

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508677
(P2025-508677A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/56 (2006.01)	C 1 2 N	15/56		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全545頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-546012(P2024-546012)	(71)出願人	597160510
(86)(22)出願日	令和5年2月2日(2023.2.2)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年8月1日(2024.8.1)		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(86)国際出願番号	PCT/US2023/061858		アメリカ合衆国1 0 5 9 1-6 7 0 7 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード7 7 7 番
(87)国際公開番号	WO2023/150623	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和5年8月10日(2023.8.10)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	63/306,040	(74)代理人	100113413
(32)優先日	令和4年2月2日(2022.2.2)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
(31)優先権主張番号	63/369,902		弁理士 飯田 貴敏
(32)優先日	令和4年7月29日(2022.7.29)	(74)代理人	100181641
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ)	(74)代理人	
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ポンペ病の処置のための抗T f R：G A A及び抗C D 6 3：G A Aの挿入

(57)【要約】

内因性A L B遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座へのマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、G A A融合タンパク質）コード配列の挿入及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、G A A融合タンパク質）コード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が提供される。核酸構築物及び組成物は、標的ゲノム遺伝子座へのマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、G A A融合タンパク質）核酸に組み込む方法、細胞においてマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、G A A融合タンパク質）を発現させる方法、グリコーゲン蓄積を低減する方法、対象のポンペ病又はG A A欠損症を処置する方法、並びに対象（新生児細胞及び対象を含む）のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法において使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対して C p G 枯渇しており、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、組成物。

【請求項 2】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対して C p G 枯渇している、組成物。

【請求項 3】

前記 C D 6 3 結合送達ドメインが、ペプチドリンカーを介して前記リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されている、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、配列番号 1 7 3 に記載の配列からなる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、コドン最適化されており、C p G 枯渇している、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4～1 8 2 及び 2 0 5～2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4～1 8 2 及び 2 0 5～2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4～1 8 2 及び 2 0 5～2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、

10

20

30

40

50

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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする、請求項 1~9 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 11】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に記載の配列を含む、請求項 1~10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に記載の配列からなる、請求項 1~11 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 13】

前記 CD63 結合送達ドメインの前記コード配列が、コドン最適化されている、又は CpG 枯渇している、請求項 1~12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 CD63 結合送達ドメインの前記コード配列が、コドン最適化されており、CpG 枯渇している、請求項 1~13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 CD63 結合送達ドメインが、抗 CD63 抗原結合タンパク質を含む、請求項 1~14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 CD63 結合送達ドメインが、抗 CD63 抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片 (scFv) を含む、請求項 1~15 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 17】

前記 CD63 結合送達ドメインが、単鎖可変断片 (scFv) である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記 scFv が、配列番号 183 に記載の配列を含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記 scFv が、配列番号 183 に記載の配列からなる、請求項 17 又は 18 に記載の組成物。

40

【請求項 20】

前記 scFv コード配列が、配列番号 184~192 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、

任意選択的に、前記 scFv コード配列が、配列番号 186 に対して少なくとも 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、請求項 1~19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

50

前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 8 3 を含む s c F v をコードし、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 8 3 を含む s c F v をコードする、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 1 8 3 を含む s c F v をコードし、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 1 8 3 を含む s c F v をコードする、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 6 に記載の配列を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 1 8 6 に記載の配列からなる、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されている、又は C p G 枯渇している、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されており、C p G 枯渇している、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 1 9 3 に記載の配列からなる、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

10

20

30

40

50

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 736 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 193 に記載の配列を含み、

10

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 196 に対して少なくとも 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 % 同一であり、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 193 に記載の配列を含み、

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 736 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 193 に記載の配列を含む、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 31】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 193 に記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 196 に対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 193 に記載の配列を含み、

30

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 736 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 193 に記載の配列を含む、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

40

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 196 に記載の配列を含み、

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 736 に記載の配列を含む、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1

50

9 6 に記載の配列からなり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含む、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、請求項 1 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項 1 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含む、請求項 1 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない、請求項 1 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、任意選択的に前記プロモーターが、肝臓特異的プロモーターである、請求項 1 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記核酸構築物が、一本鎖 DNA 又は二本鎖 DNA であり、任意選択的に、前記核酸構築物が、一本鎖 DNA である、請求項 1 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 4 ～ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項 1 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にある、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、

10

20

30

40

50

任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITRが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITRが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項43又は44に記載の組成物。

【請求項47】

前記AAVベクターが、一本鎖AAV（ssAAV）ベクターである、請求項46に記載の組成物。

【請求項48】

前記AAVベクターが、AAV8ベクター、AAV3Bベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV9ベクター、AAVrh.74ベクター、又はAAVhu.37ベクターに由来する、請求項46又は47に記載の組成物。

【請求項49】

前記AAVベクターが、組換えAAV8（rAAV8）ベクターである、請求項48に記載の組成物。

【請求項50】

前記AAVベクターが、一本鎖rAAV8ベクターである、請求項49に記載の組成物。

【請求項51】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号194～202のいずれかを含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号736に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーマームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITRが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITRが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項1～50のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項52】

前記核酸構築物が、CpG枯渇している、請求項1～51のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項53】

標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む、請求項1～51のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項54】

前記標的ゲノム遺伝子座が、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項53に記載の組成物。

【請求項55】

前記ヌクレアーゼ標的部位が、前記アルブミン遺伝子のイントロン1内にある、請求項54に記載の組成物。

【請求項56】

前記ヌクレアーゼ剤が、

（a）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、

（b）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、又は

（c）（i）Casタンパク質若しくは前記Casタンパク質をコードする核酸、及び

10

20

30

40

50

(i i) ガイドRNA若しくは前記ガイドRNAをコードする1つ以上のDNAを含み、前記ガイドRNAが、ガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含み、前記ガイドRNAが、前記Casタンパク質に結合し、前記Casタンパク質に前記ガイドRNA標的配列を標的とさせる、請求項53～55のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項57】

前記ヌクレアーゼ剤が、

(a) Casタンパク質又は前記Casタンパク質をコードする核酸、及び

(b) ガイドRNA又は前記ガイドRNAをコードする1つ以上のDNAを含み、前記ガイドRNAが、ガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含み、前記ガイドRNAが、前記Casタンパク質に結合し、前記Casタンパク質に前記ガイドRNA標的配列を標的とさせる、請求項53～55のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項58】

前記ガイドRNA標的配列が、アルブミン遺伝子のイントロン1内にある、請求項57に記載の組成物。

【請求項59】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項58に記載の組成物。

【請求項60】

(I) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号30～61のいずれかに記載の前記配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、前記DNA標的化セグメントが、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の前記配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は

20

(I I) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号30～61のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であり、任意選択的に、前記DNA標的化セグメントが、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である、請求項57～59のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項61】

前記DNA標的化セグメントが、配列番号30～61のいずれかを含み、任意選択的に、前記DNA標的化セグメントが、配列番号36、30、33、及び41のいずれかを含む、請求項57～60のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項62】

前記DNA標的化セグメントが、配列番号30～61のいずれかからなり、任意選択的に、前記DNA標的化セグメントが、配列番号36、30、33、及び41のいずれかからなる、請求項57～61のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項63】

前記ガイドRNAが、配列番号62～125のいずれかを含み、任意選択的に、前記ガイドRNAが、配列番号68、100、62、94、65、97、73、及び105のいずれかを含む、請求項57～62のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項64】

(I) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号36に記載の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は

(I I) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号36に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である、請求項57～63のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項65】

前記DNA標的化セグメントが、配列番号36を含む、請求項57～64のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項66】

50

前記DNA標的化セグメントが、配列番号36を含む、請求項57～65のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項67】

前記ガイドRNAが、配列番号68又は100を含む、請求項57～66のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項68】

前記ガイドRNAが、RNAの形態である、請求項57～67のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項69】

前記ガイドRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項57～68のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項70】

前記少なくとも1つの修飾が、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項69に記載の組成物。

【請求項71】

前記少なくとも1つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項69又は70に記載の組成物。

【請求項72】

前記少なくとも1つの修飾が、前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む、請求項69～71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項73】

前記少なくとも1つの修飾が、前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む、請求項69～72のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項74】

前記少なくとも1つの修飾が、前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項69～73のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項75】

前記少なくとも1つの修飾が、前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項69～74のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項76】

前記少なくとも1つの修飾が、前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項69～75のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項77】

前記少なくとも1つの修飾が、前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項69～76のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項78】

前記少なくとも1つの修飾が、(i)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項69～77のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項79】

10

20

30

40

50

前記ガイドRNAが、単一のガイドRNA (sgRNA) である、請求項69～78のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項80】

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号100を含み、前記ガイドRNAが、(i) 前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) 前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) 前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv) 前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項69～79のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項81】

前記Casタンパク質が、Cas9タンパク質である、請求項57～80のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項82】

前記Cas9タンパク質が、化膿連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) Cas9タンパク質、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) Cas9タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) Cas9タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) Cas9タンパク質、又は髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis) Cas9タンパク質に由来する、請求項81に記載の組成物。

20

【請求項83】

前記Casタンパク質が、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質に由来する、請求項81に記載の組成物。

【請求項84】

前記Casタンパク質が、配列番号11に記載の配列を含む、請求項57～83のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項85】

前記Casタンパク質をコードする前記核酸が、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項57～84のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項86】

前記組成物が、前記Casタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Casタンパク質をコードするmRNAを含む、請求項57～85のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項87】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項86に記載の組成物。

【請求項88】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、1つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている、請求項86又は87に記載の組成物。

40

【請求項89】

前記修飾ウリジンが、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンである、請求項88に記載の組成物。

【請求項90】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンで完全に置換されている、請求項88又は89に記載の組成物。

【請求項91】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、5'キャップを含む、請求項86～90のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 9 2】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、ポリアデニル化配列を含む、請求項 8 6 ～ 9 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9 3】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む、請求項 8 6 ～ 9 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9 4】

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュドウリジン又は N 1 -メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む、請求項 5 7 ～ 9 3 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 9 5】

前記ガイド R N A が R N A の形態であり、前記ガイド R N A が、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含み、

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む、請求項 5 7 ～ 9 4 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 9 6】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 4 ～ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

30

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 r A A V 8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 9 5 に記載の組成物。

【請求項 9 7】

前記ガイド R N A が R N A の形態であり、前記ガイド R N A が、配列番号 1 0 0 を含み、前記ガイド R N A が、(i) 前記ガイド R N A の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) 前記ガイド R N A の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) 前記ガイド R N A の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2' -O -メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) 前記ガイド R N A の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2' -O -メチル修飾ヌクレオチドを含み、

40

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュドウリジン又は N 1 -メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む、請求項 5 7 ～ 9 4 のいずれか一項に記載の組成物

50

。

【請求項 98】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号194～202のいずれかを含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号736に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復(ITS)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITSが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITSが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項97に記載の組成物。

【請求項 99】

前記Casタンパク質又は前記Casタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドRNA又は前記ガイドRNAをコードする前記1つ以上のDNAが、脂質ナノ粒子と会合している、請求項57～98のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 100】

前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む、請求項99に記載の組成物。

【請求項 101】

前記カチオン性脂質が、脂質A((9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート)である、請求項100に記載の組成物。

【請求項 102】

前記中性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン又は1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)である、請求項100又は101に記載の組成物。

【請求項 103】

前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項100～102のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 104】

前記ステルス脂質が、1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2k-DMG)である、請求項100～103のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 105】

前記カチオン性脂質が脂質Aであり、前記中性脂質がDSPCであり、前記ヘルパー脂質がコレステロールであり、前記ステルス脂質がPEG2k-DMGである、請求項100～104のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 106】

前記脂質ナノ粒子が、以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで4つの脂質を含む、請求項99～105のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 107】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号68又は10

10

20

30

40

50

0 を含み、

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、

前記ガイド RNA 及び前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、脂質 A、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A、約 9 モル % の D S P C、約 3 8 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の P E G 2 k - D M G と会合している、請求項 9 9 ~ 1 0 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0 8】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 r A A V 8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも 1 つの末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 1 0 7 に記載の組成物。

【請求項 1 0 9】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、

前記ガイド RNA が RNA の形態であり、前記ガイド RNA が、配列番号 1 0 0 を含み、前記ガイド RNA が、(i) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュードウリジン又は N 1 - メチル - シュードウリジン、任意選択的に N 1 - メチル - シュードウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、

前記ガイド RNA 及び前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、脂質 A、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A、約 9 モル % の D S P C、約 3 8 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の P E G 2 k - D M G と会合している、請求項 5 7 ~ 1 0 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 1 0】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7

10

20

30

40

50

36に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーマームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITRが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITRが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項109に記載の組成物。

【請求項111】

細胞又は細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードする前記核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項112】

細胞若しくは細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、又は細胞若しくは細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項113】

対象の細胞又は細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードする前記核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項114】

対象の細胞若しくは細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、又は対象の細胞若しくは細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項115】

必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項116】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項117】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法における使用のための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項118】

必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法において使用するための、請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項119】

請求項1～110のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項120】

前記核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれ、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記標的ゲノム遺伝子座から発現される、又は前記核酸構築物が、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン1に組み込まれ、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記内因性アルブミン遺伝子座から発現される、請求項119に記載の細胞。

【請求項121】

前記細胞が、肝臓細胞である、請求項119又は120に記載の細胞。

【請求項122】

前記肝臓細胞が、肝細胞である、請求項121に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 3】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 1 9 ～ 1 2 2 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 2 4】

前記細胞が、新生児細胞である、請求項 1 1 9 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 2 5】

前記新生児細胞が、出生後 2 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 1 2 4 に記載の細胞。

【請求項 1 2 6】

前記新生児細胞が、出生後 1 2 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 1 2 4 に記載の細胞。

【請求項 1 2 7】

前記新生児細胞が、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 1 2 4 に記載の細胞。

【請求項 1 2 8】

前記新生児細胞が、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 1 2 4 に記載の細胞。

【請求項 1 2 9】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項 1 1 9 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 3 0】

前記細胞が、インビボである、請求項 1 1 9 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 3 1】

前記細胞が、インビトロ又はエクスビボである、請求項 1 1 9 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 3 2】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は細胞の集団に投与することを含み、任意選択的に、前記送達ドメインが C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインであり、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 1 3 3】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は細胞の集団に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 1 3 4】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記細胞又は前記細胞の集団に請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインであり、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞又は細胞の集団において発現される、方法。

【請求項 1 3 5】

細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって

10

20

30

40

50

て、前記細胞又は前記細胞の集団に請求項 53～110 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63 結合送達ドメイン又は TfR 結合送達ドメインであり、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 136】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された CD63 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 1～52 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞又は細胞の集団において発現される、方法。

【請求項 137】

細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合された CD63 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 53～110 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 CD63 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 138】

前記細胞が、肝臓細胞である、又は前記細胞の集団が、肝臓細胞の集団である、請求項 132～137 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 139】

前記細胞が、肝細胞である、又は前記細胞の集団が、肝細胞の集団である、請求項 132～138 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 140】

前記細胞が、ヒト細胞である、又は前記細胞の集団が、ヒト細胞の集団である、請求項 132～139 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 141】

前記細胞が、新生児細胞である、又は前記細胞の集団が、新生児細胞の集団である、請求項 132～140 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 142】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 24 週間以内のヒト新生児対象に由来し、任意選択的に、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 12 週間以内のヒト新生児対象に由来する、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 143】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象に由来し、任意選択的に、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象に由来する、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 144】

前記細胞が、新生児細胞ではない、又は前記細胞の集団が、新生児細胞の集団ではない、請求項 132～140 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 145】

前記細胞が、インビトロ若しくはエクスピボである、又は前記細胞の集団が、インビト

10

20

30

40

50

口若しくはエキスピボである、請求項 1 3 2 ～ 1 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記細胞が、対象におけるインピボである、又は前記細胞の集団が、対象におけるインピボである、請求項 1 3 2 ～ 1 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を対象の細胞内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインであり、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 1 4 8】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を対象の細胞内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 1 4 9】

対象の細胞においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、任意選択的に、前記送達ドメインが C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインであり、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞において発現される、方法。

【請求項 1 5 0】

対象の細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインであり、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 1 5 1】

対象の細胞においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞において発現される、方法。

【請求項 1 5 2】

対象の細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を

10

20

30

40

50

作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項153】

前記発現されたマルチドメイン治療用タンパク質が、前記対象の骨格筋組織及び心臓組織に送達され、それによって内在化される、請求項149～152のいずれか一項に記載の方法。

【請求項154】

前記細胞が、肝臓細胞である、請求項147～153のいずれか一項に記載の方法。

【請求項155】

前記細胞が、肝細胞である、請求項147～154のいずれか一項に記載の方法。

【請求項156】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項147～155のいずれか一項に記載の方法。

【請求項157】

前記細胞が、新生児細胞である、請求項147～156のいずれか一項に記載の方法。

【請求項158】

前記新生児対象が出生後24週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が出生後12週間以内のヒト対象である、請求項157に記載の方法。

【請求項159】

前記新生児対象が出生後8週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が出生後4週間以内のヒト対象である、請求項157に記載の方法。

【請求項160】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項147～156のいずれか一項に記載の方法。

【請求項161】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項1～52のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されて、前記対象において発現され、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法。

【請求項162】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項53～110のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法。

【請求項163】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項1～52のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現される、方法。

【請求項164】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項53～110のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメイン

10

20

30

40

50

を含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 1 6 5】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記対象において発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減し、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、方法。

【請求項 1 6 6】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減し、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、方法。

【請求項 1 6 7】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現され、前記組織中のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項 1 6 8】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項 1 6 9】

前記対象が、ポンペ病を有する、請求項 1 4 6 ～ 1 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン処置用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記対象において発現され、それによって前記ポンペ病を処置し、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、方法。

【請求項 1 7 1】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 5 3 ～ 1 1 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置し、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 172】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 1～52 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記対象において発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項 173】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 53～110 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 CD63 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項 174】

前記ポンペ病が、乳児発症ポンペ病である、請求項 169～173 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 175】

前記ポンペ病が、遅発性ポンペ病である、請求項 169～173 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 176】

前記対象が、ヒト対象である、請求項 146～175 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 177】

前記対象が新生児対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が、出生後 24 週間以内、出生後 12 週間以内、出生後 8 週間以内、又は出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 146～176 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 178】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項 146～176 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 179】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす、請求項 146～178 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 180】

前記方法が、前記対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を減少させ、任意選択的に、前記方法が、前記対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を減少させ、任意選択的に、前記方法が、同じ年齢の野生型レベルに匹敵する、前記対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲンレベルの減少をもたらす、請求項 146～179 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 181】

前記方法が、対照対象と比較して、前記対象の筋力を改善する、又は前記対象の筋力の喪失を予防する、請求項 146～180 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 182】

前記方法が、前記対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす、請求項 181 に記載の方法。

【請求項 183】

必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記対象に請求項 1～52 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記対象において発現され、それによって前記対象のポン

10

20

30

40

50

ペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減し、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法。

【請求項184】

請求項53～110のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法。

前記ヌクレアーゼ剤が前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減し、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法。

10

【請求項185】

必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、1～52のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項186】

必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、請求項53～110のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

20

前記ヌクレアーゼ剤が前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項187】

前記ポンペ病が、乳児発症ポンペ病である、請求項183～186のいずれか一項に記載の方法。

【請求項188】

前記ポンペ病が、遅発性ポンペ病である、請求項183～186のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項189】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソームα-グルコシダーゼをもたらす、請求項183～188のいずれか一項に記載の方法。

【請求項190】

前記対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する、請求項183～189のいずれか一項に記載の方法。

【請求項191】

前記対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する、請求項183～190のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項192】

前記対象が、ヒト対象である、請求項183～191のいずれか一項に記載の方法。

【請求項193】

前記対象が、新生児対象である、請求項183～192のいずれか一項に記載の方法。

【請求項194】

前記新生児対象が出生後24週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が出生後12週間以内のヒト対象である、請求項193に記載の方法。

【請求項195】

前記新生児対象が出生後8週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象

50

が出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 193 に記載の方法。

【請求項 196】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項 183～192 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 197】

前記方法が、前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす、請求項 146～196 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 198】

前記方法が、前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの上昇をもたらす、請求項 146～197 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 199】

前記方法が、少なくとも約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項 146～198 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 200】

前記方法が、少なくとも約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項 146～199 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 201】

前記方法が、約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項 146～200 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 202】

前記方法が、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項 146～201 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 203】

正常の少なくとも約 40%、正常の少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、又は正常の 100% のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する、請求項 146～202 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 204】

(I) 前記対象が、乳児発症ポンペ病を有し、前記方法が、正常の少なくとも約 1% 又は約 1% 超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する、又は

(II) 前記対象が、遅発性ポンペ病を有し、前記方法が、正常の少なくとも約 40% 又は正常の約 40% 超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する、請求項 146～203 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 205】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の 24 週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 50% である、請求項 146～204 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 206】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の1年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である、請求項146～205のいずれか一項に記載の方法。

【請求項207】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である、請求項146～206のいずれか一項に記載の方法。

【請求項208】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の2年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である、請求項146～207のいずれか一項に記載の方法。

【請求項209】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の2年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である、請求項146～208のいずれか一項に記載の方法。

【請求項210】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である、請求項146～209のいずれか一項に記載の方法。

【請求項211】

前記方法が、前記対象に前記核酸構築物を投与する前に、前記対象における既存のAAV免疫性を評価することを更に含む、請求項146～210のいずれか一項に記載の方法。

【請求項212】

前記既存のAAV免疫性が、既存のAAV8免疫性である、請求項211に記載の方法。

【請求項213】

既存のAAV免疫性を評価することが、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む、請求項211又は212に記載の方法。

【請求項214】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸と同時に投与される、請求項132～213のいずれか一項に記載の方法。

【請求項215】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸と同時に投与されない、請求項132～213のいずれか一項に記載の方法。

【請求項216】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸の前に投与される、請求項215に記載の方法。

【請求項217】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸の後に投与される、請求項215に記載の方法。

【請求項218】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列

10

20

30

40

50

に対して C p G 枯渇している、組成物。

【請求項 2 1 9】

前記 T f R 結合送達ドメインが、ペプチドリinkerを介して前記リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合している、請求項 2 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 2 0】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く、請求項 2 1 8 又は 2 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 2 1】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む、請求項 2 1 8 ~ 2 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2 2】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、配列番号 1 7 3 に記載の配列からなる、請求項 2 1 8 ~ 2 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2 3】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、コドン最適化されており、C p G 枯渇している、請求項 2 1 8 ~ 2 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2 4】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である、請求項 2 1 8 ~ 2 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2 5】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする、請求項 2 1 8 ~ 2 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2 6】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする、請求項 2 1 8 ~ 2 2 5 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2 7】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含む、請求項 2 1 8 ~ 2 2 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2 8】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に記載の配列からなる、請求項 2 1 8 ~ 2 2 7 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 2 2 9】

前記 T f R 結合送達ドメインの前記コード配列が、コドン最適化されている、又は C p G 枯渇している、請求項 2 1 8 ~ 2 2 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3 0】

前記 T f R 結合送達ドメインの前記コード配列が、コドン最適化されており、C p G 枯渇している、請求項 2 1 8 ~ 2 2 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3 1】

前記 T f R 結合送達ドメインが、抗 T f R 抗原結合タンパク質を含む、請求項 2 1 8 ~ 2 3 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3 2】

前記抗 T f R 抗原結合タンパク質が、

(i) 配列番号 2 1 7、2 2 7、2 3 7、2 4 7、2 5 7、2 6 7、2 7 7、2 8 7、2 9 7、3 0 7、3 1 7、3 2 7、3 3 7、3 4 7、3 5 7、3 6 7、3 7 7、3 8 7、3 9 7、4 0 7、4 1 7、4 2 7、4 3 7、4 4 7、4 5 7、4 6 7、4 7 7、4 8 7、4 9 7、5 0 7、5 1 7、若しくは 5 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R の前記 H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む H C V R、及び／又は

(i i) 配列番号 2 2 2、2 3 2、2 4 2、2 5 2、2 6 2、2 7 2、2 8 2、2 9 2、3 0 2、3 1 2、3 2 2、3 3 2、3 4 2、3 5 2、3 6 2、3 7 2、3 8 2、3 9 2、4 0 2、4 1 2、4 2 2、4 3 2、4 4 2、4 5 2、4 6 2、4 7 2、4 8 2、4 9 2、5 0 2、5 1 2、5 2 2、又は 5 3 2（又はその変異体）を含む L C V R の前記 L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む L C V R、を含む、請求項 2 3 1 に記載の組成物。

30

【請求項 2 3 3】

前記抗 T f R 抗原結合タンパク質が

(1) 配列番号 2 1 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R の前記 H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む H C V R、並びに配列番号 2 2 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R の前記 L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む L C V R、

(2) 配列番号 2 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R の前記 H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む H C V R、並びに配列番号 2 3 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R の前記 L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む L C V R、

40

(3) 配列番号 2 3 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R の前記 H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む H C V R、並びに配列番号 2 4 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R の前記 L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む L C V R、

(4) 配列番号 2 4 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R の前記 H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む H C V R、並びに配列番号 2 5 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R の前記 L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む L C V R、

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

(17) 配列番号377に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCV Rの前記HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCV R、並びに配列番号382に記載

(29) 配列番号497に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVRの前記HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号502に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVRの前記LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、

(30) 配列番号507に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCV Rの前記HCD R1、HCD R2、及びHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号512に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCV Rの前記LCD R1、LCD R2、及びLCD R3を含むLCV R、

(31) 配列番号517に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCV Rの前記HCD R1、HCD R2、及びHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号522に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCV Rの前記LCD R1、LCD R2、及びLCD R3を含むLCV R、

(32) 配列番号527に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCV Rの前記HCD R1、HCD R2、及びHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号532に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCV Rの前記LCD R1、LCD R2、及びLCD R3を含むLCV R、を含む、請求項231又は232に記載の組成物。

10

【請求項234】

前記抗TfR抗原結合タンパク質が、

(1) 配列番号437に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCV Rの前記HCD R1、HCD R2、及びHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号442に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCV Rの前記LCD R1、LCD R2、及びLCD R3を含むLCV R、又は

(2) 配列番号457に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCV Rの前記HCD R1、HCD R2、及びHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号462に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCV Rの前記LCD R1、LCD R2、及びLCD R3を含むLCV R、を含む、請求項231～233のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項235】

前記抗TfR抗原結合タンパク質が、

(a) 配列番号218に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R1、配列番号219に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R2、及び配列番号220に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号223に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R1、配列番号224に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R2、及び配列番号225に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R3を含むLCV R、

30

(b) 配列番号228に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R1、配列番号229に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R2、及び配列番号230に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号233に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R1、配列番号234に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R2、及び配列番号235に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R3を含むLCV R、

(c) 配列番号238に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R1、配列番号239に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R2、及び配列番号240に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号243に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R1、配列番号244に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R2、及び配列番号245に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R3を含むLCV R、

40

(d) 配列番号248に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R1、配列番号249に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R2、及び配列番号250に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R3を含むHCV R、並びに配列番号253に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R1、配列番号254に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R2、及び配列番号255に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCD R3を含むLCV R、

(e) 配列番号258に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCD R1、配

50

(m) 配列番号 338 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR1、配列番号 339 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR2、及び配列番号 340 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR3 を含む HCVR、並び

50

(a d) 配列番号 508 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR1、

50

配列番号 509 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR2、及び配列番号 510 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR3 を含む HCV R、並びに配列番号 513 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR1、配列番号 514 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR2、及び配列番号 515 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR3 を含む LCV R、

（a e）配列番号 518 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR1、配列番号 519 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR2、及び配列番号 520 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR3 を含む HCV R、並びに配列番号 523 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR1、配列番号 524 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR2、及び配列番号 525 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR3 を含む LCV R、及び／又は

（a f）配列番号 528 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR1、配列番号 529 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR2、及び配列番号 530 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR3 を含む HCV R、並びに配列番号 533 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR1、配列番号 534 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR2、及び配列番号 535 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR3 を含む LCV R を含む、請求項 231～234 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 236】

前記抗 T f R 抗原結合タンパク質が、

（a）配列番号 438 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR1、配列番号 439 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR2、及び配列番号 440 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR3 を含む HCV R、並びに配列番号 443 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR1、配列番号 444 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR2、及び配列番号 445 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR3 を含む LCV R、又は

（b）配列番号 458 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR1、配列番号 459 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR2、及び配列番号 460 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCDR3 を含む HCV R、並びに配列番号 463 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR1、配列番号 464 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCDR2、及び配列番号 465 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R3 を含む LCV R を含む、請求項 231～235 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 237】

前記抗 T f R 抗原結合タンパク質が、

（i）配列番号 217 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 222 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

（i i）配列番号 227 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 232 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

（i i i）配列番号 237 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 242 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

（i v）配列番号 247 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 252 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

（v）配列番号 257 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 262 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

（v i）配列番号 267 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 272 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

（v i i）配列番号 277 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R、及び配列番号 282 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R、

(x x x i i) 配列番号 5 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V

50

R、及び配列番号532に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRを含む、請求項231～236のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項238】

前記抗TfR抗原結合タンパク質が、

（i）配列番号437に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号442に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、又は

（ii）配列番号457に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号462に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRを含む、請求項231～237のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項239】

前記TfR結合送達ドメインが、抗TfR抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片（scFv）を含む、請求項218～238のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項240】

前記TfR結合送達ドメインが、単鎖可変断片（scFv）であり、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、以下の配向：N'－重鎖可変領域－軽鎖可変領域－リソソームα－グルコシダーゼ－C'又はN'－軽鎖可変領域－重鎖可変領域－リソソームα－グルコシダーゼ－C'、で配置されたドメインを含み、

任意選択的に、前記scFv及びリソソームα－グルコシダーゼが、ペプチドリンカー、任意選択的に、－（GGGGS）_m（配列番号600）であるペプチドリンカーによって接続されており、mが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10であり、

任意選択的に、前記scFv可変領域が、ペプチドリンカー、任意選択的に、－（GGGGS）_m（配列番号600）であるペプチドリンカーによって接続されており、mが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である、請求項239に記載の組成物。

【請求項241】

前記マルチドメイン治療用タンパク質が、重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）、並びにリソソームα－グルコシダーゼを含み、前記V_H、V_L及びリソソームα－グルコシダーゼが、以下：

（i）V_L－V_H－リソソームα－グルコシダーゼ、

（ii）V_H－V_L－リソソームα－グルコシダーゼ、

（iii）V_L－〔（GGGGS）₃〕－V_H－〔（GGGGS）₂〕－リソソームα－グルコシダーゼ、又は

（iv）V_H－〔（GGGGS）₃〕－V_L－〔（GGGGS）₂〕－リソソームα－グルコシダーゼのように配置されている、請求項240に記載の組成物。

【請求項242】

前記scFvが、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記scFvが、配列番号554に記載の配列を含む、請求項240又は241に記載の組成物。

【請求項243】

前記scFvが、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記scFvが、配列番号554に記載の配列からなる、請求項240～242のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項244】

前記scFvコード配列が、配列番号587～599のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、

任意選択的に、前記scFvコード配列が、配列番号593～595のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なく

10

20

30

40

50

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% 同一であり、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593 に対して少なくとも 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、請求項 218～243 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 245】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 587～599 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 540、549、551、及び 554 のいずれかを含む s c F v をコードし、

10

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593～595 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 554 を含む s c F v をコードし、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 554 を含む s c F v をコードする、請求項 218～244 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 246】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 587～599 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 540、549、551、及び 554 のいずれかを含む s c F v をコードし、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593～595 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 554 を含む s c F v をコードし、

30

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593 に対して少なくとも 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% 同一であり、前記 s c F v コード配列は、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 554 を含む s c F v をコードする、請求項 218～245 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 247】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 587～599 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593～595 のいずれかに記載の配列を含み、

40

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593 に記載の配列を含む、請求項 218～246 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 248】

前記 s c F v コード配列が、配列番号 587～599 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593～595 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記 s c F v コード配列が、配列番号 593 に記載の配列からなる、請

50

求項 2 1 8 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 4 9】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されている、又は C p G 枯渇している、請求項 2 1 8 ～ 2 4 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5 0】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されており、C p G 枯渇している、請求項 2 1 8 ～ 2 4 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5 1】

前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 0 ～ 5 7 3 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 3 に記載の配列を含む、請求項 2 1 8 ～ 2 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5 2】

前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 0 ～ 5 7 3 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 3 に記載の配列からなる、請求項 2 1 8 ～ 2 5 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5 3】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 7 4 ～ 5 8 6 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 ～ 5 8 6 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む、請求項 2 1 8 ～ 2 5 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5 4】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 7 4 ～ 5 8 6 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 0 ～ 5 7 3 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 ～ 5 8 6 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 3 に記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 5 7 3 に記載の配列を含み、

10

20

30

40

50

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 733 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含み、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 573 に記載の配列を含む、請求項 218～252 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 255】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 574～586 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列を含み、

10

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584～586 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 573 に記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584 に対して少なくとも 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% 同一であり、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 573 に記載の配列を含み、

20

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 733 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含み、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、配列番号 573 に記載の配列を含む、請求項 218～254 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 256】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 733 に記載の配列を含む、請求項 218～255 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 257】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列からなり、

40

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584 に記載の配列からなり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 733 に記載の配列を含む、請求項 218～256 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 258】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の上流にス

50

プライスアクセプターを含む、請求項 2 1 8 ～ 2 5 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5 9】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む、請求項 2 1 8 ～ 2 5 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6 0】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む、請求項 2 1 8 ～ 2 5 9 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 2 6 1】

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項 2 1 8 ～ 2 6 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6 2】

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含む、請求項 2 1 8 ～ 2 6 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6 3】

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない、請求項 2 1 8 ～ 2 6 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6 4】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、プロモーターに作動可能に連結され、任意選択的に、前記プロモーターが、肝臓特異的プロモーターである、請求項 2 1 8 ～ 2 6 2 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 2 6 5】

前記核酸構築物が、一本鎖 DNA 又は二本鎖 DNA であり、任意選択的に、前記核酸構築物が、一本鎖 DNA である、請求項 2 1 8 ～ 2 6 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6 6】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ～ 1 8 2 及び 2 0 5 ～ 2 1 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 7 4 ～ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 ～ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 3 に記載の配列を含み、

30

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項 2 1 8 ～ 2 6 5 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 2 6 7】

前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項 2 1 8 ～ 2 6 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6 8】

前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にある、請求項 2 6 7 に記載の組成物。

【請求項 2 6 9】

前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 2 6 8 に記載の組成物。

【請求項 2 7 0】

前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、

50

任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITRが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITRが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項267又は268に記載の組成物。

【請求項271】

前記AAVベクターが、一本鎖AAV（ssAAV）ベクターである、請求項270に記載の組成物。

【請求項272】

前記AAVベクターが、AAV8ベクター、AAV3Bベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV9ベクター、AAVrh.74ベクター、又はAAVhu.37ベクターに由来する、請求項270又は271に記載の組成物。

【請求項273】

前記AAVベクターが、組換えAAV8（rAAV8）ベクターである、請求項272に記載の組成物。

【請求項274】

前記AAVベクターが、一本鎖rAAV8ベクターである、請求項273に記載の組成物。

【請求項275】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号574～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号584～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号733に記載の配列を含み、

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジアーームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITRが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITRが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項218～274のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項276】

前記核酸構築物が、CpG枯渇している、請求項218～275のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項277】

標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む、請求項218～276のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項278】

前記標的ゲノム遺伝子座が、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項277に記載の組成物。

【請求項279】

前記ヌクレアーゼ標的部位が、前記アルブミン遺伝子のイントロン1内にある、請求項278に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 280】

前記ヌクレアーゼ剤が、

(a) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、

(b) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、又は

(c) (i) Cas タンパク質若しくは前記 Cas タンパク質をコードする核酸、及び

(ii) ガイド RNA 若しくは前記ガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、前記ガイド RNA が、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、前記ガイド RNA が、前記 Cas タンパク質に結合し、前記 Cas タンパク質に前記ガイド RNA 標的配列を標的とさせる、請求項 277～279 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 281】

前記ヌクレアーゼ剤が、

(a) Cas タンパク質又は前記 Cas タンパク質をコードする核酸、及び

(b) ガイド RNA 又は前記ガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、前記ガイド RNA が、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、前記ガイド RNA が、前記 Cas タンパク質に結合し、前記 Cas タンパク質に前記ガイド RNA 標的配列を標的とさせる、請求項 277～279 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 282】

前記ガイド RNA 標的配列が、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある、請求項 281 に記載の組成物。

20

【請求項 283】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項 282 に記載の組成物。

【請求項 284】

(I) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 30～61 のいずれかに記載の前記配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかに記載の前記配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は

(II) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 30～61 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一であり、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である、請求項 281～283 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 285】

前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 30～61 のいずれかを含み、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかを含む、請求項 281～284 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 286】

前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 30～61 のいずれかからなり、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかからなる、請求項 281～285 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 287】

前記ガイド RNA が、配列番号 62～125 のいずれかを含み、任意選択的に、前記ガイド RNA が、配列番号 68、100、62、94、65、97、73、及び 105 のいずれかを含む、請求項 281～286 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 288】

(I) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36 に記載の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は

50

(I I) 前記 D N A 標的化セグメントが、配列番号 3 6 に対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である、請求項 2 8 1 ~ 2 8 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8 9】

前記 D N A 標的化セグメントが、配列番号 3 6 を含む、請求項 2 8 1 ~ 2 8 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 0】

前記 D N A 標的化セグメントが、配列番号 3 6 からなる、請求項 2 8 1 ~ 2 8 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 1】

前記ガイド R N A が、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含む、請求項 2 8 1 ~ 2 9 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 2】

前記ガイド R N A が、R N A の形態である、請求項 2 8 1 ~ 2 9 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 3】

前記ガイド R N A が、少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 2 8 1 ~ 2 9 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 4】

前記少なくとも 1 つの修飾が、2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 2 9 3 に記載の組成物。

【請求項 2 9 5】

前記少なくとも 1 つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 2 9 3 又は 2 9 4 に記載の組成物。

【請求項 2 9 6】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド R N A の前記 5' 末端の前記最初の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上での修飾を含む、請求項 2 9 3 ~ 2 9 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 7】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド R N A の前記 3' 末端の前記最後の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上での修飾を含む、請求項 2 9 3 ~ 2 9 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 8】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド R N A の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 2 9 3 ~ 2 9 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 9 9】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド R N A の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 2 9 3 ~ 2 9 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 0 0】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド R N A の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 2 9 3 ~ 2 9 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 0 1】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド R N A の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 2 9 3 ~ 3 0 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 0 2】

前記少なくとも 1 つの修飾が、(i) 前記ガイド R N A の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) 前記ガイド R N A の前記 3' 末

10

20

30

40

50

端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項293~301のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項303】

前記ガイドRNAが、単一のガイドRNA(sgRNA)である、請求項281~302のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項304】

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号100を含み、前記ガイドRNAが、(i)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項281~303のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項305】

前記Casタンパク質が、Cas9タンパク質である、請求項281~304のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項306】

前記Cas9タンパク質が、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質、黄色ブドウ球菌Cas9タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニCas9タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルスCas9タンパク質、又は髄膜炎菌Cas9タンパク質に由来する、請求項305に記載の組成物。

【請求項307】

前記Casタンパク質が、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質に由来する、請求項305に記載の組成物。

【請求項308】

前記Casタンパク質が、配列番号11に記載の配列を含む、請求項281~307のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項309】

前記Casタンパク質をコードする前記核酸が、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項281~308のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項310】

前記組成物が、前記Casタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Casタンパク質をコードするmRNAを含む、請求項281~309のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項311】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項310に記載の組成物。

【請求項312】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、1つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている、請求項310又は311に記載の組成物。

【請求項313】

前記修飾ウリジンが、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンである、請求項312に記載の組成物。

【請求項314】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、シュードウリジン又はN1-メチ

10

20

30

40

50

ル-シュードウリジン、任意選択的にN1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されている、請求項312又は313に記載の組成物。

【請求項315】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、5'キャップを含む、請求項310～314のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項316】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、ポリアデニル化配列を含む、請求項310～315のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項317】

前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含む、請求項310～316のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項318】

前記組成物が、前記Casタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Casタンパク質をコードするmRNAを含み、前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、シュードウリジン又はN1-メチル-シュードウリジン、任意選択的にN1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む、請求項281～317のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項319】

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号68又は100を含み、 20

前記組成物が、前記Casタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Casタンパク質をコードするmRNAを含み、前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含む、請求項281～318のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項320】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号574～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号584～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号733に記載の配列を含み、 30

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、 40

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復(ITER)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITERが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITERが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項319に記載の組成物。

【請求項321】

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号100を含み、前記ガイドRNAが、(i)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)前記ガイドRNAの 50

前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、

前記組成物が、前記 Cas タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、シュドウリジン又は N1 - メチル - シュドウリジン、任意選択的に N1 - メチル - シュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む、請求項 281 ~ 318 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 322】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α - グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記リソソーム α - グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 574 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 733 に記載の配列を含み、

20

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 rAAV8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 ITR が、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 ITR が、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 321 に記載の組成物。

【請求項 323】

30

前記 Cas タンパク質又は前記 Cas タンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイド RNA 又は前記ガイド RNA をコードする前記 1 つ以上の DNA が、脂質ナノ粒子と合している、請求項 281 ~ 322 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 324】

前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む、請求項 323 に記載の組成物。

【請求項 325】

前記カチオン性脂質が、脂質 A ((9 Z , 12 Z) - 3 - ((4 , 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ - 9 , 12 - ジエノアート) である、請求項 324 に記載の組成物。

40

【請求項 326】

前記中性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン又は 1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC) である、請求項 324 又は 325 に記載の組成物。

【請求項 327】

前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項 324 ~ 326 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 328】

前記ステルス脂質が、1 , 2 - ジミリストイル - rac - グリセロ - 3 - メトキシポリ

50

エチレングリコール-2000 (PEG2k-DMG) である、請求項324~327のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項329】

前記カチオン性脂質が脂質Aであり、前記中性脂質がDSPCであり、前記ヘルパー脂質がコレステロールであり、前記ステルス脂質がPEG2k-DMGである、請求項324~328のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項330】

前記脂質ナノ粒子が、以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで4つの脂質を含む、請求項323~329のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項331】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号68又は100を含み、

前記組成物が、前記Casタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Casタンパク質をコードするmRNAを含み、前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、

前記ガイドRNA及び前記Casタンパク質をコードする前記mRNAが、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGと会合している、請求項281~330のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項332】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号574~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号584~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号733に記載の配列を含み、

30

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復(ITER)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITERが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITERが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項331に記載の組成物。

40

【請求項333】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、

前記ガイドRNAがRNAの形態であり、前記ガイドRNAが、配列番号100を含み、前記ガイドRNAが、(i)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)前記ガイドRNAの前記5'末端の前記最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)前記ガイドRNAの前記3'末端の前記最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、

50

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュドウリジン又は N 1 -メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、

前記ガイド R N A 及び前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、脂質 A、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A、約 9 モル % の D S P C、約 3 8 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の P E G 2 k - D M G と会合している、請求項 2 8 1 ~ 3 3 0 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 3 3 4】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 7 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、配列番号 5 8 4 ~ 5 8 6 のいずれかに示される配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 4 に記載の配列を含み、任意選択的に、前記核酸構築物が、配列番号 7 3 3 に記載の配列を含み、

20

前記核酸構築物が、前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 r A A V 8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 3 3 3 に記載の組成物。

30

【請求項 3 3 5】

細胞又は細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードする前記核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3 6】

細胞若しくは細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、又は細胞若しくは細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3 7】

対象の細胞又は細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードする前記核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 3 3 8】

対象の細胞若しくは細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、又は対象の細胞若しくは細胞の集団において前記マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3 9】

必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法における

50

使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4 0】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法における使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4 1】

必要とする対象におけるポンペ病を処置する方法における使用のための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4 2】

必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法では使用するための、請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4 3】

請求項 2 1 8 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項 3 4 4】

前記核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれ、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記標的ゲノム遺伝子座から発現される、又は前記核酸構築物が、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン 1 に組み込まれ、前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記内因性アルブミン遺伝子座から発現される、請求項 3 4 3 に記載の細胞。

【請求項 3 4 5】

前記細胞が、肝臓細胞である、請求項 3 4 3 又は 3 4 4 に記載の細胞。

【請求項 3 4 6】

前記肝臓細胞が、肝細胞である、請求項 3 4 3 ~ 3 4 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 4 7】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 3 4 3 ~ 3 4 6 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 4 8】

前記細胞が、新生児細胞である、請求項 3 4 3 ~ 3 4 7 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 4 9】

前記新生児細胞が、出生後 2 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 4 8 に記載の細胞。

【請求項 3 5 0】

前記新生児細胞が、出生後 1 2 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 4 8 に記載の細胞。

【請求項 3 5 1】

前記新生児細胞が、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 4 8 に記載の細胞。

【請求項 3 5 2】

前記新生児細胞が、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 4 8 に記載の細胞。

【請求項 3 5 3】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項 3 4 3 ~ 3 4 7 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 5 4】

前記細胞が、インビボである、請求項 3 4 3 ~ 3 5 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 5 5】

前記細胞が、インビトロ又はエクスピボである、請求項 3 4 3 ~ 3 5 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 5 6】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

10

20

30

40

50

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 3 5 7】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 2 1 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞又は細胞の集団において発現される、方法。

【請求項 3 5 8】

細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 3 5 9】

前記細胞が肝臓細胞である、又は前記細胞の集団が肝臓細胞の集団である、任意選択的に、前記細胞が肝細胞である、又は前記細胞の集団が肝細胞の集団である、請求項 3 5 6 ~ 3 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6 0】

前記細胞が、ヒト細胞である、又は前記細胞の集団が、ヒト細胞の集団である、請求項 3 5 6 ~ 3 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6 1】

前記細胞が、新生児細胞である、又は前記細胞の集団が、新生児細胞の集団である、請求項 3 5 6 ~ 3 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6 2】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 2 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 6 1 に記載の方法。

【請求項 3 6 3】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 1 2 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 6 1 に記載の方法。

【請求項 3 6 4】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 6 1 に記載の方法。

【請求項 3 6 5】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 3 6 1 に記載の方法。

【請求項 3 6 6】

前記細胞が、新生児細胞ではない、又は前記細胞の集団が、新生児細胞の集団ではない、請求項 3 5 6 ~ 3 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6 7】

前記細胞が、インビトロ若しくはエキスピボである、又は前記細胞の集団が、インビトロ若しくはエキスピボである、請求項 3 5 6 ~ 3 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6 8】

前記細胞が、対象におけるインビボである、又は前記細胞の集団が、対象におけるインビボである、請求項 3 5 6 ~ 3 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 6 9】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を対象の細胞内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 3 7 0】

対象の細胞においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 2 1 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞において発現される、方法。

【請求項 3 7 1】

対象の細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 3 7 2】

前記発現されたマルチドメイン治療用タンパク質が、前記対象における骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される、請求項 3 7 0 に記載の方法。

【請求項 3 7 3】

前記細胞が、肝臓細胞であり、任意選択的に、前記細胞が肝細胞である、請求項 3 6 9 ~ 3 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7 4】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 3 6 9 ~ 3 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7 5】

前記細胞が、新生児細胞である、請求項 3 6 9 ~ 3 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7 6】

前記新生児対象が、出生後 2 4 週間以内のヒト対象である、請求項 3 7 5 に記載の方法。

【請求項 3 7 7】

前記新生児対象が、出生後 1 2 週間以内のヒト対象である、請求項 3 7 5 に記載の方法。

【請求項 3 7 8】

前記新生児対象が、出生後 8 週間以内のヒト対象である、請求項 3 7 5 に記載の方法。

【請求項 3 7 9】

前記新生児対象が、出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 3 7 5 に記載の方法。

【請求項 3 8 0】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項 3 6 9 ~ 3 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8 1】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項 2 1 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み

10

20

30

40

50

、
前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現される、方法。

【請求項 3 8 2】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 3 8 3】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 2 1 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項 3 8 4】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項 3 8 5】

前記対象が、ポンペ病を有する、請求項 3 6 8 ~ 3 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8 6】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 2 1 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記対象において発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項 3 8 7】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項 3 8 8】

前記ポンペ病が、乳児発症ポンペ病である、請求項 3 8 5 ~ 3 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8 9】

前記ポンペ病が、遅発性ポンペ病である、請求項 3 8 5 ~ 3 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9 0】

前記対象が、ヒト対象である、請求項 3 6 8 ~ 3 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 9 1】

前記対象が、新生児対象である、請求項 3 6 8 ~ 3 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9 2】

前記新生児対象が、出生後 2 4 週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が、出生後 1 2 週間以内、出生後 8 週間以内、又は出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 3 9 1 に記載の方法。

【請求項 3 9 3】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項 3 6 8 ~ 3 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9 4】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす、請求項 3 6 8 ~ 3 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9 5】

前記対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、請求項 3 6 8 ~ 3 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9 6】

前記対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、請求項 3 9 5 に記載の方法。

【請求項 3 9 7】

前記方法が、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、前記対象における骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲンレベルの低下をもたらす、請求項 3 9 6 に記載の方法。

【請求項 3 9 8】

前記方法が、対照対象と比較して、前記対象における筋力を改善する、又は前記対象における筋力の喪失を予防する、請求項 3 6 8 ~ 3 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9 9】

同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有する対象をもたらす、請求項 3 9 8 に記載の方法。

【請求項 4 0 0】

必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記新生児対象に請求項 2 1 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記マルチドメイン治療用タンパク質の前記コード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現され、それによって前記対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項 4 0 1】

必要とする新生児対象におけるのポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記新生児対象に請求項 2 7 7 ~ 3 3 4 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項 4 0 2】

ポンペ病が、乳児発症ポンペ病である、請求項 4 0 0 又は 4 0 1 に記載の方法。

【請求項 4 0 3】

ポンペ病が、遅発性ポンペ病である、請求項 4 0 0 又は 4 0 1 に記載の方法。

【請求項 4 0 4】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす、請求項400～403のいずれか一項に記載の方法。

【請求項405】

前記対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する、請求項400～404のいずれか一項に記載の方法。

【請求項406】

前記対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する、請求項400～405のいずれか一項に記載の方法。

【請求項407】

前記対象が、ヒト対象である、請求項400～406のいずれか一項に記載の方法。

【請求項408】

前記対象が、新生児対象である、請求項400～407のいずれか一項に記載の方法。

【請求項409】

前記新生児対象が出生後24週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が出生後12週間以内のヒト対象である、請求項408に記載の方法。

【請求項410】

前記新生児対象が、出生後8週間以内のヒト対象である、請求項408に記載の方法。

【請求項411】

前記新生児対象が、出生後4週間以内のヒト対象である、請求項408に記載の方法。

【請求項412】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項368～407のいずれか一項に記載の方法。

【請求項413】

前記方法が、前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす、請求項368～412のいずれか一項に記載の方法。

【請求項414】

前記方法が、前記マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの上昇をもたらす、請求項368～413のいずれか一項に記載の方法。

【請求項415】

前記方法が、少なくとも約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項368～414のいずれか一項に記載の方法。

【請求項416】

前記方法が、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項368～415のいずれか一項に記載の方法。

【請求項417】

前記方法が、約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項368～416のいずれか一項に記載の方法。

【請求項418】

前記方法が、約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$

10

20

30

40

50

Lの前記対象における前記マルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項368～417のいずれか一項に記載の方法。

【請求項419】

正常の少なくとも約40%、正常の少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は正常の100%のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する、請求項368～418のいずれか一項に記載の方法。

【請求項420】

(I)前記対象が、乳児発症ポンペ病を有し、前記方法が、正常の少なくとも約1%又は約1%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する、又は

10

(II)前記対象が、遅発性ポンペ病を有し、前記方法が、正常の少なくとも約40%又は正常の約40%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する、請求項368～419のいずれか一項に記載の方法。

【請求項421】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である、請求項368～420のいずれか一項に記載の方法。

【請求項422】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の1年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である、請求項368～421のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項423】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である、請求項368～422のいずれか一項に記載の方法。

【請求項424】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の2年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である、請求項368～423のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項425】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の2年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である、請求項368～424のいずれか一項に記載の方法。

【請求項426】

前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である、請求項368～425のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項427】

前記方法が、前記対象に前記核酸構築物を投与する前に、前記対象における既存のAAV免疫性を評価することを更に含む、請求項368～426のいずれか一項に記載の方法。

【請求項428】

前記既存のAAV免疫性が、既存のAAV8免疫性である、請求項427に記載の方法。

50

【請求項 4 2 9】

既存の A A V 免疫性を評価することが、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む、請求項 4 2 7 又は 4 2 8 に記載の方法。

【請求項 4 3 0】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記 1 つ以上の核酸と同時に投与される、請求項 3 5 6 ～ 4 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3 1】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記 1 つ以上の核酸と同時に投与されない、請求項 3 5 6 ～ 4 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3 2】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記 1 つ以上の核酸の前に投与される、請求項 4 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 3 3】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記 1 つ以上の核酸の後に投与される、請求項 4 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 3 4】

リソソーム α -グルコシダーゼのコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対して C p G 枯渇している、組成物。

【請求項 4 3 5】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く、請求項 4 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 3 6】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む、請求項 4 3 4 又は 4 3 5 に記載の組成物。

【請求項 4 3 7】

前記リソソーム α -グルコシダーゼが、配列番号 1 7 3 に記載の配列からなる、請求項 4 3 4 ～ 4 3 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 3 8】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、コドン最適化されており、C p G 枯渇している、請求項 4 3 4 ～ 4 3 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 3 9】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ～ 1 8 2 及び 2 0 5 ～ 2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である、請求項 4 3 4 ～ 4 3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 4 0】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ～ 1 8 2 及び 2 0 5 ～ 2 1 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、配列番号 1 7 3 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9

10

20

30

40

50

8 %、又は少なくとも 99 % 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする、請求項 434 ~ 439 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 441】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする、請求項 434 ~ 440 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 442】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列を含み、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に記載の配列を含む、請求項 434 ~ 441 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 443】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列からなり、

任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 に記載の配列からなる、請求項 434 ~ 442 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 444】

前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、請求項 434 ~ 443 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 445】

前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む、請求項 434 ~ 444 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 446】

前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む、請求項 434 ~ 445 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 447】

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項 434 ~ 446 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 448】

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含む、請求項 434 ~ 446 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 449】

前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まない、請求項 434 ~ 448 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 450】

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、プロモーターに作動可能に連結されており、任意選択的に、前記プロモーターが、肝臓特異的プロモーターである、請求項 434 ~ 448 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 451】

50

前記核酸構築物が一本鎖DNA又は二本鎖DNAであり、任意選択的に前記核酸構築物が一本鎖DNAである、請求項434～450のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項452】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号174～182及び205～212のいずれかを含み、任意選択的に、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号176を含み、

前記核酸構築物が、前記リソソームα-グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、

10

前記核酸構築物が、ホモロジーマームを含まない、請求項434～451のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項453】

前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項434～452のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項454】

前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にある、請求項453に記載の組成物。

【請求項455】

前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項454に記載の組成物。

【請求項456】

前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記ITRが、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ITRが、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項453又は454に記載の組成物。

20

【請求項457】

前記AAVベクターが、一本鎖AAV(ssAAV)ベクターである、請求項456に記載の組成物。

【請求項458】

前記AAVベクターが、AAV8ベクター、AAV3Bベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV9ベクター、AAVrh.74ベクター、又はAAVhu.37ベクターに由来する、請求項456又は457に記載の組成物。

30

【請求項459】

前記AAVベクターが、組換えAAV8(rAAV8)ベクターである、請求項458に記載の組成物。

【請求項460】

前記AAVベクターが、一本鎖rAAV8ベクターである、請求項459に記載の組成物。

【請求項461】

前記核酸構築物が、5'から3'に、スプライスアクセプター、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号174～182及び205～212のいずれかを含み、任意選択的に、前記リソソームα-グルコシダーゼコード配列が、配列番号176を含み、

前記核酸構築物が、前記リソソームα-グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーマームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖rAAV8ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも1つの

40

50

末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 4 3 4 ~ 4 6 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6 2】

前記核酸構築物が、C p G 枯渇している、請求項 4 3 4 ~ 4 6 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6 3】

標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む、請求項 4 3 4 ~ 4 6 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6 4】

前記標的ゲノム遺伝子座が、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項 4 6 3 に記載の組成物。

【請求項 4 6 5】

前記ヌクレアーゼ標的部位が、前記アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある、請求項 4 6 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6 6】

前記ヌクレアーゼ剤が、

(a) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、

(b) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、又は

(c) (i) C a s タンパク質若しくは前記 C a s タンパク質をコードする核酸、及び (i i) ガイド RNA 若しくは前記ガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、前記ガイド RNA が、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、前記ガイド RNA が、前記 C a s タンパク質に結合し、前記 C a s タンパク質に前記ガイド RNA 標的配列を標的とさせる、請求項 4 6 3 ~ 4 6 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6 7】

前記ヌクレアーゼ剤が、

(a) C a s タンパク質又は前記 C a s タンパク質をコードする核酸、及び

(b) ガイド RNA 又は前記ガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、前記ガイド RNA が、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、前記ガイド RNA が、前記 C a s タンパク質に結合し、前記 C a s タンパク質に前記ガイド RNA 標的配列を標的とさせる、請求項 4 6 3 ~ 4 6 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6 8】

前記ガイド RNA 標的配列が、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある、請求項 4 6 7 に記載の組成物。

【請求項 4 6 9】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項 4 6 8 に記載の組成物。

【請求項 4 7 0】

(I) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 3 0 ~ 6 1 のいずれかに記載の前記配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、又は少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 3 6、3 0、3 3、及び 4 1 のいずれかに記載の前記配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、又は少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は

(I I) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 3 0 ~ 6 1 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一であり、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 3 6、3 0、3 3、及び 4 1 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である、請求項 4 6 7 ~ 4 6 9 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 471】

前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 30～61 のいずれかを含み、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかを含む、請求項 467～470 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 472】

前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 30～61 のいずれかからなり、任意選択的に、前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかからなる、請求項 467～471 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 473】

前記ガイド RNA が、配列番号 62～125 のいずれかを含み、任意選択的に、前記ガイド RNA が、配列番号 68、100、62、94、65、97、73、及び 105 のいずれかを含む、請求項 467～472 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 474】

(I) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36 に記載の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は

(II) 前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36 に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である、請求項 467～473 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 475】

前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36 を含む、請求項 467～474 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 476】

前記 DNA 標的化セグメントが、配列番号 36 からなる、請求項 467～475 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 477】

前記ガイド RNA が、配列番号 68 又は 100 を含む、請求項 467～476 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 478】

前記ガイド RNA が、RNA の形態である、請求項 467～477 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 479】

前記ガイド RNA が、少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 467～478 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 480】

前記少なくとも 1 つの修飾が、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 479 に記載の組成物。

【請求項 481】

前記少なくとも 1 つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 479 又は 480 に記載の組成物。

【請求項 482】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上での修飾を含む、請求項 479～481 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 483】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上での修飾を含む、請求項 479～482 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 484】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 479～483 のいずれか一項に

50

記載の組成物。

【請求項 485】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 479 ~ 484 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 486】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 479 ~ 485 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 487】

前記少なくとも 1 つの修飾が、前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 479 ~ 486 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 488】

前記少なくとも 1 つの修飾が、(i) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 479 ~ 487 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 489】

前記ガイド RNA が、単一のガイド RNA (sgRNA) である、請求項 467 ~ 488 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 490】

前記ガイド RNA が RNA の形態であり、前記ガイド RNA が、配列番号 100 を含み、前記ガイド RNA が、(i) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 467 ~ 489 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 491】

前記 Cas タンパク質が、Cas9 タンパク質である、請求項 467 ~ 490 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 492】

前記 Cas9 タンパク質が、化膿連鎖球菌 Cas9 タンパク質、黄色ブドウ球菌 Cas9 タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニ Cas9 タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス Cas9 タンパク質、又は髄膜炎菌 Cas9 タンパク質に由来する、請求項 491 に記載の組成物。

【請求項 493】

前記 Cas タンパク質が、化膿連鎖球菌 Cas9 タンパク質に由来する、請求項 491 に記載の組成物。

【請求項 494】

前記 Cas タンパク質が、配列番号 11 に記載の配列を含む、請求項 467 ~ 493 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 495】

前記 Cas タンパク質をコードする前記核酸が、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 467 ~ 494 のいずれか一項に記載の組成

10

20

30

40

50

物。

【請求項 496】

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含む、請求項 467～495 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 497】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 496 に記載の組成物。

【請求項 498】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、1 つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている、請求項 496 又は 497 に記載の組成物。 10

【請求項 499】

前記修飾ウリジンが、シュードウリジン又は N1-メチル-シュードウリジン、任意選択的に N1-メチル-シュードウリジンである、請求項 498 に記載の組成物。

【請求項 500】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュードウリジン又は N1-メチル-シュードウリジン、任意選択的に N1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されている、請求項 498 又は 499 に記載の組成物。

【請求項 501】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、5' キャップを含む、請求項 496～500 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 502】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、ポリアデニル化配列を含む、請求項 496～501 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 503】

前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含む、請求項 496～502 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 504】

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含む、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含む、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュードウリジン又は N1-メチル-シュードウリジン、任意選択的に N1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む、請求項 467～503 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 505】

前記ガイド RNA が RNA の形態であり、前記ガイド RNA が、配列番号 68 又は 100 を含み、

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含む、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含む、請求項 467～504 のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項 506】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかを含み、任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 を含み、

前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、 50

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 r A A V 8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 5 0 5 に記載の組成物。

【請求項 5 0 7】

前記ガイド RNA が RNA の形態であり、前記ガイド RNA が、配列番号 1 0 0 を含み、前記ガイド RNA が、(i) 前記ガイド RNA の前記 5 ' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) 前記ガイド RNA の前記 3 ' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) 前記ガイド RNA の前記 5 ' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) 前記ガイド RNA の前記 3 ' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、

前記組成物が、前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、前記 C a s タンパク質をコードする前記 m R N A が、シュドウリジン又は N 1 - メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 - メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5 ' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む、請求項 4 6 7 ~ 5 0 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 0 8】

前記核酸構築物が、5 ' から 3 ' に、スプライスアクセプター、前記リソソーム α - グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α - グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかを含み、任意選択的に、前記リソソーム α - グルコシダーゼコード配列が、配列番号 1 7 6 を含み、

前記核酸構築物が、前記リソソーム α - グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 r A A V 8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 I T R が、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 5 0 7 に記載の組成物。

【請求項 5 0 9】

前記 C a s タンパク質又は前記 C a s タンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイド RNA 又は前記ガイド RNA をコードする前記 1 つ以上の DNA が、脂質ナノ粒子と合している、請求項 4 6 7 ~ 5 0 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1 0】

前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む、請求項 5 0 9 に記載の組成物。

【請求項 5 1 1】

前記カチオン性脂質が、脂質 A ((9 Z , 1 2 Z) - 3 - ((4 , 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ((((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノアート) である、請求項 5 1 0 に記載の組成物。

【請求項 5 1 2】

前記中性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン又は 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) である、請求項 5 1 0 又は 5 1 1 に記載

の組成物。

【請求項 5 1 3】

前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項 5 1 0～5 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1 4】

前記ステルス脂質が、1, 2-ジミリスチル-*rac*-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG 2 k-DMG) である、請求項 5 1 0～5 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1 5】

前記カチオン性脂質が脂質 A であり、前記中性脂質が DSPC であり、前記ヘルパー脂質がコレステロールであり、前記ステルス脂質が PEG 2 k-DMG である、請求項 5 1 0～5 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1 6】

前記脂質ナノ粒子が、以下のモル比：約 50 モル%の脂質 A、約 9 モル%の DSPC、約 38 モル%のコレステロール、及び約 3 モル%の PEG 2 k-DMG で 4 つの脂質を含む、請求項 5 0 9～5 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1 7】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、

前記ガイド RNA が RNA の形態であり、前記ガイド RNA が、配列番号 68 又は 100 を含み、

前記組成物が、前記 Cas タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、

前記ガイド RNA 及び前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、脂質 A、DSPC、コレステロール、及び PEG 2 k-DMG を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 50 モル%の脂質 A、約 9 モル%の DSPC、約 38 モル%のコレステロール、及び約 3 モル%の PEG 2 k-DMG と会合している、請求項 467～516 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 1 8】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかを含み、任意選択的に、前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 を含み、

前記核酸構築物が、前記リソソーム α -グルコシダーゼの前記発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 rAAV8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 ITR が、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 ITR が、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 5 1 7 に記載の組成物。

【請求項 5 1 9】

前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、

前記ガイド RNA が RNA の形態であり、前記ガイド RNA が、配列番号 100 を含み、前記ガイド RNA が、(i) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) 前記ガイド RNA の前記 5' 末端の前記最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) 前記ガイド RNA の前記 3' 末端の前記最後の 3 つのヌクレオチドにお

10

20

30

40

50

る 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、

前記組成物が、前記 Cas タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記 Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、シュドウリジン又は N1-メチルシュドウリジン、任意選択的に N1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、

前記ガイド RNA 及び前記 Cas タンパク質をコードする前記 mRNA が、脂質 A、DSPC、コレステロール、及び PEG2k-DMG を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 50 モル % の脂質 A、約 9 モル % の DSPC、約 38 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の PEG2k-DMG と会合している、請求項 467~516 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 520】

前記核酸構築物が、5' から 3' に、スプライスアクセプター、前記リソソーム α-グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、

前記リソソーム α-グルコシダーゼコード配列が、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかを含み、任意選択的に、前記リソソーム α-グルコシダーゼコード配列が、配列番号 176 を含み、

前記核酸構築物が、前記リソソーム α-グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖 rAAV8 ベクターであり、任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における前記 ITR が、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における前記 ITR が、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる、請求項 519 に記載の組成物。

【請求項 521】

細胞又は細胞の集団において前記リソソーム α-グルコシダーゼコード配列を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のための、請求項 434~520 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 522】

細胞若しくは細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から前記リソソーム α-グルコシダーゼを発現させる方法における使用のための、又は細胞若しくは細胞の集団において前記リソソーム α-グルコシダーゼを発現させる方法における使用のための、請求項 434~520 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 523】

対象の細胞又は細胞の集団において前記リソソーム α-グルコシダーゼコード配列を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のための、請求項 434~520 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 524】

対象の細胞若しくは細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から前記リソソーム α-グルコシダーゼを発現させる方法における使用のための、又は対象の細胞若しくは細胞の集団において前記リソソーム α-グルコシダーゼを発現させる方法における使用のための、請求項 434~520 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 525】

対象のリソソーム α-グルコシダーゼ欠損症を処置する方法における使用のための、請求項 434~520 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 526】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法における使用のための、請求項 434~520 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 2 7】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法における使用のための、請求項 4 3 4 ~ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 2 8】

必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法では使用するための、請求項 4 3 4 ~ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 2 9】

請求項 4 3 4 ~ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項 5 3 0】

前記核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれ、リソソーム α -グルコシダーゼが、前記標的ゲノム遺伝子座から発現される、又は前記核酸構築物が、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン 1 に組み込まれ、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記内因性アルブミン遺伝子座から発現される、請求項 5 2 9 に記載の細胞。

10

【請求項 5 3 1】

前記細胞が、肝臓細胞である、請求項 5 2 9 又は 5 3 0 に記載の細胞。

【請求項 5 3 2】

前記肝臓細胞が、肝細胞である、請求項 5 3 1 に記載の細胞。

【請求項 5 3 3】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 5 2 9 ~ 5 3 2 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 5 3 4】

前記細胞が、新生児細胞である、請求項 5 2 9 ~ 5 3 3 のいずれか一項に記載の細胞。

20

【請求項 5 3 5】

前記新生児細胞が、出生後 2 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 3 4 に記載の細胞。

【請求項 5 3 6】

前記新生児細胞が、出生後 1 2 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 3 4 に記載の細胞。

【請求項 5 3 7】

前記新生児細胞が、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 3 4 に記載の細胞。

30

【請求項 5 3 8】

前記新生児細胞が、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 3 4 に記載の細胞。

【請求項 5 3 9】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項 5 2 9 ~ 5 3 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 5 4 0】

前記細胞が、インビボである、請求項 5 2 9 ~ 5 3 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 5 4 1】

前記細胞が、インビトロ又はエクスビボである、請求項 5 2 9 ~ 5 3 9 のいずれか一項に記載の細胞。

40

【請求項 5 4 2】

リソソーム α -グルコシダーゼコード配列を細胞又は細胞の集団の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 4 6 3 ~ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 5 4 3】

細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法であって、請求項 4 3 4 ~ 4 6 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に

50

投与することを含み

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞又は前記細胞の集団において発現される、方法。

【請求項 5 4 4】

細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法であって、請求項 4 6 3～5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞又は前記細胞の集団に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

10

【請求項 5 4 5】

前記細胞が肝臓細胞である、又は前記細胞の集団が肝臓細胞の集団である、任意選択的に、前記細胞が肝細胞である、又は前記細胞の集団が肝細胞の集団である、請求項 5 4 2～5 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4 6】

前記細胞が、ヒト細胞である、又は前記細胞の集団が、ヒト細胞の集団である、請求項 5 4 2～5 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4 7】

前記細胞が、新生児細胞である、又は前記細胞の集団が、新生児細胞の集団である、請求項 5 4 2～5 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 4 8】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 2 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 4 9】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 1 2 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 5 0】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 4 7 に記載の方法。

30

【請求項 5 5 1】

前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項 5 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 5 2】

前記細胞が、新生児細胞ではない、又は前記細胞の集団が、新生児細胞の集団ではない、請求項 5 4 2～5 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5 3】

前記細胞が、インビトロ若しくはエキスピボである、又は前記細胞の集団が、インビトロ若しくはエキスピボである、請求項 5 4 2～5 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5 4】

40

前記細胞が、対象におけるインビボである、又は前記細胞の集団が、対象におけるインビボである、請求項 5 4 2～5 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5 5】

リソソーム α -グルコシダーゼコード配列を対象の細胞内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、請求項 4 6 3～5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 5 5 6】

対象の細胞においてリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法であって、請求項

50

4 3 4～4 6 2のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、前記細胞において発現される、方法。

【請求項 5 5 7】

対象の細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法であって、請求項 4 6 3～5 2 0のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

10

【請求項 5 5 8】

前記細胞が、肝臓細胞である、任意選択的に、前記細胞が肝細胞である、請求項 5 5 5～5 5 7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5 9】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 5 5 5～5 5 8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6 0】

前記細胞が、新生児対象の新生児細胞である、請求項 5 5 5～5 5 9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6 1】

前記新生児対象が、出生後 2 4 週間以内のヒト対象である、請求項 5 6 0に記載の方法。

20

【請求項 5 6 2】

前記新生児対象が、出生後 1 2 週間以内のヒト対象である、請求項 5 6 0に記載の方法。

【請求項 5 6 3】

前記新生児対象が、出生後 8 週間以内のヒト対象である、請求項 5 6 0に記載の方法。

【請求項 5 6 4】

前記新生児対象が、出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 5 6 0に記載の方法。

【請求項 5 6 5】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項 5 5 5～5 5 9のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5 6 6】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項 4 3 4～4 6 2のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現される、方法。

【請求項 5 6 7】

必要とする対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記対象に請求項 4 6 3～5 2 0のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

40

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 5 6 8】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 4 3 4～4 6 2のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに

50

作動可能に連結されており、前記対象において発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を減少させる、方法。

【請求項 5 6 9】

必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、請求項 4 6 3 ～ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項 5 7 0】

前記対象が、ポンペ病を有する、請求項 5 5 4 ～ 5 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7 1】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 4 3 4 ～ 4 6 2 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現され、それによって前記ポンペ病を治療する、方法。

【請求項 5 7 2】

必要とする対象のポンペ病を処置する方法であって、請求項 4 6 3 ～ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座の前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項 5 7 3】

前記ポンペ病が、乳児発症ポンペ病である、請求項 5 7 0 ～ 5 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7 4】

前記ポンペ病が、遅発性ポンペ病である、請求項 5 7 0 ～ 5 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7 5】

前記対象が、ヒト対象である、請求項 5 5 4 ～ 5 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7 6】

前記対象が、新生児対象である、請求項 5 5 4 ～ 5 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7 7】

前記新生児対象が、出生後 2 4 週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が、出生後 1 2 週間以内、出生後 8 週間以内、又は出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 5 7 6 に記載の方法。

【請求項 5 7 8】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項 5 5 4 ～ 5 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7 9】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環リソソーム α -グルコシダーゼをもたらす、請求項 5 5 4 ～ 5 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8 0】

前記方法が、前記対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、請求項 5 5 4 ～ 5 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8 1】

前記対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、請求項 5 8 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 8 2】

前記方法が、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、前記対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲンレベルの低下をもたらす、請求項 5 8 1 に記載の方法。

【請求項 5 8 3】

前記方法が、対照対象と比較して、前記対象の筋力を改善する、又は前記対象の筋力の喪失を予防する、請求項 5 5 4 ～ 5 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8 4】

前記方法が、前記対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす、請求項 5 8 3 に記載の方法。

【請求項 5 8 5】

必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記対象に請求項 4 3 4 ～ 4 6 2 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記リソソーム α -グルコシダーゼコード配列が、前記核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、前記対象において発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項 5 8 6】

必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記対象に請求項 4 6 3 ～ 5 2 0 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼが、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状を予防又は低減する、方法。

【請求項 5 8 7】

前記ポンペ病が、乳児発症ポンペ病である、請求項 5 8 5 又は 5 8 6 に記載の方法。

【請求項 5 8 8】

前記ポンペ病が、遅発性ポンペ病である、請求項 5 8 5 又は 5 8 6 に記載の方法。

【請求項 5 8 9】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環リソソーム α -グルコシダーゼをもたらす、請求項 5 8 5 ～ 5 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9 0】

前記対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する、請求項 5 8 5 ～ 5 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9 1】

前記対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する、請求項 5 8 5 ～ 5 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9 2】

前記対象が、ヒト対象である、請求項 5 8 5 ～ 5 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9 3】

前記対象が、新生児対象である、請求項 5 8 5 ～ 5 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9 4】

前記新生児対象が、出生後 2 4 週間以内のヒト対象であり、任意選択的に、前記新生児対象が、出生後 1 2 週間以内のヒト対象である、請求項 5 9 3 に記載の方法。

【請求項 5 9 5】

前記新生児対象が、出生後 8 週間以内のヒト対象である、請求項 5 9 3 に記載の方法。

【請求項 5 9 6】

前記新生児対象が、出生後 4 週間以内のヒト対象である、請求項 5 9 3 に記載の方法。

【請求項 5 9 7】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項 5 8 5 ～ 5 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

。

【請求項 5 9 8】

10

20

30

40

50

前記方法が、前記リソソーム α -グルコシダーゼをコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの発現の増加をもたらす、請求項554～597のいずれか一項に記載の方法。

【請求項599】

前記方法が、前記リソソーム α -グルコシダーゼをコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルの上昇をもたらす、請求項554～598のいずれか一項に記載の方法。

【請求項600】

前記方法が、少なくとも約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記リソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす、請求項554～599のいずれか一項に記載の方法。

【請求項601】

前記方法が、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記リソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす、請求項554～600のいずれか一項に記載の方法。

【請求項602】

前記方法が、約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記リソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす、請求項554～601のいずれか一項に記載の方法。

【請求項603】

前記方法が、約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の前記対象における前記リソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす、請求項554～602のいずれか一項に記載の方法。

【請求項604】

正常の少なくとも約40%、正常の少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は正常の100%のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する、請求項554～603のいずれか一項に記載の方法。

【請求項605】

(I) 前記対象が、乳児発症ポンペ病を有し、前記方法が、正常の少なくとも約1%又は約1%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する、又は

(II) 前記対象が、遅発性ポンペ病を有し、前記方法が、正常の少なくとも約40%又は正常の約40%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する、請求項554～604のいずれか一項に記載の方法。

【請求項606】

前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも50%である、請求項554～605のいずれか一項に記載の方法。

【請求項607】

前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性が、前記投与の1年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも50%である、請求項554～606のいずれか一項に記載の方法。

【請求項608】

前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現

10

20

30

40

50

又は活性の少なくとも60%である、請求項554～607のいずれか一項に記載の方法。

【請求項609】

前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性が、前記投与の2年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも50%である、請求項554～608のいずれか一項に記載の方法。

【請求項610】

前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性が、前記投与の2年後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも60%である、請求項554～609のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項611】

前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性が、前記投与の24週間後で前記対象について測定された発現のピークレベルでの前記リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも60%である、請求項554～610のいずれか一項に記載の方法。

【請求項612】

前記方法が、前記対象に前記核酸構築物を投与する前に、前記対象における既存のAAV免疫性を評価することを更に含む、請求項554～611のいずれか一項に記載の方法。

【請求項613】

前記既存のAAV免疫性が、既存のAAV8免疫性である、請求項612に記載の方法。

20

【請求項614】

既存のAAV免疫性を評価することが、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む、請求項612又は613に記載の方法。

【請求項615】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸と同時に投与される、請求項542～614のいずれか一項に記載の方法。

【請求項616】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸と同時に投与されない、請求項542～614のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項617】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸の前に投与される、請求項616に記載の方法。

【請求項618】

前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記1つ以上の核酸の後に投与される、請求項616に記載の方法。

【請求項619】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、

40

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

50

【請求項 6 2 0】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

10

【請求項 6 2 1】

新生児細胞又は新生児細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインが C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

20

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 6 2 2】

新生児細胞又は新生児細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、

30

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 6 2 3】

40

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児対象の新生児細胞の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児対象に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインが C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

50

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 6 2 4】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児対象の新生児細胞の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児対象に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

10

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 6 2 5】

新生児対象の新生児細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記新生児対象に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインが C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

20

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 6 2 6】

新生児対象の新生児細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記新生児対象に、

30

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 C D 6 3 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

40

【請求項 6 2 7】

必要とする新生児対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインが、C D 6 3 結合送達ドメイン又は T f R 結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸、を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部

50

位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項628】

必要とする新生児対象においてリソソームα-グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

10

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸、を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項629】

必要とする新生児対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、前記新生児対象に、

20

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸、を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

30

【請求項630】

必要とする新生児対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

40

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項631】

必要とする新生児対象のポンペ病を処置する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

50

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項632】

必要とする新生児対象のポンペ病を処置する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項633】

必要とする新生児対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、前記送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項634】

必要とする新生児対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソームα-グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームα-グルコシダーゼに融合された前記CD63結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項635】

請求項619～634のいずれか一項に記載の方法によって作製された、新生児細胞又は新生児細胞の集団。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3 6】

標的ゲノム遺伝子座に挿入された核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団であって、前記核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に挿入されたリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含み、任意選択的に、前記送達ドメインが、CD63 結合送達ドメイン又は TfR 結合送達ドメインである、新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項 6 3 7】

標的ゲノム遺伝子座に挿入された核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団であって、前記核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に挿入されたリソソーム α -グルコシダーゼに融合された CD63 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む、新生児細胞又は新生児細胞の集団。

10

【請求項 6 3 8】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された TfR 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 TfR 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸、を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

20

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 6 3 9】

新生児細胞又は新生児細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合された TfR 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 TfR 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

30

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 TfR 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 6 4 0】

リソソーム α -グルコシダーゼに融合された TfR 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児対象の新生児細胞の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児対象に、

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 TfR 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

40

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸、を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項 6 4 1】

新生児対象の新生児細胞において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された TfR 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、前記新生児対象に、

50

(a) 前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座の標的遺伝子のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 6 4 2】

必要とする新生児対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。

【請求項 6 4 3】

必要とする新生児対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記組織内のグリコーゲン蓄積を低減する、方法。

【請求項 6 4 4】

必要とする新生児対象のポンペ病を処置する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソーム α -グルコシダーゼに融合された前記 T f R 結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記ポンペ病を処置する、方法。

【請求項 6 4 5】

必要とする新生児対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法であって、前記新生児対象に、

(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマル

10

20

30

40

50

チドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び

(b) ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、

前記ヌクレアーゼ剤が前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記リソソームαーグルコシダーゼに融合された前記TfR結合送達ドメインを含む前記マルチドメイン治療用タンパク質が、前記修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記対象の前記ポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する、方法。

【請求項646】

請求項638～645のいずれか一項に記載の方法によって作製された、新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項647】

標的ゲノム遺伝子座に挿入された核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団であって、前記核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に挿入されたリソソームαーグルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む、新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【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、2022年2月2日に出願された米国特許出願第63／306,040号、及び2022年7月29日に出願された米国特許出願第63／369,902号の利益を主張し、それらの各々は、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0002】

EFS WEB経由でXMLファイルとして提出された配列表への参照

ファイル590204SEQLIST.xmlに記述された配列表は1.16メガバイトであり、2023年1月26日に作成され、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

遺伝子治療は、ヒト疾患がどのようにアプローチされ、処置されるかという点で非常に大きな可能性があることが長い間認識されてきた。薬物又は手術に頼る代わりに、根底にある遺伝因子を有する患者は、根底にある原因を直接標的化することによって処置される。更に、根底にある遺伝的原因を標的化することによって、遺伝子治療は、患者を効果的に治療する可能性を提供し得る。しかし、遺伝子治療アプローチの臨床適用は、いくつかの局面において依然として改善を必要とする。更に、若年期の処置は、新生児患者における独特の環境に起因して更なる障害を提示する可能性がある。

【0004】

ポンペ病(PD)又はグリコーゲン貯蔵症II型は、酵素リソソーム酸性αーグルコシダーゼ(GAA)の活性の欠損によって引き起こされる単遺伝子性リソソーム病である。GAA欠損は、骨格筋及び心筋を含む組織中の細胞のリソソームにおけるその基質であるグリコーゲンの蓄積をもたらす。筋線維におけるグリコーゲンのこの異常な蓄積は、心臓肥大、軽度から重度の筋力低下、及び最終的には心不全又は呼吸不全による死を含み得る症状を伴う、筋組織の進行的損傷をもたらす。乳児発症PD(IOPD)は、正常の1%未満のGAA活性と関連する。乳児発症PD(IOPD)は重篤であり、内臓器官、筋肉、及び中枢神経系(CNS)に影響を及ぼす。遅発性PD(LOPD)は、2～40%のGAA活性と関連する。遅発性PD(LOPD)はさほど重篤ではなく、主に呼吸器及び骨格筋に関与する。

【0005】

PDに対して唯一承認されている療法は、酵素補充療法(ERT)である。組換えヒト

10

20

30

40

50

(rh) GAAは、隔週で患者に静脈内注入によって送達される。ERTは、PDの心臓症状の治療において非常に成功しているが、骨格筋及びCNSは、ERTによって最小限にしか処置されていないままである。rh GAAがリソソームに到達する主な機構は、rh GAA上のM6Pに結合する陽イオン非依存性マンノース6-リン酸(M6P)受容体(CIMPR)による取り込みによるものである。しかしながら、骨格筋におけるCIMPR発現は非常に低く、rh GAAはマンノース6-リン酸化が不十分である。更に、CIMPRは、リソソームではなく罹患細胞中のオートファゴソームに誤って方向付けられる場合があるが、大量の薬物はまた、PDにおいて主要な病理を有さない器官である肝臓によって取り込まれる。ERTは血液脳関門を通過しない。加えて、PDは、若年期の治療を必要とする可能性があり、これは、新生児及び若年患者における固有の環境に起因する更なる障害を呈する。

10

【発明の概要】

【0006】

内因性ALB遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座へのマルチドメイン治療用タンパク質(例えば、GAA融合タンパク質)コード配列の挿入及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質(例えば、GAA融合タンパク質)コード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が提供される。核酸構築物及び組成物は、細胞又は細胞の集団又は対象において標的ゲノム遺伝子座にマルチドメイン治療用タンパク質(例えば、GAA融合タンパク質)核酸を組み込む又は挿入する方法、細胞又は細胞の集団又は対象においてマルチドメイン治療用タンパク質(例えば、GAA融合タンパク質)を発現させる方法、細胞又は細胞の集団又は対象におけるグリコーゲン蓄積を低減する方法、対象のポンペ病又はGAA欠損症を処置する方法、並びにGAA活性又は発現が低減した対象などの対象及び新生児対象を含むポンペ病と診断された対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞、細胞の集団、又は対象は、新生児細胞、新生児細胞の集団、又は新生児対象である。

20

【0007】

一態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、(a)リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b)ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤がヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入される。一態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、(a)リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b)ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様において、新生児細胞又は新生児細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。別の態様において、新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座からのリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメイン

30

40

50

を含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様において、新生児細胞又は新生児細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。別の態様では、新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座から、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝臓細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、ヒト細胞である、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、インビトロ若しくはエキスピボである、又は新生児細胞の集団は、インビトロ若しくはエキスピボである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、新生児対象におけるインビボである、又は新生児細胞の集団は、新生児対象におけるインビボである。

【0008】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児対象の新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤がヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコ

ードする核酸を、新生児対象の新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様において、新生児対象における新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである方法が提供される。別の態様において、新生児対象の新生児細胞又は新生児細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、新生児対象の新生児細胞又は新生児細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。別の態様では、新生児対象の新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座から、リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋及び心臓組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝臓細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、ヒト細胞である、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのこのような方法では、対象は、ポンベ病を有する。

【0009】

別の態様では、必要とする新生児対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアー

10

20

30

40

50

ゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、治療を必要とする新生児対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、対象は、ポンペ病を有する。別の態様では、必要とする新生児対象のポンペ病を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベ

10

20

30

40

50

ルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、対象の骨格筋組織及び／又は心臓組織内のグリコーゲンレベルの低減をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象と比較して、対象の筋力を改善するか、又は対象の筋力の喪失を予防する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。

【0010】

別の態様では、必要とする新生児対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋、心臓、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。

【0011】

いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。

【0012】

いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少な

くとも約 $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、正常の少なくとも約 40% 、正常の少なくとも約 45% 、少なくとも約 50% 、少なくとも約 60% 、少なくとも約 70% 、少なくとも約 80% 、少なくとも約 90% 、又は正常の 100% のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、乳児発症ポンベ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約 1% 又は約 1% 超のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は遅発性ポンベ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約 40% 、又は正常の約 40% 超のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象のベースラインのリソソーム α -グルコシダーゼ活性よりも、リソソーム α -グルコシダーゼ活性を少なくとも約 1% 、少なくとも約 5% 、少なくとも約 10% 、少なくとも約 15% 、少なくとも約 20% 、少なくとも約 25% 、少なくとも約 30% 、少なくとも約 35% 、少なくとも約 40% 、少なくとも約 45% 、少なくとも約 50% 、少なくとも約 60% 、少なくとも約 70% 、少なくとも約 80% 、少なくとも約 90% 、又は少なくとも約 100% 上昇させる。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 50% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 1 年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 50% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 2 年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 2 年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。

10

20

30

40

50

【0013】

いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。

【0014】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象に核酸構築物を投与する前に、新生児対象における既存の AAV 免疫性を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存の AAV 免疫性は、既存の AAV8 免疫性である。いくつかのそのような方法では、既存の AAV 免疫性を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。

【0015】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の核酸と同時に投与さ

れない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の後に投与される。

【0016】

いくつかのそのような方法では、CD63結合送達ドメインは、ペプチドリンカーを介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような方法では、CD63結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、CD63結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、CD63結合送達ドメインは、抗CD63抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような方法では、CD63結合送達ドメインは、抗CD63抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片(scfv)を含む。いくつかのそのような方法では、CD63結合送達ドメインは、単鎖可変断片(scfv)である。いくつかのそのような方法では、scfvは、配列番号183に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、scfvは、配列番号183に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に対して少なくとも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。いくつかのそのような方法では、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号183を含むscfvをコードし、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に対して少なくとも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%同一であり、配列番号183を含むscfvをコードする。いくつかのそのような方法では、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号183を含むscfvをコードし、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号183を含むscfvをコードする。いくつかのそのような方法では、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に記載の配列からなる。

【0017】

いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コ

10

20

30

40

50

ドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

【0018】

いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。

10

20

30

40

50

【0019】

いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されているか、又は CpG 枯渇している。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化され、CpG 枯渇している。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194~202 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含む。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194~202 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 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%

% 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194 ~ 202 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194 ~ 202 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194 ~ 202 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含む。

10

20

【0020】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、非相同末端結合を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、相同組換え修復を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、プロモーターに作動可能に連結され、任意選択的に、プロモーターは、肝臓特異的プロモーターである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖 DNA 又は二本鎖 DNA である。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖 DNA である。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194 ~ 202 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチド

30

40

50

メイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。

【0021】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、AAVベクターは、一本鎖AAV（ssAAV）ベクターである。いくつかのそのような方法では、AAVベクターは、AAV8ベクター、AAV3Bベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV9ベクター、AAVrh.74ベクター、又はAAVhu.37ベクターに由来する。いくつかのそのような方法では、AAVベクターは、組換えAAV8（rAAV8）ベクターである。いくつかのそのような方法では、AAVベクターは、一本鎖rAAV8ベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194～202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、CpG枯渇している。

10

20

【0022】

いくつかのそのような方法では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン1内にある。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（a）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、（b）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、又は（c）（i）Casタンパク質若しくはCasタンパク質をコードする核酸、及び（ii）ガイドRNA若しくはガイドRNAをコードする1つ以上のDNAを含み、ガイドRNAは、ガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含み、ガイドRNAは、Casタンパク質に結合し、Casタンパク質にガイドRNA標的配列を標的とさせる。

30

【0023】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（a）Casタンパク質又はCasタンパク質をコードする核酸、及び（b）ガイドRNA又はガイドRNAをコードする1つ以上のDNAを含み、ガイドRNAは、ガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含み、ガイドRNAは、Casタンパク質に結合し、Casタンパク質にガイドRNA標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、ガイドRNA標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン1内にある。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び4

40

50

1のいずれかに記載の配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であり、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかを含み、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかを含む。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかからなり、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかからなる。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、配列番号62～125のいずれかを含み、任意選択的に、ガイドRNAは、配列番号68、100、62、94、65、97、73、及び105のいずれかを含む。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号36に記載の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号36に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号36を含む。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号36からなる。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含む。

10

20

【0024】

いくつかのそのような方法では、本方法は、RNAの形態でガイドRNAを投与することを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、単一のガイドRNA(sgRNA)である。いくつかのそのような方法では、本方法は、RNAの形態でガイドRNAを投与することを含み、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

30

40

【0025】

50

いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質は、C a s 9 タンパク質である。いくつかのそのような方法では、C a s 9 タンパク質は、化膿連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) C a s 9 タンパク質、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) C a s 9 タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) C a s 9 タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) C a s 9 タンパク質、又は髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis) C a s 9 タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質は、化膿連鎖球菌 C a s 9 タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質は、配列番号 1 1 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような方法では、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、1 つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような方法では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又は N 1 -メチルシュードウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュードウリジンである。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジン又は N 1 -メチルシュードウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような方法では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、5' キャップを含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジン又は N 1 -メチルシュードウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュードウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。

10

20

30

40

50

【0026】

いくつかのそのような方法では、本方法は、R N A の形態でガイド R N A を投与することを含み、ガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I

T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、本方法は、R N A の形態でガイド R N A を投与することを含み、ガイド R N A は、配列番号 1 0 0 を含み、ガイド R N A は、(i) ガイド R N A の 5 ' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) ガイド R N A の 3 ' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイド R N A の 5 ' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) ガイド R N A の 3 ' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュドウリジン又は N 1 - メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 - メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5 ' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5 ' から 3 ' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、本方法は、R N A の形態でガイド R N A を投与することを含み、ガイド R N A は、配列番号 1 0 0 を含み、ガイド R N A は、(i) ガイド R N A の 5 ' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) ガイド R N A の 3 ' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイド R N A の 5 ' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) ガイド R N A の 3 ' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュドウリジンで完全に置換されており、5 ' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5 ' から 3 ' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【 0 0 2 7 】

いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質又は C a s タンパク質をコードする核酸、及びガイド R N A 又はガイド R N A をコードする 1 つ以上の D N A は、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような方法では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、

中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような方法では、カチオン性脂質は、脂質 A ((9 Z , 1 2 Z) - 3 - ((4 , 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノアート) である。いくつかのそのような方法では、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン又は 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、D S P C) である。いくつかのそのような方法では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような方法では、ステルス脂質は、P E G 2 k - D M G である。いくつかのそのような方法では、カチオン性脂質は脂質 A であり、中性脂質は D S P C であり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質は P E G 2 k - D M G である。いくつかのそのような方法では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A、約 9 モル % の D S P C、約 3 8 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の P E G 2 k - D M G で 4 つの脂質を含む。

10

【 0 0 2 8 】

いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、本方法は、R N A の形態のガイド R N A を投与することを含み、ガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、ガイド R N A 及び C a s タンパク質をコードする m R N A は、脂質 A、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A、約 9 モル % の D S P C、約 3 8 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の P E G 2 k - D M G と会合している。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5 ' から 3 ' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

20

30

【 0 0 2 9 】

いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、本方法は、R N A の形態のガイド R N A を投与することを含み、ガイド R N A は、配列番号 1 0 0 を含み、ガイド R N A は、(i) ガイド R N A の 5 ' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) ガイド R N A の 3 ' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイド R N A の 5 ' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) ガイド R N A の 3 ' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュドウリジン又は N 1 - メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 - メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5 ' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイド R N A 及び C a s タンパク質をコードする m R N A は、脂質 A、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A、約 9 モル % の D S P C、約 3 8 モル % のコレス

40

50

テロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、本方法は、RNAの形態のガイドRNAを投与することを含み、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、Casタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194~202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

20

30

40

50

【0030】

別の態様では、上記方法のいずれかによって作製された新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。別の態様では、上記方法のいずれかによって作製された細胞又は細胞の集団が提供される。別の態様では、標的ゲノム遺伝子座に挿入された核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団であって、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されたリソソームα-グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。別の態様では、標的ゲノム遺伝子座に挿入された核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団であって、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されたリソソームα-グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む、新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、肝臓細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、肝細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、ヒト細胞である、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団

において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、インビトロ若しくはエキスピボである、又は新生児細胞の集団は、インビトロ若しくはエキスピボである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、対象におけるインビボである、又は新生児細胞の集団は、インビボである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質が発現される。

【0031】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、CD63結合送達ドメインは、ペプチドリンカーを介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、CD63結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、CD63結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、CD63結合送達ドメインは、抗CD63抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、CD63結合送達ドメインは、抗CD63抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片(scfv)を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、CD63結合送達ドメインは、単鎖可変断片(scfv)である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvは、配列番号183に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvは、配列番号183に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に対して少なくとも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。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号183を含むscfvをコードし、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に対して少なくとも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%同一であり、配列番号183を含むscfvをコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号183を含むscfvをコードし、任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号183を含むscfvをコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、scfvコード配列は、配列番号186に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、scfvコード配列は、配列番号184~192のいずれかに記載の配列からなる

10

20

30

40

50

。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号186に記載の配列からなる。

【0032】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼは、リソソームα-グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されているか、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソームα-グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソームα-グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソームα-グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソームα-グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

【0033】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼは、リソソームα-グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グル

10

20

30

40

50

コシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されている、又は CpG 枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。

【0034】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されているか、又は CpG 枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194~202 のいずれかに対して少なくと

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% 同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 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% 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含む。

【0035】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメ

10

20

30

40

50

イン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列はプロモーターに作動可能に連結されており、任意選択的に、プロモーターは肝臓特異的プロモーターである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194～202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。

10

20

30

40

50

【0036】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン1内にある。

【0037】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対してCpG枯渇しており、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、組成物が提供される。別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対してCpG枯渇している、組成物が提供される。いくつかのそのような組成物では、CD63結合送達ドメインは、ペプチドリッカーを介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに対して少なくとも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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。

10

20

30

40

50

【0038】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された CD63 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対して CpG 枯渇している、組成物が提供される。いくつかのそのような組成物では、CD63 結合送達ドメインは、ペプチドリンカーを介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。

10

【0039】

いくつかのそのような組成物では、CD63 結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されている、又は CpG 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、CD63 結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、CD63 結合送達ドメインは、抗 CD63 抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような組成物では、CD63 結合送達ドメインは、抗 CD63 抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片 (scFv) を含む。いくつかのそのような組成物では、CD63 結合送達ドメインは、単鎖可変断片 (scFv) である。いくつかのそのような組成物では、scFv は、配列番号 183 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、scFv は、配列番号 183 に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、scFv コード配列は、配列番号 184~192 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、scFv コード配列は、配列番号 186 に対して少なくとも 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。いくつかのそのような組成物では、scFv コード配列は、配列番号 184~192 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 183 を含む scFv をコードし、任意選択的に、scFv コード配列は、配列番号 186 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 183 を含む scFv をコードし、任意選択的に、scFv コード配列は、配列番号 186 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 183 を含む sc

20

30

40

50

F v をコードする。いくつかのそのような組成物では、s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に記載の配列からなる。

【 0 0 4 0 】

いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されているか、又は C p G 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、C p G 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 4 ~ 2 0 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 1 9 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 1 9 3 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、マルチドメイン治療用タ

10

20

30

40

50

ンパク質は、配列番号 193 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含む。

【0041】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖 DNA 又は二本鎖 DNA である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖 DNA である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【0042】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、一本鎖 AAV (ssAAV) ベクターである。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、AAV8 ベクター、AAV3B ベクター、AAV5 ベクター、AAV6 ベクター、AAV7 ベクター、AAV9 ベクター、AAVrh.74 ベクター、又は AAVhu.37 ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、組換え AAV8 (rAAV8) ベクターである。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、一本鎖 rAAV8 ベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 194～202 のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 736 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選

10

20

30

40

50

択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、C p G 枯渇している。

【0043】

いくつかのそのような組成物では、組成物は標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む。いくつかのそのような組成物では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、(a) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、(b) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、又は (c) (i) C a s タンパク質若しくは C a s タンパク質をコードする核酸、及び (i i) ガイド RNA 若しくはガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、ガイド RNA は、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、ガイド RNA は、C a s タンパク質に結合し、C a s タンパク質にガイド RNA 標的配列を標的とさせる。

【0044】

いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、(a) C a s タンパク質又は C a s タンパク質をコードする核酸、及び (b) ガイド RNA 又はガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、ガイド RNA は、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、ガイド RNA は、C a s タンパク質に結合し、C a s タンパク質にガイド RNA 標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA 標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 0 ~ 6 1 のいずれかに記載の配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、又は少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6、3 0、3 3、及び 4 1 のいずれかに記載の配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、又は少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 0 ~ 6 1 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一であり、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6、3 0、3 3、及び 4 1 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 0 ~ 6 1 のいずれかを含み、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6、3 0、3 3、及び 4 1 のいずれかを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 0 ~ 6 1 のいずれかからなり、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6、3 0、3 3、及び 4 1 のいずれかからなる。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、配列番号 6 2 ~ 1 2 5 のいずれかを含み、任意選択的に、ガイド RNA は、配列番号 6 8、1 0 0、6 2、9 4、6 5、9 7、7 3、及び 1 0 5 のいずれかを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6 に記載の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、又は少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6 に対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6 を含む。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 3 6 からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含む。

【0045】

いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、RNA の形態である。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかのその

10

20

30

40

50

ような組成物では、少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、単一のガイドRNA(sgRNA)である。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0046】

いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Cas9タンパク質は、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質、黄色ブドウ球菌Cas9タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニCas9タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルスCas9タンパク質、又は髄膜炎菌Cas9タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質は、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質は、配列番号11に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含む。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、1つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、5'キャップを含む。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、2

25、又は12に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュードウリジン又はN1-メチル-シュードウリジン、任意選択的にN1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュードウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。

10

【0047】

いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含み、組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194~202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含み、核酸構築物は、ホモロジーアームを含み、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITS)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITSは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITSは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAが、シュードウリジン又はN1-メチル-シュードウリジン、任意選択的にN1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュードウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は

20

30

40

50

配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194～202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0048】

いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質又はCasタンパク質をコードする核酸、及びガイドRNA又はガイドRNAをコードする1つ以上のDNAは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は、脂質A（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアート）である。いくつかのそのような組成物では、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン又は1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）である。いくつかのそのような組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような組成物では、ステルス脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は脂質Aであり、中性脂質はDSPCであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで4つの脂質を含む。

【0049】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含み、組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGと会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194～202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、（i）ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、（ii）ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合

10

20

30

40

50

、(i i i) ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(i v) ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジン又はN1-メチルシュドウリジン、任意選択的にN1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i) ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(i v) ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号194~202のいずれかを含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号196に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0050】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象の細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象の細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象の細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質

を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、細胞は、新生児細胞であり、細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような組成物では、細胞は新生児細胞ではなく、細胞の集団は新生児細胞の集団ではない。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする対象のポンペ病を処置する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、対象は、新生児対象ではない。

10

【0051】

別の態様では、上記の組成物のいずれかを含む細胞が提供される。いくつかのそのような細胞では、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれ、マルチドメイン治療用タンパク質は、標的ゲノム遺伝子座から発現される、又は核酸構築物は、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン1に組み込まれ、マルチドメイン治療用タンパク質は、内因性アルブミン遺伝子座から発現される。いくつかのそのような細胞では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような細胞では、肝臓細胞は、肝細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞ではない。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビボである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビトロ又はエキスビボである。

20

【0052】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、細胞又は細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインであり、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座中のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインであり、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞又は細胞の集団において発現される。別の態様において、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からのリソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達

30

40

50

ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインであり、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞又は細胞の集団において発現される。別の態様では、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座から、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である、又は細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である、又は細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞である、又は細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団ではない。いくつかのそのような方法では、細胞は、インビトロ若しくはエクスピボである、又は細胞の集団は、インビトロ若しくはエクスピボである。いくつかのそのような方法では、細胞は、対象におけるインビボである、又は細胞の集団は、対象におけるインビボである。

【0053】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、対象の細胞又は細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインであり、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座中のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タ

ンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインがCD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインであり、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞において発現される。別の態様において、対象の細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からのリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法であって、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインであり、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞において発現される。別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋組織及び心臓組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である、又は細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である、又は細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞である、又は細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団ではない。

10

20

30

40

50

【0054】

別の態様では、必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座か

ら発現され、任意選択的に、送達ドメインは、C D 6 3 結合送達ドメイン又はT f R 結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたC D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、対象において発現される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたC D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、それを必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減し、任意選択的に、送達ドメインは、C D 6 3 結合送達ドメイン又はT f R 結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減し、任意選択的に、送達ドメインは、C D 6 3 結合送達ドメイン又はT f R 結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたC D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、対象において発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減し、任意選択的に、送達ドメインは、C D 6 3 結合送達ドメイン又はT f R 結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたC D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのこのような方法では、対象は、ポンペ病を有する。別の態様では、必要とする対象のポンペ病を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、それによってポンペ病を処置し、任意選択的に、送達ドメインは、C D 6 3 結合送達ドメイン又はT f R 結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置し、任意選択的に、送達ドメインは、C D 6 3 結合送達ドメイン又はT f R 結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたC D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、対象において発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたC D 6 3 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が

10

20

30

40

50

、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。

【0055】

いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、対象の骨格筋組織及び／又は心臓組織内のグリコーゲンレベルの低減をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象と比較して、対象の筋力を改善する、又は対象の筋力の喪失を予防する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。

10

【0056】

別の態様では、必要とする対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、それによって、対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減し、任意選択的に、送達ドメインは、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減し、任意選択的に、送達ドメインが、CD63結合送達ドメイン又はTfR結合送達ドメインである、方法。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、対象において発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤がヌクレアーゼ標的部位を切断し、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたCD63結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出

20

30

40

50

生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

【0057】

いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、正常の少なくとも約40%、正常の少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は正常の100%のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、乳児発症ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約1%又は約1%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、遅発性ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約40%若しくは正常の約40%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象のベースラインのリソソーム α -グルコシダーゼ活性よりも、リソソーム α -グルコシダーゼ活性を少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%上昇させる。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の6ヶ月後又は24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の1年後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の6ヶ月後又は24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の2年後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の6ヶ月後又は24週間後で対象について測定された発現のピーク

10

20

30

40

50

レベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。

【0058】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象に核酸構築物を投与する前に、対象における既存のAAV免疫性を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存のAAV免疫性は、既存のAAV8免疫性である。いくつかのそのような方法では、既存のAAV免疫性を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。

【0059】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与されない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の後に投与される。

【0060】

いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

【0061】

内因性ALB遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座へのマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）コード配列の挿入及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）コード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が提供される。核酸構築物及び組成物は、細胞又は細胞の集団又は対象において標的ゲノム遺伝子座にマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）核酸を組み込む又は挿入する方法、細胞又は細胞の集団又は対象においてマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）を発現させる方法、細胞又は細胞の集団又は対象におけるグリコーゲン蓄積を低減する方法、対象のポンペ病又はGAA欠損症を処置する方法、並びにGAA活性又は発現が低減した対象などの新生児細胞及び新生児対象を含むポンペ病と診断された対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法において使用され得る。いくつかの態様において、細胞、細胞の集団、又は対象は、新生児細胞、新生児細胞の集団、又は新生児対象である。

【0062】

一態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b)ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸、を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様において、新生児細胞又は新生児細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。別の態様では、新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座から、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる

方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、
(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b)ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝臓細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、ヒト細胞である、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、インビトロ若しくはエキスピボである、又は新生児細胞の集団は、インビトロ若しくはエキスピボである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、新生児対象におけるインビボである、又は新生児細胞の集団は、新生児対象におけるインビボである。

10

20

30

40

50

【0063】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を、新生児対象の新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b)ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸、を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、新生児対象における新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。別の態様では、新生児対象における新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座から、リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b)ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座における標的遺伝子内のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋心臓及び中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝臓細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、ヒト細胞である、又は新生児細胞の

集団は、ヒト細胞の集団である。

【0064】

別の態様では、必要とする新生児対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、治療を必要とする新生児対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのこのような方法では、対象は、ポンペ病を有する。別の態様では、必要とする新生児対象のポンペ病を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。

【0065】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び／又は中枢神経系組織内のグリコーゲンレベルの低減をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象と比較して、対象の筋力を改善する、又は対象の筋力の喪失を予防する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。

【0066】

別の態様では、必要とする新生児対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、(a) リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物、及び(b) ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座

を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。

10

【0067】

いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、正常の少なくとも約40%、正常の少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は正常の100%のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、乳児発症ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約1%又は約1%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、遅発性ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約40%又は正常の約40%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象のベースラインのリソソーム α -グルコシダーゼ活性よりも、リソソーム α -グルコシダーゼ活性を少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%上昇させる。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の6ヶ月後又は24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の1年後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少な

20

30

40

50

くとも50%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の6ヶ月後又は24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の2年後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の2年後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の6ヶ月後又は24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。

10

【0068】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象に核酸構築物を投与する前に、新生児対象における既存のAAV免疫性を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存のAAV免疫性は、既存のAAV8免疫性である。いくつかのそのような方法では、既存のAAV免疫性を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。

【0069】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与されない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の後に投与される。

20

【0070】

いくつかのそのような方法では、TfR結合送達ドメインは、ペプチドリナーを介してリソソームα-グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような方法では、TfR結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、TfR結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、TfR結合送達ドメインは、抗TfR抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような方法では、抗TfR抗原結合タンパク質は、(i)配列番号217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、387、397、407、417、427、437、447、457、467、477、487、497、507、517、若しくは527に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、及び／又は(ii)配列番号222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、382、392、402、412、422、432、442、452、462、472、482、492、502、512、522、又は532に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVRを含む。いくつかのそのような方法では、抗TfR抗原結合タンパク質は、(1)配列番号217に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号222に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(2)配列番号227に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号232に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(3)配列番号237に記載のアミノ酸配列（又はその変異

30

40

50

50

50

[illegible]

50

50

20

50

50

50

番号 4 4 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 5 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x v ）配列番号 4 5 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 6 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x v i ）配列番号 4 6 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 7 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x v i i ）配列番号 4 7 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 8 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x v i i i ）配列番号 4 8 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 9 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x i x ）配列番号 4 9 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 0 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x x ）配列番号 5 0 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 1 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、（ x x x i ）配列番号 5 1 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 2 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、及び／又は（ x x x i i ）配列番号 5 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 3 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R を含む。いくつかのそのような方法では、抗 T f R 抗原結合タンパク質は、（ i ）配列番号 4 3 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 4 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、又は（ i i ）配列番号 4 5 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 6 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R を含む。いくつかのそのような方法では、T f R 結合送達ドメインは、抗 T f R 抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片（ s c F v ）を含む。いくつかのそのような方法では、T f R 結合送達ドメインは、単鎖可変断片（ s c F v ）であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、以下の配向：N' - 重鎖可変領域 - 軽鎖可変領域 - リソソーム α - グルコシダーゼ - C' 又は N' - 軽鎖可変領域 - 重鎖可変領域 - リソソーム α - グルコシダーゼ - C' で配置されたドメインを含み、任意選択的に、s c F v 及びリソソーム α - グルコシダーゼは、ペプチドリンカー、任意選択的に、- (G G G G S)_m-（配列番号 6 0 0）であるペプチドリンカーによって接続されており、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 であり、任意選択的に、s c F v 可変領域は、ペプチドリンカー、任意選択的に、- (G G G G S)_m（配列番号 6 0 0）であるペプチドリンカーによって接続されており、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質は、重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）、並びにリソソーム α - グルコシダーゼを含み、V_H、V_L、及びリソソーム α - グルコシダーゼは、以下：（ i ）V_L-V_H-リソソーム α - グルコシダーゼ、（ i i ）V_H-V_L-リソソーム α - グルコシダーゼ、（ i i i ）V_L- [(G G G G S)₃] - V_H- [(G G G G S)₂] - リソソーム α - グルコシダーゼ、又は V_H- [(G G G G S)₃] - V_L- [(G G G G S)₂] - リソソーム α - グルコシダーゼのように配置される。いくつかのそのような方法では、s c F v は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F v は、配列番号 5 5 4 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、s c F v は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F v は、配列番号 5 5 4 に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7 ~ 5 9 9 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である。任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 5 9 3 ~ 5 9 5 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なく

10

20

30

40

50

50

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% 同一であり、s c F v コード配列は、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 551 を含む s c F v をコードする。いくつかのそのような方法では、s c F v コード配列は、配列番号 587~599 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 593~595 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 593 に記載の配列を含む。任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 590~592 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 590 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、s c F v コード配列は、配列番号 587~599 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 593~595 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 593 に記載の配列からなる。任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 590~592 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 590 に記載の配列からなる。

10

【0071】

いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されている、又は C p G 枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、C p G 枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 及び 205~212 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、C p G 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする

20

30

40

50

。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

【0072】

いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

【0073】

いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されているか、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化され、CpG枯渇している

10

20

30

40

50

50

50

選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 ~ 583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574 ~ 586 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 ~ 583 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、非相同末端結合を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーマームを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、相同組換え修復を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動する

10

20

プロモーターを含まない。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、プロモーターに作動可能に連結され、任意選択的に、プロモーターは、肝臓特異的プロモーターである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖 DNA 又は二本鎖 DNA である。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖 DNA である。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに示される配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 ~ 583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174 ~ 182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574 ~ 586 の

30

40

50

いずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【0074】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、AAV ベクターは、一本鎖 AAV (ssAAV) ベクターである。いくつかのそのような方法では、AAV ベクターは、AAV8 ベクター、AAV3B ベクター、AAV5 ベクター、AAV6 ベクター、AAV7 ベクター、AAV9 ベクター、AAVrh.74 ベクター、又は AAVhu.37 ベクターに由来する。いくつかのそのような方法では、AAV ベクターは、組換え AAV8 (rAAV8) ベクターである。いくつかのそのような方法では、AAV ベクターは、一本鎖 rAAV8 ベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配

10

20

30

40

50

列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 ～ 583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、CpG 枯渇している。

10

【0075】

いくつかのそのような方法では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、(a) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、(b) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、又は (c) (i) Cas タンパク質若しくは Cas タンパク質をコードする核酸、及び (ii) ガイド RNA 若しくはガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、ガイド RNA は、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、ガイド RNA は、Cas タンパク質に結合し、Cas タンパク質にガイド RNA 標的配列を標的とさせる。

20

【0076】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、(a) Cas タンパク質又は Cas タンパク質をコードする核酸、及び (b) ガイド RNA 又はガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、ガイド RNA は、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、ガイド RNA は、Cas タンパク質に結合し、Cas タンパク質にガイド RNA 標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、ガイド RNA 標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 30 ～ 61 のいずれかに記載の配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかに記載の配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 30 ～ 61 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一であり、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかに記載の配列に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 30 ～ 61 のいずれかを含み、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかを含む。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 30 ～ 61 のいずれかからなり、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかからなる。いくつかのそのような方法では、ガイド RNA は、配列番号 62 ～ 125 のいずれかを含み、任意選択的に、ガイド RNA は、配列番号 68、100、62、94、65、97、73、及び 105 のいずれかを含む。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36 に記載の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36 に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である。いくつかのそのような方法では、DNA 標的化セグメントは、配列番号

30

40

50

36を含む。いくつかのそのような方法では、DNA標的化セグメントは、配列番号36からなる。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含む。

【0077】

いくつかのそのような方法では、本方法は、RNAの形態でガイドRNAを投与することを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも1つの修飾は、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドRNAは、単一のガイドRNA(sgRNA)である。いくつかのそのような方法では、本方法は、RNAの形態でガイドRNAを投与することを含み、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0078】

いくつかのそのような方法では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかのそのような方法では、Cas9タンパク質は、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質、黄色ブドウ球菌Cas9タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニCas9タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルスCas9タンパク質、又は髄膜炎菌Cas9タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Casタンパク質は、化膿連鎖球菌Cas9タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Casタンパク質は、配列番号11に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、Casタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような方法では、本方法は、Casタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含む。いくつかのそのような方法では、Casタンパク質をコードするmRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、Casタンパク質をコードするmRNAは、1つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような方法では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンである。いくつかのそのような方法では、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジン、任意選択的にN1-メチルシュードウリジンで完全に置換さ

れている。いくつかのそのような方法では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、5' キャップを含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするm R N A を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、シュードウリジン又は N 1-メチル-シュードウリジン、任意選択的に N 1-メチル-シュードウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするm R N A を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、シュードウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。

10

【0079】

いくつかのそのような方法では、本方法は、R N A の形態でガイド R N A を投与することを含み、ガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするm R N A を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 7 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 4 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 3 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 1 ~ 5 8 3 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 1 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 2 9 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (I T R) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 7 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 4 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 3 に記載の配列を含み、又は任

20

30

40

50

意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、本方法は、RNA の形態でガイド RNA を投与することを含み、ガイド RNA は、配列番号 100 を含み、ガイド RNA は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、Cas タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、シュドウリジン又は N1-メチルシュドウリジン、任意選択的に N1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、本方法は、RNA の形態でガイド RNA を投与することを含み、ガイド RNA は、配列番号 100 を含み、ガイド RNA は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、Cas タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、シュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では

10

20

30

40

50

、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号733に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581～583のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

【0080】

いくつかのそのような方法では、Casタンパク質又はCasタンパク質をコードする核酸、及びガイドRNA又はガイドRNAをコードする1つ以上のDNAは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような方法では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような方法では、カチオン性脂質は、脂質A（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアート）である。いくつかのそのような方法では、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン又は1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、DSPC）である。いくつかのそのような方法では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような方法では、ステルス脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかのそのような方法では、カチオン性脂質は脂質Aであり、中性脂質はDSPCであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。いくつかのそのような方法では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで4つの脂質を含む。

20

30

【0081】

いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、本方法は、RNAの形態のガイドRNAを投与することを含み、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含み、本方法は、Casタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGと会合している。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号574

40

50

～５８６のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号５８４～５８６のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号５８４に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号７３３に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号５８１～５８３のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号５８１に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号７２９に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（I T R）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 7 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 4 ~ 5 8 6 のいずれかに示される配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 4 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物が、配列番号 7 3 3 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 1 ~ 5 8 3 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 1 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物が、配列番号 7 2 9 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（I T R）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、本方法は、RNA の形態のガイド RNA を投与することを含み、ガイド RNA は、配列番号 1 0 0 を含み、ガイド RNA は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、及び (i v) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、C a s タンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする mRNA を含み、C a s タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 2 2 6 、 2 2 5 、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする mRNA は、シュドウリジン又は N 1 - メチルシュドウリジン、任意選択的に N 1 - メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイド RNA 及び C a s タンパク質をコードする mRNA は、脂質 A 、 D S P C 、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 5 0 モル % の脂質 A 、約 9 モル % の D S P C 、約 3 8 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の P E G 2 k - D M G で会合している。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、本方法は、RNA の形態

のガイドRNAを投与することを含み、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本方法は、Casタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号733に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581~583のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号733に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581~583のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又は

10

20

30

40

50

それからなる。

【0083】

別の態様では、上記方法のいずれかによって作製された新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。別の態様では、標的ゲノム遺伝子座に挿入された核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団であって、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されたリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む、新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、肝臓細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、肝細胞である、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、ヒト細胞である、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、インビトロ若しくはエクスピボである、又は新生児細胞の集団は、インビトロ若しくはエクスピボである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、新生児細胞は、対象におけるインビボである、又は新生児細胞の集団は、インビボである。

【0084】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質が発現される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、TfR結合送達ドメインは、ペプチドリンカーを介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、TfR結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されている、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、TfR結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、TfR結合送達ドメインは、抗TfR抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、抗TfR抗原結合タンパク質は、(i)配列番号217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、387、397、407、417、427、437、447、457、467、477、487、497、507、517、若しくは527に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、及び／又は(ii)配列番号222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、382、392、402、412、422、432、442、452、462、472、482、492、502、512、522、又は532に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVRを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、抗TfR抗原結合タンパク質は、(1)配列番号217に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号222に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(2)配列番号227に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHC

10

20

30

40

50

50

50

[illegible]

50

50

30

50

50

記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号443に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCDR1、配列番号444に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCDR2、及び配列番号445に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCDR3を含むLCVR、（b）配列番号458に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCDR1、配列番号459に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCDR2、及び配列番号460に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号463に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCDR1、配列番号464に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCDR2、及び配列番号465に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、抗TfR抗原結合タンパク質は、（i）配列番号217に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号222に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（ii）配列番号227に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号232に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（iii）配列番号237に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号242に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（iv）配列番号247に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号252に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（v）配列番号257に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号262に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（vi）配列番号267に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号272に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（vii）配列番号277に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号282に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（viii）配列番号287に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号292に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（ix）配列番号297に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号302に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（x）配列番号307に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号312に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xi）配列番号317に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号322に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xii）配列番号327に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号332に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xiii）配列番号337に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号342に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xiv）配列番号347に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号352に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xv）配列番号357に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号362に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xvi）配列番号367に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号372に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xvii）配列番号377に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号382に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xviii）配列番号387に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号392に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xix）配列番号397に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号402に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xx）配列番号407に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号412に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xxi）配列番号417に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVR、及び配列番号422に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVR、（xxii）配列

10

20

30

40

50

番号 4 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 3 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x i i i) 配列番号 4 3 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 4 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x i v) 配列番号 4 4 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 5 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x v) 配列番号 4 5 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 6 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x v i) 配列番号 4 6 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 7 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x v i i) 配列番号 4 7 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 8 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x v i i i) 配列番号 4 8 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 9 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x i x) 配列番号 4 9 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 0 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x x) 配列番号 5 0 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 1 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x x i) 配列番号 5 1 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 2 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、及び／又は (x x x i i) 配列番号 5 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 3 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、抗 T f R 抗原結合タンパク質は、(i) 配列番号 4 3 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 4 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、又は (i i) 配列番号 4 5 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 6 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、T f R 結合送達ドメインは、抗 T f R 抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片 (s c F v) を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、T f R 結合送達ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、以下の配向：N' - 重鎖可変領域 - 軽鎖可変領域 - リソソーム α - グルコシダーゼ - C' 又は N' - 軽鎖可変領域 - 重鎖可変領域 - リソソーム α - グルコシダーゼ - C' で配置されたドメインを含み、任意選択的に、s c F v 及びリソソーム α - グルコシダーゼは、ペプチドリンカー、任意選択的に、- (G G G G S)_m - (配列番号 6 0 0) であるペプチドリンカーによって接続されており、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 であり、任意選択的に、s c F v 可変領域は、ペプチドリンカー、任意選択的に、- (G G G G S)_m (配列番号 6 0 0) であるペプチドリンカーによって接続されており、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質は、重鎖可変領域 (V_H) 及び軽鎖可変領域 (V_L)、並びにリソソーム α - グルコシダーゼを含み、V_H、V_L、及びリソソーム α - グルコシダーゼは、以下：(i) V_L - V_H - リソソーム α - グルコシダーゼ、(i i) V_H - V_L - リソソーム α - グルコシダーゼ、(i i i) V_L - [(G G G G S)₃] - V_H - [(G G G G S)₂] - リソソーム α - グルコシダーゼ、又は (i v) V_H - [(G G G G S)₃] - V_L - [(G G G G S)₂] - リソソーム α - グルコシダーゼのように配置される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、s c F v は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F v は、配列番号 5 5 4 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、s c F v は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F v は、

10

20

30

40

50

50

くとも98%、又は少なくとも99%同一であり、s c F vコード配列は、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号554を含むs c F vをコードする。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590~592のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号590~592を含むs c F vをコードし、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号551を含むs c F vをコードし、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に対して少なくとも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%同一であり、s c F vコード配列は、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号551を含むs c F vをコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、s c F vコード配列は、配列番号587~599のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593~595のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列を含む。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590~592のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、s c F vコード配列は、配列番号587~599のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593~595のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列からなる。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590~592のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に記載の配列からなる。

10

20

30

40

50

【0085】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼは、リソソームα-グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団ではリソソームα-グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団ではリソソームα-グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されている、又はC p G枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、C p G枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソームα-グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソームα-グルコシダーゼタンパク質

をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

10

【0086】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されているか、又はCpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソ-

20

30

40

50

ム α -グロコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グロコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含むリソソーム α -グロコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グロコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グロコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、リソソーム α -グロコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グロコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。

10

【0087】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されているか、又は CpG 枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570~573 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570~573 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574~586 のいずれかに対して少なくとも 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。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584~586 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581~583 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 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% 同一であり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574~586 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少な

20

30

40

50

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 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 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 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに対して少なくとも 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 % 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 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 % 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 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 % 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 573 に記載の配列を含む。

10

20

30

40

50

任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 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% 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列はプロモーターに作動可能に連結されており、任意選択的に、プロモーターは肝臓特異的プロモーターである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼ

コード配列は、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。

10

20

30

【0088】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団において、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。

【0089】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された TfR 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対して CpG 枯渇している、組成物が提供される。いくつかのそのような組成物では、TfR 結合送達ドメインは、ペプチドリinker を介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号 173 に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかに対して少なくとも 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

40

50

あり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

【0090】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対してCpG枯渇している、組成物が提供される。いくつかのそのような組成物では、TfR結合送達ドメインは、ペプチドリンカーを介してリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合される。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182のいずれかに対して少なくとも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% 同一であり、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、配列番号 173 を含む リソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174~182 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。

10

20

30

40

50

【0091】

いくつかのそのような組成物では、TfR 結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されている、又は CpG 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、TfR 結合送達ドメインのコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇している。いくつかのそのような組成物では、TfR 結合送達ドメインは、抗 TfR 抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような組成物では、抗 TfR 抗原結合タンパク質は、(i) 配列番号 217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、387、397、407、417、427、437、447、457、467、477、487、497、507、517、若しくは 527 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R の HCD R1、HCD R2、及び HCD R3 を含む HCV R、及び／又は (ii) 配列番号 222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、382、392、402、412、422、432、442、452、462、472、482、492、502、512、522、又は 532 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R の LCD R1、LCD R2、及び LCD R3 を含む LCV R を含む。いくつかのそのような組成物では、抗 TfR 抗原結合タンパク質は、(1) 配列番号 217 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R の HCD R1、HCD R2、及び HCD R3 を含む HCV R、並びに配列番号 222 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R の LCD R1、LCD R2、及び LCD R3 を含む LCV R、(2) 配列番号 227 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R の HCD R1、HCD R2、及び HCD R3 を含む HCV R、並びに配列番号 232 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R の LCD R1、LCD R2、及び LCD R3 を含む LCV R、(3) 配列番号 237 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R の HCD R1、HCD R2、及び HCD R3 を含む HCV R、並びに配列番号 242 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む LCV R の LCD R1、LCD R2、及び LCD R3 を含む LCV R、(4) 配列番号 247 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む HCV R の HCD

50

50

50

50

50

50

50

L C V R、(x x v i) 配列番号 4 6 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 7 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x v i i) 配列番号 4 7 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 8 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x v i i i) 配列番号 4 8 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 9 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x i x) 配列番号 4 9 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 0 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x x) 配列番号 5 0 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 1 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、(x x x i) 配列番号 5 1 7 に

記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 2 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、及び／又は (x x x i i) 配列番号 5 2 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 5 3 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R を含む。いくつかのそのような組成物では、抗 T f R 抗原結合タンパク質は、(i) 配列番号 4 3 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 4 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R、又は (i i) 配列番号 4 5 7 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む H C V R、及び配列番号 4 6 2 に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含む L C V R を含む。いくつかのそのような組成物では、T f R 結合送達ドメインは、抗 T f R 抗体、抗体断片、又は単鎖可変断片 (s c F v) を含む。いくつかのそのような組成物では、T f R 結合送達ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、以下の配向：N' - 重鎖可変領域 - 軽鎖可変領域 - リソソーム α - グルコシダーゼ - C' 又は N' - 軽鎖可変領域 - 重鎖可変領域 - リソソーム α - グルコシダーゼ - C' で配置されたドメインを含み、任意選択的に、s c F v 及びリソソーム α - グルコシダーゼは、ペプチドリンカー、任意選択的に、- (G G G G S)_m - (配列番号 6 0 0) であるペプチドリンカーによって接続されており、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 1 0 であり、任意選択的に、s c F v 可変領域は、ペプチドリンカー、任意選択的に、- (G G G G S)_m (配列番号 6 0 0) であるペプチドリンカーによって接続されており、m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 1 0 である。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質は、重鎖可変領域 (V_H) 及び軽鎖可変領域 (V_L)、並びにリソソーム α - グルコシダーゼを含み、V_H、V_L 及びリソソーム α - グルコシダーゼは、以下：(i) V_L - V_H - リソソーム α - グルコシダーゼ、(i i) V_H - V_L - リソソーム α - グルコシダーゼ、(i i i) V_L - [(G G G G S)₃] - V_H - [(G G G G S)₂] - リソソーム α - グルコシダーゼ、又は (i v) V_H - [(G G G G S)₃] - V_L - [(G G G G S)₂] - リソソーム α - グルコシダーゼのように配置される。いくつかのそのような組成物では、s c F v は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F v は、配列番号 5 5 4 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、s c F v は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F v は、配列番号 5 5 4 に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7 ~ 5 9 9 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 5 9 3 ~ 5 9 5 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一であり、任意選択的に、s c F v コード配列は、配列番号 5 9 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、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。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590～592のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に対して少なくとも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。いくつかのそのような組成物では、s c F vコード配列は、配列番号587～599のいずれかに対して少なくとも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%、
10 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%同一であり、配列番号540、549、551、及び554のいずれかを含むs c F vをコードする。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593～595のいずれかに対して少なくとも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%、
20 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%同一であり、配列番号554を含むs c F vをコードする。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも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%、
30 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%同一であり、配列番号554を含むs c F vをコードする。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に対して少なくとも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%、
40 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%同一であり、配列番号551を含むs c F vをコードする。いくつかのそのような組成物では、s c F vコード配列は、配列番号587～599のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、
50 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%同一であり、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号540、549、551、及び554のいずれかを含むs c F vをコードする。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593～595のいずれかに対して少なくとも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%、
60 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%同一であり、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号554を含むs c F vをコードし、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも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%、
70 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%同一であり、s c F vコード配列は、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号554を含むs c F vをコードする。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590～592のいずれかに対して少なくとも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%、
80 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%同一であり、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号551を含むs c F vをコードし、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に対して少なくとも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%、
90 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%同一であり、s c F vコード配列は、コドン最適化されており、C p G枯渇しており、配列番号5

10

20

30

40

50

51を含むs c F vをコードする。いくつかのそのような組成物では、s c F vコード配列は、配列番号587～599のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593～595のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列を含む。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590～592のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、s c F vコード配列は、配列番号587～599のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593～595のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列からなる。任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590～592のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、s c F vコード配列は、配列番号590に記載の配列からなる。

10

【0092】

いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されているか、又はC p G枯渇している。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、C p G枯渇している。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号570～573のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号573に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号570～573のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号573に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574～586のいずれかに対して少なくとも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。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584～586のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584に対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581～583のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に対して少なくとも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%同一である配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574～586のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質は

20

30

40

50

50

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% 同一であり、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 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% 同一であり、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 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% 同一である配列を含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、コドン最適化されており、CpG 枯渇しており、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 572 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列からなり、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない。いくつかのそのような組成物では、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、プロモーターに作動可能に連結され、任意選択的に、プロモーター

は、肝臓特異的プロモーターである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖 DNA 又は二本鎖 DNA である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖 DNA である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のい

10

20

30

40

50

いずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。

【0093】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、一本鎖 AAV (ssAAV) ベクターである。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、AAV8 ベクター、AAV3B ベクター、AAV5 ベクター、AAV6 ベクター、AAV7 ベクター、AAV9 ベクター、AAVrh.74 ベクター、又は AAVhu.37 ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、組換え AAV8 (rAAV8) ベクターである。いくつかのそのような組成物では、AAV ベクターは、一本鎖 rAAV8 ベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 及び 205～212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築

物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174 ~ 182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 ~ 583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、CpG 枯渇している。

10

20

30

40

50

【0094】

いくつかのそのような組成物では、組成物は標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む。いくつかのそのような組成物では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、(a) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、(b) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、又は (c) (i) Cas タンパク質若しくは Cas タンパク質をコードする核酸、及び (ii) ガイド RNA 若しくはガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、ガイド RNA は、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、ガイド RNA は、Cas タンパク質に結合し、Cas タンパク質にガイド RNA 標的配列を標的とさせる。

【0095】

いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、(a) Cas タンパク質又は Cas タンパク質をコードする核酸、及び (b) ガイド RNA 又はガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA を含み、ガイド RNA は、ガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含み、ガイド RNA は、Cas タンパク質に結合し、Cas タンパク質にガイド RNA 標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA 標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン 1 内にある。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 30 ~ 61 のいずれかに記載の配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36、30、33、及び 41 のいずれかに記載の配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも

19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であり、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかを含み、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号30～61のいずれかからなり、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかからなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、配列番号62～125のいずれかを含み、任意選択的に、ガイドRNAは、配列番号68、100、62、94、65、97、73、及び105のいずれかを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号36に記載の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号36に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号36を含む。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号36からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含む。

10

20

【0096】

いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、RNAの形態である。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも1つの修飾は、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、単一のガイドRNA(sgRNA)である。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii)ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii)ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv)ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

30

40

【0097】

いくつかのそのような組成物では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。

50

いくつかのそのような組成物では、C a s 9 タンパク質は、化膿連鎖球菌 C a s 9 タンパク質、黄色ブドウ球菌 C a s 9 タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニ C a s 9 タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス C a s 9 タンパク質、又は髄膜炎菌 C a s 9 タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質は、化膿連鎖球菌 C a s 9 タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質は、配列番号 1 1 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような組成物では、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、1 つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又は N 1 -メチルシュードウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジン又は N 1 -メチルシュードウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、5 ' キャップを含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジン又は N 1 -メチルシュードウリジン、任意選択的に N 1 -メチルシュードウリジンで完全に置換されており、5 ' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、シュードウリジンで完全に置換されており、5 ' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 8 】

いくつかのそのような組成物では、ガイド R N A は R N A の形態であり、ガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含み、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードする m R N A を含み、C a s タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5 ' から 3 ' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかに示される配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 6 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 7 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 4 ~ 5 8 6 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 5 8 4 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 7 3 3 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 1 ~ 5 8 3 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 5 8 1 に記載の配列を含み、任意選択

的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174 ~ 182 のいずれかに示される配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584 ~ 586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 ~ 583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は RNA の形態であり、ガイド RNA は、配列番号 100 を含み、ガイド RNA は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Cas タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、シュドウリジン又は N1-メチルシュドウリジン、任意選択的に N1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は RNA の形態であり、ガイド RNA は、配列番号 100 を含み、ガイド RNA は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Cas タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Cas タンパク質をコードする mRNA を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 226、225、又は 12 に記載の配列を含み、Cas タンパク質をコードする mRNA は、シュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシ

ダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174～182 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

20

30

40

50

【0099】

いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質又は Cas タンパク質をコードする核酸、及びガイド RNA 又はガイド RNA をコードする 1 つ以上の DNA は、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は、脂質 A ((9Z, 12Z) - 3 - ((4, 4-ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート) である。いくつかのそのような組成物では、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン又は 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine、DSPC) である。いくつかのそのような組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような組成物では、ステルス脂質は、PEG2k-DMG である。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は脂質 A であり、中性脂質は DSPC であり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質は PEG2k-DMG である。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約 50 モル % の脂質 A、約 9 モル % の DSPC、約 38 モル % のコレステロール、及び約 3 モル % の PEG2k-DMG で 4 つの脂質を含む。

【0100】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含み、組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGと会合している。

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかに示される配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号733に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581～583のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584～586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号733に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581～583のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0101】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i)ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオ

エート結合、(i i) ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(i v) ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジン又はN1-メチルシュドウリジン、任意選択的にN1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、(i) ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i) ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(i i i) ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(i v) ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、Casタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Casタンパク質をコードするmRNAを含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、Casタンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びCasタンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号574~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号584~586のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号584に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号733に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581~583のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号581に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号729に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用

10

20

30

40

50

タンパク質のコード配列は、配列番号 574～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列が、配列番号 584 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含み、又は任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含み、任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

【0102】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象の細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象の細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象の細胞又は細胞の集団においてマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、細胞は、新生児細胞であり、細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような組成物では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 24 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような組成物では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 12 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような組成物では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような組成物では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような組成物では、細胞は新生児細胞ではなく、細胞の集団は新生児細胞の集団ではない。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする対象のポンペ病を処置する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後 24 週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後 12 週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、対象は、新生児対象ではない。

20

30

40

【0103】

50

別の態様では、上記の組成物のいずれかを含む細胞が提供される。いくつかのそのような細胞では、核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれ、マルチドメイン治療用タンパク質が、標的ゲノム遺伝子座から発現される、又は核酸構築物が、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン1に組み込まれ、マルチドメイン治療用タンパク質が、内因性アルブミン遺伝子座から発現される。いくつかのそのような細胞では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような細胞では、肝臓細胞は、肝細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞ではない。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビボである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビトロ又はエクスピボである。

10

20

30

40

50

【0104】

別の態様では、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞又は細胞の集団において発現される。別の態様では、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である、又は細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である、又は細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞である、又は細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団ではない。いくつかのそのような方法では、細胞は、インビトロ若しくはエクスピボである、又は細胞の集団は、インビトロ若しくはエクスピボである。いくつかのそのような方法では、細胞は、対象におけるインビボである、又は細胞の集団は、対象におけるインビボである。

【0105】

別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼに融

合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞において発現される。別の態様では、対象の細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質に融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である、又は細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である、又は細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞である、又は細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 2 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 1 2 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団ではない。

10

20

30

【0106】

別の態様では、必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、それを必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合された T f R 結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのこのような方法では、対象は、ポンペ病を有する。別の態様では、必要とする対象のポンペ病を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記

40

50

の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物が標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。

【0107】

10

いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

【0108】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び／又は中枢神経系組織内のグリコーゲンレベルの低減をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象と比較して、対象の筋力を改善する、又は対象の筋力の喪失を予防する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。

20

【0109】

別の態様では、必要とする新生児対象においてポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを新生児対象に投与することを含み、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを新生児対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤がヌクレアーゼ標的部位を切断し、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼに融合されたTfR結合送達ドメインを含むマルチドメイン治療用タンパク質が、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質又はリソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。

30

40

【0110】

いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法で

50

は、対象は、新生児対象ではない。

【0111】

いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、正常の少なくとも約 40%、正常の少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、又は正常の 100% のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、乳児発症ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約 1% 又は約 1% 超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、遅発性ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約 40% 又は正常の約 40% 超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現又は活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象のベースラインのリソソーム α -グルコシダーゼ活性よりも、リソソーム α -グルコシダーゼ活性を少なくとも約 1%、少なくとも約 5%、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、又は少なくとも約 100% 増加させる。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後又は 24 週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 50% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 1 年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 50% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後又は 24 週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 2 年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 50% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 2 年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。いくつかのそのような方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後又は 24 週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも 60% である。

【0112】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象に核酸構築物を投与する前に、対象に

おける既存の A A V 免疫性を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存の A A V 免疫性は、既存の A A V 8 免疫性である。いくつかのそのような方法では、既存の A A V 免疫性を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。

【0113】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与されない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の後に投与される。いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

【0114】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼのコード配列を含む核酸構築物を含む組成物であって、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、野生型リソソーム α -グルコシダーゼコード配列に対してCpG枯渇している、組成物が提供される。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、リソソーム α -グルコシダーゼシグナルペプチド及びプロペプチドを欠く。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼは、配列番号173に記載の配列からなる。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、コドン最適化されており、CpG枯渇している。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソーム α -グルコシダーゼタンパク質をコードし、任意選択的に、リソソーム α

ーグルコシダーゼコード配列は、配列番号176に対して少なくとも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%同一であり、コドン最適化されており、CpG枯渇しており、配列番号173を含むリソソームαーグルコシダーゼタンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列を含み、任意選択的に、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかに記載の配列からなり、任意選択的に、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。

10

【0115】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第1のリソソームαーグルコシダーゼコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、リソソームαーグルコシダーゼコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、リソソームαーグルコシダーゼコード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、リソソームαーグルコシダーゼコード配列の下流にポリアデニル化シグナル又は配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーマームを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、リソソームαーグルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まない。いくつかのそのような組成物では、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、プロモーターに作動可能に連結され、任意選択的に、プロモーターは肝臓特異的プロモーターである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖DNA又は二本鎖DNAである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖DNAである。

20

【0116】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、リソソームαーグルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかを含み、任意選択的に、リソソームαーグルコシダーゼコード配列は、配列番号176を含み、核酸構築物は、リソソームαーグルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まない。

30

【0117】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、AAVベクターは、一本鎖AAV(ssAAV)ベクターである。いくつかのそのような組成物では、AAVベクターは、AAV8ベクター、AAV3Bベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV9ベクター、AAVrh.74ベクター、又はAAVhu.37ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、AAVベクターは、組換えAAV8(rAAV8)ベクターである。いくつかのそのような組成物では、AAVベクターは、一本鎖rAAV8ベクターである。

40

【0118】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプ

50

ター、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号174~182及び205~212のいずれかを含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号176を含み、核酸構築物は、リソソーム α -グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーマームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(ITR)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、CpG枯渇している。

10

【0119】

いくつかのそのような組成物は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む。いくつかのそのような組成物では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン1内にある。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、(a)ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、(b)転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、又は(c)(i)Casタンパク質若しくはCasタンパク質をコードする核酸、及び(ii)ガイドRNA若しくはガイドRNAをコードする1つ以上のDNAを含み、ガイドRNAは、ガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含み、ガイドRNAは、Casタンパク質に結合し、Casタンパク質にガイドRNA標的配列を標的とさせる。

20

【0120】

いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、(a)Casタンパク質又はCasタンパク質をコードする核酸、及び(b)ガイドRNA又はガイドRNAをコードする1つ以上のDNAを含み、ガイドRNAは、ガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含み、ガイドRNAは、Casタンパク質に結合し、Casタンパク質にガイドRNA標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNA標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン1内にある。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、(I)DNA標的化セグメントは、配列番号30~61のいずれかに記載の配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は(II)DNA標的化セグメントは、配列番号30~61のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であり、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号30~61のいずれかを含み、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかを含む。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配列番号30~61のいずれかからなり、任意選択的に、DNA標的化セグメントは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかからなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAは、配列番号62~125のいずれかを含み、任意選択的に、ガイドRNAは、配列番号68、100、62、94、65、97、73、及び105のいずれかを含む。いくつかのそのような組成物では、(I)DNA標的化セグメントは、配列番号36に記載の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含み、及び／又は(II)DNA標的化セグメントは、配列番号36に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一である。いくつかのそのような組成物では、DNA標的化セグメントは、配

30

40

50

列番号 36 を含む。いくつかのそのような組成物では、DNA 標的化セグメントは、配列番号 36 からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、配列番号 68 又は 100 を含む。

【0121】

いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、RNA の形態である。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ガイド RNA の 5' 末端の最初の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ガイド RNA の 3' 末端の最後の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも 1 つの修飾は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は、単一のガイド RNA (sgRNA) である。いくつかのそのような組成物では、ガイド RNA は RNA の形態であり、ガイド RNA は、配列番号 100 を含み、ガイド RNA は、(i) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 4 つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイド RNA の 5' 末端の最初の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び (iv) ガイド RNA の 3' 末端の最後の 3 つのヌクレオチドにおける 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0122】

いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質は、Cas9 タンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Cas9 タンパク質は、化膿連鎖球菌 Cas9 タンパク質、黄色ブドウ球菌 Cas9 タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニ Cas9 タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス Cas9 タンパク質、又は髄膜炎菌 Cas9 タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質は、化膿連鎖球菌 Cas9 タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質は、配列番号 11 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Cas タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Cas タンパク質をコードする mRNA を含む。いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質をコードする mRNA は、少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質をコードする mRNA は、1 つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又は N1-メチルシュードウリジン、任意選択的に N1-メチルシュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、Cas タンパク質をコードする mRNA は、シュードウリジン又は N1-メチルシュードウリジン、任意選択的に N1-メチルシュードウリジンで完全に

置換されている。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、5' キャップを含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。

【0123】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするm R N A を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、シュドウリジン又はN1-メチルシュドウリジン、任意選択的にN1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号 6 8 又は 1 0 0 を含み、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするm R N A を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかを含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 6 を含み、核酸構築物は、リソソーム α -グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(I T R)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるI T Rは、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるI T Rは、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0124】

いくつかのそのような組成物では、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号 1 0 0 を含み、ガイドRNAは、(i) ガイドRNAの5' 末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(ii) ガイドRNAの3' 末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、(iii) ガイドRNAの5' 末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び(iv) ガイドRNAの3' 末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするm R N A を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、配列番号 2 2 6、2 2 5、又は 1 2 に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードするm R N A は、シュドウリジン又はN1-メチルシュドウリジン、任意選択的にN1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5' キャップを含み、ポリアデニル化配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 4 ~ 1 8 2 及び 2 0 5 ~ 2 1 2 のいずれかを含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 1 7 6 を含み、核酸構築物は、リソソーム α -グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖r A A V 8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復(I T R)が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるI T Rは、配列番号 1 6 0 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるI T Rは、配列番号 1 6 0 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0125】

いくつかのそのような組成物では、C a s タンパク質又はC a s タンパク質をコードする核酸、及びガイドRNA又はガイドRNAをコードする1つ以上のDNAは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は、脂質A（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアート）である。いくつかのそのような組成物では、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン又は1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、DSPC）である。いくつかのそのような組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような組成物では、ステルス脂質は、1，2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000（1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000、PEG2k-DMG）である。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は脂質Aであり、中性脂質はDSPCであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGで4つの脂質を含む。

10

【0126】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号68又は100を含み、組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするmRNAを含み、C a s タンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、ガイドRNA及びC a s タンパク質をコードするmRNAは、脂質A、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約50モル%の脂質A、約9モル%のDSPC、約38モル%のコレステロール、及び約3モル%のPEG2k-DMGと会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5'から3'に、スプライスアクセプター、リソソームα-グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号174～182及び205～212のいずれかを含み、任意選択的に、リソソームα-グルコシダーゼコード配列は、配列番号176を含み、核酸構築物は、リソソームα-グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖rAAV8ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ITR）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

20

30

【0127】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、ガイドRNAはRNAの形態であり、ガイドRNAは、配列番号100を含み、ガイドRNAは、（i）ガイドRNAの5'末端の最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、（ii）ガイドRNAの3'末端の最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、（iii）ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及び（iv）ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、本組成物は、C a s タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、C a s タンパク質をコードするmRNAを含み、C a s タンパク質をコードするmRNAは、配列番号226、225、又は12に記載の配列を含み、C a s タンパク質をコードするmRNAは、シュドウリジン又はN1-メチルシュドウリジン、任意選択的にN1-メチルシュドウリジンで完全に置換されており、5'キャップを含み、ポリアデニル化配列を含み、ガイドRNA及びC

40

50

as タンパク質をコードする mRNA は、脂質 A、DSPC、コレステロール、及び PEG 2k-DMG を含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約 50 モル% の脂質 A、約 9 モル% の DSPC、約 38 モル% のコレステロール、及び約 3 モル% の PEG 2k-DMG で会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、5' から 3' に、スプライスアクセプター、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列、及びポリアデニル化シグナル又は配列を含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかを含み、任意選択的に、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、配列番号 176 を含み、核酸構築物は、リソソーム α -グルコシダーゼの発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖 rAAV8 ベクターにあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復 (ITR) が隣接しており、任意選択的に、少なくとも一方の末端における ITR は、配列番号 160 を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、任意選択的に、各末端における ITR は、配列番号 160 を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

【0128】

いくつかのそのような組成物は、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼコード配列を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、対象の細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼコード配列を標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、対象における細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、対象における細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、必要とする対象において組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、必要とする対象においてポンペ病を処置する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物は、必要とする新生児対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法における使用のためのものである。

20

30

【0129】

別の態様では、上記の組成物のいずれかを含む細胞が提供される。いくつかのそのような細胞では、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれ、リソソーム α -グルコシダーゼは、標的ゲノム遺伝子座から発現される、又は核酸構築物は、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン 1 に組み込まれ、リソソーム α -グルコシダーゼは、内因性アルブミン遺伝子座から発現される。いくつかのそのような細胞では、細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような細胞では、肝臓細胞は、肝細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後 24 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後 12 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後 8 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後 4 週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞ではない。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビボである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビトロ又はエクスピボである。

40

【0130】

50

一態様では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列を、細胞又は細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、細胞又は細胞の集団においてリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞又は細胞の集団において発現される。別の態様では、細胞又は細胞の集団において標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを細胞又は細胞の集団に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼは、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である、又は細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である、又は細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞である、又は細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後24週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後12週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後8週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後4週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない、又は細胞の集団は、新生児細胞の集団ではない。いくつかのそのような方法では、細胞は、インビトロ若しくはエキスピボである、又は細胞の集団は、インビトロ若しくはエキスピボである。いくつかのそのような方法では、細胞は、対象におけるインビボである、又は細胞の集団は、対象におけるインビボである。

【0131】

別の態様では、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列を対象の細胞内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、対象の細胞においてリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、細胞において発現される。別の態様では、対象の細胞内の標的ゲノム遺伝子座からリソソーム α -グルコシダーゼを発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼは、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない。

【0132】

別の態様では、必要とする対象においてリソソーム α -グルコシダーゼ欠損症を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、対象において発現される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼは、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、必要とする対象の組織内のグリコーゲン蓄積を減少させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、組織中のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼは、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのこのような方法では、対象は、ポンペ病を有する。別の態様では、必要とする対象のポンペ病を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結されており、対象において発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼは、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによってポンペ病を処置する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。

10

20

【0133】

いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

30

【0134】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環リソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、同じ年齢での野生型レベルに匹敵する、対象の骨格筋組織及び心臓組織内のグリコーゲンレベルの低減をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象と比較して、対象の筋力を改善する、又は対象の筋力の喪失を予防する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。

40

【0135】

別の態様では、必要とする対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、上記の組成物のいずれかを対象に投与することを含み、リソソーム α -グルコシダーゼコード配列は、核酸構築物中のプロモーターに作動可能に連結され、対象において発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又

50

は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法は、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤がヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し、リソソーム α -グルコシダーゼが、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病である。いくつかのそのような方法では、ポンペ病は、遅発性ポンペ病である。

【0136】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象において治療有効レベルの循環リソソーム α -グルコシダーゼをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかのそのような方法では、本方法は、対象の骨格筋及び心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。

10

【0137】

いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後24週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後12週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後8週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後4週間以内のヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

20

【0138】

いくつかのそのような方法では、本方法は、リソソーム α -グルコシダーゼをコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、リソソーム α -グルコシダーゼをコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルの上昇をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $7\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 $9\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は少なくとも約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、少なくとも約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は少なくとも約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の対象におけるリソソーム α -グルコシダーゼの血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、正常の少なくとも約40%、正常の少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は正常の100%のリソソーム α -グルコシダーゼ活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、(I)対象が乳児発症ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約1%若しくは約1%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現若しくは活性レベルを達成する、又は(II)対象が遅発性ポンペ病を有し、本方法は、正常の少なくとも約40%若しくは正常の約40%超のリソソーム α -グルコシダーゼ発現若しくは活性レベルを達成する。いくつかの方法では、リソソーム α -グルコシダーゼのFIXの発現又は活性は、投与の24週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのリソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかの方法では、リソソーム α -グルコシダーゼのFIXの発現又は活性は、投与の1年後に対象について測定された発現のピークレベ

30

40

50

ルでのリソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかの方法では、リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性は、投与の24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのリソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかの方法では、リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性は、投与の2年後で対象について測定された発現のピークレベルでのリソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかの方法では、リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性は、投与の2年後で対象について測定された発現のピークレベルでのリソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかの方法では、リソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性は、投与の24週間後で対象について測定された発現のピークレベルでのリソソーム α -グルコシダーゼの発現又は活性の少なくとも60%である。

10

【0139】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対象に核酸構築物を投与する前に、対象における既存のAAV免疫性を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存のAAV免疫性は、既存のAAV8免疫性である。いくつかのそのような方法では、既存のAAV免疫性を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。

【0140】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸と同時に投与されない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の核酸の後に投与される。

20

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】成体マウス及び新生仔マウスにおいて試験した異なるヒト第IX因子(hFIX)挿入鑄型を説明する概略図を示す。

【図2A】エピソームhFIX(エピソーム)、LNP-g666+hFIX-HDR-500鑄型(HDR500)、LNP-g666+hFIX-HDR-800鑄型(HDR800)、及びLNP-g666+hFIX-NHEJ鑄型(NHEJ)の投与後の異なる時点での新生仔マウス(群当たりn=4~10、雄及び雌)及び成体マウス(群当たりn=5、雌)におけるhFIX血漿レベルを示す。新生仔マウスにおける投与はP0又はP1に行った。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。データを対数スケールで示す。

30

【図2B】エピソームhFIX(エピソーム)、LNP-g666+hFIX-HDR-500鑄型(HDR500)、LNP-g666+hFIX-HDR-800鑄型(HDR800)、及びLNP-g666+hFIX-NHEJ鑄型(NHEJ)の投与後の異なる時点での新生仔マウス(群当たりn=4~10、雄及び雌)におけるhFIX血漿レベルを示す。新生仔マウスにおける投与はP0又はP1に行った。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。データを線形スケールで示す。

40

【図3】Cas9 mRNA及びヒトアルブミン(ALB)イントロン1を標的とするsgRNA 9860を含有する脂質ナノ粒子であるLNP-g9860、並びに抗CD63:GAA挿入鑄型と共にパッケージングされた組換えAAV8(rAAV8)カプシドの概略図を示す。

【図4】抗CD63 scFvへの融合を介したリソソームへのGAAの標的化の概略図を示す。

【図5】ALB遺伝子座における抗CD63:GAA挿入鑄型のCRISPR/Cas9媒介挿入についての概略図を示す。ヒトALB遺伝子座を示しており、Cas9切断部位

50

をハサミで示している。挿入鑄型中の抗CD63:GAA導入遺伝子に隣接するスプライスアクセプター部位を示す。内因性ALBプロモーターによって駆動される挿入及び転写に続いて、ALBエキソン1と挿入された抗CD63:GAA DNA鑄型との間にスプライシングが起こり、破線で図示されるように、ハイブリッドALB抗CD63 GAA mRNAが生成される。ALBシグナルペプチドは、抗CD63:GAAの分泌を促進し、タンパク質成熟中に除去されて血漿中に抗CD63:GAAを生じる。

【図6】成体ポンペ病モデル雄及び雌マウス ($n=12$; $GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) へのLNP-g666 ($1\text{mg}/\text{kg}$) 及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型 ($1.2 \times 10^8 \text{ vg}/\text{kg}$) (「挿入」) の投与後、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAV ($4 \times 10^8 \text{ vg}/\text{kg}$) (「エピソーム」) の投与後の10ヶ月の時間経過にわたる血清中の抗CD63:GAAのレベルを示す。

10

【図7】成体ポンペ病モデル雄及び雌マウス ($n=12$; $GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) へのLNP-g666及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与10ヵ月後、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAVのへの投与10ヵ月後の、ポンペ病モデルマウス ($GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) における心臓、大腿四頭筋、横隔膜、及び脊髄におけるグリコーゲンレベルを示す。野生型GAAマウス ($GAA^{+/+}$; $CD63^{hu/hu}$; $n=4$) 及び未処置ポンペ病モデルマウス ($n=4$) を対照として使用した。水平の点線は、アッセイの検出下限である。

【図8A】新生児(P1)ポンペ病モデルマウス ($GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) へのLNP-g666及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与後 ($n=10$; 雄及び雌; 「挿入」)、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAVの投与後 ($n=6$; 雄及び雌; 「エピソーム」) の、15ヶ月の時間経過にわたる血清中の抗CD63:GAAのレベルを示す。水平の点線は、アッセイの検出下限である。図8Aのエラーバーは±SDであり、図8Bのエラーバーは±SEMである。

20

【図8B】新生児(P1)ポンペ病モデルマウス ($GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) へのLNP-g666及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与後 ($n=10$; 雄及び雌; 「挿入」)、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAVの投与後 ($n=6$; 雄及び雌; 「エピソーム」) の、15ヶ月の時間経過にわたる血清中の抗CD63:GAAのレベルを示す。水平の点線は、アッセイの検出下限である。図8Aのエラーバーは±SDであり、図8Bのエラーバーは±SEMである。

30

【図9A】新生児(P1)マウスへのLNP-g666及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与の3ヵ月後 ($n=5$; 雄及び雌、 「I」)、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAVの投与の3ヵ月後 ($n=3$; 雄及び雌、 「E」) のポンペ病モデルマウス ($GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) の心臓、大腿四頭筋、腓腹筋、及び横隔膜におけるグリコーゲンレベルを示す。未処置のポンペ病モデルマウスを対照として使用した。

【図9B】新生児(P1)マウスへのLNP-g666及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与15ヵ月後 ($n=10$; 雄及び雌、 「I」)、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAVの投与15ヵ月後 ($n=6$; 雄及び雌、 「E」) のポンペ病モデルマウス ($GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) の心臓、大腿四頭筋、腓腹筋、横隔膜、大脳、及び脊髄におけるグリコーゲンレベルを示す。未処置ポンペ病モデルマウス (「U」) 及び野生型マウス (「W」) を対照として使用した。

40

【図10】新生児(P1)マウスへのLNP-g666及び組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型 ($n=10$; 雄及び雌、 「P1挿入AAV+LNP」) の投与から15ヵ月後、又は抗CD63:GAAをコードするエピソームAAV ($n=6$; 雄及び雌、 「P1エピソームAAV」) の投与から15ヵ月後のポンペ病モデルマウス ($GAA^{-/-}$; $CD63^{hu/hu}$) における握力を示す。野生型GAAマウス ($GAA^{+/+}$; $CD63^{hu/hu}$; 「野生型」) 及び未処置ポンペ病モデルマウス (「未処置KO」) を対照として使用した。

【図11】初代ヒト形質細胞様DCベースのアッセイにおいてIFN α ELISAによっ

50

て測定されたIFN α 応答を示す。様々なrAAV6 CpG枯渇抗CD63:GAA鑄型を、第1世代(非CpG枯渇)抗CD63:GAA鑄型と比較して試験した。rAAV6-GFPを陽性対照として使用し、CpG枯渇(0 CpG)F9鑄型を陰性対照として使用した。

【図12】rAAV2による送達後の初代ヒト肝細胞のアルブミン遺伝子座への様々な抗CD63:GAA及び抗TfR:GAA挿入鑄型の挿入後の培地中のGAA酵素活性を示す。

【図13】rAAV6による送達後の初代ヒト肝細胞のアルブミン遺伝子座への様々な抗CD63:GAA挿入鑄型の挿入後の培地中のGAA酵素活性を示す。

【図14A】LNP-g666及び様々な組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与後のGAA $^{-/-}$ マウスにおけるGAA血清発現を示す。未処置KO及び未処置WTマウスを対照として使用した。

【図14B】LNP-g666及び様々な組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型の投与後のGAA $^{-/-}$ マウスにおけるGAA血清発現を示す。未処置KO及び未処置WTマウスを対照として使用した。

【図15】Cas9 mRNA及びヒトアルブミン(ALB)イントロン1を標的とするsgRNA 9860を含有する脂質ナノ粒子であるLNP-g9860、並びに抗TfR:GAA挿入鑄型と共にパッケージングされた組換えAAV8(rAAV8)カプシドの概略図を示す。

【図16】抗TfR scFvへの融合を介した複数の経路によるGAAの標的化の概略図を示す。

【図17】ALB遺伝子座におけるGAA挿入鑄型のCRISPR/Cas9媒介挿入についての概略図を示す。ヒトALB遺伝子座を示しており、Cas9切断部位をハサミで示している。挿入鑄型中の抗TfR:GAA導入遺伝子に隣接するスプライスアクセプター部位を示す。内因性ALBプロモーターによって駆動される挿入及び転写に続いて、ALBエキソン1と挿入された抗TfR:GAA DNA鑄型との間にスプライシングが起こり、破線で図示されるように、ハイブリッドALB抗TfR:GAA mRNAが生成される。ALBシグナルペプチドは、抗TfR:GAAの分泌を促進し、タンパク質成熟中に除去されて血漿中に抗TfR:GAAを生じる。

【図18A】抗ヒトTfR抗体クローンがTfrc^{hum}マウス的大脑にGAAを送達することを示すウェスタンブロットを示す。各レーン=1匹のマウスWtマウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陽性対照として使用した。Tfrc^{hum}マウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陰性対照として使用した。

【図18B】抗ヒトTfR抗体クローンがTfrc^{hum}マウス的大脑にGAAを送達することを示すウェスタンブロットを示す。各レーン=1匹のマウスWtマウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陽性対照として使用した。Tfrc^{hum}マウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陰性対照として使用した。

【図18C】抗ヒトTfR抗体クローンがTfrc^{hum}マウス的大脑にGAAを送達することを示すウェスタンブロットを示す。各レーン=1匹のマウスWtマウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陽性対照として使用した。Tfrc^{hum}マウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陰性対照として使用した。

【図19】抗hTfR抗体クローンのサブセットが成熟GAAをscfv:GAAフォーマットで脳実質組織に送達することを示すウェスタンブロットを示す(HDDによる送達)。Wtマウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陽性対照として使用した。Tfrc^{hum}マウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陰性対照として使用した。

【図20】4つの選択された抗hTfR抗体クローンが、scfv:GAAフォーマットで成熟GAAを脳実質組織に送達することを示すウェスタンブロットを示す(AAV8エピソーム肝臓蓄積遺伝子治療)。Wtマウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陽性対照として使用した。Tfrc^{hum}マウスにおける抗マウスmTfR:GAAを陰性対照として使用した。

10

20

30

40

50

【図 2 1】 3つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスにおいて成熟 G A A を C N S、心臓、及び筋肉に送達することを示すウェスタンブロットを示す。

【図 2 2 A】 4つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスの C N S、心臓、及び筋肉におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 2 B】 4つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスの C N S、心臓、及び筋肉におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 2 C】 選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスにおいて後根神経節 (D R G) におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 3 A】 3つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスにおいて、脳視床 (図 2 3 A)、脳大脳皮質 (図 2 3 B)、脳海馬 C A 1 (図 2 3 C)、及び大腿四頭筋 (図 2 3 D) におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 3 B】 3つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスにおいて、脳視床 (図 2 3 A)、脳大脳皮質 (図 2 3 B)、脳海馬 C A 1 (図 2 3 C)、及び大腿四頭筋 (図 2 3 D) におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 3 C】 3つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスにおいて、脳視床 (図 2 3 A)、脳大脳皮質 (図 2 3 B)、脳海馬 C A 1 (図 2 3 C)、及び大腿四頭筋 (図 2 3 D) におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 3 D】 3つの選択されたエピソーム A A V 8 肝臓デポ抗 h T f R 抗体クローンが、G a a^{-/-}/T f r c^{hum}マウスにおいて、脳視床 (図 2 3 A)、脳大脳皮質 (図 2 3 B)、脳海馬 C A 1 (図 2 3 C)、及び大腿四頭筋 (図 2 3 D) におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。W t 未処置マウスは陽性対照であり、G a a^{-/-}未処置マウスは陰性対照であった。

【図 2 4 A】 抗 h T f R 1 2 8 4 7 s c f v : G A A の挿入が、ポンペモデルマウスの C N S 及び筋肉に成熟 G A A タンパク質を送達することを示す。

【図 2 4 B】 抗 h T f R 1 2 8 4 7 s c f v : G A A の挿入がポンペモデルマウスの C N S 及び筋肉におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。一元配置分散分析 * p < 0 . 0 1 ; ** p < 0 . 0 0 1 ; *** p < 0 . 0 0 0 1 。未処置ポンペ病モデルマウス及び野生型マウスを対照として使用した。組換え A A V 8 抗 T f R : G A A エピソーム鑄型を注射したマウスを陽性対照として使用した。L N P - g 6 6 6 を含まない組換え A A V 8 抗 T f R : G A A 挿入鑄型を注射したマウスを陰性対照として使用した。

【図 2 5 A】 r A A V 2 による送達後の初代ヒト肝細胞のアルブミン遺伝子座への様々な抗 T f R : G A A 挿入鑄型 (C p G 枯渇及び天然) の挿入後の培地中の G A A 酵素活性を示す。

【図 2 5 B】 r A A V 2 による送達後の初代ヒト肝細胞のアルブミン遺伝子座への様々な抗 T f R : G A A 挿入鑄型 (C p G 枯渇及び天然) の挿入後の培地中の G A A 酵素活性を示す。

【図 2 6 A】 抗ヒト T f R 抗体クローン (0 C p G 及び天然) が、L N P - g 6 6 6 (

10

20

30

40

50

3 mg / kg) 及び様々な組換え AAV8 抗 Tfr : GAA 又は AAV8 抗 CD63 : GAA 挿入鑄型を静脈内投与した 3 ヶ月齢 Gaa^{-/-} / Tfr^{chum} マウスの脳 (大脳)

【図 26B】抗 hTfr : GAA のアルブミン挿入が、LNP-g666 (3 mg / kg) 及び様々な組換え AAV8 抗 Tfr : GAA 又は AAV8 抗 CD63 : GAA 挿入鑄型を静脈内投与した Gaa^{-/-} / Tfr^{chum} マウスにおいて、大脳、大腿四頭筋、横隔膜、及び心臓におけるグリコーゲン貯蔵をレスキューすることを示す。グリコーゲンレベルを投与 3 週間後に測定した。Wt 未処置マウスは陽性対照であり、Gaa^{-/-} 未処置マウスは陰性対照であった。

【図 27A】CpG 枯渴抗 CD63 : GAA 鑄型及び LNP-g9860 を含有する組換え AAV8 を投与したカニクイザルにおいて、蛍光基質アッセイを用いて測定した血清中の GAA 活性を示す。3 つの異なる AAV8 用量 (0.3 e13 vg / kg、1.5 e13 vg / kg、及び 5.6 e13 vg / kg) を、3 mg / kg の LNP 用量と共に使用した。ビヒクル対照群では N = 1、投与群では N = 3。

【図 27B】CpG 枯渴抗 CD63 : GAA 鑄型及び LNP-g9860 を含有する組換え AAV8 を投与したカニクイザルからの組織溶解物における成熟 GAA の発現を示す。3 つの異なる AAV8 用量 (0.3 e13 vg / kg、1.5 e13 vg / kg、及び 5.6 e13 vg / kg) を、3 mg / kg の LNP 用量と共に使用した。ビヒクル対照群では N = 1、投与群では N = 3。組織を 殺時 (89 日目) に収集し、GAA の 76 kDa リソソーム形態の存在についてウェスタンブロットによってプローブした。

【発明を実施するための形態】

【0142】

定義

本明細書で互換的に使用される、「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、コードされたアミノ酸及び非コードのアミノ酸並びに化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸を含む、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を含む。これらの用語には、修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドなどの修飾されたポリマーも含まれる。「ドメイン」という用語は、特定の機能又は構造を有するタンパク質又はポリペプチドの任意の部分を目指す。

【0143】

タンパク質は、「N 末端」及び「C 末端」を有すると言われている。「N 末端」という用語は、遊離アミン基 (-NH₂) を有するアミノ酸を末端に有する、タンパク質又はポリペプチドの開始に関する。「C 末端」という用語は、遊離カルボキシル基 (-COOH) によって終端されたアミノ酸鎖 (タンパク質又はポリペプチド) の最後に関する。

【0144】

本明細書で互換的に使用される、「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はそれらの類似体若しくは修飾バージョンを含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。これらには、一本鎖、二本鎖、及び多重鎖 DNA 又は RNA、ゲノム DNA、cDNA、DNA-RNA ハイブリッド、並びにプリン塩基、ピリミジン塩基、又は他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、若しくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。

【0145】

1 つのモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸がホスホジエステル結合を介して一方向で、その隣の 3' 酸素に結合する手法でオリゴヌクレオチドを作製するように、モノヌクレオチドが反応するため、核酸は、「5' 末端」及び「3' 末端」を有すると言われている。オリゴヌクレオチドの末端は、その 5' リン酸がモノヌクレオチドペントース環の 3' 酸素に連結されていない場合、「5' 末端」と称される。オリゴヌクレオチドの末端は、その 3' 酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸に連結されていない場合、「3' 末端」と称される。核酸配列は、より大きなオリゴヌクレオチドの内部に存在す

10

20

30

40

50

るとしても、5'及び3'末端を有するとも言われ得る。直線状又は環状DNA分子のいずれかにおいて、別個の要素は、「上流」又は「下流」の5'若しくは3'要素であると称される。

【0146】

「ゲノムに組み込まれた」という用語は、ヌクレオチド配列が細胞のゲノムに組み込まれるように、細胞のゲノムに導入されている核酸を指す。細胞のゲノムへの核酸の安定した組み込みのために、任意のプロトコルが使用され得る。

【0147】

「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、かつウイルスベクター粒子へのパッケージングに十分な、又はそれを許容する要素を含む、組換え核酸を指す。ベクター及び／又は粒子は、DNA、RNA、又は他の核酸を、インビトロ、エクスピボ、又はインピボで細胞に移入する目的で利用することができる。ウイルスベクターの多くの形態が既知である。

10

【0148】

細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸に関して「単離された」という用語は、細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸の実質的に純粋な調製物までを含み、通常インサイチュで存在し得る他の細菌、ウイルス、細胞、又は他の成分に関して比較的精製されている細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸を含む。「単離された」という用語はまた、天然に存在する対応物を有せず、化学的に合成され、それにより他の細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸が実質的に混入していない、又はそれらに天然に付随する（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、若しくは他の成分）ほとんどの他の成分（例えば、細胞成分）から分離若しくは精製されている細胞、組織、タンパク質及び核酸も含む。

20

【0149】

「野生型」という用語は、（突然変異体、病変した、改変したなどとは対照的に）正常な状態又は文脈に見出されるような構造及び／又は活性を有する実体を含む。野生型遺伝子及びポリペプチドは、多くの場合、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在する。

【0150】

「内因性配列」という用語は、細胞又は動物内で天然に存在する核酸配列を指す。例えば、ヒトの内因性ALB配列は、ヒトにおけるALB遺伝子座で天然に存在する天然のALB配列を指す。

30

【0151】

「外因性」分子又は配列には、その形態で細胞に通常は存在しない分子又は配列が含まれる。通常の存在には、細胞の特定の発生段階及び環境条件に関する存在が含まれる。外因性分子又は配列には、例えば、内因性配列のヒト化バージョンなどの、細胞内の対応する内因性配列の変異バージョンが含まれ得る、又は細胞内であるが、異なる形態の（すなわち、染色体内ではない）内因性配列に対応する配列が含まれ得る。対照的に、内因性分子又は配列は、その形態で、特定の細胞において、特定の発生段階で、特定の環境条件下で通常存在する分子又は配列を含む。

40

【0152】

核酸又はタンパク質の文脈で使用される場合の「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、同じ分子内で一緒に天然に存在しない少なくとも2つのセグメントを含むことを示す。例えば、核酸のセグメント又はタンパク質のセグメントに関して使用される場合の「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、自然界で互いに同じ関係（例えば、一緒に結合）で見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す。一例として、核酸ベクターの「異種」領域は、自然界で他の分子に関連して見出されない、別の核酸分子内の、又は別の核酸分子に結合した核酸のセグメントである。例えば、核酸ベクターの異種領域は、自然界のコード配列に関連して見出されない配列に隣接するコード配列を含み得る。同様に、タンパク質の「異種」領域は、自然界の他のペプチド分子（例えば、融合タンパク

50

質、又はタグ付きタンパク質）に関連して見出されない、別のペプチド分子内にある、又はそれに結合しているアミノ酸のセグメントである。同様に、核酸又はタンパク質は、異種標識又は異種分泌又は局在化配列を含み得る。

【0153】

「コドン最適化」（すなわち、「コドン最適化された」配列）は、アミノ酸を指定する3塩基対のコドンの組み合わせの多様性によって示されるように、コドンの縮重を利用し、一般に、天然アミノ酸配列を維持しながら、天然配列の少なくとも1つのコドンを、宿主細胞の遺伝子においてより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって、特定の宿主細胞における発現の増強のために核酸配列を修飾するプロセスを含む。例えば、目的のポリペプチドをコードする核酸は、天然に存在する核酸配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、又は他の任意の宿主細胞を含む、所与の原核細胞又は真核細胞においてより高い頻度で使用する代替コドンへと修飾され得る。コドン使用表は、例えば、「コドン使用データベース」において容易に利用可能である。これらの表は、様々な方法で適用され得る。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Nakamura et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28 (1): 292を参照されたい。特定の宿主における発現のための特定の配列のコドン最適化のためのコンピュータアルゴリズム（例えば、Gene Forgeを参照されたい）もまた利用可能である。

【0154】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（又は有意な配列）、DNA配列、ポリペプチドコード配列、又は生物のゲノムの染色体上の位置（position）の特定の位置（location）を指す。例えば、「ALB遺伝子座」は、ALB遺伝子、ALB DNA配列、アルブミンコード配列、又はそのような配列が常駐すると同定されている生物のゲノムの染色体上のALB位置の特定の位置を指し得る。「ALB遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、5'及び／若しくは3'非翻訳領域（untranslated region、UTR）、又はそれらの組み合わせを含む、ALB遺伝子の調節要素を含み得る。

【0155】

「遺伝子」という用語は、自然に存在する場合、少なくとも1つのコード領域及び少なくとも1つの非コード領域を含有する可能性のある染色体中のDNA配列を指す。遺伝子が完全長のRNA（5'及び3'の非翻訳配列を含む）に対応するように、産物（例えば、非限定的に、RNA産物及び／又はポリペプチド産物）をコードする染色体中のDNA配列は、非コードイントロンで中断されたコード領域並びに5'端及び3'端の両方のコード領域に隣接して位置する配列を含み得る。更に、調節配列を含む他の非コード配列（例えば、非限定的に、プロモーター、エンハンサー、及び転写因子結合部位）、ポリアデニル化シグナル、配列内リボソーム進入部位、サイレンサー、絶縁配列、及びマトリックス結合領域も遺伝子に存在してもよい。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近接（例えば、非限定的に、10 kb以内）している、又は離れた部位にあってもよく、それらは遺伝子の転写及び翻訳のレベル又は速度に影響を及ぼす。

【0156】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子の変異体形態を指す。いくつかの遺伝子は、染色体上の同じ位置、又は遺伝子座に位置する様々な異なる形態を有する。二倍体生物は、各遺伝子座に2つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に2つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合、2つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合と記載される。

【0157】

「プロモーター」は、RNAポリメラーゼIIが特定のポリヌクレオチド配列のための適切な転写開始部位でRNA合成を開始することを指示することができるTATAボックスを通常含むDNAの調節領域である。プロモーターは、転写開始速度に影響を及ぼす他の領域を追加的に含み得る。本明細書に開示されるプロモーター配列は、作動可能に連結

10

20

30

40

50

されたポリヌクレオチドの転写を調節する。プロモーターは、本明細書に開示される1つ以上の細胞型（例えば、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、1細胞期胚、分化細胞、又はそれらの組み合わせ）において活性であり得る。プロモーターは、例えば、構成的に活性なプロモーター、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生的に調節されたプロモーター）、又は空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的又は組織特異的プロモーター）であり得る。プロモーターの例は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2013/176772号において見出すことができる。

【0158】

「作動可能な連結」又は「作動可能に連結される」とは、その両方の成分が正常に機能し、かつ成分のうちの少なくとも1つが他の成分のうちの少なくとも1つに及ぶ機能を媒介し得る可能性を許すような、2つ以上の成分（例えば、プロモーター及び別の配列要素）の並列を含む。例えば、プロモーターが、1つ以上の転写調節因子の存在又は不在に応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結され得る。作動可能な連結は、そのような配列が互いに近接していること、又はトランスに作用する（例えば、調節配列が、コード配列の転写を制御するために離れて作用し得る）ことを含み得る。

【0159】

本明細書で提供される方法及び組成物は、様々な異なる成分を用いる。記載全体のいくつかの成分は、活性な変異体及び断片を有し得る。「機能的」という用語は、生物学的活性又は機能を示すタンパク質又は核酸（又はその断片、若しくは変異体）の生来の能力を指す。機能的断片又は変異体の生物学的機能は、元の分子と比較して同じである、又は実際に変更され得る（例えば、それらの特異性又は選択性又は有効性に関して）が、分子の基本的な生物学的機能を保持する。

【0160】

「変異体」という用語は、集団で最も一般的な配列とは（例えば、1ヌクレオチドだけ）異なるヌクレオチド配列、又は集団で最も一般的な配列とは（例えば、1アミノ酸だけ）異なるタンパク質配列を指す。

【0161】

「断片」という用語は、タンパク質に言及する場合、完全長タンパク質よりも短い、又は少ないアミノ酸を有するタンパク質を意味する。「断片」という用語は、核酸に言及する場合、完全長核酸よりも短い、又は少ないヌクレオチドを有する核酸を意味する。断片は、例えば、タンパク質断片に言及する場合、N末端断片（すなわち、タンパク質のC末端の一部の除去）、C末端断片（すなわち、タンパク質のN末端の一部の除去）、又は内部断片（すなわち、タンパク質のN末端及びC末端の各々の一部の一部の除去）であり得る。断片は、例えば、核酸断片に言及する場合、5'断片（すなわち、核酸の3'末端の一部の除去）、3'断片（すなわち、核酸の5'末端の一部の除去）、又は内部断片（すなわち、核酸の5'末端及び3'末端の各々の一部の一部の除去）であり得る。

【0162】

2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」又は「同一性」は、特定の比較ウィンドウで最大の一致のためにアラインさせる場合、同じである2つの配列の残基を指す。タンパク質に関して、配列同一性のパーセンテージを使用する場合、同一ではない残基位置は多くの場合に、保存的アミノ酸置換によって異なり、その保存的アミノ酸置換では、アミノ酸残基は同様の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されており、したがって、分子の機能的特性を変化させない。配列が保存的置換で異なる場合、配列同一性パーセントを、置換の保存的性質について補正するために、上方に調整され得る。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」又は「類似性」を有すると言われている。この調整を行うための手段は周知である。典型的には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングして、それによって、配列同一性パーセンテージを増加させる

10

20

30

40

50

ことを含む。したがって、例えば、同一のアミノ酸が1のスコアを与えられ、非保存的置換が0のスコアを与えられる場合に、保存的置換は、0～1のスコアを与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムPC／GENE（（Intelligentics、カリフォルニア州マウンテンビュー）で実行されるように計算される。

【0163】

「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適にアラインされた配列（完全にマッチする残基の数が最大）を比較することによって決定される値を含み、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適アラインメントのための（付加また欠失を含まない）参照配列と比較した場合に、付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が両方の配列中に発生する位置の数を決定してマッチする位置の数を得ること、マッチする位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割ること、及び結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。特に明記しない限り（例えば、短い方の配列が、連結された非相同配列を含む）、比較ウィンドウは、比較される2つの配列のうちの短い方の全長である。

10

【0164】

特に指示しない限り、配列同一性／類似性の値は、以下のパラメータ：50のGAP重量及び3の長さ重量、並びにnws gap dna．cmpスコア行列を使用するヌクレオチド配列についての同一性％及び類似性％；8のGAP重量及び2の長さ重量、並びにBLOSUM62スコア行列を使用するアミノ酸配列についての同一性％及び類似性％；又はその任意の同等のプログラムを使用し、GAPバージョン10を使用して得られた値を含む。「同等のプログラム」は、問題の任意の2つの配列について、GAPバージョン10によって生成された対応するアラインメントと比較した場合、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基のマッチ及び同一の配列同一性パーセントを有するアラインメントを生成する任意の配列比較プログラムを含む。

20

【0165】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列中に通常存在するアミノ酸の、類似のサイズ、電荷、又は極性の、異なるアミノ酸との置換を指す。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、又はロイシンなどの非極性（疎水性）残基の、別の非極性残基との置換が含まれる。同様に、保存的置換の例には、アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、又はグリシンとセリンとの間などの、1つの極性（親水性）残基の別のものとの置換が含まれる。追加的に、リジン、アルギニン、若しくはヒスチジンなどの塩基性残基の別のものへの置換、又はアスパラギン酸若しくはグルタミン酸などのある酸性残基の別の酸性残基への置換は、保存的置換の追加の例である。非保存的置換の例には、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、若しくはメチオニンの極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸、若しくはリジンへの置換、及び／又は極性残基の非極性残基への置換が含まれる。典型的なアミノ酸の分類を以下で要約する。

30

【0166】

40

50

【表 1】

表 1 アミノ酸の分類

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1. 8
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	-4. 5
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3. 5
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	-3. 5
システイン	Cys	C	非極性	中性	2. 5
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	-3. 5
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3. 5
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0. 4
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	-3. 2
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4. 5
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3. 8
リジン	Lys	K	極性	陽性	-3. 9
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1. 9
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2. 8
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1. 6
セリン	Ser	S	極性	中性	-0. 8
トレオニン	Thr	T	極性	中性	-0. 7
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0. 9
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1. 3
バリン	Val	V	非極性	中性	4. 2

10

【0167】

20

「相同」配列（例えば、核酸配列）には、例えば、既知の参照配列に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、若しくは100%同一であるような、既知の参照配列に対して同一、又は実質的に同様である配列が含まれる。相同配列は、例えば、オルソログ配列及びパラログ配列を含み得る。例えば、相同遺伝子は典型的には、種分化事象（オルソログ遺伝子）又は遺伝子重複事象（パラログ遺伝子）のいずれかを介して、共通の祖先DNA配列から派生する。

「オルソログ」遺伝子には、種分化によって共通の祖先遺伝子から進化した様々な種における遺伝子が含まれる。オルソログは典型的には、進化の過程で同じ機能を保持する。「パラログ」遺伝子には、ゲノム内の重複によって関連する遺伝子が含まれる。パラログは、進化の過程で新しい機能を進化させ得る。

30

【0168】

「インビトロ」という用語は、人工環境、及び人工環境（例えば、試験管又は単離された細胞若しくは細胞株）内で生じるプロセス又は反応を含む。「インビボ」という用語は、天然環境（例えば、細胞又は生物又は身体）、及び天然環境内で生じるプロセス又は反応を含む。「エクスピボ」という用語は、個体の身体から除去される細胞、及びそのような細胞内で生じるプロセス又は反応を含む。

【0169】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された4つのポリペプチド鎖である2つの重鎖（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含む免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてHCVR又はVHと略される）及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、及びCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVR又はVLと略記される）及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLを含む。VH及びVL領域は、フレームワーク領域（framework region、FR）と呼ばれるより保存された領域に組み入れられている、相補性決定領域（complementarity determining region、CDR）と呼ばれる超可変領域に更に細分することができる。各VH及びVLは、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDR及び4つのFRから構成さ

40

50

れる（重鎖CDRは、HC DR 1、HC DR 2、及びHC DR 3と略記することができ、軽鎖CDRは、LC DR 1、LC DR 2及びLC DR 3と略記することができる）。「高親和性」抗体という用語は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E（商標）又は溶液親和性E L I S Aによって測定される、少なくとも 10^{-9} M、少なくとも 10^{-10} M；少なくとも 10^{-11} M、又は少なくとも 10^{-12} Mの、それらの標的に対する結合親和性を有する抗体を指す。「抗体」という用語は、例えばモノクローナル又はポリクローナルなどの任意のタイプの抗体を包含することができる。更に、抗体は、例えば哺乳動物又は非哺乳動物などの任意の起源であってもよい。一実施形態では、抗体は哺乳動物又は鳥類であり得る。更なる実施形態では、抗体はヒト起源であってもよく、更にヒトモノクローナル抗体であってもよい。

10

【0170】

「二重特異性抗体」という語句は、2つ以上のエピトープに選択的に結合することができる抗体を含む。二重特異性抗体は、一般に、2つの異なる重鎖を含み、各重鎖は、2つの異なる分子（例えば、抗原）上又は同じ分子（例えば、同じ抗原）上の異なるエピトープに特異的に結合する。二重特異性抗体が2つの異なるエピトープ（第1のエピトープ及び第2のエピトープ）に選択的に結合することができる場合、第1のエピトープに対する第1の重鎖の親和性は、一般に、第2のエピトープに対する第1の重鎖の親和性よりも少なくとも1～2桁又は3桁又は4桁低くなり、逆もまた同様である。二重特異性抗体によって認識されるエピトープは、同じ又は異なる標的上（例えば、同じ又は異なるタンパク質上）にあり得る。二重特異性抗体は、例えば、同じ抗原の異なるエピトープを認識する重鎖を組み合わせることによって作製され得る。例えば、同じ抗原の異なるエピトープを認識する重鎖可変配列をコードする核酸配列を、異なる重鎖定常領域をコードする核酸配列に融合することができ、そのような配列を、免疫グロブリン軽鎖を発現する細胞において発現させることができる。典型的な二重特異性抗体は、それぞれが3つの重鎖CDR、続いて（N末端からC末端へ）CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを有する2つの重鎖、並びに抗原結合特異性を付与しないが、各重鎖と会合することができる、又は各重鎖と会合することができ、重鎖抗原結合領域によって結合されるエピトープの1つ以上に結合することができる、又は各重鎖と会合することができ、重鎖の一方若しくは両方が一方若しくは両方のエピトープに結合することを可能にする免疫グロブリン軽鎖を有する。

20

30

【0171】

「重鎖」又は「免疫グロブリン重鎖」という語句は、任意の生物由来の免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含み、別段の指定がない限り、重鎖可変ドメインを含む。重鎖可変ドメインは、特に明記しない限り、3つの重鎖CDR及び4つのFR領域を含む。重鎖の断片には、CDR、CDR及びFR、並びにそれらの組み合わせが含まれる。典型的な重鎖は、可変ドメインに続いて、（N末端からC末端まで）CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを有する。重鎖の機能的断片は、エピトープを特異的に認識することができ（例えば、マイクロモル、ナノモル、又はピコモル範囲のKDでエピトープを認識する）、細胞から発現及び分泌することができ、少なくとも1つのCDRを含む断片を含む。

40

【0172】

「軽鎖」という語句は、任意の生物由来の免疫グロブリン軽鎖定常領域配列を含み、別段の指定がない限り、ヒトカッパ及びラムダ軽鎖を含む。軽鎖可変ドメイン（VL）には、特に指定がない限り、通常、3つの軽鎖CDRと4つのフレームワーク（FR）領域が含まれる。一般に、全長軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端まで、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含むVLドメイン、及び軽鎖定常領域アミノ酸配列を含む。本発明で使用され得る軽鎖は、例えば、抗原結合タンパク質によって選択的に結合される第1の抗原又は第2の抗原のいずれにも選択的に結合しない軽鎖を含む。適切な軽鎖には、既存の抗体ライブラリー（ウェットライブラリー又はインシリコ）において最も一般的に用いられる軽鎖をスクリーニングすることによって同定するこ

50

とができる軽鎖が含まれ、ここで、軽鎖は、抗原結合タンパク質の抗原結合ドメインの親和性及び／又は選択性に実質的に干渉しない。適切な軽鎖は、抗原結合タンパク質の抗原結合領域によって結合される一方又は両方のエピトープに結合することができる軽鎖を含む。

【0173】

「可変ドメイン」という語句は、N末端からC末端への配列において、以下のアミノ酸領域を含む免疫グロブリン軽鎖又は重鎖（所望のように改変された）のアミノ酸配列を含む（別段の指示がない限り）：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。「可変ドメイン」は、二重βシート構造を有する標準ドメイン（VH又はVL）に折り畳むことができるアミノ酸配列を含み、βシートは、第1のβシートの残基と第2のβシートの残基との間のジスルフィド結合によって接続されている。

10

【0174】

本明細書で使用される「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、通常（すなわち、野生型動物において）、免疫グロブリン分子（例えば、抗体又はT細胞受容体）の軽鎖又は重鎖の可変領域内の2つのフレームワーク領域の間に現れる、生物の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。CDRは、例えば、生殖細胞系列配列、又は例えば、ナイーブ又は成熟B細胞若しくはT細胞によって再構成された配列によって、コードされ得る。いくつかの状況（例えば、CDR3の場合）では、CDRは、連続していない（例えば、再構成されていない核酸配列において）が、B細胞核酸配列において、例えば、配列のスプライシング又は接続の結果として（例えば、V-D-J組換えによる重鎖CDR3の形成）連続している2つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）によってコードされ得る。

20

【0175】

「抗体断片」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。用語「抗体断片」内に包含される結合断片の例としては、以下：(i) Fab断片、VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、及びCH1ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片；(iii) VHドメイン及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVLドメイン及びVHドメインからなるFv断片；(v) dAb断片（Ward et al. (1989) Nature 241:544-546）；VHドメイン、(vi) 単離されたCDR；並びに(vii) VL及びVH領域が対合して一価分子を形成する単一タンパク質鎖を形成するように合成リンカーによって連結された、Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHからなるscFv、を含む。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も、用語「抗体」に包含される（例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448；Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照されたい）。

30

【0176】

「Fc含有タンパク質」という語句は、抗体、二重特異性抗体、イムノアドヘシン、並びに免疫グロブリンCH2及びCH3領域の少なくとも機能的部分を含む他の結合タンパク質を含む。「機能的部分」は、Fc受容体（例えば、FcγR；又はFcRn、すなわち、新生児Fc受容体）に結合することができる、及び／又は補体の活性化に関与することができるCH2及びCH3領域を指す。CH2及びCH3領域が、任意のFc受容体に結合することができず、補体を活性化することもできないようにする欠失、置換、及び／若しくは挿入又は他の修飾を含有する場合、CH2及びCH3領域は機能的ではない。

40

【0177】

Fc含有タンパク質は、修飾が結合タンパク質の1つ以上のエフェクター機能に影響を及ぼす場合（例えば、FcγR結合、FcRn結合、したがって半減期、及び／又はCDC活性に影響を及ぼす修飾）を含む、免疫グロブリンドメインにおける修飾を含み得る。このような修飾としては、免疫グロブリン定常領域のEU番号付けを参照して、以下の修

50

飾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。238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438、及び439。

10

【0178】

例えば、限定するものではないが、結合タンパク質は、Fc含有タンパク質であり、増強された血清半減期を示し（列挙された修飾（複数可）を含まない同じFc含有タンパク質と比較して）、250位（例えば、E又はQ）；250及び428位（例えば、L又はF）；252位（例えば、L/Y/F/W又はT）、254位（例えば、S又はT）、及び256位（例えば、S/R/Q/E/D又はT）における修飾、428及び433位（例えば、L/R/SI/P/Q又はK）及び／又は434位（例えば、H/F又はY）における修飾；又は250位及び／又は428位における修飾、又は307又は308位（例えば、308F、V308F）、及び434位における修飾を有する。別の例では、修飾は、428L（例えば、M428L）及び434S（例えば、N434S）修飾、428L、2591（例えば、V259I）、及び308F（例えば、V308F）修飾、433K（例えば、H433K）及び434（例えば、434Y）修飾、252、254、及び256（例えば、252Y、254T、及び256E）修飾、250Q及び428L修飾（例えば、T250Q及びM428L）；307及び／又は308修飾（例えば、308F又は308P）を含み得る。

20

【0179】

本明細書で使用される「抗原結合タンパク質」という用語は、本発明の細胞特異的抗原及び／又は標的抗原などの抗原上のエピトープを特異的に認識するポリペプチド又はタンパク質（機能単位で複合体化された1つ以上のポリペプチド）を指す。抗原結合タンパク質は多重特異性であってもよい。抗原結合タンパク質に関する「多重特異性」という用語は、そのタンパク質が、同じ抗原上又は異なる抗原上の異なるエピトープを認識することを意味する。本発明の多重特異性抗原結合タンパク質は、単一の高機能性ポリペプチドであってもよく、又は互いに共有結合若しくは非共有結合している2つ以上のポリペプチドの多量体複合体であってもよい。用語「抗原結合タンパク質」は、別の機能的分子（例えば、別のペプチド又はタンパク質）に連結され得るか又はそれと同時に発現され得る、本発明の抗体又はその断片を含む。例えば、抗体又はその断片は、第2の結合特異性を有する二重特異性又は多重特異性抗原結合分子を生成するために、タンパク質又はその断片などの1つ以上の他の分子実体に（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合又はその他によって）機能的に連結され得る。

30

【0180】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、多重特異性抗原結合ポリペプチドによって認識される抗原の部分の部分を指す。単一の抗原（抗原性ポリペプチドなど）は、2つ以上のエピトープを有し得る。エピトープは、構造的又は機能的として定義されてもよい。機能的エピトープは、一般に、構造的エピトープのサブセットであり、抗原結合ポリペプチドと抗原との間の相互作用の親和性に直接寄与する残基として定義される。エピトープはまた、立体構造であってもよく、すなわち、非直鎖状アミノ酸から構成されてもよい。特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面基である決定基を含んでもよく、特定の実施形態では、特異的な三次元構造特性及び／又は特異的な電荷特性を有してもよい。隣接アミノ酸から形成されるエピトープ（線形エピトープとしても既知）は典型的には、変性溶

40

50

媒に対する曝露で保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープ（配座異性エピトープとしても既知）は典型的には、変性溶媒での処置で失われる。

【0181】

「ドメイン」という用語は、特定の機能又は構造を有するタンパク質又はポリペプチドの任意の部分を指す。好ましくは、本発明のドメインは、細胞特異的抗原又は標的抗原に結合する。細胞特異的抗原又は標的抗原結合ドメインなどは、本明細書で使用される場合、抗原に特異的に結合する任意の天然に存在する、酵素的に入手可能な、合成の、又は遺伝子操作されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。

【0182】

互換的に使用される「ハーフボディ」又は「半抗体」という用語は、1つの重鎖及び1つの軽鎖を本質的に含有する抗体の半分を指す。抗体重鎖は二量体を形成することができ、したがって、一方の半体の重鎖は、異なる分子（例えば、別の半体）又は別のFc含有ポリペプチドと会合した重鎖と会合し得る。2つのわずかに異なるFcドメインは、二重特異性抗体又は他のヘテロ二量体、三量体、四量体などの形成におけるように、「ヘテロ二量体化」し得る。Vincent及びMurini（2012）Biotechnol. J. 7（12）：1444-1450；及びShimamoto et al.（2012）MAbs 4（5）：586-91を参照されたい。一実施形態では、半体可変ドメインは、内部移行エフェクターを特異的に認識し、半体Fcドメインは、置換酵素（例えば、ペプチボディ）を含むFc融合タンパク質と二量体化する。

【0183】

「単鎖可変断片」又は「scFv」という用語は、免疫グロブリン重鎖可変領域（VH）及び免疫グロブリン軽鎖可変領域（VL）を含有する単鎖融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、VH及びVLは、10～25個のアミノ酸のリンカー配列によって接続される。scFvポリペプチドはまた、他のアミノ酸配列（例えば、CL又はCH1領域）を含み得る。scFv分子は、ファージディスプレイによって製造され得る、又はハイブリドーマ若しくはB細胞から重鎖及び軽鎖を直接サブクロニングすることによって作製され得る。Ahmad et al.（2012）Clin. Dev. Immunol. 2012：980250を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0184】

本明細書で使用される場合、ヒトの文脈における「新生児」という用語は、1歳（52週齢）以下、好ましくは24週齢以下、より好ましくは12週齢以下、より好ましくは8週齢以下、及び更により好ましくは4週齢以下のヒト対象であり得る。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大4週齢である。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大8週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後7日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後6日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後5日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後4日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、「新生児細胞」は、新生児対象の細胞であり、新生児細胞の集団は、新生児対象の細胞の集団である。

【0185】

本明細書で使用される場合、対照サンプル又は対照対象におけるような「対照」は、測定、例えば、疾患の徴候又は症状の診断測定のための比較物である。特定の実施形態では、対照は、より早い時点、例えば、治療介入前の同じ対象からの対象サンプルであり得る。特定の実施形態では、対照は、正常な対照、例えば、対象サンプル中の酵素濃度又は活

10

20

30

40

50

性を提供するための、正常な対象、すなわち、処置された対象の疾患を有しない対象からの測定であり得る。特定の実施形態では、正常対照は、集団対照、すなわち、一般集団における対象の平均であり得る。特定の実施形態では、対照は、同じ疾患を有する未処置の対象であり得る。特定の実施形態では、対照は、異なる療法、例えば、標準治療で処置された対象であり得る。特定の実施形態では、対照は、比較される対象の疾患を有する対象の自然履歴試験からの対象又は対象の集団であり得る。特定の実施形態では、対照は、特定の因子、例えば、年齢、性別について、試験される対象と一致する。特定の実施形態では、対照は、特定の検査室、例えば、臨床検査室についての対照レベルであり得る。適切な対照の選択は、当業者の能力の範囲内である。

【0186】

1つ以上の列挙された要素を「含む (comprising)」又は「含む (including)」組成物又は方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含み得る。例えば、タンパク質を「含む (comprises)」又は「含む (includes)」組成物は、タンパク質を単独で、又は他の成分と組み合わせる含有し得る。「から本質的になる」という移行句は、特許請求の範囲の範囲が、特許請求の範囲に列挙された特定の要素、及び特許請求される発明の基本的かつ新規の特性に実質的に影響しない要素を包含すると解釈されることを意味する。したがって、本発明の特許請求の範囲で 사용되는場合の「から本質的になる」という用語は、「含む」と同等であると解釈されることを意図するものではない。

【0187】

「任意選択的な」又は「任意選択的に」は、それに続いて記載された事象又は状況が起こっても起こらなくてもよいことであり、説明が、事象又は状況が起こる場合の例及びそれが起こらない場合の例を含むことを意味する。

【0188】

値の範囲の指定は、その範囲内の、又はその範囲を定義する全ての整数、及びその範囲内の整数によって定義される全ての部分範囲を含む。例えば、5～10個のヌクレオチドは、5、6、7、8、9、又は10個のヌクレオチドとして理解され、一方、5～10%は、5%及び10%までの全ての可能な値を含むと理解される。

【0189】

20個のヌクレオチド配列のうちの少なくとも17個のヌクレオチドは、提供される配列の17、18、19、又は20個のヌクレオチドを含むと理解され、それによって、明確に理解されるように、1つが具体的に提供されない場合であっても上限を提供する。同様に、最大3ヌクレオチドは、0、1、2、又は3ヌクレオチドを包含すると理解され、1つが具体的に提供されない場合であっても下限を提供する。「少なくとも」、「最大」、又は他の同様の言語が数を修飾する場合、それは、一連の各数を修飾すると理解することができる。

【0190】

本明細書で 사용되는場合、「以下」又は「未満」は、句に隣接する値、及び文脈から論理的に0までの論理的なより低い値又は整数として理解される。例えば、「2以下のヌクレオチド塩基対」の二重鎖領域は、2、1、又は0ヌクレオチド塩基対を有する。一連の数又は範囲の前に「以下」又は「未満」が存在する場合、その一連又は範囲内の数の各々が修飾されていることが理解される。

【0191】

本明細書で 사용되는場合、「分析物を検出する」などは、分析物が存在する場合、分析物が検出され得るアッセイを行うこととして理解され、ここで、分析物は、アッセイの検出レベルを超える量で存在する。

【0192】

本明細書で 사용되는場合、「機能喪失」は、何らかの理由で活性が存在しないこと、例えば酵素活性が存在しないこととして理解される。特定の実施形態では、活性の非存在は、機能を有するタンパク質の非存在に起因し得、例えば、タンパク質は転写又は翻訳されない、タンパク質は翻訳されるが安定でない、又は細胞内若しくは全身のいずれかで適

10

20

30

40

50

切に輸送されない。特定の実施形態では、活性の非存在は、タンパク質が存在するが機能的ではないような突然変異、例えば、点突然変異、切断、異常スプライシングの存在に起因し得る。機能喪失は、部分的又は完全な機能喪失であり得る。特定の実施形態では、様々な状態、疾患の重篤度、又は発症年齢をもたらす様々な程度の機能喪失が分かっている場合がある。本明細書中で使用される場合、機能喪失は、好ましくは、例えば、機能的タンパク質の一時的な喪失を生じるストレス応答又は他の応答に起因する機能の一過性の喪失ではない。タンパク質の機能喪失を修正するための治療的介入は、欠損しているタンパク質による機能喪失の補償、又は機能喪失を補償するが、機能が失われているタンパク質とは異なる配列若しくは構造を有するタンパク質による機能喪失の補償を含み得る。1つのタンパク質の機能喪失は、同じ生物学的経路における別のタンパク質の活性を提供又は改変することによって補償することができると理解される。特定の実施形態では、機能喪失を補償するタンパク質は、タンパク質の機能喪失を克服するために、細胞内又は全身のいずれかでタンパク質の輸送を指示するための切断、突然変異、又は非天然配列のうちの1つ以上を含む。治療的介入は、全ての細胞型又は組織内のタンパク質の機能喪失を修正してもよいし、しなくてもよい。治療的介入は、機能を欠くタンパク質が典型的に発現される部位（例えば、欠損が細胞又は臓器の機能不全をもたらす部位）から離れた部位における機能喪失を補うためのタンパク質の発現を含み得る。治療的介入は、肝臓から離れた部位での機能喪失を補うための、肝臓におけるタンパク質の発現を含み得る。多くの遺伝子突然変異は、ヒト及び他の種の両方において、特異的機能喪失突然変異と関連付けられている。

10

20

【0193】

本明細書中で使用される場合、「酵素欠損症」は、タンパク質の機能喪失による不十分なレベルの酵素の活性として理解される。酵素欠損症は、部分的又は全体的であり得、機能喪失のレベル及び部位に依存して、酵素欠損症の徴候又は症状の発症又は重篤度の時間における差異を生じ得る。本明細書中で使用される場合、酵素欠損症は、好ましくは、ストレス又は他の因子に起因する一過性の酵素欠損症ではない。多くの遺伝子突然変異が、ヒト及び他の種の両方において、酵素欠損症と関連付けられている。特定の実施形態では、酵素欠損症は、先天性代謝異常をもたらす。特定の実施形態では、酵素欠損症は、リソソーム蓄積症をもたらす。特定の実施形態では、酵素欠損症は、ガラクトース血症をもたらす。特定の実施形態では、酵素欠損症は、出血障害をもたらす。

30

【0194】

本明細書で使用される場合、値の最大量が100%（例えば、100%阻害又は100%カプセル化）で表される場合、その値は検出方法によって制限されることが理解される。例えば、100%阻害は、アッセイの検出レベル未満のレベルへの阻害として理解され、100%カプセル化は、カプセル化のために意図される物質が小胞の外側に検出され得ないとして理解される。

【0195】

文脈から特に明らかな限り、「約」という用語は、記載された値の±5%である値を包含する。特定の実施形態では、「約」という用語は、当該技術分野内で許容される変動若しくは誤差、例えば、平均からの2標準偏差、又は測定を行うために使用される方法の感度、又は当該技術分野において許容される値のパーセント、例えば、年齢を伴うものを包含すると理解される。一連の最初の値の前に「約」が存在する場合、一連の各値を修飾すると理解することができる。

40

【0196】

「及び／又は」という用語は、関連するリストされる項目のうちの1つ以上の任意及び全ての可能な組み合わせ、並びに代替物（「又は」）で解釈されるときに組み合わせの欠如を指し、これらを包含する。

【0197】

「又は」という用語は、特定のリストの任意の1つのメンバーを指し、そのリストのメンバーの任意の組み合わせも含む。

50

【0198】

冠詞「a」、「an」、及び「the」の単数形は、文脈が特に明確に規定していない限り、複数形の言及を含む。例えば、「タンパク質」又は「少なくとも1つのタンパク質」という用語は、それらの混合物を含む複数のタンパク質を含み得る。

【0199】

統計的に有意なとは、 $p \leq 0.05$ を意味する。

【0200】

本出願中の配列と、示されたアクセッション番号又はアクセッション番号中の位置との間に矛盾がある場合、本出願中の配列が優勢である。

(発明を実施するための形態)

【0201】

I. 概要

目的のポリペプチドをコードする核酸を、新生児細胞、新生児細胞の集団、若しくは新生児対象における標的ゲノム遺伝子座に挿入するため、又は目的のポリペプチドをコードする核酸を、新生児細胞、新生児細胞の集団、若しくは新生児対象において発現させるための組成物及び方法も提供される。酵素欠損症を処置する方法、リソソーム蓄積症を処置する方法、及び対象における酵素欠損症又はリソソーム蓄積症の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法も提供される。標的ゲノム遺伝子座に挿入された目的のポリペプチドのコード配列を含む核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団も提供される。

【0202】

マルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）をコードする核酸を、新生児細胞、新生児細胞の集団、若しくは新生児対象における標的ゲノム遺伝子座に挿入するための、又はマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）をコードする核酸を、新生児細胞、新生児細胞の集団、若しくは新生児対象における標的ゲノム遺伝子座から発現させるための組成物及び方法も提供される。新生児対象において、GAA欠損を処置し、組織内のグリコーゲン蓄積を低減し、ポンペ病を処置し、又はポンペ病の徴候若しくは症状の発症を予防若しくは低減するための組成物及び方法が提供される。標的ゲノム遺伝子座に挿入されたマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）のコード配列を含む核酸構築物を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団も提供される。

【0203】

本明細書に記載される新生児遺伝子挿入プラットフォームは、新生児における既存のエピソームプラットフォームよりも、発現レベル、発現の持続性、及び酵素欠損の機能的レスキューのレベルに関して利点を有する。

【0204】

マルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）の発現のための核酸構築物及び組成物（例えば、エピソーム発現ベクター）も本明細書において提供される。内因性ALB遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座へのマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）コード配列の挿入及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）コード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が本明細書で提供される。核酸構築物及び組成物は、細胞又は細胞の集団又は対象において標的ゲノム遺伝子座にマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）核酸を組み込む又は挿入する方法、細胞又は細胞の集団又は対象においてマルチドメイン治療用タンパク質（例えば、GAA融合タンパク質）を発現させる方法、細胞又は細胞の集団又は対象におけるグリコーゲン蓄積を低減する方法、対象のポンペ病又はGAA欠損症を処置する方法、並びに新生児細胞及び新生児対象を含むポンペ病と診断された対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法において使用される。

【0205】

より具体的には、いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9遺伝子編集技術に

10

20

30

40

50

基づき、組換えアデノ随伴ウイルス血清型 8 (rAAV8) に任意選択的に含有されるマルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) DNA 遺伝子挿入鑄型と会合した、脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle、LNP) 送達系に任意選択的に含有される、治療用産物が本明細書に記載される。CRISPR/Cas9 成分は、標的ゲノム遺伝子座 (例えば、肝細胞における ALB 遺伝子座などのセーフハーバー遺伝子座) において二本鎖 DNA を標的とし、切断するように設計されており、マルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) DNA 鑄型が標的ゲノム遺伝子座においてゲノムに挿入されることを可能にする。導入遺伝子挿入は、ポンペ病患者における欠損又は欠陥ゲノム GAA をコードする機能的マルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) 遺伝子を提供する。

10

【0206】

本明細書に開示される構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) コード配列の一部は、天然 GAA コード配列と比較して発現のために最適化されている。例えば、本明細書に開示される構築物中のコード配列は、(例えば、ヒトコドンへの) コドン最適化、CpG ジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、又はそれらの任意の組み合わせなどの 1 つ以上の修飾を含み得る。他の場合、本明細書に開示される構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、天然の GAA コード配列を含み得る。

【0207】

II. 細胞又は新生児細胞において目的のポリペプチドをコードする核酸構築物を挿入するため、及び目的のポリペプチドを発現させるための組成物

20

内因性アルブミン (ALB) 遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への目的のポリペプチドのコード配列の挿入及び／又は目的のポリペプチドのコード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が本明細書で提供される。目的のポリペプチドのコード配列の発現のための核酸構築物及び組成物 (例えば、エピソーム発現ベクター) も本明細書において提供される。核酸構築物及び組成物は、標的ゲノム遺伝子座への組み込み及び／又は細胞又は対象における発現のための方法において使用され得る。ヌクレアーゼ剤 (例えば、内因性 ALB 遺伝子座を標的とする) 又はヌクレアーゼ剤をコードする核酸も提供され、内因性 ALB 遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への核酸構築物の組み込みを容易にする。

【0208】

30

内因性アルブミン (ALB) 遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座へのマルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) コード配列の挿入及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) コード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が本明細書で提供される。マルチドメイン治療用タンパク質 (例えば、GAA 融合タンパク質) の発現のための核酸構築物及び組成物 (例えば、エピソーム発現ベクター) も本明細書において提供される。核酸構築物及び組成物は、細胞又は細胞の集団又は対象においてマルチドメイン治療用タンパク質コード配列を含む核酸構築物を導入する方法、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列を含む核酸構築物を標的ゲノム遺伝子座に挿入又は組み込む方法、細胞又は細胞の集団又は対象においてマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法、対象の細胞又は細胞の集団又は組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法、及び対象のポンペ病又は GAA 欠損症を処置する方法において使用され得る。ヌクレアーゼ剤 (例えば、内因性 ALB 遺伝子座を標的とする) 又はヌクレアーゼ剤をコードする核酸も提供され、内因性 ALB 遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への核酸構築物の組み込みを容易にする。

40

【0209】

A. 目的のポリペプチドをコードする核酸構築物

本明細書に記載される組成物及び方法は、目的のポリペプチドのコード配列 (例えば、外因性ポリペプチドコード配列) を含む核酸構築物の使用を含む。本明細書に記載される組成物及び方法はまた、目的のポリペプチドコード配列又は目的のポリペプチドコード配列の逆相補体 (例えば、外因性ポリペプチドコード配列又は外因性ポリペプチドコード配

50

列の逆相補体)を含む核酸構築物の使用を含み得る。このような核酸構築物は、細胞における目的のポリペプチドの発現のためのものであり得る。そのような核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座への、又は本明細書の他の箇所に開示されるヌクレアーゼ剤若しくはCRISPR/Cas系によって作製される切断部位への挿入のためのものであり得る。切断部位という用語は、ヌクレアーゼ剤(例えば、ガイドRNAと複合体を形成したCas9タンパク質)によってニック又は二本鎖切断が作製されるDNA配列を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖切断は、ガイドRNAと複合体化されたCas9タンパク質、例えば、Spy Cas9ガイドRNAと複合体化されたSpy Cas9タンパク質によって作製される。場合によっては、目的のポリペプチドは、本明細書において定義される外因性ポリペプチドである。

10

【0210】

特定の例では、本明細書に記載される組成物及び方法は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列(マルチドメイン治療用タンパク質核酸)を含む核酸構築物の使用を含む。そのような核酸構築物は、細胞におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現のためのものであり得る。そのような核酸構築物は、本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤若しくはCRISPR/Cas系による切断部位での切断後の標的ゲノム遺伝子座への挿入のためのものであり得る、又は標的ゲノム遺伝子座又は(例えば、エピソームにおける)切断部位への挿入を伴わないマルチドメイン治療用タンパク質の発現のためのものであり得る。切断部位という用語は、ヌクレアーゼ剤(例えば、ガイドRNAと複合体を形成したCas9タンパク質)によってニック又は二本鎖切断が作製されるDNA配列を含む。特定の実施形態では、切断部位は、ガイドRNAと複合体化されたCas9タンパク質、例えば、Spy Cas9ガイドRNAと複合体化されたSpy Cas9タンパク質によって二本鎖切断が作製されるDNA配列を含む。

20

【0211】

本明細書に開示される核酸構築物の長さは、変動し得る。構築物は、例えば、約1kb~約5kb、例えば、約1kb~約4.5kb又は約1kb~約4kbであり得る。例示的な核酸構築物は、約1kb~約5kbの長さ、又は約1kb~約4kbの長さである。代替的に、核酸構築物は、約1kb~約1.5kb、約1.5kb~約2kb、約2kb~約2.5kb、約2.5kb~約3kb、約3kb~約3.5kb、約3.5kb~約4kb、約4kb~約4.5kb、又は約4.5kb~約5kbの長さであり得る。代替的に、核酸構築物は、例えば、5kb以下、4.5kb以下、4kb以下、3.5kb以下、3kb以下、又は2.5kb以下の長さであり得る。

30

【0212】

構築物は、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)を含み得、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得、直線状又は環状(例えば、ミニサークル)形態で宿主細胞に導入され得る。例えば、米国特許出願公開第2010/0047805号、同第2011/0281361号、及び同第2011/0207221号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。直線状の形態で導入された場合、構築物の末端は、既知の方法によって(例えば、エキソヌクレアーゼ分解から)保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の3'末端に付加し得る、及び/又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションし得る。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:4959-4963、及びNehls et al. (1996) Science 272:886-889を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するための追加の方法としては、末端アミノ基(複数可)の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター

40

50

分子の一部として細胞に導入され得る。構築物は、ウイルス要素を省いてもよい。更に、構築物は、ネイキッド核酸として導入され得る、リポソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得る、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【0213】

本明細書に開示される構築物は、必要に応じて1つ以上の好適な構造的特徴を含むように、及び／又は1つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ITR）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、1つ、2つ、若しくは3つのITRを含み得る、又は2つ以下のITRを含み得る。構造的修飾の様々な方法が既知である。

【0214】

いくつかの構築物は、それらの発現が挿入部位での内因性プロモーター（例えば、構築物が宿主細胞のALB遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ALBプロモーター）によって駆動されるように挿入され得る。そのような構築物は、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA融合タンパク質）の発現を駆動するプロモーターを含まなくてもよい。例えば、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA融合タンパク質）の発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のALB遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ALBプロモーター）によって駆動され得る。そのような場合、構築物は、その発現を駆動する制御要素（例えば、プロモーター及び／又はエンハンサー）を欠いていてもよい（例えば、プロモーターを含まない構築物）。それでもなお、他の場合、構築物は、プロモーター及び／又はエンハンサー、例えば、エピソーム中で又は組み込み時に目的のポリペプチド（マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA融合タンパク質）の発現を駆動する構成的プロモーター又は誘導性若しくは組織特異的（例えば、肝臓特異的又は血小板特異的）プロモーターを含み得る。例えば、構築物は、発現のための構築物（例えば、エピソーム構築物）であり得るが、挿入のためではない。いくつかの実施形態では、構築物は挿入用ではない。非限定的な例示的な構成的プロモーターには、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター（cytomegalovirus、CMV）、シミアンウイルス（SV40）プロモーター、アデノウイルス主要後期（major late promoter、MLP）プロモーター、ラズ肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus、RSV）プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（mouse mammary tumor virus、MMTV）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（phosphoglycerate kinase、PGK）プロモーター、伸長因子-アルファ（elongation factor-alpha、EF1a）プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、その機能的断片、又は前述のいずれかの組み合わせが含まれる。例えば、プロモーターは、CMVプロモーター又は切断型CMVプロモーターであり得る。別の例では、プロモーターは、EF1aプロモーターであり得る。非限定的な例示的な誘導性プロモーターには、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、又はアルコールによって誘導性であるプロモーターが含まれる。誘導性プロモーターは、Tet-On（登録商標）プロモーター（Clontech）などの低い基底（非誘導）発現レベルを有するものであってもよい。発現に必要なではないが、構築物は、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リポソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び／又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。構築物は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列の下流にあり、かつそれに作動可能に連結された目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA融合タンパク質）をコードする配列を含んでもよい。いくつかの例では、核酸構築物は、目的のポリペプチド（例え

10

20

30

40

50

ば、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質)をコードする核酸のホモロジー非依存性挿入において機能する。そのような核酸構築物は、例えば、非分裂細胞(例えば、相同組換え(homologous recombination、H R)ではなく、非相同末端結合(non-homologous end joining、N H E J)が、二本鎖D N A切断が修復される主要な機構である細胞)又は分裂細胞(活発に分裂している細胞)において機能し得る。そのような構築物は、例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。好ましい実施形態では、プロモーター及び他の調節配列は、ヒトにおける使用に適切であり、例えば、ヒト細胞(例えば、ヒト肝臓細胞)における調節因子によって認識され、そしてヒトにおける使用のために規制当局に受容可能である。肝臓特異的プロモーターの例としては、ヒト又はマウスT T RプロモーターなどのT T Rプロモーターが挙げられる。一例では、構築物は、マウスT T Rプロモーター又はヒトT T RプロモーターなどのT T Rプロモーターを含み得る(例えば、目的のポリペプチド又はマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、T T Rプロモーターに作動可能に連結されている)。一例では、構築物は、マウスS E R P I N A 1エンハンサー又はヒトS E R P I N A 1エンハンサーなどのS E R P I N A 1エンハンサーを含んでもよい(例えば、目的のポリペプチド又はマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、S E R P I N A 1エンハンサーに作動可能に連結されている)。一例では、構築物は、ヒトS E R P I N A 1エンハンサー及びマウスT T Rプロモーターなどの、T T Rプロモーター及びS E R P I N A 1エンハンサーを含んでもよい(例えば、目的のポリペプチド又はマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、S E R P I N A 1エンハンサー及びT T Rプロモーターに作動可能に連結されている)。

10

20

【0215】

本明細書に開示される構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は1つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含む又は除外するように修飾され得る。例えば、本明細書に開示されるいくつかの構築物は、ホモロジーアームを含まない。本明細書に開示されるいくつかの構築物は、非相同末端結合によって、ヌクレアーゼ剤の標的D N A配列中の標的ゲノム遺伝子座又は切断部位への挿入が可能である(例えば、A L B遺伝子座などのセーフハーバー遺伝子への挿入が可能である)。例えば、そのような構築物は、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤(例えば、C R I S P R／C a s系、例えば、S p y C a s 9 C R I S P R／C a s系)による切断後の平滑末端二本鎖切断に挿入され得る。具体的な例では、構築物は、A A Vを介して送達され得、非相同末端結合による挿入が可能であり得る(例えば、構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る)。

30

【0216】

特定の例では、構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込みを介して挿入され得る。例えば、構築物中の目的のポリペプチドコード配列(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質コード配列)は、ヌクレアーゼ剤の標的部位(例えば、標的化挿入のための標的D N A配列中(例えば、セーフハーバー遺伝子中)と同じ標的部位、及び標的化挿入のための標的D N A配列を切断するために使用される同じヌクレアーゼ剤)によって各側に隣接され得る。次いで、ヌクレアーゼ剤は、目的のポリペプチドコード配列(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質コード配列)に隣接する標的部位を切断し得る。特定の例では、構築物は、A A V媒介性送達で送達され、目的のポリペプチドコード配列(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質コード配列)に隣接する標的部位の切断は、A A Vの逆位末端反復(I T R)を除去し得る。いくつかの例では、標的化挿入のための標的D N A配列(例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むg R N A標的配列などのセーフハーバー遺伝子座中の標的D N A配列)は、目的のポリペプチドコード配列(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質コード配列)が切断部位又は標的D N A配列に正しい配向で挿入される場合にはもはや存在しないが、目的のポリペプチドコード配列(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質コード配列

40

50

）が切断部位又は標的DNA配列に逆の配向で挿入される場合には再形成される。これは、目的のポリペプチドコード配列（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA融合タンパク質コード配列）が、発現のために正しい配向で挿入されることを確実にするのに役立ち得る。

【0217】

本明細書に開示される構築物は、ポリアデニル化配列（例えば、目的のポリペプチドコード配列の下流又は3'）を含み得る。好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は、周知である。ポリアデニル化テール配列は、例えば、目的のポリペプチドコード配列の下流の「ポリA」ストレッチとしてコードされ得る。ポリAテールは、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、又は100個のアデニン、及び任意選択的に最大300個のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリAテールは、95、96、97、98、99、又は100個のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列AAUAAAは哺乳動物系において一般的に使用されるが、UAUAAA又はAU/GUAAAなどの変異体が同定されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Proudfoot (2011) Genes & Dev. 25 (17) : 1770-82を参照されたい。ポリアデニル化シグナル配列という用語は、転写の終結及びmRNA転写物へのポリAテールの付加を指示する任意の配列を指す。真核生物では、転写ターミネーターはタンパク質因子によって認識され、終結の後に、ポリ(A)ポリメラーゼの存在下でmRNA転写物にポリ(A)テールを追加するプロセスであるポリアデニル化が続く。哺乳動物のポリ(A)シグナルは、典型的には、約45ヌクレオチド長のコア配列で構成されており、切断及びポリアデニル化の効率を高めるのに役立つ多様な補助配列が隣接している場合がある。コア配列は、ポリA認識モチーフ又はポリA認識配列と呼ばれ、切断及びポリアデニル化特異性因子(cleavage and polyadenylation-specificity factor、CPSF)によって認識される、mRNA内の高度に保存された上流要素(AATAAA又はAAUAAA)、並びに定義が不十分であり、切断刺激因子(cleavage stimulation factor、CstF)によって結合される下流領域(U又はG及びUが豊富)で構成される。使用され得る転写ターミネーターの例には、例えば、ヒト成長ホルモン(human growth hormone、HGH)ポリアデニル化シグナル、シミアンウイルス40(simian virus 40、SV40)後期ポリアデニル化シグナル、ウサギベータグロビンポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン(bovine growth hormone、BGH)ポリアデニル化シグナル、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)ポリアデニル化シグナル、AOX1転写終結配列、CYC1転写終結配列、又は真核細胞における遺伝子発現の調節に好適であることが既知の任意の転写終結配列が含まれる。一例では、ポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス40(SV40)後期ポリアデニル化シグナルである。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号712、169、又は161を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号169又は161を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号169を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナル又はCpG枯渇しているBGHポリアデニル化シグナルである。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号162を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

【0218】

本明細書に開示される構築物はまた、スプライスアクセプター部位（例えば、目的のポリペプチドコード配列（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA融合タンパク質コード配列）の上流又は5'など、目的のポリペプチドコード配列（例えば、マルチ

ドメイン治療用タンパク質又はG A A融合タンパク質コード配列)に作動可能に連結されている)を含んでもよい。スプライスアクセプター部位は、例えば、N A Gを含み得るか、又はN A Gからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、A L Bスプライスアクセプターである(例えば、A L Bのエキソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるA L Bスプライスアクセプター(すなわち、A L Bエキソン2スプライスアクセプター))。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトA L B遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスA l b遺伝子に由来し得る(例えば、マウスA l bのエキソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるA L Bスプライスアクセプター(すなわち、マウスA l bエキソン2スプライスアクセプター))。別の例では、スプライスアクセプターは、目的のポリペプチドをコードする遺伝子由来のスプライスアクセプター(例えば、G A Aスプライスアクセプター)である。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトG A A遺伝子に由来し得る。代替的に、そのようなスプライスアクセプターは、マウスG A A遺伝子に由来し得る。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は、周知である。例えば、Shapiro et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 7155-7174、及びBurset et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29: 255-259を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。具体的な例では、スプライスアクセプターは、マウスA l bエキソン2スプライスアクセプターである。具体的な例では、スプライスアクセプターは、配列番号163を含み得る、から本質的になり得る、又はなり得る。

10

20

【0219】

いくつかの例では、本明細書に開示される核酸構築物は、以下により詳細に記載される双方向性構築物であり得る。いくつかの例では、本明細書に開示される核酸構築物は、以下により詳細に記載される一方向性構築物であり得る。同様に、いくつかの例では、本明細書に開示される核酸構築物は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、ベクター(例えば、A A V又はr A A V 8などのウイルスベクター)及び／又は脂質ナノ粒子内にあり得る。

【0220】

(1) 目的のポリペプチド及びマルチドメイン治療用タンパク質

目的の任意のポリペプチドは、本明細書中に開示される核酸構築物によってコードされてもよい。一例では、目的のポリペプチドは、治療用ポリペプチド(例えば、新生児対象において欠如又は欠損しているポリペプチド)である。一例では、目的のポリペプチドは、酵素である。

30

【0221】

目的のポリペプチドは、分泌ポリペプチド(例えば、細胞によって分泌されるタンパク質及び／又は可溶性細胞外タンパク質として機能的に活性であるタンパク質)であり得る。あるいは、目的のポリペプチドは、細胞内ポリペプチド(例えば、可溶性細胞質ゾルポリペプチドを含む、細胞によって分泌されず、細胞内で機能的に活性であるタンパク質)であり得る。

40

【0222】

目的のポリペプチドは、野生型ポリペプチドであり得る。代替的に、目的のポリペプチドは、変異体又は突然変異体ポリペプチドであり得る。

【0223】

一例では、目的のポリペプチドは、肝臓タンパク質(例えば、肝臓において内因的に産生され、及び／又は肝臓において機能的に活性であるタンパク質)である。別の例では、目的のポリペプチドは、肝臓によって産生される循環タンパク質であり得る。別の例では、目的のポリペプチドは、非肝臓タンパク質であり得る。

【0224】

目的のポリペプチドは、外因性ポリペプチドであり得る。「外因性」ポリペプチドコー

50

ド配列は、外因性供給源から宿主細胞ゲノム内の部位に（例えば、A L B イントロン 1 を含むセーフハーバー遺伝子座などのゲノム遺伝子座において）導入されているコード配列を指し得る。すなわち、外因性ポリペプチドコード配列は、その挿入部位に関して外因性であり、そのような外因性コード配列から発現されたポリペプチドは、外因性ポリペプチドと称される。異種コード配列は、天然に存在し得、又は操作され得、野生型又は変異体であり得る。外因性コード配列は、外因性ポリペプチドをコードする配列以外のヌクレオチド配列（例えば、配列内リボソーム進入部位）を含み得る。外因性コード配列は、野生型又は変異体（例えば、突然変異体）として宿主ゲノム内に天然に存在するコード配列であり得る。例えば、宿主細胞は目的のコード配列を（野生型として、又は変異体として）含有するが、同じコード配列又はその変異体を外因性供給源として（例えば、高度に発現される遺伝子座での発現のために）導入することができる。外因性コード配列はまた、宿主ゲノム内に天然に存在しない、又は宿主ゲノム内に天然に存在しない外因性ポリペプチドを発現するコード配列であり得る。外因性コード配列は、外因性核酸配列（例えば、核酸配列は、レシピエント細胞に対して内因性ではない）を含み得る、又はその挿入部位に関して、及び／又はそのレシピエント細胞に関して外因性であり得る。

10

20

30

40

50

【0225】

一例では、目的のポリペプチドは、遺伝性酵素欠損症に関連するポリペプチドである。特定の実施形態では、遺伝性酵素欠損症は、酵素欠損症の乳児発症をもたらす。特定の実施形態では、遺伝性酵素欠損症は、新生児スクリーニングで診断され得る、又は型通りに診断される。特定の実施形態では、酵素欠損症は、発症年齢が乳児発症型の病気及び遅発性型の病気（例えば、小児期、青年、又は成人発症型）を含み得るように、様々な重篤度の病気で現れ得る。

【0226】

一例では、目的のポリペプチドは、リソソーム α -グルコシダーゼ（G A A）ポリペプチドである。

【0227】

別の例では、目的のポリペプチドは、マルチドメイン治療用タンパク質である。本明細書に記載されるマルチドメイン治療用タンパク質は、内部移行エフェクター（細胞内に内部移行され得るか、又は他の方法で逆行性膜輸送に関与若しくは寄与するタンパク質）への結合を提供する送達ドメインに連結又は融合されたリソソーム α -グルコシダーゼ（G A A；例えば、G A A 酵素置換活性を提供するため）を含む。マルチドメイン治療用タンパク質の例は、例えば、国際公開第 2 0 1 3 / 1 3 8 4 0 0 号、同第 2 0 1 7 / 0 0 7 7 9 6 号、同第 2 0 1 7 / 1 9 0 0 7 9 号、同第 2 0 1 7 / 1 0 0 4 6 7 号、同第 2 0 1 8 / 2 2 6 8 6 1 号、同第 2 0 1 9 / 1 5 7 2 2 4 号、及び同第 2 0 1 9 / 2 2 2 6 6 3 号に見出され得、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質は、リソソーム α -グルコシダーゼ（G A A）に連結又は融合された C D 6 3 結合送達ドメインを含み得る。C D 6 3 結合ドメイン及び G A A を、以下により詳細に記載する。C D 6 3 結合ドメインは、内在化因子 C D 6 3 への結合を提供する。マルチドメイン治療用タンパク質は、筋肉において高度に発現される急速内在化タンパク質である C D 6 3 を標的化することによって筋肉に標的化される。いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質では、C D 6 3 結合送達ドメインは、G A A に共有結合している。共有結合は、任意のタイプの共有結合（すなわち、電子の共有を伴う任意の結合）であってもよい。場合によっては、共有結合は、G A A 及び C D 6 3 結合送達ドメインの全体又は一部が、融合タンパク質におけるように、連続ポリペプチド鎖を形成するような、2つのアミノ酸間のペプチド結合である。場合によっては、G A A 部分及び C D 6 3 結合送達ドメイン部分は、直接連結される。他の場合には、ペプチドリinkerなどのリンカーが、2つの部分をテザリングするために使用される。任意の好適なリンカーが使用され得る。Chen et al., 「Fusion protein linkers: property, design and functionality,」 65 (10) Adv Drug Deliv Rev. 1

357-69 (2013) を参照されたい。場合によっては、切断可能なリンカーが使用される。例えば、カテプシン切断可能リンカーをCD63結合送達ドメインとGAAとの間に挿入して、リソソームにおけるCD63結合送達ドメインの除去を容易にすることができる。別の例では、リンカーは、アミノ酸配列、例えば、約10アミノ酸長、例えば、Gly4Ser (配列番号600) の1、2、3、4、5、6、7、8、8、又は10反復を含み得る。一例では、リンカーは、3つのそのような反復 (配列番号713) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号715~719を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、リンカーは、2つのそのような反復 (配列番号714) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号720~726を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、リンカーは、1つのそのような反復 (配列番号600) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号727を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

10

【0228】

特定のマルチドメイン治療用タンパク質では、GAAは、抗CD63抗体の重鎖のC末端又は軽鎖のC末端に共有結合している。別の特定のマルチドメイン治療用タンパク質では、GAAは、抗CD63抗体の重鎖のN末端又は軽鎖のN末端に共有結合している。別の特定の実施形態では、GAAは抗CD63 scFvドメインのC末端に連結される。

20

【0229】

別の例として、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質は、リソソームα-グルコシダーゼ (GAA) に連結又は融合されたTfR結合送達ドメインを含み得る。TfR結合ドメイン及びGAAは、以下により詳細に記載される。TfR結合ドメインは、内在化因子TfRへの結合を提供する。肝臓によって産生されるマルチドメイン治療用タンパク質は、筋肉及び脳内皮細胞上で発現されるTfRを標的とすることによって筋肉及びCNSを標的とする。これらの細胞におけるTfRのトランスサイトシスは、血液脳関門通過を可能にする。いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質において、TfR結合送達ドメインは、GAAに共有結合している。共有結合は、任意のタイプの共有結合 (すなわち、電子の共有を伴う任意の結合) であってもよい。いくつかの場合において、共有結合は、GAA及びTfR結合送達ドメインの全体又は一部が、融合タンパク質におけるように、連続ポリペプチド鎖を形成するような2つのアミノ酸間のペプチド結合である。いくつかの場合において、GAA部分及びTfR結合送達ドメイン部分は直接連結される。他の場合には、ペプチドリンカーなどのリンカーが、2つの部分をつなぐために使用される。任意の好適なリンカーが使用され得る。Chen et al., 「Fusion protein linkers: property, design and functionality,」 65 (10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013) を参照されたい。場合によっては、切断可能なリンカーが使用される。例えば、カテプシン切断可能リンカーをTfR結合送達ドメインとGAAとの間に挿入して、リソソームにおけるTfR結合送達ドメインの除去を容易にすることができる。別の例では、リンカーは、アミノ酸配列、例えば、約10アミノ酸長、例えば、Gly4Ser (配列番号600) の1、2、3、4、5、6、7、8、8、又は10反復を含み得る。一例では、リンカーは、3つのそのような反復 (配列番号713) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号715~719のいずれかを含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、リンカーは、2つのそのような反復 (配列番号714) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号720~726を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、リンカーは、1つのそのような反復 (配列番号600) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号727を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

30

40

50

【0230】

特定のマルチドメイン治療用タンパク質において、GAAは、抗TfR抗体の重鎖のC末端又は軽鎖のC末端に共有結合している。別の特定のマルチドメイン治療用タンパク質において、GAAは、抗TfR抗体の重鎖のN末端又は軽鎖のN末端に共有結合している。別の特定の実施形態では、GAAは、抗TfR scFvドメインのC末端に連結される。

【0231】

(a) リソソーム α -グルコシダーゼ (GAA)

リソソーム α -グルコシダーゼ (GAA; 酸性 α -グルコシダーゼ、酸性 α -グルコシダーゼプレプロタンパク質、酸性マルターゼ、アグルコシダーゼ α 、 α -1, 4-グルコシダーゼ、アミログルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、LYAGとしても知られる) は、GAAによってコードされる。この酵素はリソソームにおいて活性であり、そこでグリコーゲンをグルコースに分解する。

【0232】

ヒトGAA遺伝子 (NCBI遺伝子ID 2548) は、952アミノ酸タンパク質をコードする。リソソームにおいて、ヒトGAAは、プロテアーゼによって、結合したままである76 kDa、19.4 kDa、及び3.9 kDaのポリペプチドに連続的にプロセシングされる。R (200) とA (204) との間の更なる切断は、76 kDaポリペプチドを、更なる10.4 kDaポリペプチドを有する成熟70 kDa形態に非効率的に変換する。GAA成熟は、グリコーゲンに対するその親和性を7~10倍増加させる。シグナルペプチドはアミノ酸1~27によってコードされ、プロペプチドはアミノ酸28~69によってコードされ、シグナルペプチド及びプロペプチドの除去後のリソソーム α -グルコシダーゼはアミノ酸70~952によってコードされ、76 kDaリソソーム α -グルコシダーゼはアミノ酸123~952によってコードされ、70 kDaリソソーム α -グルコシダーゼはアミノ酸204~952によってコードされる。

【0233】

本明細書に開示される組成物及び方法から発現されたGAAは、任意の野生型又は変異体GAAであり得る。一例では、GAAは、ヒトGAAタンパク質である。ヒトGAAは、UniProt参照番号P10253が割り当てられている。ヒト第GAA因子についての例示的なアミノ酸配列は、NCBIアクセッション番号NP_000143.2が割り当てられており、配列番号170に記載されている。例示的なヒトGAA mRNA (cDNA) 配列は、NCBIアクセッション番号NM_000152.5が割り当てられており、配列番号171に記載されている。例示的なヒトGAAコード配列は、CCDS ID CCDS32760.1が割り当てられており、配列番号172に記載されている。アミノ酸70で開始する例示的な成熟ヒトGAAアミノ酸配列 (すなわち、シグナルペプチド及びプロペプチドの除去後のヒトGAA配列) (すなわち、GAA70~952) は、配列番号173に記載されている。GAA70-952の例示的なコード配列は、配列番号174に記載されている。

【0234】

いくつかの例では、GAA (例えば、ヒトGAA) は、野生型GAA (例えば、野生型ヒトGAA) 配列又はその断片である。例えば、GAAは、成熟GAAアミノ酸配列 (すなわち、シグナルペプチド及びプロペプチドの除去後のGAA配列) を含む断片、77 kDa形態のGAAを含む断片、又は70 kDa形態のGAAを含む断片であり得る。具体的な例では、GAAは、配列番号173又は配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。別の具体的な例では、GAAは、配列番号173から本質的になり得る。具体的な例では、GAAは、配列番号173からなり得る。

【0235】

本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、（例えば、ヒトコドンへの）コドン最適化、C p G ジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の突然変異、1 つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの 1 つ以上の修飾を含み得る。構築物中の C p G ジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化 C p G ジヌクレオチドは、宿主トール様受容体 9（TLR-9）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激し得る。第二に、C p G ジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル-C p G 結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの突然変異によって活性化され得る、プレメッセンジャー RNA 中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

10

【0236】

一例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、1 つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、1 つ以上の C p G ジヌクレオチドが除去されている（すなわち、C p G 枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、全ての C p G ジヌクレオチドが除去されている（すなわち、完全に C p G 枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。具体的な例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、1 つ以上の C p G ジヌクレオチドが除去されており（すなわち、C p G 枯渇している）、1 つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、全ての C p G ジヌクレオチドが除去されており、1 つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、1 つ以上の C p G ジヌクレオチドが除去されており（すなわち、C p G 枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中の G A A コード配列は、全ての C p G ジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

20

30

【0237】

様々な G A A コード配列が提供される。一例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 及び 205 ~ 212 のいずれかに記載の配列からなる。種々の G A A コード配列が提供される。一例では、G A A コード配列は、配列番号 174 ~ 182 のいずれ

40

50

かに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174~182のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174~182のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174~182のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174~182のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174~182のいずれかに記載の配列からなる。一例では、GAAコード配列は、配列番号176に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号176に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号176に記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号176に記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号176に記載の配列からなる。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列を含むGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列から本質的になるGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列からなるGAAタンパク質をコードする。

【0238】

様々なコドン最適化されたGAAコード配列が提供される。GAAコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、CpG枯渇していても完全にCpG枯渇している）。一例では、GAAコード配列は、配列番号175~182のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号175~182のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号175~182のいずれか

に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 175～182 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 175～182 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAAタンパク質（又は配列を含む GAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAAタンパク質（又は配列を含む GAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAAコード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAAタンパク質（又は配列を含む GAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAAコード配列は、配列番号 173 に記載される配列を含む GAAタンパク質をコードする、任意選択的に、上記の例における GAAコード配列は、配列番号 173 に記載の配列から本質的になる GAAタンパク質をコードする、任意選択的に、上記の例における GAAコード配列は、配列番号 173 に記載の配列からなる GAAタンパク質をコードする。

10

20

【0239】

一例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAAタンパク質（又は配列を含む GAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載される配列を含む GAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載の配列を含む GAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少な

30

40

50

は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載の配列を含むGAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載される配列を含むGAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174に記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174に記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174に記載の配列からなる。GAAコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、GAAコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載される配列を含むGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載される配列から本質的になるGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載される配列からなるGAAタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0241】

一例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載される配列を含むGAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%

、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載される配列を含むGAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載の配列を含むGAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号181に記載の配列からなる。GAAコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、GAAコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列を含むGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列から本質的になるGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列からなるGAAタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0242】

一例では、GAAコード配列は、配列番号180に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号180に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号180に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）

、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に記載の配列を含む。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 180 に記載の配列からなる。G A A コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A A コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載の配列から本質的になる G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載の配列からなる G A A タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0243】

一例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少な

くとも 99.5%、又は 100% 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に記載の配列を含む。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 178 に記載の配列からなる。G A A コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A A コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列から本質的になる G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列からなる G A A タンパク質をコードする。

【0244】

様々な他の G A A コード配列が提供される。一例では、G A A コード配列は、配列番号 174 及び 205～212 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも

96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174及び205～212のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174及び205～212のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174及び205～212のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174及び205～212のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号174及び205～212のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載される配列を含むGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載される配列から本質的になるGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載される配列からなるGAAタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0245】

様々な他のコドン最適化されたGAAコード配列が提供される。GAAコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、CpG枯渇していても（例えば、完全にCpG枯渇していても）コドンが最適化されている）。一例では、GAAコード配列は、配列番号205～212のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号205～212のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号205～212のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号205～212のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号205～212のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくと

も 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列から本質的になる G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 173 に記載される配列からなる G A A タンパク質をコードする。

10

【0246】

一例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 173 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である G A A タンパク質（又は配列を含む G A A タンパク質）をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 173 に記載される配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に記載の配列を含む。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 176 に記載の配列からなる。G A A コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A A コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、

20

30

40

50

10

20

30

40

50

、G A Aコード配列は、配列番号174に記載の配列からなる。G A Aコード配列は、例えば、C p G枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A Aコード配列は、C p G枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載される配列を含むG A Aタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載される配列から本質的になるG A Aタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載される配列からなるG A Aタンパク質をコードする。

10

20

【0248】

一例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載される配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号205に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は

30

40

50

配列を含む G A A タンパク質) をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 5 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 5 に記載の配列を含む。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 5 に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 5 に記載の配列からなる。G A A コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく (例えば、完全に C p G 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A A コード配列は、C p G 枯渇していてもよく (例えば、完全に C p G 枯渇している)、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する)。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に記載の配列から本質的になる G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に記載の配列からなる G A A タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 9 】

一例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である (又は配列を含む)。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 6 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である (又は配列を含む)。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 6 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 0 6 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパ

ク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号206に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号206に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号206に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号206に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号206に記載の配列からなる。G A Aコード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A Aコード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載の配列から本質的になるG A Aタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載の配列からなるG A Aタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0250】

一例では、G A Aコード配列は、配列番号207に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号207に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号207に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号207に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号207に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、

配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 207 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載の配列を含む GAA タンパク質をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 207 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 207 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 207 に記載の配列を含む。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 207 に記載の配列から本質的になる。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 207 に記載の配列からなる。GAA コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、GAA コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列を含む GAA タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列から本質的になる GAA タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列からなる GAA タンパク質をコードする。

【0251】

一例では、GAA コード配列は、配列番号 208 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 208 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 208 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載の配列を含む GAA タンパク質をコードする。別の例では、GAA

Aコード配列は、配列番号208に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載の配列を含むGAAタンパク質をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に記載の配列を含む。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に記載の配列から本質的になる。別の例では、GAAコード配列は、配列番号208に記載の配列からなる。GAAコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、GAAコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列を含むGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列から本質的になるGAAタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるGAAコード配列は、配列番号173に記載の配列からなるGAAタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0252】

一例では、GAAコード配列は、配列番号209に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、GAAコード配列は、配列番号209に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるGAAタンパク質（又は配列を含むGAAタ

ンパク質)をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質(又は配列を含むG A Aタンパク質)をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質(又は配列を含むG A Aタンパク質)をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に記載の配列を含む。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号209に記載の配列からなる。G A Aコード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく(例えば、完全にC p G 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A Aコード配列は、C p G 枯渇していてもよく(例えば、完全にC p G 枯渇している)、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質(又は配列を含むG A Aタンパク質)をコードする(かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する)。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質(又は配列を含むG A Aタンパク質)をコードする(かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する)。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質(又は配列を含むG A Aタンパク質)をコードする(かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する)。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載の配列から本質的になるG A Aタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に記載の配列からなるG A Aタンパク質をコードする。

【0253】

一例では、G A Aコード配列は、配列番号210に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、G A Aコー

10

20

30

40

50

ド配列は、配列番号 210 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 210 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に記載の配列を含む GAA タンパク質をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 210 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 210 に記載の配列を含む。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 210 に記載の配列から本質的になる。別の例では、GAA コード配列は、配列番号 210 に記載の配列からなる。GAA コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、GAA コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列を含む GAA タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列から本質的になる GAA タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列からなる GAA タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0254】

一例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に記載の配列を含むG A Aタンパク質をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に記載の配列を含む。別の例では、G A Aコード配列は、配列番号211に記載の配列からなる。G A Aコード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A Aコード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、G A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるG A Aコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるG A Aタンパク質（又は配列を含むG A Aタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然G A Aの

10

20

30

40

50

活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に記載の配列から本質的になる G A A タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に記載の配列からなる G A A タンパク質をコードする。

【 0 2 5 5 】

一例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である (又は配列を含む)。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に記載の配列を含む G A A タンパク質をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である (又は配列を含む)。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に記載の配列を含む。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に記載の配列から本質的になる。別の例では、G A A コード配列は、配列番号 2 1 2 に記載の配列からなる。G A A コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく (例えば、完全に C p G 枯渇している)、及び / 又はコドン最適化されていてもよい。例えば、G A A コード配列は、C p G 枯渇していてもよく (例えば、完全に C p G 枯渇している)、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である G A A タンパク質 (又は配列を含む G A A タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する)。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 1 7 3 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくと

10

20

30

40

50

も 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である GAA タンパク質（又は配列を含む GAA タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列を含む GAA タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列から本質的になる GAA タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における GAA コード配列は、配列番号 173 に記載の配列からなる GAA タンパク質をコードする。

10

【0256】

特定の GAA 又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される GAA 又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が仮定配列 5'-CTGGACCGA-3' からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（5'-TCGGTCCAG-3'）を包含することを意味する。同様に、構築物要素が特定の 5' から 3' への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。この理由の 1 つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、GAA 又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が一本鎖組換え AAV ベクターの一部であることである。一本鎖 AAV ゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+ 及び - 極性の一本鎖 AAV ゲノムは、等しい頻度で成熟 rAAV ビリオンにパッケージされる。例えば、LING et al. (2015) J. Mol. Genet. Med. 9 (3): 175, Zhou et al. (2008) Mol. Ther. 16 (3): 494-499、及び Samulski et al. (1987) J. Virol. 61: 3096-3101 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0257】

(b) CD63 結合送達ドメイン

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質は、GAA に融合された CD63 結合送達ドメインを含み得る。CD63 結合ドメインは、内在化因子 CD63 (UniProt Ref. P08962-1) への結合を提供する。CD63 (CD63 抗原、グラニュロフィシン、リソソーム関連膜タンパク質 3、LAMP-3、リソソーム内在性膜タンパク質 1、Limp1、黒色腫関連抗原 ME491、OMA81H、眼黒色腫関連抗原、テトラスパニン-30、又は Tspan-30 としても知られる) は、細胞膜を 4 回貫通する細胞表面タンパク質のテトラスパニンスーパーファミリーのメンバーである。それは、CD63 遺伝子 (MLA1 又は TSPAN30 としても知られている) によってコードされる。CD63 は、実質的に全ての組織において発現され、シグナル伝達複体の形成及び安定化に関与すると考えられている。CD63 は、細胞膜、リソソーム膜、及び後期エンドソーム膜に局在する。CD63 は、インテグリンと会合することが知られており、上皮間葉転換に関与し得る。

30

40

【0258】

いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質において、CD63 結合送達ドメインは、抗体、抗体断片、又は他の抗原結合タンパク質である。いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質において、CD63 結合送達ドメインは、抗原結合タンパク質である。抗原結合タンパク質の例としては、例えば、受容体融合分子、トラップ分子、受容体-Fc 融合分子、抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、Fd 断片、Fv 断片、単鎖 Fv (scFv) 分子、dAb 断片、単離相補性決定領域 (CDR)、CDR3 ペプチド、拘束 FR3-CDR3-FR4 ペプチド、ドメイン特異的抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR 移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボ

50

ディ、ナノボディ、一価ナノボディ、二価ナノボディ、小モジュラー免疫薬（SMIP）、ラクダ科抗体（VHH重鎖ホモ二量体抗体）、及びサメ可変IgNARDメインが挙げられる。CD63結合送達ドメインの例は、国際公開第2013/138400号、同第2017/007796号、同第2017/190079号、同第2017/100467号、同第2018/226861号、同第2019/157224号、及び同第2019/222663号に見出され得、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0259】

特定のマルチドメイン治療用タンパク質において、CD63結合送達ドメインは、抗CD63 s c F vである。具体的な例では、抗CD63 s c F vは、配列番号183を含み得るか、又は配列番号183に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。別の具体的な例では、抗CD63 s c F vは、配列番号183から本質的になり得る。別の具体的な例では、抗CD63 s c F vは、配列番号183からなり得る。

10

【0260】

本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、コドン最適化（例えば、ヒトコドンへの）、CpGジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、1つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの1つ以上の修飾を含み得る。構築物中のCpGジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化CpGジヌクレオチドは、宿主トル様受容体9（TLR-9）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激し得る。第二に、CpGジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル-CpG結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの突然変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーRNA中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

20

30

【0261】

一例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、1つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されている（すなわち、CpG枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されている（すなわち、完全にCpG枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、CpG枯渇している）、1つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており、1つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のCD63結合送達ドメインコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、CpG枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中の

40

50

C D 6 3 結合送達ドメインコード配列は、全ての C p G ジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【0262】

様々な抗 C D 6 3 s c F v コード配列が提供される。一例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 4 ~ 1 9 2 のいずれかに記載の配列からなる。一例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に記載の配列を含む。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に記載の配列からなる。任意選択的に、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、C D 6 3 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、C D 6 3 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、C D 6 3 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に記載の配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に記載の配列から本質的になる抗 C D 6 3 s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に記載の配列からなる抗 C D 6 3 s c F v タンパク質をコードする。

【0263】

様々な種々のコドン最適化された抗 C D 6 3 s c F v コード配列が提供される。抗 C

D 6 3 s c F v コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、C p G 枯渇しており（例えば、完全に C p G 枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 5 ～ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 5 ～ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 5 ～ 1 9 2 のいずれかに対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 5 ～ 1 9 2 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 5 ～ 1 9 2 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 5 ～ 1 9 2 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、C D 6 3 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、C D 6 3 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、C D 6 3 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に記載の配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に記載の配列から本質的になる抗 C D 6 3 s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 3 に記載の配列からなる抗 C D 6 3 s c F v タンパク質をコードする。

【 0 2 6 4 】

一例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 1 8 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 C D 6 3 s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 C D 6 3 s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 C D 6 3 s c F v コード配列は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号

183に記載の配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 s c F vタンパク質（又は配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 s c F vタンパク質（又は配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に記載の配列を含む。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号186に記載の配列からなる。抗CD63 s c F vコード配列は、例えば、C p G枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗CD63 s c F vコード配列は、C p G枯渇していてもよく（例えば、完全にC p G枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号183に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 s c F vタンパク質（又は配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号183に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 s c F vタンパク質（又は配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 s c F vタンパク質（又は配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号183に記載の配列から本質的になる抗CD63 s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号183に記載の配列からなる抗CD63 s c F vタンパク質をコードする。

【0265】

一例では、抗CD63 s c F vコード配列は、配列番号184に対して少なくとも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

10

20

30

40

50

なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 183 に記載の配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。配列番号 183 に記載の配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に記載の配列を含む。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 184 に記載の配列からなる。抗 CD63 scFv コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗 CD63 scFv コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 183 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 183 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 CD63 scFv コード

10

20

30

40

50

配列は、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 183 に記載の配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 183 に記載の配列から本質的になる抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 183 に記載の配列からなる抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。

【0266】

一例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に記載の配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に記載の配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 183 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 CD63 scFv タンパク質（又は配列を含む抗 CD63 scFv タンパク質）をコードする。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に記載の配列を含む。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 CD63 scFv コード配列は、配列番号 191 に記載の配列からなる。抗 CD63 scFv コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよ

10

20

30

40

50

い。例えば、抗CD63 scFvコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列から本質的になる抗CD63 scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列からなる抗CD63 scFvタンパク質をコードする。

10

20

【0267】

一例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又

30

40

50

は配列を含む)。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質(又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質)をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に記載の配列を含む。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号190に記載の配列からなる。抗CD63 scFvコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗CD63 scFvコード配列は、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質(又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、CD63結合活性を保持する)。任意選択的に、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質(又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、CD63結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号173に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質(又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、CD63結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列から本質的になる抗CD63 scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列からなる抗CD63 scFvタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0268】

一例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質(又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質)をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含む)、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも95%、少なく

とも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に記載の配列を含む。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号188に記載の配列からなる。抗CD63 scFvコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗CD63 scFvコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗CD63 scFvタンパク質（又は配列を含む抗CD63 scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、CD63結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列を含む抗CD63 scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列から本質的になる抗CD63 scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗CD63 scFvコード配列は、配列番号183に記載の配列からなる抗CD63 scFvタンパク質をコードする。

【0269】

特定の抗CD63 scFv又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される抗CD63 scFv又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が仮定配列5'-CTGGACCGA-3'からなる場合、

それはまた、その配列の逆相補体（5' - T C G G T C C A G - 3'）を包含することを意味する。同様に、構築物要素が特定の5'から3'への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。この理由の1つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、抗CD63 scFv又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が、一本鎖組換えAAVベクターの一部であることである。一本鎖AAVゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+及び-極性の一本鎖AAVゲノムは、等しい頻度で成熟rAAVビリオンにパッケージされる。例えば、LING et al. (2015) J. Mol. Genet. Med. 9 (3) : 175, Zhou et al. (2008) Mol. Ther. 16 (3) : 494-499、及びSamulski et al. (1987) J. Virol. 61 : 3096-3101を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0270】

（c）TfR結合送達ドメイン

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質は、GAAに融合されたTfR結合送達ドメインを含み得る。TfR結合ドメインは、内在化因子トランスフェリン受容体タンパク質1（TfR；UniProt Ref. P02786）への結合を提供する。TfR（TR、TfR1、及びTrfrとしても知られている）は、TFRC遺伝子によってコードされる。TfRは、筋肉細胞及び脳内皮細胞において発現される。これらの細胞におけるTfRのトランスサイトシスは、血液脳関門通過を可能にする。いくつかの実施形態では、GAAに融合されたTfR結合送達ドメイン（例えば、scFv）を含むマルチドメイン治療用タンパク質は、トランスフェリン取り込みを変化させない。いくつかの実施形態では、GAAに融合されたTfR結合送達ドメイン（例えば、scFv）を含むマルチドメイン治療用タンパク質は、鉄ホメオスタシスを変化させない。いくつかの実施形態では、GAAに融合されたTfR結合送達ドメイン（例えば、scFv）を含むマルチドメイン治療用タンパク質は、トランスフェリン取り込み又は鉄ホメオスタシスを変化させない。

【0271】

トランスフェリン受容体1（TfR）は、主要な鉄担体タンパク質であるトランスフェリンの結合を介して細胞への鉄供給の制御に関与する膜受容体である。トランスフェリン受容体1は、TFRC遺伝子から発現される。トランスフェリン受容体1は、本明細書において、TFRCと称されてもよい。鉄はリボヌクレオチドレダクターゼ活性を維持するのに必須であり、リボヌクレオチドからデオキシリボヌクレオチドへの変換を触媒する唯一の酵素であるため、この受容体は細胞増殖の制御において重要な役割を果たす。好ましくは、TfRは、ヒトTfR（hTfR）である。例えば、アクセッション番号NP_001121620.1；BAD92491.1；及びNP_001300894.1；及びENSG00000072274を参照されたい。ヒトトランスフェリンレセプター1は、いくつかの組織において発現され、この組織としては、大脳皮質、小脳、海馬、尾状核、上皮小体、副腎、気管支、肺臓、口腔粘膜、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸、肝臓、胆嚢、膵臓、腎、膀胱、睾丸、副睾丸、前立腺、腔、子房、ファローピウス管、子宮内膜、頸部、胎座、胸部、心筋、平滑筋、軟組織、皮膚、虫垂、リンパ腺、扁桃腺、及び骨髄が挙げられるが、これらに限定されない。関連するトランスフェリン受容体は、トランスフェリン受容体2（TfR2）である。ヒトトランスフェリン受容体2は、ヒトトランスフェリン受容体1と約45%の配列同一性を有する。Trinder & Baker, トランスフェリン受容体2：鉄代謝における新しい分子。Int J Biochem Cell Biol. 2003 Mar; 35 (3) : 292-6. 特に明記しない限り、本明細書で使用されるトランスフェリン受容体は、一般に、トランスフェリン受容体1（例えば、ヒトトランスフェリン受容体1）を指す。

【0272】

ヒトトランスフェリン（Tf）は、タンパク質のアニオン結合スーパーファミリーの一

本鎖 80 kDa メンバーである。トランスフェリンは、19 個の鎖内ジスルフィド結合を典型的に含有する 19 個のアミノ酸シグナル配列 + 679 個のアミノ酸成熟セグメントに分割される 698 個のアミノ酸前駆体である。N 及び C 末端隣接領域（又はドメイン）は、偏性アニオン（例えば、重炭酸塩）と 4 つのアミノ酸（His、Asp、及び 2 つの Tyr）との相互作用を介して第二鉄に結合する。アポトランスフェリン（又は鉄を含まない）は、最初に C 末端で鉄の 1 つの原子に結合し、これに続いて N 末端による鉄結合が起こり、ホロトランスフェリン（二鉄 Tf、Holo-Tf）を形成する。その C 末端鉄結合性ドメインを介して、ホロトランスフェリンは、細胞表面上の TfR と相互作用し、そこで酸性化エンドソームに内在化される。鉄は、これらのエンドソーム内で Tf 分子から解離し、第一鉄としてサイトゾルに輸送される。TfR に加えて、トランスフェリンは、

10

【0273】

血液脳関門（BBB）は、脳の微小血管内に位置し、血液から脳への分子の通過を調節する。Burkhardt et al., Accessing targeted nanoparticles to the brain: the vascular route. Curr Med Chem. 2014; 21 (36): 4092-9。脳毛細血管内皮細胞を介する経細胞通過は、1) 白血球による細胞侵入、2) 例えば、グルコース輸送体 1 (GLUT-1) によるグルコースの担体媒介性流入、L 型アミノ酸輸送体 1 (LAT-1) によるアミノ酸の担体媒介性流入、及び例えば、有機アニオン輸送ペプチド-B (OATP-B) による小ペプチドの担体媒介性流入、3) 小疎水性分子の傍細胞通過、4) 例えば、アルブミン及びカチオン化分子の吸着媒介性経細胞輸送、5) CO₂ 及び O₂ を含む脂溶性非極性溶質の受動拡散、並びに 5) 例えばインスリン受容体によるインスリン及び TfR による Tf の受容体媒介性経細胞輸送を介して起こり得る。Johansen et al., Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery, Prog Neurobiol. 2019 Oct; 181: 101665。

20

【0274】

例えば、トランスフェリン受容体に対する高い親和性及び優れた血液脳関門通過を示す抗 TfR: GAA 融合タンパク質が提供される。驚くべきことに、TfR に対して高い結合親和性を示す融合物は、低親和性結合剤よりも効率的に血液脳関門を通過した。本発明の融合体は、GAA を脳に効率的に送達する能力を有し、したがって、ポンペ病などの糖原病の有効な治療である。

30

【0275】

本明細書では、トランスフェリン受容体、好ましくはヒトトランスフェリン受容体 1 (抗 hTfR) に特異的に結合する抗体、その抗原結合断片、例えば Fab 及び scFv などの抗原結合タンパク質が提供される。例えば、一実施形態では、抗 hTfR は、融合タンパク質の形態である。融合タンパク質は、GAA に融合された抗 hTfR 抗原結合タンパク質を含む。抗 hTfR s は、脳血管関門 (BBB) を効率的に通過し、それによって融合 GAA を脳に送達し得る。

40

【0276】

トランスフェリン受容体及びその融合物に特異的に結合する抗原結合タンパク質、例えば、His₆ 及び／又は myc（例えば、ヒトトランスフェリン受容体（例えば、REGN2431）又はサルトランスフェリン受容体（例えば、REGN2054））は、約 25 °C、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイにおいて、K_D が約 20 nM 以上の親和性で結合する。このような抗原結合タンパク質は、「抗 TfR」と称され得る。

【0277】

一実施形態では、抗 hTfR scFv: GAA 融合タンパク質は、以下の LCVR-HCVR 又は HCVR-LCVR のような可変領域の配置を含む scFv を含み、HCVR 及び LCVR は、任意選択的にリンカーによって接続され、scFv は、任意選択的に

50

リンカーによって、G A Aに接続される（例えば、L C V R - (G l y₄ S e r)₃ - H C V R - (G l y₄ S e r)₂) - G A A、又は L C V R - (G l y₄ S e r)₃ - H C V R - (G l y₄ S e r)₂) - G A A) (G l y₄ S e r = 配列番号 6 0 0)。一例では、H C V Rと L C V Rとの間のリンカーは、3つのそのような反復（配列番号 7 1 3）を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号 7 1 5 ~ 7 1 9 のいずれかを含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、H C V Rと L C V Rとの間のリンカーは、2つのそのような反復（配列番号 7 1 4）を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号 7 2 0 ~ 7 2 6 を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、H C V Rと L C V Rとの間のリンカーは、1つのそのような反復（配列番号 6 0 0）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号 7 2 7 を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。一例では、s c F vと G A Aとの間のリンカーは、3つのそのような反復（配列番号 7 1 3）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号 7 1 5 ~ 7 1 9 を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、s c F vと G A Aとの間のリンカーは、2つのそのような反復（配列番号 7 1 4）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号 7 2 0 ~ 7 2 6 を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、s c F vと G A Aとの間のリンカーは、1つのそのような反復（配列番号 6 0 0）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。例えば、リンカーのコード配列は、配列番号 7 2 7 を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

10

20

30

40

50

【0278】

抗 h T f R : G A A は、任意選択的に、トランスフェリン受容体 (T f R)、好ましくはヒトトランスフェリン受容体 (h T f R) に特異的に結合する抗原結合タンパク質に連結されたシグナルペプチドを含み、これは（任意選択的にリンカーによって）G A Aに融合される。一実施形態では、シグナルペプチドは、m R O Rシグナル配列である（例えば、m R O Rシグナル配列 - L C V R - (G l y₄ S e r)₃ - H C V R - (G l y₄ S e r)₂) - G A A ; 又は L C V R - (G l y₄ S e r)₃ - H C V R - (G l y₄ S e r)₂) - G A A) (G l y₄ S e r = 配列番号 6 0 0)。融合ポリペプチドに関する「融合された」又は「テザリングされた」という用語は、直接的又は間接的に結合されたポリペプチドを指す（例えば、例えば、リンカー又は他のポリペプチドを介して）。

【0279】

いくつかの実施形態では、各フレームワーク又は C D R ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat et al. ; National Institutes of Health, Bethesda, Md. ; 5th ed. ; NIH Publ. No. 91-3242 (1991) ; Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32 : 1-75 ; Kabat et al. , (1977) J. Biol. Chem. 252 : 6609-6616 ; Chothia, et al. , (1987) J. Mol. Biol. 196 : 901-917 or Chothia, et al. , (1989) Nature 342 : 878-883を参照されたい。したがって、V_Hの C D R 及び V_Lの C D R を含む抗体及び抗原結合断片が含まれ、V_H及び V_Lは、本明細書に記載のアミノ酸配列（例えば、表 29 の配列又はその変異体を参照されたい）を含み、C D R は、K a b a t 及び / 又は C h o t h i a に従って定義される通りである。

【0280】

いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質では、T f R 結合送達ドメインは、抗体、抗体断片、又は他の抗原結合タンパク質である。いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質では、T f R 結合送達ドメインは抗原結合タンパク質である。抗原結合タンパク質の例としては、例えば、受容体融合分子、トラップ分子、受容体 - F c 融合分子、抗体、F

a b 断片、F (a b ')₂ 断片、F d 断片、F v 断片、単鎖 F v (s c F v) 分子、d A b 断片、単離相補性決定領域 (C D R)、C D R 3 ペプチド、拘束 F R 3 - C D R 3 - F R 4 ペプチド、ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、C D R 移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ、一価ナノボディ、二価ナノボディ、小モジュラー免疫薬 (S M I P)、ラクダ科抗体 (V H H 重鎖ホモ二量体抗体)、及びサメ可変 I g N A R ドメインが挙げられる。

【0281】

本明細書では、ヒトトランスフェリン受容体 1 に特異的に結合する抗体が提供される。本明細書で使用される「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された 4 つのポリペプチド鎖である 2 つの重鎖 (H C) 及び 2 つの軽鎖 (L C) を含む免疫グロブリン分子を指す。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖 (H C) は、重鎖可変領域 (「H C V R」又は「V_H」) (例えば、配列番号 217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、387、397、407、417、427、437、447、457、467、477、487、497、507、517、及び／又は 527、又はそれらの変異体) 並びに鎖定常領域 (例えば、ヒト I g G、ヒト I g G 1、又はヒト I g G 4)) を含み、各抗体軽鎖 (L C) は、軽鎖可変領域 (「L C V R」又は「V_L」) (例えば、配列番号 222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、382、392、402、412、422、432、442、452、462、472、482、492、502、512、522、及び／又は 532、又はそれらの変異体) 並びに軽鎖定常領域 (例えば、ヒトカッパ又はヒトラムダ) を含む。V_H 及び V_L 領域は、フレームワーク領域 (framework region、F R) と呼ばれるより保存された領域に組み入れられている、相補性決定領域 (complementarity determining region、C D R) と呼ばれる超可変領域に更に細分され得、各 V_H 及び V_L は 3 つの C D R と 4 つの F R を含む。本明細書に開示される抗 T f R 抗体はまた、G A A に融合され得る。

【0282】

本発明の抗 T f R 抗原結合タンパク質は、G A A にテザリングされ得る抗体の抗原結合断片であってもよい。抗体の「抗原結合部分」又は「抗原結合断片」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に結合するが、完全抗体 (好ましくは、完全抗体は I g G である) の配列の全てを含まない免疫グロブリン分子を指す。抗原結合断片の非限定的な例としては、(i) F a b 断片；(i i) F (a b ')₂ 断片；(i i i) F d 断片；(i v) F v 断片；(v) 一本鎖 F v (s c F v) 分子；及び (v i) 抗体 (例えば、C D R 3 ペプチドなどの単離された相補性決定領域 (C D R)) 又は拘束性 F R 3 - C D R 3 - F R 4 ペプチドの超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる d A b 断片が挙げられる。ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、C D R 移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ及び小型モジュール免疫医薬品 (S M I P) などの他の操作された分子も、本明細書で使用される「抗原結合断片」という表現に包含される。

【0283】

抗 T f R 抗原結合タンパク質は、G A A にテザリングされ得る s c F v であり得る。s c F v (一本鎖断片可変) は、重 (V_H) ドメイン及び軽 (V_L) ドメインの可変領域を (いずれかの順序で) 有し、これらは、好ましくは、可撓性リンカー (例えば、ペプチドリンカー) によって一緒に連結される。両方の V 領域を連結するために使用される可撓性リンカーの長さは、ポリペプチド鎖の正確な折り畳みをもたらすために重要であり得る。以前に、ペプチドリンカーは、ドメインが折り畳まれてインタクトな抗原結合部位を形成する能力に影響を及ぼすことなく、可変ドメインのカルボキシ末端と他のドメインのアミノ末端との間に 3.5 nm (35 Å) にわたっていなければならないと推定されている (H u s t o n e t a l . , P r o t e i n e n g i n e e r i n g o f s i n g l e - c h a i n F v a n a l o g s a n d f u s i o n p r o t e i n s

10

20

30

40

50

．Methods in Enzymology．1991；203：46－88）。一実施形態では、リンカーは、可変ドメインを約3．5 nm分離するような長さのアミノ酸配列を含む。

【0284】

抗体の抗原結合断片は、一実施形態では、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズ又はアミノ酸組成のものであってもよく、一般に、1つ以上のフレームワーク配列に隣接するか又はインフレームである少なくとも1つのCDRを含む。V_Lドメインと会合したV_Hドメインを有する抗原結合断片において、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、任意の適切な配置で互いに対して位置し得る。例えば、可変領域は二量体であってもよく、V_H－V_H、V_H－V_L又はV_L－V_L二量体を得る。代替的に、抗体の抗原結合断片は、単量体V_H又はV_Lドメインを含有してもよい。

10

【0285】

「単離された」抗原結合タンパク質（例えば、抗体又はその抗原結合断片）、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及びベクターは、それらが産生される細胞又は細胞培養物からの他の生物学的分子を少なくとも部分的に含まない。そのような生物学的分子には、核酸、タンパク質、他の抗体若しくは抗原結合断片、脂質、炭水化物、又は細胞残屑及び増殖培地などの他の材料が含まれる。単離された抗原結合タンパク質は更に、宿主細胞からの生物学的分子又はその増殖培地などの発現系成分を少なくとも部分的に含まなくてもよい。一般に、「単離された」という用語は、そのような生物学的分子が完全に存在しないこと（例えば、微量又はわずかな量の不純物が残っていてもよい）、又は水、緩衝剤若しくは塩、又は抗原結合タンパク質（例えば、抗体若しくは抗原結合断片）を含む医薬製剤の成分が存在しないことを指すことを意図しない。

20

【0286】

本発明の抗TfR抗原結合タンパク質は、GAAにテザリングされ得るモノクローナル抗体又はモノクローナル抗体の抗原結合断片であり得る。本発明は、モノクローナル抗TfR抗原結合タンパク質、例えば、抗体及びその抗原結合断片、並びに複数の単離されたモノクローナル抗原結合タンパク質を含むモノクローナル組成物を含む。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」又は「mAb」という用語は、実質的に均一な抗体の集団からの抗体を指し、すなわち、集団を含む抗体分子は、少量存在し得る天然に存在する可能性のある変異を除いてアミノ酸配列が同一である。組成物中のこのようなモノクローナル抗体及び断片の「複数」とは、天然に、例えば、マウス又はヒトのような宿主生物の血液中に通常存在する濃度を超える、同一の（すなわち、上記のように、少量で存在し得る可能な天然に存在する変異を除いてアミノ酸配列において）抗体及び断片の濃度をいう。

30

【0287】

ある実施形態では、抗TfR抗原結合タンパク質、例えば、抗体又は抗原結合断片（ペイロードにテザリングされていてもよい）は、例えば、IgA（例えば、IgA1又はIgA2）、IgD、IgE、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）又はIgM型の重鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質、例えば抗体又は抗原結合断片は、例えばカップ又はラムダ型の軽鎖定常ドメインを含む。

40

【0288】

GAAにテザリングされ得るヒト抗TfR抗原結合タンパク質が、本明細書に含まれる。用語「ヒト」抗原結合タンパク質（例えば、抗体又は抗原結合断片）は、本明細書で 사용되는場合、ヒト細胞中にあるか、又は非ヒト細胞（例えば、マウス細胞）に移植されているかにかかわらず、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体及び断片を含む。例えば、米国特許第8502018号、同第6596541号、又は同第5789215号を参照されたい。本発明の抗TfRヒトmAbは、例えばCDR、特にCDR3において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発によって、又はインビボでの体細胞突然変異によって導入された突然変異）を含んでもよ

50

い。しかしながら、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種（例えば、マウス）の生殖系列に由来するCDR配列がヒトFR配列上に移植されているmAbを含むことを意図しない。この用語は、非ヒト哺乳動物において、又は非ヒト哺乳動物の細胞において組換え産生された抗体を含む。この用語は、ヒト対象から直接単離された天然抗体を含むことを意図しない。

【0289】

抗TfRキメラ抗原結合タンパク質、例えば、抗体及びその抗原結合断片（GAAにテザリングされていてもよい）、並びにその使用方法も本明細書に含まれる。本明細書中で使用される場合、「キメラ抗体」は、第1の抗体由来の可変ドメイン及び第2の抗体由来の定常ドメインを有する抗体であり、ここで、第1の抗体及び第2の抗体は、異なる種由来である。（例えば、米国特許第4816567号、及びMorrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855を参照されたい）。

10

【0290】

抗体又はその抗原結合断片（GAAにテザリングされ得る）などの「組換え」抗原結合タンパク質という用語は、例えばDNAスプライシング及びトランスジェニック発現を含む組換えDNA技術として当技術分野で公知の技術又は方法によって作製、発現、単離、又は得られるそのような分子を指す。この用語は、非ヒト哺乳動物（トランスジェニック非ヒト哺乳動物、例えばトランスジェニックマウスを含む）、又は宿主細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）若しくは細胞発現系で発現される抗体、又は組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体を含む。

20

【0291】

ポリペプチドの「変異体」は、本明細書に記載の参照アミノ酸配列（例えば、配列番号217~220、222~225、227~230、232~235、237~240、242~245、247~250、252~255、257~260、262~265、267~270、272~275、277~280、282~285、287~290、292~295、297~300、302~305、307~310、312~315、317~320、322~325、327~330、332~335、337~340、342~345、347~350、352~355、357~360、362~365、367~370、372~375、377~380、382~385、387~390、392~395、397~400、402~405、407~410、412~415、417~420、422~425、427~430、432~435、437~440、442~445、447~450、452~455、457~460、462~465、467~470、472~475、477~480、482~485、487~490、492~495、497~500、502~505、507~510、512~515、517~520、522~525、527~530、532~535、703（任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA（配列番号673）を含まない））、704（任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA（配列番号673）を含まない））、705（任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA（配列番号673）を含まない））、706（任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA（配列番号673）を含まない））；538-573、603~672、又は675~702のいずれか）と少なくとも約70~99.9%（例えば、70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9%）同一又は類似であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを指し、比較がBLASTアルゴリズムによって行われる場合、アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列間で最大の一致を与えるように選択される（例えば、閾値：10；ワードサイズ：3；クエリ範囲内の最大マッチ：0；BLOSUM 62行列；ギャップコスト；存在11，拡張1；条件付き組成スコア行列調整）

30

40

50

及び／又はアミノ酸配列を含むが、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10）の突然変異（例えば、点突然変異、挿入、切断、及び／又は欠失）を有する。好ましくは、機能的GAA外部ドメイン。

【0292】

以下の参考文献は、配列分析にしばしば使用されるBLASTアルゴリズムに関する。BLAST ALGORITHMS: Altschul et al. (2005) FEBS J. 272 (20): 5101-5109; Altschul, S. F., et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W., et al., (1993) Nature Genet. 3: 266-272; Madden, T. L. et al., (1996) Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S. F., et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. et al., (1997) Genome Res. 7: 649-656; Wootton, J. C. et al., (1993) Comput. Chem. 17: 149-163; Hancock, J. M. et al., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10: 67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M. O., et al., 「A model of evolutionary change in proteins.」 in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.; Schwartz, R. M., et al., 「Matrices for detecting distant relationships.」 in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. 「M. O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.; Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol.」, 219: 555-565; States, D. J. et al., (1991) Methods 3: 66-70; Henikoff, S., et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919; Altschul, S. F., et al., (1993) J. Mol. Evol. 36: 290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268; Karlin, S., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877; Dembo, A., et al., (1994) Ann. Prob. 22: 2022-2039; 及び Altschul, S. F. 「Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments.」 in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, N. Y.

【0293】

本発明の一実施形態では、例えばペイロードがヒトGAAである、抗hTfR: ペイロード又は抗hTfR: ペイロード（例えば、scFv、Fab、抗体又はその抗原結合断片フォーマット）は、以下の特徴の1つ以上を示す：

- ・表面プラズモン共鳴フォーマットにおける25℃のヒトTfRへの結合についての親和性（ K_D ）約41 nM又はより高い親和性（例えば、約1若しくは0.1 nM又は約0.18～約1.2 nM、又はそれ以上）；

- ・約0 nMの表面プラズモン共鳴フォーマットにおける25℃のサルTfRへの結合についての親和性（ K_D ）、又はより高い親和性（例えば、約20 nM以上）；。

・表面プラズモン共鳴フォーマットにおける25℃でのサルTfR／ヒトTfRへの結合についての K_D の比0～278（例えば、約17又は18）；

・Fab型（IgG1）である場合、ヒトホローTfへのhTfR（例えば、Hm-m-hTFRC、例えば、REGN2431）の結合を約3、5、10又は13%遮断する、例えば、約45%以下遮断する；

・scFv（V_K-V_H）フォーマットである場合、ヒトホローTfへのhTfR（例えば、Hm-m-hTFRC、例えばREGN2431）結合を約6、8、10、又は13%遮断する、例えば、約45%以下遮断する；

・scFv（V_H-V_L）フォーマットである場合、ヒトホローTfへのhTfR（例えば、Hm-m-hTFRC、例えばREGN2431）結合を約11、17、23又は26%遮断する、例えば、約45%以下遮断する；

・抗hTfRscFv：hGAAフォーマットである場合、HDDを介して分子を投与されたマウス（例えば、Tfrc^{hum}/humノックインマウス）の脳において、約1以上、0.67以上、1.08以上、0.91以上、0.65以上、0.55以上、0.50以上、0.27以上、0.72以上、1.05以上、0.49以上、0.29以上、1.29以上、1.72以上、1.79以上、3.08以上、1.24以上、0.59以上、又は0.47以上（又は約1～2以上）の成熟hGAAタンパク質（陽性対照8D3：GAA scFvのものに対して正規化）の比を示す、又は該scFv：hGAAを投与されたヒトの脳に成熟ヒトGAAタンパク質を送達する；

・抗hTfRscFv：hGAAフォーマットである場合、HDDを介して投与されたマウス、例えば、Tfrc^{hum}/humノックインマウスにおいて、脳実質中の成熟hGAAタンパク質（陽性対照8D3：GAA scFvのものに対して正規化）の約0.44、0.05、1.13又は0.60（約0.1～1.2）の比を示す、又はscFv：hGAAタンパク質を投与されたヒトの脳実質に成熟ヒトGAAタンパク質を送達する；

・抗hTfRscFv：hGAAフォーマットである場合、HDDを介して投与されたマウス（例えば、Tfrc^{hum}/humノックインマウス）における四頭筋中の成熟hGAAタンパク質（陽性対照8D3：GAA scFvのものに対して正規化）の約0.67、1.80、1.78又は7.74（約1～2）の比を示す、又はscFv：hGAAを投与されたヒトの大腿四頭筋又は他の筋肉組織に成熟ヒトGAAタンパク質を送達する；

・抗hTfRscFv：hGAAフォーマットである場合、AAV8肝臓デポを介して投与されたマウス、例えば、Tfrc^{hum}ノックインマウスにおいて、脳実質における成熟hGAAタンパク質（陽性対照8D3：GAA scFvのものに対して正規化）の約0.94、0.49、0.61又は1.90（約0.1～1.2）の比を示す、又はウイルス、例えば、AAV、肝臓デポを介してscFv：hGAAを投与されたヒトの脳実質に成熟ヒトGAAタンパク質を送達するか、又はタンパク質scFv：hGAA融合フォーマットで非経口送達する；

・抗hTfRscFv：hGAAフォーマットである場合、AAV8肝臓デポを介して投与されたマウス（例えば、Tfrc^{hum}ノックインマウス）の血清、肝臓、大脳、小脳、脊髄、心臓及び／又は大腿四頭筋に成熟hGAAタンパク質を送達する、又はウイルス、例えば、AAV、肝臓デポを介してscFv：hGAAを投与されたヒトの血清、肝臓、大脳、小脳、脊髄、心臓及び／又は大腿四頭筋に成熟ヒトGAAタンパク質を送達するか、又はタンパク質scFv：hGAA融合フォーマットで非経口送達する；

・抗hTfRscFv：hGAAフォーマットである場合、AAV8肝臓デポを介して投与されたマウス（例えば、Tfrc^{hum}ノックインマウス）の大脳、小脳、脊髄、心臓及び／又は大腿四頭筋に貯蔵されたグリコーゲンを、例えば、少なくとも75%から95%超若しくは99%超低減する、又はウイルス、例えば、AAV、肝臓デポを介してscFv：hGAAを投与された、又はタンパク質scFv：hGAA融合フォーマットで非経口送達されたヒトの大脳、小脳、脊髄、心臓及び／又は大腿四頭筋に貯蔵されたグリ

10

20

30

40

50

コーゲンを低減する；

・肝臓デポ AAV8 抗 hTFRC scfv : hGAA (例えば、4e11vg/kg AAV8) で処置された Gaa^{-/-}/TFRC^{hum}マウスの組織 (例えば、小脳におけるグリコーゲンレベルを、未処置 Gaa^{-/-}/TFRC^{hum}マウスと比較して少なくとも約 90% (例えば、約 95% 以上) 低減する；

・融合タンパク質は、肝臓デポ AAV8 抗 hTFRC scfv : hGAA (例えば、4e11vg/kg AAV8) で処置した Gaa^{-/-}/TFRC^{hum}マウスの組織 (例えば、大腿四頭筋) におけるグリコーゲンレベルを、未処置 Gaa^{-/-}/TFRC^{hum}マウスと比較して少なくとも約 89% (例えば、約 90% 又は 91% 又はそれ以上) 低減する、又は例えば、融合タンパク質の非経口的送達によって融合物で処置したヒトのグリコーゲンレベルを低減する、

・(例えば、HDD 又は AAV8 エピソーム肝臓デポにより) TFRC^{hum}マウスに投与された場合、又は例えば、融合タンパク質の非経口送達により、ヒトに投与された場合、異常な鉄ホメオスタシスを引き起こさない、例えば、マウスが、正常な血清、心臓、肝臓、及び/又は脾臓鉄レベル、正常な総鉄結合能 (TIBC)、及び/又は正常なヘプシジンレベルを維持する；

・例えば、AAV8 ベクターにおいて、対象 (例えば、ヒト又は Gaa^{-/-}/TFRC^{hum}/hum マウス) に (例えば、アルブミン遺伝子座に) 染色体的に挿入される、又はエピソーム的に送達される場合、融合体をコードする DNA は、血清、肝臓、大脳及び/又は大腿四頭筋への成熟ヒト GAA の発現を引き起こす；

・例えば、AAV8 ベクターにおいて、染色体に挿入された場合 (例えば、アルブミン遺伝子座へ) 又は (例えば、ヒトに対して、又は Gaa^{-/-}/TFRC^{hum}/hum マウスへ) エピソーム的に挿入される場合、融合物をコードする DNA は、大脳及び/又は四頭筋におけるグリコーゲンレベルを低下させる。

*TFRC^{hum} 又は TFRC^{hum}/hum は、ホモ接合ノックインマウスである。

【0294】

本明細書に開示される融合体の抗ヒトトランスフェリン受容体抗原結合タンパク質におけるドメインのアミノ酸配列を、以下の表 29 に要約する。例えば、GAA に融合された、表 29 の分子の HCVR 及び LCVR を含む、又はその CDR を含む、抗ヒトトランスフェリン受容体 1 抗体及びその抗原結合断片 (例えば、scFv 及び Fab) が、本明細書に開示される。

【0295】

論じられるように、抗 hTfR : GAA scFv 融合タンパク質 (例えば、31874B、31863B、69348、69340、69331、69332、69326、69329、69323、69305、69307、12795B、12798B、12799B、12801B、12802B、12808B、12812B、12816B、12833B、12834B、12835B、12847B、12848B、12843B、12844B、12845B、12839B、12841B、12850B、69261、又は 69263) は、scFv に連結され (例えば、リンカーによって任意選択的に連結された VL 及び VH を含む)、任意選択のリンカーに連結され、GAA に連結された任意選択のシグナルペプチドを含む。例えば、任意のシグナル・ペプチドは、(例えば、アミノ酸 MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA (配列番号 673) からなる) ハツカネズミ Ror1 由来のシグナル・ペプチドであり得る。

【0296】

特定のマルチドメイン治療用タンパク質において、TfR 結合送達ドメインは、抗 TfR scFv である。例えば、scFv は、リンカーによって任意選択的に接続された VL 及び VH を含む得る。

【0297】

一例では、抗 hTfR scFv は、(i) 配列番号 217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347

10

20

30

40

50

、357、367、377、387、397、407、417、427、437、447、457、467、477、487、497、507、517、若しくは527に記載のアミノ酸配列を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、及び／又は(ii)配列番号222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、382、392、402、412、422、432、442、452、462、472、482、492、502、512、522、又は532に記載のアミノ酸配列を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0298】

別の例では、抗TfR s c Fvは、(1)配列番号217に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号222に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(2)配列番号227に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号232に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(3)配列番号237に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号242に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(4)配列番号247に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号252に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(5)配列番号257に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号262に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(6)配列番号267に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号272に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(7)配列番号277に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号282に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(8)配列番号287に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号292に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(9)配列番号297に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号302に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(10)配列番号307に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号312に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(11)配列番号317に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号322に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(12)配列番号327に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号332に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含むLCVR、(13)配列番号337に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号342に記載のアミノ酸

10

20

30

40

50

50

配列（又はその変異体）を含むH C V RのH C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号5 0 2に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V RのL C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含むL C V R、（3 0）配列番号5 0 7に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V RのH C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号5 1 2に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V RのL C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含むL C V R、（3 1）配列番号5 1 7に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V RのH C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号5 2 2に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V RのL C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含むL C V R、（3 2）配列番号5 2 7に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V RのH C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号5 3 2に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V RのL C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含むL C V R、を含み得る。変異体は、本明細書に記載の参照アミノ酸配列と少なくとも約7 0～9 9 . 9 %（例えば、7 0、7 2、7 4、7 5、7 6、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、9 9 . 5、9 9 . 9 %）同一又は類似であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

10

【0 2 9 9】

別の例では、抗T f R s c F vは、（a）配列番号2 1 8に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 1、配列番号2 1 9に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 2、及び配列番号2 2 0に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号2 2 3に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 1、配列番号2 2 4に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 2、及び配列番号2 2 5に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 3を含むL C V R、（b）配列番号2 2 8に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 1、配列番号2 2 9に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 2、及び配列番号2 3 0に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号2 3 3に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 1、配列番号2 3 4に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 2、及び配列番号2 3 5に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 3を含むL C V R、（c）配列番号2 3 8に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 1、配列番号2 3 9に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 2、及び配列番号2 4 0に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号2 4 3に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 1、配列番号2 4 4に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 2、及び配列番号2 4 5に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 3を含むL C V R、（d）配列番号2 4 8に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 1、配列番号2 4 9に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 2、及び配列番号2 5 0に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号2 5 3に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 1、配列番号2 5 4に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 2、及び配列番号2 5 5に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 3を含むL C V R、（e）配列番号2 5 8に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 1、配列番号2 5 9に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 2、及び配列番号2 6 0に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 3を含むH C V R、並びに配列番号2 6 3に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 1、配列番号2 6 4に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 2、及び配列番号2 6 5に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C D R 3を含むL C V R、（f）配列番号2 6 8に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 1、配列番号2 6 9に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C D R 2、及び配列番号2 7 0に記載のアミノ酸配列

20

30

40

50

50

50

50

その変異体)を含むLCDR3を含むLCVR、及び／又は(a f)配列番号528に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCDR1、配列番号529に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCDR2、及び配列番号530に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCDR3を含むHCVR、並びに配列番号533に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCDR1、配列番号534に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCDR2、及び配列番号535に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR3を含むLCVRを含み得る。変異体は、本明細書に記載の参照アミノ酸配列と少なくとも約70~99.9%(例えば、70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9%)同一又は類似であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

10

【0300】

別の例では、抗TfR s c F vは、(i)配列番号217に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号222に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(i i)配列番号227に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号232に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(i i i)配列番号237に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号242に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(i v)配列番号247に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号252に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(v)配列番号257に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号262に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(v i)配列番号267に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号272に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(v i i)配列番号277に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号282に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(v i i i)配列番号287に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号292に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(i x)配列番号297に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号302に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x)配列番号307に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号312に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x i)配列番号317に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号322に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x i i)配列番号327に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号332に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x i i i)配列番号337に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号342に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x i v)配列番号347に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号352に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x v)配列番号357に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号362に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x v i)配列番号367に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号372に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x v i i)配列番号377に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号382に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x v i i i)配列番号387に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号392に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x i x)配列番号397に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号402に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x x)配列番号407に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むHCVR、及び配列番号412に記載のアミノ酸配列(又はその変異体)を含むLCVR、(x x i)配列番号4

20

30

40

50

17に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号422に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x i i）配列番号427に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号432に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x i i i）配列番号437に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号442に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x i v）配列番号447に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号452に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x v）配列番号457に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号462に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x v i）配列番号467に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号472に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x v i i）配列番号477に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号482に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x v i i i）配列番号487に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号492に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x i x）配列番号497に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号502に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x x）配列番号507に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号512に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、（x x x i）配列番号517に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号522に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V R、及び／又は（x x x i i i）配列番号527に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むH C V R、及び配列番号532に記載のアミノ酸配列（又はその変異体）を含むL C V Rを含み得、任意選択的に、H C V R及びL C V Rは、リンカーによって連結されている（例えば、アミノ酸配列、例えば、長さが約10アミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、8、又は10回反復のG l y₄ S e r（配列番号600）を含む）。変異体は、本明細書に記載の参照アミノ酸配列と少なくとも約70～99.9%（例えば、70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9%）同一又は類似であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

10

20

30

40

50

【0301】

抗T f R s c F vをコードするポリヌクレオチドの例は、表29に提供され、（1）配列番号216に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号221に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（2）配列番号226に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号231に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（3）配列番号236に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号241に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（4）配列番号246に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号251に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（5）配列番号256に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号261に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（6）配列番号266に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号271に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（7）配列番号276に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号281に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（8）配列番号286に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号291に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（9）配列番号296に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号301に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポリヌクレオチド、（10）配列番号306に記載のヌクレオチド配列を含むH C V R、及び配列番号311に記載のヌクレオチド配列を含むL C V Rをコードするポ

リヌクレオチド、(11)配列番号316に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号321に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(12)配列番号326に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号331に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(13)配列番号336に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号341に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(14)配列番号346に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号351に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(15)配列番号356に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号361に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(16)配列番号366に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号371に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(17)配列番号376に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号381に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(18)配列番号386に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号391に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(19)配列番号396に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号401に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(20)配列番号406に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号411に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(21)配列番号416に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号421に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(22)配列番号426に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号431に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(23)配列番号436に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号441に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(24)配列番号446に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号451に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(25)配列番号456に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号461に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(26)配列番号466に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号471に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(27)配列番号476に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号481に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(28)配列番号486に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号491に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(29)配列番号496に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号501に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(30)配列番号506に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号511に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(31)配列番号516に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号521に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、(32)配列番号526に記載のヌクレオチド配列を含むHCVR、及び配列番号531に記載のヌクレオチド配列を含むLCVRをコードするポリヌクレオチド、を含み、HCVR及びLCVRはいずれかの順序である。

【0302】

一実施形態では、 $V_L - (Gly_4Ser)_3 - V_H$ フォーマット(Gly_4Ser = 配列番号600)の抗hTfR scFvは、538~569のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。また、 $V_H - (Gly_4Ser)_3 - V_L$ (Gly_4Ser = 配列番号600)フォーマットのそのような融合物も企図される。

【0303】

別の例では、TfR結合送達ドメインは、Fab断片(例えば、ヒトトランスフェリン受容体に特異的に結合する)であり得る。Fab断片は、典型的には、1つの完全軽鎖V

10

20

30

40

50

L 及び定常軽鎖ドメイン、例えば、カップ（例えば、RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号601））及びV_H及びIgG1 CH1部分（例えば、ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSLVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH（配列番号602））又は1つの重鎖のIgG4 CH1（例えば、ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSLVVTVPPSSSLGTQTYTCNVLDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPLLQGS（配列番号674））を含む。Fab断片抗体は、ヒンジ領域を含む全Fc断片を除去するための全IgG抗体のパパイン消化によって生成され得る。一例では、Fabタンパク質は、（1）配列番号217に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号222に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（2）配列番号227に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号232に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（3）配列番号237に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号242に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（4）配列番号247に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号252に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（5）配列番号257に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号262に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（6）配列番号267に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号272に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（7）配列番号277に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号282に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（8）配列番号287に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号292に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域（LCVR）；（9）配列番号297に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）、又はCH1ドメインに連結されるこのようなHCVRのHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号302に記載のアミノ酸配列、又はCLドメインに連結されるこのようなLCVRのLCDR1、LCD

10

20

30

40

50

50

50

【0304】

一例では、F a b タンパク質は、（１）配列番号 6 0 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 0 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（3 1 8 7 4 B）、（２）配列番号 6 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 0 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（3 1 8 6 3 B）、（３）配列番号 6 0 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 0 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 4 8）、（４）配列番号 6 0 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 1 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 4 0）、（５）配列番号 6 1 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 1 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 3 1）、（６）配列番号 6 1 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 1 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 3 2）、（７）配列番号 6 1 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 1 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 2 6）、（８）配列番号 6 1 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 1 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 2 9）、（９）配列番号 6 1 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 2 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 2 3）、（１０）配列番号 6 2 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 2 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 0 5）、（１１）配列番号 6 2 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 2 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 3 0 7）、（１２）配列番号 6 2 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 2 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 7 9 5 B）、（１３）配列番号 6 2 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 2 8 又は配列番号 6 6 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 7 9 8 B）、（１４）配列番号 6 2 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 3 0 又は配列番号 6 6 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 7 9 9 B）、（１５）配列番号 6 3 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 3 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 0 1 B）、（１６）配列番号 6 3 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 3 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 0 2 B）、（１７）配列番号 6 3 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 3 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 0 8 B）、（１８）配列番号 6 3 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 3 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 1 2 B）、（１９）配列番号 6 3 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 4 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 1 6 B）、（２０）配列番号 6 4 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 4 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 3 3 B）、（２１）配列番号 6 4 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 4 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 3 4 B）、（２２）配列番号 6 4 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 4 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 3 5 B）、（２３）配列番号 6 4 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 4 8 又は配列番号 6 4 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 4 7 B）、（２４）配列番号 6 4 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 5 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 4 8 B）、（２５）配列番号 6 5 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 5 2 又は配列番号 6 7 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 4 3 B）、（２６）配列番号 6 5 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 5 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 4 4 B）、（２７）配列番号 6 5 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 5 6 又は配列番号 6 7 1 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 4 5 B）、（２８）配列番号 6 5 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 5 8 又は配列番号 6 7 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 3 9 B）、（２９）配列番号 6 5 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 6 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 4 1 B）、（３０）配列番号 6 6 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 6 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（1 2 8 5 0 B）、（３１）配列番号 6 6 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 6 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖（6 9 2 6 1）、又は（３２）配列番号 6 6 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び配列番号 6 6 6 に記載のアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含む重鎖（69263）を含み得る。

【0305】

「31874B」、「31863B」、「69348」、「69340」、「69331」、「69332」、「69326」、「69329」、「69323」、「69305」、「69307」、「12795B」、「12798B」、「12799B」、「12801B」、「12802B」、「12808B」、「12812B」、「12816B」、「12833B」、「12834B」、「12835B」、「12847B」、「12848B」、「12843B」、「12844B」、「12845B」、「12839B」、「12841B」、「12850B」、「69261」、及び「69263」は、配列番号222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、382、392、402、412、422、432、442、452、462、472、482、492、502、512、522、又は532（又はその変異体）に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、387、397、407、417、427、437、447、457、467、477、487、497、507、517、又は527（又はその変異体）に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを含む、抗TfR：GAA融合タンパク質、例えば、抗TfR scFv：GAA又は抗TfR Fab：GAAを指し、これらは、scFvの場合には、例えば、ペプチドリinker（例えば、（G₄S）₃）（G₄S＝配列番号600）によって、（いずれかの順序で）一緒に融合され得、又はそのCDR（CDR-H1（又はその変異体）、CDR-H2（又はその変異体）、及びCDR-H3（又はその変異体））を含むV_H、及び／又はそのCDR（CDR-L1（又はその変異体）、CDR-L2（又はその変異体）、及びCDR-L3（又はその変異体））を含むV_Lを含み、scFvの場合、V_Lに融合されるV_H又はV_Hに融合されるV_Lは、例えば、ペプチドリinker（例えば（G₄S）₂（G₄S＝配列番号600））によってGAAと一緒に融合され得る。

【0306】

本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、コドン最適化（例えば、ヒトコドンへの）、CpGジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、1つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの1つ以上の修飾を含み得る。構築物中のCpGジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化CpGジヌクレオチドは、宿主トール様受容体9（TLR-9）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激し得る。第二に、CpGジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル-CpG結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの突然変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーRNA中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

【0307】

一例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、1つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されている（すなわち、CpG枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されている（すなわち、完全にCpG枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物に

おける発現のためにコドン最適化されている)。具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のCDTfR63結合送達ドメインコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており(すなわち、CpG枯渇している)、1つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており、1つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており(すなわち、CpG枯渇している)、コドン最適化されている(例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている)。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のTfR結合送達ドメインコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており(すなわち、完全にCpG枯渇している)、コドン最適化されている(例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている)。

10

20

30

40

50

【0308】

様々な抗TfR scFvコード配列が提供される。一例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号538~569のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号538~569のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号538~569のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号538~569のいずれかに記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号538~569のいずれかに記載の配列から本質的になる抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号538~569のいずれかに記載の配列からなる抗TfR scFvタンパク質をコードする。

【0309】

様々な抗TfR scFvコード配列が提供される。一例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号587~599のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号587~599のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号587~599のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号587~599のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号587~599のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号587~599のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに対して少なくとも90%

、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに記載の配列から本質的になる抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540、549、551、及び554のいずれかに記載の配列からなる抗TfR s c F vタンパク質をコードする。

10

20

【0310】

様々な抗TfR s c F vコード配列が提供される。一例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593～595及び599のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593～595及び599のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593～595及び599のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593～595及び599のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593～595及び599のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例

30

40

50

における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 5 4 に記載の配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 5 4 に記載の配列からなる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

【0311】

様々なコドン最適化抗 T f R s c F v コード配列が提供される。抗 T f R s c F v コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、C p G 枯渇しており（例えば、完全に C p G 枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7～5 9 5 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7～5 9 5 のいずれかに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7～5 9 5 のいずれかに対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7～5 9 5 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7～5 9 5 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7～5 9 5 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0、5 4 9、5 5 1、及び 5 5 4 のいずれかに記載の配列からなる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

【0312】

様々なコドン最適化抗 T f R s c F v コード配列が提供される。抗 T f R s c F v コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、C p G 枯渇しており（例えば、完全に C p G 枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 3～5 9 5 のいずれかに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5

%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593～595のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593～595のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593～595のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593～595のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593～595のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗TfRscFvコード配列は、配列番号554に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfRscFvタンパク質（又は配列を含む抗TfRscFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfRscFvコード配列は、配列番号554に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfRscFvタンパク質（又は配列を含む抗TfRscFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfRscFvコード配列は、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfRscFvタンパク質（又は配列を含む抗TfRscFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfRscFvコード配列は、配列番号554に記載の配列を含む抗TfRscFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfRscFvコード配列は、配列番号554に記載の配列から本質的になる抗TfRscFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfRscFvコード配列は、配列番号554に記載の配列からなる抗TfRscFvタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0313】

一例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfRscFvタンパク質（又は配列を含む抗TfRscFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に記載の配列を含む抗TfRscFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、別の例では、抗TfRscFvコード配列は、配列番号593に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又

は配列を含み)、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質(又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質)をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質(又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質)をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列を含む。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に記載の配列からなる。抗TfRコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗TfR s c F vコード配列は、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質(又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質(又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質(又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列から本質的になる抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列からなる抗TfR s c F vタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0314】

一例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F

vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号593に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に記載の配列を含む。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号594に記載の配列からなる。抗TfRコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗TfR s c F vコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列から本質的になる抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号554に記載の配列からなる抗TfR s c F vタンパク質をコードす

10

20

30

40

50

る。

【0315】

一例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に記載の配列を含む。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号595に記載の配列からなる。抗TfRコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗TfR scFvコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号554に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号554に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%

10

20

30

40

50

、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号554に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号554に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号554に記載の配列から本質的になる抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号554に記載の配列からなる抗TfR scFvタンパク質をコードする。

10

【0316】

様々なコドン最適化抗TfR scFvコード配列が提供される。抗TfR scFvコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、CpG枯渇しており（例えば、完全にCpG枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590～592のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590～592のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590～592のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590～592のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590～592のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590～592のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に記載の配列から本質的になる抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に記載の配列からなる抗TfR scFvタンパク質をコードする。

20

30

40

【0317】

一例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも90

50

%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号551に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号551に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号551に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。配列番号551に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号551に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号551に記載される配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に記載の配列を含む。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号590に記載の配列からなる。抗TfRコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗TfR scFvコード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号551に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質（又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR sc

10

20

30

40

50

F v コード配列は、配列番号 5 5 1 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 5 1 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 5 1 に記載の配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 5 1 に記載の配列からなる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

【 0 3 1 8 】

一例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 5 5 1 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 5 5 1 に記載される配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 5 5 1 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 5 5 1 に記載される配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 5 5 1 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に記載の配列を含む。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 9 1 に記載の配列からなる。抗 T f R コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗 T f R s c F v コード配列は、C p

10

20

30

40

50

G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に記載される配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に記載される配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に記載される配列からなる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

10

20

【0319】

一例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 551 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 551 に記載される配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 551 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 551 に記載される配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 99 %、

30

40

50

少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 551 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 551 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に記載の配列を含む。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 592 に記載の配列からなる。抗 T f R コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗 T f R s c F v コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に記載される配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に記載される配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 551 に記載される配列からなる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

【0320】

様々なコドン最適化抗 T f R s c F v コード配列が提供される。抗 T f R s c F v コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、C p G 枯渇しており（例えば、完全に C p G 枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 587～589 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 587～589 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 587～589 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 587～589 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 587～589 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 587～589 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92

10

20

30

40

50

%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする（かつ例えば、TfR結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540に記載の配列から本質的になる抗TfR s c F vタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR s c F vコード配列は、配列番号540に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。

10

【0321】

一例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号540に記載される配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号540に記載の配列を含む抗TfR s c F vタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗TfR s c F vコード配列は、配列番号587に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR s c F vタンパク質（又は配列を含む抗TfR s c F vタンパク質）をコードする。別の例で

20

30

40

50

は、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 5 4 0 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7 に記載の配列を含む。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 7 に記載の配列からなる。抗 T f R コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗 T f R s c F v コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0 に記載の配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 4 0 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【 0 3 2 2 】

一例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 8 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 8 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 5 4 0 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 8 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 5 4 0 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 8 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 5 8 8 に対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 5 4 0 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、又は 1 0 0 % 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F

vタンパク質)をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号588に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号540に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号588に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号588に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号588に記載の配列を含む。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号588に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号588に記載の配列からなる。抗TfRコード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗TfR scFvコード配列は、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号540に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、抗TfR scFvコード配列は、配列番号540に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする(かつ例えば、TfR結合活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号540に記載の配列を含む抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号540に記載の配列から本質的になる抗TfR scFvタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗TfR scFvコード配列は、配列番号540に記載の配列からなる抗TfR scFvタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0323】

一例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号589に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号589に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号540に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である抗TfR scFvタンパク質(又は配列を含む抗TfR scFvタンパク質)をコードする。別の例では、抗TfR scFvコード配列は、配列番号589に対して少なくとも90%、少な

くとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 540 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 540 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 540 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 540 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 540 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に記載の配列を含む。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に記載の配列から本質的になる。別の例では、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 589 に記載の配列からなる。抗 T f R コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、抗 T f R s c F v コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である抗 T f R s c F v タンパク質（又は配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質）をコードする（かつ例えば、T f R 結合活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に記載の配列を含む抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に記載の配列から本質的になる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における抗 T f R s c F v コード配列は、配列番号 540 に記載の配列からなる抗 T f R s c F v タンパク質をコードする。

【0324】

10

20

30

40

50

特定の抗TfR s c F v又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される抗TfR s c F v又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が仮定配列5' - C T G G A C C G A - 3' からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体(5' - T C G G T C C A G - 3')を包含することを意味する。同様に、構築物要素が特定の5' から3' への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。この理由の1つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、抗TfR s c F v又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が一本鎖組換えAAVベクターの一部であることである。一本鎖AAVゲノムは、センス(プラス鎖)又はアンチセンス(マイナス鎖ゲノム)のいずれかとしてパッケージされ、+及び-極性の一本鎖AAVゲノムは、等しい頻度で成熟rAAVビリオンにパッケージされる。例えば、L I N G e t a l . (2 0 1 5) J . M o l . G e n e t . M e d . 9 (3) : 1 7 5、Z h o u e t a l . (2 0 0 8) M o l . T h e r . 1 6 (3) : 4 9 4 - 4 9 9、及びS a m u l s k i e t a l . (1 9 8 7) J . V i r o l . 6 1 : 3 0 9 6 - 3 1 0 1を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0325】

(2) 双方向性構築物

本明細書に開示される核酸構築物は、双方向性構築物であり得る。そのような双方向性構築物は、コードされた目的のポリペプチドの増強された挿入及び発現を可能にし得る。本明細書に記載のヌクレアーゼ剤(例えば、C R I S P R / C a s系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Z F N)系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)系)と組み合わせて使用される場合、核酸構築物の双方向性は、構築物が標的ゲノム遺伝子座内のいずれかの方向に挿入されることを可能にし(すなわち、一方向の挿入に限定されない)、いずれかの配向で挿入された場合に目的のポリペプチドの発現を可能にし、それによって、本明細書に例示されるように、発現効率を増強する。

20

【0326】

本明細書に開示される双方向性構築物は、少なくとも2つの核酸セグメントを含み得、第1のセグメントは、目的のポリペプチドの第1のコード配列を含み、第2のセグメントは、目的のポリペプチドの第2のコード配列の逆相補体を含むか、又はその逆である。しかしながら、本明細書に開示される他の双方向性構築物は、少なくとも2つの核酸セグメントを含み得、第1のセグメントは、目的のポリペプチドのコード配列を含み、第2のセグメントは、別のタンパク質についてのコード配列の逆相補体を含むか、又はその逆である。逆相補体は、参照配列の相補体配列である配列を指し、相補体配列は逆向きに書かれている。例えば、仮定配列5' - C T G G A C C G A - 3' について、完全相補体配列は3' - G A C C T G G C T - 5' であり、完全逆相補体配列は5' - T C G G T C C A G - 3' と書かれる。逆相補体配列は完全である必要はなく、それでも参照配列と同じポリペプチド又は類似のポリペプチドをコードし得る。コドン使用冗長性のために、逆相補体は、同じポリペプチドをコードする参照配列から分岐し得る。コード配列は、任意選択的に、目的のポリペプチド又は他のタンパク質に連結されたシグナル配列、標識配列(例えば、H i B i t)、又は異種機能的配列(例えば、核局在化配列(nuclear localization signal、N L S)又は自己切断ペプチド)などのアミノ末端又はカルボキシ末端アミノ酸配列をコードする配列などの、1つ以上の追加の配列を含み得る。

30

40

【0327】

特定の双方向性構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される双方向性構築物が仮定配列5' - C T G G A C C G A - 3' からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体(5' - T C G G T C C A G - 3')を包含することを意味する。同様に、双方向性構築物要素が特定の5' から3' への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。例えば、5' から3' に、第

50

1 のスプライスアクセプター、第 1 のコード配列、第 1 のターミネーター、第 2 のターミネーターの逆相補体、第 2 のコード配列の逆相補体、及び第 2 のスプライスアクセプターの逆相補体を含む双方向性構築物が本明細書に開示される場合、それはまた、5' から 3' に、第 2 のスプライスアクセプター、第 2 のコード配列、第 2 のターミネーター、第 1 のターミネーターの逆相補体、第 1 のコード配列の逆相補体、及び第 1 のスプライスアクセプターの逆相補体を含む構築物を包含することを意味する。この理由の 1 つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、双方向性構築物が一本鎖組換え AAV ベクターの一部であることである。一本鎖 AAV ゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+ 及び - 極性の一本鎖 AAV ゲノムは、等しい頻度で成熟 r AAV ビリオンにパッケージされる。例えば、Ling et al. (2015) J. Mol. Genet. Med. 9 (3) : 175、Zhou et al. (2008) Mol. Ther. 16 (3) : 494-499、及び Samulski et al. (1987) J. Virol. 61 : 3096-3101 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0328】

少なくとも 2 つのセグメントが両方とも目的のポリペプチドをコードする場合、少なくとも 2 つのセグメントは、同じ目的のポリペプチド又は目的のポリペプチドタンパク質をコードし得る。異なる目的のポリペプチドは、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は少なくとも約 99.5% 同一であり得る。例えば、第 1 のセグメントは、野生型ポリペプチド若しくはその断片をコードし得、第 2 のセグメントは、目的のポリペプチド若しくはその断片の変異体をコードし得るか、又はその逆である。代替的に、第 1 のセグメントは、第 1 の変異体ポリペプチドをコードし得、第 2 のセグメントは、第 1 の変異体ポリペプチドとは異なる第 2 の変異体ポリペプチドをコードし得る。好ましくは、2 つのセグメントは、同じ目的のポリペプチド（すなわち、100% 同一）をコードする。

20

【0329】

2 つのセグメントが同じ目的のポリペプチドをコードする場合であっても、第 1 のセグメント中の目的のポリペプチドのコード配列は、第 2 のセグメント中の目的のポリペプチドのコード配列と異なり得る。いくつかの双方向性構築物では、第 1 のコード配列でのコドン使用は、第 2 のコード配列でのコドン使用と同じである。他の双方向性構築物では、ヘアピン形成を低減するために、第 2 のコード配列は、第 1 のコード配列のコドン使用とは異なるコドン使用を採用する。コード配列の一方又は両方は、宿主細胞での発現のためにコドン最適化され得る。いくつかの双方向性構築物では、コード配列のうちの 1 つのみがコドン最適化されている。いくつかの双方向性構築物では、第 1 のコード配列がコドン最適化されている。いくつかの双方向性構築物では、第 2 のコード配列がコドン最適化されている。いくつかの双方向性構築物では、両方のコード配列がコドン最適化されている。例えば、第 2 の目的のポリペプチドコード配列は、コドン最適化され得る、又は第 1 のセグメントにおける目的のポリペプチドのコード配列によってコードされる同じ目的のポリペプチド（すなわち、同じアミノ酸配列）の 1 つ以上のアミノ酸に対して 1 つ以上の代替コドンを使用してもよい。代替コドンは、本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

30

40

【0330】

一例では、第 2 のセグメントは、ヘアピン形成を低減させるために、第 1 のセグメントにおける目的のポリペプチドコード配列のコドン使用とは異なるコドン使用を採用する目的のポリペプチドコード配列の逆相補体を含む。そのような逆相補体は、第 1 のセグメントにおけるコード配列の全てのヌクレオチドよりも少ない塩基対を形成するが、任意選択的に同じポリペプチドをコードする。一例では、第 2 のセグメントにおける逆相補体配列

50

は、第1のセグメントにおけるコード配列に対して実質的に相補的ではない（例えば、70%以下相補的）。しかしながら、他の場合、第2のセグメントは、第1のセグメントにおけるコード配列に対して非常に相補的（例えば、少なくとも90%相補的）である逆相補体配列を含む。

【0331】

第2のセグメントは、第1のセグメントに対して任意のパーセンテージの相補性を有することができる。例えば、第2のセグメント配列は、第1のセグメントに対する少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、又は少なくとも約99%の相補性を有することができる。別の例として、第2のセグメント配列は、第1のセグメントに対して約30%未満、約35%未満、約40%未満、約45%未満、約50%未満、約55%未満、約60%未満、約65%未満、約70%未満、約75%未満、約80%未満、約85%未満、約90%未満、約95%未満、約97%未満、又は約99%未満の相補性を有し得る。いくつかの核酸構築物では、第2のコード配列の逆相補体は、第1のコード配列に実質的に相補的ではなく（例えば、70%以下相補的）、第1のコード配列の断片に実質的に相補的ではなく、第1のコード配列に高度に相補的であり（例えば、少なくとも90%相補的）、第1のコード配列の断片に高度に相補的であり、第1のコード配列の逆相補体に対して約50%～約80%同一であるか、又は第1のコード配列の逆相補体に対して約60%～約100%同一であり得る。

10

20

【0332】

本明細書に開示される双方向性構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は1つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むように修飾され得る。例えば、本明細書に開示される双方向性核酸構築物は、ホモロジーアームを含む必要はなく、及び／又は例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。核酸構築物の双方向性機能に部分的に起因して、双方向性構築物は、目的のポリペプチドの効率的な挿入及び／又は発現を可能にするために、本明細書に記載されるようにいずれかの方向でゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【0333】

場合によっては、双方向性核酸構築物は、目的のポリペプチドの発現を駆動するプロモーターを含まない。例えば、目的のポリペプチドの発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のALB遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ALBプロモーター）によって駆動され得る。他の場合、双方向性核酸構築物は、目的のポリペプチドのコード配列に作動可能に連結された1つ以上のプロモーターを含み得る。すなわち、発現に必要なではないが、本明細書に開示される構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び／又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。いくつかの双方向性構築物は、第1の目的のポリペプチドのコード配列の発現を駆動するプロモーター、及び／又は第2の目的のポリペプチドのコード配列の逆相補体の発現を駆動するプロモーターの逆相補体を含み得る。

30

40

【0334】

本明細書に開示される双方向性構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は1つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むか、又は除外するように修飾され得る。例えば、本明細書に開示されるいくつかの双方向性核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。核酸構築物の双方向性機能に部分的に起因して、双方向性構築物は、目的のポリペプチドの効率的な挿入及び／又は発現を可能にするために、本明細書に記載されるようにいずれかの方向（配向）でゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【0335】

双方向性構築物は、場合によっては、1つ以上（例えば、2つ）のポリアデニル化テ

50

ル配列又はポリアデニル化シグナル配列を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、ポリアデニル化シグナル配列を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第2のセグメントは、ポリアデニル化シグナル配列を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、第1のポリアデニル化シグナル配列を含み得、第2のセグメントは、第2のポリアデニル化シグナル配列（例えば、ポリアデニル化シグナル配列の逆相補体）を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、第1のコード配列の3'に位置する第1のポリアデニル化シグナル配列を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第2のセグメントは、第2のコード配列の逆相補体の5'に位置する第2のポリアデニル化シグナル配列の逆相補体を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、第1のコード配列の3'に位置する第1のポリアデニル化シグナル配列を含み得、第2のセグメントは、第2のコード配列の逆相補体の5'に位置する第2のポリアデニル化シグナル配列の逆相補体を含み得る。第1のポリアデニル化シグナル配列と第2のポリアデニル化シグナル配列は、同じであっても異なってもよい。一例では、第1のポリアデニル化シグナルと第2のポリアデニル化シグナルは異なっている。具体的な例では、第1のポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス40（SV40）後期ポリアデニル化シグナル（若しくはその変異体）であり、第2のポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化シグナル（若しくはその変異体）である、又はその逆である。例えば、一方のポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナルであり得、他方のポリアデニル化シグナルは、BGHポリアデニル化シグナルであり得る。具体的な例では、一方のポリアデニル化シグナルは、配列番号161を含み得、それから本質的になり得、又はそれからなり得、他方のポリアデニル化シグナルは、配列番号162を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

10

20

30

40

50

【0336】

いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメント及び第2のセグメントの両方は、ポリアデニル化テール配列を含む。好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は、既知である。例えば、いくつかの双方向性構築物では、第1及び第2のセグメントの一方又は両方は、オープンリーディングフレームの下流にポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列（すなわち、コード配列の3'のポリアデニル化テール配列及び／若しくはポリアデニル化シグナル配列、又はコード配列の逆相補体の5'のポリアデニル化テール配列及び／若しくはポリアデニル化シグナル配列の逆相補体）を含む。ポリアデニル化テール配列は、例えば、第1のセグメント及び／又は第2のセグメントにおける目的のポリペプチドコード配列（又は他のタンパク質コード配列）の下流の「ポリA」ストレッチとしてコードされ得る。ポリAテールは、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、又は100個のアデニン、及び任意選択的に最大300個のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリAテールは、95、96、97、98、99、又は100個のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列AAUAAAは哺乳動物系において一般的に使用されるが、UAUAAA又はAU/GUAAAなどの変異体が同定されている。例えば、Proudfoot (2011) Genes & Dev. 25 (17): 1770-82を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの双方向性構築物では、単一の双方向性ターミネーターが、センス方向又はアンチセンス方向のいずれかでRNAポリメラーゼ転写を終結させるために（すなわち、第1のセグメント及び第2のセグメントの両方からのRNAポリメラーゼ転写を終結させるために）使用され得る。双方向性ターミネーターの例には、ARO4、TRP1、TRP4、ADH1、CYC1、GAL1、GAL7、及びGAL10ターミネーターが含まれる。

【0337】

双方向性構築物は、場合によっては、1つ以上（例えば、2つ）のスプライスアクセプター部位を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、スプライス

アクセプター部位を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第2のセグメントは、スプライスアクセプター部位を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、第1のスプライスアクセプター部位を含み得、第2のセグメントは、第2のスプライスアクセプター部位（例えば、スプライスアクセプター部位の逆相補体）を含み得る。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、第1のコード配列の5'に位置する第1のスプライスアクセプター部位を含む。いくつかの双方向性構築物では、第2のセグメントは、第2のコード配列の逆相補体の3'に位置する第2のスプライスアクセプター部位の逆相補体を含む。いくつかの双方向性構築物では、第1のセグメントは、第1のコード配列の5'に位置する第1のスプライスアクセプター部位を含み、第2のセグメントは、第2のコード配列の逆相補体の3'に位置する第2のスプライスアクセプター部位の逆相補体を含む。第1のスプライスアクセプター部位と第2のスプライスアクセプター部位は、同じであっても異なってもよい。具体的な例では、両方のスプライスアクセプターは、マウスAlbエキソン2スプライスアクセプターである。具体的な例では、両方のスプライスアクセプターは、配列番号163を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

10

20

30

40

50

【0338】

双方向性構築物は、スプライスアクセプターに連結された第1のコード配列をコードする第1のコード配列と、スプライスアクセプターの逆相補体に作動可能に連結された第2のコード配列の逆相補体とを含んでもよい。本明細書に開示される双方向性構築物はまた、構築物のいずれか若しくは両方の末端にスプライスアクセプター部位、又は第1のセグメント及び第2のセグメントの両方にスプライスアクセプター部位（例えば、コード配列の5'のスプライスアクセプター部位、又はコード配列の逆相補体の3'のスプライスアクセプターの逆相補体）を含み得る。スプライスアクセプター部位は、例えば、NAGを含み得るか、又はNAGからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、ALBスプライスアクセプターである（例えば、ALBのエキソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるALBスプライスアクセプター（すなわち、ALBエキソン2スプライスアクセプター））。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトALB遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスAlb遺伝子に由来し得る（例えば、マウスAlbのエキソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるALBスプライスアクセプター（すなわち、マウスAlbエキソン2スプライスアクセプター））。別の例では、スプライスアクセプターは、目的のポリペプチドをコードする遺伝子由来のスプライスアクセプターである。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は既知である。例えば、Shapiro et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 7155-7174、及びBurset et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29: 255-259を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。双方向性構築物において使用されるスプライスアクセプターは、同じであっても異なってもよい。具体的な例では、両方のスプライスアクセプターは、マウスAlbエキソン2スプライスアクセプターである。

【0339】

双方向性構築物は、環状又は直線状であり得る。例えば、双方向性構築物は、直線状であり得る。第1のセグメントと第2のセグメントは、リンカー配列を介して直線状の様式で結合され得る。例えば、逆相補体配列を含む第2のセグメントの5'末端は、第1のセグメントの3'末端に連結され得る。代替的に、第1のセグメントの5'末端は、逆相補体配列を含む第2のセグメントの3'末端に連結され得る。リンカーは、任意の好適な長さであり得る。例えば、リンカーは、約5～約2000ヌクレオチドの長さであり得る。一例として、リンカー配列は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、

約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95、約 100、約 150、約 200、約 250、約 300、約 500、約 1000、約 1500、約 2000、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。リンカー配列に加えて、又はリンカー配列の代わりに、他の構造的要素もまた、第 1 のセグメントと第 2 のセグメントとの間に挿入され得る。

【0340】

本明細書に開示される双方向性構築物は、DNA 又は RNA、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得る。例えば、構築物は、一本鎖又は二本鎖 DNA であり得る。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、（例えば、ヌクレオシド類似体を使用して）修飾され得る。具体的な例では、双方向性構築物は、一本鎖（例えば、一本鎖 DNA）である。

10

【0341】

本明細書に開示される双方向性構築物は、必要に応じて 1 つ以上の好適な構造的特徴を含むように、及び／又は 1 つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ITR）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、1 つ、2 つ、若しくは 3 つの ITR を含み得る、又は 2 つ以下の ITR を含み得る。構造的修飾の様々な方法が既知である。

20

【0342】

同様に、構築物の一方又は両方の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得る。例えば、1 つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の 3' 末端に付加し得る、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションし得る。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4959-4963、及び Nehls et al. (1996) Science 272: 886-889 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。構築物を分解から保護するための追加の方法には、末端アミノ基の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及び O-メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0343】

本明細書でより詳細に開示されるように、本明細書に開示される双方向性構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクターの一部として細胞に導入され得る。構築物は、ネイキッド核酸として導入され得る、リボソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得る、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【0344】

例示的な双方向性構築物では、第 2 のセグメントは、第 1 のセグメントの 3' に位置し、第 1 の目的のポリペプチドコード配列及び第 2 の目的のポリペプチドコード配列は両方とも同じ目的のヒトポリペプチドをコードし、第 2 の目的のポリペプチドコード配列は、第 1 の目的のポリペプチドのコードン使用とは異なるコードン使用を採用し、第 1 のセグメントは、第 1 の目的のポリペプチドコード配列の 3' に位置する第 1 のポリアデニル化シグナル配列を含み、第 2 のセグメントは、第 2 の目的のポリペプチドコード配列の逆相補体の 5' に位置する第 2 のポリアデニル化シグナル配列の逆相補体を含み、第 1 のセグメントは、第 1 の目的のポリペプチドコード配列の 5' に位置する第 1 のスプライスアクセプター部位を含み、第 2 のセグメントは、第 2 の目的のポリペプチドコード配列の逆相補体の 3' に位置する第 2 のスプライスアクセプター部位の逆相補体を含み、核酸構築物は、第 1 の目的のポリペプチド又は第 2 の目的のポリペプチドの発現を駆動するプロモーター

40

50

を含まず、任意選択的に、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【0345】

(3) 一方向性構築物

本明細書に開示される核酸構築物は、一方向性構築物であり得る。特定の一方向性構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される一方向性構築物が仮定配列 5' - C T G G A C C G A - 3' からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体 (5' - T C G G T C C A G - 3') を包含することを意味する。同様に、一方向性構築物要素が特定の 5' から 3' への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。この理由の 1 つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、一方向性構築物が一本鎖組換え A A V ベクターの一部であることである。一本鎖 A A V ゲノムは、センス (プラス鎖) 又はアンチセンス (マイナス鎖ゲノム) のいずれかとしてパッケージされ、+ 及び - 極性の一本鎖 A A V ゲノムは、等しい頻度で成熟 r A A V ビリオンにパッケージされる。例えば、L I N G e t a l . (2 0 1 5) J . M o l . G e n e t . M e d . 9 (3) : 1 7 5、Z h o u e t a l . (2 0 0 8) M o l . T h e r . 1 6 (3) : 4 9 4 - 4 9 9、及び S a m u l s k i e t a l . (1 9 8 7) J . V i r o l . 6 1 : 3 0 9 6 - 3 1 0 1 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0346】

一方向性構築物では、目的のポリペプチドのコード配列は、宿主細胞での発現のためにコドン最適化され得る。例えば、コード配列は、コドン最適化され得る、又は目的のポリペプチドの 1 つ以上のアミノ酸 (すなわち、同じアミノ酸配列) の 1 つ以上の代替コドンを使用してもよい。代替コドンは、本明細書で 사용되는場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン (コドン最適化) であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

20

【0347】

本明細書に開示される一方向性構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び/又は 1 つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むように修飾され得る。例えば、本明細書に開示される一方向性核酸構築物は、ホモロジーアームを含む必要はない、及び/又は例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。

30

【0348】

場合によっては、一方向性核酸構築物は、目的のポリペプチドの発現を駆動するプロモーターを含まない。例えば、目的のポリペプチドの発現は、宿主細胞のプロモーター (例えば、導入遺伝子が宿主細胞の A L B 遺伝子座に組み込まれる場合、内因性 A L B プロモーター) によって駆動され得る。他の場合、一方向性核酸構築物は、目的のポリペプチドのコード配列に作動可能に連結された 1 つ以上のプロモーターを含み得る。すなわち、発現に必要なではないが、本明細書に開示される構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び/又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。いくつかの一方向性構築物は、目的のポリペプチドのコード配列の発現を駆動するプロモーターを含み得る。

40

【0349】

一方向性構築物は、場合によっては、1 つ以上のポリアデニル化テール配列又はポリアデニル化シグナル配列を含み得る。いくつかの一方向性構築物は、目的のポリペプチドのコード配列の 3' 側に位置するポリアデニル化シグナル配列を含み得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス 40 (S V 40) 後期ポリアデニル化シグナル (又はその変異体) である。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン (B G H) ポリアデニル化シグナル (又はその変異体) である。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、B G H ポリアデニル化シグナルである。例えば

50

、ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル又はBGHポリアデニル化シグナルであり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号161を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号162を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

【0350】

好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は、既知である。例えば、いくつかの一方向性構築物は、オープンリーディングフレームの下流にポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列（すなわち、コード配列の3'のポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列）を含む。ポリアデニル化テール配列は、例えば、第1のセグメント及び／又は第2のセグメントにおける目的のポリペプチドのコード配列（又は他のタンパク質コード配列）の下流の「ポリA」ストレッチとしてコードされ得る。ポリAテールは、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、又は100個のアデニン、及び任意選択的に最大300個のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリAテールは、95、96、97、98、99、又は100個のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列AAUAAAは哺乳動物系において一般的に使用されるが、UAUAAA又はAU/GUAAAなどの変異体が同定されている。例えば、Proudfoot (2011) Genes & Dev. 25 (17) : 1770-82を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0351】

一方向性構築物は、場合によっては、1つ以上のスプライスアクセプター部位を含み得る。いくつかの一方向性構築物は、目的のポリペプチドのコード配列の5'側に位置するスプライスアクセプター部位を含む。具体的な例では、スプライスアクセプターは、マウスAlbエクソン2スプライスアクセプターである。具体的な例では、スプライスアクセプターは、配列番号163を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

【0352】

スプライスアクセプター部位は、例えば、NAGを含み得るか、又はNAGからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、ALBスプライスアクセプターである（例えば、ALBのエクソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるALBスプライスアクセプター（すなわち、ALBエクソン2スプライスアクセプター））。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトALB遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスAlb遺伝子に由来し得る（例えば、マウスAlbのエクソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるALBスプライスアクセプター（すなわち、マウスAlbエクソン2スプライスアクセプター））。別の例では、スプライスアクセプターは、目的のポリペプチドをコードする遺伝子由来のスプライスアクセプターである。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は既知である。例えば、Shapiro et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15 : 7155-7174、及びBursett et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29 : 255-259を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0353】

一方向性構築物は、環状又は直線状であり得る。例えば、一方向性構築物は、直線状であり得る。

【0354】

本明細書に開示される一方向性構築物は、DNA又はRNA、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得る。例えば、構築物は、一本鎖又は二本鎖DN

Aであり得る。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、（例えば、ヌクレオシド類似体を使用して）修飾され得る。具体的な例では、一方向性構築物は、一本鎖（例えば、一本鎖DNA）である。

【0355】

本明細書に開示される一方向性構築物は、必要に応じて1つ以上の好適な構造的特徴を含むように、かつ／又は1つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ITR）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、1つ、2つ、若しくは3つのITRを含み得る、又は2つ以下のITRを含み得る。構造的修飾の様々な方法が既知である。

10

【0356】

同様に、構築物の一方又は両方の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の3'末端に付加し得る、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションし得る。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4959-4963、及びNehls et al. (1996) Science 272: 886-889を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。構築物を分解から保護するための追加の方法には、末端アミノ基の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0357】

本明細書でより詳細に開示されるように、本明細書に開示される一方向性構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクターの一部として細胞に導入され得る。構築物は、ネイキッド核酸として導入され得る、リボソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得る、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

30

【0358】

例示的な一方向性構築物では、構築物は、目的のポリペプチドのコード配列の3'に位置するポリアデニル化シグナル配列を含み、構築物は、目的のポリペプチドのコード配列の5'に位置するスプライスアクセプター部位を含み、核酸構築物は、目的のポリペプチドの発現を駆動するプロモーターを含まず、任意選択的に、核酸構築物は、ホモロジーマを含まない。

【0359】

（4）マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、一方向性構築物又は二方向性構築物であり得る。特定の構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される構築物が仮定配列5'-CTGGACCGA-3'からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（5'-TCGGTCCAG-3'）を包含することを意味する。同様に、構築物要素が特定の5'から3'への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。この理由の1つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、構築物が一本鎖組換えAAVベクターの一部であることである。一本鎖AAVゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+及び-極性の一本鎖AAVゲノムは、等しい頻度で成熟rAAVビリオンにパッケージされる。例えば、LING et al

40

50

．（２０１５）*J. Mol. Genet. Med.* 9（３）：１７５、*Zhou et al.*（２００８）*Mol. Ther.* 16（３）：４９４－４９９、及び*Samulski et al.*（１９８７）*J. Virol.* 61：３０９６－３１０１を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３６０】

核酸構築物において、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、ＣＤ６３結合送達ドメインコード配列、及び／又はＧＡＡコード配列は、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得る。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、ＣＤ６３結合送達ドメインコード配列、及び／又はＧＡＡコード配列は、コドン最適化され得る、又はタンパク質の１つ以上のアミノ酸（すなわち、同じアミノ酸配列）について１つ以上の代替コドンを使用し得る。代替コドンは、本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

10

【０３６１】

核酸構築物において、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、ＴｆＲ結合送達ドメインコード配列、及び／又はＧＡＡコード配列は、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得る。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、ＴｆＲ結合送達ドメインコード配列、及び／又はＧＡＡコード配列は、コドン最適化され得る、又はタンパク質の１つ以上のアミノ酸（すなわち、同じアミノ酸配列）について１つ以上の代替コドンを使用し得る。代替コドンは、本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

20

【０３６２】

本明細書に開示される核酸構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は１つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むように修飾される。例えば、本明細書に開示される核酸構築物は、ホモロジーアームを含む必要はなく、及び／又は例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。

30

【０３６３】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質の発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のＡＬＢ遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ＡＬＢプロモーター）によって駆動され得る。他の場合、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列に作動可能に連結された１つ以上のプロモーターを含み得る。すなわち、発現に必要ではないが、本明細書に開示される構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び／又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。いくつかの核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含み得る。例えば、別の例として、プロモーターは、肝臓特異的プロモーターであり得る。肝臓特異的プロモーターの例としては、ヒト又はマウスＴＴＲプロモーターなどのＴＴＲプロモーターが挙げられる。一例では、構築物は、マウスＴＴＲプロモーター又はヒトＴＴＲプロモーターなどのＴＴＲプロモーターを含み得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、ＴＴＲプロモーターに作動可能に連結されている）。一例では、構築物は、マウスＳＥＲＰＩＮＡ１エンハンサー又はヒトＳＥＲＰＩＮＡ１エンハンサーなどのＳＥＲＰＩＮＡ１エンハンサーを含んでもよい（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、ＳＥＲＰＩＮＡ１エンハンサーに作動可能に連結されている）。一例では、構築物は、ヒトＳＥＲＰＩＮＡ１エンハンサー及びマウスＴＴＲプロモーターなどの、ＴＴＲプロモーター及びＳＥＲＰＩＮＡ１エン

40

50

ハンサーを含んでもよい（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、S E R P I N A 1 エンハンサー及び T T R プロモーターに作動可能に連結されている）。

【0364】

核酸構築物は、場合によっては、1つ以上のポリアデニル化テール配列又はポリアデニル化シグナル配列を含み得る。いくつかの核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列の3'に位置するポリアデニル化シグナル配列を含み得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス40（SV40）後期ポリアデニル化シグナル（又はその変異体）である。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化シグナル（又はその変異体）である。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、CpG枯渇しているBGHポリアデニル化シグナルである。例えば、ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル又はCpG枯渇しているBGHポリアデニル化シグナルであり得る。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号712、169、又は161を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号712を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号169を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号161を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号162を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

10

20

【0365】

好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は、既知である。例えば、いくつかの核酸構築物は、オープンリーディングフレームの下流にポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列（すなわち、コード配列の3'のポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列）を含む。ポリアデニル化テール配列は、例えば、第1のセグメント及び／又は第2のセグメントにおけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列（又は他のタンパク質コード配列）の下流の「ポリA」ストレッチとしてコードされ得る。ポリAテールは、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、又は100個のアデニン、及び任意選択的に最大300個のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリAテールは、95、96、97、98、99、又は100個のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列A A U A A Aは哺乳動物系において一般的に使用されるが、U A U A A A又はA U / G U A A Aなどの変異体が同定されている。例えば、P r o u d f o o t（2011）G e n e s & D e v . 2 5（17）：1770-82を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0366】

核酸構築物は、場合によっては、1つ以上のスプライスアクセプター部位を含み得る。いくつかの核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列の5'に位置するスプライスアクセプター部位を含む。具体的な例では、スプライスアクセプターは、マウスA l bエキソン2スプライスアクセプターである。具体的な例では、スプライスアクセプターは、配列番号163を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

40

【0367】

スプライスアクセプター部位は、例えば、N A Gを含み得るか、又はN A Gからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、A L Bスプライスアクセプターである（例えば、A L Bのエキソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるA L Bスプライスアクセプター（すなわち、A L Bエキソン2スプライスアクセプター））。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトA L B遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスA l b遺伝子に由来し得る（例えば、マウスA l

50

bのエキソン1及び2と一緒にスプライシングする際に使用されるA L Bスプライスアクセプター（すなわち、マウスA l bエキソン2スプライスアクセプター）。別の例では、スプライスアクセプターは、G A Aスプライスアクセプターである。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトG A A遺伝子に由来し得る。代替的に、そのようなスプライスアクセプターは、マウスG A A遺伝子に由来し得る。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は既知である。例えば、Shapiro et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 7155-7174、及びBurset et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29: 255-259を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0368】

核酸構築物は、環状又は直線状であり得る。例えば、核酸構築物は、直線状であり得る。本明細書に開示される核酸構築物は、DNA又はRNA、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得る。例えば、構築物は、一本鎖又は二本鎖DNAであり得る。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、（例えば、ヌクレオシド類似体を使用して）修飾され得る。具体的な例では、核酸構築物は、一本鎖（例えば、一本鎖DNA）である。

【0369】

本明細書に開示される核酸構築物は、必要に応じて1つ以上の好適な構造的特徴を含むように、及び／又は1つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ITR）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される核酸構築物は、1つ、2つ、若しくは3つのITRを含み得る、又は2つ以下のITRを含み得る。構造的修飾の様々な方法が既知である。

20

【0370】

同様に、核酸構築物の一方又は両方の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の3'末端に付加し得る、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションし得る。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4959-4963、及びNehls et al. (1996) Science 272: 886-889を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。構築物を分解から保護するための追加の方法には、末端アミノ基の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0371】

本明細書でより詳細に開示されるように、本明細書に開示される核酸構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクターの一部として細胞に導入され得る。核酸構築物は、ネイキッド核酸として導入され得るか、リボソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得る、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

40

【0372】

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又は核酸構築物中のG A Aコード配列は、（例えば、ヒトコドンへの）コドン最適化、C p Gジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の突然変

50

異、1つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの1つ以上の修飾を含み得る。構築物中のCpGジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化CpGジヌクレオチドは、宿主トール様受容体9（TLR-9）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激し得る。第二に、CpGジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル-CpG結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらす。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの突然変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーRNA中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

10

【0373】

一例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、変異又は除去された1つ以上の潜在性スプライス部位を有する。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されている（すなわち、CpG枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されている。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており、1つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、CpG枯渇している）、1つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の特定の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており、1つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、CpG枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、CD63結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

20

30

40

【0374】

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又は核酸構築物中のGAAコード配列は、（例えば、ヒトコドンへの）コドン最適化、CpGジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の突然変異、1つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの1つ以上の修飾を含み得る。構築物中のCpGジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化CpGジヌクレオチドは、宿主トール様受容体9（TLR-9）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激し得る。第二に、CpGジヌクレオ

50

チドがメチル化されると、それらは、メチル-CpG結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの突然変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーRNA中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

【0375】

一例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、変異又は除去された1つ以上の潜在性スプライス部位を有する。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されている（すなわち、CpG枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されている。別の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、CpG枯渇している）、1つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の特定の例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており、1つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、1つ以上のCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、CpG枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列、TfR結合送達ドメインコード配列、及び／又はGAAコード配列は、全てのCpGジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にCpG枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【0376】

例示的な核酸構築物では、構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列の3'に位置するポリアデニル化シグナル配列を含み、構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列の5'に位置するスプライスアクセプター部位を含み、核酸構築物は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、任意選択的に、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【0377】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号193を含み得るか、又は配列番号193に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。別の具体的な例では、マル

チドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 から本質的になり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 193 からなり得る。

【0378】

様々なマルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194～202 のいずれかに記載の配列から本質的になる。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0379】

様々なコドン最適化マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、CpG枯渇しており（例えば、完全にCpG枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号195～202のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号195～202のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号195～202のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号195～202のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号195～202のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号195～202のいずれかに記載の配列から本質的になる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0380】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号196に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号196に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列

番号 196 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質コード配列）は、配列番号 196 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質コード配列）は、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 196 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列から本質的になるマルチド

10

20

30

40

50

メイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0381】

核酸構築物は、例えば、(1) 5' ITR (例えば、配列番号160に記載されるもの)、(2) スプライスアクセプター部位 (例えば、マウスA1bエクソン2スプライスアクセプター、例えば、配列番号163に記載のもの)、(3) マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、(4) ポリアデニル化シグナル (例えば、SV40 ポリアデニル化シグナル、例えば、配列番号712に記載のもの)、及び(5) 3' ITR (例えば、配列番号160に記載のもの又はそれらの逆相補体) を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である (又は配列を含む)。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり (又は配列を含む)、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質コード配列) は、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり (又は配列を含む)、配列番号193に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり (又は配列を含む)、別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり (又は配列を含む)、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質コード配列) は、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり (又は配列を含む)、配列番号193に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である (又は配列を含む)。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり (又は配列を含む)、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質コード配列) は、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である。別の例では、核酸構築物は、配列番号736に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全にCpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全にCpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号193に対して少なくとも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%、

10

20

30

40

50

少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 193 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 193 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 193 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 193 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

【0382】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配

20

30

40

50

列番号 194 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 194 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載される配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0383】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、

少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 201 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載される配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0384】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくと

10

20

30

40

50

も 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 193 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 200 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメ

10

20

30

40

50

イン治療用タンパク質)をコードする(かつ例えば、天然GAAの活性を保持する)。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号193に記載される配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0385】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質(又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質)をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号193に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質(又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質)をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号193に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり(又は配列を含み)、配列番号193に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質(又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質)をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号198に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく(例えば、完全にCpG枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチ

10

20

30

40

50

ドメイン治療用タンパク質コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 193 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0386】

場合によっては、抗 h T f R : G A A s c F v 融合タンパク質は、V_L - (G l y₄ S e r)₃ - V_H : G A A (G l y₄ S e r = 配列番号 600) のフォーマットである。マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570 ~ 573 及び 675 ~ 702 のいずれかを含み得る、又は配列番号 570 ~ 573 及び 675 ~ 702 のいずれかに対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は少なくとも 99.5 % 同一であり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570 ~ 573 及び 675 ~ 702 のいずれかから本質的になり得る。別の具体例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570 ~ 573 及び 675 ~ 702 のいずれかからなり得る。

【0387】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570 を含み得る、又は配列番号 570 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は少なくとも 99.5 % 同一であり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570 から本質的になり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 570 からなり得る。

【0388】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 571 を含み得る、又は配列番号 571 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は少なくとも 99.5 % 同一であり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 571 から本質的になり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号 571 からなり得る。

【0389】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号572を含み得る、又は配列番号572に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号572から本質的になり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号572からなり得る。

【0390】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号573を含む得るか、又は配列番号573に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号573から本質的になり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号573からなり得る。

【0391】

ある場合には、抗hTfR:GAA scFv融合タンパク質は、V_H-(Gly4Ser)₃-V_L:GAA (Gly4Ser=配列番号600)のフォーマットである。マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の具体例では、コードされたマルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号703~706のいずれか(任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA配列を欠く)を含み得るか、又は配列番号703~706のいずれか(任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA配列を欠く)に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。別の具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号703~706のいずれか(任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA配列を欠く)のいずれかから本質的になり得る。別の具体例では、マルチドメイン治療用タンパク質は、配列番号703~706(任意選択的にN末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA配列を欠く)のいずれかからなり得る。

【0392】

様々なマルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号574~586のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号574~586のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号574~586のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である(又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号574~586のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号574~586のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号574~586のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570~573のいずれかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%

、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

【0393】

様々なコドン最適化マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、C p G 枯渇しており（例えば、完全に C p G 枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578～586 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578～586 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578～586 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578～586 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578～586 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578～586 のいずれかに記載の配列から本質的になる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、G A A コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメ

20

30

40

50

イン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570～573 のいずれかに記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0394】

様々なマルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 577 及び 584～586 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 577 及び 584～586 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 577 及び 584～586 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 577 及び 584～586 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 577 及び 584～586 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 577 及び 584～586 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0395】

様々なコドン最適化マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、CpG 枯渇していても（例えば、完全に CpG 枯渇していても）コドンが最適化されている）。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少な

くとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584～586 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、GAA コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

【0396】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584

40

50

に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 584 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0397】

核酸構築物は、例えば、（１）5' ITR（例えば、配列番号 160 に記載されるもの）、（２）スプライスアクセプター部位（例えば、マウス Alu b エクソン 2 スプライスアクセプター、例えば、配列番号 163 に記載のもの）、（３）マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、（４）ポリアデニル化シグナル（例えば、SV40 ポリアデニル化シグナル、例えば、配列番号 712 に記載のもの）、及び（５）3' ITR（例えば、配列

番号 160 に記載のもの又はそれらの逆相補体) を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 733 に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然

10

20

30

40

50

G A A の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0398】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチ

10

20

30

40

50

ドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号573に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号573に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号573に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号573に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号573に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号573に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0399】

核酸構築物は、例えば、（1）5' ITR（例えば、配列番号160に記載されるもの）、（2）スプライスアクセプター部位（例えば、マウスAlbエクソン2スプライスアクセプター、例えば、配列番号163に記載のもの）、（3）マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、（4）ポリアデニル化シグナル（例えば、SV40ポリアデニル化シグナル、例えば、配列番号712に記載のもの）、及び（5）3' ITR（例えば、配列番号160に示されるもの又はそれらの逆相補体）を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号734に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号734に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号573に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号734に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号573に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号734に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号734に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号573に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号734に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号573に記載の配列を含むマ

ルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 734 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 734 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 734 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 734 に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載される配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

【0400】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は

40

50

配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 586 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 573 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0401】

核酸構築物は、例えば、(1) 5' ITR (例えば、配列番号 160 に記載されるものなど)、(2) スプライスアクセプター部位 (例えば、マウス Alu エクソン 2 スプライスアクセプター、例えば、配列番号 163 に記載のもの)、(3) マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、(4) ポリアデニル化シグナル (例えば、SV40 ポリアデニル

10

20

30

40

50

化シグナル、例えば、配列番号 712 に記載のもの）、及び（5）3' ITR（例えば、配列番号 160 に示されるもの又はそれらの逆相補体）を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 573 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 735 に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 573 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン

10

20

30

40

50

治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 573 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0402】

様々なマルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 576、及び 581～583 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 576、及び 581～583 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 576、及び 581～583 のいずれかに対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 576、及び 581～583 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 576、及び 581～583 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 576、及び 581～583 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0403】

様々なコドン最適化マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、C p G 枯渇していて（例えば、完全に C p G 枯渇していて）コドンが最適化されている）。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581～583 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93

%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581～583のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581～583のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581～583のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581～583のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581～583のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号572に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号572に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号572に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号572に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号572に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号572に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

【0404】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含む）、配列番号572に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。配列番号572に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号581に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列

40

50

を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 581 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0405】

核酸構築物は、例えば、(1) 5' ITR (例えば、配列番号 160 に記載されるもの)、(2) スプライスアクセプター部位 (例えば、マウス Alu エクソン 2 スプライスアクセプター、例えば、配列番号 163 に記載のもの)、(3) マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、(4) ポリアデニル化シグナル (例えば、SV40 ポリアデニル化シ

10

20

30

40

50

グナル、例えば、配列番号 712 に記載のもの）、及び (5) 3' ITR (例えば、配列番号 160 に記載のもの又はそれらの逆相補体) を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含む)、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 729 に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なく

10

20

30

40

50

パク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0406】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 582 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 585 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメ

10

20

30

40

50

イン治療用タンパク質コード配列は、C p G 枯渇していてもよく（例えば、完全に C p G 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

【0407】

核酸構築物は、例えば、（１）5' ITR（例えば、配列番号 160 に記載されるもの）、（２）スプライスアクセプター部位（例えば、マウス A l b エクソン 2 スプライスアクセプター、例えば、配列番号 163 に記載のもの）、（３）マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、（４）ポリアデニル化シグナル（例えば、S V 40 ポリアデニル化シグナル、例えば、配列番号 712 に記載のもの）、及び（５）3' ITR（例えば、配列番号 160 に示されるもの又はそれらの逆相補体）を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 95 %、少なく

30

40

50

とも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 730 に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0408】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配

列番号 583 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 583 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0409】

核酸構築物は、例えば、（１）5' ITR（例えば、配列番号 160 に記載されるもの）（２）スプライスアクセプター部位（例えば、マウス Alb エクソン 2 スプライスアク

10

20

30

40

50

セプター、例えば、配列番号 163 に記載のもの）、（３）マルチドメイン治療用タンパク質コード配列、（４）ポリアデニル化シグナル（例えば、SV40 ポリアデニル化シグナル、例えば、配列番号 712 に記載のもの）、及び（５）3' ITR（例えば、配列番号 160 に示されるもの又はそれらの逆相補体）を含み得る。一例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、核酸構築物は、配列番号 731 に記載の配列を含む。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA

10

20

30

40

50

の活性を保持する)。任意選択的に、核酸構築物は、配列番号 572 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例における核酸構築物は、配列番号 572 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0410】

様々なマルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 574 及び 578~580 のいずれかに対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 574 及び 578~580 のいずれかに対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 574 及び 578~580 のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 574 及び 578~580 のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 574 及び 578~580 のいずれかに記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0411】

様々なコドン最適化マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく (例えば、完全に CpG 枯渇している)、及び/又はコドン最適化されていてもよい (例えば、CpG 枯渇して (例えば、完全に CpG 枯渇して) コドンが最適化されている)。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 578~580 のい

10

20

30

40

50

れかに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578～580のいずれかに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578～580のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578～580のいずれかに記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578～580のいずれかに記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、GAAコード配列は、配列番号570に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に記載される配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に記載される配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0412】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号570に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号570に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも

98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号570に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号570に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号570に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であり（又は配列を含み）、配列番号570に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号578に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG枯渇していてもよく（例えば、完全にCpG枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に対して少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は100%同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然GAAの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号570に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0413】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号579に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、

少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 570 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含み）、配列番号 570 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 570 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり（又は配列を含む）、配列番号 570 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 579 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例え

10

20

30

40

50

ば、天然 G A A の活性を保持する)。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする (かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する)。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

【0414】

一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 570 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 570 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 570 に記載される配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一である (又は配列を含む)。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 570 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質 (又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質) をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に対して少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% 同一であり (又は配列を含み)、配列番号 570 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン

20

30

40

50

ン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 580 に記載の配列からなる。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、例えば、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、CpG 枯渇していてもよく（例えば、完全に CpG 枯渇している）、及び／又はコドン最適化されていてもよい。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 570 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

【0415】

様々なマルチドメイン治療用タンパク質コード配列が提供される。一例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 575 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 575 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であり（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 575 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一である（又は配列を含む）。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 575 に記載の配列を含む。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 575 に記載の配列から本質的になる。別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 575 に記載の配列からなる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 571 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 571 に対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 GAA の活性を保持する）。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 571 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 %、又は 100 % 同一であるマルチドメイン治

療用タンパク質（又は配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質）をコードする（かつ例えば、天然 G A A の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 571 に記載の配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 571 に記載の配列から本質的になるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、配列番号 571 に記載の配列からなるマルチドメイン治療用タンパク質をコードする。

【0416】

特定のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が仮定配列 5' - C T G G A C C G A - 3' からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（5' - T C G G T C C A G - 3'）を包含することを意味する。同様に、構築物要素が特定の 5' から 3' への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。この理由の 1 つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が一本鎖組換え A A V ベクターの一部であることである。一本鎖 A A V ゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+ 及び - 極性の一本鎖 A A V ゲノムは、等しい頻度で成熟 r A A V ビリオンにパッケージされる。例えば、L I N G e t a l . (2 0 1 5) J . M o l . G e n e t . M e d . 9 (3) : 1 7 5 、 Z h o u e t a l . (2 0 0 8) M o l . T h e r . 1 6 (3) : 4 9 4 - 4 9 9 、及び S a m u l s k i e t a l . (1 9 8 7) J . V i r o l . 6 1 : 3 0 9 6 - 3 1 0 1 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0417】

（5）ベクター

本明細書に開示される核酸構築物は、発現のための、又は標的ゲノム遺伝子座への組み込み及び標的ゲノム遺伝子座からの発現のためのベクターにおいて提供され得る。ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を含み得る。ベクターはまた、本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤成分を含み得る。例えば、ベクターは、目的のポリペプチドをコードする核酸構築物（例えばマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸構築物）、C R I S P R / C a s 系（C a s タンパク質及び g R N A をコードする核酸）、C R I S P R / C a s 系のうちの 1 つ以上の成分、又はそれらの組み合わせ（例えば、核酸構築物及び g R N A）を含み得る。場合によっては、目的のポリペプチドをコードする核酸構築物（例えばマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸構築物）を含むベクターは、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤のいかなる成分も含まない（例えば、C a s タンパク質をコードする核酸を含まず、g R N A をコードする核酸を含まない）。いくつかのそのようなベクターは、標的ゲノム遺伝子座の標的部位に対応するホモロジーアームを含む。他のそのようなベクターは、いかなるホモロジーアームも含まない。

【0418】

いくつかのベクターは、環状であってもよい。代替的に、ベクターは、直線状であってもよい。ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、又はウイルスキャプシドを介して送達されるようにパッケージされ得る。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、及び発現ベクターが挙げられる。

【0419】

ベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターなどのウイルスベクターであり得る。A A V は任意の好適な血清型であってもよく、一本鎖 A A V（s s A A V）又は自己相補的 A A V（s c A A V）であってもよい。他の例示的なウイルス／ウイルス

ベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まない。このようなウイルスは、免疫性が低減するようにも操作され得る。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性であり得る（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な1つ以上の遺伝子に欠損がある）。ウイルスは、一過性発現又はより長く持続する発現を引き起こし得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に修飾されてもよい。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの1つ以上の特性が変化するように、1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減され得る。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損性であってもよい。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、1つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする1つ以上のベクターを含む1つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系と共に宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることができる。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。

10

20

30

40

50

【0420】

例示的なウイルス力価（例えば、AAV力価）としては、約 10^{12} ～約 10^{16} v g / mL が挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、AAV力価）としては、体重の約 10^{12} ～約 10^{16} v g / kg が挙げられる。

【0421】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、ヒト及び非ヒト霊長類（NHP）を含む複数の種に固有である。現在までに、少なくとも12種の天然血清型及び数百種の天然変異体が単離され、特徴付けられている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Li et al. (2020) Nat. Rev. Genet. 21: 255–272を参照されたい。AAV粒子は、一本鎖DNA（ssDNA）ゲノムを含む非エンベロップ二十面体タンパク質キャプシドから天然に構成される。DNAゲノムには、ウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとして働く2つの逆位末端反復（ITR）が隣接している。rep遺伝子は、ウイルス複製及びパッケージングに必要とされる4つのタンパク質をコードするが、cap遺伝子は、AAV血清型を規定する3つの構造的キャプシドサブユニット、及びいくつかの血清型においてビリオンアセンブリを促進するアセンブリ活性化タンパク質（AAP）をコードする。

【0422】

組換えAAV（rAAV）は、現在、治療用導入遺伝子を標的細胞にインビボで送達することによってヒト疾患を治療するための遺伝子療法において使用される最も一般的に使用されるウイルスベクターのうちの1つである。実際、rAAVベクターは、天然のAAVに類似した二十面体キャプシドから構成されるが、rAAVビリオンは、AAVタンパク質コード配列又はAAV複製配列をキャプシド化しない。これらのウイルスベクターは

、非複製性である。r A A Vベクターにおいて必要とされる唯一のウイルス配列は、2つのI T Rであり、これらは、r A A Vベクターの製造中にゲノム複製及びパッケージングを誘導するために必要とされる。r A A Vゲノムは、A A V rep及びcap遺伝子を欠いており、インビボでそれらを非複製性にする。r A A Vベクターは、rep及びcap遺伝子を、A A V I T Rに隣接する意図された導入遺伝子カセットと組み合わせて、追加のウイルスヘルパータンパク質と共にトランスで発現させることによって生成される。

【0423】

治療用r A A Vゲノムでは、遺伝子発現カセットは、I T R配列の間に配置される。典型的には、r A A Vゲノムカセットは、治療用導入遺伝子の発現を駆動するためのプロモーター、続いてポリアデニル化配列を含む。r A A V発現カセットに隣接するI T Rは、通常、単離され、組換えウイルスベクターに変換される最初の血清型であるA A V 2に由来する。それ以来、ほとんどのr A A V生成方法は、A A V 2 Repベースのパッケージングシステムに依存している。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Collella et al. (2017) Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 8: 87-104を参照されたい。

【0424】

使用され得るI T Rのいくつかの非限定的な例には、配列番号158、配列番号159、又は配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなるI T Rが挙げられる。I T Rの他の例は、配列番号158、配列番号159、又は配列番号160と比較して1つ以上の突然変異を含み、配列番号158、配列番号159、又は配列番号160に対して少なくとも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%同一であり得る。本明細書に開示されるいくつかのr A A Vゲノムでは、核酸構築物は、両側に同じI T R（すなわち、5'末端におけるI T R、及び3'末端におけるI T Rの逆相補体、例えば、5'末端における配列番号158及び3'末端における配列番号168、又は5'末端における配列番号159及び3'末端における配列番号710、又は5'末端における配列番号160及び3'末端における配列番号711）が隣接している。一例では、各末端におけるI T Rは、配列番号158（すなわち、5'末端における配列番号158、及び3'末端における逆相補体）を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、各末端におけるI T Rは、配列番号159（すなわち、5'末端における配列番号159、及び3'末端における逆相補体）を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。一例では、少なくとも一方の末端におけるI T Rは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、5'末端におけるI T Rは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、3'末端におけるI T Rは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、各末端におけるI T Rは、配列番号160（すなわち、5'末端における配列番号160、及び3'末端における逆相補体）を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。本明細書に開示される他のr A A Vゲノムでは、核酸構築物は、各末端に異なるI T Rが隣接している。一例では、一方の末端におけるI T Rは、配列番号158を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、他方の末端におけるI T Rは、配列番号159を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。別の例では、一方の末端におけるI T Rは、配列番号158を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、他方の末端におけるI T Rは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、一方の末端におけるI T Rは、配列番号159を含み、それから本質的になり、又はそれからなり、他方の末端におけるI T Rは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0425】

組換えA A Vベクターの特定の血清型は、特定の組織に対するそのインビボ指向性に影

響を及ぼす。AAVキャプシドタンパク質は、標的細胞への付着及び侵入を仲介し、続いてエンドソーム脱出及び核への輸送を担う。したがって、rAAVベクターを開発する場合の血清型の選択は、どの細胞型及び組織にベクターがインビボで注射された場合に結合及び形質導入する可能性が最も高いかに影響を与える。rAAV8を含むrAAVのいくつかの血清型は、マウス、NHP及びヒトにおいて全身的に送達された場合、肝臓に形質導入することができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Li et al. (2020) Nat. Rev. Genet. 21:255-272を参照されたい。

【0426】

核に入ると、ssDNAゲノムはビリオンから放出され、相補的DNA鎖が合成されて、二本鎖DNA (dsDNA) 分子が生成される。二本鎖AAVゲノムは、それらのITRを介して自然に環状化し、染色体外で核内に存続するエピソームになる。したがって、エピソーム遺伝子療法プログラムのために、rAAV送達rAAVエピソームは、非分裂細胞において長期のプロモーター駆動遺伝子発現を提供する。しかしながら、このrAAV送達エピソームDNAは、細胞が分裂するにつれて希釈される。対照的に、本明細書に記載の遺伝子療法は、長期の遺伝子発現を可能にする遺伝子挿入に基づく。

【0427】

特定の配列（例えば、特定の双方向性構築物配列又は特定の一方向性構築物配列）を含む特定のrAAVが本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される双方向性構築物又は一方向性構築物が仮定配列5'-CTGGACCGA-3'からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体(5'-TCGGTCCAG-3')を包含することを意味する。同様に、双方向性構築物要素又は一方向性構築物要素を含むrAAVが特定の5'から3'への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。例えば、5'から3'に、第1のスプライスアクセプター、第1のコード配列、第1のターミネーター、第2のターミネーターの逆相補体、第2のコード配列の逆相補体、及び第2のスプライスアクセプターの逆相補体を含む双方向性構築物を含むrAAVが本明細書に開示される場合、それはまた、5'から3'に、第2のスプライスアクセプター、第2のコード配列、第2のターミネーター、第1のターミネーターの逆相補体、第1のコード配列の逆相補体、及び第1のスプライスアクセプターの逆相補体を含む構築物を包含することを意味する。一本鎖AAVゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+及び-極性の一本鎖AAVゲノムは、等しい頻度で成熟rAAVビリオンにパッケージされる。例えば、LING et al. (2015) J. Mol. Genet. Med. 9(3):175、Zhou et al. (2008) Mol. Ther. 16(3):494-499、及びSamulski et al. (1987) J. Virol. 61:3096-3101を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0428】

ssDNA AAVゲノムは、2つのオープンリーディングフレーム、Rep及びCapからなり、相補的DNA鎖の合成を可能にする2つの逆位末端反復が隣接している。AAVトランスファープラスミドを構築する場合、導入遺伝子は、2つのITRの間に配置され、Rep及びCapは、トランスで供給され得る。Rep及びCapに加えて、AAVはアデノウイルスからの遺伝子を含むヘルパープラスミドを必要とし得る。これらの遺伝子(E4、E2a、及びVA)はAAV複製を仲介する。例えば、トランスファープラスミド、Rep/Cap、及びヘルパープラスミドをアデノウイルス遺伝子E1+を含むHEK293細胞にトランスフェクトして、感染性AAV粒子を生成し得る。代替的に、Rep、Cap、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせる単一のプラスミドとしてもよい。同様のパッケージングセル及び方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用され得る。

【0429】

AAVの複数の血清型が確認されている。これらの血清型は、感染する細胞の種類（すなわち、それらの指向性）が異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。AAVという用語は、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッド、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVを含む。AAVの種々の血清型のゲノム配列、並びに天然末端反復（TR）、Repタンパク質、及びキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献又はGenBankなどの公開データベースに見出すことができる。「AAVベクター」は、本明細書で使用される場合、AAV起源ではない異種配列（すなわち、AAVに対して異種の核酸配列）を含むAAVベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッド、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも1つ、及び一般に2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）が隣接している。AAVベクターは、一本鎖（ssAAV）又は自己相補的（scAAV）のいずれかであり得る。肝臓組織の血清型の例には、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、及びAAVhu.37が含まれ、特にAAV8が含まれる。具体的な例では、核酸構築物を含むAAVベクターは、組換えAAV8（rAAV8）であり得る。本明細書に記載のrAAV8ベクターは、キャプシドがAAV8由来であるベクターである。例えば、AAV2由来のITR及びAAV8のキャプシドを使用するAAVベクターは、本明細書においてrAAV8ベクターであるとみなされる。

【0430】

指向性は、キャプシド及び異なるウイルス血清型からのゲノムの混合である偽型付けによって更に洗練され得る。例えば、AAV2/5は、血清型5のキャプシドにパッケージされた血清型2のゲノムを含むウイルスを示す。偽型ウイルスの使用は、形質導入効率を改善するだけでなく、指向性を変え得る。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドはまた、ウイルスの指向性を改変するためにも使用され得る。例えば、AAV-DJは、8つの血清型からのハイブリッドキャプシドを含有しており、インビボで幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。AAV-DJ8は、AAV-DJの特性を示すが、脳への取り込みが増強された別の例である。AAV血清型は、変異によっても修飾され得る。AAV2の変異修飾の例には、Y444F、Y500F、Y730F、及びS662Vが含まれる。AAV3の変異修飾の例には、Y705F、Y731F、及びT492Vが含まれる。AAV6の変異修飾の例には、S663V及びT492Vが含まれる。他の偽型/修飾AAV変異体には、AAV2/1、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV2.5、AAV8.2、及びAAV/SASTGが含まれる。

【0431】

導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的AAV（scAAV）変異体が使用され得る。AAVは細胞のDNA複製機構に依存して、AAVの一本鎖DNAゲノムの相補的鎖を合成するため、導入遺伝子の発現が遅れる可能性がある。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補的配列を含むscAAVを使用することができ、宿主細胞のDNA合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖AAV（ssAAV）ベクターも使用され得る。

【0432】

パッケージング容量を増加させるために、長い導入遺伝子は、1つ目は3'スプライスドナー、2つ目は5'スプライスアクセプターである2つのAAVトランスファープラスミドとの間で分割され得る。細胞の共感染時に、これらのウイルスはコンカテマーを形成し、一緒にスプライシングされ、完全長導入遺伝子を発現させ得る。これにより、より長い導入遺伝子の発現が可能になるが、発現の効率は低下する。容量を増加させるための同様の方法は、相同組換えを利用する。例えば、導入遺伝子は2つのトランスファープラスミドの間で分割され得るが、共発現が相同組換え及び完全長導入遺伝子の発現を誘導するように、実質的な配列の重複がある。

【0433】

B. ヌクレアーゼ剤及びCRISPR/Cas系

本明細書に開示される方法及び組成物は、本明細書に開示される核酸構築物の挿入のために、クラスター化して規則的に散在する短回文配列リピート (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat, CRISPR) / CRISPR 関連 (Cas) 系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 系、若しくは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) 系などのヌクレアーゼ剤、又はそのような系の成分を利用し、セーフハーバー遺伝子 (例えば、ALB) などの標的遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座を修飾し得る。一般に、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位において二本鎖切断又はニック (すなわち、一本鎖切断) を誘導するための操作された切断系の使用を伴う。切断又はニックングは、ヌクレアーゼ標的部位の特異的切断又はニックングを誘導するための操作されたガイドRNAを有する、操作されたZFN、TALEN、又はCRISPR/Cas系などの特異的ヌクレアーゼの使用を介して起こり得る。所望の標的配列においてニック又は二本鎖切断を誘導する任意のヌクレアーゼ剤が、本明細書に開示される方法及び組成物において使用され得る。ヌクレアーゼ剤を使用して、宿主ゲノム内の所望の遺伝子座 (標的遺伝子) に挿入の部位を作製し得、その部位に核酸構築物を挿入して目的のポリペプチド (例えば、マルチドメイン治療用タンパク質) を発現させる。目的のポリペプチド (例えば、マルチドメイン治療用タンパク質) は、目的のポリペプチドが通常発現されないセーフハーバー遺伝子座などの、その挿入部位又は遺伝子座 (標的遺伝子) に関して外因性であり得る。あるいは、目的のポリペプチドは、目的のポリペプチドをコードする欠損遺伝子を修正するための目的のポリペプチドをコードする内因性遺伝子座への挿入など、その挿入部位に関して非外因性であってもよい。

【0434】

一例では、ヌクレアーゼ剤は、CRISPR/Cas系である。別の例では、ヌクレアーゼ剤は、1つ以上のZFNを含む。更に別の例では、ヌクレアーゼ剤は、1つ以上のTALENを含む。具体的な例では、CRISPR/Cas系又はそのような系の成分は、細胞内のALB遺伝子若しくは遺伝子座 (例えば、ALBゲノム遺伝子座)、又は細胞内のALB遺伝子若しくは遺伝子座のイントロン1を標的とする。より具体的な例では、CRISPR/Cas系又はそのような系の成分は、細胞内のヒトALB遺伝子若しくは遺伝子座又はヒトALB遺伝子若しくは遺伝子座のイントロン1を標的とする。

【0435】

CRISPR/Cas系には、Cas遺伝子の発現に関与する、又はその活性を指示する転写物及び他の要素が含まれる。CRISPR/Cas系は、例えば、タイプI、タイプII、タイプIII系、又はタイプV系 (例えば、サブタイプV-A又はサブタイプV-B) であり得る。本明細書に開示される方法及び組成物は、核酸の部位特異的結合又は切断のためにCRISPR複合体 (Casタンパク質と複合体を形成したガイドRNA (gRNA) を含む) を利用することによってCRISPR/Cas系を採用し得る。ALB遺伝子又は遺伝子座を標的とするCRISPR/Cas系は、Casタンパク質 (又はCasタンパク質をコードする核酸) 及び1つ以上のガイドRNA (又は1つ以上のガイドRNAをコードするDNA) を含み、1つ以上のガイドRNAの各々は、標的ゲノム遺伝子座 (例えば、ALB遺伝子又は遺伝子座) 内の異なるガイドRNA標的配列を標的と

する。

【0436】

本明細書に開示される組成物及び方法で使用されるCRISPR/Cas系は、天然に存在しなくてもよい。天然に存在しない系は、系の1つ以上の成分が、それらの天然に存在する状態から改変若しくは変異されている、それらが自然界で天然に関連する少なくとも1つの他の成分を少なくとも実質的に含まない、又はそれらが天然に関連しない少なくとも1つの他の成分と関連するなどの、ヒトの手の関与を示す任意のものを含む。例えば、いくつかのCRISPR/Cas系は、天然に存在しないgRNA及びCasタンパク質と一緒に含む天然に存在しないCRISPR複合体を用いる、天然に存在しないCasタンパク質を用いる、又は天然に存在しないgRNAを用いる。

10

【0437】

(1) 標的ゲノム遺伝子座及びアルブミン (ALB)

セーフハーバー遺伝子座 (ALBなどのセーフハーバー遺伝子) 又は内因性GAA遺伝子座などの、遺伝子を発現することができる任意の標的ゲノム遺伝子座が使用され得る。核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座の任意の部分に組み込まれ得る。例えば、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座のイントロン若しくはエキソンに挿入され得る、又は標的ゲノム遺伝子座の1つ以上のイントロン及び／若しくはエキソンを置換し得る。具体的な例では、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座の第1のイントロン (例えば、ALBイントロン1) などの、標的ゲノム遺伝子座のイントロンに組み込まれ得る。例えば、国際公開第2020/082042号、米国特許出願公開第2020/0270617号、国際公開第2020/082041号、米国特許出願公開第2020/0268906号、国際公開第2020/082046号、及び米国特許出願公開第2020/0289628号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。標的ゲノム遺伝子座に組み込まれた構築物は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーター (例えば、内因性ALBプロモーター) に作動可能に連結され得る。

20

【0438】

組み込まれた外因性DNAと宿主ゲノムとの間の相互作用は、組み込みの信頼性及び安全性を制限する可能性があり、標的化遺伝子修飾によるものではなく、代わりに周囲の内因性遺伝子に対する組み込みの意図しない影響による明白な表現型効果をもたらす可能性がある。例えば、ランダムに挿入された導入遺伝子は、位置効果及びサイレンシングの影響を受けやすく、その発現が信頼できず、予測できないものになる可能性がある。同様に、外因性DNAの染色体遺伝子座への組み込みは、周囲の内因性遺伝子及びクロマチンに影響を及ぼし、それによって細胞の挙動及び表現型を変化させる可能性がある。セーフハーバー遺伝子座には、導入遺伝子又は他の外因性核酸インサートが、細胞の挙動又は表現型を明白に変えることなく (すなわち、宿主細胞に有害な影響を与えることなく)、目的の全ての組織で安定かつ確実に発現できる染色体遺伝子座が含まれる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sadelain et al. (2012) Nat. Rev. Cancer 12:51-58を参照されたい。例えば、セーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。例えば、セーフハーバー遺伝子座は、内因性遺伝子の構造又は発現に悪影響を及ぼすことなく、外因性DNAが予測可能な方法で組み込まれて機能できる染色体遺伝子座を含み得る。セーフハーバー遺伝子座には、遺伝子外領域又は遺伝子内領域、例えば、必須ではない、不要な、又は明白な表現型の結果なしに破壊できる遺伝子内の遺伝子座を含めることができる。

30

40

【0439】

このようなセーフハーバー遺伝子座は、全ての組織でオープンクロマチン構成を提供し、胚発生中及び成体で遍在的に発現され得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Zambrowicz et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:3789-3794を参照されたい。加えて、セーフハーバー遺伝子座を高効率で標的化することができ、セーフハー

50

バー遺伝子座を明白な表現型を伴わずに破壊することができる。セーフハーバー遺伝子座の例には、A L B、C C R 5、H P R T、A A V S 1、及びR o s a 2 6が含まれる。例えば、米国特許第7, 888, 121号、同第7, 972, 854号、同第7, 914, 796号、同第7, 951, 925号、同第8, 110, 379号、同第8, 409, 861号、同第8, 586, 526号、並びに米国特許出願公開第2003/0232410号、同第2005/0208489号、同第2005/0026157号、同第2006/0063231号、同第2008/0159996号、同第2010/00218264号、同第2012/0017290号、同第2011/0265198号、同第2013/0137104号、同第2013/0122591号、同第2013/0177983号、同第2013/0177960号、及び同第2013/0122591号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。標的ゲノム遺伝子座の他の例としては、A L B遺伝子座、E E S Y R遺伝子座、S A R S遺伝子座、ヒト染色体1若しくはその非ヒト哺乳動物オルソログの188, 083, 272位、ヒト染色体10若しくはその非ヒト哺乳動物オルソログの3, 046, 320位、ヒト染色体17若しくはその非ヒト哺乳動物オルソログの67, 328, 980位、染色体上のアデノ随伴ウイルス部位1 (A A V S 1)、ヒト染色体19若しくはその非ヒト哺乳動物オルソログ上のA A V ウイルスの天然に存在する組込み部位、ケモカイン受容体5 (C C R 5) 遺伝子、H I V - 1 共受容体をコードするケモカイン受容体遺伝子、又はマウスR o s a 2 6 遺伝子座若しくはその非マウス哺乳動物オルソログが挙げられる。

10

20

【0440】

具体的な例では、セーフハーバー遺伝子座は、ゲノム内の遺伝子座であり、遺伝子は、肝細胞などの宿主細胞に対する顕著な有害効果なしに（例えば、アポトーシス、壊死、及び／若しくは老化を引き起こすことなく、又は対照細胞集団と比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、若しくは40%を超えるアポトーシス、壊死、及び／若しくは老化を引き起こすことなく）挿入され得る。セーフハーバー遺伝子座は、肝細胞などの宿主細胞に対する顕著な有害効果なしに（例えば、アポトーシス、壊死、及び／又は老化を引き起こすことなく、又は対照細胞集団と比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、若しくは40%を超えるアポトーシス、壊死、及び／又は老化を引き起こすことなく）外因性遺伝子の過剰発現を可能にし得る。望ましいセーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。セーフハーバーは、ヒトセーフハーバー（例えば、肝臓組織又は肝細胞宿主細胞について）であり得る。

30

【0441】

具体的な例では、標的ゲノム遺伝子座は、A L B 遺伝子座、例えば、A L B 遺伝子座のイントロン1である。より具体的な例では、標的ゲノム遺伝子座は、ヒトA L B 遺伝子座、例えば、ヒトA L B 遺伝子座のイントロン1である（例えば、配列番号4）。

【0442】

(2) C a s タンパク質

C a s タンパク質は一般に、ガイドRNAと相互作用することができる少なくとも1つのRNA認識又は結合ドメインを含む。C a s タンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、D N a s e ドメイン又はR N a s e ドメイン）、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、及び他のドメインを含み得る。いくつかのそのようなドメイン（例えば、D N a s e ドメイン）は、天然のC a s タンパク質に由来し得る。他のそのようなドメインを追加して、修飾C a s タンパク質を作製し得る。ヌクレアーゼドメインは、核酸分子の共有結合の切断を含む、核酸切断に対する触媒活性を有する。切断は平滑末端又は付着末端を生成することができ、一本鎖又は二本鎖であってもよい。例えば、野生型C a s 9 タンパク質は、典型的には、平滑切断産物を作製する。代替的に、野生型C p f 1 タンパク質（例えば、F n C p f 1）は、非標的化鎖におけるP A M 配列から18番目の塩基対の後及び標的化鎖にお

40

50

る23番目の塩基の後に切断が生じる、5-ヌクレオチドの5'オーバーハングを有する切断産物をもたらし得る。Casタンパク質は、完全な切断活性を有し、標的ゲノム遺伝子座で二本鎖切断を作製し得る（例えば、平滑末端を持つ二本鎖切断）、又は標的ゲノム遺伝子座で一本鎖切断を作製するニックアーゼであり得る。

【0443】

Casタンパク質の例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9 (Csn1又はCsx12)、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (CasA)、Cse2 (CasB)、Cse3 (CasE)、Cse4 (CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、及びCu1966、並びにそれらのホモロジー又は修飾バージョンが含まれる。

【0444】

例示的なCasタンパク質は、Cas9タンパク質又はCas9タンパク質に由来するタンパク質である。Cas9タンパク質は、タイプII CRISPR/Cas系からのものであり、典型的には、保存されたアーキテクチャを有する4つの重要なモチーフを共有する。モチーフ1、2、及び4はRuvC様モチーフであり、モチーフ3はHNHモチーフである。例示的なCas9タンパク質は、化膿連鎖球菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ストレプトコッカス種、黄色ブドウ球菌、ノカルディオプシス・ダソンビレイ (*Nocardia* *das*sonvillei)、ストレプトミセス・プリスティナエスピラリス (*Streptomyces* *pristinae*spiralis)、ストレプトミセス・プリスティナエスピラリス (*Streptomyces* *viridochromogenes*)、ストレプトミセス・ビリドクロモゲネス (*Streptomyces* *viridochromogenes*)、ストレプトスポランギウム・ロセウム (*Streptosporangium* *roseum*)、ストレプトスポランギウム・ロセウム (*Streptosporangium* *roseum*)、アリサイクロバチルス・アシドカルダリウス (*Alicyclobacillus* *acidocaldarius*)、バチルス・シュードマイコイデス (*Bacillus* *pseudomycoides*)、バチルス・セレニチレデュセンス (*Bacillus* *selenitireducens*)、エキシグオバクテリウム・シビリカム (*Exiguobacterium* *sibiricum*)、ラクトバチルス・デルブルエッキイ (*Lactobacillus* *delbrueckii*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus* *salivarius*)、マイクロシーラ・マリナ (*Microscilla* *marina*)、バークホルデルリア・バクテリウム (*Burkholderiales* *bacterium*)、ポラロモナス・ナフタレニボランス (*Polaromonas* *naphthalenivorans*)、ポラロモナス種 (*Polaromonas* *sp.*)、クロコスファエラ・ワットソニ (*Crocospaera* *watsonii*)、シアノテセ種 (*Cyanothece* *sp.*)、ミクロキスティス・エルギノーサ (*Microcystis* *aeruginosa*)、シネココッカス種 (*Synechococcus* *sp.*)、アセトハロビウム アラビティカム (*Acetohalobium* *arabaticum*)、アモニフェクス・デジェンシー (*Ammonifex* *degensii*)、カルディセルロシルプター・ベシイ (*Caldicellulosiruptor* *becscii*)、カンジダ・デスルフォルディス (*Candidatus* *Desulforudis*)、クロストリジウム・ボツリヌス (*Clostridium* *botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium* *difficile*)、フィネゴルディア・マグナ (*Fin*egoldia *magna*)、ナトロアナエロビウス・サーモフィルス (*Natranaerobius* *thermophilus*)、ペロトマクラム・サーモプロピオニカム (*Pelotomaculum* *thermopropionicum*)、アシドチオバシラス・カルドゥス (*Acidithiobacillus* *caldus*)、アシドチオバシラス・フェロオキシダンス (*Acidithiobacillus* *ferrooxidans*)、アロクロマチウム・ビノサム (*Allochro*matium *vinosum*)、マリノバクター種 (*Marinobacter* *sp.*)、ニトロソコッカス・ハロフィルス (*Nitrosococcus* *halophilus*)、ニトロソコッカス・ワットソニ (*Nitrosococcus* *watsoni*)、シュードアルテ

ロモナス・ハロプランクティス (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、クテドノ
バクテル・ラセミファー (*Ktedonobacter racemifer*)、メタノハロビウム・エベス
チガツム (*Methanohalobium evestigatum*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、ノドゥラリア・スプミゲナ (*Nodularia spumigena*)、ネンジ
ユモ種 (*Nostoc* sp.)、アルスロスピラ・マキシマ (*Arthrospira maxima*)、アル
スロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)、アルスロスピラ種 (*Arthrospira* sp.)、リングビア種 (*Lyngbya* sp.)、ミクロコレウス・クトノプラステス
(*Microcoleus chthonoplastes*)、オシラトリア種 (*Oscillatoria* sp.)、ペト
ロトガ・モビリス (*Petrotoga mobilis*)、サーモシフォ・アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*)、アカリオクロリス・マリナ (*Acaryochloris marina*)、髄膜
炎菌、又はカンピロバクター・ジェジュニ由来である。Cas9ファミリーメンバーの追
10 加の例は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開
第2014/131833号に記載されている。化膿レンサ球菌からのCas9 (SpCas9) (例えば、UniProtアクセッション番号Q99ZW2が割り当てられてい
る) は、例示的なCas9タンパク質である。例示的なSpCas9タンパク質配列は、
配列番号8 (配列番号9に記載のDNA配列によってコードされている) に記載される。
例示的なSpCas9 mRNA (cDNA) 配列は、配列番号10に記載される。より
小さなCas9タンパク質 (例えば、SaCas9及びCjCas9及びNme2Cas9などのCas9及びガイドRNAのガイドRNAコード配列及び調節要素と組み合わせた
20 場合) にそのコード配列が最大AAVパッケージング容量と互換性があるCas9タンパク質) は、他の例示的なCas9タンパク質である。例えば、黄色ブドウ球菌由来のCas9 (SaCas9) (例えば、UniProtアクセッション番号J7RUA5が割り
当てられている) は、別の例示的なCas9タンパク質である。同様に、カンピロバクター・ジェジュニ由来のCas9 (CjCas9) (例えば、UniProtアクセッション
番号Q0P897が割り当てられている) は、別の例示的なCas9タンパク質である。
例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kim
et al. (2017) Nat. Commun. 8:14500を参照されたい。SaCas9は、SpCas9よりも小さく、CjCas9は、SaCas9及びSpCas9
30 の両方よりも小さい。髄膜炎菌由来のCas9 (Nme2Cas9) は、別の例示的な
Cas9タンパク質である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書
に組み込まれる、Edraki et al. (2019) Mol. Cell 73(4):714-726を参照されたい。ストレプトコッカス・サーモフィルス由来のCas9
タンパク質 (例えば、CRISPR1遺伝子座 (St1Cas9) によってコードされる
ストレプトコッカス・サーモフィルスLMD-9 Cas9又はCRISPR3遺伝子座 (St3Cas9) 由来のストレプトコッカス・サーモフィルスCas9) は、他の例
示的なCas9タンパク質である。フランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) 由来のCas9 (FnCas9) 又は代替PAM (E1369R/E
1449H/R1556A置換) を認識するRHAフランシセラ・ノビシダCas9変異
体は、他の例示的なCas9タンパク質である。これら及び他の例示的なCas9タン
40 パク質は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、C
ebrían-Serrano and Davies (2017) Mamm. Genome 28(7):247-261で概説されている。Cas9コード配列、Cas9
mRNA、及びCas9タンパク質配列の例は、国際公開第2013/176772号、
国際公開第2014/065596号、国際公開第2016/106121号、国際公開
第2019/067910号、国際公開第2020/082042号、米国特許出願公開
第2020/0270617号、国際公開第2020/082041号、米国特許出願公
開2020/0268906号、国際公開第2020/082046号、及び米国特許出
50 願公開2020/0289628号に提供されており、それらの各々は、全ての目的のため
にその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ORF及びCas9アミノ酸配列の
具体的な例は、国際公開第2019/067910号の段落[0449]の表30に提供

され、C a s 9 mRNA及びORFの具体的な例は、国際公開第2019/067910号の段落[0214]～[0234]に提供される。また、国際公開第2020/082046(A2)号(pp.84-85)及び国際公開第2020/069296号における表24も参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的なS p C a s 9タンパク質配列は、配列番号11を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。S p C a s 9タンパク質配列をコードする別の例示的なS p C a s 9 mRNA配列は、配列番号12を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。S p C a s 9タンパク質配列をコードする別の例示的なS p C a s 9 mRNA配列は、配列番号1を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。S p C a s 9タンパク質配列をコードする別の例示的なS p C a s 9 mRNA配列は、配列番号2を含む。例示的なS p C a s 9コード配列は、配列番号3を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

10

20

30

40

50

【0445】

C a sタンパク質の別の例は、C p f 1(プレボテラ(Prevotella)及びフランシセラ(Francisella)1由来のC R I S P R)タンパク質である。C p f 1は、C a s 9の対応するドメインに相同なR u v C様ヌクレアーゼドメインを、C a s 9の特徴的なアルギニンに富むクラスターの対応物と共に含有する大きなタンパク質(約1300個のアミノ酸)である。しかしながら、C p f 1は、C a s 9タンパク質に存在するH N Hヌクレアーゼドメインを欠いており、H N Hドメインを含む長いインサートを含むC a s 9とは対照的に、R u v C様ドメインは、C p f 1配列において連続している。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Z e t s c h e e t a l.(2015)C e l l 163(3):759-771を参照されたい。例示的なC p f 1タンパク質は、野兔病菌(Francisella tularensis)1、別種フランシセラ・ノビシダ(Francisella tularensis subsp.novicida)、プレボテラ・アルベンシス(Prevotella albensis)、ラクノスピラセアエ(Lachnospiraceae)菌M C 2 0 1 7 1、ブチリビブリオ・プロテオクラスティカス(Butyrivibrio proteoclasticus)、ペレグリニバクテリア菌(Peregrinibacteria bacterium)G W 2 0 1 1 _ G W A 2 _ 3 3 _ 1 0、パルクバクテリア菌(Parcubacteria bacterium)G W 2 0 1 1 _ G W C 2 _ 4 4 _ 1 7、スミセラ種(Smithella sp.)S C A D C、アシダミノコッカス種(Acidaminococcus sp.)B V 3 L 6、ラクノスピラセアエ菌M A 2 0 2 0、カンジダツス・メタノプラスマ・テルミツム(Candidatus Methanoplasma termitum)、ユウバクテリウム・エリゲンス(Eubacterium eligens)、モラクセラ・ボーボクリ(Moraxella bovoculi)237、レプトスピラ・イナダイ(Leptospira inadai)、ラクノスピラセアエ菌N D 2 0 0 6、ポルフィロモナス・クレビオリカニス(Porphyrromonas crevioricanis)3、プレボテラ・ディシエンス(Prevotella disiens)、及びポルフィロモナス・マカカエ(Porphyrromonas macacae)由来のものである。フランシセラ・ノビシダU 1 1 2由来のC p f 1(F n C p f 1、割り当てられたU n i P r o tアクセッション番号A 0 Q 7 Q 2)は、例示的なC p f 1タンパク質である。

【0446】

C a sタンパク質の別の例は、C a s X(C a s 1 2 e)である。C a s Xは、DNA中に付着二本鎖切断を生成するRNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼである。C a s Xは、1000未満のアミノ酸のサイズである。例示的なC a s Xタンパク質は、デルタプロテオバクテリア(Deltaproteobacteria)(D p b C a s X又はD p b C a s 1 2 e)及びプランクトミケス(Planctomycetes)(P l m C a s X又はP l m C a s 1 2 e)由来である。C p f 1と同様に、C a s Xは、DNA切断のために単一のR u v C活性部位を使用する。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、L i u e t a l.(2019)N a t u r e 566(7743):218-223を参照されたい。

【0447】

Cas タンパク質の別の例は、CasΦ (CasPhi 又は Cas12j) であり、これはバクテリオファージにおいて特有に見出される。CasΦ は、1000 未満のアミノ酸のサイズ (例えば、700~800 のアミノ酸) である。CasΦ 切断は、付着 5' オーバーハングを生成する。CasΦ における単一の RuvC 活性部位は、crRNA プロセシング及び DNA 切断が可能である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Pausch et al. (2020) Science 369 (6501) : 333-337 を参照されたい。

【0448】

Cas タンパク質は、野生型タンパク質 (すなわち、自然界で発生するもの)、修飾 Cas タンパク質 (すなわち、Cas タンパク質変異体)、又は野生型若しくは修飾 Cas タンパク質の断片であり得る。Cas タンパク質はまた、野生型又は修飾 Cas タンパク質の触媒活性に関して、活性な変異体又は断片であり得る。触媒活性に関する活性な変異体又は断片は、野生型若しくは修飾 Cas タンパク質又はその一部に対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を含み得、活性な変異体は、所望の切断部位で切断する能力を保持し、したがってニック誘導又は二本鎖切断誘導活性を保持する。ニック誘導又は二本鎖切断誘導活性のためのアッセイは既知であり、一般に、切断部位を含有する DNA 基質上の Cas タンパク質の全体的な活性及び特異性を測定する。

【0449】

修飾 Cas タンパク質の一例は、修飾された SpCas9-HF1 タンパク質であり、これは、非特異的 DNA 接触を減らすように設計された改変 (N497A/R661A/Q695A/Q926A) を有する化膿連鎖球菌 Cas9 の忠実度の高い変異体である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kleist et al. (2016) Nature 529 (7587) : 490-495 を参照されたい。修飾 Cas タンパク質の別の例は、オフターゲット効果を低減させるように設計された修飾 eSpCas9 変異体 (K848A/K1003A/R1060A) である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Slaymaker et al. (2016) Science 351 (6268) : 84-88 を参照されたい。他の SpCas9 変異体には、K855A 及び K810A/K1003A/R1060A が含まれる。これら及びその他の修飾 Cas タンパク質は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Cebrian-Serrano 及び Davie (2017) Mamm. Genome 28 (7) : 247-261 で概説されている。修飾 Cas9 タンパク質の別の例は、xCas9 であり、これは拡大された範囲の PAM 配列を認識し得る SpCas9 変異体である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hu et al. (2018) Nature 556 : 57-63 を参照されたい。

【0450】

Cas タンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、及び酵素活性のうちの 1 つ以上を上昇又は低下させるように修飾され得る。Cas タンパク質はまた、安定性などの、タンパク質の他の活性又は特性を変更するように修飾され得る。例えば、Cas タンパク質の 1 つ以上のヌクレアーゼドメインを修飾、欠失、又は不活性化することができる、あるいは Cas タンパク質を短縮して、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去する、又は Cas タンパク質の活性若しくは特性を最適化 (例えば、増強又は低減) することができる。

【0451】

Cas タンパク質は、DNase ドメインなどの少なくとも 1 つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型 Cpf1 タンパク質は、一般に、おそらく二量体立体配座で、標的 DNA の両方の鎖を切断する RuvC 様ドメインを含む。同様に、CasX 及び CasΦ は、一般に、標的 DNA の両方の鎖を切断する単一の RuvC 様ドメインを含む。Cas タンパク質はまた、DNase ドメインなどの少なくとも 2 つのヌクレアーゼド

メインを含み得る。例えば、野生型 Cas9 タンパク質は、一般に、RuvC 様ヌクレアーゼドメイン及び HNH 様ヌクレアーゼドメインを含む。RuvC ドメイン及び HNH ドメインは各々、二本鎖 DNA の異なる鎖を切断して、DNA に二本鎖切断を行い得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Jinek et al. (2012) Science 337 (6096) : 816-821 を参照されたい。

【0452】

もはや機能的でなくなるか、又は低減したヌクレアーゼ活性を低減するように、ヌクレアーゼドメインの1つ以上を欠失又は変異させ得る。例えば、Cas9 タンパク質でヌクレアーゼドメインのうちの1つが欠失又は変異している場合、得られる Cas9 タンパク質はニッカーゼと称され得、二本鎖標的 DNA 内で一本鎖切断を生成できるが、二本鎖切断は生成できない（すなわち、相補的鎖又は非相補的鎖を切断することができるが、両方を切断することはできない）。Cas9 タンパク質でヌクレアーゼドメインのいずれも欠失又は変異していない場合、Cas9 タンパク質は二本鎖切断誘導活性を保持する。Cas9 をニッカーゼに変換する突然変異の例は、化膿レンサ球菌由来の Cas9 の RuvC ドメインにおける D10A (Cas9 の位置 10 におけるアラニンからアスパラギン酸への) 突然変異である。同様に、化膿レンサ球菌由来の Cas9 の HNH ドメインにおける H939A (アミノ酸位置 839 におけるヒスチジンからアラニンへ)、H840A (アミノ酸位置 840 におけるヒスチジンからアラニン)、又は N863A (アミノ酸位置 N863 におけるアスパラギンからアラニン) は、Cas9 をニッカーゼに変換することができる。Cas9 をニッカーゼに変換する突然変異の他の例としては、S. サーマフィリス由来の Cas9 に対する対応する突然変異が挙げられる。例えば、Saprunauskas et al. (2011) Nucleic Acids Res. 39 (21) : 9275-9282 及び国際公開第 2013/141680 号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような突然変異は、部位特異的変異誘発、PCR 媒介変異誘発、又は全遺伝子合成などの方法を使用して生成され得る。ニッカーゼを作製する他の突然変異の例は、例えば、国際公開第 2013/176772 号及び同第 2013/142578 号に見出すことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0453】

x Cas9 の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例は、SpCas9 について上に記載されるものと同じである。黄色ブドウ球菌 Cas9 タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も公知である。例えば、黄色ブドウ球菌 Cas9 酵素 (SxCas9) は、Cas ニッカーゼを生成するために、位置 N580 での置換 (例えば、N580A 置換) 又は位置 D10 での置換 (例えば、D10A 置換) を含んでもよい。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2016/106236 号を参照されたい。Nme2Cas9 の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である (例えば、D16A 又は H588A)。St1Cas9 の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である (例えば、D9A、D598A、H599A、又は N622A)。St3Cas9 の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である (例えば、D10A 又は N870A)。CjCas9 の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である (例えば、D8A 又は H559A の組み合わせ)。FnCas9 及び RHA FnCas9 の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である (例えば、N995A)。

【0454】

Cpf1 タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である。フランシセラ・ノビシダ U112 (FnCpf1)、アシダミノコッカス種 BV3L6 (AsCpf1)、ラクノスピラセアエ菌細菌 ND2006 (LbCpf1)、及びモラクセラ・ボーボクリ 237 (MbCpf1 Cpf1) 由来の Cpf1 タンパク質に関して、そのような突然変異は、AsCpf1 の位置 908、993 又は 1263 あるいは Cpf1

オルソログ中の対応する位置、あるいはL b C p f 1の位置8 3 2、9 2 5、9 4 7又は1 1 8 0あるいはC p f 1オルソログ中の対応する位置における突然変異を含み得る。そのような突然変異は、例えば、A s C p f 1の突然変異D 9 0 8 A、E 9 9 3 A、及びD 1 2 6 3 A若しくはC p f 1オルソログにおける対応する突然変異、又はL b C p f 1のD 8 3 2 A、E 9 2 5 A、D 9 4 7 A、及びD 1 1 8 0 A若しくはC p f 1オルソログにおける対応する突然変異のうちの1つ以上を含み得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2 0 1 6 / 0 2 0 8 2 4 3号を参照されたい。

【0 4 5 5】

C a s Xタンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である。デルタプロテオバクテリア由来のC a s Xタンパク質に関して、D 6 7 2 A、E 7 6 9 A、及びD 9 3 5 A（個々に又は組み合わせて）又は他のC a s Xオルソログにおける対応する位置は、不活性化されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、L i u e t a l. (2 0 1 9) N a t u r e 5 6 6 (7 7 4 3) : 2 1 8 - 2 2 3を参照されたい。

10

【0 4 5 6】

C a s φタンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である。例えば、D 3 7 1 A及びD 3 9 4 Aは、単独で又は組み合わせて、不活性化突然変異である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、P a u s c h e t a l. (2 0 2 0) S c i e n c e 3 6 9 (6 5 0 1) : 3 3 3 - 3 3 7を参照されたい。

20

【0 4 5 7】

C a sタンパク質はまた、融合タンパク質として異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。例えば、C a sタンパク質を切断ドメインに融合させ得る。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2 0 1 4 / 0 8 9 2 9 0号を参照されたく、C a sタンパク質はまた、安定性の上昇又は低下を提供する異種ポリペプチドに融合させることができる。融合ドメイン又は異種ポリペプチドは、N末端、C末端、又はC a sタンパク質内に内部的に位置し得る。

【0 4 5 8】

一例として、C a sタンパク質は、細胞内局在化を提供する1つ以上の異種ポリペプチドに融合させ得る。そのような異種ポリペプチドは、例えば、核を標的とするための単一部分S V 4 0 N L S及び／又は二部分アルファインポーチンN L Sなどの1つ以上の核局在化シグナル（N L S）、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、E R保持シグナルなどを含み得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、L a n g e e t a l. (2 0 0 7) J. B i o l. C h e m. 2 8 2 (8) : 5 1 0 1 - 5 1 0 5を参照されたい。そのような細胞内局在化シグナルは、N末端、C末端、又はC a sタンパク質内のどこにでも配置され得る。N L Sは、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単一部分配列又は二部分配列であり得る。任意選択的に、C a sタンパク質は、N末端にN L S（例えば、αインポーチンN L S又は単一部分N L S）及びC末端にN L S（例えば、S V 4 0 N L S又は二部分N L S）を含む2つ以上のN L Sを含み得る。C a sタンパク質はまた、N末端に2つ以上のN L S及び／又はC末端に2つ以上のN L Sを含み得る。

30

40

【0 4 5 9】

C a sタンパク質は、例えば、1～1 0個のN L Sと融合され得る（例えば、1～5つのN L Sと融合される、1つのN L Sと融合され得る）。1つのN L Sが使用される場合、N L Sは、C a sタンパク質配列のN末端又はC末端で連結されてもよい。N L Sはまた、C a sタンパク質配列内に挿入されてもよい。代替的に、C a sタンパク質は、2つ以上のN L Sと融合されてもよい。例えば、C a sタンパク質は、2、3、4、又は5つのN L Sと融合されてもよい。具体的な例では、C a sタンパク質は、2つのN L Sと融合されてもよい。特定の状況では、2つのN L Sは、同じ（例えば、2つのS V 4 0 N

50

L S)又は異なってもよい。例えば、C a s タンパク質は、カルボキシ末端で連結された2つのS V 4 0 N L S 配列に融合され得る。代替的に、C a s タンパク質は、2つのN L S と融合され、1つはN末端で、1つはC末端で連結されてもよい。他の例では、C a s タンパク質は、3つのN L S と融合され得る、又はN L S なしで融合され得る。N L S は、単一部分配列、例えば、S V 4 0 N L S、P K K K R K V (配列番号13)又はP K K K R R V (配列番号14)であってもよい。N L S は、二部分配列、例えば、ヌクレオプラスミンのN L S、K R P A A T K K A G Q A K K K K (配列番号15)であってもよい。具体的な例では、単一P K K K R K V (配列番号13) N L S は、C a s タンパク質のC末端に連結され得る。1つ以上のリンカーは、融合部位に任意選択的に含まれる。

10

【0460】

C a s タンパク質はまた、細胞透過性ドメイン又はタンパク質導入ドメインに作動可能に連結され得る。例えば、細胞透過性ドメインは、H I V - 1 T A T タンパク質、ヒトB型肝炎ウイルス由来のT L M細胞透過性モチーフ、M P G、P e p - 1、V P 2 2、単純ヘルペスウイルス由来の細胞透過性ペプチド、又はポリアルギニンペプチド配列に由来し得る。例えば、国際公開第2014/089290号及び同第2013/176772号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。細胞透過性ドメインは、N末端、C末端、又はC a s タンパク質内のどこにでも位置し得る。

20

【0461】

C a s タンパク質はまた、追跡又は精製を容易にするために、蛍光タンパク質、精製タグ、又はエピトープタグなどの異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質 (例えば、G F P、G F P - 2、t a g G F P、t u r b o G F P、e G F P、E m e r a l d、A z a m i G r e e n、M o n o m e r i c A z a m i G r e e n、C o p G F P、A c e G F P、Z s G r e e n l)、黄色蛍光タンパク質 (例えば、Y F P、e Y F P、C i t r i n e、V e n u s、Y P e t、P h i Y F P、Z s Y e l l o w l)、青色蛍光タンパク質 (例えば、e B F P、e B F P 2、A z u r i t e、m K a l a m a l、G F P u v、S a p p h i r e、T - s a p p h i r e)、シアン蛍光タンパク質 (例えば、e C F P、C e r u l e a n、C y P e t、A m C y a n l、M i d o r i i s h i - C y a n)、赤色蛍光タンパク質 (例えば、m K a t e、m K a t e 2、m P l u m、D s R e d 単量体、m C h e r r y、m R F P 1、D s R e d - E x p r e s s、D s R e d 2、D s R e d - M o n o m e r、H c R e d - T a n d e m、H c R e d l、A s R e d 2、e q F P 6 1 1、m R a s p b e r r y、m S t r a w b e r r y、J r e d)、オレンジ色蛍光タンパク質 (例えば、m O r a n g e、m K O、K u s a b i r a - O r a n g e、M o n o m e r i c K u s a b i r a - O r a n g e、m T a n g e r i n e、t d T o m a t o)、及び任意の他の好適な蛍光タンパク質が含まれる。タグの例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase、G S T)、キチン結合タンパク質 (chitin binding protein、C B P)、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン (thioredoxin、T R X)、ポリ (N A N P)、タンデムアフィニティー精製 (tandem affinity purification、T A P) タグ、m y c、A c V 5、A U 1、A U 5、E、E C S、E 2、F L A G、ヘマグルチニン (hemagglutinin、H A)、n u s、S o f t a g 1、S o f t a g 3、S t r e p、S B P、G l u - G l u、H S V、K T 3、S、S 1、T 7、V 5、V S V - G、ヒスチジン (histidine、H i s)、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質 (biotin carboxyl carrier protein、B C C P)、及びカルモジュリンが含まれる。

30

40

【0462】

C a s タンパク質はまた、標識された核酸にテザリングされ得る。そのようなテザリング (すなわち、物理的連結) は、共有相互作用若しくは非共有相互作用を介して達成され得、テザリングは、直接 (例えば、タンパク質又はインテイン修飾上のシステイン又はリ

50

ジン残基の修飾によって達成することができる直接融合又は化学的結合を介して）、又はストレプトアビジン若しくはアプタマーなどの1つ以上の介在するリンカー又はアダプター分子を介して達成され得る。例えば、Pierce et al. (2005) *Mini Rev. Med. Chem.* 5 (1) : 41-55; Duckworth et al. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (46) : 8819-8822; Schaeffer and Dixon (2009) *Australian J. Chem.* 62 (10) : 1328-1332; Goodman et al. (2009) *Chembiochem.* 10 (9) : 1551-1557、及びKhatwani et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem.* 20 (14) : 4532-4539を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質-核酸コンジュゲートを合成するための非共有戦略には、ビオチン-ストレプトアビジン及びニッケル-ヒスチジン法が含まれる。共有結合タンパク質-核酸コンジュゲートは、様々な化学物質を使用して適切に機能化された核酸とタンパク質を接続することによって合成できる。これらの化学物質のいくつかは、タンパク質表面のアミノ酸残基（例えば、リジンアミン又はシステインチオール）へのオリゴヌクレオチドの直接結合を含むが、他のより複雑なスキームは、タンパク質の翻訳後修飾又は触媒若しくは反応性タンパク質ドメインの関与を必要とする。タンパク質の核酸への共有結合の方法には、例えば、オリゴヌクレオチドのタンパク質リジン又はシステイン残基への化学的架橋、発現されたタンパク質ライゲーション、化学酵素的な方法、及び光アプタマーの使用が含まれ得る。標識された核酸は、Casタンパク質のC末端、N末端、又は内部領域にテザリングされ得る。一例では、標識された核酸は、Casタンパク質のC末端又はN末端にテザリングされる。同様に、Casタンパク質は、標識された核酸の5'末端、3'末端、又は内部領域にテザリングされ得る。すなわち、標識された核酸は、任意の向き及び極性でテザリングされ得る。例えば、Casタンパク質は、標識された核酸の5'末端又は3'末端にテザリングされ得る。

10

20

30

40

50

【0463】

Casタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、Casタンパク質は、gRNAと複合体を形成したCasタンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、Casタンパク質は、RNA（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA））又はDNAなどの、Casタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意選択的に、Casタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。例えば、Casタンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへ修飾され得る。Casタンパク質をコードする核酸が細胞に導入されると、Casタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構造的に細胞内で発現され得る。

【0464】

Casタンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定して組み込まれ、細胞内で活性のあるプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、Casタンパク質をコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子又は他の目的の核酸配列（例えば、Cas遺伝子）の発現を指示することができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移入することができる任意の核酸構築物を含む。例えば、Casタンパク質をコードする核酸は、gRNAをコードするDNAを含むベクター内に存在し得る。代替的に、核酸は、gRNAをコードするDNAを含むベクターとは別個であるベクター又はプラスミド内にあり得る。発現構築物で使用され得るプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（embryonic stem、ES）細胞、成体幹細胞、発達の制限された前駆細胞、誘導多能性幹（induced pluripotent stem、iPS）細胞、又は1細胞期胚のうちの1つ以上において活性な

プロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、又は組織特異的プロモーターであり得る。任意選択的に、プロモーターは、一方向のC a sタンパク質及び他の方向のガイドRNAの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであり得る。そのような双方向プロモーターは、(1)遠位配列要素(D S E)、近位配列要素(P S E)、及びT A T Aボックスの3つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向P o l I I Iプロモーター、並びに(2)D S Eの5'末端に逆方向に融合されたP S E及びT A T Aボックスを含む第2の基本的なP o l I I Iプロモーターからなり得る。例えば、H 1プロモーターでは、D S EはP S E及びT A T Aボックスに隣接しており、プロモーターは、U 6プロモーターに由来するP S E及びT A T Aボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2 0 1 6 / 0 0 7 4 5 3 5号を参照されたい。双方向プロモーターを使用してC a sタンパク質及びガイドRNAをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることを可能にする。好ましい実施形態では、プロモーターは、ヒトにおける使用について規制当局によって承認されている。特定の実施形態では、プロモーターは、肝臓細胞における発現を駆動する。

10

【0465】

様々なプロモーターを使用して、C a s発現又はC a s 9発現を駆動できる。いくつかの方法では、C a s又はC a s 9コード配列がA A V構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。例えば、C a s又はC a s 9及び1つ以上のg R N A(例えば、1つのg R N A又は2つのg R N A又は3つのg R N A又は4つのg R N A)は、L N P媒介送達(例えば、RNAの形態)又はアデノ随伴ウイルス(A A V)媒介送達(例えば、A A V 2媒介送達、A A V 5媒介送達、A A V 8媒介送達又はA A V 7 m 8媒介送達)を介して送達され得る。例えば、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s 9であり得、内因性ヒトA L B遺伝子座のイントロン1を標的とするC a s 9 m R N A及びg R N Aは、L N P媒介送達又はA A V媒介送達を介して送達され得る。C a s又はC a s 9及びg R N A(複数可)は、単一のA A Vにおいて、又は2つの別個のA A Vを介して送達され得る。例えば、第1のA A Vは、C a s又はC a s 9発現カセットを担持し得、第2のA A Vは、g R N A発現カセットを担持し得る。同様に、第1のA A Vは、C a s又はC a s 9発現カセットを担持し、第2のA A Vは、2つ以上のg R N A発現カセットを担持し得る。代替的に、単一のA A Vは、C a s又はC a s 9発現カセット(例えば、プロモーターに作動可能に連結されたC a s又はC a s 9コード配列)及びg R N A発現カセット(例えば、プロモーターに作動可能に連結されたg R N Aコード配列)を担持し得る。同様に、単一のA A Vは、C a s又はC a s 9発現カセット(例えば、プロモーターに作動可能に連結されたC a s又はC a s 9コード配列)及び2つ以上のg R N A発現カセット(例えば、プロモーターに作動可能に連結されたg R N Aコード配列)を担持し得る。U 6プロモーター又は小さなt R N A G l nなど、様々なプロモーターを使用してg R N Aの発現が駆動され得る。同様に、C a s 9の発現を駆動するために様々なプロモーターが使用され得る。例えば、C a s 9コード配列がA A V構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。同様に、小さなC a s 9タンパク質(例えば、S a C a s 9又はC j C a s 9を使用して、A A Vパッケージング容量を最大化する)。

20

30

40

【0466】

m R N Aとして提供されるC a sタンパク質は、安定性及び／又は免疫原性の特性を改善するために修飾され得る。修飾は、m R N A内の1つ以上のヌクレオシドに対して行われてもよい。m R N A核酸塩基への化学修飾の例としては、シュードウリジン、1-メチルシュードウリジン、及び5-メチルシチジンが挙げられる。C a sタンパク質をコードするm R N Aはまたキャップされ得る。キャップは、例えば、+ 1リボヌクレオチドがリボースの2' O位置でメチル化されているキャップ1構造であり得る。キャッピング

50

は、例えば、（例えば、天然のキャップを模倣することによって）インビボで優れた活性を与え、宿主の自然免疫系の刺激を低減する天然の構造をもたらし得る（例えば、自然免疫系におけるパターン認識受容体の活性化を低減し得る）。Cas タンパク質をコードする mRNA は、（ポリ（A）テールを含むように）ポリアデニル化され得る。Cas タンパク質をコードする mRNA はまた、シュードウリジンを含むように修飾され得る（例えば、シュードウリジンで完全に置換され得る）。別の例として、N1-メチル-シュードウリジンを含有するキャップ及びポリアデニル化された Cas mRNA が使用され得る。Cas タンパク質をコードする mRNA は、N1-メチル-シュードウリジンを含むようにも修飾され得る（例えば、N1-メチル-シュードウリジンで完全に置換され得る）。別の例として、シュードウリジンで完全に置換された Cas mRNA が使用され得る（すなわち、全ての標準的なウラシル残基は、ウラシルが窒素-炭素ではなく炭素-炭素結合で結合しているウリジン異性体であるシュードウリジンで置換される）。別の例として、N1-メチル-シュードウリジンで完全に置換された Cas mRNA が使用され得る（すなわち、全ての標準ウラシル残基が N1-メチル-シュードウリジンで置換される）。同様に、Cas mRNA は、同義のコドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。例えば、シュードウリジンで完全に置換された、キャップされポリアデニル化された Cas mRNA が使用され得る。例えば、N1-メチル-シュードウリジンで完全に置換された、キャップされ及びポリアデニル化された Cas mRNA が使用され得る。

10

20

30

50

【0467】

Cas mRNA は、少なくとも1つ、複数、又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含み得る。修飾ウリジンは、5位で（例えば、ハロゲン、メチル、又はエチルで）修飾されたウリジンであり得る。修飾ウリジンは、1位で（例えば、ハロゲン、メチル、又はエチルで）修飾されたシュードウリジンであり得る。修飾ウリジンは、例えば、シュードウリジン、N1-メチル-シュードウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、又はそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、修飾ウリジンは、5-メトキシウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、N1-メチル-シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンとN1-メチル-シュードウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、N1-メチルシュードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンとN1-メチル-シュードウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンと5-ヨードウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。

【0468】

本明細書に開示される Cas mRNA はまた、Cap0、Cap1、又はCap2などの5'キャップを含み得る。5'キャップは、一般に、5'-三リン酸を介して、mRNAの5'から3'鎖の最初のヌクレオチドの5'位（すなわち、最初のキャップ近位ヌクレオチド）に連結された7-メチルグアニリボヌクレオチド（例えば、ARCAに関して更に修飾され得る）である。Cap0では、mRNAの第1及び第2のキャップ近位ヌクレオチドのリボースは両方とも、2'-ヒドロキシルを含む。Cap1では、mRNAの第1及び第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、2'-メトキシ及び2'-ヒドロキシルを含む。Cap2では、mRNAの第1及び第2のキャップ近位ヌクレオチドのリボースは両方とも、2'-メトキシを含む。例えば、Katibah et al. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111 (33): 12025-30、及び Abbas et al. (2017) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114 (11): E2106-E2115を参照されたく、そ

これらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ヒト mRNA などの哺乳動物 mRNA を含むほとんどの内因性高等真核生物 mRNA は、Cap 1 又は Cap 2 を含む。Cap 1 及び Cap 2 とは異なる Cap 0 及び他のキャップ構造は、IFIT-1 及び IFIT-5 などの自然免疫系の構成要素によって非自己として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物では免疫原性であり得、I 型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こす可能性がある。IFIT-1 及び IFIT-5 などの自然免疫系の成分も eIF4E と競合して、mRNA と Cap 1 又は Cap 2 以外のキャップとの結合を競合し、mRNA の翻訳を阻害する可能性がある。

【0469】

キャップは、共転写的に含まれ得る。例えば、ARCA (アンチリバースキャップアナログ、Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 AM8045) は、グアニリボヌクレオチドの 5' 位に連結された 7-メチルグアニン 3'-メトキシ-5'-三リン酸を含むキャップ類似体であり、開始時に転写物にインビトロで組み込まれ得る。ARCA は、最初のキャップ近位ヌクレオチドの 2' 位がヒドロキシルである Cap 0 キャップをもたらす。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Stepinski et al. (2001) RNA 7:1486-1495 を参照されたい。

【0470】

CleanCap (商標) AG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeA) pG; TriLink Biotechnologies、カタログ番号 N-7113) 又は CleanCap (商標) GG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeG) pG; TriLink Biotechnologies、カタログ番号 N-7133) を使用して、Cap 1 構造を共転写的に提供し得る。CleanCap (商標) AG 及び CleanCap (商標) GG の 3'-O-メチル化バージョンはまた、それぞれ、カタログ番号 N-7413 及び N-7433 として TriLink Biotechnologies から入手可能である。

【0471】

代替的に、転写後にキャップが RNA に追加され得る。例えば、ワクシニアキャッピング酵素は、市販されており (New England Biolabs、カタログ番号 M2080S)、その D1 サブユニットによって提供される RNA トリホスファターゼ及びグアニリルトランスフェラーゼ活性、並びにその D12 サブユニットによって提供されるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、S-アデノシルメチオニン及び GTP の存在下で、RNA に 7-メチルグアニンを付加して Cap 0 を与えることができる。例えば、Guo and Moss (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:4023-4027 及び Mao and Shuman (1994) J. Biol. Chem. 269:24472-24479 を参照されたく、これらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0472】

Cas mRNA は、ポリアデニル化 (ポリ A 又はポリ (A) 又はポリアデニン) テールを更に含み得る。ポリ A テールは、例えば、少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、又は少なくとも 100 個のアデニン、及び任意選択的に最大 300 個のアデニンを含む。例えば、ポリ A テールは、95 個、96 個、97 個、98 個、99 個、又は 100 個のアデニンヌクレオチドを含み得る。

【0473】

(3) ガイド RNA

「ガイド RNA」又は「gRNA」は、Cas タンパク質 (例えば、Cas9 タンパク質) に結合し、かつ Cas タンパク質を標的 DNA 内の特定の位置に標的化する RNA 分子である。ガイド RNA は、2つのセグメント: 「DNA 標的化セグメント」 (「ガイド配列」とも呼ばれる) 及び「タンパク質結合セグメント」を含み得る。「セグメント」は

、分子のセクション又は領域、例えば、RNA中のヌクレオチドの連続範囲を含む。Cas9についてのものなどのいくつかのgRNAは、2つの別個のRNA分子：「アクチベーターRNA」（例えば、tracrRNA）及び「ターゲットRNA」（例えば、CRISPR RNA又はcrRNA）を含み得る。他のgRNAは、単一のRNA分子（単一のRNAポリヌクレオチド）であり、これは「単一分子gRNA」、「単一ガイドRNA」、又は「sgRNA」とも呼ばれ得る。例えば、国際公開第2013/176772号、国際公開第2014/065596号、国際公開第2014/089290号、国際公開第2014/093622号、国際公開第2014/099750号、国際公開第2013/142578号、及び国際公開第2014/131833号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ガイドRNAは、CRISPR RNA (crRNA) 又はcrRNAとトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) との組み合わせのいずれかを指し得る。crRNA及びtracrRNAは、単一のRNA分子（単一ガイドRNA又はsgRNA）として、又は2つの別個のRNA分子（二重ガイドRNA又はdgRNA）において関連付けられ得る。例えば、Cas9の場合、単一ガイドRNAは、（例えば、リンカーを介して）tracrRNAに融合されたcrRNAを含み得る。例えば、Cpf1及びCasφの場合、標的配列への結合を達成するために必要なのはcrRNAだけである。「ガイドRNA」及び「gRNA」という用語は、二重分子（すなわち、モジュラー）gRNA及び単一分子gRNAの両方を含む。本明細書に開示される方法及び組成物のうちのいくつかでは、gRNAは、化膿レンサ球菌Cas9 gRNA又はその同等物である。本明細書に開示される方法及び組成物のうちのいくつかでは、gRNAは、黄色ブドウ球菌Cas9 gRNA又はその同等物である。

10

20

30

40

50

【0474】

例示的な2分子gRNAは、crRNA様（「CRISPR RNA」又は「ターゲットRNA」又は「crRNA」又は「crRNAリピート」）分子及び対応するtracrRNA様（「トランス活性化CRISPR RNA」又は「アクチベーターRNA」又は「tracrRNA」）分子を含む。crRNAは、gRNAのDNA標的化セグメント（一本鎖）、及びgRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖の半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。DNA標的化セグメントの下流（3'）に位置するcrRNAテール（例えば、化膿レンサ球菌Cas9と共に使用するための）の例は、GUUUUAGAGCUAUGCUG（配列番号16）又はGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG（配列番号17）を含む、それらが本質的になる、又はそれからなる。本明細書に開示されるDNA標的化セグメントのいずれかは、配列番号16又は17の5'末端に結合して、crRNAを形成し得る。

【0475】

対応するtracrRNA（アクチベーターRNA）は、gRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖の他の半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。crRNAのヌクレオチドのストレッチは、tracrRNAのヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それをハイブリダイズして、gRNAのタンパク質結合ドメインのdsRNA二重鎖を形成する。したがって、各crRNAは、対応するtracrRNAを有すると言われ得る。tracrRNA配列（例えば、化膿レンサ球菌Cas9と共に使用するための）の例は、AGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号18）、AAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号19）、又はGUUGGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGC（配列番号20）のいずれかを含む、それから本質的になる、又はそれからなる。

【0476】

c r R N A 及び t r a c r R N A の両方が必要とされる系では、c r R N A 及び対応する t r a c r R N A は、ハイブリダイズして g R N A を形成する。c r R N A のみが必要な系では、c r R N A は g R N A であり得る。c r R N A は追加的に、標的 D N A の相補的鎖にハイブリダイズする一本鎖 D N A 標的化セグメントを提供する。細胞内での修飾に使用する場合、所与の c r R N A 又は t r a c r R N A 分子の正確な配列は、R N A 分子が使用される種に特異的になるように設計され得る。例えば、M a l i e t a l . (2 0 1 3) S c i e n c e 3 3 9 (6 1 2 1) : 8 2 3 - 8 2 6 、 J i n e k e t a l . (2 0 1 2) S c i e n c e 3 3 7 (6 0 9 6) : 8 1 6 - 8 2 1 、 H w a n g e t a l . (2 0 1 3) N a t . B i o t e c h n o l . 3 1 (3) : 2 2 7 - 2 2 9 、 J i a n g e t a l . (2 0 1 3) N a t . B i o t e c h n o l . 3 1 (3) : 2 3 3 - 2 3 9 、及び C o n g e t a l . (2 0 1 3) S c i e n c e 3 3 9 (6 1 2 1) : 8 1 9 - 8 2 3 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 0 4 7 7 】

所与の g R N A の D N A 標的化セグメント (c r R N A) は、以下により詳細に記載するように、標的 D N A の相補的鎖上の配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。g R N A の D N A 標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション (すなわち、塩基対合) を介して配列特異的様式で標的 D N A と相互作用する。したがって、D N A 標的化セグメントのヌクレオチド配列は変動し、g R N A 及び標的 D N A が相互作用する標的 D N A 内の位置を決定することができる。目的の g R N A の D N A 標的化セグメントは、標的 D N A 内の任意の所望の配列にハイブリダイズするように修飾され得る。天然に存在する c r R N A は、C R I S P R / C a s 系及び生物に応じて異なるが、21~46ヌクレオチド長の2つの直接反復 (direct repeat、D R) が隣接する、21~72ヌクレオチド長の標的化セグメントを含有することが多い (例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 1 4 / 1 3 1 8 3 3 号を参照されたい)。化膿レンサ球菌の場合、D R は 3 6ヌクレオチド長であり、標的化セグメントは 3 0ヌクレオチド長である。3' に位置する D R は、対応する t r a c r R N A に相補的であり、ハイブリダイズし、これが次に、C a s タンパク質に結合する。

20

【 0 4 7 8 】

D N A 標的化セグメントは、例えば、少なくとも約 1 2、少なくとも約 1 5、少なくとも約 1 7、少なくとも約 1 8、少なくとも約 1 9、少なくとも約 2 0、少なくとも約 2 5、少なくとも約 3 0、少なくとも約 3 5、又は少なくとも約 4 0 のヌクレオチド長を有し得る。そのような D N A 標的化セグメントは、例えば、約 1 2 ~ 約 1 0 0、約 1 2 ~ 約 8 0、約 1 2 ~ 約 5 0、約 1 2 ~ 約 4 0、約 1 2 ~ 約 3 0、約 1 2 ~ 約 2 5、又は約 1 2 ~ 約 2 0ヌクレオチド長を有し得る。例えば、D N A 標的化セグメントは、約 1 5 ~ 約 2 5 個のヌクレオチド (例えば、約 1 7 ~ 約 2 0 個のヌクレオチド、又は約 1 7 個、1 8 個、1 9 個、若しくは 2 0 個のヌクレオチド) であり得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 2 4 5 2 3 号を参照されたい。化膿レンサ球菌由来の C a s 9 の場合、典型的な D N A 標的化セグメントは、1 6 ~ 2 0ヌクレオチド長、又は 1 7 ~ 2 0ヌクレオチド長である。黄色ブドウ球菌由来の C a s 9 の場合、典型的な D N A 標的化セグメントは、2 1 ~ 2 3ヌクレオチド長である。C p f 1 の場合、典型的な D N A 標的化セグメントは、少なくとも 1 6ヌクレオチド長又は少なくとも 1 8ヌクレオチド長である。

30

40

【 0 4 7 9 】

一例では、D N A 標的化セグメントは、約 2 0ヌクレオチド長であり得る。しかしながら、より短い配列及びより長い配列も標的化セグメントに使用することができる (例えば、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、又は 2 5ヌクレオチド長などの、1 5 ~ 2 5ヌクレオチド長)。D N A 標的化セグメントと対応するガイド R N A 標的配列との間の同一性の程度 (又は D N A 標的化セグメントとガイド R N A 標的配列の他の鎖との間の相補性の程度) は、例えば、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0

50

%、又は100%であり得る。DNA標的化セグメント及び対応するガイドRNA標的配列には、1つ以上のミスマッチが含まれ得る。例えば、ガイドRNAのDNA標的化セグメント及び対応するガイドRNA標的配列には、1～4、1～3、1～2、1、2、3、又は4つのミスマッチが含まれ得る（例えば、ガイドRNA標的配列の全長が、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個以上のヌクレオチドである）。例えば、ガイドRNAのDNA標的化セグメント及び対応するガイドRNA標的配列には、ガイドRNA標的配列の全長が、20ヌクレオチドである、1～4、1～3、1～2、1、2、3、又は4つのミスマッチが含まれ得る。

【0480】

一例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）から3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30～61のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドから3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。

【0481】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少な

くとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）と少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）から3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36、30、33、及び41のいずれかに記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドから3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。

10

20

30

40

50

【0482】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）から3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号36に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドから3個以下、2個以下、又は1個以下のヌク

レオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。

【0483】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）から3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号30に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドから3個以下、2個以下、又は1個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。

【0484】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号33に記載の配列（DNA標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号33に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む、それから本質的になる、又はそれからなるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号33に記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号33に記載の配列（DNA標的化セグメント）に対して少なくとも90%又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号33に記載の配列（DNA標的化セグメント）の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%同一であるDNA標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトA

L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 33 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 33 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなる DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 33 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドから 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなる DNA 標的化セグメントを含み得る。

10

【0485】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) を含む、それから本質的になる、又はそれからなる DNA 標的化セグメント (すなわち、ガイド配列) を含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドを含む、それから本質的になる、又はそれからなる DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) に対して少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% 同一である DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) に対して少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% 同一である DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドから 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなる DNA 標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 41 に記載の配列 (DNA 標的化セグメント) の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、又は少なくとも 20 個の連続ヌクレオチドから 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなる DNA 標的化セグメントを含み得る。

20

30

40

【0486】

50

【表 2】

表 2 ヒト A L B イントロン 1 ガイド配列

ガイド配列	配列番号:
GAGCAACCUCACUCUUGUCU	30
AUGCAUUUGUUUCAAUAU	31
UGCAUUUGUUUCAAUAUU	32
AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	33
GAUCAACAGCACAGGUUUUG	34
UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	35
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	36
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	37
UACUAAAACUUUAUUUUACU	38
AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	39
AAUGCAUAAUCUAAGUCAA	40
UAAUAAAAUCAAACAUCU	41
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUU	42
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	43
UGUAUUUGUGAAGUCUUACA	44
UCCUAGGUAAAAAAAAAAAAA	45
UAAUUUUUCUUUUGCGCACUA	46
UGACUGAAACUUCACAGAAU	47
GACUGAAACUUCACAGAAUA	48
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	49
AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	50
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	51
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	52
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	53
UUACUAAAACUUUAUUUUAC	54
ACCUUUUUUUUUUUUUUACCU	55
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	56
UGAUUCCUACAGAAAAACUC	57
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	58
CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	59
ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	60
UGAGCAACCUCACUCUUGUC	61

10

20

30

【 0 4 8 7 】

40

50

【表 3 - 1】

表 3 ヒト ALB イントロン 1 s g RNA 配列

完全配列	修飾された完全配列
GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 62)	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 94)
AUGCAUUUGUUUCAAUAUUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 63)	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAUAUUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 95)
UGCAUUUGUUUCAAUAUUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 64)	mU*mG*mC*AUUUUGUUUCAAUAUUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 96)
AUUUAUGAGAUAACAGCAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 65)	mA*mU*mU*UAUGAGAUAACAGCAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 97)
GAUCAACAGCACAGUUUUGGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 66)	mG*mA*mU*CAACAGCACAGUUUUGGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 98)
UUAAAUAAAGCAUAGUGCAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 67)	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 99)
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 68)	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 100)
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 69)	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 101)
UACUAAAACUUUAUUUUACUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 70)	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 102)
AAAGUUGAACAAUAGAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UU (配列番号 71)	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 103)
AAUGCAUAAUCUAAAGUCAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 72)	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAAGUCAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 104)

10

20

30

40

【 0 4 8 8 】

【表 3 - 2】

(表 3 の続き)

完全配列	修飾された完全配列
UAAUAAAAUUCAAACAUCCUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 73)	mU*mA*mA*UAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 105)
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 74)	mG*mC*mA*UCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 106)
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 75)	mU*mU*mU*GGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 107)
UGUAUUUGUGAAGUCUUACAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 76)	mU*mG*mU*AUUUGUGAAGUCUUACAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 108)
UCCUAGGUAAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UU (配列番号 77)	mU*mC*mC*UAGGUAAAAAAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 109)
UAAUUUUUUUGCGCACUAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 78)	mU*mA*mA*UUUUUUUUUGCGCACUAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 110)
UGACUGAAACUUCACAGAAUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 79)	mU*mG*mA*CUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 111)
GACUGAAACUUCACAGAAUAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 80)	mG*mA*mC*UGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 112)
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 81)	mU*mU*mC*AUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 113)
AUAUUCUAAGUUUGAAUAUAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 82)	mA*mU*mU*AUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 114)
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号 83)	mA*mA*mU*UUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 115)

10

20

30

40

【 0 4 8 9 】

【表 3 - 3】

(表 3 の続き)

完全配列	修飾された完全配列
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号84)	mU*mG*mA*AUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号116)
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号85)	mA*mU*mC*AUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号117)
UUACUAAAACUUUAUUUUACGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号86)	mU*mU*mA*CUAAAACUUUAUUUUACGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号118)
ACCUUUUUUUUUUUUUUACUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号87)	mA*mC*mC*UUUUUUUUUUUUUACUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号119)
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号88)	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号120)
UGAUUCCUACAGAAAAACUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号89)	mU*mG*mA*UUCUACAGAAAAACUCGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号121)
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号90)	mU*mG*mG*GCAAGGGAAGAAAAAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号122)
CCUCACUCUUGUCUGGGCAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号91)	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGCAAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号123)
ACCUCACUCUUGUCUGGGCAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号92)	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGCAGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号124)
UGAGCAACCUCACUCUUGUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU (配列番号93)	mU*mG*mA*GCAACCUCACUCUUGUCGUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号125)

10

20

30

40

【0490】

【表 4】

表 4 マウス A1b イントロン 1 ガイド配列

ガイド配列	配列番号
CACUCUUGUCUGUGGAAACA	164

【0491】

50

【表 5】

表 5 マウス A1b インترون 1 sgRNA 配列

完全配列	修飾された完全配列
CACUCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 166)	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGAAACAGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU (配列番号 167)

【0492】

TracrRNA は、任意の形態（例えば、完全長 tracrRNA 又は活性部分 tracrRNA）であり得、様々な長さのものであり得る。それらには、一次転写物又は処理された形態が含まれ得る。例えば、tracrRNA（単一ガイド RNA の一部として、又は 2 分子 gRNA の一部としての別個の分子として）は、野生型 tracrRNA 配列（例えば、野生型 tracrRNA 配列の約 20 個、26 個、32 個、45 個、48 個、54 個、63 個、67 個、85 個、又はそれ以上のヌクレオチド）の全て又は一部を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。化膿レンサ球菌由来の野生型 tracrRNA 配列の例としては、171 ヌクレオチド、89 ヌクレオチド、75 ヌクレオチド、及び 65 ヌクレオチドのバージョンが挙げられる。例えば、Deltcheva et al. (2011) Nature 471 (7340): 602-607、国際公開第 2014/093661 号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。単一ガイド RNA (sgRNA) 内の tracrRNA の例には、sgRNA の +48、+54、+67、及び +85 バージョン内に見出される tracrRNA セグメントが含まれ、ここで、「+n」は、野生型 tracrRNA の最大 +n ヌクレオチドが sgRNA に含まれることを示す。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 8,697,359 号を参照されたい。

【0493】

ガイド RNA の DNA 標的化セグメントと標的 DNA の相補的鎖との間の相補性パーセントは、少なくとも 60%（例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は 100%）であり得る。DNA 標的化セグメントと標的 DNA の相補的鎖との間の相補性パーセントは、約 20 個の連続ヌクレオチドにわたって少なくとも 60% であり得る。一例として、DNA 標的化セグメントと標的 DNA の相補的鎖との間の相補性パーセントは、標的 DNA の相補的鎖の 5' 末端における 14 個の連続ヌクレオチドにわたって 100% であってもよく、残りの部分にわたって 0% と低くてもよい。そのような場合、DNA 標的化セグメントは、14 ヌクレオチド長であるとみなされ得る。別の例として、DNA 標的化セグメントと標的 DNA の相補的鎖との間の相補性パーセントは、標的 DNA の相補的鎖の 5' 末端における 7 個の連続ヌクレオチドにわたって 100% であってもよく、残りの部分にわたって 0% まで低くてもよい。そのような場合、DNA 標的化セグメントは、7 ヌクレオチド長であるとみなされ得る。いくつかのガイド RNA では、DNA 標的化セグメント内の少なくとも 17 個のヌクレオチドが標的 DNA の相補的鎖に相補的である。例えば、DNA 標的化セグメントは、20 ヌクレオチド長であり得、標的 DNA の相補的鎖との 1、2、又は 3 つのミスマッチを含み得る。一例では、ミスマッチは、プロトスペーサー隣接モチーフ (protospacer adjacent motif、PAM) 配列に対応する相補的鎖（すなわち、PAM 配列の逆相補体）の領域に隣接していない（例えば、ミスマッチは、ガイド RNA の DNA 標的化セグメントの 5' 末端におけるか、又はミスマッチは、PAM 配列に対応する相補的鎖の領域から、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、若しくは 19 塩基対離れている）。

10

20

30

40

50

【0494】

gRNAのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的である2つのヌクレオチドのストレッチを含み得る。タンパク質結合セグメントの相補的ヌクレオチドは、ハイブリダイズして二本鎖RNA二重鎖（dsRNA）を形成する。対象のgRNAのタンパク質結合セグメントはCasタンパク質と相互作用し、gRNAは結合したCasタンパク質をDNA標的化セグメントを介して標的DNA内の特定のヌクレオチド配列に指向する。

【0495】

単一ガイドRNAは、DNA標的化セグメント及び足場配列（すなわち、ガイドRNAのタンパク質結合又はCas結合配列）を含み得る。例えば、そのようなガイドRNAは、3'足場配列に結合された5' DNA標的化セグメントを有し得る。例示的な足場配列（例えば、化膿レンサ球菌Cas9と共に使用するための）は、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCU（バージョン1、配列番号21）、GUUGGAACCAUUCAAAAACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCU（バージョン2、配列番号22）、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCU（バージョン3、配列番号23）、GUUUUAGAGCUAUGCGUGGA AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCU（バージョン4、配列番号24）、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUUU（バージョン5、配列番号25）、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUU（バージョン6、配列番号26）、GUUUUAGAGCUAUGCGUGGA AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUUUUU（バージョン7、配列番号27又はGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGGCAACCGAGUCGGUGCU（バージョン8、配列番号28）を含む、それから本質的になる、又はそれからなる）。いくつかのガイドsgRNAでは、バージョン6の4つの末端U残基が存在しない。いくつかのガイドsgRNAでは、バージョン6の4つの末端U残基のうちの1つ、2つ、又は3つしか存在しない。本明細書に開示されるガイドRNA標的配列のいずれかを標的とするガイドRNAは、例えば、ガイドRNAの3'末端における例示的なガイドRNA足場配列のいずれかに融合されたガイドRNAの5'末端におけるDNA標的化セグメントを含み得る。すなわち、本明細書に開示されるDNA標的化セグメントのいずれかは、上記の足場配列のいずれかの5'末端に結合して、単一ガイドRNA（キメラガイドRNA）を形成し得る。

【0496】

ガイドRNAは、追加の望ましい特徴（例えば、修飾又は調節された安定性、細胞内標的化、蛍光標識による追跡、タンパク質又はタンパク質複合体についての結合部位など）を提供する修飾又は配列を含み得る。すなわち、ガイドRNAは、1つ以上の修飾ヌクレオチド若しくはヌクレオチド、又は標準A、G、C、及びU残基の代わりに、若しくはそれに加えて使用される1つ以上の非天然及び／若しくは天然に存在する成分若しくは構成を含み得る。そのような修飾の例には、例えば、5'キャップ（例えば、7-メチルグアニレートキャップ（m7G））、3'ポリアデニル化テール（すなわち、3'ポリ（A）テール）、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質及び／又はタンパク質複合体による調節された安定性及び／又は調節されたアクセス可能性を可能にするため）、安定性制御配列、dsRNA二重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列、RNAを細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）に標的化する修飾又は配列、追跡を提供する修

飾又は配列（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を容易にする部分への複合体化、蛍光検出を可能にする配列など）、タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどを含む、DNAに作用するタンパク質）の結合部位を提供する修飾又は配列、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。修飾の他の例には、操作されたステムループ二重構造、操作されたバルジ領域、ステムループ二重構造の操作されたヘアピン3'、又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2015/0376586号を参照されたい。バルジは、crRNA様領域と最小のtracrRNA様領域で構成される二重鎖内のヌクレオチドの対になっていない領域であり得る。バルジは、二重鎖の一方の側に、Xが任意のプリンであり、Yが反対側の鎖上のヌクレオチドとゆらぎ対を形成することができるヌクレオチドであり得る、対になっていない5'-XXXXY-3'、及び二重鎖の他方の側に対になっていないヌクレオチド領域を含み得る。【0497】

10

ガイドRNAは、例えば、以下のうちの1つ以上を含む修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドを含み得る：（1）ホスホジエステル骨格連結において、非連結リン酸酸素の一方若しくは両方及び／又は連結リン酸酸素のうちの1つ以上の改変又は置換（例示的な骨格修飾）、（2）リボース糖での2'ヒドロキシルの改変又は置換などのリボース糖の成分の改変又は置換（例示的な糖修飾）、（3）リン酸部分のデホスホリンカーによる置換（例えば、大規模な置換）（例示的な骨格修飾）、（4）非標準核酸塩基を含む天然に存在する核酸塩基の修飾又は置換（例示的な塩基修飾）、（5）リボースーリン酸骨格の置換又は修飾（例示的な骨格修飾）、（6）オリゴヌクレオチドの3'末端又は5'末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾、若しくは置換、又は部分、キャップ、若しくはリンカーの複合（そのような3'又は5'キャップ修飾は、糖及び／又は骨格修飾を含み得る））、並びに（7）糖の修飾又は置換（例示的な糖修飾）。他の可能なガイドRNA修飾には、ウラシル又はポリウラシルトラクトの修飾又は置換が含まれる。例えば、国際公開第2015/048577号及び米国特許出願公開第2016/0237455号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。同様の修飾が、Cas mRNAなどのCasコード核酸に行われ得る。例えば、Cas mRNAは、同義のコドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。【0498】

20

30

上に列挙されるホースでのような化学修飾を組み合わせ、2、3、4、又はそれ以上の修飾を有することができる残基（ヌクレオシド及びヌクレオチド）を含む修飾gRNA及び／又はmRNAを提供し得る。例えば、修飾残基は、修飾された糖及び修飾された核酸塩基を有し得る。一例では、gRNAの全ての塩基が修飾されている（例えば、全ての塩基は、ホスホロチオエート基などの修飾リン酸基を有する）。例えば、gRNAの全て又は実質的に全てのリン酸基が、ホスホロチオエート基で置換され得る。代替的又は追加的に、修飾gRNAは、5'末端又はその近くに少なくとも1つの修飾残基を含み得る。代替的又は追加的に、修飾gRNAは、3'末端又はその近くに少なくとも1つの修飾残基を含み得る。【0499】

40

いくつかのgRNAは、1つ、2つ、3つ、又はそれ以上の修飾残基を含む。例えば、修飾gRNAにおける少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の位置は、修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドであり得る。【0500】

50

未修飾核酸は、分解されやすい可能性がある。外因性核酸はまた、自然免疫応答を誘導し得る。修飾は、安定性を導入し、免疫原性を低減させるのに役立ち得る。本明細書に記載のいくつかの gRNA は、細胞内又は血清ベースのヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含み得る。本明細書に記載のいくつかの修飾 gRNA は、細胞の集団に導入された場合、自然免疫応答の低減を示す可能性がある。

【0501】

本明細書に開示される gRNA は、修飾残基のリン酸基が、酸素のうちの1つ以上を異なる置換基で置き換えることによって修飾され得る骨格修飾を含み得る。修飾は、本明細書に記載されるように、修飾されていないリン酸部分を修飾されたリン酸基で大規模に置き換えすることを含み得る。リン酸骨格の骨格修飾には、非荷電リンカー又は非対称電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかをもたらず改変も含まれ得る。

10

【0502】

修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレン酸、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキル又はアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが挙げられる。修飾されていないリン酸基におけるリン原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの1つを上記の原子又は原子の基のうちの1つと置き換えると、リン原子がキラルになる可能性がある。立体中心のリン原子は、「R」配置 (Rp) 又は「S」配置 (Sp) のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに結合する酸素）を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによっても修飾され得る。置換は、連結酸素の一方又は連結酸素の両方で起こり得る。

20

【0503】

リン酸基は、特定の骨格修飾でリンを含まないコネクタに置き換えられ得る。いくつかの実施形態では、荷電リン酸基は、中性部分によって置き換えられ得る。リン酸基を置き換えることができる部分の例には、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリナー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、及びメチレンオキシメチルイミノが含まれ得るが、これらに限定されない。

30

【0504】

核酸を模倣することができる足場はまた、リン酸リンカー及びリボース糖がヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド又はヌクレオチド代用物によって置き換えられるように構築され得る。そのような修飾は、骨格及び糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、代理骨格によってテザリングされ得る。例には、モルフォリノ、シクロブチル、ピロリジン、及びペプチド核酸 (peptide nucleic acid、PNA) ヌクレオシド代用物が含まれるが、これらに限定されない。

【0505】

修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、糖基への1つ以上の修飾（糖修飾）を含み得る。例えば、2' ヒドロキシル基 (OH) は修飾され得る（例えば、いくつかの異なるオキシ又はデオキシ置換基で置換され得る）。2' -アルコキシドイオンを形成するためにヒドロキシルを脱プロトン化することができなくなるため、2' ヒドロキシル基への修飾は核酸の安定性を高め得る。

40

【0506】

2' ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシ又はアリールオキシ (OR、「R」が、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロアリール、又は糖であり得る)、ポリエチレングリコール (polyethyleneglycol、PEG)、 $O(CH_2CH_2)_nCH_2CH_2OR$ を含み得、R は、例えば、H 又は任意選択的に置換されたア

50

ルキルであり得、 n は、 $0 \sim 20$ （例えば、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 8$ 、 $0 \sim 10$ 、 $0 \sim 16$ 、 $1 \sim 4$ 、 $1 \sim 8$ 、 $1 \sim 10$ 、 $1 \sim 16$ 、 $1 \sim 20$ 、 $2 \sim 4$ 、 $2 \sim 8$ 、 $2 \sim 10$ 、 $2 \sim 16$ 、 $2 \sim 20$ 、 $4 \sim 8$ 、 $4 \sim 10$ 、 $4 \sim 16$ 、及び $4 \sim 20$ ）の整数であり得る。2'ヒドロキシル基修飾は、2'-O-Meであり得る。同様に、2'ヒドロキシル基修飾は、2'-フルオロ修飾であり得、これは2'ヒドロキシル基をフッ化物で置き換える。2'ヒドロキシル基修飾は、2'ヒドロキシルが、例えば、 $C_1 \sim 6$ アルキレン又は $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキレンブリッジによって、同じリボース糖の4'炭素に接続され得るロックされた核酸（LNA）を含み得、例示的なブリッジは、メチレン、プロピレン、エーテル又はアミノブリッジ；O-アミノ（アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン又はポリアミノであり得る）及びアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ、（アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、又はポリアミノであり得る）を含み得る。2'ヒドロキシル基修飾は、リボース環が $C2' \sim C3'$ 結合を欠いている非ロック核酸（unlocked nucleic acid、UNA）を含み得る。2'ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（MOE）（ $OCH_2CH_2OCH_3$ 、例えば、PEG誘導体）を含み得る。

10

【0507】

デオキシ2'修飾には、水素（すなわち、例えば、部分的にdsRNAのオーバーハング部分におけるデオキシリボース糖）、ハロ（例えば、ブromo、クロロ、フルオロ又はヨード）、アミノ（アミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、又はアミノ酸であり得る）、 $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載される通りであり得る）、 $-NHC(O)R$ （ R は、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロアリール又は糖であり得る）、シアノ、メルカプト、アルキルチオールアルキル、チオアルコキシ、並びにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、及びアルキニルを含み得、これらは、任意選択的に、例えば、本明細書に記載のアミノで置換され得る。

20

【0508】

糖修飾は、リボース中の対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する1つ以上の炭素を含み得る糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として、例えば、アラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖（abasic sugar）を含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子のうちの1つ以上で更に修飾され得る。修飾核酸はまた、L型における1つ以上の糖（例えば、L-ヌクレオシド）を含み得る。

30

【0509】

修飾核酸に組み込まれ得る、本明細書に記載の修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例には、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、及びウラシル（U）が含まれるが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を提供するために修飾され得るか、又は完全に置換され得る。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、又はピリミジン類似体から選択され得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在する合成誘導体を含み得る。

40

【0510】

二重ガイドRNAでは、crRNA及びtracrRNAの各々に修飾を含み得る。そのような修飾は、crRNA及び／又はtracrRNAの一端又は両端にあってもよい。sgRNAでは、sgRNAの一端又は両端の1つ以上の残基が化学的に修飾されていてもよく、及び／又は内部ヌクレオシドが修飾されていてもよく、及び／又はsgRNA全体が化学的に修飾されていてもよい。いくつかのsgRNAは、5'末端修飾を含む。いくつかのsgRNAは、3'末端修飾を含む。

50

【0511】

本明細書に開示されるガイドRNAは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2018/107028(A1)号に開示される修飾パターンのうちの1つを含み得る。本明細書に開示されるガイドRNAはまた、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2017/0114334号に開示される構造／修飾パターンのうちの1つを含み得る。本明細書に開示されるガイドRNAはまた、国際公開第2017/136794号、国際公開第2017/004279号、米国特許出願公開第2018/0187186号、又は米国特許出願公開第2019/0048338号に開示される構造／修飾パターンのうちの1つを含むことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0512】

一例として、ガイドRNAの5'又は3'末端におけるヌクレオチドは、ホスホロチオエート連結を含み得る（例えば、塩基は、ホスホロチオエート基である修飾されたリン酸基を有することができる）。例えば、ガイドRNAは、ガイドRNAの5'又は3'末端における2、3、又は4つの末端ヌクレオチド間のホスホロチオエート連結を含み得る。別の例として、ガイドRNAの5'及び／又は3'末端におけるヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を有し得る。例えば、ガイドRNAは、ガイドRNAの5'及び／又は3'末端（例えば、5'末端）における2、3、又は4つの末端ヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾を含み得る。例えば、国際公開第2017/173054(A1)号、及びFinnet al. (2018) Cell Rep. 22(9):2227-2235を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。具体的な例では、ガイドRNAは、最初の3つの5'及び3'末端RNA残基に2'-O-メチル類似体及び3'ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。そのような化学修飾は、例えば、エキソヌクレアーゼからガイドRNAへのより優れた安定性及び保護を提供し、非修飾ガイドRNAよりも長く細胞内に存続することを可能にする。そのような化学修飾はまた、例えば、RNAを積極的に分解し得る、又は細胞死につながる免疫カスケードを引き起こし得る自然細胞内免疫応答から保護することもできる。

20

【0513】

一例として、本明細書に記載のガイドRNAのいずれかは、少なくとも1つの修飾を含み得る。一例では、少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート(phosphorothioate、PS)結合、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含む。例えば、少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含み得る。代替的又は追加的に、少なくとも1つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート(PS)結合を含み得る。代替的又は追加的に、少なくとも1つの修飾は、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含み得る。一例では、本明細書に記載のガイドRNAは、1つ以上の2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間の1つ以上のホスホロチオエート(PS)結合を含む。

30

40

【0514】

修飾は、ガイドRNAにおいてどこでも起こり得る。一例として、ガイドRNAは、ガイドRNAの5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾を含み、ガイドRNAは、ガイドRNAの3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾、又はそれらの組み合わせを含む。例えば、ガイドRNAは、ガイドRNAの最初の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、ガイドRNAの最後の4つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、又はそれらの組み合わせを含み得る。代替的又は追加的に、ガイドRNAは、ガイドRNAの5'末端の最初の3つのヌクレオチドでの2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含み得、ガイドRNAの3'末端の最後の3つのヌクレオチドでの2'-O-Me修飾ヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含み得る。

50

【0515】

一例では、修飾 gRNA は、以下の配列：mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号29）を含み得、「N」は、任意の天然又は非天然ヌクレオチドであってもよい。例えば、N残基の全体は、本明細書に記載のヒトALBイントロン1 DNA標的化セグメントを含む（例えば、配列番号29）に記載の配列であり、N残基は、配列番号30～61のいずれかのDNA標的化セグメント、配列番号36、30、33、及び41のいずれかのDNA標的化セグメント、又は配列番号36のDNA標的化セグメントで置換される。例えば、修飾 gRNA は、表3における配列番号94～125のいずれかに記載の配列、配列番号100、94、97、及び105のいずれかに記載の配列、又は配列番号100に記載の配列を含み得る。「mA」、「mC」、「mU」、及び「mG」という用語は、2'-O-Meで修飾されたヌクレオチド（それぞれ、A、C、U、及びG）を示す。「*」という記号は、ホスホロチオエート修飾を示す。特定の実施形態では、A、C、G、U、及びNは、独立して、リボース糖、すなわち、2'-OHを示す。特定の実施形態では、修飾配列の文脈において、A、C、G、U、及びNは、リボース糖、すなわち、2'-OHを示す。ホスホロチオエート連結又は結合は、ホスホジエステル結合、例えばヌクレオチド塩基間の結合において、硫黄が1つの非架橋リン酸酸素と置換されている結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはS-オリゴと呼ばれることもある。A*、C*、U*又はG*という用語は、ホスホロチオエート結合で次の（例えば3'）ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを示す。「mA*」、「mC*」、「mU*」、及び「mG*」という用語は、2'-O-Meで置換されており、ホスホロチオエート結合で次の（例えば、3'）ヌクレオチドに連結されるヌクレオチド（それぞれA、C、U、及びG）を示す。

10

20

【0516】

ヌクレオチド糖環に影響を与えることが立証されている他の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環における2'-フルオロ（2'-F）置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性及びヌクレアーゼ安定性を上昇させ得る。脱塩基ヌクレオチドとは、窒素塩基を欠くヌクレオチドを指す。反転塩基とは、通常の5'から3'への連結（すなわち、5'から5'への連結又は3'から3'への連結のいずれか）から反転している連結を有するものを指す。

30

【0517】

脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結で結合され得る。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、5'から5'への連結を介して末端5'ヌクレオチドに結合され得る、又は脱塩基ヌクレオチドは、3'から3'への連結を介して末端3'ヌクレオチドに結合され得る。末端5'又は3'ヌクレオチドのいずれかにおける反転脱塩基ヌクレオチドは、反転脱塩基エンドキップと呼ばれることもあり得る。

【0518】

一例では、5'末端の最初の3つ、4つ、又は5つのヌクレオチドのうちの1つ以上、及び3'末端の最後の3つ、4つ、又は5つのヌクレオチドのうちの1つ以上が修飾されている。修飾は、例えば、2'-O-Me、2'-F、反転塩基性ヌクレオチド、ホスホロチオエート結合、又は安定性及び／若しくは性能を増加させることが周知の他のヌクレオチド修飾であり得る。

40

【0519】

別の例では、5'末端の最初の4つのヌクレオチド、及び3'末端の最後の4つのヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され得る。

【0520】

別の例では、5'末端の最初の3つのヌクレオチド、及び3'末端の最後の3つのヌクレ

50

オチドは、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含み得る。別の例では、5'末端の最初の3つのヌクレオチド、及び3'末端の最後の3つのヌクレオチドは、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。別の例では、5'末端の最初の3つのヌクレオチド、及び3'末端の最後の3つのヌクレオチドは、反転塩基性ヌクレオチドを含む。

【0521】

ガイドRNAは、任意の形態で提供され得る。例えば、gRNAは、2つの分子(別個のcrRNA及びtracrRNA)又は1つの分子(sgRNA)のいずれかとしてRNAの形態で、及び任意選択的にCasタンパク質との複合体の形態で提供され得る。gRNAはまた、gRNAをコードするDNAの形態で提供され得る。gRNAをコードするDNAは、単一RNA分子(sgRNA)又は別個のRNA分子(例えば、別個のcrRNA及びtracrRNA)をコードし得る。後者の場合、gRNAをコードするDNAは、1つのDNA分子として、又はそれぞれcrRNA及びtracrRNAをコードする別個のDNA分子として提供され得る。

10

【0522】

gRNAがDNAの形態で提供される場合、gRNAは、一過性、条件付き、又は構成的に細胞内で発現され得る。gRNAをコードするDNAは、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、gRNAをコードするDNAは、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、gRNAをコードするDNAは、Casタンパク質をコードする核酸などの異種核酸を含むベクター内にあり得る。代替的に、それは、Casタンパク質をコードする核酸を含むベクターとは別個のベクター又はプラスミドであり得る。そのような発現構築物において使用され得るプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹(ES)細胞、成体幹細胞、発達の制限された前駆細胞、誘導多能性幹(iPS)細胞、又は1細胞期胚のうちの1つ以上において活性なプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、又は組織特異的プロモーターであり得る。そのようなプロモーターはまた、例えば、双方向プロモーターであり得る。好適なプロモーターの具体的な例には、ヒトU6プロモーター、ラットU6ポリメラーゼIIIプロモーター、又はマウスU6ポリメラーゼIIIプロモーターなどのRNAポリメラーゼIIIプロモーターが含まれる。

20

30

【0523】

代替的に、gRNAは、様々な他の方法によって調製され得る。例えば、gRNAは、例えば、T7 RNAポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって調製され得る(例えば、国際公開第2014/089290号及び国際公開第2014/065596号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ガイドRNAはまた、化学合成によって調製された合成的に生成された分子であり得る。例えば、ガイドRNAを化学的に合成して、最初の3つの5'及び3'末端RNA残基に2'-O-メチル類似体及び3'ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み得る。

40

【0524】

ガイドRNA(又はガイドRNAをコードする核酸)は、1つ以上のガイドRNA(例えば、1、2、3、4、又はそれ以上のガイドRNA)と、ガイドRNAの安定性を増加させる(例えば、所定の保存条件下(例えば、-20℃、4℃、又は周囲温度)で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸又はタンパク質の0.5重量%未満のままである期間を延長するか、あるいはインビボでの安定性を増加させる)担体と、を含む組成物にあり得る。そのような担体の非限定的な例には、ポリ(乳酸)(PLA)ミクロスフェア、ポリ(D,L-乳酸-コグリコール酸)(PLGA)ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート、及び脂質微小管が含まれる。そのような組成物は、Cas

50

9 タンパク質などの C a s タンパク質、又は C a s タンパク質をコードする核酸を更に含み得る。

【0525】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 2 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 2 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 2 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 2 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の配列から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

10

【0526】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8、1 0 0、6 2、9 4、6 5、9 7、7 3、及び 1 0 5 のいずれかに記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8、1 0 0、6 2、9 4、6 5、9 7、7 3、及び 1 0 5 のいずれかに記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8、1 0 0、6 2、9 4、6 5、9 7、7 3、及び 1 0 5 のいずれかに記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8、1 0 0、6 2、9 4、6 5、9 7、7 3、及び 1 0 5 のいずれかに記載の配列から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

20

30

【0527】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 に記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 に記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 8 又は 1 0 0 に記載の配列から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

40

【0528】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 2 又は 9 4 に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド R N A は、配列番号 6 2 又は 9 4 に記載の D N A 標的化セグメントに対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を

50

含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 6 2 又は 9 4 に記載の DNA 標的化セグメントに対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 6 2 又は 9 4 に記載の配列から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

【0529】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 6 5 又は 9 7 に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 6 5 又は 9 7 に記載の DNA 標的化セグメントに対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 6 5 又は 9 7 に記載の DNA 標的化セグメントに対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 6 5 又は 9 7 に記載の配列から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

【0530】

別の例として、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 7 3 又は 1 0 5 に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 7 3 又は 1 0 5 に記載の DNA 標的化セグメントに対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 7 3 又は 1 0 5 に記載の DNA 標的化セグメントに対して少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % 同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒト A L B 遺伝子のイントロン 1 を標的とするガイド RNA は、配列番号 7 3 又は 1 0 5 に記載の配列から 3 個以下、2 個以下、又は 1 個以下のヌクレオチドだけ異なる配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。

【0531】

(4) ガイド RNA 標的配列

ガイド RNA の標的 DNA には、結合に十分な条件が存在する場合に、g RNA の DNA 標的化セグメントが結合する DNA に存在する核酸配列が含まれる。好適な DNA / RNA 結合条件には、細胞に通常存在する生理学的条件が含まれる。他の好適な DNA / RNA 結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当該技術分野で既知である（例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 3 r d E d . (S a m b r o o k e t a l . , H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 2 0 0 1) を参照されたい)。g RNA に相補的であり、かつそれとハイブリダイズする標的 DNA の鎖は、「相補的鎖」と呼ばれ得、「相補的鎖」に相補的である（したがって、C a s タンパク質又は g RNA に相補的ではない）標的 DNA の鎖は、「非相補的鎖」又は「鋳型鎖」と呼ばれ得る。

【0532】

標的 DNA は、ガイド RNA がハイブリダイズする相補的鎖上の配列と非相補的鎖上の対応する配列（例えば、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接する）の両方を含む。「ガイド RNA 標的配列」という用語は、本明細書で使用される場合、具体的には

、ガイドRNAが相補鎖上でハイブリダイズする配列に対応する（すなわち、その逆相補体）非相補的鎖上の配列を指す。すなわち、ガイドRNA標的配列は、PAMに隣接する非相補的鎖上の配列（例えば、Cas9の場合、PAMの上流又は5'）を指す。ガイドRNA標的配列は、ガイドRNAのDNA標的化セグメントと同等であるが、ウラシルの代わりにチミンを含む。一例として、SpCas9酵素のガイドRNA標的配列は、非相補的鎖上の5'-NGG-3' PAMの上流の配列を指し得る。ガイドRNAは、標的DNAの相補的鎖に対して相補性を有するように設計されており、ガイドRNAのDNA標的化セグメントと標的DNAの相補的鎖との間のハイブリダイゼーションは、CRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ではない。ガイドRNAが本明細書でガイドRNA標的配列を標的とするものと言及される場合、それは、ガイドRNAが、非相補的鎖上のガイドRNA標的配列の逆相補体である標的DNAの相補的鎖配列にハイブリダイズすることを意味する。

10

【0533】

標的DNA又はガイドRNA標的配列は、任意のポリヌクレオチドを含み得、例えば、細胞の核又は細胞質内、あるいはミトコンドリア又は葉緑体などの細胞の細胞小器官内に位置し得る。標的DNA又はガイドRNA標的配列は、細胞に対して内因性又は外因性の任意の核酸配列であり得る。ガイドRNA標的配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列又は非コード配列（例えば、調節配列）であり得るか、又は両方を含み得る。

20

【0534】

Casタンパク質による標的DNAの部位特異的結合及び切断は、(i) ガイドRNAと標的DNAの相補的鎖との間の塩基対合相補性、及び(ii) 標的DNAの非相補的鎖におけるプロトSpacer隣接モチーフ(PAM)と呼ばれる短いモチーフの両方によって決定される位置で起こり得る。PAMは、ガイドRNA標的配列に隣接し得る。任意選択的に、ガイドRNA標的配列は、3'末端でPAMが隣接し得る（例えば、Cas9の場合）。代替的に、ガイドRNA標的配列は、5'末端でPAMが隣接し得る（例えば、Cpf1の場合）。例えば、Casタンパク質の切断部位は、PAM配列の上流又は下流（例えば、ガイドRNA標的配列内）の約1～約10又は約2～約5塩基対（例えば、3塩基対）であり得る。SpCas9の場合、PAM配列（すなわち、非相補的鎖上）は、5'-N₁GG-3'であり得、N₁は、任意のDNAヌクレオチドであり、PAMは、標的DNAの非相補的鎖上のガイドRNA標的配列の3'のすぐ近くである。したがって、相補的鎖上のPAMに対応する（すなわち、逆相補体）配列は、5'-CCN₂-3'であり、N₂は、任意のDNAヌクレオチドであり、ガイドRNAのDNA標的化セグメントが標的DNAの相補的鎖上でハイブリダイズする配列の5'のすぐ近くである。いくつかのそのような場合、N₁及びN₂は、相補的であり得、N₁～N₂塩基対は、任意の塩基対であり得る（例えば、N₁=C及びN₂=G、N₁=G及びN₂=C、N₁=A及びN₂=T、又はN₁=T及びN₂=A）。黄色ブドウ球菌からのCas9の場合、PAMは、NNGRRT又はNNGRRであり得、Nは、A、G、C、又はTであり得、Rは、G又はAであり得る。C. ジェジュニ由来のCas9の場合、PAMは、例えば、NNNNAACAC又はNNNNRYACであり得、Nは、A、G、C、又はTであり得、Rは、G又はAであり得る。場合によっては（例えば、FnCpf1の場合）、PAM配列は、5'末端の上流であり得、配列5'-TTN-3'を有し得る。DpbCasXの場合、PAMは、配列5'-TTCN-3'を有し得る。CasΦの場合、PAMは、配列5'-TBN-3'を有し得、式中、Bは、G、T、又はCである。

30

40

【0535】

ガイドRNA標的配列の例は、SpCas9タンパク質によって認識されるNGGモチーフの直前の20ヌクレオチドのDNA配列である。例えば、ガイドRNA標的配列及びPAMの2つの例は、GN₁₉NGG（配列番号5）又はN₂₀NGG（配列番号6）である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際

50

公開第2014/165825号を参照されたい。5'末端におけるグアニンは、細胞内のRNAポリメラーゼによる転写を容易にし得る。ガイドRNA標的配列及びPAMの他の例は、インビトロでのT7ポリメラーゼによる効率的な転写を容易にするために、5'末端に2つのグアニンヌクレオチドを含み得る（例えば、GGN₂₀NGG、配列番号7）。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2014/065596号を参照されたい。他のガイドRNA標的配列及びPAMは、5'G又はGG及び3'GG又はNGGを含む、配列番号5～7の4～22ヌクレオチド長を有し得る。更に他のガイドRNA標的配列及びPAMは、配列番号5～7の14～20ヌクレオチド長を有し得る。

【0536】

標的DNAにハイブリダイズしたCRISPR複合体の形成は、ガイドRNA標的配列（すなわち、標的DNAの非相補的鎖上のガイドRNA標的配列及びガイドRNAがハイブリダイズする相補的鎖上の逆相補体）に対応する領域内又は領域の近くの標的DNAの一方又は両方の鎖の切断をもたらし得る。例えば、切断部位は、（例えば、PAM配列に対して定義された位置で）ガイドRNA標的配列内にあり得る。「切断部位」は、Casタンパク質が一本鎖切断又は二本鎖切断を生成する標的DNAの位置を含む。切断部位は、一本鎖のみ（例えば、ニッカーゼが使用される場合）又は二本鎖DNAの両方の鎖上にあり得る。切断部位は、両方の鎖の同じ位置（平滑末端を生成する、例えば、Cas9）にあってもよく、又は各鎖の異なる部位（付着末端（すなわち、オーバーハング）を生成する、例えば、Cpf1）にあってもよい。付着末端は、例えば、その各々が異なる鎖上の異なる切断部位で一本鎖切断を生成し、それによって二本鎖切断を生成する2つのCasタンパク質を使用することによって生成され得る。例えば、第1のニッカーゼは、二本鎖DNA（dsDNA）の第1の鎖上に一本鎖切断を作製することができ、第2のニッカーゼは、オーバーハング配列が作製されるようにdsDNAの第2の鎖上に一本鎖切断を作製することができる。場合によっては、第1の鎖上のニッカーゼのガイドRNA標的配列又は切断部位は、第2の鎖上のニッカーゼのガイドRNA標的配列又は切断部位から、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500、又は1,000塩基対離れている。

【0537】

ガイドRNA標的配列は、オフターゲット修飾を最小限に抑えるか、又はオフターゲット効果を回避するように選択することもできる（例えば、オフターゲットゲノム配列とのミスマッチが2つ以下になることを回避することによって）。

【0538】

一例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号126～157のいずれかに記載のガイドRNA標的配列を標的とし得る。別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号126～157のいずれかに記載のガイドRNA標的配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを標的とし得る。

【0539】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号132、126、129、及び137のいずれかに記載のガイドRNA標的配列を標的とし得る。別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号132、126、129、及び137のいずれかに記載のガイドRNA標的配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを標的とし得る。

【0540】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号132に記載のガイドRNA標的配列を標的とし得る。別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号132に記載のガイドRNA標的配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20

10

20

30

40

50

個の連続ヌクレオチドを標的とし得る。

【0541】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号126に記載のガイドRNA標的配列を標的とし得る。別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号126に記載のガイドRNA標的配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを標的とし得る。

【0542】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号129に記載のガイドRNA標的配列を標的とし得る。別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号129に記載のガイドRNA標的配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを標的とし得る。

10

【0543】

別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号137に記載のガイドRNA標的配列を標的とし得る。別の例として、ヒトALB遺伝子のイントロン1を標的とするガイドRNAは、配列番号137に記載のガイドRNA標的配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、又は少なくとも20個の連続ヌクレオチドを標的とし得る。

【0544】

20

30

40

50

【表 6】

表 6 ヒト A L B イントロン 1 ガイド RNA 標的配列

ガイド RNA 標的配列	配列番号
GAGCAACCTCACTCTTGTCT	126
ATGCATTTGTTTCAAAATAT	127
TGCATTTGTTTCAAAATATT	128
ATTTATGAGATCAACAGCAC	129
GATCAACAGCACAGGTTTGT	130
TTAAATAAAGCATAGTGCAA	131
TAAAGCATAGTGCAATGGAT	132
TAGTGCAATGGATAGGTCTT	133
TACTAAAACCTTATTTTACT	134
AAAGTTGAACAATAGAAAAA	135
AATGCATAATCTAAGTCAAA	136
TAATAAAATTCAAACATCCT	137
GCATCTTTAAAGAATTATTT	138
TTTGGCATTATTTCTAAAA	139
TGTATTTGTGAAGTCTTACA	140
TCCTAGGTAAAAA	141
TAATTTTCTTTTGCGCACTA	142
TGACTGAACTTCACAGAAT	143
GA CTGAACTTCACAGAATA	144
TTCA TTTTAGTCTGTCTTCT	145
ATTATCTAAGTTTGAATATA	146
AATTTTAAATAGTATTCT	147
TGAATTATTCTTCTGTTTAA	148
ATCATCCTGAGTTTTTCTGT	149
TTACTAAAACCTTATTTTAC	150
ACCTTTTTTTTTTTTACCT	151
AGTGCAATGGATAGGTCTTT	152
TGATTCCTACAGAAAACTC	153
TGGGCAAGGGAAGAAAAA	154
CCTCACTCTTGTCTGGGCAA	155
ACCTCACTCTTGTCTGGGCA	156
TGAGCAACCTCACTCTTGTC	157

【0545】

【表 7】

表 7 マウス A l b イントロン 1 ガイド RNA 標的配列

ガイド RNA 標的配列	配列番号
CACTCTTGTCTGTGGAAACA	165

【0546】

(5) ヌクレアーゼ剤を含む脂質ナノ粒子

ヌクレアーゼ剤（例えば、C R I S P R / C a s 系）を含む脂質ナノ粒子も提供される。脂質ナノ粒子は、代替的に又は追加的に、本明細書に開示される目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物を含み得る。例えば、脂質ナノ粒子は、ヌクレアーゼ剤（例えば、C R I S P R / C a s 系）を含み得る、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物を含み得る、又はヌクレアーゼ剤（例えば、C R I S P R / C a s 系）と目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物の両方を含み得る。C R I S P R / C a s 系に関して、脂質ナノ粒子は、任意の形態（例えば、タンパク質、DNA、又は mRNA）で C a s タンパク質を含み得る、及び／又は任意の形態（例えば、DNA 又は RNA）でガイド RNA を含み得る。一例では、脂質ナノ粒子は、mRNA の形態で C a s タンパク質（例えば、本明細書に記載の修飾 RNA）及び RNA の

形態でガイドRNA（例えば、本明細書に開示される修飾ガイドRNA）を含む。別の例として、脂質ナノ粒子は、タンパク質の形態でCasタンパク質及びRNAの形態でガイドRNA（複数可）を含み得る。具体的な例では、ガイドRNA及びCasタンパク質の各々は、同じLNPでのLNP媒介送達を介してRNAの形態で導入される。本明細書の他の場所でより詳細に論じられるように、RNAのうちの1つ以上が修飾され得る。例えば、ガイドRNAは、5'末端及び／又は3'末端に1つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾され得る。そのような修飾には、例えば、5'末端及び／若しくは3'末端の1つ以上のホスホロチオエート連結、及び／又は5'末端及び／若しくは3'末端の1つ以上の2'-O-メチル修飾が含まれ得る。別の例として、Cas mRNA修飾は、シュードウリジンでの置換（例えば、シュードウリジンで完全に置換される）、5'キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。別の例として、Cas mRNA修飾は、N1-メチルシュードウリジンでの置換（例えば、N1-メチルシュードウリジンで完全に置換される）、5'キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。他の修飾もまた、本明細書の他の場所に開示されるように企図される。そのような方法による送達は、一過性のCas発現及び／又は一過性のガイドRNAの存在をもたらし得、生分解性脂質はクリアランスを改善し、忍容性を改善し、免疫原性を低下させる。脂質製剤は、生体分子を分解から保護すると同時に、細胞への取り込みを改善し得る。脂質ナノ粒子は、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア（単層及び多層ベシクル、例えば、リポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセル、又は懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために1つ以上の核酸又はタンパク質をカプセル化するために使用され得る。カチオン性脂質を含有する製剤は、核酸などのポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質（すなわち、非荷電又は両性イオン脂質）、アニオン性脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、及びナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを増加させるステルス脂質である。好適なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質の例は、全ての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2016/010840（A1）号及び同第2017/173054（A1）号に見出すことができる。例示的な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質及び1つ以上の他の成分を含み得る。一例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質を含み得る。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質及びジステアロイルホスファチジルコリン又は1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DSPC）などの中性脂質を含み得る。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質、DSPCなどの任意選択的な中性脂質、及びS010、S024、S027、S031、又はS033などのステルス脂質を含み得る。【0547】

LNPは、以下：（i）カプセル化及びエンドソーム脱出のための脂質、（ii）安定化のための中性脂質、（iii）安定化のためのヘルパー脂質、及び（iv）ステルス脂質のうちの1つ以上又は全てを含有してもよい。例えば、Finnet al.（2018）Cell Rep. 22（9）：2227-2235及び国際公開第2017/173054（A1）号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定のLNPにおいて、カーゴは、ガイドRNA又はガイドRNAをコードする核酸を含み得る。特定のLNPでは、カーゴは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNA、及びガイドRNA又はガイドRNAをコードする核酸を含み得る。特定のLNPでは、カーゴは、本明細書の他の箇所に記載されるような目的のポリペプチドをコードする核酸構築物（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）を含み得る。特定のLNPでは、カーゴは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNA、及びガイドRNA又はガイドRNAをコードする核酸、並びに本明細書の他の場所に記載されるような目的のポリペプチドをコードする核酸構築物（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）を含み得る。いくつかのLNPでは、脂質成分は、生分解性のイオン化可能脂質などのアミン脂質を含む。いくつかの例では、脂質成分

は、生分解性のイオン化可能脂質、コレステロール、DSPC、及びPEG-DMGを含む。例えば、Cas9 mRNA及びgRNAは、イオン化可能な脂質（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12ジエノアート、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12ジエノアートとも呼ばれる）、コレステロール、DSPC、及びPEG2k-DMGを含む脂質製剤を利用して細胞及び動物に送達され得る。

【0548】

いくつかの例では、LNPは、カチオン性脂質を含む。いくつかの例では、LNPは、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノアートとも呼ばれる、（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアート、又は別のイオン化可能脂質を含む。例えば、国際公開第2019/067992号、国際公開第2017/173054号、国際公開第2015/095340号、及び国際公開第2014/136086号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの例では、LNPは、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、又は約6.5のカチオン性脂質アミン対RNAリン酸のモル比（N：P）を含む。いくつかの例では、LNP脂質の文脈におけるカチオン性及びイオン化可能という用語は、互換的である（例えば、イオン化可能脂質はpHに応じてカチオン性である）。

【0549】

カプセル化及びエンドソーム脱出のための脂質は、カチオン性脂質であり得る。脂質はまた、生分解性イオン化可能脂質などの生分解性脂質であり得る。好適な脂質の一例は、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノアートとも呼ばれる、（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアートである脂質A又はLP01である。例えば、Finn et al.（2018）Cell Rep. 22（9）：2227-2235及び国際公開第2017/173054（A1）号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。好適な脂質の別の例は、（（5-（（ジメチルアミノ）メチル）-1，3-フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン-8，1-ジイル）ビス（デカノアート）とも呼ばれる、（（5-（（ジメチルアミノ）メチル）-1，3-フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン-8，1-ジイル）ビス（デカノアート）である脂質Bである。好適な脂質の別の例は、2-（（4-（（3-（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）ヘキサデカノイル）オキシ）プロパン-1，3-ジイル（9Z，9'Z，12Z，12'Z）-ビス（オクタデカ-9，12-ジエノアート）である脂質Cである。好適な脂質の別の例は、3-（（（3-（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）-13-（オクタノイルオキシ）トリデシル3-オクチルウンデカノアートである脂質Dである。他の好適な脂質には、ヘプタトリアコンター6，9，28，31-テトラエン-19-イル4-（ジメチルアミノ）ブタノアート（〔（6Z，9Z，28Z，31Z）-ヘプタトリアコンター6，9，28，31-テトラエン-19-イル〕4-（ジメチルアミノ）ブタノアート又はDlin-MC3-DMA（MC3））としても既知である）が含まれる。

【0550】

本明細書に記載の L N P における使用に好適ないくつかのそのような脂質は、インビボで生分解性である。

【0551】

そのような脂質は、それらが含まれる培地の pH に応じてイオン化可能であり得る。例えば、わずかに酸性の培地では、脂質は、プロトン化され、したがって正電荷を帯びることができる。逆に、例えば、pH が約 7.35 である血液などのわずかに塩基性の媒体では、脂質はプロトン化されない可能性があり、したがって電荷を帯びない可能性がある。いくつかの実施形態では、脂質は、少なくとも約 9.5、又は 10 の pH でプロトン化されてもよい。そのような脂質が電荷を帯びる能力は、固有の pKa に関連している。例えば、脂質は、独立して、約 5.8 ~ 約 6.2 の範囲の pKa を有し得る。

10

【0552】

中性脂質は、L N P を安定化し、そのプロセッシングを改善するよう機能する。好適な中性脂質の例には、様々な中性、非荷電、又は両性イオン脂質が含まれる。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例には、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン、又は 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、ホスホコリン（DOPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ホスファチジルコリン（PLPC）、1,2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DAPC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、卵ホスファチジルコリン（EPC）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（DLPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（MPPC）、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン（SPPC）、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DBPC）、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（SPPC）、1,2-ジェイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DEPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPPE）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、イソホスファチジルエタノールアミン、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（SOPC）、及びそれらの組み合わせが含まれるが、それらに限定されない。例えば、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）からなる群から選択されてもよい。

20

30

【0553】

ヘルパー脂質には、トランスフェクションを増強する脂質が含まれる。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強する機構は、粒子安定性を増強することを含み得る。場合によっては、ヘルパー脂質は、膜融合性を増強し得る。ヘルパー脂質は、ステロイド、ステ

40

【0554】

ステルス脂質は、ナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを変える脂質を含む。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減させ、粒子サイズを制御することによって、製剤化プロセスを支援し得る。ステルス脂質は、L N P の薬物動態特性を調節してもよい。好適なステルス脂質には、脂質部分に連結された親水性頭部基を有する脂質が含まれる。

50

【0555】

ステルス脂質の親水性頭部基は、例えば、PEG（しばしば、ポリ（エチレンオキシド）と称される）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、及びポリN-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含み得る。PEGという用語は、ポリエチレングリコール又は他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。特定のLNP製剤において、PEGはPEG2000とも呼ばれるPEG-2Kであり、平均分子量は約2,000ダルトンである。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2017/173054A1号を参照されたい。

10

【0556】

ステルス脂質の脂質部分は、例えば、独立して約C4～約C40の飽和又は不飽和の炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基を含むものを含むジアシルグリセロール又はジアシルグリカミドに由来し得、鎖は、1つ以上の、例えば、アミド又はエステルなどの官能基を含み得る。ジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基は、1つ以上の置換アルキル基を更に含み得る。

【0557】

一例として、ステルス脂質は、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール（PEG-DSP）、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、及びPEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール（1-[8'-（コレスト-5-エン-3[ベータ]-オキシ）カルボキシアミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール）、PEG-DMB（3,4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール）エーテル）、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DMPE）、又は1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレングリコール-2000（PEG2k-DMG）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DSP）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（PEG2k-DSG）、ポリ（エチレングリコール）-2000-ジメタクリレート（PEG2k-DMA）、及び1,2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]PEG2k-DSAから選択され得る。1つの特定の例では、ステルス脂質は、PEG2k-DMGであってもよい。

20

30

【0558】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、グリセロール基を含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、ジミリスチルグリセロール（DMG）基を含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、PEG2kを含む。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、PEG-DMGである。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかの実施形態では、PEG脂質は、1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000である。いくつかの実施形態では、PEG2k-DMGは、1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000である。

40

【0559】

LNPは、製剤中の成分脂質の異なるそれぞれのモル比を含み得る。CCD脂質のモル%は、例えば、約30モル%～約60モル%であり得る。ヘルパー脂質のモル%は、例えば、約30モル%～約60モル%であり得る。中性脂質のモル%は、例えば、約1モル%～約20モル%であり得る。ステルス脂質のモル%は、例えば、約1モル%～約10モル%

50

%であってもよい。

【0560】

LNPは、生分解性脂質（N）の正に帯電したアミン基と、カプセル化される核酸の負に帯電したリン酸基（P）との間で異なる比を有し得る。これは、式 N/P によって数学的に表すことができる。例えば、 N/P 比は約0.5～約100であってもよい。 N/P 比はまた、約4～約6であり得る。

【0561】

いくつかのLNPにおいて、カーゴは、Cas mRNA（例えば、Cas9 mRNA）及びgRNAを含み得る。Cas mRNA及びgRNAは、様々な比で存在し得る。例えば、LNP製剤は、約25：1～約1：25のCas mRNAとgRNA核酸との比を含み得る。代替的に、LNP製剤は、約2：1～約1：2のCas mRNAとgRNA核酸との比を含み得る。具体的な例では、Cas mRNAとgRNAとの比は、約2：1であり得る。

【0562】

いくつかのLNPでは、カーゴは、目的のポリペプチドをコードする核酸構築物（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）及びgRNAを含み得る。目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物とgRNAは、異なる比率であり得る。例えば、LNP製剤は、約25：1～約1：25の核酸構築物とgRNA核酸との比を含み得る。

【0563】

好適なLNPの具体的な例は、約4.5の窒素対リン酸塩（ N/P ）比を有し、約45：44：9：2のモル比（約45：約44：約9：約2）で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、DSPC、及びPEG2k-DMGを含有する。生分解性カチオン性脂質は、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノアート）とも呼ばれる、（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアートであり得る。例えば、Finn et al.（2018）Cell Rep. 22（9）：2227-2235を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重量比で約1：1（約1：約1）であり得る。好適なLNPの別の具体的な例は、約50：38.5：10：1.5のモル比（約50：約38.5：約10：約1.5）で、Dlin-MC3-DMA（MC3）、コレステロール、DSPC、及びPEG-DMGを含有する。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重量比で約1：2（約1：約2）であり得る。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重量比で約1：1（約1：約1）であり得る。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重量比で約2：1（約2：約1）であり得る。

【0564】

好適なLNPの別の具体的な例は、約6の窒素対リン酸塩（ N/P ）比を有し、約50：38：9：3のモル比（約50：約38：約9：約3）で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、DSPC、及びPEG2k-DMGを含有する。生分解性カチオン性脂質は、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノアート）とも呼ばれる、脂質A（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアート）であり得る。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重量比で約1：2（約1：約2）であり得る。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重量比で約1：1（約1：約1）であり得る。Cas9 mRNAは、ガイドRNAに対して重

10

20

30

40

50

量比で約 2 : 1 (約 2 : 約 1) であり得る。

【0565】

好適な LNP の別の具体的な例は、約 3 の窒素対リン酸塩 (N/P) 比を有し、約 50 : 10 : 38.5 : 1.5 の比 (約 50 : 約 10 : 約 38.5 : 約 1.5) 又は約 47 : 10 : 42 : 1 の比 (約 47 : 約 10 : 約 42 : 約 1) で、カチオン性脂質、構造脂質、コレステロール (例えば、コレステロール (ヒツジ) (Avanti 700000))、及び PEG2k-DMG (例えば、PEG-DMG 2000 (NOF America-SUNBRIGHT (登録商標) GM-020 (DMG-PEG))) を含有する。構造脂質は、例えば、DSPC (例えば、DSPC (Avanti 850365))、SOPC、DOPC、又は DOPE であり得る。カチオン性/イオン化可能脂質は、例えば、Dlin-MC3-DMA (例えば、Dlin-MC3-DMA (Biofine International)) であり得る。Cas9 mRNA は、ガイド RNA に対して重量比で約 1 : 2 (約 1 : 約 2) であり得る。Cas9 mRNA は、ガイド RNA に対して重量比で約 1 : 1 (約 1 : 約 1) であり得る。Cas9 mRNA は、ガイド RNA に対して重量比で約 2 : 1 (約 2 : 約 1) であり得る。

10

【0566】

好適な LNP の別の具体的な例は、約 45 : 9 : 44 : 2 の比 (約 45 : 約 9 : 約 44 : 約 2) で Dlin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール、及び PEG 脂質を含有する。好適な LNP の別の具体的な例は、約 50 : 10 : 39 : 1 の比 (約 50 : 約 10 : 約 39 : 約 1) で Dlin-MC3-DMA、DOPE、コレステロール、及び PEG 脂質又は PEG DMG を含有する。好適な LNP の別の具体的な例は、約 55 : 10 : 32.5 : 2.5 の比 (約 55 : 約 10 : 約 32.5 : 約 2.5) で Dlin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール、及び PEG2k-DMG を有する。好適な LNP の別の具体的な例は、約 50 : 10 : 38.5 : 1.5 の比 (約 50 : 約 10 : 約 38.5 : 約 1.5) で Dlin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール、及び PEG-DMG を有する。好適な LNP の別の具体的な例は、約 50 : 10 : 38.5 : 1.5 の比 (約 50 : 約 10 : 約 38.5 : 約 1.5) で Dlin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール、及び PEG-DMG を有する。Cas9 mRNA は、ガイド RNA に対して重量比で約 1 : 2 (約 1 : 約 2) であり得る。Cas9 mRNA は、ガイド RNA に対して重量比で約 1 : 1 (約 1 : 約 1) であり得る。Cas9 mRNA は、ガイド RNA に対して重量比で約 2 : 1 (約 2 : 約 1) であり得る。

20

30

【0567】

好適な LNP の他の例は、例えば、国際公開第 2019/067992 号、国際公開第 2020/082042 号、米国特許出願公開第 2020/0270617 号、国際公開第 2020/082041 号、米国特許出願公開第 2020/0268906 号、国際公開第 2020/082046 号 (例えば、pp. 85-86 を参照されたい)、及び米国特許出願公開第 2020/0289628 号に見出すことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0568】

(6) ヌクレアーゼ剤を含むベクター

40

本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤 (例えば、ZFN、TALEN、又は CRISPR/Cas) は、発現のためのベクターで提供され得る。ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を含み得る。

【0569】

いくつかのベクターは、環状であってもよい。代替的に、ベクターは、直線状であってもよい。ベクターは、脂質ナノ粒子、リボソーム、非脂質ナノ粒子、又はウイルスキヤプシドを介して送達されるようにパッケージされ得る。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、及び発現ベクターが挙げられる。

【0570】

50

核酸の導入は、AAV媒介送達又はレンチウイルス媒介送達などのウイルス媒介送達によっても達成され得る。ベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターなどのウイルスベクターであり得る。AAVは任意の好適な血清型であってもよく、一本鎖AAV（ssAAV）又は自己相補的AAV（scAAV）であってもよい。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まない。このようなウイルスは、免疫性が低減するようにも操作され得る。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性であり得る（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な1つ以上の遺伝子に欠損がある）。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に修飾されてもよい。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの1つ以上の特性が変化するように、1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減され得る。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損性であってもよい。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、1つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする1つ以上のベクターを含む1つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系と共に宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることができる。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。

10

20

30

【0571】

例示的なウイルス力価（例えば、AAV力価）としては、約 10^{12} ～約 10^{16} v g / mL が挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、AAV力価）としては、体重の約 10^{12} ～約 10^{16} v g / kg が挙げられる。

【0572】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、ヒト及び非ヒト霊長類（NHP）を含む複数の種に固有である。現在までに、少なくとも12種の天然血清型及び数百種の天然変異体が単離され、特徴付けられている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Li et al. (2020) Nat. Rev. Genet. 21: 255-272を参照されたい。AAV粒子は、一本鎖DNA（ssDNA）ゲノムを含む非エンベロップ二十面体タンパク質キャプシドから天然に構成される。DNAゲノムには、ウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとして働く2つの逆位末端反復（ITR）が隣接している。rep遺伝子は、ウイルス複製及びパッケージングに必要とされる4つのタンパク質をコードするが、cap遺伝子は、AAV血清型を規定する3つの構造的キャプシドサブユニット、及びいくつかの血清型においてビリオンアセンブリを促進するアセンブリ活性化タンパク質（AAP）をコードする。

40

【0573】

組換えAAV（rAAV）は、現在、治療用導入遺伝子を標的細胞にインビボで送達す

50

ることによってヒト疾患を治療するための遺伝子療法において使用される最も一般的に使用されるウイルスベクターのうちの1つである。実際、rAAVベクターは、天然のAAVに類似した二十面体キャプシドから構成されるが、rAAVビリオンは、AAVタンパク質コード配列又はAAV複製配列をキャプシド化しない。これらのウイルスベクターは非複製性である。rAAVベクターにおいて必要とされる唯一のウイルス配列は、2つのITRであり、これらは、rAAVベクターの製造中にゲノム複製及びパッケージングを誘導するために必要とされる。rAAVゲノムは、AAV rep及びcap遺伝子を欠いており、インビボでそれらを非複製性にする。rAAVベクターは、rep及びcap遺伝子を、AAV ITRに隣接する意図された導入遺伝子カセットと組み合わせて、追加のウイルスヘルパータンパク質と共にトランスで発現させることによって生成される。
【0574】

10

治療用rAAVゲノムでは、遺伝子発現カセットは、ITR配列の間に配置される。典型的には、rAAVゲノムカセットは、治療用導入遺伝子の発現を駆動するためのプロモーター、続いてポリアデニル化配列を含む。rAAV発現カセットに隣接するITRは、通常、単離され、組換えウイルスベクターに変換される最初の血清型であるAAV2に由来する。それ以来、ほとんどのrAAV生成方法は、AAV2Repベースのパッケージングシステムに依存している。例えば、Colella et al. (2017) Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 8: 87-104を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0575】

20

使用され得るITRのいくつかの非限定的な例には、配列番号158、配列番号159、又は配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなるITRが挙げられる。ITRの他の例は、配列番号158、配列番号159、又は配列番号160と比較して1つ以上の突然変異を含み、配列番号158、配列番号159、又は配列番号160に対して少なくとも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%同一であり得る。本明細書に開示されるいくつかのrAAVゲノムでは、ヌクレアーゼ剤（又はその成分）をコードする核酸は、両側に同じITR（すなわち、5'末端におけるITR、及び3'末端におけるITRの逆相補体、例えば、5'末端における配列番号158及び3'末端における配列番号168、又は5'末端における配列番号159及び3'末端における配列番号710、又は5'末端における配列番号160及び3'末端の711）が隣接している。一例では、各末端におけるITRは、配列番号158（すなわち、5'末端における配列番号158、及び3'末端における逆相補体）を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例では、各末端におけるITRは、配列番号159（すなわち、5'末端における配列番号159、及び3'末端における逆相補体）を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。一例では、少なくとも一方の末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、5'末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、3'末端におけるITRは、配列番号160を含む、それから本質的になる、又はそれからなる。一例では、各末端におけるITRは、配列番号160（すなわち、5'末端における配列番号160、及び3'末端における逆相補体）を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。一例では、一方の末端におけるITRは、配列番号160を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。本明細書に開示される他のrAAVゲノムでは、ヌクレアーゼ剤（又はその成分）をコードする核酸は、各末端に異なるITRが隣接している。一例では、一方の末端におけるITRは、配列番号158を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他方の末端におけるITRは、配列番号159を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。別の例では、一方の末端におけるITRは、配列番号158を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他方の末端におけるITRは、配列番号160を含むか、それから本質的になるか、

30

40

50

又はそれからなる。一例では、一方の末端における I T R は、配列番号 1 5 9 を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他方の末端における I T R は、配列番号 1 6 0 を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【0576】

組換え A A V ベクターの特定の血清型は、特定の組織に対するそのインビボ指向性に影響を及ぼす。A A V キャプシドタンパク質は、標的細胞への付着及び侵入を仲介し、続いてエンドソーム脱出及び核への輸送を担う。したがって、r A A V ベクターを開発する場合の血清型の選択は、どの細胞型及び組織にベクターがインビボで注射された場合に結合及び形質導入する可能性が最も高いかに影響を与える。r A A V 8 を含む r A A V のいくつかの血清型は、マウス、N H P 及びヒトにおいて全身的に送達された場合、肝臓に形質導入することができる。例えば、L i e t a l . (2 0 2 0) N a t . R e v . G e n e t . 2 1 : 2 5 5 - 2 7 2 を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0577】

核に入ると、s s D N A ゲノムはビリオンから放出され、相補的 D N A 鎖が合成されて二本鎖 D N A (d s D N A) 分子が生成される。二本鎖 A A V ゲノムは、それらの I T R を介して自然に環状化し、染色体外で核内に存続するエピソームになる。したがって、エピソーム遺伝子療法プログラムのために、r A A V 送達 r A A V エピソームは、非分裂細胞において長期のプロモーター駆動遺伝子発現を提供する。しかしながら、この r A A V 送達エピソーム D N A は、細胞が分裂するにつれて希釈される。対照的に、本明細書に記載の遺伝子療法は、長期の遺伝子発現を可能にする遺伝子挿入に基づく。

20

【0578】

特定の配列（例えば、特定の双方向性構築物配列又は特定の一方向性構築物配列）を含む特定の r A A V が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される双方向性構築物又は一方向性構築物が仮定配列 5' - C T G G A C C G A - 3' からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体 (5' - T C G G T C C A G - 3') を包含することを意味する。同様に、双方向性構築物要素又は一方向性構築物要素を含む r A A V が特定の 5' から 3' への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。例えば、5' から 3' に、第 1 のスプライスアクセプター、第 1 のコード配列、第 1 のターミネーター、第 2 のターミネーターの逆相補体、第 2 のコード配列の逆相補体、及び第 2 のスプライスアクセプターの逆相補体を含む双方向性構築物を含む r A A V が本明細書に開示される場合、それはまた、5' から 3' に、第 2 のスプライスアクセプター、第 2 のコード配列、第 2 のターミネーター、第 1 のターミネーターの逆相補体、第 1 のコード配列の逆相補体、及び第 1 のスプライスアクセプターの逆相補体を含む構築物を包含することを意味する。一本鎖 A A V ゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、+ 及び - 極性の一本鎖 A A V ゲノムは、等しい頻度で成熟 r A A V ビリオンにパッケージされる。例えば、L I N G e t a l . (2 0 1 5) J . M o l . G e n e t . M e d . 9 (3) : 1 7 5 、 Z h o u e t a l . (2 0 0 8) M o l . T h e r . 1 6 (3) : 4 9 4 - 4 9 9 、 及び S a m u l s k i e t a l . (1 9 8 7) J . V i r o l . 6 1 : 3 0 9 6 - 3 1 0 1 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0579】

s s D N A A A V ゲノムは、2 つのオープンリーディングフレーム、R e p 及び C a p からなり、相補的 D N A 鎖の合成を可能にする 2 つの逆位末端反復が隣接している。A A V トランスファープラスミドを構築する場合、導入遺伝子は、2 つの I T R の間に配置され、R e p 及び C a p は、トランスで供給され得る。R e p 及び C a p に加えて、A A V はアデノウイルスからの遺伝子を含むヘルパープラスミドを必要とし得る。これらの遺伝子 (E 4 、 E 2 a 、及び V A) は A A V 複製を仲介する。例えば、トランスファー

50

プラスミド、Rep/Cap、及びヘルパープラスミドをアデノウイルス遺伝子E1+を含むHEK293細胞にトランスフェクトして、感染性AAV粒子を生成し得る。代替的に、Rep、Cap、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせて単一のプラスミドとしてもよい。同様のパッケージングセル及び方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用され得る。

【0580】

AAVの複数の血清型が同定されている。これらの血清型は、感染する細胞の種類（すなわち、それらの指向性）が異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。AAVという用語は、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッド、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVを含む。AAVの種々の血清型のゲノム配列、並びに天然末端反復（TR）、Repタンパク質、及びキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献又はGenBankなどの公開データベースに見出すことができる。「AAVベクター」は、本明細書で使用される場合、AAV起源ではない異種配列（すなわち、AAVに対して異種の核酸配列）を含むAAVベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッド、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも1つ、及び一般に2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）が隣接している。AAVベクターは、一本鎖（ssAAV）又は自己相補的（scAAV）のいずれかであり得る。肝臓組織の血清型の例には、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.74、及びAAVhu.37が含まれ、特にAAV8が含まれる。具体的な例では、核酸構築物を含むAAVベクターは、組換えAAV8（rAAV8）であり得る。本明細書に記載のrAAV8ベクターは、キャプシドがAAV8由来であるベクターである。例えば、AAV2由来のITR及びAAV8のキャプシドを使用するAAVベクターは、本明細書においてrAAV8ベクターであるとみなされる。

【0581】

指向性は、キャプシド及び異なるウイルス血清型からのゲノムの混合である偽型付けによって更に洗練され得る。例えば、AAV2/5は、血清型5のキャプシドにパッケージされた血清型2のゲノムを含むウイルスを示す。偽型ウイルスの使用は、形質導入効率を改善するだけでなく、指向性を変え得る。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドはまた、ウイルスの指向性を改変するためにも使用され得る。例えば、AAV-DJは、8つの血清型からのハイブリッドキャプシドを含有しており、インビボで幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。AAV-DJ8は、AAV-DJの特性を示すが、脳への取り込みが増強された別の例である。AAV血清型は、突然変異によっても修飾され得る。AAV2の突然変異修飾の例には、Y444F、Y500F、Y730F、及びS662Vが含まれる。AAV3の突然変異修飾の例には、Y705F、Y731F、及びT492Vが含まれる。AAV6の突然変異修飾の例には、S663V及びT492Vが含まれる。他の偽型/修飾AAV変異体には、AAV2/1、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV2.5、AAV8.2、及びAAV/SASTGが含まれる。

【0582】

導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的 A A V (s c A A V) 変異体が使用され得る。A A V は細胞の D N A 複製機構に依存して、A A V の一本鎖 D N A ゲノムの相補的鎖を合成するため、導入遺伝子の発現が遅れる可能性がある。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補的配列を含む s c A A V を使用することができ、宿主細胞の D N A 合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖 A A V (s s A A V) ベクターも使用され得る。

【 0 5 8 3 】

パッケージング容量を増加させるために、長い導入遺伝子は、1 つ目は 3 ' スプライスドナー、2 つ目は 5 ' スプライスアクセプターである 2 つの A A V トランスファープラスミドとの間で分割され得る。細胞の共感染時に、これらのウイルスはコンカテマーを形成し、一緒にスプライシングされ、完全長導入遺伝子を発現させ得る。これにより、より長い導入遺伝子の発現が可能になるが、発現の効率は低下する。容量を増加させるための同様の方法は、相同組換えを利用する。例えば、導入遺伝子は 2 つのトランスファープラスミドの間で分割され得るが、共発現が相同組換え及び完全長導入遺伝子の発現を誘導するように、実質的な配列の重複がある。

【 0 5 8 4 】

特定の A A V において、カーゴは、1 つ以上のガイド R N A をコードする核酸（例えば、ガイド R N A をコードする D N A 、又は 2 つ以上のガイド R N A をコードする D N A ）を含み得る。特定の A A V において、カーゴは、C a s 9 などの C a s ヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、D N A ）、及び 1 つ以上のガイド R N A をコードする D N A （例えば、ガイド R N A をコードする D N A 、又は 2 つ以上のガイド R N A をコードする D N A ）を含み得る。特定の A A V において、カーゴは、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物を含み得る。特定の A A V において、カーゴは、C a s 9 などの C a s ヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、D N A ）、ガイド R N A （又は複数のガイド R N A ）をコードする D N A 、及び目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物を含み得る。

【 0 5 8 5 】

例えば、C a s 又は C a s 9 及び 1 つ以上の g R N A （例えば、1 つの g R N A 又は 2 つの g R N A 又は 3 つの g R N A 又は 4 つの g R N A ）は、L N P 媒介送達（例えば、R N A の形態）又はアデノ随伴ウイルス（A A V ）媒介送達（例えば、r A A V 8 媒介送達）を介して送達され得る。例えば、C a s 9 m R N A 及び g R N A は、L N P 媒介送達を介して送達され得る、又は C a s 9 をコードする D N A 及び g R N A をコードする D N A は、A A V 媒介送達を介して送達され得る。C a s 又は C a s 9 及び g R N A （複数可）は、単一の A A V において、又は 2 つの別個の A A V を介して送達され得る。例えば、第 1 の A A V は、C a s 又は C a s 9 発現カセットを担持し得、第 2 の A A V は、g R N A 発現カセットを担持し得る。同様に、第 1 の A A V は、C a s 又は C a s 9 発現カセットを担持し、第 2 の A A V は、2 つ以上の g R N A 発現カセットを担持し得る。代替的に、単一の A A V は、C a s 又は C a s 9 発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結された C a s 又は C a s 9 コード配列）及び g R N A 発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結された g R N A コード配列）を担持し得る。同様に、単一の A A V は、C a s 又は C a s 9 発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結された C a s 又は C a s 9 コード配列）及び 2 つ以上の g R N A 発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結された g R N A コード配列）を担持し得る。U 6 プロモーター又は小さな t R N A G l n など、様々なプロモーターを使用して g R N A の発現が駆動され得る。同様に、C a s 9 の発現を駆動するために様々なプロモーターが使用され得る。例えば、C a s 9 コード配列が A A V 構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。同様に、小さな C a s 9 タンパク質（例えば、S a C a s 9 又は C j C a s 9 を使用して、A A V パッケージング容量を最大化する）。

【 0 5 8 6 】

C . 細胞又は動物又はゲノム

上記の組成物のいずれか（例えば、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物、ヌクレアーゼ剤、ベクター、脂質ナノ粒子、又はそれらの任意の組み合わせ）を含む細胞又は動物（すなわち、対象）もまた本明細書で提供される。そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、本明細書に開示される方法によって產生され得る。例えば、細胞又は動物は、本明細書に記載される目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物のいずれか、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤のいずれか、又はその両方を含み得る。そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、新生児細胞又は動物（又はゲノム）であり得る。代替的に、そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、非新生児細胞又は動物（又はゲノム）であり得る。

10

【0587】

新生児対象（例えば、動物）は、1歳（52週齢）以下、好ましくは24週齢以下、より好ましくは12週齢以下、より好ましくは8週齢以下、及び更により好ましくは4週齢以下のヒト対象であり得る。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大4週齢である。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大8週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後7日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後6日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後5日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後4日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。

20

【0588】

新生児細胞は、任意の新生児対象の細胞であり得る。例えば、新生児細胞は、1歳（52週齢）以下、好ましくは24週齢以下、より好ましくは12週齢以下、より好ましくは8週齢以下、及び更により好ましくは4週齢以下のヒト対象の細胞であり得る。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大4週齢である。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大8週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後7日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後6日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後5日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後4日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。

30

【0589】

いくつかのそのような細胞又は動物又はゲノムでは、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物は、セーフハーバー遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座（例えば、ALB遺伝子座又はヒトALB遺伝子座のイントロン1などのALB遺伝子座又はヒトALB遺伝子座）にゲノム的に組み込まれ得る。いくつかのそのような細胞、動物、又はゲノムにおいて、核酸構築物によってコードされる目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）は、細胞、動物、又はゲノムにおいて発現される。例えば、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）をコードする核酸構築物が、ALB遺伝子座（例えば、ヒトALB遺伝子座のイントロン1）に組み込まれる場合、目的のポリペプチド（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質）がALB遺伝子座から発現され得る。目的のポリペプチドのコード配列（

40

50

例えば、マルチドメイン治療用タンパク質)は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。核酸構築物が本明細書に開示される双方向性核酸構築物である場合、新生児ゲノム、新生児細胞、又は新生児動物は、第1の目的のポリペプチドを発現し得る、又は第2の目的のポリペプチドを発現し得る。いくつかの新生児ゲノム、新生児細胞、又は新生児動物では、標的ゲノム遺伝子座は、A L B 遺伝子座である。例えば、核酸構築物は、内因性 A L B 遺伝子座のイントロン1にゲノム的に組み込まれ得る。次いで、内因性 A L B エキソン1は、核酸構築物中の目的のポリペプチド(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質)のコード配列にスプライスされ得る。

10

【0590】

核酸構築物が安定して組み込まれる標的ゲノム遺伝子座は、目的のポリペプチド(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質)をコードする核酸構築物についてヘテロ接合性であってもよく、又は目的のポリペプチド(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質)をコードする核酸構築物についてホモ接合性であってもよい。二倍体生物は、各遺伝子座に2つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に2つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合、2つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合と記載される。

【0591】

細胞、動物、又はゲノムは、真核細胞若しくは真核生物、又は哺乳動物細胞若しくは哺乳動物(例えば、非ヒト哺乳動物細胞若しくは非ヒト哺乳動物、又はヒト細胞若しくはヒト)などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、サル及び類人猿などの非ヒト霊長類が含まれる。「非ヒト」という用語は、ヒトを除外する。例には、ヒト細胞／ヒト、げっ歯類細胞／げっ歯類、マウス細胞／マウス、ラット細胞／ラット、及び非ヒト霊長類細胞／非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、細胞はヒト細胞であるか、又は動物はヒトである。同様に、細胞は、任意の好適なタイプの細胞であり得る。具体的な例では、細胞は、肝細胞などの肝臓細胞(例えば、ヒト肝臓細胞又はヒト肝細胞)である。

20

【0592】

細胞は、単離された細胞(例えば、インビトロ)、エクスピボ細胞であり得る、又は動物内(すなわち、対象内)でインビボであり得る。細胞は、有糸分裂能力のある細胞又は有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞又は減数分裂的に不活性な細胞であり得る。同様に、細胞はまた、初代体細胞又は初代体細胞ではない細胞であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、又は未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。例えば、新生児細胞は、肝細胞(例えば、マウス、非ヒト霊長類、又はヒト肝細胞)などの肝臓細胞であり得る。

30

【0593】

本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であり得る、又は病変した細胞若しくは突然変異体を担持する細胞であり得る。例えば、細胞は、目的のポリペプチドの欠損を有し得るか、又は目的のポリペプチドの欠損を有する対象由来であり得る。例えば、細胞は、G A A 欠損を有し得るか、G A A 欠損をもたらす突然変異を保有し得る、又はG A A 欠損若しくはポンベ病をもたらす突然変異を保有するG A A 欠損を有する対象由来であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、新生児対象のものである。

40

【0594】

細胞は、分裂細胞(例えば、活発に分裂している細胞)であり得る。本明細書で提供される細胞は、非分裂細胞であり得る。

【0595】

III. 治療方法、及び細胞又は対象において目的のポリペプチドをコードする核酸を導入する、組み込む、又は発現させる方法

50

本明細書に開示される核酸構築物及び組成物は、目的のポリペプチドをコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入若しくは組み込む方法、又は細胞において、細胞の集団において、若しくは対象において（例えば、新生児細胞において、新生児細胞の集団において、若しくは新生児対象において）目的のポリペプチドを発現させる方法において使用され得る。

【0596】

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物及び組成物は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸構築物を細胞又は細胞の集団又は対象（例えば、対象における細胞又は細胞の集団）に導入する方法、細胞又は細胞の集団又は対象（例えば、対象における細胞又は細胞の集団）においてマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸構築物を標的ゲノム遺伝子座に挿入又は組み込む方法、細胞又は細胞の集団又は対象（例えば、対象における細胞又は細胞の集団）においてマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法、対象の細胞又は細胞の集団又は組織（例えば、対象の細胞又は細胞の集団）内のグリコーゲン蓄積を低減する方法、対象のポンペ病又はGAA欠損症を処置する方法、及び対象のポンペ病又はGAA欠損症の徴候又は症状の発症を予防又は低減する方法において使用され得る。

【0597】

本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質組成物（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物、又はヌクレアーゼ剤（例えば、CRISPR/Cas系）と組み合わせたマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物）は、GAA欠損症若しくはポンペ病の処置、及び／又はGAA欠損症若しくはポンペ病に関連する少なくとも1つの症状の改善（例えば、対照の未処置対象と比較して）に有用である。本明細書に開示されるマルチドメイン治療用タンパク質組成物（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物、又はヌクレアーゼ剤（例えば、CRISPR/Cas系）と組み合わせたマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物）はまた、（例えば、対照の未処置対象と比較して）GAA欠損症又はポンペ病の徴候又は症状の発症を予防又は低減するのに有用である。同様に、本明細書に開示される組成物は、GAA欠損症又はポンペ病を有する対象を治療するための医薬組成物又は薬剤の調製のために使用することができる。

【0598】

GAA欠損症又はポンペ病に関して、用語「処置する」、「処置された」、「処置すること」、及び「処置」は、GAA欠損症又はポンペ病の症状、合併症、又は生化学的徴候の発症を予防又は遅延させ、症状を緩和し、又はGAA欠損症又はポンペ病の更なる進行を停止又は阻害するために、本明細書に開示されるマルチドメイン治療用核酸構築物を（例えば、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤と一緒に）対象に投与することを含む。処置は、予防的（GAA欠損症若しくはポンペ病の発症を予防若しくは遅延させるため、又はその臨床的若しくは準臨床的症状の発現を予防するため）又はGAA欠損症若しくはポンペ病の発現後の症状の治療的抑制若しくは緩和であり得る。

【0599】

GAA欠損症とは、対象（例えば、新生児対象）におけるGAAの発現及び／又は活性レベルが、正常なGAAの発現及び／又は活性レベルよりも低く、その結果、GAAの正常な機能が対象において完全に実行されない（例えば、ポンペ病をもたらす）ことを指す。ポンペ病は、酸性マルターゼ欠損症、酸性マルターゼ欠損症、 α -1, 4-グルコシダーゼ欠損症、AMD、 α -グルコシダーゼの欠損症、GAA欠損症、グリコーゲン貯蔵症II型、糖原病II型、GSD II、GSD 2、及びポンペ病としても知られている。

【0600】

ポンペ病は、身体の細胞内のグリコーゲン蓄積によって引き起こされる遺伝性障害である。特定の器官及び組織、特に筋肉におけるグリコーゲン蓄積は、正常に機能するそれらの能力を損なう。異なるタイプのポンペ病は、重篤度及びそれらが現れる年齢が異なる。これらのタイプは、乳児発症ポンペ病（古典的な乳児発症及び非古典的な乳児発症）及び遅発性ポンペ病として知られている。遅発性ポンペ病を有する対象は、乳児発症型の疾患

において見出されるよりも高い G A A 酵素レベルを有するが、一般に、正常な酵素活性の 40 パーセント未満である。典型的な乳児発症ポンペ病患者は、典型的には、1 パーセント未満の G A A 酵素活性を有するが、非古典的形態を有する患者は、通常、10 パーセント未満を有する。

【0601】

乳児発症ポンペ病の古典的な形態は、生後数ヶ月以内に始まる。心筋症などのいくつかの表現型は、出生時に存在し得る。この障害を有する乳児は、典型的には、筋力低下（ミオパシー）、筋緊張不良（筋緊張低下）、肝肥大（肝腫大）、及び心臓欠陥を経験する。罹患した乳児はまた、体重を増加させることができず、予想される速度で成長することができず（成長障害）、呼吸障害を有し得る。処置しなければ、この形態のポンペ病は、生後1年以内に心不全による死をもたらす。

10

【0602】

乳児発症ポンペ病の非古典的形態は、通常、1歳までに現れる。これは、運動能力の遅延（例えば、寝返り及び座位）及び進行性の筋力低下を特徴とする。心臓は異常に大きくなり得る（心臓肥大）が、罹患した個体は通常、心不全を経験しない。この障害における筋力低下は、深刻な呼吸障害をもたらす、非古典的な乳児発症ポンペ病を有するほとんどの小児は、小児期初期にしか生存しない。

【0603】

遅発性ポンペ病は、小児期、青年期、又は成人期の後期まで明らかにならない場合がある。遅発性ポンペ病は、通常、この障害の乳児発症形態よりも軽度であり、心臓に關与する可能性が低い。遅発性ポンペ病を有するほとんどの個体は、呼吸を制御する筋肉を含む、特に脚及び体幹において進行性の筋力低下を経験する。障害が進行するにつれて、呼吸障害が呼吸不全をもたらす。

20

【0604】

G A A 遺伝子における突然変異は、ポンペ病を引き起こし得る。G A A 遺伝子は、 α グルコシダーゼと呼ばれる酵素をコードする。この酵素は、リソソーム中で活性である。この酵素は通常、グリコーゲンをグルコースに分解する。G A A 遺伝子の突然変異は、酸性 α -グルコシダーゼがグリコーゲンを効果的に分解することを妨げ、これにより、この糖がリソソームにおいて毒性レベルまで蓄積することが可能になる。この蓄積は、身体全体の器官及び組織、特に筋肉を損傷し、ポンペ病の進行性の徴候及び症状をもたらす。

30

【0605】

これは遺伝的状態であるので、この疾患を患う人々は、親から受け継ぐ。しかしながら、どちらの親も症状を示さないことが一般的である。この疾患は稀である。米国では、40000人中1人のみがポンペ病に罹患している。ポンペ病は、全ての民族の男性及び女性の両方に影響を及ぼし得る。

【0606】

ポンペ病の症状は、疾患がそれ自体を発症する時期に応じて異なり得る。典型的なタイプでは、乳児の症状には、以下：弱い筋肉、弱い筋肉緊張、肝肥大、体重増加不全及び期待される速度での成長不全（成長障害）、呼吸困難、摂食の問題、呼吸器系における感染、及び聴覚の問題が含まれ得る。非古典的なタイプでは、乳児の症状には、以下：運動技能が遅れる（寝返り及び座るなど）、筋肉が着実に弱くなる、心臓が異常に大きくなる、呼吸障害が起こる、が含まれ得る。遅発性タイプでは、症状には以下：脚及び胴体が着実に弱くなること、呼吸障害、心肥大、歩行困難の増加、広範囲にわたる筋肉痛、運動能力の喪失、頻繁な転倒、頻繁な肺感染、無理をしたときの息切れ、朝の頭痛、日中の疲労、体重減少、以前ほど容易に嚥下できないこと、不整脈、難聴の進行、及び高レベルのクレアチニンキナーゼが含まれ得る。

40

【0607】

ポンペ病における病理は、対象が症状を示すかなり前に始まり得る。ポンペ病は、血液サンプルを採取することによって診断され得、血液中の酵素が試験され、計数される。確認は、DNA 試験によって行われ得る。例えば、G A A 酵素活性は、フロー注入タンデム

50

質量分析によって測定され得、G A A 遺伝子の完全配列決定は、低いG A A 酵素活性を有する新生児において実施される。例えば、F i c i c i o g l u e t a l . (2 0 2 0) I n t . J . N e o n a t a l S c r e e n . 6 (4) : 8 9 , T a n g e t a l . (2 0 2 0) I n t . J . N e o n a t a l S c r e e n . 6 (1) : 9、及びK l u g e t a l . (2 0 2 0) I n t . J . N e o n a t a l S c r e e n 6 (1) : 1 1 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。G A A 活性は、任意の公知の方法によって評価され得る。例えば、G A A 活性（又は活性の欠乏）を評価するために、血液ベースのアッセイは、乾燥血液スポット又は新鮮血中のG A A 活性を測定し得る。G A A 活性は、皮膚バイオプシー又は筋生検からの線維芽細胞においても測定され得る。他の二次的測定は、質量分析による尿グルコース四糖の測定であり得る。これらを遺伝子分析と組み合わせて、乳児期及び遅発性ポンペ病を診断し得る。無症候性対象は、遺伝子スクリーニングによって診断された場合、ポンペ病を有するとみなされ得る。例えば、本明細書に記載の対象は、無症候性であっても、G A A 活性の低下及び病原性G A A 変異体又は突然変異を有する場合、ポンペ病を有するとみなされる。ポンペ病に関連する病原性G A A 突然変異及び変異体が既知である。例えば、F i c i c i o g l u e t a l . (2 0 2 0) I n t . J . N e o n a t a l S c r e e n . 6 (4) : 8 9 , T a n g e t a l . (2 0 2 0) I n t . J . N e o n a t a l S c r e e n . 6 (1) : 9、及びK l u g e t a l . (2 0 2 0) I n t . J . N e o n a t a l S c r e e n 6 (1) : 1 1 を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0608】

いくつかの他のリソソーム病の場合と同様に、ポンペ病は現在、酵素補充療法（E R T）によって治療されている。組換えヒトG A A は、隔週で患者に静脈内注入によって送達される。E R T はポンペ病の心臓症状を治療するのに成功しているが、骨格筋及び中枢神経系（C N S）はE R T によって最小限にしか処置されていないままである。

【0609】

細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸構築物を細胞又は細胞の集団又は対象（例えば、対象の細胞又は細胞の集団）に導入する方法、細胞又は細胞の集団又は対象（例えば、対象の細胞又は細胞の集団）においてマルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸構築物を標的ゲノム遺伝子座に挿入する又は組み込む方法、細胞又は細胞の集団又は対象（例えば、対象の細胞又は細胞の集団）においてマルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法、対象（例えば、対象の細胞又は細胞の集団）の細胞又は細胞の集団又は組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法、及び対象のポンペ病又はG A A 欠損症を処置する方法において新生児対象であり得る。新生児対象は、1 歳（5 2 週齢）以下、好ましくは2 4 週齢以下、より好ましくは1 2 週齢以下、より好ましくは8 週齢以下、及び更により好ましくは4 週齢以下のヒト対象であり得る。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大4 週齢である。特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大8 週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3 週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2 週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1 週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後7 日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後6 日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後5 日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後4 日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後3 日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後2 日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後1 日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、「新生児細胞」は、新生児対象の細胞であり、新生児細胞の集団は、新生児対象の細胞の集団である。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の

30

40

50

集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。

【0610】

一例では、核酸の導入を必要とする細胞若しくは細胞の集団又は対象に（例えば、対象における細胞又は細胞の集団に）マルチドメイン治療用タンパク質をコードする核酸を導入する方法が本明細書で提供される。細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。そのような方法は、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか）を細胞に投与することを含み得る。マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得る、又は単独で投与され得る。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれることなくマルチドメイン治療用タンパク質を発現するもの（例えば、エピソームベクター又はマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列がプロモーターに作動可能に連結されている発現ベクター）であり得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、マルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s 系であり、標的遺伝子は、A L B（例えば、A L B のイントロン 1）である。そのような方法では、ガイド RNA は、C a s タンパク質に結合し、C a s タンパク質を A L B 遺伝子のイントロン 1 内のガイド RNA 標的配列に標的とし得、C a s タンパク質は、ガイド RNA 標的配列を切断し得、核酸構築物は、A L B 遺伝子に挿入されて、修飾された A L B 遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、修飾 A L B 遺伝子から発現され得る。

【0611】

別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現を必要とする細胞若しくは細胞の集団又は対象において（例えば、対象における細胞又は細胞の集団において）マルチドメイン治療用タンパク質を発現させる方法が本明細書で提供される。細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。そのような方法は、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか）を細胞に投与することを含み得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにマルチドメイン治療用タンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、マルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に

組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s 系であり、標的遺伝子は、A L B（例えば、A L B のイントロン 1）である。そのような方法では、ガイド R N A は、C a s タンパク質に結合し、C a s タンパク質を A L B 遺伝子のイントロン 1 内のガイド R N A 標的配列に標的とし得、C a s タンパク質は、ガイド R N A 標的配列を切断し得、核酸構築物は、A L B 遺伝子に挿入されて、修飾された A L B 遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、修飾 A L B 遺伝子から発現され得る。

【0612】

別の例では、細胞若しくは細胞の集団又は必要とする対象にいて（例えば、対象の細胞又は細胞の集団において）マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を標的ゲノム遺伝子座に挿入する又は組み込む方法が本明細書で提供される。細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。そのような方法は、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか）を細胞に投与することを含み得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、マルチドメイン治療用タンパク質は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s 系であり、標的遺伝子は、A L B（例えば、A L B のイントロン 1）である。そのような方法では、ガイド R N A は、C a s タンパク質に結合し、C a s タンパク質を A L B 遺伝子のイントロン 1 内のガイド R N A 標的配列に標的とし得、C a s タンパク質は、ガイド R N A 標的配列を切断し得、核酸構築物は、A L B 遺伝子に挿入されて、修飾された A L B 遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、修飾 A L B 遺伝子から発現され得る。

【0613】

上記方法のいずれかにおいて、細胞は、真核細胞又は哺乳動物細胞（例えば、非ヒト哺乳動物細胞又はヒト細胞）などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、サル及び類人猿などの非ヒト霊長類が含まれる。「非ヒト」という用語は、ヒトを除外する。具体的な例には、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、及び非ヒト霊長類細胞が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、細胞は、ヒト細胞である。同様に、細胞は、任意の好適なタイプの細胞であり得る。具体的な例では、細胞は、肝細胞などの肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞又はヒト肝細胞）である。細胞は新生児細胞であってもよく、又は非新生児細胞であってもよい。

【0614】

細胞は、単離された細胞（例えば、インビトロ）、エクスピボ細胞であり得る、又は動物内（すなわち、対象内）でインビボであり得る。具体的な例では、細胞は、（例えば、G A A 欠損症又はポンベ病を有する対象において）インビボである。細胞は、有糸分裂能力のある細胞又は有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞又は減数分裂的に不活性な細胞であり得る。同様に、細胞はまた、初代体細胞又は初代体細胞ではない細胞

であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、又は未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。例えば、細胞は、肝細胞（例えば、マウス、非ヒト霊長類、又はヒト肝細胞）などの肝臓細胞であり得る。

【0615】

本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であり得る、又は病変した細胞若しくは突然変異体を担持する細胞であり得る。例えば、細胞は、G A A 欠損症を有し得る、又はG A A 欠損症若しくはポンペ病を有する対象からのものであり得る。

【0616】

必要とする対象（例えば、ポンペ病を有する対象）のリソソーム α -グルコシダーゼ（G A A）欠損症を処置する方法も提供する。ポンペ病は、任意のタイプのポンペ病（例えば、乳児発症ポンペ病（古典的な乳児発症若しくは非古典的な乳児発症）又は遅発性ポンペ病）であり得る。例えば、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的乳児発症ポンペ病）を有し得る。ポンペ病については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋、肝臓、又は心臓組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋又は心臓組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の肝臓組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の心臓組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、及び心臓組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋及び心臓組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、又は中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかの方法において、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象における骨格筋組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の肝臓組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の心臓組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象の中枢神経系組織に送達され、それによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象における骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、及び中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかの方法では、発現されたマルチドメイン治療用タンパク質は、対象における骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織に送達され、それらによって内在化される。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、肝臓組織、又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、及び心臓組織において低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織及び心臓組織において低減され得る。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法

10

20

30

40

50

は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において低減され得る。場合によっては、グリコーゲンレベルは、野生型レベルまで低減される。場合によっては、骨格筋組織、心臓組織、及び／又は中枢神経系組織内のグリコーゲンレベルは、同じ年齢での野生型レベルに匹敵するレベルまで低減される。いくつかの方法では、本方法は、対象の筋力を改善する（例えば、野生型レベルまで筋力を回復させる）。いくつかの方法では、本方法は、対照と比較して対象の筋力の喪失を予防する。いくつかの方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。そのような方法は、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか）を対象に投与することを含み得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにマルチドメイン治療用タンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断し得、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように）修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s系であり、標的遺伝子は、A L B（例えば、A L Bのイントロン1）である。そのような方法では、ガイドRNAは、C a sタンパク質に結合し、C a sタンパク質をA L B遺伝子のイントロン1内のガイドRNA標的配列に標的とし得、C a sタンパク質は、ガイドRNA標的を切断し得、核酸構築物は、A L B遺伝子に挿入されて、修飾されたA L B遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように）修飾A L B遺伝子から発現され得る。

【0617】

必要とする対象（例えば、ポンペ病を有する対象）の細胞又は細胞の集団又は組織内のグリコーゲン蓄積を低減する方法も提供される。同様に、細胞又は細胞の集団におけるグリコーゲン蓄積を低減する方法が提供される。ポンペ病は、任意のタイプのポンペ病（例えば、乳児発症ポンペ病（古典的な乳児発症若しくは非古典的な乳児発症）又は遅発性ポンペ病）であり得る。例えば、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的な乳児発症ポンペ病）を有し得る。ポンペ病については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグ

10

20

30

40

50

リコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、及び心臓組織において低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織及び心臓組織において低減され得る。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において低減され得る。場合によっては、グリコーゲンレベルは、野生型レベルまで低減される。場合によっては、骨格筋組織、心臓組織、及び／又は中枢神経系組織内のグリコーゲンレベルは、同じ年齢での野生型レベルに匹敵するレベルまで低減される。いくつかの方法では、本方法は、対象における筋力を改善する（例えば、野生型レベルまで筋力を回復させる）。いくつかの方法では、本方法は、対照と比較して対象の筋力の喪失を予防する。いくつかの方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。そのような方法は、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか）を対象に投与することを含み得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにマルチドメイン治療用タンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断し得、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように）修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s系であり、標的遺伝子は、A L B（例えば、A L Bのイントロン1）である。そのような方法では、ガイドRNAは、C a sタンパク質に結合し、C a sタンパク質をA L B遺伝子のイントロン1内のガイドRNA標的配列に標的とし得、C a sタンパク質は、ガイドRNA標的を切断し得、核酸構築物は、A L B遺伝子に挿入されて、修飾されたA L B遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように）修飾A L B遺伝子から発現され得る。

【0618】

対象のポンペ病を処置する方法もまた提供される。ポンペ病は、任意のタイプのポンペ病（例えば、乳児発症ポンペ病（古典的な乳児発症若しくは非古典的な乳児発症）又は遅

10

20

30

40

50

発性ポンペ病)であり得る。例えば、対象は、乳児発症ポンペ病(例えば、古典的な乳児発症ポンペ病)を有し得る。ポンペ病については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、及び心臓組織において低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織及び心臓組織において低減され得る。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において低減され得る。場合によっては、グリコーゲンレベルは、野生型レベルまで低減される。場合によっては、骨格筋組織、心臓組織、及び／又は中枢神経系組織内のグリコーゲンレベルは、同じ年齢での野生型レベルに匹敵するレベルまで低減される。いくつかの方法では、本方法は、対象の筋力を改善する(例えば、野生型レベルまで筋力を回復させる)。いくつかの方法では、本方法は、対照と比較して対象の筋力の喪失を予防する。いくつかの方法では、本方法は、対象が同じ年齢で野生型レベルに匹敵する筋力を有することをもたらす。そのような方法は、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか(又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか)を対象に投与することを含み得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにマルチドメイン治療用タンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合)。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に(例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に)投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座(例えば、標的遺伝子)内のヌクレアーゼ標的配列を切断し得、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、(例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように)修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s系であり、標的遺伝子は、A L B(例えば、A L Bのイントロン1)である。そのような方法では、ガイドRNAは、C a sタンパク質に結合し、C a sタンパク質をA L B遺伝子のイントロン1内のガイドRNA標的配列に標的とし得、C a sタンパク質は、ガイドRNA標的を切断し得、核酸構築物は、A L B遺伝子に挿入されて、修飾されたA L B遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、(例えば、対象に

10

20

30

40

50

において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように) 修飾A L B遺伝子から発現され得る。

【0619】

処置は、対象における疾患又は障害のための治療薬の任意の投与又は適用を指し、疾患を阻害すること、その発症を阻止すること、疾患の1つ以上の症状を軽減すること、疾患を治癒すること、又は疾患の1つ以上の症状の再発を予防することを含む。例えば、ポンペ病の処置は、ポンペ病の症状を緩和することを含み得る。ポンペ病は、上で詳細に記載されており、欠損又は欠陥G A A遺伝子又はG A Aポリペプチドによって引き起こされる障害を指す。欠陥G A A遺伝子又はG A Aポリペプチドは、G A A発現及び／又はG A Aの活性の低減をもたらす可能性がある。

10

【0620】

対象のポンペ病の徴候又は症状の発症を(例えば、未治療の対照対象と比較して) 予防又は低減する方法も提供される。予防とは、ポンペ病の徴候又は症状が決して存在しなくなることを意味する。そのような徴候及び症状はよく知られており、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。ポンペ病は、任意のタイプのポンペ病(例えば、乳児発症ポンペ病(古典的な乳児発症若しくは非古典的な乳児発症) 又は遅発性ポンペ病) であり得る。例えば、ポンペ病は、乳児発症ポンペ病(例えば、古典的な乳児発症ポンペ病) であり得る。ポンペ病については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織又は心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、及び心臓組織において予防又は低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織及び心臓組織において予防又は低減され得る。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象における骨格筋組織、心臓組織、又は中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の骨格筋組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の肝臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の心臓組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。いくつかの方法では、本方法は、対象の中枢神経系組織内のグリコーゲン蓄積を予防又は低減する。例えば、グリコーゲン蓄積は、対象の骨格筋組織、肝臓組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において予防又は低減され得る。例えば、グリコーゲン蓄積の開始は、対象の骨格筋組織、心臓組織、及び中枢神経系組織において予防又は低減され得る。そのような方法は、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物のいずれか(又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物のいずれか) を対象に投与することを含み得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る(例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにマルチドメイン治療用タンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合)。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に(例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に) 投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座(例えば、標的遺伝子) 内のヌクレアーゼ標的配列を切断し得、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構

20

30

40

50

築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aの発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aが達成されるように）修飾標的ゲノム遺伝子座から発現され得る。マルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得る、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、C R I S P R / C a s系であり、標的遺伝子は、A L B（例えば、A L Bのイントロン1）である。そのような方法では、ガイドRNAは、C a sタンパク質に結合し、C a sタンパク質をA L B遺伝子のイントロン1内のガイドRNA標的配列に標的とし得、C a sタンパク質は、ガイドRNA標的を切断し得、核酸構築物は、A L B遺伝子に挿入されて、修飾されたA L B遺伝子を作製し得、マルチドメイン治療用タンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのマルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質の発現又は治療有効レベルの循環マルチドメイン治療用タンパク質若しくはG A Aタンパク質が達成されるように）修飾A L B遺伝子から発現され得る。

10

20

30

40

50

【0621】

いくつかの方法では、治療有効量のマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含む組成物又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物とヌクレアーゼ剤との組み合わせ（例えば、C R I S P R / C a s系）が対象に投与される。治療有効量は、それが投与される所望の効果を生み出す量である。正確な量は、治療の目的に依存し、既知の技術を使用して当業者によって確認可能である。例えば、L l o y d (1 9 9 9) T h e A r t , S c i e n c e a n d T e c h n o l o g y o f P h a r m a c e u t i c a l C o m p o u n d i n gを参照されたい。特定の例では、少なくとも約2 μ g / mL又は少なくとも約5 μ g / mLのマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルは、治療上有効であると考えられ、筋肉におけるグリコーゲン貯蔵の完全な補正に対応する。

【0622】

本明細書に開示される組成物を含む治療用又は薬学的組成物は、好適な担体、賦形剤、及び改善された移入、送達、耐性などを提供するために製剤に組み込まれる他の薬剤と共に投与され得る。多数の適切な製剤は、全ての薬剤師に既知である処方集：に見出すことができる：R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , E a s t o n , P Aに見出され得る。P o w e l l e t a l . 「C o m p e n d i u m o f e x c i p i e n t s f o r p a r e n t e r a l f o r m u l a t i o n s」P D A (1 9 9 8) J . P h a r m . S c i . T e c h n o l . 5 2 : 2 3 8 - 3 1 1も参照されたい。特定の実施形態では、医薬組成物は、非発熱性である。

【0623】

本明細書に開示される組成物は、G A A欠損症又はポンペ病の症状のうちの1つ以上の重篤度を軽減又は予防又は減少させるために投与され得る。そのような症状については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。

【0624】

上記方法のいずれかにおける対象は、G A A欠損又はポンペ病の改善又は処置を必要とする対象であり得る。上記方法のいずれかにおける対象は、真核生物又は哺乳動物などの任意の適切な種由来であり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、サル及び類人猿などの非ヒト霊長類が含まれる。「非ヒト」という用語は、ヒトを除外する。好適な種の具体的な例には、ヒト、げっ歯類、マウス、ラット、及び非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、対象は、ヒトである。いくつかの方法における対象は、新生児対象であり得る。他の方法では、対象は、新生児対象ではない。

【0625】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物がゲノムに組み込まれる方法では、セーフハーバー遺伝子座（セーフハーバー遺伝子）又は内因性GAA遺伝子座などの、遺伝子を発現することができる任意の標的ゲノム遺伝子座が使用され得る。そのような遺伝子座については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。具体的な例では、標的ゲノム遺伝子座は、内因性ヒトALB遺伝子座などの内因性ALB遺伝子座であり得る。例えば、核酸構築物は、内因性ALB遺伝子座のイントロン1にゲノム的に組み込まれ得る。次いで、内因性ALBエキソン1は、核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列にスプライスされ得る。

【0626】

マルチドメイン治療用タンパク質コード配列を含むマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の標的ゲノム遺伝子座、及び特に内因性ALB遺伝子座への標的化挿入は、複数の利点をもたらす。そのような方法は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列の安定した長期発現を可能にするための安定した修飾をもたらす。ALB遺伝子座に関して、そのような方法は、内因性ALBプロモーター及び調節領域を利用して、治療有効レベルの発現を達成することができる。例えば、核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質のコード配列は、プロモーターを含まない遺伝子を含み得、挿入された核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ALB遺伝子座）において内因性プロモーターに作動可能に連結され得る。内因性プロモーターの使用は、核酸構築物にプロモーターを含める必要がなく、（例えば、AAVでは）通常効率的にパッケージングされない可能性があるより大きな導入遺伝子のパッケージングを可能にするために有利である。代替的に、核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、核酸構築物中の外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。使用され得るプロモーターのタイプの例は、本明細書の他の場所で開示する。

【0627】

任意選択的に、標的ゲノム遺伝子座における内因性遺伝子（例えば、内因性ALB遺伝子）のいくつか又は全てを、核酸構築物からのマルチドメイン治療用タンパク質コード配列の挿入時に発現させ得る。代替的に、いくつかの方法では、標的ゲノム遺伝子座の内因性遺伝子のいずれも発現されない。一例として、核酸構築物の組み込み後の修飾標的ゲノム遺伝子座（例えば、修飾ALB遺伝子座）は、内因性分泌シグナル（例えば、アルブミン分泌シグナル）を含むキメラタンパク質及び核酸構築物によってコードされるマルチドメイン治療用タンパク質をコードし得る。別の例では、ALB遺伝子座の第1のイントロンが標的とされ得る。ALBの分泌シグナルペプチドは、ALB遺伝子のエキソン1によってコードされる。そのようなシナリオでは、スプライスアクセプター及びマルチドメイン治療用タンパク質コード配列を担持するプロモーターを含まないカセットが、マルチドメイン治療用タンパク質の発現及び分泌を支持する。内因性ALBエキソン1と組み込まれたマルチドメイン治療用タンパク質コード配列との間のスプライシングは、組み込まれた核酸構築物によってコードされるマルチドメイン治療用タンパク質配列に作動可能に連結されたエキソン1によってコードされる内因性ALB配列を含むキメラmRNA及びタンパク質を作製する。

【0628】

マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、本明細書の他の場所で記載されているように、相同組換え（HR）及び非相同末端結合（NHEJ）を含む任意の手段によって標的ゲノム遺伝子座に挿入され得る。具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、NHEJによって挿入される（例えば、ホモロジーアームを含まず、NHEJによって挿入される）。

【0629】

別の具体的な例では、核酸構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込み（例えば、方向性のあるホモロジー非依存性標的化組み込み）を介して挿入され得る。例えば、核酸構築物中のマルチドメイン治療用タンパク質コード配列は、各側にヌクレアーゼ剤の標的部

10

20

30

40

50

位が隣接され得る（例えば、標的ゲノム遺伝子座と同じ標的部位、及び同じヌクレアーゼ剤が標的ゲノム遺伝子座の標的部位を切断するために使用される）。次いで、ヌクレアーゼ剤は、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列に隣接する標的部位を切断し得る。具体的な例では、核酸構築物は、AAV媒介送達で送達され得、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列に隣接する標的部位の切断は、AAVの逆位末端反復（ITR）を除去し得る。ITRを除去すると、ITRの存在が反復配列のために配列決定作業を妨げる可能性があるため、成功したターゲティングの評価が容易になる。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が正しい配向で標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合、標的ゲノム遺伝子座の標的部位（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むgRNA標的配列）はもはや存在しないが、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が逆の配向で標的ゲノム遺伝子座に挿入されると再形成される。これは、マルチドメイン治療用タンパク質コード配列が、発現のために正しい配向に挿入されることを確実にするのに役立ち得る。

10

【0630】

上記方法のいずれかにおいて、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤（例えば、CRISPR/Cas系）と同時に投与され得るか、又は同時に投与され得ない（例えば、任意の組み合わせで逐次的に）。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物及びヌクレアーゼ剤を含む組成物を投与することを含む方法では、それらは別々に投与され得る。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤の前に、ヌクレアーゼ剤の後に、又はヌクレアーゼ剤と同時に投与され得る。核酸構築物及びヌクレアーゼ剤を細胞に投与する任意の好適な方法、特に、肝臓に投与する方法を使用することができ、そのような方法の例は、本明細書の他の場所で詳細に記載されている。治療方法又は対象においてインビボで細胞を標的とする方法では、核酸構築物は、対象における特定のタイプの細胞に挿入され得る。マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物及び／又はヌクレアーゼ剤を対象に導入するための方法及びビヒクルは、対象において、どのタイプの細胞が標的化されるかに影響を及ぼし得る。いくつかの方法では、例えば、核酸構築物は、肝細胞などの肝臓細胞における標的ゲノム遺伝子座（例えば、内因性ALB遺伝子座）に挿入される。そのような構築物及びヌクレアーゼ剤を対象に導入するための方法及びビヒクル（脂質ナノ粒子媒介送達及びAAV媒介送達（例えば、rAAV8媒介送達）並びに静脈内注射などの、肝臓又は肝細胞を標的とする方法及びビヒクルを含む）は、本明細書の他の場所により詳細に開示されている。

20

30

【0631】

核酸構築物（又はベクター若しくはLNP）及びヌクレアーゼ剤を含む組成物が投与される方法では（すなわち、核酸構築物（又はベクター若しくはLNP）及びヌクレアーゼ剤の両方が投与される方法では）、核酸構築物及びヌクレアーゼ剤は、同時に投与され得る。代替的に、核酸構築物及びヌクレアーゼ剤は、任意の順序で逐次的に投与され得る。例えば、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤の後に投与され得るか、又はヌクレアーゼ剤は、核酸構築物の後に投与され得る。例えば、ヌクレアーゼ剤は、核酸構築物の投与の約1時間～約48時間、約1時間～約24時間、約1時間～約12時間、約1時間～約6時間、約1時間～約2時間、約2時間～約48時間、約2時間～約24時間、約2時間～約12時間、約2時間～約6時間、約3時間～約48時間、約6時間～約48時間、約12時間～約48時間、又は約24時間～約48時間の前後に投与され得る。

40

【0632】

一例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する約4時間、約8時間、約12時間、約18時間、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、又は約1週間前に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、少なくとも約18時間、少なくとも約1日、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約4日、少なくとも約5日、少なくとも約6日、又は少なくとも約1週間前に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する約4時間～約24時間、約4時間～約12時間、約4時間～約8時

50

間、約 8 時間～約 24 時間、約 12 時間～約 24 時間、約 1 日～約 7 日、約 1 日～約 6 日、約 1 日～約 5 日、約 1 日～約 4 日、約 1 日～約 3 日、約 1 日～約 2 日、約 2 日～約 7 日、約 3 日～約 7 日、約 4 日～約 7 日、約 5 日～約 7 日、約 6 日～約 7 日、又は約 1 日～約 3 日前に投与される。

【0633】

一例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから約 4 時間、約 8 時間、約 12 時間、約 18 時間、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、又は約 1 週間後に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから少なくとも約 4 時間、少なくとも約 8 時間、少なくとも約 12 時間、少なくとも約 18 時間、少なくとも約 1 日、少なくとも約 2 日、少なくとも約 3 日、少なくとも約 4 日、少なくとも約 5 日、少なくとも約 6 日、又は少なくとも約 1 週間後に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから約 4 時間～約 24 時間、約 4 時間～約 12 時間、約 4 時間～約 8 時間、約 8 時間～約 24 時間、約 12 時間～約 24 時間、約 1 日～約 7 日、約 1 日～約 6 日、約 1 日～約 5 日、約 1 日～約 4 日、約 1 日～約 3 日、約 1 日～約 2 日、約 2 日～約 7 日、約 3 日～約 7 日、約 4 日～約 7 日、約 5 日～約 7 日、約 6 日～約 7 日、又は約 1 日～約 3 日後に投与される。

【0634】

上記方法のいずれかにおいて、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物及びヌクレアーゼ剤（例えば、CRISPR/Cas 系）は、任意の好適な送達系及び既知の方法を使用して投与され得る。ヌクレアーゼ剤成分及びマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物（例えば、ガイド RNA、Cas タンパク質、及びマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物）は、必要に応じて同じ又は異なる送達方法を使用して、個別に又は任意の組み合わせで一緒に送達され得る。

【0635】

CRISPR/Cas 系が使用される方法では、ガイド RNA は、例えば、RNA（例えば、本明細書に開示される修飾ガイド RNA などのインビトロ転写 RNA）の形態で、又はガイド RNA をコードする DNA の形態で、対象又は細胞に導入又は投与され得る。DNA の形態で導入されると、ガイド RNA をコードする DNA は、細胞内で又は対象における細胞内で活性であるプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ガイド RNA は、AAV を介して送達され、U6 プロモーターの下で、インビボで発現させてもよい。そのような DNA は、1 つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、そのような発現構築物は、単一の核酸分子の構成要素であり得る。代替的に、それらは、2 つ以上の核酸分子の間で任意の組み合わせで分離することができる（すなわち、1 つ以上の CRISPR RNA をコードする DNA 及び 1 つ以上の tracrRNA をコードする DNA は、別個の核酸分子の構成要素であり得る）。

【0636】

同様に、Cas タンパク質は、任意の形態で対象又は細胞に導入され得る。例えば、Cas タンパク質は、gRNA と複合体を形成した Cas タンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、Cas タンパク質は、本明細書に開示される修飾 mRNA などの RNA（例えば、メッセンジャー RNA (mRNA)）又は DNA などの、Cas タンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意選択的に、Cas タンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。例えば、Cas タンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。Cas タンパク質をコードする核酸が細胞又は対象に導入されると、Cas タンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で又は対象における細胞内で発現され得る。

【0637】

一例では、Cas タンパク質は、mRNA（例えば、本明細書に開示される修飾 mRNA

A) の形態で導入され、ガイドRNAは、本明細書に開示される修飾gRNAなどのRNAの形態で（例えば、同じ脂質ナノ粒子内に一緒に）導入される。ガイドRNAは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。同様に、Cas mRNAは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。

【0638】

遺伝子編集系（例えば、Casタンパク質）による切断後にマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物が挿入される方法では、遺伝子編集系（例えば、Casタンパク質）は、標的ゲノム遺伝子座を切断して一本鎖切断（ニック）又は二本鎖切断を作製することができ、切断された又はニックの入った遺伝子座は、非相同末端結合（NHEJ）媒介挿入又は相同組換え修復を介してマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物の挿入によって修復することができる。任意選択的に、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物による修復は、ガイドRNA標的配列を除去又は破壊し、その結果、標的化されている対立遺伝子は、CRISPR/Cas試薬によって再標的化され得ない。

10

【0639】

本明細書の他の場所でより詳細に説明されるように、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）を含み得、それらは一本鎖又は二本鎖であり得、それらは直線状又は環状の形態であり得る。マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ネイキッド核酸であり得るか、又はAAVなどのウイルスによって送達され得る。具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、AAVを介して送達され得、非相同末端結合によって標的ゲノム遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子、ALB遺伝子、又はALB遺伝子のイントロン1）に挿入することが可能であり得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

20

【0640】

いくつかのマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、非相同末端結合によって挿入することが可能である。場合によっては、そのようなマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。例えば、そのようなマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、Casタンパク質による切断後の平滑末端二本鎖切断に挿入され得る。具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、AAVを介して送達され得、非相同末端結合によって挿入することが可能であり得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

30

【0641】

別の例では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込みを介して挿入され得る。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、各側にガイドRNA標的配列（例えば、標的ゲノム遺伝子座と同じ標的部位、及びCRISPR/Cas試薬（Casタンパク質及びガイドRNA）が標的ゲノム遺伝子座の標的部位を切断するために使用される）が隣接していてもよい。次いで、Casタンパク質は、核酸インサートに隣接する標的部位を切断し得る。具体的な例では、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、AAV媒介送達で送達され、核酸インサートに隣接する標的部位の切断は、AAVの逆位末端反復（ITR）を除去し得る。いくつかの方法では、核酸インサートが正しい配向で標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合、標的ゲノム遺伝子座の標的部位（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むガイドRNA標的配列）はもはや存在しないが、核酸インサートが逆の配向で標的ゲノム遺伝子座に挿入されると再形成される。

40

【0642】

本明細書に開示される方法は、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物、及び任意選択的に、核酸（例えば、DNA又はRNA）、タンパク質、又は核酸-タンパク質複合体の形態を含む、CRISPR/Cas試薬などのヌクレアーゼ剤を、対象（例えば、動物又はヒトなどの哺乳動物）又は細胞に導入又は投与することを含み得る。「導入するこ

50

と」又は「投与すること」は、細胞の内部又は対象内の細胞の内部にアクセスできるような様式で、細胞又は対象に分子（例えば、核酸又はタンパク質）を提示することが含まれる。導入することは、任意の手段によって達成され得、構成要素のうちの2つ以上（例えば、構成要素のうちの2つ、又は構成要素の全て）を、任意の組み合わせで同時に又は逐次的に細胞又は対象に導入し得る。例えば、Casタンパク質は、ガイドRNAの導入前に細胞又は対象に導入され得る、又はガイドRNAの導入後に導入され得る。別の例として、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、Casタンパク質及びガイドRNAの導入前に導入され得るか、又はCasタンパク質及びガイドRNAの導入後に導入され得る（例えば、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物は、Casタンパク質及びガイドRNAの導入の約1、2、3、4、8、12、24、36、48、又は72時間前又は後に投与され得る）。例えば、米国特許出願公開第2015/0240263号及び同第2015/0110762号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。加えて、成分のうちの2つ以上は、同じ送達方法又は異なる送達方法によって細胞又は対象に導入され得る。同様に、成分のうちの2つ以上は、同じ投与経路又は異なる投与経路によって対象に導入され得る。

10

【0643】

ガイドRNAは、例えば、RNA（例えば、インビトロ転写RNA）の形態で、又はガイドRNAをコードするDNAの形態で、対象又は細胞に導入され得る。ガイドRNAは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。DNAの形態で導入されると、ガイドRNAをコードするDNAは、細胞内で又は対象における細胞内で活性であるプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ガイドRNAは、AAVを介して送達され、U6プロモーターの下で、インビボで発現させてもよい。そのようなDNAは、1つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、そのような発現構築物は、単一の核酸分子の構成要素であり得る。代替的に、それらは、2つ以上の核酸分子の間で任意の組み合わせで分離することができる（すなわち、1つ以上のCRISPR RNAをコードするDNA及び1つ以上のtracrRNAをコードするDNAは、別個の核酸分子の構成要素であり得る）。

20

【0644】

同様に、Casタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、Casタンパク質は、gRNAと複合体を形成したCasタンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、Casタンパク質は、RNA（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA））又はDNAなどの、Casタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。Cas RNAは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。任意選択的に、Casタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。例えば、Casタンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。Casタンパク質をコードする核酸が細胞又は対象に導入されると、Casタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で又は対象における細胞内で発現され得る。

30

40

【0645】

Casタンパク質又はガイドRNAをコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子又は他の目的の核酸配列（例えば、Cas遺伝子）の発現を指示することができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移入することができる任意の核酸構築物を含む。例えば、Casタンパク質をコードする核酸は、1つ以上のgRNAをコードするDNAを含むベクター内にあり得る。代替的に、それは、1つ以上のgRNAをコードするDNAを含むベクターとは別のベクター又はプラスミド内にあり得る。発現構築物で使用され得る好適なプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹（ES）細胞、

50

成体幹細胞、発達的に制限された前駆細胞、誘導多能性幹（iPS）細胞、又は1細胞期胚のうちの1つ以上において活性なプロモーターが含まれる。例えば、好適なプロモーターは、肝細胞などの肝臓細胞において活性であり得る。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、又は組織特異的プロモーターであり得る。任意選択的に、プロモーターは、一方向のCasタンパク質及び他の方向のガイドRNAの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであり得る。そのような双方向プロモーターは、（1）遠位配列要素（DSE）、近位配列要素（PSE）、及びTATAボックスの3つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Pol IIIプロモーター、並びに（2）DSEの5'末端に逆方向に融合されたPSE及びTATAボックスを含む第2の基本的なPol IIIプロモーターからなり得る。例えば、H1プロモーターでは、DSEはPSE及びTATAボックスに隣接しており、プロモーターは、U6プロモーターに由来するPSE及びTATAボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2016/0074535号を参照されたい。双方向プロモーターを使用してCasタンパク質及びガイドRNAをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることを可能にする。好ましい実施形態では、プロモーターは、ヒトにおける使用について規制当局によって承認されている。特定の実施形態では、プロモーターは、肝臓細胞における発現を駆動する。

10

20

【0646】

対象又は細胞に導入された分子（例えば、Casタンパク質又はガイドRNA又は核酸をコードする）は、導入された分子の安定性を増加させる（例えば、所定の保存条件下（例えば、-20℃、4℃、又は周囲温度）で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸又はタンパク質の0.5重量%未満のままである期間を延長するか、又はインビボでの安定性を増加させる）担体を含む組成物で提供され得る。そのような担体の非限定的な例には、ポリ（乳酸）（PLA）ミクロスフェア、ポリ（D，L-乳酸-コグリコール-酸）（PLGA）ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート、及び脂質微小管が含まれる。

【0647】

細胞又は対象への分子（例えば、核酸又はタンパク質）の導入を可能にするために、様々な方法及び組成物が本明細書で提供される。分子を種々の細胞型に導入するための方法は既知であり、例えば、安定したトランスフェクション法、一過性トランスフェクション法、及びウイルス媒介法が含まれる。

30

【0648】

トランスフェクションプロトコル、及び分子を細胞に導入するためのプロトコルは様々な方法であり得る。非限定的なトランスフェクション法には、リポソーム、ナノ粒子、リン酸カルシウム（Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2): 456-67, Bacchetti et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (4): 1590-4、及びKriegler, M (1991) *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97)、デンドリマー、又はDEAE-デキストラン若しくはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを使用する化学的ベースのトランスフェクション法が含まれる。非化学的方法には、電気穿孔法、ソノポレーション、及び光トランスフェクションが含まれる。粒子ベースのトランスフェクションには、遺伝子銃の使用、又は磁石支援トランスフェクション（Bertram (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28）が含まれる。ウイルス法もトランスフェクションに使用され得る。

40

【0649】

50

細胞への核酸又はタンパク質の導入はまた、電気穿孔法、細胞質内注射、ウイルス感染、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、トランスフェクション、脂質媒介トランスフェクション、又はヌクレオフェクションによって媒介され得る。ヌクレオフェクションは、核酸基質を細胞質だけでなく核膜を介して核に送達することを可能にする改善された電気穿孔法技術である。加えて、本明細書に開示される方法でのヌクレオフェクションの使用は、典型的には、通常の電気穿孔法よりもはるかに少ない細胞を必要とする（例えば、通常の電気穿孔法による700万に対してわずか約200万）。一例では、ヌクレオフェクションは、LONZA（登録商標）NUCLEOFECTOR（商標）系を使用して実施される。

【0650】

細胞（例えば、接合子）への分子（例えば、核酸又はタンパク質）の導入は、マイクロインジェクションによっても達成され得る。接合子（すなわち、1細胞期胚）では、マイクロインジェクションは母方及び／又は父方の前核又は細胞質に行うことができる。マイクロインジェクションが1つの前核のみに行われる場合は、サイズが大きいいため、父方の前核が適している。mRNAのマイクロインジェクションは、好ましくは細胞質へ（例えば、mRNAを翻訳機構に直接送達するために）のものであるが、一方で、Casタンパク質若しくはCasタンパク質をコードするか又はRNAをコードするポリヌクレオチドのマイクロインジェクションは、核／前核へのものが好ましい。代替的に、マイクロインジェクションは、核／前核及び細胞質の両方への注射によって実施することができ、針を最初に核／前核に導入し、最初の量を注射することができ、1細胞期胚から針を除去しながら、2番目の量を細胞質に注射することができる。Casタンパク質が細胞質に注入される場合、Casタンパク質は、核／前核への送達を確実にするために、核局在化シグナルを含むことが好ましい。マイクロインジェクションを実施する方法は周知である。例えば、Nagy et al. (Nagy A, Gertszenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照されたく、また、Meyer et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:15022-15026、及びMeyer et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109:9354-9359を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0651】

分子（例えば、核酸又はタンパク質）を細胞又は対象に導入するための他の方法には、例えば、ベクター送達、粒子媒介送達、エクソソーム媒介送達、脂質ナノ粒子媒介送達、細胞透過性ペプチド媒介送達、又は埋め込み型デバイス媒介送達が含まれ得る。具体的な例として、核酸又はタンパク質は、ポリ（乳酸）（PLA）マイクロスフェア、ポリ（D，L-乳酸-コグリコール酸）（PLGA）マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート、又は脂質微小管などの担体中で、細胞又は対象に導入され得る。対象への送達のいくつかの具体的な例には、流体力学的送達、ウイルス媒介送達（例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）媒介送達）、及び脂質ナノ粒子媒介送達が含まれる。

【0652】

細胞又は対象への核酸及びタンパク質の導入は、流体力学的送達（hydrodynamic delivery、HDD）によって達成され得る。実質細胞への遺伝子送達では、必須のDNA配列のみを選択した血管から注射する必要がある、現在のウイルス及び合成ベクターに関連する安全性の懸念が排除される。DNAは血流に注入されると、血液にアクセスできる様々な組織の細胞に到達することができる。流体力学的送達は、循環中の非圧縮性血液への大量の溶液の迅速な注射によって生成される力を利用して、大きくかつ膜不透過性の化合物が実質細胞に入るのを妨げる内皮及び細胞膜の物理的障壁を克服する。DNAの送達に加えて、この方法は、RNA、タンパク質、及び他の小さな化合物をインビボで効率

的に細胞内に送達するのに有用である。例えば、Bonamassa et al. (2011) Pharm. Res. 28 (4) : 694-701を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0653】

核酸の導入は、AAV媒介送達又はレンチウイルス媒介送達などのウイルス媒介送達によっても達成され得る。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まない。このようなウイルスは、免疫性が低減するようにも操作され得る。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性であり得る（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な1つ以上の遺伝子に欠損がある）。ウイルスは、一過性発現又はより長く持続する発現を引き起こし得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に修飾されてもよい。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの1つ以上の特性が変化するように、1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減されてもよい。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、1つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする1つ以上のベクターを含む1つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系と共に宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることができる。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。

【0654】

例示的なウイルス力価（例えば、AAV力価）としては、約 10^{12} ～約 10^{16} v g / mL が挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、AAV力価）としては、体重の約 10^{12} ～約 10^{16} v g / kg が挙げられる。

【0655】

核酸及びタンパク質の導入は、脂質ナノ粒子（LNP）媒介送達によっても達成され得る。例えば、LNP媒介送達は、Cas mRNA及びガイドRNAの組み合わせ、又はCasタンパク質及びガイドRNAの組み合わせを送達するために使用され得る。LNP媒介送達は、RNAの形態でガイドRNAを送達するために使用され得る。具体的な例では、ガイドRNA及びCasタンパク質はそれぞれ、同じLNPでのLNP媒介送達を介してRNAの形態で導入される。本明細書の他の場所でより詳細に論じられるように、RNAのうちの1つ以上が修飾され得る。例えば、ガイドRNAは、5'末端及び／又は3'末端に1つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾され得る。そのような修飾には、例えば、5'末端及び／若しくは3'末端の1つ以上のホスホロチオエート連結、又は5'末端及び／若しくは3'末端の1つ以上の2'-O-メチル修飾が含まれ得る。別の例として、Cas mRNA修飾は、シュードウリジンでの置換（例えば、シュードウリジンで完全

10

20

30

40

50

に置換される)、5'キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。別の例として、Cas mRNA 修飾は、N1-メチル-シュードウリジンでの置換(例えば、N1-メチル-シュードウリジンで完全に置換される)、5'キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。他の修飾もまた、本明細書の他の場所に開示されるように企図される。そのような方法による送達は、一過性のCas発現及び／又は一過性のガイドRNAの存在をもたらし得、生分解性脂質はクリアランスを改善し、忍容性を改善し、免疫原性を低下させる。脂質製剤は、生体分子を分解から保護すると同時に、細胞への取り込みを改善し得る。脂質ナノ粒子は、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア(単層及び多層ベシクル、例えば、リポソームを含む)、エマルジョン中の分散相、ミセル、又は懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために1つ以上の核酸又はタンパク質をカプセル化するために使用され得る。カチオン性脂質を含有する製剤は、核酸などのポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質(すなわち、非荷電又は両性イオン脂質)、アニオン性脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、及びナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを増加させるステルス脂質である。好適なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質の例は、全ての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2016/010840(A1)号及び同第2017/173054(A1)号に見出すことができる。例示的な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質及び1つ以上の他の成分を含み得る。一例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質を含み得る。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質及びDSPCなどの中性脂質を含み得る。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質、DSPCなどの任意選択的な中性脂質、及びS010、S024、S027、S031、又はS033などのステルス脂質を含み得る。

10

20

30

40

50

【0656】

LNPは、以下：(i)カプセル化及びエンドソーム脱出のための脂質、(ii)安定化のための中性脂質、(iii)安定化のためのヘルパー脂質、及び(iv)ステルス脂質のうちの1つ以上又は全てを含有してもよい。例えば、Finn et al. (2018) Cell Rep. 22(9): 2227-2235 及び国際公開第2017/173054(A1)号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定のLNPにおいて、カーゴは、ガイドRNA又はガイドRNAをコードする核酸を含み得る。特定のLNPでは、カーゴは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNA、及びガイドRNA又はガイドRNAをコードする核酸を含み得る。特定のLNPでは、カーゴは、マルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含み得る。特定のLNPでは、カーゴは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNA、ガイドRNA又はガイドRNAをコードする核酸、及びマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物を含み得る。本方法における使用のためのLNPについては、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。

【0657】

免疫原性を低下させるために、送達様式が選択され得る。例えば、Casタンパク質及びgRNAは、異なる様式(例えば、バイモーダル送達)によって送達され得る。これらの異なる様式は、対象の送達された分子(例えば、Cas又は核酸をコードする、gRNA又は核酸をコードする、又はマルチドメイン治療用タンパク質核酸構築物)に異なる薬力学又は薬物動態特性を与える可能性がある。例えば、異なる様式は、異なる組織分布、異なる半減期、又は異なる時間的分布をもたらす可能性がある。いくつかの送達様式(例えば、自律複製又はゲノム組み込みによって細胞内で持続する核酸ベクターの送達)は、分子のより持続的な発現及び存在をもたらすが、他の送達様式は、一過性で持続性が低い(例えば、RNA又はタンパク質の送達)。例えばmRNA又はタンパク質としてのより一時的な方法でのCasタンパク質の送達は、Cas/gRNA複合体が短期間のみ存在し、活性であることを保証し、MHC分子によって細胞の表面に表示される細菌由来のC

a s 酵素からのペプチドによって引き起こされる免疫原性を低下させ得る。そのような一過性な送達はまだ、オフターゲット修飾の可能性を低減させ得る。

【0658】

インビボでの投与は、例えば、静脈内、皮下、動脈内、又は筋肉内などの非経口投与などの全身投与経路を含む、任意の適切な経路によるものであり得る。具体的な例では、インビボでの投与は、静脈内である。

【0659】

ガイドRNA及び／又はCasタンパク質（又はガイドRNA及び／又はCasタンパク質をコードする核酸）を含む組成物は、1つ以上の生理学的及び薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤又は助剤を使用して処方され得る。製剤は、選択した投与経路に依存し得る。薬学的に許容されるとは、担体、希釈剤、賦形剤、又は補助剤が、製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに実質的に有害ではないことを意味する。具体的な例では、投与経路及び／又は製剤、あるいは肝臓（例えば肝細胞）への送達のために選択される。

【0660】

本明細書に開示される方法は、細胞又は対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質又はGAAタンパク質レベル及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質又はGAA活性レベル（例えば、対象における循環、血清、又は血漿レベル）を上昇させることができ、細胞又は対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質GAAタンパク質レベル及び／又はマルチドメイン治療用タンパク質又はGAA活性レベル（例えば、対象における循環、血清、又は血漿レベル）を測定することを含み得る。一例では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす。例えば、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの上昇をもたらし得る。本方法はまた、マルチドメイン治療用タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを投与することを含む方法と比較して、対象におけるマルチドメイン治療用タンパク質活性又はGAA活性の増加をもたらし得る。循環マルチドメイン治療用タンパク質又はGAA活性のレベルは、周知の方法を使用することによって測定され得る。

【0661】

いくつかの方法では、対象におけるGAA活性及び／又は発現レベルは、正常レベルの約又は少なくとも約2%、約又は少なくとも約10%、約又は少なくとも約25%、約又は少なくとも約40%、約又は少なくとも約50%、約又は少なくとも約75%、又は少なくとも約100%、又はそれ以上に上昇する。いくつかの方法では、対象におけるGAA活性及び／又は発現レベルは、正常レベルの約若しくは少なくとも約40%、約若しくは少なくとも約50%、約若しくは少なくとも約75%、又は少なくとも約100%、又はそれ以上に上昇する。特定の実施形態では、発現又は活性のレベルは、GAA機能喪失の徴候又は症状が存在する細胞又は組織において測定される。例えば、機能喪失が筋肉機能不全をもたらす場合、マルチドメイン治療用タンパク質又はGAAのレベル又は活性は、筋肉細胞において測定される。外因性タンパク質に応じて、マルチドメイン治療用タンパク質の活性レベルは、重量に基づいて天然GAAタンパク質と1:1に匹敵しない場合があることが理解される。そのような実施形態では、マルチドメイン治療用タンパク質及び天然GAAの相対活性が比較され得る。特定の実施形態では、機能喪失は、相対活性を決定することができないようにほぼ完全である。特定の実施形態では、比較は、適切な対照対象に対して行われる。適切な対照対象の選択は、当業者の能力の範囲内である。特定の実施形態では、発現レベルは、GAAの機能喪失に起因する少なくとも1つの徴候又は症状を治療するのに十分である。GAA活性は、任意の公知の方法によって評価され得る。例えば、GAA活性（又は活性の欠乏）を評価するために、血液ベースのアッセイは、乾燥血液スポット又は新鮮血中のGAA活性を測定し得る。GAA活性は、皮膚バイオブ

シー又は筋生検からの線維芽細胞でも測定され得る。他の二次的測定は、質量分析による尿グルコース四糖の測定であり得る。

【0662】

いくつかの方法では、循環マルチドメイン治療用タンパク質レベル（すなわち、血清レベル）は、約若しくは少なくとも約0.5、約若しくは少なくとも約1、約若しくは少なくとも約2、約若しくは少なくとも約3、約若しくは少なくとも約4、約若しくは少なくとも約5、約若しくは少なくとも約6、約若しくは少なくとも約7、約若しくは少なくとも約8、約若しくは少なくとも約9、又は約若しくは少なくとも約10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇する。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質レベルは、少なくとも約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇する。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質レベルは、少なくとも約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇する。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質レベルは、少なくとも約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇する。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質レベルは、約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。例えば、本方法は、約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマルチドメイン治療用タンパク質レベルをもたらし得る。例えば、本方法は、約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマルチドメイン治療用タンパク質レベルをもたらし得る。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも1ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも2ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも3ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも4ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも5ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも6ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも9ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも12ヶ月後である。

【0663】

いくつかの方法では、本方法は、GAA又はマルチドメイン治療用タンパク質の発現及び／又は活性を、対象のベースライン発現及び／又は活性（すなわち、投与前の発現及び／又は活性）よりも増加させる。いくつかの方法では、本方法は、対象のベースライン発現及び／又は活性（すなわち、投与前の発現及び／又は活性）を超えてGAAの発現及び／又は活性を増加させる。いくつかの方法では、対象におけるGAA活性及び／又はGAA発現又は血清レベルは、投与前の対象のGAA発現又は血清レベル及び／又は活性（例えば、GAA活性）（すなわち、対象のベースラインレベル）と比較して、約若しくは少なくとも約10%、約若しくは少なくとも約25%、約若しくは少なくとも約50%、約若しくは少なくとも約75%、又は約若しくは少なくとも約100%、又はそれ以上上昇する。マルチドメイン治療用タンパク質に応じて、マルチドメイン治療用タンパク質の活性レベルは、重量に基づいて天然タンパク質と1:1に匹敵しない場合があることが理解される。そのような実施形態では、マルチドメイン治療用タンパク質及び天然GAAの相対活性が比較され得る。特定の実施形態では、機能喪失は、相対活性を決定することができないようにほぼ完全である。特定の実施形態では、発現レベルは、GAAの機能喪失に起因する少なくとも1つの徴候又は症状を治療するのに十分である。

【0664】

いくつかの方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質の発現及び／又は活性を、細胞のベースライン発現及び／又は活性（すなわち、投与前の発現及び／又は活性）よりも増加させる。いくつかの方法では、本方法は、細胞のベースライン発現及び／又

は活性（すなわち、投与前の発現及び／又は活性）を超えてG A Aの発現及び／又は活性を増加させる。いくつかの方法では、細胞又は細胞の集団（例えば、肝臓細胞又は肝細胞）におけるG A A活性及び／又は発現レベルは、投与前のG A A活性及び／又は発現レベル（すなわち、対象のベースラインレベル）と比較して、約又は少なくとも約10%、約又は少なくとも約25%、約又は少なくとも約50%、約又は少なくとも約75%、約又は少なくとも約100%、又はそれ以上上昇する。マルチドメイン治療用タンパク質に応じて、マルチドメイン治療用タンパク質の活性レベルは、重量に基づいて天然G A Aタンパク質と1：1に匹敵しない場合があることが理解される。そのような実施形態では、マルチドメイン治療用タンパク質及び天然G A Aタンパク質の相対活性が比較され得る。特定の実施形態では、G A Aの機能喪失はほぼ完全であり、その結果、相対活性を決定することができない。特定の実施形態では、発現レベルは、G A Aの機能喪失に起因する少なくとも1つの徴候又は症状を治療するのに十分である。

10

【0665】

具体的な例では、対象におけるG A A活性レベルは、正常なG A A活性レベルの約300%以下、約250%以下、約200%以下、又は約150%以下まで上昇する。

【0666】

具体的な例では、対象におけるG A A活性レベルは、正常なG A A活性レベルの少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%まで増加する。具体的な例では、対象は、対象におけるG A A活性レベルは、正常なG A A活性レベルの少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%まで増加する。

20

【0667】

具体的な例では、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的な乳児発症ポンペ病）を有し、対象におけるG A A活性レベルは、正常なG A A活性レベルの少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%まで上昇する。特定の例では、対象は乳児発症ポンペ病（例えば、古典的乳児発症ポンペ病）を有し、対象におけるG A A活性レベルは、正常なG A A活性レベルの少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%まで上昇する。

30

40

【0668】

特定の例では、対象は乳児発症ポンペ病（例えば、古典的又は非古典的な乳児発症ポンペ病）を有し、対象におけるG A A活性レベルは、正常G A A活性レベルの少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、又は少なくとも約100%（例えば、正常G A A活性レベルの少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、

50

少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、又は少なくとも約 100 %) まで上昇する。特定の例では、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的又は非古典的乳児発症ポンペ病）を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常 G A A 活性レベルの少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、又は少なくとも約 100 % まで上昇する。

【0669】

特定の例では、対象は、遅発性ポンペ病を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常 G A A 活性レベルの少なくとも約 2 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、又は少なくとも約 100 %（例えば、正常 G A A 活性レベルの少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、又は少なくとも約 100 %）まで上昇する。

【0670】

具体的な例では、対象は、乳児発症ポンペ病を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常な G A A 活性レベルの約 1 % 超、約 5 % 超、約 10 % 超、約 15 % 超、約 20 % 超、約 25 % 超、約 30 % 超、約 35 % 超、約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、約 85 % 超、約 90 % 超、又は約 100 % 超まで上昇する。特定の例では、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的な乳児発症ポンペ病）を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常 G A A 活性レベルの約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、約 85 % 超、約 90 % 超、又は約 100 % 超まで上昇する。

【0671】

特定の例では、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的又は非古典的な乳児発症ポンペ病）を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常 G A A 活性レベルの約 2 % 超、約 5 % 超、約 10 % 超、約 15 % 超、約 20 % 超、約 25 % 超、約 30 % 超、約 35 % 超、約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、約 85 % 超、約 90 % 超、又は約 100 % 超（例えば、正常 G A A 活性レベルの約 10 % 超、約 15 % 超、約 20 % 超、約 25 % 超、約 30 % 超、約 35 % 超、約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、約 85 % 超、約 90 % 超、又は約 100 % 超まで上昇する。特定の例では、対象は、乳児発症ポンペ病（例えば、古典的又は非古典的な乳児発症ポンペ病）を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常な G A A 活性レベルの約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、約 85 % 超、約 90 % 超、又は約 100 % 超まで上昇する。

【0672】

特定の例では、対象は、遅発性ポンペ病を有し、対象における G A A 活性レベルは、正常 G A A 活性レベルの約 2 % 超、約 5 % 超、約 10 % 超、約 15 % 超、約 20 % 超、約 25 % 超、約 30 % 超、約 35 % 超、約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、約 85 % 超、約 90 % 超、又は約 100 % 超（例えば、正常 G A A 活性レベルの約 40 % 超、約 45 % 超、約 50 % 超、約 55 % 超、約 60 % 超、約 65 % 超、約 70 % 超、約 75 % 超、約 80 % 超、

約 85% 超、約 90% 超、又は約 100% 超) まで上昇する。

【0673】

いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象において目的のポリペプチドをコードするエピソーム発現ベクターを投与することを含む方法と比較して、対象（例えば、新生児対象）におけるマルチドメイン治療用タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、本方法は、対照対象において目的のポリペプチドをコードするエピソーム発現ベクターを投与することを含む方法と比較して、対象（例えば、新生児対象）におけるマルチドメイン治療用タンパク質の血清レベルの上昇をもたらす。

【0674】

いくつかの方法では、本方法は、マルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現又は活性を、対象（例えば、新生児対象）のマルチドメイン治療用タンパク質又は G A A のベースライン発現又は活性（すなわち、典型的なエラーバーよりも大きい発現の任意のパーセント変化）よりも増加させる。いくつかの方法では、本方法は、0 を超える検出可能なレベル、例えば、臨床的に関連するレベルである統計的に有意なレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現をもたらす。

【0675】

いくつかの方法は、ヒトにおいて、少なくとも少なくとも 8 週間、少なくとも 24 週間、例えば、少なくとも 1 年、又は任意選択的に、少なくとも 2 年の効果、及びいくつかの実施形態では、少なくとも 3 年、少なくとも 4 年、又は少なくとも 5 年の効果などの永続的かつ持続的な効果を達成することを含む。いくつかの方法は、ヒトにおいて、少なくとも 8 週間、少なくとも 24 週間、例えば、少なくとも 1 年、又は任意選択的に、少なくとも 2 年の効果、及びいくつかの実施形態では、少なくとも 3 年、少なくとも 4 年、又は少なくとも 5 年の効果などの永続的かつ持続的に治療効果を達成することを含む。いくつかの方法では、ヒトにおける増加したマルチドメイン治療用タンパク質又は G A A 活性及び／又は発現レベルは、少なくとも 8 週間、少なくとも 24 週間、例えば、少なくとも 1 年、任意選択的に、少なくとも 2 年、及びいくつかの実施形態では、少なくとも 3 年、少なくとも 4 年、又は少なくとも 5 年間安定している。いくつかの方法では、ヒトにおけるマルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の定常状態の活性及び／又はレベルは、少なくとも 7 日間、少なくとも 14 日間、又は少なくとも 28 日間、任意選択的に、少なくとも 56 日間、少なくとも 80 日間、又は少なくとも 96 日間で達成される。追加の方法では、本方法は、少なくとも 8 週間、少なくとも 16 週間、若しくは少なくとも 24 週間、又はいくつかの実施形態では、少なくとも 1 年間、若しくは少なくとも 2 年間、任意選択的に少なくとも 3 年間、少なくとも 4 年間、若しくは少なくとも 5 年間、ヒトにおける単回用量後のマルチドメイン治療用タンパク質又は G A A 活性及び／又はレベルを維持することを含む。例えば、マルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現は、ヒト対象において、治療後少なくとも約 8 週間、少なくとも約 12 週間、少なくとも約 24 週間、特定の実施形態では、少なくとも約 1 年間、又は少なくとも約 2 年間、及びいくつかの実施形態では、治療後少なくとも 3 年間、少なくとも 4 年間、又は治療後少なくとも 5 年間持続され得る。同様に、マルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の活性は、ヒト対象において、治療後少なくとも約 8 週間、少なくとも約 12 週間、少なくとも約 24 週間、特定の実施形態では、治療後少なくとも約 1 年間、又は少なくとも約 2 年間、及びいくつかの実施形態では、治療後少なくとも 3 年間、少なくとも 4 年間、又は治療後少なくとも 5 年間持続され得る。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現又は活性は、治療前のマルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現又は活性（すなわち、対象のベースライン）よりも高いレベルで維持される。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現又は活性は、治療有効レベルの発現又は活性で維持される場合、持続しているとみなされる。他の生物における相対的持続期間は、例えば、寿命及び発育段階に基づいて理解され、上記の開示内に包含される。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質又は G A A の発現又は活性は、投与の 6 ヶ月後、投与の 1 年後、又は投与の 2 年後のヒトにおける発現又は活性、発現又は活性が、

10

20

30

40

50

その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%である場合、「持続している」とみなされる。特定の実施形態では、投与の6ヶ月後、例えば、24週間～28週間で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%である。特定の実施形態では、投与の1年後、すなわち、約12ヶ月、例えば、11～13ヶ月で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%である。特定の実施形態では、投与の2年後、すなわち、約24ヶ月、例えば、23～25ヶ月で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%である。特定の実施形態では、投与の6ヶ月後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%である。特定の実施形態では、投与の1年後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%である。特定の実施形態では、投与の2年後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%である。好ましい実施形態では、対象は、例えば、毎週、毎月、特に、投与後早期に、例えば、最初の6ヶ月以内に、ポリペプチドの発現又は活性レベルの日常的なモニタリングを有する。定期的な測定は、発現又は活性に対する効果が、例えば、投与の6ヶ月後、投与の1年後、又は投与の2年後に持続されることを証明し得る。新生児対象におけるいくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A Aの発現は、新生児対象が成人になるときに持続される。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質又はG A Aの発現は、対象又は新生児対象の生涯にわたって持続する。

10

20

30

40

【0676】

いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の24週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の1年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の24週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の2年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも50%である。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の2年後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。いくつかの方法では、マルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性は、投与の24週間後に対象について測定された発現のピークレベルでのマルチドメイン治療用タンパク質の発現又は活性の少なくとも60%である。

【0677】

A L B 遺伝子座への挿入を伴ういくつかの方法では、対象の循環アルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルは正常である。そのような方法は、対象の循環アルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルを、正常な循環アルブミンレベル又は正常なアルブミンレベルの±5%、±10%、±15%、±20%、又は±50%以内に維持することを含み得る。いくつかの方法では、対象のアルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルは、少なくとも4週目、少なくとも8週目、少なくとも12週目、又は少なくとも20週目まで、未治療の個体のアルブミンレベルと比較して変化しない。いくつかの方法では、対象のアルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルは、一時的に低下し、次いで正常レベルに戻る。特に、方法は、血漿アルブミンのレベルの顕著な変化を検出しないことを含み得る。

50

【0678】

いくつかの方法では、本方法は、本明細書に記載の核酸構築物のいずれかを投与する前に、対象における既存の抗GAA免疫性を評価することを更に含む。例えば、そのような方法は、全抗体（TA b）免疫アッセイ又は中和抗体（NA b）アッセイを使用して免疫原性を評価することを含み得る。いくつかの方法では、対象は、組換えGAAタンパク質を以前に投与されていない。

【0679】

いくつかの方法では、本方法は、本明細書に記載の核酸構築物のいずれかを投与する前に、対象における既存の抗AAV（例えば、抗AAV8）免疫性を評価することを更に含む。例えば、そのような方法は、全抗体（TA b）免疫アッセイ又は中和抗体（NA b）アッセイを使用して免疫原性を評価することを含み得る。例えば、Manno et al. (2006) Nat. Med. 12 (3): 342-347, Kruzik et al. (2019) Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 14: 126-133、及びWeber (2021) Front. Immunol. 12: 658399を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TA bアッセイは、AAVベクターに結合する抗体を探すのに対して、NA bアッセイは、存在する抗体が、AAVベクターが標的細胞に形質導入するのを止めるかどうかを評価する。TA bアッセイでは、薬物製品又は空のキャプシドを使用して抗体を捕捉することができ、NA bアッセイは、レポーターベクター（例えば、ルシフェラーゼをコードするAAVベクターのバージョン）を必要とし得る。

【0680】

上記又は下記で引用されている全ての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、アクセッション番号などは、各個々の項目が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。配列の異なるバージョンが違う時間にアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効な出願日においてアクセッション番号に関連付けられるバージョンを意味する。有効な出願日とは、該当する場合、アクセッション番号に関する実際の出願日以前又は優先出願の出願日を意味する。同様に、刊行物、ウェブサイトなどの異なるバージョンが違う時間に公開されている場合、別段の指定のない限り、本出願の有効な出願日の直前に公開されたバージョンを意味する。別段に他の指示がない限り、本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態、又は態様を、任意の他のものと組み合わせて使用し得る。本発明は、明瞭さ及び理解の目的に対し図表及び例を介していくつかの詳細が記載されているが、添付の特許請求の範囲の範囲内で、特定の変化及び修正を実施することができることが明らかになるう。

【0681】

配列の簡単な説明

添付の配列表にリストされているヌクレオチド及びアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基のための標準的な文字略語、及びアミノ酸のための三文字表記を使用して示されている。ヌクレオチド配列は、配列の5'末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進み3'末端に至る標準規則に従っている。各ヌクレオチド配列の一本の鎖のみが示されているが、相補的鎖は、示されている鎖を任意に参照することによって含まれると理解される。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が提供される場合、同じアミノ酸配列をコードするそのコドン縮重変異体もまた提供されることが理解される。アミノ酸配列は、配列のアミノ末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進みカルボキシ末端に至る標準規則に従っている。

【0682】

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表 9 配列の説明

配列番号	種類	説明
1	RNA	Cas9 mRNA
2	RNA	Cas9 mRNA CDS
3	DNA	Cas9 CDS
4	DNA	ヒトALBイントロン1
5	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v1
6	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v2
7	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v3
8	タンパク質	SpCas9タンパク質V1
9	DNA	SpCas9 DNA V1
10	DNA	SpCas9 mRNA (cDNA)
11	タンパク質	SpCas9タンパク質V2
12	RNA	SpCas9 mRNA V2
13	タンパク質	SV40 NLS v1
14	タンパク質	SV40 NLS v2
15	タンパク質	ヌクレオプラスミンNLS
16	RNA	crRNAテールv1
17	RNA	crRNAテールv2
18	RNA	TracrRNA v1
19	RNA	TracrRNA v2
20	RNA	TracrRNA v3
21	RNA	gRNA足場v1
22	RNA	gRNA足場v2
23	RNA	gRNA足場v3
24	RNA	gRNA足場v4
25	RNA	gRNA足場v5
26	RNA	gRNA足場v6
27	RNA	gRNA足場v7
28	RNA	gRNA足場v8
29	RNA	修飾gRNA足場
30~61	RNA	ヒトALBイントロン1ガイド配列
62~125	RNA	ヒトALBイントロン1 sgRNA配列
126~157	DNA	ヒトALBイントロン1ガイドRNA標的配列
158	DNA	ITR 145
159	DNA	ITR 141
160	DNA	ITR 130
161	DNA	SV40ポリA
162	DNA	bGHポリA
163	DNA	マウスAlbエキソン2スプライスアクセプター
164	RNA	マウスAlbイントロン1ガイド配列g666
165	DNA	マウスAlbイントロン1ガイドRNA標的配列g666
166~167	RNA	マウスAlbイントロン1 sgRNA配列g666
168	DNA	ITR 145逆相補体
169	DNA	SV40ポリA v2
170	タンパク質	ヒトGAAタンパク質(NP_000143.2)
171	DNA	ヒトGAA cDNA/mRNA(NM_000152.5)
172	DNA	ヒトGAA CDS(CCDS32760.1)
173	タンパク質	ヒトGAA(70~952)タンパク質
174	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS
175	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-DC-0
176	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-GA-0
177	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-GS-0
178	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-GS-0v2
179	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-GS-1
180	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-GS-44
181	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-GS-50
182	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-RE-8
183	タンパク質	12450抗CD63 scFv

10

20

30

40

【0683】

50

【表 9 - 2】

(表 9 の続き)

配列番号	種類	説明
184	DNA	12450抗CD63 scFv CDS
185	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-DC-0
186	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-GA-0
187	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-GS-0
188	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-GS-0v2
189	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-GS-1
190	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-GS-44
191	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-GS-50
192	DNA	12450抗CD63 scFv CDS-RE-8
193	タンパク質	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質
194	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS
195	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-DC-0
196	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-GA-0
197	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-GS-0
198	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-GS-0v2
199	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-GS-1
200	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-GS-44
201	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-GS-50
202	DNA	12450抗CD63 scFv:GAA(70~952)融合タンパク質CDS-RE-8
203	DNA	グリシンをコードする配列v1
204	DNA	グリシンをコードする配列v2
205	DNA	ヒトGAA(70-952)CDS-1-DC
206	DNA	ヒトGAA(70-952)CDS-1-GS
207	DNA	ヒトGAA(70-952)CDS-2-DC
208	DNA	ヒトGAA(70-952)CDS-2-GS
209	DNA	ヒトGAA(70-952)CDS-3-DC
210	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-3-GS
211	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-4-DC
212	DNA	ヒトGAA(70~952)CDS-4-GS
213	タンパク質	GAA_1 77
214	タンパク質	GAA_2 22
215	タンパク質	GAA_3 61
216~537	DNA及びタンパク質	抗hTfR抗体、抗原結合断片、又はscFv分子中のドメイン
538~569	タンパク質	抗hTfR scFv
570	タンパク質	12799B-2xG4S-GAA
571	タンパク質	12839B-2xG4S-GAA
572	タンパク質	12843B-2xG4S-GAA
573	タンパク質	12847B-2xG4S-GAA
574	DNA	12799B-2xG4S-GAA
575	DNA	12839B-2xG4S-GAA
576	DNA	12843B-2xG4S-GAA
577	DNA	12847B-2xG4S-GAA
578~580	DNA	最適化12799B-2xG4S-GAA
581~583	DNA	最適化12843B-2xG4S-GAA
584~586	DNA	最適化12847B-2xG4S-GAA
587	DNA	12799 GA 0抗TfR scFv
588	DNA	12799 GS 0抗TfR scFv
589	DNA	12799 GS 0v2抗TfR scFv
590	DNA	12843 GA 0抗TfR scFv
591	DNA	12843 GS 0抗TfR scFv
592	DNA	12843 GS 0v2抗TfR scFv
593	DNA	12847 GA 0抗TfR scFv
594	DNA	12847 GS 0抗TfR scFv
595	DNA	12847 GS 0v2抗TfR scFv
596	DNA	12799抗TfR scFv

【 0 6 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

(表 9 の続き)

配列番号	種類	説明
597	DNA	12839抗TfR scFv
598	DNA	12843抗TfR scFv
599	DNA	12847抗TfR scFv
600	タンパク質	リンカー
601	タンパク質	カップ定常軽鎖ドメイン
602	タンパク質	IgG1 CH1重ドメイン
603~672	タンパク質	Fab重鎖及び軽鎖
673	タンパク質	ハツカネズミRor1シグナルペプチド
674	タンパク質	IgG4 CH1重ドメイン
675~706	タンパク質	追加の抗TfR scFv:GAA配列
707	DNA	12837scfv-GAA-1 0CpG 27
708	DNA	12837scfv-GAA-2 5CpG 27
709	タンパク質	任意選択のN末端配列
710	DNA	ITR 141逆相補体
711	DNA	ITR 130逆相補体
712	DNA	SV40ポリA V3
713	タンパク質	3X G4Sリンカー
714	タンパク質	2X G4Sリンカー
715~719	DNA	3X G4Sリンカーコード配列
720~726	DNA	2X G4Sリンカーコード配列
727	DNA	1X G4Sリンカーコード配列
728	DNA	pINT ITR130 12843 GAA天然SV40pA
729	DNA	pINT ITR130 12843scFv:GAA 0CpG v0(GA 0)
730	DNA	pINT ITR130 12843scFv:GAA 0CpG v1(GS 0 v1)
731	DNA	pINT ITR130 12843scFv:GAA 0CpG v2(GS 0 v2)
732	DNA	pINT ITR130 12847 scFv:GAA天然
733	DNA	pINT ITR130 12847scFv:GAA 0CpG v0(GA 0)
734	DNA	pINT ITR130 12847scFv:GAA 0CpG v1(GS 0 v1)
735	DNA	pINT ITR130 12847scFv:GAA 0CpG v2(GS 0 v2)
736	DNA	pINT-ITR 130-抗CD63:GAA GA 0

【実施例】

【0685】

実施例1 肝臓におけるアルブミン遺伝子座への新生児挿入のためのシステムの開発
 新生児に投与された場合を含めて、導入遺伝子の永続的な発現をもたらすために、導入遺伝子の特定の遺伝子座（例えば、アルブミンイントロン1）へのヌクレアーゼ媒介挿入（例えば、CRISPR/Cas）のための系が開発された。システムの例示的な構成要素は、後続の実施例で使用されるものを含めて、以下でより詳細に説明する。

【0686】

単一のガイドRNAの設計及び選択

ALB遺伝子座をDNA鋳型の挿入部位として選択した。ヒトALBイントロン1を標的とする単一ガイドRNA（sgRNA）のリストを生成した。表10を参照されたい。
 候補sgRNAを合成し、インビトロ及びインビボでの評価のためにCas9 mRNAと共に脂質ナノ粒子（LNP）に製剤化した。

【0687】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10 ヒト ALB イントロン 1 ガイド RNA

ガイド RNA	配列番号 (DNA 標的化 セグメント)	配列番号 (未修飾 sgRNA)	配列番号 (修飾 sgRNA)	配列番号 (ガイド RNA 標的配列)
G009844	30	62	94	126
G009851	31	63	95	127
G009852	32	64	96	128
G009857	33	65	97	129
G009858	34	66	98	130
G009859	35	67	99	131
G009860	36	68	100	132
G009861	37	69	101	133
G009866	38	70	102	134
G009867	39	71	103	135
G009868	40	72	104	136
G009874	41	73	105	137
G012747	42	74	106	138
G012748	43	75	107	139
G012749	44	76	108	140
G012750	45	77	109	141
G012751	46	78	110	142
G012752	47	79	111	143
G012753	48	80	112	144
G012754	49	81	113	145
G012755	50	82	114	146
G012756	51	83	115	147
G012757	52	84	116	148
G012758	53	85	117	149
G012759	54	86	118	150
G012760	55	87	119	151
G012761	56	88	120	152
G012762	57	89	121	153
G012763	58	90	122	154
G012764	59	91	123	155
G012765	60	92	124	156
G012766	61	93	125	157

【0688】

レポーターとして双方向性 nano luc コード AAV 挿入鑄型を使用して、初代ヒト肝細胞 (primary human hepatocyte、PHH) において LNP を最初にスクリーニングした。PHH 培養物の上清中に分泌された nano luc タンパク質を測定することによって、nano luc の標的化挿入を支持した LNP を同定した。次いで、最初の PHH スクリーニングに合格した候補を、インビボ遺伝子挿入を支持するそれらの能力について試験した。インビボでの研究からの上位候補を、オフターゲット切断について機能的に評価した。

【0689】

以下により詳細に説明する ALB 標的化 sgRNA 9860 を用いて製剤化される LNP-g 9860 を、複数のプラットフォーム (初代ヒト及び非ヒト霊長類肝細胞、ALB ヒト化マウス、及び非ヒト霊長類) にわたるロバストな導入遺伝子発現レベルの支持、確認されたオフターゲット部位の欠如、種間の翻訳、標的部位における共通ヒト SNP の欠如、群内の導入遺伝子発現の低い変動性、及び用量範囲にわたる性能に基づいて選択した。sgRNA 9860 の標的部位は、カニクイザルサルにおいて保存されている。LNP-g 9860 は、ヒトゲノムにおいて検出可能なオフターゲット部位を有せず (編集の飽和レベルで初代ヒト肝細胞のうちの 2 つのロットにおいて実施した標的化アンプリコン配列決定は、ALB におけるオンターゲット以外の任意の遺伝子座を検証することがで

きなかった)、初代ヒト及び非ヒト霊長類肝細胞、A L Bヒト化マウス、並びに非ヒト霊長類における挿入を介する導入遺伝子発現を支持した。

【0690】

L N P - g 9 8 6 0

L N P - g 9 8 6 0は、ヒトA L Bイントロン1の標的化に使用するために開発された。L N P - g 9 8 6 0は、100ヌクレオチド長のs g R N A (g 9 8 6 0)と、C a s 9をコードするm R N Aとを含む脂質ナノ粒子であり、その各々が更に以下に記載され、4つの異なる脂質からなるL N Pに封入されている。C a s 9 m R N Aから発現されたC a s 9タンパク質は、s g R N A 9 8 6 0がP A Mに関連する標的化相補的D N A配列に結合する場合にのみ、D N Aを切断するように指向される。L N Pの組成物を表11に要約する。L N P - g 9 8 6 0は、以下のモル比：50モル%の脂質A、9モル%のD S P C、38モル%のコレステロール、及び3モル%のP E G 2 k - D M Gで4つの脂質を含み、50mMのT r i s - H C l、45mMのN a C l、5% (w / v) のスクロースから構成されるp H 7. 4での水性緩衝液中で製剤化する。N : P比は約6であり、g R N A : C a s 9 m R N A比は、重量で約1 : 2である。

10

【0691】

【表11】

表11脂質ナノ粒子(L N P - g 9 8 6 0)組成物

成分	説明
活性医薬成分	Cas9 mRNA sgRNA(gRNA9860)
脂質賦形剤	脂質A: (9Z, 12Z)-3-(((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-((((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート コレステロール DSPC PEG2K-DMG
他の賦形剤	Tris、NaCl、スクロース WFI

20

【0692】

単一のガイドRNA。L N P - g 9 8 6 0で使用される単一ガイドRNA (s g R N A 9 8 6 0)は、ヒトA L B遺伝子のイントロン1内の標的領域に相補的な20ヌクレオチド配列を含有する100merオリゴヌクレオチドである。g 9 8 6 0によって認識される標的配列は、カニクイザルm f A l b遺伝子イントロン1において保存されている。g 9 8 6 0の配列は、配列番号68及び100に記載される。化学修飾は、合成中に100merに組み込まれ、これは、s g R N Aの5'末端及び3'末端におけるホスホロチオエート(P S)結合、並びにRNAの糖の一部に対する2'-O-メチル修飾を含む。

30

【0693】

C a s 9 m R N A。L N P - g 9 8 6 0において使用されるC a s 9メッセンジャーRNA (m R N A)は、化膿連鎖球菌からのC a s 9タンパク質配列に基づく。C a s 9コードm R N A (配列番号1、コード配列(C D S)は、配列番号2に記載される)は、約4400ヌクレオチド長である。配列は、5'キャップ、5'非翻訳領域(U T R)、C a s 9タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(open reading frame、O R F)、3'U T R、及びポリAテールを含有する。5'キャップは、アンチリバースキャップアナログ(A R C A)として既知の合成キャップ類似体構造の使用によって共転写的に生成される。m R N A配列中のウラシルは、インビトロ転写中に修飾N¹メチルシュードウリジンによって完全に置き換えられている。m R N Aの5'末端は、安定性を増加させるために合成キャップ類似体構造を有する。ポリAテールは、約100ヌクレオチドである。

40

【0694】

50

L N P - g 6 6 6

L N P - g 6 6 6 は、マウス A l b イントロン 1 の標的化に使用するために開発された。L N P - g 6 6 6 は、ヒトアルブミン標的化 g 9 8 6 0 が、マウスアルブミンイントロン 1 を標的化するガイド RNA である g 6 6 6 で置換されていることを除いて、L N P - g 9 8 6 0 と同じである。g 6 6 6 の配列は、配列番号 1 6 6 及び 1 6 7 に記載される。

【 0 6 9 5 】

r A A V 8 ベクター

D N A 挿入鑄型を担持する組換え A A V 8 (r A A V 8) ベクターを開発した。D N A 挿入鑄型を担持する r A A V 8 ベクターは、A A V 血清型 8 に由来する A A V ベースのベクターである非複製ベクターである。ゲノムは、各末端に逆位末端反復 (I T R) を含む一本鎖デオキシリボ核酸 (D N A) である。I T R は、プロモーターレス挿入鑄型に隣接する。カセットに隣接する A A V I T R は、A A V 2 に由来した。r A A V 8 ベクターによって送達される D N A 挿入鑄型は、プロモーターレス鑄型として設計され得、従って、発現のために標的化 A L B 遺伝子座プロモーターに依存する。

【 0 6 9 6 】

実施例 2 新生児マウスにおける挿入後の持続的なヒト F I X タンパク質発現

成体マウス及び新生仔マウスにおけるエピソーム媒介性発現対挿入媒介性発現を比較するため、並びに成体マウス及び新生仔マウスにおける異なる D N A 修復経路を比較するため、本発明者らは、h F I X エピソーム (h A A T プロモーターによって駆動される発現) 、双方向性 h F I X N H E J 挿入鑄型、5 0 0 b p のホモロジーアームを有する h F I X H D R 挿入鑄型、及び 8 0 0 b p のホモロジーアームを有する h F I X H D R 挿入鑄型の投与後の h F I X 血清レベルを比較した。図 1 を参照されたい。新生仔 C 5 7 B L / 6 マウスに、P 0 又は P 1 で以下を投与した。(1) 4 m g / k g の L N P - g 6 6 6 及び h F I X - H D R - 5 0 0 鑄型を有する 3 e 9 v g / マウスの r A A V 8 、(2) 4 m g / k g の L N P - g 6 6 6 及び h F I X - H D R - 8 0 0 鑄型を有する 3 e 9 v g / マウスの r A A V 8 、(3) 4 m g / k g の L N P - g 6 6 6 及び h F I X - N H E J 鑄型を有する 3 e 9 v g / マウスの r A A V 8 、又は (4) 3 e 9 v g / マウスの r A A V 8 エピソーム鑄型。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。エピソーム A A V 中の h F I X コード配列は、野生型ヒト F 9 をコードするコドン最適化された配列であった。2 つの H D R 構築物中の h F I X コード配列は、P a d u a 突然変異 (R 3 3 8 L) を有する天然ヒト F 9 コード配列であった。投薬後 1 週間、2 週間、及び 5 週間で血液を収集し、血漿を調製した。h F I X レベルをヒト F I X E L I S A によって測定した。次いで、実験を成体 C 5 7 B L / 6 マウスにおいて繰り返し、成体マウスに以下を投与した。(1) 0 . 8 m g / k g の L N P - g 6 6 6 及び h F I X - H D R - 5 0 0 鑄型を有する 2 e 1 0 v g / マウスの r A A V 8 、(2) 0 . 8 m g / k g の L N P - g 6 6 6 及び h F I X - H D R - 8 0 0 鑄型を有する 2 e 1 0 v g / マウスの r A A V 8 、(3) 0 . 8 m g / k g の L N P - g 6 6 6 及び h F I X - N H E J 鑄型を有する 2 e 1 0 v g / マウスの r A A V 8 、又は (4) 2 e 1 0 v g / マウスの r A A V 8 エピソーム鑄型。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。投薬後 1 週間、2 週間、及び 4 週間で血液を収集し、血漿を調製した。結果を、図 2 A ~ 2 B 及び表 1 2 ~ 1 4 に示す。エピソーム媒介性発現は、新生児において挿入媒介性発現と比較して、最初の時点でさえ低く、新生児において経時的に失われた。成体マウスでは反対のことが観察された：エピソーム媒介性発現は、成体マウスにおいて挿入媒介性発現と比較して、最初の時点及びその後の時点でより高かった。これらの結果は、以前の同様の実験において観察されたことを確認した (データは示さず) 。新生児マウスにおける結果とは対照的に、h F I X レベルは、エピソーム及び挿入構築物の両方を有する成体マウスにおいて一定のままであり、エピソーム構築物が最も高い発現を与えた。図 2 A ~ 2 B 及び表 1 2 ~ 1 4 を参照されたい。

【 0 6 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 2 新生児マウスにおけるヒト F I X 血清レベル ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

	エピソーム									
1週目	0.9	0.56	0.48	0.52	0.96	0.67	0.93	0.98	0.77	
2週目	0.2	0.11	0.12	0.14	0.15	0.17	0.22	0.21	0.15	
5週目	0.06	0.03	0.03	0.07	0.07	0.03	0.04	0.04	0.04	
	NHEJ									
1週目	14.22	19.28	14.12	18.67	21.69					
2週目	16.08	17.25	16.07	17.66	21.39					
5週目	12.29	12.41	14.18	16.61	13.71					
	HDR500									
1週目	11.03	8.02	7.86	10.11						
2週目	8.29	6.74	8.63	8.61						
5週目	6.27	4.09	5.24	5.49						
	HDR800									
1週目	3.86	6.44	6.52	4.43		1.41	2	3.58	2.71	2.07
2週目	3.54	6.9	7.46	4.44	4.64	1.65	2.45	3.55	2.83	2.5
5週目	2.4	3.49	3.48	3.33	3.77	0.77	2.19	2.7	2.5	1.68

10

【0 6 9 8】

【表 1 3】

表 1 3 成体マウスにおけるヒト F I X 血清レベル ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

	エピソーム				
1週目	16.69	15.57	18.97	14.17	9.82
2週目	25.39	23.07	41.53	27.53	12.07
4週目	39.97	26.61	39.63	28.5	14.28
	NHEJ				
1週目	8.1	9.52	13.09	6.55	9.2
2週目	9.15	8.12	8.18	6.46	7.27
4週目	14.86	10.86	13.85	8.42	13
	HDR500				
1週目	2.23	2.5	1.89	3.14	1.85
2週目	1.2	2.62	1.55	2.41	1.34
4週目	3.83	5.39	4.89	4.62	2.75
	HDR800				
1週目	1.65	0.94	0.26	0.54	0.14
2週目	0.69	1.52	0.24	0.67	0.46
4週目	2.13	1.87	0.49	0.94	0.43

20

30

【0 6 9 9】

40

50

【表 1 4 - 1】

表 1 4 新生児マウスにおけるヒト F I X 血清レベル ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

マウス 番号	群 番号	1週目 hF9 ug/mL	2週目 hF9 ug/mL	5週目 hF9 ug/mL	3ヶ月目 hF9 ug/mL	4ヶ月目 hF9 ug/mL	7ヶ月目 hF9 ug/mL	9ヶ月目 hF9 ug/mL	10ヶ月目 hF9 ug/mL	12ヶ月目 hF9 ug/mL	15ヶ月目 hF9 ug/mL
1	対照1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	対照2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	対照3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	対照4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	対照5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	対照6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	対照7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	対照8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	HDR500-1	11.03	8.29	6.27	3.04	3.12	3.13	3.32	3.35	2.91	1.60
10	HDR500-3	8.02	6.74	4.09	3.05	2.51	2.59	2.80	2.98	2.95	1.54
11	HDR500-4	7.86	8.63	5.24	6.61	5.11	5.44	5.62	7.64	4.76	5.97
12	HDR500-5	10.11	8.61	5.49	5.68	6.60	5.43	5.33	7.89	5.00	7.00
13	エピソード1	0.90	0.20	0.06	0.16	0.14	0.12	0.04	0.05	0.04	0.04
14	エピソード2	0.56	0.11	0.03	0.09	0.09	0.08	0.03	0.03	0.04	0.06
15	エピソード3	0.48	0.12	0.03	0.11	0.09	0.09	0.02	0.04	0.02	0.03
16	エピソード4	0.52	0.14	0.07	0.14	0.11	0.09	0.03	0.02	0.02	0.05
17	エピソード5	0.96	0.15	0.07	NA(マウスは死亡)	NA(マウスは死亡)	NA(マウスは死亡)	NA(マウスは死亡)	NA(マウスは死亡)	NA(マウスは死亡)	NA(マウスは死亡)
18	エピソード6	0.67	0.17	0.03	0.13	0.11	0.11	0.03	0.04	0.00	0.04
19	エピソード7	0.93	0.22	0.04	0.13	0.09	0.09	0.09	0.05	0.04	0.03
20	エピソード8	0.98	0.21	0.04	0.14	0.10	0.11	0.06	0.03	0.04	0.05
21	エピソード9	0.77	0.15	0.04	0.14	0.15	0.12	0.05	0.03	0.05	0.07
22	HDR800-1	3.86	3.54	2.40	2.08	2.26	2.91	1.66	2.09	1.98	1.77
23	HDR800-2	6.44	6.90	3.49	3.47	3.36	3.49	ND	2.92	2.24	2.31
24	HDR800-3	6.52	7.46	3.48	2.80	3.62	3.45	2.71	2.70	1.95	2.54
25	HDR800-4	4.43	4.44	3.33	3.59	4.55	4.14	3.22	3.75	2.51	3.28
26	HDR800-5	NA	4.64	3.77	3.47	3.82	4.26	4.57	4.56	3.65	3.95
27	HDR800-6	1.41	1.65	0.77	1.54	1.48	1.19	3.35	1.50	1.47	1.60

【 0 7 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

(表 1 4 の続き)

マウス 番号	1週目 hF9 ug/mL	2週目 hF9 ug/mL	5週目 hF9 ug/mL	3ヶ月目 hF9 ug/mL	4ヶ月目 hF9 ug/mL	7ヶ月目 hF9 ug/mL	9ヶ月目 hF9 ug/mL	10ヶ月目 hF9 ug/mL	12ヶ月目 hF9 ug/mL	15ヶ月目 hF9 ug/mL
群番号										
28 HDR800-7	2.00	2.45	2.19	3.32	3.11	2.26	2.37	2.75	2.63	2.29
29 HDR800-8	3.58	3.55	2.70	2.16	2.09	2.36	1.58	2.04	1.59	2.08
30 HDR800-9	0.09	0.10	0.03	NA(マウスは死亡)			NA(マウスは死亡)			
31 HDR800-10	2.71	2.83	2.50	3.87	3.36	3.12	2.52	3.58	2.45	2.80
32 HDR800-11	2.07	2.50	1.68	1.35	1.66	1.28	1.15	1.45	1.01	1.50
33 NHEJ 1	6.45	5.75	NA(マウスは死亡)				NA(マウスは死亡)			
34 NHEJ 2	14.22	16.08	12.29	10.58	8.44	9.27	9.45	11.67	7.24	8.95
35 NHEJ 3	19.28	17.25	12.41	15.67	18.44	15.77	14.70	18.38	14.58	14.80
36 NHEJ 4	15.19	NA(マウスは死亡)					NA(マウスは死亡)			
37 NHEJ 5	14.12	16.07	14.18	17.28	15.39	14.79	16.99	18.47	14.32	14.68
38 NHEJ 6	18.67	17.66	16.61	19.46	21.53	22.32	18.93	23.21	19.53	21.90
39 NHEJ 7	18.23	NA(マウスは死亡)					NA(マウスは死亡)			
40 NHEJ 8	21.69	21.39	13.71	11.15	11.88	12.72	12.36	18.53	11.19	18.07

10

20

30

40

【0701】

これらの実験は、挿入された F 9 の発現が、新生児の肝臓において永続的であることを示し、アルブミン遺伝子座への F 9 鑄型の挿入が、新生児対象において永続的な発現をもたらし得ることを示している。これらのゲノムの組み込みは、新生児マウスにおける実験全体にわたる永続的な発現を提供した。

【0702】

実施例 3 ポンペ病の治療のための新生児挿入システム及び試薬の開発

抗 C D 6 3 : G A A 導入遺伝子又は抗 T f R : G A A 導入遺伝子の、特定の遺伝子座（例えば、アルブミンイントロン 1）へのヌクレアーゼ媒介挿入（例えば、C R I S P R /

50

Cas) のための系を開発して、抗CD63:GAA又は抗TfR:GAAの永続的な発現を、新生児に投与された場合を含めて、生じさせた。

【0703】

抗CD63:GAAの挿入のためのシステムの例示的な構成要素(後続の実施例で利用されるものを含む)は、以下により詳細に記載される。図3~5を参照されたい。実施例における抗CD63:GAA DNA鋳型は、組換えAAV8ベクターによって細胞内にもたらされ、CRISPR/Cas9 RNA成分(Cas9 mRNA及びsgRNA)は、LNP媒介送達によって肝細胞に送達される(図3及び5)。肝臓によって産生される抗CD63:GAAタンパク質は、筋肉内で高度に発現される迅速に内在化するタンパク質であるCD63を標的化することによって、筋肉内のリソソームに標的化される。図4を参照されたい。単一ガイドRNA、LNP-g9860、Cas9 mRNA、及びLNP-g666の設計及び選択は、実施例1に記載した通りであった。

10

【0704】

抗TfR:GAAのためのシステムの例示的な構成要素は、後続の実施例で利用されるものを含めて、以下により詳細に説明する。図15~17を参照されたい。以下に記載の実施例における抗TfR:GAA DNA鋳型は、組換えAAV8ベクターによって細胞内にもたらされ、CRISPR/Cas9 RNA成分(Cas9 mRNA及びsgRNA)は、LNP媒介送達によって肝臓に送達される(図15及び17)。肝臓によって産生される抗TfR:GAAタンパク質は、筋肉及び脳内皮細胞上で発現されるTfRを標的とすることによって筋肉及びCNSを標的とする。これらの細胞におけるTfRのトランスサイトシスは、血液脳関門通過を可能にする。図16を参照されたい。単一ガイドRNA、LNP-g9860、Cas9 mRNA、及びLNP-g666の設計及び選択は、実施例1に記載した通りであった。

20

【0705】

DNA鋳型の設計及び選択

本発明者らは、単鎖可変断片(scFv)のC末端がグリシン-セリンリンカーによってGAAのアミノ酸70-952のN末端に融合されている抗CD63:GAA融合体をコードする核酸の挿入のためのDNA鋳型を操作した。GAA(70-952)配列は、配列番号173に記載され、配列番号174に記載の配列によってコードされる。DNA鋳型は、配列番号194に記載され、配列番号193に記載の融合タンパク質をコードする。スプライスアクセプター部位は、抗CD63:GAA導入遺伝子上流にコードされ、ポリアデニル化配列は、抗CD63:GAA導入遺伝子下流にコードされる。導入遺伝子の5'末端のスプライスアクセプター配列は、マウスAlbエキソン2スプライスアクセプターに由来する。導入遺伝子の3'末端のポリアデニル化配列は、シミアンウイルス40(SV40)に由来した。

30

【0706】

本発明者らは、単鎖可変断片(scFv)のC末端がグリシン-セリンリンカーによってGAAのアミノ酸70-952のN末端に融合されている抗TfR:GAA融合体をコードする核酸の挿入のためのDNA鋳型を操作した。GAA(70-952)配列は、配列番号173に記載され、配列番号174に記載の配列によってコードされる。スプライスアクセプター部位は、抗TfR:GAA導入遺伝子上流にコードされ、ポリアデニル化配列は、抗TfR:GAA導入遺伝子下流にコードされる。導入遺伝子の5'末端のスプライスアクセプター配列は、マウスAlbエキソン2スプライスアクセプターに由来する。導入遺伝子の3'末端のポリアデニル化配列は、シミアンウイルス40(SV40)に由来した。

40

【0707】

rAAV8ベクター

DNA挿入鋳型を担持する組換えAAV8(rAAV8)ベクターを開発した。抗CD63:GAA DNA鋳型(REGV044)を保有するrAAV8ベクターは、AAV血清型8に由来するAAVベースのベクターである非複製ベクターである。ゲノムは、各

50

末端に逆位末端反復 (ITR) を含む一本鎖デオキシリボ核酸 (DNA) である。ITR は、抗 CD63 : GAA プロモーターレス挿入鑄型に隣接する。カセットに隣接する AAV ITR は、AAV2 に由来した。rAAV8 ベクターによって送達される抗 CD63 : GAA DNA 鑄型を、プロモーターレス鑄型として設計し、したがって、発現のために標的化 ALB 遺伝子座プロモーターに依存した。

【0708】

抗 TfR : GAA DNA 鑄型を担持する rAAV8 ベクターは、AAV 血清型 8 に由来する AAV ベースのベクターである非複製ベクターである。ゲノムは、各末端に逆位末端反復 (ITR) を含む一本鎖デオキシリボ核酸 (DNA) である。ITR は、抗 TfR : GAA プロモーターレス挿入鑄型に隣接する。カセットに隣接する AAV ITR は、AAV2 に由来した。rAAV8 ベクターによって送達される抗 TfR : GAA DNA 鑄型は、プロモーターレス鑄型として設計され、したがって、発現のために標的化 ALB 遺伝子座プロモーターに依存した。

10

【0709】

実施例 4 新生仔マウスにおける抗 CD63 : GAA DNA 鑄型の挿入後の持続性 α -グルコシダーゼ (GAA) 発現

次に、本発明者らは、抗 CD63 単鎖可変断片 (scFv) の C 末端がグリシン-セリンリンカー (上記) を用いて GAA の N 末端に融合されている抗 CD63 : GAA 融合体をコードする核酸を挿入するための DNA 鑄型を操作した。本発明者らは、ポンペ病 (PD) マウスモデルにおいて抗 CD63 : GAA 挿入鑄型、 $Gaa^{-/-}$; $Cd63^{hu/hu}$ マウスを試験し、 Gaa は、 $LacZ$ によって置換され、 $Cd63$ 遺伝子座のタンパク質コード領域はそのヒト対応物によって置換された。成体 (2ヶ月齢) 雄及び雌 $Gaa^{-/-}$; $Cd63^{hu/hu}$ マウス (62.5% C57BL/6、37.5% 129Sv) に、以下を静脈内投与した。(1) 抗 CD63 : GAA をコードする $4e12vg/kg$ 組換え AAV8 (REGV042)、又は (2) $1mg/kg$ の LNP-g666 及び $1.2e13vg/kg$ の組換え AAV8 抗 CD63 : GAA 挿入鑄型 (REGV044)。REGV042 は、 $hSerpina1$ エンハンサー及び mTTR プロモーターを使用して、ヒトアルブミンシグナルペプチドを更に含む、抗 CD63 : GAA の肝細胞特異的発現をもたらすエピソーム AAV である。抗 CD63 : GAA コード配列は、REGV042 及び REGV044 において同一であり、配列番号 194 に示されている。未処置 $Gaa^{-/-}$; $Cd63^{hu/hu}$ マウス及び野生型マウスを対照として使用した。投与後 7 日目、30 日目、2ヶ月目、3ヶ月目、6ヶ月目及び 10ヶ月目に採血及び血清を調製し、投与後 10ヶ月目に組織を採取した。抗 CD63 : GAA 血清レベルを、分子の scFv 部分を検出するプレートベースのサンドイッチ ELISA を使用して定量した。抗 CD63 : GAA 精製タンパク質を、定量化のためのタンパク質標準として使用した。データを図 6 及び表 15 ~ 表 16 に示す。投与後 10ヶ月目に、動物を殺し、殺した動物の筋肉組織溶解物中のグリコーゲンレベルを定量化した。CO₂ 窒息による殺直後にマウスから組織を切除し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃ で保存した。グリコーゲン測定のために蒸留水中で、又はタンパク質分析のために RIPA 緩衝液中でステンレス鋼ビーズを用いて、ベンチトップホモジナイザー上で組織を溶解した。グリコーゲン分析溶解物を煮沸し、遠心分離して破片を除去した。グリコーゲン測定は、市販のキット (K646, BioVision、米国カリフォルニア州ミルピータス) を製造業者の指示に従って用いて蛍光定量的に行った。図 7 及び表 17 ~ 19 に示すように、グリコーゲンは、成体マウスの心臓、大腿四頭筋、及び横隔膜におけるエピソーム群及び挿入群の両方において、野生型レベル近くまで有意に減少した。

20

30

40

【0710】

50

【表 1 5】

表 1 5 挿入成体群における抗CD63：GAAの血清レベル (μg/mL)

月	M1	M2	M3	M4	M5	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
0.25	21.06	2.6	14.93	24.37	24.39	16.08	11.21	18.35	28.54	20.94		
1	16.43	1.85	17.92	13.45	3.7	18.88	19.37	26.6	19.8	28.72	26.63	19.97
2	13.15	2.95	13.82	6.06	11.51	6.45	9.5	8.05	11.61	19.2	12.07	14.09
3	14.49	2.53	7.22	6.04	5.75	4.62	10.19	5.75	14.8	12.93	6.61	10.26
6	12.92	3.13	12.08	8.18	5.54	2.48	9.08	8	18.66	2.78	5.03	15.15
10	16.5	2	7.5	10.6	2.3		2.4					

* データのない細胞は、収集後に失われたサンプルによるものであった。
【0 7 1 1】

10

20

30

40

【表 1 6】

表 1 6 エピソーム成体群における抗CD63：GAAの血清レベル（ $\mu\text{g/mL}$ ）

月	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	F1	F2	F3	F4	F5
0.25	62.13	52.18	47.7	53.55	4.9	4.85	2.92	11.55	0	0	8.37	0.6
1	43.85	48.12	40.68	49.22	14.41	15.74	2.21	19.18	0	1.09	4.57	2.25
2	43.68	30.59	29.79	35.37	7.88	6.71	1.67	11.27	0	0.51	0.54	0
3	51.86	47.18	38.41	50.98	5.05	10.89	1.54	3.26	0	0	0.19	0.6
6	42.49	40.95	44.62	44.2	4.42	4.03	1.93	0.35	0	0	0.17	0.17
10	20.9	17.9	18	13.1	5.2	4.9	1.2	0.1	0	0	0	0

【0 7 1 2】

10

20

30

40

50

【表 1 7】

表 1 7 挿入成体群におけるグリコーゲンレベル

	M1	M2	M3	M4	M5	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
心臓	0.02	0.02	0.02	0.01	0.22	0.02	0.02	0.19	0.04	0.02	0.04	0.02
大腿四頭筋	0.43	3.24	0.47	0.79	2.12	0.5	2.32	0.82	1.06	3.45	0.83	0.89
横隔膜	2.85	1.51	0.34	2.24	4.75	0.37	4.06	0.9	4.47	4.56	2.86	0.04
腎臓	4.28	8.11	5.82	1.38	3.41	5.46	6.68	5.63	4	4.62	5.57	7.02

【 0 7 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 8】

表 1 8 エピソーム成体群におけるグリコーゲンレベル

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	F1	F2	F3	F4	F5
心臓	0.18	0.13	0.22	0.02	0.18	0.02	0	1.04	15.39	4.99	5.74	0.13
大腿四頭筋	0.87	0.54	0.72	0.27	0.71	0.85	2.78	6.09	12.05	10.46	11.31	2.89
横隔膜	2.39	1.62	3.41	1.22	2.13	0.32	0.75	6.41	9.94	9.7	8.58	2.89
骨髄	0.3	2.63	3.37	3.19	2.96	5.99	6.1	4.66	6.46	7.9	8.15	7.67

【 0 7 1 4】

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19 対照成体群におけるグリコーゲンレベル

	未処置ボンペマウス (GAA ^{-/-} ; CD63 ^{hu/hu})				野生型 (GAA ^{+/+} CD63 ^{hu/hu})			
	M1	M2	F1	F2	M1	M2	F1	F2
心臓	51.59	44.11	46.31	38.79	0.12	0.85	1.57	0.02
大腿四頭筋	21.63				0	0.74	0	0
横隔膜	20.55	19.89	19.29	22.63	0	0.7	0.42	0.02
脊髄	9.05	3.5	7.17	7.78	0	0.77	0.96	0.05

10

* データのない細胞は実験誤差によるものであった。

【0715】

次に、同様の実験を行い、新生児 G a a^{-/-}; C d 6 3^{h u / h u} マウス (62.5% C 5 7 B L / 6、37.5% 1 2 9 S v) に P 1 において以下を静脈内投与した。(1) 8.2 e 1 2 v g / k g の抗 C D 6 3 : G A A をコードする組換え A A V 8 (R E G V 0 4 2)、又は (2) 4 m g / k g の L N P - g 6 6 6、及び 8.2 e 1 2 v g / k g の組換え A A V 8 抗 C D 6 3 : G A A 挿入鑄型 (R E G V 0 4 4)。未処置 G a a^{-/-}; C d 6 3^{h u / h u} マウス及び野生型マウスを対照として使用した。投与後 7 日目、30 日目、2 ヶ月目、3 ヶ月目、4 ヶ月目、5 ヶ月目、6 ヶ月目、7 ヶ月目、8 ヶ月目、9 ヶ月目、12 ヶ月目、13 ヶ月目、及び 15 ヶ月目に採血及び血清を調製し、3 ヶ月目及び 15 ヶ月目に組織を採取した。図 8 A ~ 8 B 及び表 20 ~ 21 に示すように、成体マウスに投薬したときに観察されたものとは対照的に、血清抗 C D 6 3 : G A A レベルは、挿入群では 15 カ月の時間経過にわたって安定していたが、エピソード群ではより低くなり始め、新生仔マウスに投薬した 1 カ月以内に血清 E L I S A アッセイを使用した定量化の下限未満に低下した。同様に、図 9 A 及び表 22 に示すように、挿入群では、心臓、大腿四頭筋、腓腹筋、及び横隔膜における 3 ヶ月目のグリコーゲン貯蔵が野生型レベルに対して正常化されたが、エピソード群では正常化されなかった。同様に、図 9 B 及び表 23 に示すように、挿入群の心臓、大腿四頭筋、腓腹筋、及び横隔膜において、15 カ月目のグリコーゲン貯蔵が野生型レベルに対して正規化され、挿入群の C N S 組織ではグリコーゲン貯蔵が部分的に修正されたが、エピソード群では修正されなかった。

20

30

【0716】

40

50

【表 2 0】

表 2 0 挿入群を有する新生仔マウスにおける血清抗 CD 6 3 : G A A レベル (μ g / m L)

挿入(AAV+LNP)																	
[00742]																	
月	*	*	**	**	*	*	**	**	*	*	**	**	*	*	*	*	*
0. 23	18. 3	14. 4	15. 9	12. 2	12. 8	8. 7	5. 9	15. 1	9. 5	14. 6	8. 2	11. 6	5. 7	8. 4	14	13. 7	8. 8
1	13. 2	14. 8	13. 9	9	10. 3	5. 4	3. 9	11. 1	6. 1	11. 2	8	9. 9	4. 7	9. 4	11. 5	8. 7	10. 2
3	10. 2	10. 9				3. 5	2. 3	10. 3	5. 8	7. 2	6. 9	8. 2	2. 7	7. 9	14. 7	5. 5	7. 2
4						5. 2	2. 8	8. 7	7. 2	8. 7	6. 8	8. 4		7. 4	14. 5	6. 8	
5						7. 1	4. 1	12. 1	6. 6	10. 2	8. 1	9		8. 5	16. 6	8. 8	
6						6. 9	4. 2	14. 8	7	10. 2	7	7. 9		9. 2	13. 1	8	
7						8. 9	4. 9	17. 5	11. 2	10. 4	9. 9	10		9. 1	13. 4	9. 6	
8						8. 5	4. 4	17	6	8. 9	8. 4	8. 5		8. 1	12. 5	9. 3	
9						5. 9	3. 1	10. 7	5. 2	25. 4	7. 5	5. 9		6. 5	9. 4	6. 2	
12						6. 7	3. 6	10. 3	6. 8	17. 8	6. 8	7. 3		6. 7	9. 7	5. 9	
13						4. 6	3. 7	17. 4	4. 2	17. 0	N/A	6. 1		5. 3	10. 3	5. 6	
15						5. 1	3. 8	18. 4	4. 0	18. 3	7. 6	3. 9		5. 5	18. 0	6. 6	

* 3 ヶ月グリコーゲンアッセイのために 3 ヶ月目に 殺したマウス
** マウスは死亡
【 0 7 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1 エピソーム群を有する新生児マウスにおける血清抗 C D 6 3 : G A A レベル (μ g / m L)

[00744]	エピソームAAV										
月	*	*	*	**			**				
0. 23	0	0	1. 9	0	2. 2	4. 1	2. 5	2. 7	3. 7	3. 4	3. 6
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0. 3	0. 4	0. 5	0
4				0	0	0	0	0	0	0	0
5					0	0	0	0	0	0. 6	0
6					0	0	0	0	0. 5	0. 6	0
7					0	0	0	0	0	0	0
8					0	0. 5	0	0	0. 5	1	0
9					0	0	0	0	0	0	0
12					0	0	0	0	0	0	0
13					0	0	0	0	0	0	0
15					0	0		0	0	0	0

* マウスを 殺

【 0 7 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2 新生仔マウスにおけるグリコーゲンレベル (μ g / m g 組織)

	未処置 KO				エピソーム AAV				遺伝子挿入			
	20.16	18.52	20.14	21.92	0.16	0.1	0.1	0.1	0.08	0.06	0.08	0.04
心臓												
大腿四頭筋	8.96	10.83	9.89	9.63	4.18	2.13	4.21	0.89	0.89	0.77	0.82	0.1
腓腹筋	10.39	10.65	9.31	9.77	5.58	3.66	3.75	1.04	0.83	1.12	0.38	0.73
横隔膜	10.05	7.73	11.33	9.6	0.5	0.59	1.7	0.57	0.7	0.85	0.34	0.9

【 0 7 1 9】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3 新生仔マウスにおけるグリコーゲンレベル ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 組織)

WT										
心臓	0.18	0.03	0.09	0.12	0.04	0.04				
大腿四頭筋	0.95	0.77	0.86	1.01	1.35	0.85				
腓腹筋	0.8	0.68	0.61	1.02	1.06	0.53				
横隔膜	0.6	0.12	2.24	1.25	0.22	0.03				
大脳	0.02664	0	0	0.04436	0	0.00255				
脊髄	0.01999	0	0	0	0.026	0				
未処置										
心臓	40.73	42.15	45.87	46.84	39.15					
大腿四頭筋	12.42	11.02	14.71	15.05	13.43					
腓腹筋	*	10.99	11.6	14.56	12.86					
横隔膜	16.49	10.57	18.33	17.3	11.87					
大脳	7.28	6.26	7.02	6.98	8.23					
脊髄	8.46	10.34	9.37	9.94	9.49					
P1エピソーム										
心臓	0.42	0.17	0.69	0.21	0.09	0.09				
大腿四頭筋	11.27	8.47	1.85	2.72	1.43	0.96				
腓腹筋	7.73	5.36	2.02	2.18	2.03	1.84				
横隔膜	3.09	0.8	0.74	0.76	0.33	0.42				
大脳	8.26	5.63	7.25	7.48	5.87	6.33				
脊髄	6.42	4.93	7.46	7.13	7.61	7.55				
P1挿入										
心臓	0.04	0.12	0.13	0.06	0.25	2.1	0	0.05	0.04	0.07
大腿四頭筋	0.6	0.64	0.68	0.54	0.58	0.61	0.27	0.85	0.35	0.5
腓腹筋	0.43	0.65	0.51	0.51	0.46	0.9	0.27	1.06	0.24	0.43
横隔膜	0.16	0.29	0.08	0.12	0.39	0.77	0	0	0.59	0.12
大脳	3.09	4.59	1.18	3.06	1.87	2.42	3.33	2.2	2.39	3.29
脊髄	3.61	4.89	1.88	3.55	1.03	3.79	3.39	3.72	2.23	3.42

【0720】

新生仔マウスにおいて挿入鋳型を用いて観察されたグリコーゲン低減の改善が、筋肉機能の改善に変換されたかどうかを評価するために、マウスを投与の15ヶ月後に握力装置で試験した。力計 (Columbus Instruments、米国オハイオ州コロンバス) を用いて肢の握力を測定した。全ての試験を三連で行った。挿入鋳型で処置したマウスは、握力試験において、エピソーム構築物で処置したマウスと比較して有意に改善された性能を示した。実際に、挿入群における握力は、処置後15ヶ月で野生型マウスの握力と共に密接に追跡したが、追跡したエピソーム群における握力は、未処置群と比較して差はなかった。図10及び表24を参照されたい。これらの結果は、新生仔マウスにおいて、挿入アプローチが、エピソームアプローチと比較して非常に改善された発現の耐久性、及びより良好な基質減少を示すことを示し、挿入が小児適応のための優れたアプローチであることを示す。

【0721】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 4 新生仔マウスにおける握力 (ニュートン)

野生型	未処置KO	P1挿入AAV+LNP	P1エピソームAAV
2. 21	1. 39	2. 44	1. 83
2. 21	1. 63	2. 34	1. 47
2. 52	1. 48	2. 51	0. 94
2. 55	1. 66	2. 68	1. 81
2. 81	1. 37	3. 13	2. 2
2. 69	2. 27	0. 95	2. 61
3. 29	1. 5	2. 99	
2. 79		2. 42	
		2. 66	
		3. 13	

10

【0 7 2 2】

抗CD63:GAAが、ヒトアルブミンgRNAを使用してアルブミンについてヒト化されたマウスに挿入され得ることを検証するために、4ヶ月齢のGaa^{-/-}; Alb^{hu/hu}マウス (n=3) に、7.5e10vg/マウス組換えAAV8抗CD63:GAA挿入鑄型 (REGV044) 及び1mg/kg LNP-g9860を静脈内投与した実験を行った。投与後7日目、14日目、35日目、及び60日目に血液を採取し、血清を調製した。約3µg/mLまでのGAA血清レベルが観察され、時間経過にわたって維持され (データ示さず)、抗CD63:GAAが、ヒトアルブミンgRNAを使用してアルブミンについてヒト化されたマウスに挿入され得ることが確認された。

20

【0 7 2 3】

要約すると、LNPによって送達される高度に正確かつ標的化されたCRISPR/Cas9技術と、選択されたrAAV8ベクターによって送達される抗CD63:GAA DNA鑄型との組み合わせは、肝細胞からの抗CD63:GAAタンパク質の長期発現並びにPDに罹患した筋細胞への送達を可能にし、新生仔マウスを含むPD病患者に生涯にわたる有効な治療を潜在的に提供する。

【0 7 2 4】

これらの結果は、新生仔マウスにおいて、挿入アプローチがエピソームアプローチと比較して非常に改善された発現の耐久性を示すことを示し、挿入が新生児対象において優れたアプローチであることを示す。

30

【0 7 2 5】

実施例5最適化抗CD63:GAA DNA鑄型

最適化抗CD63:GAA鑄型を生成して、非ヒト霊長類 (NHP) 試験のためのリードを開発した。開発候補を選択するために、抗CD63:GAAをコードするヌクレオチド配列が修飾された (例えば、CpGを枯渇させることによって) 挿入カセットのいくつかのバージョンを生成した。表25は、設計された抗CD63:GAAインサートの各種バージョンを列挙する。加えて、GS50構築物を更に最適化して、6個の活性化CpGモチーフを除去するが、44個の非活性化CpGモチーフを残した (GS44; 配列番号200)。GS0構築物を、AATAAポリAを除去し、潜在性スプライスアクセプターを除去し、グリシンコードGGGGGGGGGGGG (配列番号203) をGGAGGAGGTTGG (配列番号204) で置換することによって更に最適化した (GS0v2; 配列番号198)。

40

【0 7 2 6】

50

【表 2 5】

表 2 5 挿入カセットのための抗 CD 6 3 : G A A 挿入

抗CD63:GAA挿入	導入遺伝子CpG含量	配列番号
第1世代	181	194
GS 0	0	197
GS 0v2	0	198
DC 0	0	195
GS 1	1	199
RE 8	8	202
GS 50	50	201
GS 44	44	200
GA 0	0	196

10

【0 7 2 7】

末梢血単核細胞（P B M C）をヒト血液から単離した。形質細胞様樹状細胞（p D C）を濃縮し、P B M Cと組み合わせた（ウェル当たり 1×10^4 個の p D C + 1×10^5 個の p B M C）。細胞を A A V 6 又は対照 C p G - オリゴデオキシヌクレオチド（O D N）と共に 16 ~ 18 時間インキュベートした。上清を回収し、I F N α E L I S A を実施した。このアッセイは、C p G 枯渇抗 CD 6 3 : G A A 配列が、非 C p G 枯渇配列と比較して、初代ヒト形質細胞様 D C ベースのアッセイにおいて I F N - I 応答の減少を示すかどうかを評価した。陽性対照 A A V 6 - G F P 及び陰性対照 C p G 枯渇（0 C p G F 9 導入遺伝子）鑄型を含む試験サンプルを表 2 6 に示す。結果を、図 1 1 に示す。

20

【0 7 2 8】

【表 2 6】

表 2 6 A A V 6 抗 CD 6 3 : G A A 鑄型 p D C / A A V アッセイにおいて I F N α 応答について試験した。

ゲノム	導入遺伝子CpG含量	総CpG含量w / ITR
AAV6 GFP (SFFV_eGFP_WPRE)	99	175
第1世代	181	213
GS 50	50	82
GS 44	44	75
GA 0	0	32
GS 0 v2	0	32
F90 CpG鑄型	0	33

30

【0 7 2 9】

最適化鑄型の活性を、初代ヒト肝細胞アッセイにおいて試験した。A A V 鑄型を A A V 2 ウイルスにパッケージングした。初代ヒト肝細胞を 96 ウェルプレート中で増殖させ、鑄型 D N A 及び L N P - g 9 8 6 0 を含有する A A V （A A V 2、A A V 6、又は A A V 8）を、L N P 用量滴定による固定 M O I 又は A A V 用量滴定による固定 L N P 濃度のいずれかで投与した。投与 7 日後に上清を回収し、 -80°C で保存した。上清を解凍し、上清中の G A A 活性を、細胞から産生及び分泌された酵素的に活性な G A A の量の測定として、4 - メチルウンベリフェロンベースの蛍光定量アッセイ（K 6 9 0, B i o V i s i o n、米国カリフォルニア州ミルピータス）を使用して測定した。最適化された抗 CD 6 3 : G A A 及び抗 T f R : G A A 鑄型の第 1 のバッチを、表 2 7 及び図 1 2 に示すように A A V 2 を使用して試験した。50 C p G 抗 CD 6 3 : G A A 鑄型は天然鑄型と同様に発現したが、より少ない C p G を有する最初の鑄型は十分に発現しなかった。追加の最適化抗 CD 6 3 : G A A 鑄型を、表 2 8 及び図 1 3 に示すように A A V 6 を使用して試験した。G A 0 C p G 抗 CD 6 3 : G A A 鑄型は、インビトロ初代ヒト肝細胞挿入アッセイにおいて、天然高 C p G 鑄型と比較して発現を維持した。同様の結果が、A A V 6 の代わりに A A V 8 を使用して観察された（データは示さず）。G A 0 C p G 抗 CD 6 3 : G A A 鑄型は、初代ヒト肝細胞アッセイにおいて天然と同様のレベルで機能的 G A A を

40

50

産生したが、pDC／AAVアッセイにおいてIFN α 応答の低下ももたらした。

【0730】

【表27】

表27 PHH上清中のGAA活性について試験したAAV2抗CD63：GAA及び抗TfR：GAA鑄型

ゲノム	導入遺伝子CpG含量
第1世代	181
GS 50	50
RE 8	8
GS 0	0
12837scfv-GAA-1 0CpG 27	0
12837scfv-GAA-2 5CpG 27	5

10

【0731】

【表28】

表28 PHH上清中のGAA活性について試験されたAAV6抗CD63：GAA鑄型

ゲノム	導入遺伝子CpG含量
第1世代	181
GS 50	50
GS 44	8
GA 0	0
GS 0v2	0

20

【0732】

最適化された鑄型の発現は、実施例4に記載されるように、Gaa^{-/-}マウスにおける挿入後に検証された。成体マウスに、1.97e12vg/kgの組換えAAV8抗CD63：GAA挿入鑄型（REGV044）及び1mg/kgのLNP-g666を静脈内投与した。試験した組換えAAV8鑄型は、天然181 CpG抗CD63：GAA挿入鑄型（REGV044）、GA 0 CpG鑄型、GSa50 CpG鑄型、及びGS44 CpG鑄型を含んだ。未処置Gaa^{-/-}マウス及び野生型マウスを対照として使用した。投薬後13週間、34週間、及び92週間で血液を収集し、血清を調製した。図14Aに示すように、GA 0 CpG鑄型は、天然高CpG鑄型と比較して、成体Gaa^{-/-}マウスにおいて同様のインビボでの血清発現を示した。図14Bに示すように、血清発現レベルは3つの時点にわたって一貫していた。

30

【0733】

GA 0 CpG抗CD63：GAA鑄型（配列番号196及び736）の発現を、非ヒト霊長類における挿入後に評価した。2年齢のカニクイザルに、CpG枯渴抗CD63：GAA鑄型及びカニクイザルアルブミンイントロン1を標的とするLNP-g9860を含有する組換えAAV8を投与した。3つの異なる組換えAAV8用量（0.3e13vg/kg、1.5e13vg/kg、及び5.6e13vg/kg）を3mg/kgのLNP用量と共に使用した。ビヒクル対照群ではN=1、投与群ではN=3。血清GAA活性を、研究の過程を通してサルにおいて蛍光基質アッセイを使用して測定した。血清GAA活性レベルのAAV用量依存的増加が、群において経時的に観察された（図27A）。これは、抗CD63：GAA導入遺伝子のアルブミン遺伝子座への挿入の成功並びに動物における導入遺伝子の発現及び分泌の結果を示した。組織を殺時（89日目）に収集し、GAAの76kDaリソソーム形態の存在についてウェスタンブロットによってプローブした。組織中のリソソームGAAの用量依存的増加が、心臓及び横隔膜において観察され（図27B）、これは、肝臓由来抗CD63：GAAタンパク質の遠位組織への送達を示した。

40

【0734】

最適化鑄型の活性は、実施例4に記載されるように、PDマウスモデル、Gaa^{-/-}

50

; C d 6 3^{h u} / ^{h u}において検証される。

【0735】

最適化鑄型の発現は、非ヒト霊長類において評価される。2つのLNP用量及び2つのgRNAを試験する。具体的には、発現は、実施例1に記載される1又は3mg/kgのLNP-g9860及び各最適化鑄型を含む1.5e13vg/kgのrAAV8を投与することによって評価される。gRNA9844を有するLNPも使用される。発現を12週間の試験にわたって分析する。GAAの生体内分布の分析のために組織も収集し、収集した組織においてGAA活性を評価する。

【0736】

実施例6新生仔マウスにおける抗TfR:GAA DNA鑄型の挿入後の持続的α-グルコシダーゼ(GAA)発現

抗ヒトトランスフェリン受容体(hTfR)抗体を作製し、hTfRに結合する能力及びヒトトランスフェリン-hTfR結合の強力な遮断の欠如についてスクリーニングした。この最初の分析に基づいて、32の可変配列を選択した。表29を参照されたい。

【0737】

【表29】

表29融合タンパク質中の抗hTfR抗体、抗原結合断片(例えば、Fab)、又はscFv分子中のドメイン

#	抗hTfR分子	HC-VR NT	HC-VR AA	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LC-VR NT	LC-VR AA	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	31874B	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
2	31863B	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235
3	69348	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
4	69340	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
5	69331	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265
6	69332	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275
7	69326	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
8	69329	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295
9	69323	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305
10	69305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
11	69307	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325
12	12795B	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335
13	12798B	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
14	12799B	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355
15	12801B	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365
16	12802B	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
17	12808B	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385
18	12812B	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395
19	12816B	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
20	12833B	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415
21	12834B	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425
22	12835B	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
23	12847B	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445
24	12848B	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455
25	12843B	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
26	12844B	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475
27	12845B	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485
28	12839B	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495
29	12841B	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505
30	12850B	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515
31	69261	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525
32	69263	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535

【0738】

3 1 8 7 4 B

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T G G T A C A G
C C T G G G G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C G C C T T T A G C A G C T A T G C C A T G A C C T G G G T C C G A C A G G C
T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G G T C T C A G T T A T C A G T G G T
A C T G G T G G T A G T A C A T A C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C
G G T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A A G A A C A C G C T G T A
T C T A C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C C G T A
T A T T A C T G T G C G A A A G G G G G A G C A G C T C G T A G A A T G G A A T
A C T T C C A G T A C T G G G G C C A G G G C A C C C T G G T C A C C G T C T C
C T C A (配列番号 2 1 6)

10

【0 7 3 9】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F A F S S Y A M T W V R Q
A P G K G L E W V S V I S G T G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G G A A R R M E Y F Q Y W G Q G T L V T V
S S (配列番号 2 1 7)

H C D R 1 : G F A F S S Y A (配列番号 2 1 8)

H C D R 2 : I S G T G G S T (配列番号 2 1 9)

20

H C D R 3 : A K G G A A R R M E Y F Q Y (配列番号 2 2 0)

【0 7 4 0】

L C V R (V_L) ヌクレオチド配列

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A
T C T G T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C C G G G C G A G T C
A G G G C A T T A G C A A T T A T T T A G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C
A G G G A A A G T T C C T A A C C T C C T T A T C T A T G C T G C A T C C A C T
T T G C A A T C A G G G G T C C C A T C T C G A T T C A G T G G C A G T G G A T
C T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G C C T G C A G C C
T G A A G A T G T T G C A A C T T A T T A C T G T C A A A A G T A T A A C A G T
G C C C C T C T C A C T T T C G G C G G A G G G A C C A A G G T G G A G A T C A
A A (配列番号 2 2 1)

30

【0 7 4 1】

L C V R (V_L) アミノ酸配列

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L A W Y Q Q K
P G K V P N L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D V A T Y Y C Q K Y N S A P L T F G G G T K V E I K (配列番号 2 2 2)

L C D R 1 : Q G I S N Y (配列番号 2 2 3)

L C D R 2 : A A S (配列番号 2 2 4)

L C D R 3 : Q K Y N S A P L T (配列番号 2 2 5)

40

【0 7 4 2】

3 1 8 6 3 B

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T G G T A C A G
C C T G G G G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C A C C T T T A A C A G C T A T G C C A T G A C C T G G G T C C G C C A G G C
T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G G T C T C A T T T A T T G G T G G T
A G T A C T G G T A A C A C A T A C T A C G C A G G C T C C G T G A A G G G C C
G G T T C A C C A T C T C C A G C G A C A A T T C C A A G A A G A C G C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C C G T A

50

T A T T A C T G T G C G A A A G G G G G A G C A G C T C G T A G A A T G G A A T
A C T T C C A G C A C T G G G G C C A G G G C A C C C T G G T C A C C G T C T C
C T C A (配列番号 2 2 6)

【0743】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F N S Y A M T W V R Q
A P G K G L E W V S F I G G S T G N T Y Y A G S V K G R F T I S S D N S K K T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G G A A R R M E Y F Q H W G Q G T L V T V
S S (配列番号 2 2 7)

H C D R 1 : G F T F N S Y A (配列番号 2 2 8)

H C D R 2 : I G G S T G N T (配列番号 2 2 9)

H C D R 3 : A K G G A A R R M E Y F Q H (配列番号 2 3 0)

10

【0744】

L C V R (V_L) ヌクレオチド配列

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A
T C T A T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C C G G G C G A G T C
A G G G C A T T A G C A A T T A T T T A G C C T G G T A T C A A C A G A A A C C
A G G G A A A G T T C C T A A G C T C C T G A T C T A T G C T G C A T C C A C T
T T G C A A T C A G G G G T C C C A T C T C G G T T C A G T G G C A G T G G A T
C T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G C C T G C A G C C
T G A A G A T G T T G C A A C T T A T T A C T G T C A A A A C C A T A A C A G T
G T C C C T C T C A C T T T C G G C G G A G G G A C C A A G G T G G A G A T C A
A A (配列番号 2 3 1)

20

【0745】

L C V R (V_L) アミノ酸配列

D I Q M T Q S P S S L S A S I G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L A W Y Q Q K
P G K V P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D V A T Y Y C Q N H N S V P L T F G G G T K V E I K (配列番号 2 3 2)

L C D R 1 : Q G I S N Y (配列番号 2 3 3)

L C D R 2 : A A S (配列番号 2 3 4)

L C D R 3 : Q N H N S V P L T (配列番号 2 3 5)

30

【0746】

6 9 3 4 8

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

C A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C G T G G T C C A G
C C T G G G A G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C G T C T G G A T
T C A C C T T C A C T A C C T A T G G C A T G C A C T G G G T C C G C C A G G C
T C C A G G C A A G G G G C T G G A G T G G G T G G C T G T T A T A T G G T A T
G A T G G A A G T A A T A A A T A T T A T G G A G A C T C C G T G A A G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A A G A A C A C A C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G T C G A C G A C A C G G C T G T T
T A T T A C T G T A C G A G A A C C C A T G G C T A T A C C A G G T C G T C G G
A C G G T T T T G A C T A C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T
C T C C T C A (配列番号 2 3 6)

40

【0747】

H C V R (V_H) アミノ酸配列 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S

G F T F T T Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y G D S V K
G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R V D D T A V Y Y C T R T H G Y T R S
S D G F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 2 3 7)

H C D R 1 : G F T F T T Y G (配列番号 2 3 8)

50

HCDR2 : IWYDGSNK (配列番号 239)

HCDR3 : TRTHGYTRSSDGFY (配列番号 240)

[0748]

LCVR (VL) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTC
AGAGCATTAGAAATGTTTTAGGCTGGTTTTAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTCAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTACAGCC
TGAAGATTTTGGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAAATTTT
TACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA
AA (配列番号 241)

10

[0749]

LCVR (VL) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSIRNVLGWFQQK
PGKAPQRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
PEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKEIK (配列番号 242)

LCDR1 : QSIRNV (配列番号 243)

LCDR2 : AAS (配列番号 244)

20

LCDR3 : LQHNFYPLT (配列番号 245)

[0750]

69340

HCVR (VH) ヌクレオチド配列

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTACAG
CCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTGATGATAAAGCCATGCACCTGGGTCCGGCAAGT
TCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGATCTCAGGTATTAGTTGG
AATAGTGGTACTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCAATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA
TCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTG
TATTACTGCGCAAAAGATGGAGATACCAGTGGCTGGTACT
GGTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAACGGTCA
CGTCTCCTCA (配列番号 246)

30

[0751]

HCVR (VH) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDKAMHWVRQ
VPKGLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNANKNSL
YLQMNSLR AEDTALYYCAKDGDTSGWYWG L D V W G Q G T T V
TVSS (配列番号 247)

40

HCDR1 : GFTTFDDKA (配列番号 248)

HCDR2 : ISWNSGTI (配列番号 249)

HCDR3 : AKDGDTS GWYWG L D V (配列番号 250)

[0752]

LCVR (VL) ヌクレオチド配列

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCCACCCCTGTCTTTG
TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTC
AGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCCTGGTACCAACAGAAACC
TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCCATGATGTATCCAAC
AGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT

50

CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTAGAGCC
TGAAGATTTTGTAGTTTATTACTGTTCAGCAGCGTAGCGAC
TGGCCCATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA
AA (配列番号 251)

【0753】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIHDSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE
PEDFVYCYCQQRSDWPITFGQGTRLEIK (配列番号 252)

LCDR1: QSVSSY (配列番号 253)

LCDR2: DVS (配列番号 254)

LCDR3: QQRSDWPIT (配列番号 255)

【0754】

69331

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCGTGGTCCAG
CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTATAGCCTCTGGAT
TCACCTTCAGTGTCTATGGCATTCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGGCTGGAGTGGATGGCAGTAATATCACAT
GATGGAAATATTAAACACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA
TCTTCAAATTAAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGTG
TATTACTGTGCGAAAGATACCTGGAACTCCCTTGATACTT
TTGATATCTGGGGGCCAAGGGGACAATGGTTCACCGTCTCTTC
A (配列番号 256)

【0755】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFVYGIHWVRQ
APGKGLEWMAVISHDGNIKHYSVKGRTISRDNSKNTL
YLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGTMVTVS
S (配列番号 257)

HCDR1: GFTFSVYG (配列番号 258)

HCDR2: ISHDGNIK (配列番号 259)

HCDR3: AKDTWNSLDTFDI (配列番号 260)

【0756】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCTGGGGCCAGTC
AGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACC
AGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACT
TTGCAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGT
TACCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGGACCAAGGTGGAGATCA
AA (配列番号 261)

【0757】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCWASQGISSSYLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
PEDFATYCYCQQLNSYPLTFGGGTKEIK (配列番号 262)

LCDR1 : QGISSY (配列番号 263)

LCDR2 : AAS (配列番号 264)

LCDR3 : QQLNSYPLT (配列番号 265)

[0758]

69332

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCCGCGCTGGTGAAA
CCCTCACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTCTCTGGAT
TCTCACTCAACACTTATGGGATGTTTGTGAGCTGGATCCG
TCAGCCTCCAGGGAAGGCCCTAGAGTGGCTTGCACACATT
CATTGGGATGATGATAAATACTACAGCACATCTCTGAAGA
CCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCA AAAACCAGGT
GGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCCTGTGGACACAGCC
ACGTATTATTGTGCACGGGGGACACAATAATTTGA ACTACA
TCATCCACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCA CCGTCTCTC
A (配列番号 266)

10

[0759]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWI
RQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQ
VVLTMTNMDPVDATYYCARGHNNLNYYIIHWGQGTLVTVS
S (配列番号 267)

20

HCDR1 : GFSLNTYGMF (配列番号 268)

HCDR2 : IHWDDDK (配列番号 269)

HCDR3 : ARGHNNLNYYIIH (配列番号 270)

[0760]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGGCCGGGCAAGTC
AGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACT
TTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATTTTGTCAACTTATTACTGTCTACAAGATTACAAT
TACCCATTCACTTTTCGGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATATCA
AA (配列番号 271)

30

[0761]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

AIQMTQSPSSL SASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQK
PGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
PEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIK (配列番号 272)

40

LCDR1 : QGIRND (配列番号 273)

LCDR2 : AAS (配列番号 274)

LCDR3 : LQDYNYPFT (配列番号 275)

[0762]

69326

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG
CCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTCAGTCTCTGGAT
TCATCTTTCAGTAGTTATGAAATGAACTGGGGTCCGCCAGGC

50

TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTTCATACATTAGTAGT
AGTGGTAGTACCATATTCTACGCAGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGGCTGTT
TATTACTGTGTGTCTGGAGTGGTCTTTTGTATGTCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCTTCA (配列番号 276)

【0763】

HCV R (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFI FSSSYEMNWVRQ
APGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLR AEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTVSS (配列
番号 277)

10

HCDR1 : GFIFSSYE (配列番号 278)

HCDR2 : ISSSGSTI (配列番号 279)

HCDR3 : VSGVVLFDV (配列番号 280)

【0764】

LCV R (V_L) ヌクレオチド配列

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTG
TCTCCGGGGGGAAGAGGCCACCCCTCTCCTGCAAGGGCCAGTC
AGAGTGTTAGCAGCAACTTTGCTGCTGGTACCAACAGAAACC
TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATAGTGCAATCCTCC
AGGGCCACTGGTATCCCAGTCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAAGTC
TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGTATAATATC
TGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA
AA (配列番号 281)

20

【0765】

LCV R (V_L) アミノ酸配列

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQK
PGQAPRLLIYSASSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
SEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIK (配列番号 282)

30

LCDR1 : QSVSSN (配列番号 283)

LCDR2 : SAS (配列番号 284)

LCDR3 : QQYNIWPRT (配列番号 285)

【0766】

69329

HCV R (V_H) ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTGGTCCAG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAAGCCTCTGGAT
TCACCTTTAGTAACCTATTGGATGACCTGGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAA
GATGGAAGTGAGAAAGACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGGCTGTG
TATTACTGTGCGAGAGATGGGGAGCAGCTCGTCGATTACT
ACTACTACTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAAC
GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 286)

40

【0767】

HCV R (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQ

50

APGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY Y Y Y Y VMDVWGGQT
TVTVSS (配列番号287)

HCDR1:GFTFSNYW (配列番号288)

HCDR2:IKEDGSEK (配列番号289)

HCDR3:ARDGEQLVDY Y Y Y Y VMDV (配列番号290)

【0768】

LCVR(V_L)ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCT
AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATTTTTCGCAACTTACTATTGTCAAAGGCTAACAGT
TTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCA
AA (配列番号291)

10

【0769】

LCVR(V_L)アミノ酸配列

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIK (配列番号292)

20

LCDR1:QGISSW (配列番号293)

LCDR2:AAS (配列番号294)

LCDR3:QKANSFPYT (配列番号295)

【0770】

69323 (REGN16816抗hTfR scFv:hGAA)

HCVR(V_H)ヌクレオチド配列

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTGGTACAG
CCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTGATGACTATGCCATGCACCTGGGTCCGGGCAAGC
TCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
AATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGGCC
GATTCAACCATCTCCAGAGACAACGCCGAGAACTCCCTACA
TCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGGCCTTG
TATTACTGTGCAAGAGGGGGGATCTACTCTGGTTTCGGGGGAG
TTAAGGGAGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG
GACCACGGTCAACCGTCTCCTCA (配列番号296)

30

【0771】

HCVR(V_H)アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAAENSL
HLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGMVWGGQ
GTTTVTVSS (配列番号297)

40

HCDR1:GFTFDDYA (配列番号298)

HCDR2:ISWNSGYI (配列番号299)

HCDR3:ARGGSTLVRGVKGGYYGMV (配列番号300)

【0772】

LCVR(V_L)ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA

50

TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTTGCCCGGGCAAGTCA
AGAGCATAAAGTAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
AGGTAAAGCCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCAACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ATTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA
AA (配列番号301)

【0773】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKVLIIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKEIK (配列番号302)

LCDR1: QSISSY (配列番号303)

LCDR2: AAS (配列番号304)

LCDR3: QQSYSIPLT (配列番号305)

【0774】

69305

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG
CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGAT
TCACCTTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTAT
GATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACATTTCCAAGAACACGCTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGTA
TATTACTGTGCGGGTCAACTGGATCTCTTTCTTTGACTACT
GGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA (配列番号306)

【0775】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQ
APGKGLEWVAWIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNL
YLQMNSLR AEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSS (配
列番号307)

HCDR1: GFTFSY G (配列番号308)

HCDR2: IWYDGSNK (配列番号309)

HCDR3: AGQLDLFFDY (配列番号310)

【0776】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTTGCCCGGGCAAGTCA
AGAGCATTTGACAGGTATTTAAATTGGTATCGGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATACTACATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCAACCCTCAGCAGTCTGCAAGCC
TGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
CCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA
AA (配列番号311)

【0777】

10

20

30

40

50

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDRYLNWYRQK
PGKAPKLLIYTTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQ
PEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKEIK (配列番号 312)

LCDR1: QSIDRY (配列番号 313)

LCDR2: TTS (配列番号 314)

LCDR3: QQSYSPPLT (配列番号 315)

[0778]

69307 (REGN16817 抗 hTfR scFv: hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGAT
TCACCTTTAGTAACCTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAA
GATGGAAGTGAGAAAGAGTATGTGGACTCTGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATTCACTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTA
TATTACTGTGCGAGAGATGGGGAGCAGCTCGTCGATTACT
ATTACTACTACGTTATGGACGTCTGGGGGCCAAGGGACCA
CGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 316)

[0779]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQ
APGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY YYY YVMDVWGQGT
TVTVSS (配列番号 317)

HCDR1: GFTFSNYW (配列番号 318)

HCDR2: IKEDGSEK (配列番号 319)

HCDR3: ARDGEQLVDY YYY YVMDV (配列番号 320)

[0780]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCA
TCTGTTGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTCTGGGGCGAGTC
AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATTTTGCAA CT TACTATTGTCAA AAGGCTGACAGT
CTCCCGTACGCTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCA
AA (配列番号 321)

[0781]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIISSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTEKLEIK (配列番号 322)

LCDR1: QGISSW (配列番号 323)

LCDR2: AAS (配列番号 324)

LCDR3: QKADSLPYA (配列番号 325)

[0782]

12795B

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T G G T T C A G
C C T G G G G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A A C C T C T G G A T
T C A C C T T T A C C A G C T A T G A C A T G A A G T G G G T C C G C C A G G C
T C C A G G G C T G G G C C T G G A G T G G G T C T C A G C T A T T A G T G G T
A G T G G T G G T A A C A C A T A C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C
G G T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A G G A A C A C G C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C C G T A
T A T T A C T G T A C G A G G T C C C A T G A C T T C G G T G C C T T C G A C T
A C T T T G A C T A C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T C T C
C T C A (配列番号 3 2 6)

10

【0783】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A T S G F T F T S Y D M K W V R Q
A P G L G L E W V S A I S G S G G N T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S R N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R S H D F G A F D Y F D Y W G Q G T L V T V
S S (配列番号 3 2 7)

H C D R 1 : G F T F T S Y D (配列番号 3 2 8)

H C D R 2 : I S G S G G N T (配列番号 3 2 9)

H C D R 3 : T R S H D F G A F D Y F D Y (配列番号 3 3 0)

20

【0784】

L C V R (V_L) ヌクレオチド配列

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A
T C T G T G G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C C G G G C A A G T C
A G G G C A T T A G A G A T C A T T T T G G C T G G T A T C A G C A G A A A C C
A G G G A A A G C C C C T A A G C G C C T G A T C T A T G C T G C A T C C A G T
T T G C A C A G T G G G G T C C C A T C A A G G T T C A G C G G C A G T G G A T
C T G G G A C A G A A T T C A C T C T C A C A A T C A G C A G C T T G C A G C C
T G A A G A T T T T G C A A C C T A T T A C T G T C T A C A G T A T G A T A C T
T A C C C G C T C A C T T T C G G C G G A G G G A C C A A G G T G G A G A T C A
A A (配列番号 3 3 1)

30

【0785】

L C V R (V_L) アミノ酸配列

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R D H F G W Y Q Q K
P G K A P K R L I Y A A S S L H S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C L Q Y D T Y P L T F G G G T K V E I K (配列番号 3 3 2)

L C D R 1 : Q G I R D H (配列番号 3 3 3)

L C D R 2 : A A S (配列番号 3 3 4)

L C D R 3 : L Q Y D T Y P L T (配列番号 3 3 5)

40

【0786】

1 2 7 9 8 B (REGN17078 Fab; REGN17072 scFv; REG
N16818 抗 h T f R scFv: h G A A)

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

G A A G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G A C T T G G T A C A G
C C T G G C A G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C A C C T T T G A T G A T T A T G C C A T G C A C T G G G T C C G G C A A G C
T C C A G G G A A G G G C C T G G A G T G G G T C T C A G G T A T T A G T T G G
A A T A G T G C T A C C A G A G T C T A T G C G G A C T C T G T G A A G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A C G C C A A G A A T T T C C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G T C T G A G A T C T G A G G A C A C G G C C T T G

50

TATCACTGTGCAAAAGATATGGATATCTCGCTAGGGTACT
ACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCACGGTCAACCGT
CTCCTCA (配列番号336)

[0787]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNANKNFL
YLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTVT
VSS (配列番号337)

HCDR1: GFTTFDDYA (配列番号338)

HCDR2: ISWNSATR (配列番号339)

HCDR3: AKDMDISLGYYGLDV (配列番号340)

10

[0788]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTG
TCTCCAGGGGAAAGAGGCCACCCTCTCCTGCAAGGGCCAGTC
AGACTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC
TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTTTCATCCTCC
AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTC
TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGTATAATAAC
TGGCCTCCCTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGA
TCAAA (配列番号341)

20

[0789]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWEYQQK
PGQAPRLLIYGSSSRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ
SEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGGTKLEIK (配列番号342)

LCDR1: QTVSSN (配列番号343)

LCDR2: GSS (配列番号344)

LCDR3: QQYNNWPPYT (配列番号345)

30

[0790]

12799B (REGN17079 Fab; REGN17073 scFv; REGN
16819 抗hTfR scFv: hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCCTACGCTGGTGAAA
CCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGT
TCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTGTGGTCTGGATCCG
TCAGCCCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACCTCATTT
TATTGGAATGATCATAAGCGGTACAGCCCATCTCTGGGGGA
GCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAAACAGGT
GGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCCTGTGGACACAGCC
ACATATTACTGTGCACACTACAGTGGGAGCTATTCTCTACT
ACTACTATGGTTTGGACGTCTGGGGGCCAAGGGACCCACGGT
CACCGTCTCCTCA (配列番号346)

40

[0791]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVG VVWI
RQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLSRLTITKDTSKNQ
VVLTMNMDPVDATYYCAHYSYSYYYYGLDVWGQGTTT

50

VTVSS (配列番号347)

HCDR1: GFSLSSTSGVG (配列番号348)

HCDR2: IYWNDHK (配列番号349)

HCDR3: AHYSGSYSYYYYGLDV (配列番号350)

[0792]

LCVR (VL) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCA
AGGGTATTGCCAGCTGGTTAGCCTGGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTGAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAGGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATTTTGC AATTTACTATTGTCAACAGGCTAACTAT
TTCCCGTGGACGTTTCGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA
AA (配列番号351)

[0793]

LCVR (VL) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIIASWLAWYQQK
PGKAPELLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIK (配列番号352)

LCDR1: QGIIASW (配列番号353)

LCDR2: AAS (配列番号354)

LCDR3: QQANYFPWT (配列番号355)

[0794]

12801B

HCVR (VH) ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGGTACAG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTACCTCCTATGCCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGAGGT
AGTGGTGGTGGCACATACTCCGCAGACTCCGTGAAGGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGGACACTCTATA
TCTGCAAATGAACAGTGTGAGAGCCGAGGACACGGGCCGTT
TATTACTGTGCGAGGTCCCATGACTACGGTGCCTTCGACT
TCTTTGACTACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTC
CTCA (配列番号356)

[0795]

HCVR (VH) アミノ酸配列

EVQLLES GGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQ
APGKGLEWVSSIRGSGGGTYSDSVKGRFTISRDN SRDTL
YLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFFDFDYWGQGTLVTV
SS (配列番号357)

HCDR1: GFTFTSYA (配列番号358)

HCDR2: IRGSGGGT (配列番号359)

HCDR3: ARSHDYGAFFDFDY (配列番号360)

[0796]

LCVR (VL) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTCTGGGCAAGTCA
AGGGCATTAGAACTGATTTAGGCTGGGTATCAGCAGAAACC

10

20

30

40

50

AGGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGAT
CTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCGGCC
TGAAGATTTTGCAACTTTTTTACTGTCTACAGTATAATAGT
TACCCGCTCACTTTTCGGCGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA
AA (配列番号361)

【0797】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQGIRTDLGWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLR
PEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTTKVEIK (配列番号362)

10

LCDR1: QGIRTD (配列番号363)

LCDR2: AAS (配列番号364)

LCDR3: LQYNSYPLT (配列番号365)

【0798】

12802B (REGN16820抗hTfR scFv: hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGAGGCTTGGTCAAG
CCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT
TCACCTTCAGTGACTACTTCATGAGCTGGATCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTTCATACATTAGTAGT
ACTGGTAGTACCATAAATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGGGACAATGTCAAGAAATTCAGTGT
TCTGCAAATGACCAGCCTGAGAGTCTGAGGACACGGGCCGTG
TATTACTGTACGAGAGATAACTGGAACTATGAATACTGGG
GCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA (配列番号366)

20

【0799】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYFMSWIRQ
APGKGLEWVSYSSTGSTINYSVKGRTFISRDNVKNSL
YLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYYEYWGQGTLLVTVSS (配列
番号367)

30

HCDR1: GFTTFSDYF (配列番号368)

HCDR2: ISSTGSTI (配列番号369)

HCDR3: TRDNWNYYEY (配列番号370)

【0800】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTG
TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTC
AGAGTGTTAGCATCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACC
TGGCCAGGCTCCCAAGGCTCCTCATCTTTGTTGCATCCACC
AGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTC
TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTAGCAGTATGATATC
TGGCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCA
AA (配列番号371)

40

【0801】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQK
PGQAPRLLI FVASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ

50

SEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGGTKLEIK (配列番号 372)

LCDR1: QSVSIN (配列番号 373)

LCDR2: VAS (配列番号 374)

LCDR3: QQQYDIWPYT (配列番号 375)

12808B

[0802]

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCCCCAGGACTGGGTGAAG
CCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACTGTGTCTGGGTG
AATCCATCAGCAGTAATACTTACTACTGGGGCTGGATCCG
CCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATTGGGAGGTATC
GATTATAGTGGGACCAACCAATTATAACCCGTCCTCTCAAGA
GTCGAGTCACCATATCCGCTAGACACGTCACAGGAATCACTT
CTCCCTGAGGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCGAGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGAGTGGGGAAACTACGGCTACT
ATTACGGGTATGGACGTTTGGGGCCAAGGGACCAACGGTCA
CGTCTCTCTCA (配列番号 376)

10

[0803]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGESISSENTYYWGWIR
RQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSRNH
FSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWVGQGTTV
TVSS (配列番号 377)

20

HCDR1: GESISSNTYY (配列番号 378)

HCDR2: IDYSGTT (配列番号 379)

HCDR3: AREWGNYGYYYGMDV (配列番号 380)

[0804]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCAATTGCCGGGGCAAGTC
AGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAACAACCTGCAGCC
TGAAGATTTTGGCAACTTATTACTGTCTATCGCATATAAGT
TACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA
AA (配列番号 381)

30

[0805]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVINCRASQGIRNDLGWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTINN
LPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGGTKVEIK (配列番号 382)

40

LCDR1: QGIRND (配列番号 383)

LCDR2: AAS (配列番号 384)

LCDR3: LSHNSYPWT (配列番号 385)

[0806]

12812B (REGN16821抗hTfR scFv: hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG
CCTGGGTCTCTCGGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCTTCTAGAG

50

G C A C C T T C A G C A G C T A T G C T A T C A G C T G G G T G C G A C A G G C
C C C T G G A C A A G G C C T T G A G T G G A T G G G A G G G A T C A T C C C C
A T C T T T G G T A C A G C A A A C T A C G C A C A G A A G T T C C T G G C C A
G A G T C A C G A T T A C C G C G G A C G A A T C C A C G A G C A C A G C C T A
C A T G G A G C T G A G C A G C C T G A G A T C T G A G G A C A C G G C C G T G
T A T T A C T G T G C G A G A G A G A A G G G G T G G A A C T A C T T T G A C T
A C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A (配列番号
386)

【0807】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V R V S C K A S R G T F S S Y A I S W V R Q
A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F L A R V T I T A D E S T S T A
Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R E K G W N Y F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号387)

H C D R 1 : R G T F S S Y A (配列番号388)

H C D R 2 : I I P I F G T A (配列番号389)

H C D R 3 : A R E K G W N Y F D Y (配列番号390)

【0808】

L C V R (V_L) ヌクレオチド配列

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A C C T T C C G T G T C T G C A
T C T G T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G T C G G G C G A G T C
A G G G T A T T A G C A G C T G G T T A G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C
A G G G A A A G C C C C T A A A C T C C T G A T C T A T G C T G C A T C C A G T
T T G C A A A G T G G G G T C C C A T C A A G G T T C A G C G G C A G T G G A T
C T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G C C T G C A G C C
T G A A G A T T T T G C A A C T T A C T A T T G T C A A C A G G C T A A C A G T
T T C C C T C G G A C G T T C G G C C A A G G G A C C A A G G T G G A A A T C A
A A (配列番号391)

【0809】

L C V R (V_L) アミノ酸配列

D I Q M T Q S P P S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P R T F G Q G T K V E I K (配列番号392)

L C D R 1 : Q G I S S W (配列番号393)

L C D R 2 : A A S (配列番号394)

L C D R 3 : Q Q A N S F P R T (配列番号395)

【0810】

12816B

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

C A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T G G T C A A G
C C T G G A G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C A C C T T C A G T G A C T A C T A C A T G A A C T G G A T C C G C C A G G C
T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G G T T T C A T A C A T T A G T A G T
A G T G G G A C T A C C A T A T A C T A C G C A G A C T C T G T G A A G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G G G A C A A C G C C A A G A A A T C A C T G T A
T C T G G A G A T G A A C A G C C T C A G A G C C G A G G A C A C G G C C G T G
T A C T A C T G T G C G A G A G A G G G G T A C G G T A A T G A C T A C T A T T
A C T A C G G T A T A G A C G T C T G G G G C C A A G G G A C C A C G G T C A C
C G T C T C C T C A (配列番号396)

【0811】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

Q V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y Y M N W I R Q
A P G K G L E W V S Y I S S S G T T I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K K S L
Y L E M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G Y G N D Y Y Y Y G I D V W G Q G T T V
T V S S (配列番号 397)

H C D R 1 : G F T F S D Y Y (配列番号 398)

H C D R 2 : I S S S G T T I (配列番号 399)

H C D R 3 : A R E G Y G N D Y Y Y Y G I D V (配列番号 400)

[0812]

L C V R (V_L) ヌクレオチド配列

G A T A T T G T G A T G A C T C A G T C T C C A C T C T C C C T G C C C G T C
A C C C C T G G A G A G C C G G C C T C C A T C T C C T G C A G G T C T A G T C
A G A G C C T C C T G C A T G G T A A T G G A T A C A A C T A T T T G A C T T G
G T A C C T G C A G A A G C C A G G G C A G T C T C C A C A G C T C C T G A T C
T A T T T G G G T T C T A A T C G G G C C T C C G G G G T C C C T G A C A G G T
T C A G T G G C A G T G G A T C A G G C A C A G A T T T T A C A C T G A A A A T
A A G C A G A G T G G A G G C T G A G G A T G T T G G G G T T T A T T A C T G C
A T G C A A G C T C T A C A A A C T C C G T A C A C T T T T G G C C A G G G G A
C C A A G C T G G A G A T C A A A (配列番号 401)

[0813]

L C V R (V_L) アミノ酸配列

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H G N G Y N Y L T
W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K
I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P Y T F G Q G T K L E I K (配列番号 402)

L C D R 1 : Q S L L H G N G Y N Y (配列番号 403)

L C D R 2 : L G S (配列番号 404)

L C D R 3 : M Q A L Q T P Y T (配列番号 405)

[0814]

1 2 8 3 3 B

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

C A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C G T G G T C C A G
C C T G G G A G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C A C C T T C A G T A G C T T T G G C A T G C A C T G G G T C C G C C A G G C
T C C A G G C A A G G G G C T G G A G T G G G T G A T A T T T A T A T C A T A T
G A T G G A A G T G A T A A A T A C T A T G C A G A C T C C G T G A A G G G C C
G A T T C G C C A T C T C C A G A G A C A G T T C C A A G A A C A C G C T A T A
T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C T G A G G A C A C G G C T G T G
T A T T A C T G T G C G A A A G A A A A C G G T A T T T T G A C T G A T T C C T
A C G G T A T G G A C G T C T G G G G C C A A G G G A C C A C G G T C A C C G T
C T C C T C A (配列番号 406)

[0815]

H C V R (V_H) アミノ酸配列

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S F G M H W V R Q
A P G K G L E W V I F I S Y D G S D K Y Y A D S V K G R F A I S R D S S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K E N G I L T D S Y G M D V W G Q G T T V T
V S S (配列番号 407)

H C D R 1 : G F T F S S F G (配列番号 408)

H C D R 2 : I S Y D G S D K (配列番号 409)

H C D R 3 : A K E N G I L T D S Y G M D V (配列番号 410)

10

20

30

40

50

【0816】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGGCAAGTCA
AGAGCATTTAGCAGCTATTTTAAATTGGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ACCCCTCCGATCACCTTCGGGCCAAGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号411)

10

【0817】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号412)

LCDR1: QSISSY (配列番号413)

LCDR2: AAS (配列番号414)

LCDR3: QQSYSTPPIT (配列番号415)

20

【0818】

12834B

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAAG
CCTGGGGGCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTT
ACACCTTTTACCAGCTATGGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGC
CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGTGTTT
TACCATGGTAACACAAACTATGCACAGAAAGTTCCAGGGCA
GAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTA
CATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGGCCGTG
TATTACTGTGCGAGAGAGGGGTATTACGATTTTGTGGAGTG
GTTATTACCCTTTTGACTACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGT
CACCGTCTCCTCA (配列番号416)

30

【0819】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFSTSYGISWVRQ
APGQGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTA
YMELRSLRSDDTAVYYCAREGYDFWSGYYPFDYWGQGTL
VTVSS (配列番号417)

HCDR1: GYTFSTSYG (配列番号418)

HCDR2: ISVYHGNT (配列番号419)

HCDR3: AREGYDFWSGYYPFDY (配列番号420)

40

【0820】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGGCAAGTCA
AGAGCATTTAGCAGCTATTTTAAATTGGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT

50

ACCCCTCCGATCACCTTCGGGCCAAGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号 421)

【0821】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 422)

LCDR1: QSISSY (配列番号 423)

LCDR2: AAS (配列番号 424)

LCDR3: QQSYSTPPIT (配列番号 425)

10

【0822】

12835B

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTGATACAA
CCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCTCTGGAT
TCACCTTCAGAAATTATGAAATGAATTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGGCTGGAGTGGGTTTTCATATATTAGTAGT
AGTGGTAATATGAAAGACTACGCAGAGTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAATTCACTGCA
GCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCTGAGGACACGGCTGTT
TATTACTGTGCGAGAGACGAGTTTCTCTTACGGAATGGACG
TCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCA (配列番号
426)

20

【0823】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTRFRNYEMNWVRQ
APGKGLEWVSYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNVKNSL
QLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 427)

HCDR1: GFTFRNVE (配列番号 428)

HCDR2: ISSSGNMK (配列番号 429)

HCDR3: ARDEFPGMDV (配列番号 430)

30

【0824】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGGCAAGTC
AGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ACCCCTCCGATCACCTTCGGGCCAAGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号 431)

40

【0825】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 432)

LCDR1: QSISSY (配列番号 433)

LCDR2: AAS (配列番号 434)

50

LCDR3 : QQSYSTPPIT (配列番号 435)

[0826]

12847B (REGN17083 抗 hTfR Fab ; REGN17077 抗 hTfR scFv ; REGN16826 抗 hTfR scFv : hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTGGTTTCAG
CCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTGATGATTATGCCATGAACCTGGGTCCGGCAAGC
TCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
AGTAGTGGTAGCATGGACTATGCGGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAAACTCCCTGTA
TCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACGGCCTTA
TATTACTGTGCAAAAGCTAGGGGAAGTTGGAGACTACTACG
GTATGGACGTCTGGGGGCCAAGGGGACCAACGGTCAACCGTCTC
CTCA (配列番号 436)

10

[0827]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMNWVRQ
APGKGLEWVSGISWSSGSM DYADSVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTV
SS (配列番号 437)

20

HCDR1 : GFTTFDDYA (配列番号 438)

HCDR2 : ISWSSGSM (配列番号 439)

HCDR3 : AKAREVGDYYGMDV (配列番号 440)

[0828]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGGCAAGTC
AGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ACCCCTCCGATCACCTTCGGGCCAAGGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号 441)

30

[0829]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 442)

40

LCDR1 : QSISSY (配列番号 443)

LCDR2 : AAS (配列番号 444)

LCDR3 : QQSYSTPPIT (配列番号 445)

[0830]

12848B (REGN16827 抗 hTfR scFv : hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTGGTACAG
CCTGGCAGGTCCCTGACACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTGATAATTTTGGCATGCACTGGGTCCGGCAAGG
TCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGGTCTTACTTGG

50

A A T A G T G G T G T C A T A G G C T A T G C G G A C T C T G T G A A G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A C G C C A A G A A C T C C C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G T C T G A G A C C T G A G G A C A C G G C C T T A
T A T T A C T G T G C A A A A G A T A T A C G G G A A T T A C G G C C C C T T T G
A C T A C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A (配
列番号 4 4 6)

【0831】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L T L S C A A S G F T F D N F G M H W V R Q
G P G K G L E W V S G L T W N S G V I G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L
Y L Q M N S L R P E D T A L Y Y C A K D I R N Y G P F D Y W G Q G T L V T V S S
(配列番号 4 4 7)

10

H C D R 1 : G F T F D N F G (配列番号 4 4 8)

H C D R 2 : L T W N S G V I (配列番号 4 4 9)

H C D R 3 : A K D I R N Y G P F D Y (配列番号 4 5 0)

【0832】

L C V R (V_L) ヌクレオチド配列

G A A A T T G T G T T G A C G C A G T C T C C A G G C A C C C T G T C T T T G
T C T C C A G G G G A A A G A G C C A C C C T C T C C T G C A G G G C C A G T C
A G A G T G T T A G C A G C A G C T A C T T A G C C T G G T A C C A G C A G A A
A C C T G G C C A G G C T C C C A G G C T C C T C A T C T A T G G T G C A T C C
A G C A G G G C C A C T G G C A T C C C A G A C A G G T T C A G T G G C A G T G
G G T C T G G G A C A G A C T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G A C T G G A
G C C T G A A G A T T T T G C A G T G T A T T A C T G T C A G C A G T A T G G T
A G C T C A C C T T G G A C G T T C G G C C A A G G G A C C A A G G T G G A A A
T C A A A (配列番号 4 5 1)

20

【0833】

L C V R (V_L) アミノ酸配列

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q
K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L
E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K (配列番号 4 5 2)

30

L C D R 1 : Q S V S S S Y (配列番号 4 5 3)

L C D R 2 : G A S (配列番号 4 5 4)

L C D R 3 : Q Q Y G S S P W T (配列番号 4 5 5)

【0834】

1 2 8 4 3 B (REGN17075 抗 h T f R s c F v ; REGN16824 抗 h T
f R s c F v : h G A A ; REGN17081 抗 h T f R F a b)

H C V R (V_H) ヌクレオチド配列

G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T A G T A C A G
C C T G G A G G G T C C C T A A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C A C C T T C A A T A T T T T T G A A A T G A A C T G G G T C C G C C A G G C
T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G A T T T C C T A C A T T A G T A G T
C G T G G A A C T A C C A C A T A C T A C G C A G A C T C T G T G A G G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A C G C C A A G A A C T C A C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C T G T T
T A T T A C T G T G C G A G A G A T T A T G A A G C A A C A A T C C C T T T T G
A C T T C T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A (配
列番号 4 5 6)

40

【0835】

H C V R (V_H) アミノ酸配列

50

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQ
APGKGLEWISYISSRGTTTTYYADSVRGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLR AEDTAVYYCARDYEATIPFD FWGQG GTLVTVSS
(配列番号 457)

HCDR1: GFTFNIFE (配列番号 458)

HCDR2: ISSRGTTTT (配列番号 459)

HCDR3: ARDYEATIPFDF (配列番号 460)

[0836]

LCVR(V_L)ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGGCAAGTC
AGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGC AACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号 461)

10

[0837]

LCVR(V_L)アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 462)

20

LCDR1: QSISSY (配列番号 463)

LCDR2: AAS (配列番号 464)

LCDR3: QQSYSTPPIT (配列番号 465)

[0838]

12844B

HCVR(V_H)ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGAAGTGTTGGTACGG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCTCTGGAT
TCACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGA
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGG
AATGGTGATAGAACAAATTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCATCATTTTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCTGTGTA
TCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCGGAGGACTCGGCCCTTG
TATCACTGTGCGAGAGATCAGGGACTCGGAGTGGCAGCTA
CCCTTGACTACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTC
CTCA (配列番号 466)

30

[0839]

HCVR(V_H)アミノ酸配列

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGM SWVRQ
DPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNANKNSV
YLQMNSLR AEDSALYHCARDQGLGV AATLDYWGQG GTLVTV
SS (配列番号 467)

40

HCDR1: GFTFDDYG (配列番号 468)

HCDR2: INWNGDRT (配列番号 469)

HCDR3: ARDQGLGV AATLDY (配列番号 470)

[0840]

LCVR(V_L)ヌクレオチド配列

50

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A
T C T G T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C C G G G C A A G T C
A G A G C A T T A G C A G C T A T T T A A A T T G G T A T C A G C A G A A A C C
A G G G A A A G C C C C T A A G C T C C T G A T C T A T G C T G C A T C C A G T
T T G C A A A G T G G G G T C C C G T C A A G G T T C A G T G G C A G T G G A T
C T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G T C T G C A A C C
T G A A G A T T T T G C A A C T T A C T A C T G T C A A C A G A G T T A C A G T
A C C C C T C C G A T C A C C T T C G G C C A A G G G A C A C G A C T G G A G A
T T A A A (配列番号 471)

[0841]

10

LCVR (V_L) アミノ酸配列

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P I T F G Q G T R L E I K (配列番号 472)

LCDR1: Q S I S S Y (配列番号 473)

LCDR2: A A S (配列番号 474)

LCDR3: Q Q S Y S T P P I T (配列番号 475)

[0842]

12845B (REGN17082 Fab; REGN17076 scFv; REG
N16825抗hTfR scFv: hGAA)

20

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T G G T A C A G
C C T G G A G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T
T C A C C G T C A G T A A T T A T G A A A T G A A C T G G G T C C G C C A G G C
T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G G T T T C A T A C A T T A G T A G T
A G T A C C A G T A A C A T A T A C T A C G C A G A C T C T G T G A A G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A C G C C G A G A A C T C A C T G T A
T C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A G T C G A G G A C A C G G C T G T T
T A T T A C T G T G T G A G A G A T G G G A T T G T A G T A G T T C C A G T T G
G T C G T G G A T A C T A C T A T T A C G G T T T G G A C G T C T G G G G C C A
A G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C T C A (配列番号 476)

30

[0843]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T V S N Y E M N W V R Q
A P G K G L E W V S Y I S S S T S N I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A E N S L
Y L Q M N S L R V E D T A V Y Y C V R D G I V V V P V G R G Y Y Y Y G L D V W G
Q G T T V T V S S (配列番号 477)

HCDR1: G F T V S N Y E (配列番号 478)

HCDR2: I S S S T S N I (配列番号 479)

HCDR3: V R D G I V V V P V G R G Y Y Y Y G L D V (配列番号 480)

40

[0844]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A
T C T G T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C C G G G C A A G T C
A G A G C A T T A G C A G C T A T T T A A A T T G G T A T C A G C A G A A A C C
A G G G A A A G C C C C T A A G C T C C T G A T C T A T G C T G C A T C C A G T
T T G C A A A G T G G G G T C C C G T C A A G G T T C A G T G G C A G T G G A T
C T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G T C T G C A A C C
T G A A G A T T T T G C A A C T T A C T A C T G T C A A C A G A G T T A C A G T
A C C C C T C C G A T C A C C T T C G G C C A A G G G A C A C G A C T G G A G A

50

TTAAA (配列番号 481)

[0845]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 482)

LCDR1: QSISSY (配列番号 483)

LCDR2: AAS (配列番号 484)

LCDR3: QQSYSTPPIT (配列番号 485)

[0846]

12839B (REGN17080 Fab; REGN17074 scFv; REG
N16822 抗 hTfR scFv: hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG
CCTGGAAGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGGAT
TCCCCCTTTAGTAATTATGTCATGTATTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCTCTTATTTTTTTT
GACGGAAAGAAAAACTATCATGCAAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATTAACCAGAGACAATTCCAAAAATATGTTATA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACGCGGCTGTG
TATTACTGTGCGAAAATCCATTGTCTTAATGGTGTATGTT
ACAAGGGGTATTACGGAATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 486)

[0847]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQ
APGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNML
YLMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQG
TSTVTVSS (配列番号 487)

HCDR1: GFPFSNYV (配列番号 488)

HCDR2: IFFDGKKN (配列番号 489)

HCDR3: AKIHCPNGVCYKGYYGMDV (配列番号 490)

[0848]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGGCAAGTC
AGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号 491)

[0849]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 492)

LCDR1: QSISSY (配列番号 493)

LCDR2: AAS (配列番号 494)

10

20

30

40

50

LCDR3 : QQSYSTPPIT (配列番号 495)

[0850]

12841B (REGN16823抗hTfR scFv : hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG
CCTGGGGGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGTCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTAGTAACCTATTGGATGAACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAATATAAAAGAA
GATGGAGGTAAGAAATTGTATGTGGACTCTGTGAAGGGGCC
GATTCAACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTT
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTG
TATTATTGTGCGAGAGAAGATACAACCTTTGGTTGTGGACT
ACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAC
GGTCAACCGTCTCCTCA (配列番号 496)

10

[0851]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQ
APGKGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNANKNSL
FLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDVWGQG
TFTVSS (配列番号 497)

20

HCDR1 : GFTFSNYW (配列番号 498)

HCDR2 : IKEDGGKK (配列番号 499)

HCDR3 : AREDTTLVVDYYYYGMDV (配列番号 500)

[0852]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTC
AGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGTCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT
ACCCCTCCGATCACCTTCGGGCCAAGGGACACGACTGGAGA
TTAAA (配列番号 501)

30

[0853]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (配列番号 502)

LCDR1 : QSISSY (配列番号 503)

LCDR2 : AAS (配列番号 504)

LCDR3 : QQSYSTPPIT (配列番号 505)

40

[0854]

12850B (REGN16828抗hTfR scFv : hGAA)

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAAG
CCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAG
GCACCTTCAACACCTATGCTATCACCTGGGTGCGACAGGC
CCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGGGGAATCATCCCT
ATCTCTGGCATAGCAGAGTACGCACAGAAAGTTCCAGGGCA

50

GAGTCACGATCACCCACGGATGACTCCTCGACCAACAGCCTA
CATGGAACCTGAACAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTG
TATTACTGTGCGAGCTGGAACCTACGCACCTCTACTACTTCT
ACGGTATGGACGTCTGGGGGCCGAGGGACCAACGGTCAACCGT
CTCCTCA (配列番号506)

【0855】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQ
APGQGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTTDDSSSTTA
YME LNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGM DVWGRGTTVT
VSS (配列番号507)

10

HCDR1:GGTFNTYA (配列番号508)

HCDR2:IIPISGIA (配列番号509)

HCDR3:ASWNYALYYFYGM DV (配列番号510)

【0856】

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

GAAATTGTGTTGACGCGAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTTTG
TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCGAGGGGCCAGTC
AGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCCTGGTACCAGCAGAA
ACCTGGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTG CATCC
AGCAGGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA
GCCTGAAGATTTTGCAGTGTTATTACTGT CAGCAGTATGGT
AGCTCACCTTGGACGTTTCGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAA
TCAAA (配列番号511)

20

【0857】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQG TKVEIK (配列番号512)

30

LCDR1:QSVSSSY (配列番号513)

LCDR2:GAS (配列番号514)

LCDR3:QQYGS SPWT (配列番号515)

【0858】

69261

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAG
CCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGAGCCCTCTGGAT
TCACCTTTCAGTGTCATTACATGAACCTGGATCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCCTGGAGTGGGTTTTCATACATTAGTAGT
AGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTA
TCTCCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGTA
TATTACTGTGGGAGAGAAGGGGTATAGTGGGACTTATTCTT
ATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAACGGTCA
CGTCTCCTCA (配列番号516)

40

【0859】

HCVR (V_H) アミノ酸配列

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQ
APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSL

50

Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C G R E G Y S G T Y S Y Y G M D V W G Q G T T V
T V S S (配列番号 517)

HCDR1: G F T F S V Y Y (配列番号 518)

HCDR2: I S S S G S T I (配列番号 519)

HCDR3: G R E G Y S G T Y S Y Y G M D V (配列番号 520)

[0860]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

G A T A T T G T G A T G A C T C A G T C T C C A C T C T C C C T G C C C G T C
A C C C C T G G A G A G C C G G C C T C C A T C T C C T G C A G G T C T A G T C
A G A G C C T C C T G C A T A G T A A T G G A T A C A A C T A T T T G G A T T G
G T A C C T G C A G A A G C C A G G G C A G T C T C C A C A G T T C C T G A T C
T A T T T G G G T T C T A A T C G G G C C T C C G G G G T C C C T G A C A G G T
T C A G T G G C A G T G G A T C A G G C A C A G A T T T T A C A C T G A A A A T
C A A C A G A G T G G A G G C T G A G G A T G T T G G G G T T T A T T A C T G C
A T G C A A G C T C T A C A A A C T C C G T A C A C T T T T G G C C A G G G G A
C C A A G C T G G A G A T C A A A (配列番号 521)

10

[0861]

LCVR (V_L) アミノ酸配列

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D
W Y L Q K P G Q S P Q F L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K
I N R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P Y T F G Q G T K L E I K (配列番号 522)

20

LCDR1: Q S L L H S N G Y N Y (配列番号 523)

LCDR2: L G S (配列番号 524)

LCDR3: M Q A L Q T P Y T (配列番号 525)

69263

[0862]

HCVR (V_H) ヌクレオチド配列

G A A G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G G T T G G T A C A G
C C T G G C A G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G T C T C T G G A T
T C A C C T T T G A T G A T T A T G C C A T G C A C T G G G T C C G G C A A G C
T C C A G G G A A G G G C C T G G A G T G G G T C T C A G G T A T T A G T T G G
A A T A G T G G T A C C A G A G G A T A T G C G G A C T C T G T G A A G G G C C
G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A C G C C A A G A A C T C C C T G T A
T C T G C A A A T G A A C A G T C T G A G A G G T G A G G A C A C G G C C T T G
T A T T A C T G T G T A A A A G A T A T T A C G A T A T C C C C C A A C T A C T
A C G G T A T G G A C G T C T G G G G C C A A G G G A C C A C G G T C A C C G T
C T C C T C A (配列番号 526)

30

[0863]

HCVR (V_H) アミノ酸配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A V S G F T F D D Y A M H W V R Q
A P G K G L E W V S G I S W N S G T R G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L
Y L Q M N S L R G E D T A L Y Y C V K D I T I S P N Y Y G M D V W G Q G T T V T
V S S (配列番号 527)

40

HCDR1: G F T F D D Y A (配列番号 528)

HCDR2: I S W N S G T R (配列番号 529)

HCDR3: V K D I T I S P N Y Y G M D V (配列番号 530)

[0864]

LCVR (V_L) ヌクレオチド配列

G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T C T G C A

50

TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTTGCCGGGCGAGTCA
AGGACATTAGCCATTATTCAGCCTGGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAACTTCTTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACT
TTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCTCTCTCAACCAACCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGT
GTCCCTCTCACTTTTCGGCGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA
AA (配列番号531)

【0865】

LCVR (V_L) アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQDISHYSAWYQQK
PGKLPNLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTSSSLQ
PEDVATYYCQKYNQSVPLTFGGGTKEIK (配列番号532)

LCDR1: QDISHY (配列番号533)

LCDR2: AAS (配列番号534)

LCDR3: QKYNQSVPLT (配列番号535)

【0866】

10

20

30

40

50

【表 30-1】

表 30 融合タンパク質中の抗 h T f R s c F v 分子

抗体 クローン	配列 番号	アミノ酸配列 (Vk-3xG4S-Vh)
12795B	538	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAA SSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGKTK VEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTS YDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNRSNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGGGTLVTVSS
12798B	539	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGS SSRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGGG TKLEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSRLRLSCAASGFTF DDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNNAKNFL YLQMNSLRSEDTALYHCAKMDISLGYGLDVWGGGTTVTVSS
12799B	540	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPPELLIYAA SSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGGGT KVEIKGGGGSGGGSGGGGSGITLKESGPTLVKPTQLTLTCTFSGFSLST SGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNHDKRYSPLSGSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATYYCAHYSGSYSYYYGLDVWGGGTTVTVSS
12801B	541	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGKTK VEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESAGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTS YAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNRSRDTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARSHDYGAFFDYWGGGTLVTVSS
12802B	542	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVA STRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGGGKTK LEIKGGGGSGGGSGGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YFMSWIRQAPGKGLEWVSYSSTGSTINYADSVKGRFTISRDNVKNLSLYLQ MTSLRVEDTAVYYCTRDNWNIEYWGQGTTLVTVSS
12808B	543	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIKNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAA SSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTINNLPEDFATYYCLSHNSYPWTFGGGT KVEIKGGGGSGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGESIS SNTYYWGWRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYPNPSLKSRTVISVDTSRNHFS LRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYYGYGMDVWGGGTTVTVSS
12812B	544	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGGGT KVEIKGGGGSGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASRGTF SSYAISWVRQAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKFLARVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAREGWNYYFDYWGGGTLVTVSS
12816B	545	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNGNYLTWYLGKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYT FGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDYYMNVIRQAPGKGLEWVSYSISSGTTIYYADSVKGRFTISRDNNAK SLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYGYGIDVWGGGTTVTVSS
12833B	546	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGGGT RLEIKGGGGSGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS SFGMHVVRQAPGKGLEWVIFISYDGSDDKYADSVKGRFAISRDSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMVWGGGTTVTVSS
12834B	547	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGGGT RLEIKGGGGSGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT SYGISWVRQAPGGGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLSRSDDTAVYYCAREGYDFWGGYYPFDYWGGGTLVTVSS
12835B	548	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGGGT RLEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFR NYEMNWVRQAPGKGLEWVSYSISSGNMKDYAESVKGRFTISRDNVKNLSL QLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMVWGGGTTVTVSS

10

20

30

40

【0867】

【表 30 - 2】

(表 30 の続き)

抗体 クローン	配列 番号	アミノ酸配列 (Vk-3xG4S-Vh)
12839B	549	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFPFS NYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNMLY LQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYGMDVWVGQGTITVTVSS
12841B	550	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFS NYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRPEDTAVYYCAREDTTLVVDYVYGGMDVWVGQGTITVTVSS
12843B	551	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFN IFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPDFWVGQGTITVTVSS
12844B	552	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGSVVRPGRSLRLSCEASGFTFD DYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNAKNSVY LQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTITVTVSS
12845B	553	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTVS NYEMNWVRQAPGKGLEWVSYSSTSTNIYYADSVKGRFTISRDNKAENSLYL QMNSLRVEDTAVYYCVRDGIIVVPVGRGYVGLDVWGQGTITVTVSS
12847B	554	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFD DYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLMNSLRTEALYYCAKAREVGDYVGMVWVGQGTITVTVSS
12848B	555	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTF DNFGMHVVRQGPVKGLEWVSGLTWNVSGVIGYADSVKGRFTISRDNAKNS LYLMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFVWVGQGTITVTVSS
12850B	556	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSKASGGT FNTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITDDSDSTTAYM ELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMVWVWGRGTTVTVSS
31863B	557	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGSISSYLNWYQQKPGKVPKLLIYAA TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFNS YAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNKSKTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGGAARRMEYFQHWGQGTITVTVSS
31874B	558	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGSISSYLNWYQQKPGKVPNLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPLTFGGGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFS SYAMTWVRQAPGKGLEWVSISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGGGAARRMEYFQYWGQGTITVTVSS
69261	559	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQF LIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGYYCMQALQTPYT FGQGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVSGGGVVPGRSLRLSCAAS GFTFSVYYMNWVRQAPGKGLEWVSYSISSGSTIYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYGMVWVGQGTITVTVSS

10

20

30

40

【0868】

50

【表 30-3】

(表 30 の続き)

抗体 クローン	配列 番号	アミノ酸配列 (Vk-3xG4S-Vh)
69263	560	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDVATYYCQKYNVPLTFGGGT KVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFD DYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGTRGYADSVKGRFTISRDNANKSLY LQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGGGTTVTVSS
69305	561	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGT VEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYYADSVKGRFTISRDISKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGGGTLTVSS
69307	562	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGGGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFS NYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNANKSLY LQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYVVVVVMDVWGGGTTVTVSS
69323	563	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGT VEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGRSLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNANKSLHL QMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGYYGMDVWGGGTTVTVSS
69326	564	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLIYSA SSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGGGTK VEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSS YEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVSGVFLFDVWGGGTMVTVSS
69329	565	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGGGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNANKSLY LQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYVVVVVMDVWGGGTTVTVSS
69331	566	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGT VEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVQPGRSLRLSCIASGFTFSV YGIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNIKHYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQ INSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGGGTMVTVSS
69332	567	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTK VDIKGGGSGGGGSGGGGSGVTLRESGPALVKPSQTLTLCTFSGFSNLTY GMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVL MTNMDPVDATYYCARGHNNLNYIIHWGGGTLTVSS
69340	568	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIHV SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFVYYCQQRSDWPITFGGGTR LEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGRSLRLSCAASGFTFDD KAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNANKSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWGGLDVWGGGTTVTVSS
69348	569	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI RNVLGWYQQKPGKAPRLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGT KVEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFT TYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYYGDSVKGRFTISRDNANKNTLY LQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFYWGGLTVTVSS

10

20

30

40

【0869】

抗 h T f R : G A A 融合タンパク質中の抗 h T f R F a b の重鎖及び軽鎖

(1) 31874B

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGSISSNYLAWYQQK
PGKVPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDVATYYCQKYN SAPLTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ

50

GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 603)

【0870】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSSYAMTWVRQ
APGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
Y LQMNSLRAEDTAVYYCAKGGGAARRMEYFQYWGQG GTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 604)

【0871】

(2) 31863B

Fab 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASIGDRVITITCRASQGINSNYLAWYQQK
PGKVPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGSGTDFTLTIS SLQ
PEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 605)

【0872】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQ
APGKGLEWVSFI GGSTGNTYYAGSVKGRFTISSD NSKKTL
Y LQMNSLRAEDTAVYYCAKGGGAARRMEYFQHWGQG GTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 606)

【0873】

(3) 69348

Fab 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGD RVITITCRASQSIRNV LGWFQQK
PGKAPQRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGSGTEFTLTIS SLQ
PEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 607)

【0874】

Fab 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQ
APGKGLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTL
Y LQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGF D YWGQG GTLVTV
VSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 608)

【0875】

(4) 69340

Fab 軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIH D VSNRATGIPARFSGSGSGSGTDFTLTIS SLE
PEDFVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

10

20

30

40

50

QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 609)

【0876】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDKAMHWVRQ
VPGKGLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNANKNSL
YLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWGGLDVWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 610)

【0877】

(5) 69331

Fab 軽鎖

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCWAASQGISSYLAWEYQQK
PGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTAKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 611)

【0878】

Fab 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQ
APGKGLEWMAVISHDGNIKHAYADSVKGRFTISRDNASKNTL
YLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGTMVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 612)

【0879】

(6) 69332

Fab 軽鎖

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGI RNDLGWEYQQK
PGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 613)

【0880】

Fab 重鎖

QVTLRSGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWI
RQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQ
VVLTMNTNMDPVDATYYCARGHNNLNYYIHWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 614)

【0881】

(7) 69326

Fab 軽鎖

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWEYQQK
PGQAPRLLIYSASSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
SEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTAKVEIKRTVAAPSVFIFP

10

20

30

40

50

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 615)

【0882】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSSYEMNWVRQ
APGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLR AEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 616)

10

【0883】

(8) 69329

Fab 軽鎖

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIISSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCQKANSFPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 617)

20

【0884】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYWMTWVRQ
APGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY YYY YVMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 618)

【0885】

(9) 69323

Fab 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIISSYLNWYQQK
PGKAPKVLIIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 619)

30

【0886】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDN AENSL
HLQMNSLR AEDTALYYCARGGSTLV RGVKGGY YGMDVWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号
620)

40

【0887】

(10) 69305

Fab 軽鎖

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDRYLNWYRQK
PGKAPKLLIYTTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQ
PEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKS FNRGEC (配列番号 621)

【0888】

F a b 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMDHWVRQ
APGKGLEWVAVIWYDGSNKKYYADSVKGRFTISRDISKNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 622)

10

【0889】

(11) 69307

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSSVSASVGDRTITCRASQGGISSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQKADSLPYAFGQGQTKLEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKS FNRGEC (配列番号 623)

20

【0890】

F a b 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTTFSNYWMTWVRQ
APGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNAAKNSL
YLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY YYY YVMDVWGQGQT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 624)

30

【0891】

(12) 12795B

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGGIRDHF GWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSSLQ
PEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKS FNRGEC (配列番号 625)

40

【0892】

F a b 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQ
APGLGLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNNSRNTL
YLQMNSLR AEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 626)

50

【0893】

(13) 12798B (REGN17078)

F a b 軽鎖

EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQT VSSNLAWYQQK
PGQAPRL LIYGSSSRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSSLQ
SEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQG GTKLEIKRTVAAPS VFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 627)

【0894】

F a b 重鎖

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDN AKNFL
Y LQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLD VWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 628) ;

又は

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDN AKNFL
Y LQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLD VWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLG
TKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPLLQGS G (配列番号 667)

【0895】

(14) 12799B (REGN17079)

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG IASWLAWYQQK
PGKAPELLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSSLQ
PEDFAIYYCQQANYFPWTFGQG GTKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 629)

【0896】

F a b 重鎖

QITLKESGPTLVKPTQTLLTCTFSGFSLSTSGVGVVWI
RQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDT SKNQ
VVLTMNTNMDPVDATYYCAHYSGSYSYYYGLD VWGQGTT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 630)

); 又は

QITLKESGPTLVKPTQTLLTCTFSGFSLSTSGVGVVWI
RQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDT SKNQ
VVLTMNTNMDPVDATYYCAHYSGSYSYYYGLD VWGQGTT
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSS
LGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPLLQGS G

(配列番号 668)

【0897】

10

20

30

40

50

(15) 12801B

F a b 輕鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIRTDLGWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSSLR
PEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 631)

【0898】

F a b 重鎖

EVQLLES GGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQ
APGKGLEWVSSIRGSGGGTY SADSVKGRFTISRDN SRDTL
YLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFFFDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 632)

【0899】

(16) 12802B

F a b 輕鎖

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQK
PGQAPRLLIIFVASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQ
SEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGKLEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 633)

【0900】

F a b 重鎖

QVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFTFTSDYFM SWIRQ
APGKGLEWVSYISSTGSTIN YADSVKGRFTISRDNVKN SL
YLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWN YEYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 634)

【0901】

(17) 12808B

F a b 輕鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVINCRASQGIRNDLGWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTINN LQ
PEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGKTKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 635)

【0902】

F a b 重鎖

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGW I
RQPPGKGLEWIGSIDYSGTTN YNP SLKSRVTISVDTSRNH
FSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGN YGY YGM DVWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 636)

10

20

30

40

50

【0903】

(18) 12812B

F a b 輕鎖

DIQMTQSPPSVSA SVGDRVTITCRASQGGISSSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCQQANSFPRTFGQGKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号637)

【0904】

F a b 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQ
APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFLARVTITADESTSTA
YME LSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGGLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号638)

【0905】

(19) 12816B

F a b 輕鎖

DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCRSSQSLLHGNNGYNYLT
WYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVG VYYCMQALQTPYTFGQGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号639)

【0906】

F a b 重鎖

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQ
APGKGLEWVS YISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNACKKSL
YLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDY YYYGIDVWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号640)

【0907】

(20) 12833B

F a b 輕鎖

DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSIS SYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPS VFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号641)

【0908】

F a b 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQ
APGKGLEWVIFISYDGS D KY YADSVKGRFAISRDS SKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGM DVWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLG

10

20

30

40

50

T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H (配列番号 6 4 2)

【0909】

(21) 1 2 8 3 4 B

F a b 軽鎖

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P I T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 6 4 3)

10

【0910】

F a b 重鎖

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q
A P G Q G L E W M G W I S V Y H G N T N Y A Q K F Q G R V T M T T D T S T S T A
Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R E G Y Y D F W S G Y Y P F D Y W G Q G T L
V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E
P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S
L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H (配列番号 6 4 4
)

20

【0911】

(22) 1 2 8 3 5 B

F a b 軽鎖

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P I T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 6 4 5)

30

【0912】

F a b 重鎖

E V Q L V E S G G G L I Q P G G S L R L S C E A S G F T F R N Y E M N W V R Q
A P G K G L E W V S Y I S S S G N M K D Y A E S V K G R F T I S R D N V K N S L
Q L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R D E F P Y G M D V W G Q G T T V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H (配列番号 6 4 6)

【0913】

(23) 1 2 8 4 7 B (REGN17083)

F a b 軽鎖

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P I T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 6 4 7)

40

【0914】

F a b 重鎖

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M N W V R Q
A P G K G L E W V S G I S W S S G S M D Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L
Y L Q M N S L R T E D T A L Y Y C A K A R E V G D Y Y G M D V W G Q G T T V T V

50

SSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 648) ; 又
は

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMNWVRQ
APGKGLEWVSGISWSSGSM DYADSVKGRFTISRDN AKNSL
YLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQG GTT VTV
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGT
KTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPL LQGS G

10

(配列番号 669)

【0915】

(24) 12848B

Fab 軽鎖

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR L
EPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGT KVEIKRTVAAPS VFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 649)

20

【0916】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTTFDNFGMHWVRQ
GPGKGLEWVSGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDN AKNSL
YLQMNSLRPEDTALYYCAKD IRNYGPF D YWGQGT LVT VSS
ASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 650)

【0917】

(25) 12843B (REGN17081)

30

Fab 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGT RLEIKRTVAAPS VFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 651)

【0918】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFNIFEMNWVRQ
APGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDN AKNSL
YLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPDFDFWGQGT LVT VSS
ASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 652) ; 又
は

40

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFNIFEMNWVRQ
APGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDN AKNSL
YLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPDFDFWGQGT LVT VSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGT KT

50

YTCNV D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P L L Q G S G

(配列番号 670)

【0919】

(26) 12844B

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPS VFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 653)

10

【0920】

F a b 重鎖

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGM SWVRQ
DPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIIISRDNAKNSV
YLQMNSLR AEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 654)

20

【0921】

(27) 12845B (REGN17082)

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPS VFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 655)

30

【0922】

F a b 重鎖

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQ
APGKGLEWVSYISSSTSNIIYYADSVKGRFTISRDN AENSL
YLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGI VVVPVGRGYYY YGLDVWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番
号 656) ; 又は

40

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQ
APGKGLEWVSYISSSTSNIIYYADSVKGRFTISRDN AENSL
YLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGI VVVPVGRGYYY YGLDVWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTV
PSSSLGTQTYTCNV D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P L L Q G S G
(配列番号 671)

【0923】

(28) 12839B (REGN17080)

F a b 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPS VFIF

50

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 657)

【0924】

Fab 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQ
APGKGLEWVALIFFDGGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNML
YLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 658) ; 又は

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQ
APGKGLEWVALIFFDGGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNML
YLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS
SSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVEISKYGPPLQLGSG

(配列番号 672)

【0925】

(29) H1H12841B

Fab 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 659)

【0926】

Fab 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQ
APGKGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNACKNSL
FLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDVWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (配列番号 660)

【0927】

(30) 12850B

Fab 軽鎖

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
EPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 661)

【0928】

Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQ
APGQGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTDSSSTA

Y M E L N S L R S E D T A V Y Y C A S W N Y A L Y Y F Y G M D V W G R G T T V T
V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H (配列番号 662)

【0929】

(31) 69261

F a b 軽鎖

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D
W Y L Q K P G Q S P Q F L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K
I N R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P Y T F G Q G T K L E I K R T V A A P S
V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L
Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C
E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 663)

10

【0930】

F a b 重鎖

Q V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S V Y Y M N W I R Q
A P G K G L E W V S Y I S S S G S T I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C G R E G Y S G T Y S Y Y G M D V W G Q G T T V
T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P
V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L
G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H (配列番号 664)

20

(32) 69263

【0931】

F a b 軽鎖

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S H Y S A W Y Q Q K
P G K L P N L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F S L T T S S L Q
P E D V A T Y Y C Q K Y N S V P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q
G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 665)

30

【0932】

F a b 重鎖

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A V S G F T F D D Y A M H W V R Q
A P G K G L E W V S G I S W N S G T R G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L
Y L Q M N S L R G E D T A L Y Y C V K D I T I S P N Y Y G M D V W G Q G T T V T
V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H (配列番号 666)

【0933】

抗 T f R s c F V : G A A 配列 :

40

(1) 12795B

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R D H F G W Y Q Q K
P G K A P K R L I Y A A S S L H S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C L Q Y D T Y P L T F G G G T K V E I K G G G G S G G G G S G G
G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A T S G F T F T S Y D M K W V
R Q A P G L G L E W V S A I S G S G G N T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S R N
T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R S H D F G A F D Y F D Y W G Q G T L V
T V S S G G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D
K A I T Q E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S
Y K L E N L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T

50

ENRLHFTTIKDPANRRYEVPLET PHVHSRAPSPLYSVEFSE
EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQLQLSTSLPSQ
YITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH
PFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGG
ILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPPYWGLGFHL CR
WGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RDFT
FNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGSY
RPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTA
LAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEEDGCPN
NELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLY
GLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW TG
DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE
ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAM
RKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS
STWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDL
QTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTIN
VHLRAGYIIPPLQGGPLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARG
ELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSE
GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL
DICVSLLMGEQFLVSWC

10

20

(配列番号 675)

【0934】

(2) 12798B (REGN16818)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQTVSSNLAWYQQK
PGQAPRLLIYGSSSRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQ
SEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGDLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW
VRQAPGKGLEWVSGISWNSATR VYADSVKGRFTISRDN AK
NFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGT
TVTVSSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVPPNSRFDCA
PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY
PSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMM
ETENRLHFTTIKDPANRRYEVPLET PHVHSRAPSPLYSVEF
SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQLQLSTSLP
SQYITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYG
SHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPPYWGLGFHL
CRWGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RD
FTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAG
SYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNP
TALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEEDGC
PNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHN
LYGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW
TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNT
SEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQ
AMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPK
DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWY
DLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDT
INVHLRAGYIIPPLQGGPLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEA
RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVT

30

40

50

SEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTK
VL D I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 676)

【0935】

(3) 12799B (REGN16819)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIIASWLAWYQQK
PGKAPELLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSQITLKEGPTLVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVV
WIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLSGSRLTITKDTSK
NQVVL TMTNMDPVD TATYYCAHYSGSYSYYYGLDVWGQG
TTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFD C
APDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPS
YPSYKLENLSSSEM GYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVM
METENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVE
FSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSL
PSQYITGLAEHL SPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLY
GSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRS
TGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWGLGFH
LCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR R
DFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPA
GSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTN
PTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS EDG
CPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLH
NLYGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGH
WTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGN
TSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQ
QAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFP
KDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTW
YDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLD
TINVHLRAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT K GGE
ARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRV
TSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDT
KVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号 570)

【0936】

(4) 12801B

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGI RTDLGWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLR
PEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGGTKVEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLLES GGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWV
RQAPGKGLEWVSSIRGSGGGGTYSADSVKGRFTISRDN SRD
TLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFFDFDYWGQGT LV
TVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFD CAPD
KAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPS
YKLENLSSSEM GYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVM MET
ENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVE FSE
EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQ
YITGLAEHL SPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH
PFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGG

I L D V Y I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C R
W G Y S S T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F T
F N K D G F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P A G S Y
R P Y D E G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T A
L A W W E D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P N
N E L E N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L Y
G L T E A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G
D V W S S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E
E L C V R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M
R K A L T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S
S T W T V D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D L
Q T V P V E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I N
V H L R A G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R G
E L F W D D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S E
G A G L Q L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V L
D I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 677)

[0937]

(5) 12802B (REGN16820)

E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C R A S Q S V S I N L A W Y Q Q K
P G Q A P R L L I F V A S T R A T G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
S E D F A T Y Y C Q Q Y D I W P Y T F G Q G T K L E I K G G G G S G G G G S G G
G G S Q V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y F M S W I
R Q A P G K G L E W V S Y I S S T G S T I N Y A D S V K G R F T I S R D N V K N
S L Y L Q M T S L R V E D T A V Y Y C T R D N W N Y E Y W G Q G T L V T V S S G
G G G S G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D K A I T Q
E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S Y K L E N
L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T E N R L H
F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S E E P F G V
I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S Q Y I T G L
A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S H P F Y L A
L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G G I L D V Y
I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C R W G Y S S
T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F T F N K D G
F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P A G S Y R P Y D E
G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T A L A W W E
D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P N N E L E N
P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L Y G L T E A
I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G D V W S S
W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E E L C V R
W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M R K A L T
L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S S T W T V
D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D L Q T V P V
E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I N V H L R A
G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R G E L F W D
D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S E G A G L Q
L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V L D I C V S
L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 678)

[0938]

10

20

30

40

50

(6) 12808B

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVINCRA S QGIRNDLGWYQQK
PGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTINN LQ
PEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSQQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSENTYYWG
WIRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSR
NHFSRLRLRSVTAADTAVYYCAREWGN YGY YGMDVWGQGT
TVTVSSSGGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA
PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY
PSYKLENLSSSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM M
ETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF
SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLP
SQYITGLAEHLSP LMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYG
SHPFYLALEDGGSAHG VFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMPPPYWGLGFHL
CRWGYSSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RD
FTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAG
SYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNP
TALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGC
PNNEL ENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHN
LYGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW
TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNT
SEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQ
AMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPK
DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWY
DLQTPVVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPA PLDT
INVHLRAGYIIP LQGGPLTTTESRQQPMALAVALT KGGEA
RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVT
SEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTK
VLDICVSLLMGEQFLVSWC

10

20

30

(配列番号679)

【0939】

(7) 12812B (REGN16821)

DIQMTQSPSPSVSASVGDRTVITCRA S QGISSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSY AISWV
RQAPGQGLEWMMGGIIPIFGTANYAQKFLARVTITADESTS
TAYMELSSSLRSED TAVYYCAREKGN YFDYW GQGT LVTVS
SGGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA PDKAI
TQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPPSYPSYKL
ENLSSSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM METENR
LHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPF
GVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYIT
GLAEHLSP LMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFY
LALEDGGSAHG VFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILD
VYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMPPPYWGLGFHL CRWGY
SSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RDFTFNK
DGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGSYRPY
DEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNP TALAW

40

50

WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS E D G C P N N E L
ENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLT
EAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW TGDVW
SSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELC
VRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFS EPAQQAMRKA
LTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTW
TVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTV
PVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHL
RAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARGELF
WDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAG
LQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL D I C
V S L L M G E Q F L V S W C

10

(配列番号680)

【0940】

(8) 12816B

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNNGYNYLT
WYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGV PDRFS GSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVG VYYCMQALQTPYTFGQG G T K L E I K G G G G S G G
GSGSGSGSGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY
YMNWIRQAPGKGLEWVS YISSSGTTIYYADSVKGRFTISR
DNAKKS L Y L E M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G Y G N D Y Y Y Y G I D V
WGQGT T V T V S S G G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S
RFDCA PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWC F
FPPSYPSYKLENLSSSEM GYTATLT R T T P T F F P K D I L T L R
LDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAP SPL
YSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQL
STS L P S Q Y I T G L A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G
ANLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPAL
SWRSTGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWG
LGFHL CRWGYSSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYM
DSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS
SGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFP
DFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI R G
S E D G C P N N E L E N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H
Y N L H N L Y G L T E A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R
Y A G H W T G D V W S S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G
F L G N T S E E L C V R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S
E P A Q Q A M R K A L T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F
L E F P K D S S T W T V D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P
L G T W Y D L Q T V P V E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P
A P L D T I N V H L R A G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T
K G G E A R G E L F W D D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E
L V R V T S E G A G L Q L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y
S P D T K V L D I C V S L L M G E Q F L V S W C

20

30

40

(配列番号681)

【0941】

(9) 12833B

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIS SYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGSGTDFTLTIS SLQ
PEDFATY Y C Q Q S Y S T P P I T F G Q G T R L E I K G G G G S G G G G S G

50

GGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SFGMHW
VRQAPGKGLEWVIFISYDGS DKYYADSVKGRFAISR DSSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTD SYGMDVWGQGT
TVT VSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVP PNSRFDCA
PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY
PSYKLENLS SSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM
ETENRLHFTTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSP LYSVEF
SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLP
SQYITGLAEHLSP LMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYG
SHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP P YWGLGFHL
CRWGYSSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RD
FTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS SGPAG
SYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWP GSTAFPDFTNP
TALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGC
PNNEL ENPPYVPGVVGGT LQAATICASSHQFLSTHYNLHN
LYGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW
TGDVWSSWEQLASSVP EILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNT
SEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQ
AMRKALTLRYALLPHLYTLFHQA H VAGETVARPLFLEFPK
DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWY
DLQTPVVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDT
INVHLRAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEA
RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVT
SEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTK
VLDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号682)

[0942]

(10) 12834B

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIS SYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSG
GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYGISW
VRQAPGQG LEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTST
STAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGY YDFWSGYYPFDYW GQ
GTLVT VSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVP PNSRFD
CAPDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPP
SYPSYKLENLS SSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDV
MMETENRLHFTTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSP LYSV
EFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTS
LPSQYITGLAEHLSP LMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANL
YGSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWR
STGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP P YWGLGF
HLCRWGYSSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR
RDFTFNKGDFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS SGP
AGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWP GSTAFPDFT
NPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE D
GCPNNEL ENPPYVPGVVGGT LQAATICASSHQFLSTHYNL
HNLYGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAG
HWTGDVWSSWEQLASSVP EILQFNLLGVPLVGADVCGFLG

10

20

30

40

50

NTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPA
QQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEF
PKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGT
WYDLQTPVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPL
DTINVHLRAGYIIPPLQGPGGLTTTESRQQPMALAVALTCKGG
EARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVR
VTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPD
TKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号683)

【0943】

(11) 12835B

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNW
VRQAPGKGLEWVSYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNVK
NSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPGMDVWGQGTTTVTV
SSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVPPNSRFDCA PDKA
ITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSPSYPSYK
LENLSSSEMGTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVM METEN
RLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEP
FGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYI
TGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPF
YLALEDGGSAHGVFLSNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGIL
DVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPIYWGLGFHLCRWG
YSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RDFTFN
KDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGSYRP
YDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALA
WWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS EDGCPNNE
LENPPYVPGVVG GTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGL
TEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHWTGDV
WSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEEL
CVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRK
ALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSST
WTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQT
VPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVH
LRAGYIIPPLQGPGGLTTTESRQQPMALAVALTCKGG EARGEL
FWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA
GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPD TKVLDI
CVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号684)

【0944】

(12) 12839B (REGN16822)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFPFSNYVMYW
VRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSK
NMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVW
GQGTTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVPPNSR

10

20

30

40

50

FDCAPDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFF
PPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTTRTTPFTFFPKDILTLRL
DVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPPLY
SVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLS
TSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGA
NLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPAL S
WRSTGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP PPYWGL
GFHL CRWGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD
SRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS S
GPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPD 10
FTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS
EDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHY
NLHNL YGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RY
AGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGF
LGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSE
PAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFL
EFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPL
GTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPA
PLDTINVHLRAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT K
GGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNEL 20
VRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYS
PDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号571)

【0945】

(13) 12841B (REGN16823)

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIS SYL NWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGGRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSNYWMNW
VRQAPGKGLEWVANIKEDGGGKKLYVDSVKGRFTISRDN AK 30
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDY YYYGMDVWG
QGT TVTVSSGGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRF
DCAPDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFP
PSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTTRTTPFTFFPKDILTLRLD
VMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYS
VEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLST
SLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGA N
LYGSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPAL SW
RSTGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP PPYWGLG
FHL CRWGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD S 40
RRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS SG
PAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDF
TNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS E
DGC PNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHY N
LHNL YGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYA
GHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFL
GNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEP
AQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLE
FPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLG
TWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPA P 50

LDTINVHLRAGYIIP LQGPG LTTTESRQQPMALAVALT K G
GEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELV
RVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSP
DTKVL D I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 685)

【0946】

(14) 12843B (REGN16824)

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIS SYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGSGTDFTLTIS SLQ
PEDFATY YCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNW
VRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDN AK
NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPDFDFWGQGTLVT
VSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDK
AITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPPSYPSY
KLENLS SSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVMME TE
NRLHFTTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEE
PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQY
ITGLAEHLSP LMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH P
FYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGI
LDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWGLGFHL CRW
GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR R DFTF
NKDGF R DFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR
PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL
AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGC PNN
ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYG
LTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHWTGD
VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLV GADVCGFLGNTSEE
LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMR
KALT LRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS S
TWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ
TVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINV
HLRAGYIIP LQGPG LTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARGE
LFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELV RVTSEG
AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL D
I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 572)

【0947】

(15) 12844B

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIS SYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGSGTDFTLTIS SLQ
PEDFATY YCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGM SW
VRQDPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDN AK
NSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTL
VTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAP
DKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPPSYP
SYKLENLS SSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVMME
TENRLHFTTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS
EEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPS

QYITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTTPGANLYGSH
HPFYLALEDGGSAHGVFLSNSNAMDVVLQPSPALSWRSTG
GILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHLC
RWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSSRRDF
TFNKDGFDRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGS
YRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFFTNPT
ALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEEDGCP
NNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSSHQFLSTHYNLHNL
YGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGGRYAGHWT
GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTS
EELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQA
MRKALTTRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKD
SSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYD
LQTPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTI
NVHLRAGYIIPPLQGGPLTTTESRQQPMALAVALTCKGGEAR
GELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTS
EGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKV
LDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号686)

[0948]

(16) 12845B (REGN16825)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNW
VRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIIYYADSVKGRFTISRDAE
NSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGI VVVPVGRGYYYGLD
VWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGGSAHPGRPRAVPTQC
DVP PNSSRFDCA PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWC
FFPPSYPSYKLENLSSEMGTATLTTRTPTFFPKDILTL
RLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSP
LYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQ
LSTSLPSQYITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPT
TPGANLYGSHHPFYLALEDGGSAHGVFLSNSNAMDVVLQPS
PALSWRSTGGILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMP
YPWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWND
LDYMDSSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVD
PAISSSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPG
STAFPDFFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEP
SNFIRGSEEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASS
SHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVIS
RSTFAGHGGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLG
VPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLL
SLPQEPYSFSEPAQQA MRKALTTRYALLPHLYTLFHQA
HVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITP
VLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTPVEALGSLPPPPAAP
REPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPPLQGGPL
TTTESRQQPMALAVALTCKGGEAR GELFWDDGESLEV
LERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTS EGAGLQLQKVT
VLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL

LDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号 687)

【0949】

(17) 12847B (REGN16826)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMNW
VRQAPGKGLEWVSGISWSSGSM DYADSVKGRFTISRDN AK
NSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDY YGMDVWGQGTT
VTVSSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVP PNSRFD CAP 10
DKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY P
SYKLENLSSSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM ME
TENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSP LYSVEFS
E E PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPS
QYITGLAEHL SPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT P GANLYGS
HPFYLALEDGGSAHG VFLLNSNAMDVVLQP SPALSWRSTG
GILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP P YWGLGFHLC
RWGYSSTA ITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD SRRDF
TFNKDGF RDFPAMVQELHQGGRRYMMI V DPAISSSGPAGS
YRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAF P DFTNPT 20
ALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGC P
NNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL
YGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHWT
GDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVC GFLGNTS
EELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQE PYSFSEPAQQA
MRKALT LRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPL FLEFPKD
SSTWTV DHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFP L GTWYD
LQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSE GQWVTLPA PLDTI
NVHLRAGYI IPLQGPGLT TTESRQQPMALAVALT KGGGEAR
GELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTI VNELVRVTS 30
EGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYS PDTKV
LDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号 573)

【0950】

(18) 12848B (REGN16827)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR L
EPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQG TKVEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTTFDNFGMHW
VRQGP G KGLEWVSGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDN AK 40
NSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKD I RNYGPF D YWGQGTLVT
VSSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVP PNSRFD CAPDK
AITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSY
KLENLSSSEM GYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM ME TE
NRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSP LYSVEFSEE
PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQY
ITGLAEHL SPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT P GANLYGSH P
FYLALEDGGSAHG VFLLNSNAMDVVLQP SPALSWRSTGGI
LDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP P YWGLGFHLCRW
GYSSTA ITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD SRRDFTF 50

NKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGSYR
PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL
AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS EDGCPNN
ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYG
LTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW TGD
VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEE
LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMR
KALT LRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS S
TWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ
TVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINV
HLRAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARGE
LFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEG
AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPD TKVLD
ICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号688)

【0951】

(19) 12850B (REGN16828)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGSGTDFTLTISR L
EPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGGSG
GGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGT FNTYAITW
VRQAPGQG LEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTTDDSS
TTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGM DVWGRGT
TVT VSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVPPNSRFDCA
PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY
PSYKLENLSSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVM M
ETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF
SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLP
SQYITGLAEHL SPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYG
SHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWGLGFHL
CRWGYSSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RD
FTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAG
SYR PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNP
TALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGS EDGC
PNN ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHN
LYGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW
TGD VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNT
SEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQ
AMRKALT LRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPK
DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWY
DLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDT
INVHLRAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEA
RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVT
SEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPD TK
VLDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号689)

【0952】

(20) 31863B

DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQK

10

20

30

40

50

PGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGKVEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWV
RQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSSDNSKK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGGAARRMEYFQHWGQGTLV
TVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPD
KAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSPSPS
YKLENLSSSEMGYTATLTTRTTPTFPPKDI LTLRLDVMME
ENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE
EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQ
YITGLAEHLSPMLLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH
PFYLALEDGGSAHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGG
ILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHLCR
WGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFT
FNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGSY
RPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTA
LAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEEDGCPN
NELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSSHQFLSTHYNLHNL
GLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWG
DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE
ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAM
RKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS
STWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDL
QTPVVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTIN
VHLRAGYIIPPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARG
ELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSE
GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL
DICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号690)

[0953]

(21) 31874B

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGGSNYLAWYQQK
PGKVPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDVATYYCQKYN SAPLTFGGGKVEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWV
RQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGGAARRMEYFQYWGQGTLV
TVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPD
KAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSPSPS
YKLENLSSSEMGYTATLTTRTTPTFPPKDI LTLRLDVMME
ENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSE
EPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQ
YITGLAEHLSPMLLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH
PFYLALEDGGSAHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGG
ILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHLCR
WGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFT
FNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGSY
RPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTA
LAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEEDGCPN
NELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSSHQFLSTHYNLHNL

GLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW TG
DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE
ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAM
RKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS
STWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDL
QTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTIN
VHLRAGYIIPPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARG
ELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSE
GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYS PDTKVL
DICVSLLMGEQFLVSWC

10

(配列番号 691)

【0954】

(22) 69261

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLD
WYLQKPGQSPQFLIYLG SNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLK
INRVEAEDVG VY YCMQALQTPYTFGQG TKLEIKGGGGSGG
GGSGGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVY
YMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYS GTYSY YGMDV
WGQGTTTVTVSSGGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC DVP PNS
RFDCA PDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWC F
FPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLR
LDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAP SPL
YSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQL
STSLPSQYITGLAEHL SPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT PG
ANLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQP SPAL
SWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWG
LGFHL CRWGYSSSTAITRQVV ENMTRAHFPLDVQWNDLDYM
DSRRDFTTFNKDGF RDPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS
SGPAGSYR PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFP
DFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRG
SEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTH
YNLHNL YGLTEAIA SHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG R
YAGHW TG DVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCG
FLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFS
EPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLF
LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFP
LGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLP
APLDTINVHLRAGYIIPPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALT
KGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNE
LVRVTSE GAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTY
SPDTKVL DICVSLLMGEQFLVSWC

20

30

40

(配列番号 692)

【0955】

(23) 69263

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISHYSAWYQQK
PGKLPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTTSSSLQ
PEDVATY YCQKYN SVPLTFGGG GTKVEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWV
RQAPGKGLEWVSGISWNSGTRGYADSVKGRFTISR DNAKN

50

S L Y L Q M N S L R G E D T A L Y Y C V K D I T I S P N Y Y G M D V W G Q G T T
V T V S S G G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P
D K A I T Q E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P
S Y K L E N L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E
T E N R L H F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S
E E P F G V I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S
Q Y I T G L A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S
H P F Y L A L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G
G I L D V Y I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C
R W G Y S S T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F
T F N K D G F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P A G S
Y R P Y D E G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T
A L A W W E D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P
N N E L E N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L
Y G L T E A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T
G D V W S S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S
E E L C V R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A
M R K A L T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D
S S T W T V D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D
L Q T V P V E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I
N V H L R A G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R
G E L F W D D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S
E G A G L Q L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V
L D I C V S L L M G E Q F L V S W C

10

20

(配列番号 693)

【0956】

(24) 69305

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I D R Y L N W Y R Q K
P G K A P K L L I Y T T S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T L S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q S Y S P P L T F G G G T K V E I K G G G G S G G G G S G G
G G S Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V
R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D I S K N
T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A G Q L D L F F D Y W G Q G T L V T V S S
G G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D K A I T
Q E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S Y K L E
N L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T E N R L
H F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S E E P F G
V I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S Q Y I T G
L A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S H P F Y L
A L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G G I L D V
Y I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C R W G Y S
S T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F T F N K D
G F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P A G S Y R P Y D
E G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T A L A W W
E D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P N N E L E
N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L Y G L T E
A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G D V W S
S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E E L C V
R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M R K A L
T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S S T W T

30

40

50

VDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVP
VEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLR
AGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTCKGGEARGELFW
DDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEGAGL
QLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL D I C V
SLLMGEQFLVSWC

(配列番号 694)

[0957]

(25) 69307 (REGN16817)

DIQMTQSPSSSVSASVGDRTVITCRASQGGISSWLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYCYCQKADSLPYAFGQGKTLEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWV
RQAPGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNACKN
SLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDY Y Y Y Y VMDVWGQ
GTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC D V P P N S R F D
CAPDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPP
SYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP T F F P K D I L T L R L D V
MMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSV
EFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTS
LPSQYITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANL
YGSHPFYLALEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWR
STGGILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGF
HLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR
RDFTFNKGDFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGP
AGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFT
NPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSED
GCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNL
HNL YGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAG
HWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLG
NTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPA
QQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEF
PKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGT
WYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPL
DTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTCKG
EARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVR
VTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPD
TKVL D I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 695)

[0958]

(26) 69323 (REGN16816)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKVL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYCYCQQSYSIPLTFGGGKTKEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWV
RQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDN AEN
SLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLV RGVKGGY Y GMDVW
GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQC D V P P N S R
FDCAPDKAITQE QCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFF
PPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTP T F F P K D I L T L R L

D V M M E T E N R L H F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y
S V E F S E E P F G V I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S
T S L P S Q Y I T G L A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A
N L Y G S H P F Y L A L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S
W R S T G G I L D V Y I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L
G F H L C R W G Y S S T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D
S R R D F T F N K D G F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S
G P A G S Y R P Y D E G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D
F T N P T A L A W W E D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S
E D G C P N N E L E N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y
N L H N L Y G L T E A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y
A G H W T G D V W S S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F
L G N T S E E L C V R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E
P A Q Q A M R K A L T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L
E F P K D S S T W T V D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L
G T W Y D L Q T V P V E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A
P L D T I N V H L R A G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K
G G E A R G E L F W D D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L
V R V T S E G A G L Q L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S
P D T K V L D I C V S L L M G E Q F L V S W C

10

20

(配列番号 696)

【0959】

(27) 69326

E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C R A S Q S V S S N F A W Y Q Q K
P G Q A P R L L I Y S A S S R A T G I P V R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
S E D F A V Y Y C Q Q Y N I W P R T F G Q G T K V E I K G G G G S G G G G S G G
G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G F I F S S Y E M N W V
R Q A P G K G L E W V S Y I S S S G S T I F Y A D S V K G R F T I S R D N A K N
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V S G V V L F D V W G Q G T M V T V S S G
G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D K A I T Q
E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S Y K L E N
L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T E N R L H
F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S E E P F G V
I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S Q Y I T G L
A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S H P F Y L A
L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G G I L D V Y
I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C R W G Y S S
T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F T F N K D G
F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S S G P A G S Y R P Y D E
G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T A L A W W E
D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P N N E L E N
P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L Y G L T E A
I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G D V W S S
W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E E L C V R
W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M R K A L T
L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S S T W T V
D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D L Q T V P V
E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I N V H L R A
G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R G E L F W D
D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S E G A G L Q

30

40

50

L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V L D I C V S
L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 697)

【0960】

(28) 69329

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q K A N S F P Y T F G Q G T K L E I K G G G G S G G G G S G G
G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y W M T W V
R Q A P G K G L E W V A N I K E D G S E K D Y V D S V K G R F T I S R D N A K N
S L Y L Q M N S L R G E D T A V Y Y C A R D G E Q L V D Y Y Y Y Y V M D V W G Q
G T T V T V S S G G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D
C A P D K A I T Q E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P
S Y P S Y K L E N L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V
M M E T E N R L H F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V
E F S E E P F G V I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S
L P S Q Y I T G L A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L
Y G S H P F Y L A L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R
S T G G I L D V Y I F L G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F
H L C R W G Y S S T A I T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R
R D F T F N K D G F R D F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P
A G S Y R P Y D E G L R R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T
N P T A L A W W E D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D
G C P N N E L E N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L
H N L Y G L T E A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G
H W T G D V W S S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G
N T S E E L C V R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A
Q Q A M R K A L T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F
P K D S S T W T V D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T
W Y D L Q T V P V E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L
D T I N V H L R A G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G
E A R G E L F W D D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R
V T S E G A G L Q L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D
T K V L D I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号 698)

【0961】

(29) 69331

D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C W A S Q G I S S Y L A W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q Q L N S Y P L T F G G G T K V E I K G G G G S G G G G S G G
G G S Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C I A S G F T F S V Y G I H W V
R Q A P G K G L E W M A V I S H D G N I K H Y A D S V K G R F T I S R D N S K N
T L Y L Q I N S L R T E D T A V Y Y C A K D T W N S L D T F D I W G Q G T M V T
V S S G G G G S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D K
A I T Q E Q C E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S Y
K L E N L S S S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T E
N R L H F T I K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S E E
P F G V I V R R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S Q Y
I T G L A E H L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S H P
F Y L A L E D G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G G I

LDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPTYWGLGFHLCRW
GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTF
NKDGFRRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR
PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL
AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIIRGSEEDGCPNN
ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYG
LTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGGRYAGHWTGD
VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEE
LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMR
KALTRLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS
TWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ
TVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINV
HLRAGYIIPPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTCKGGEARGE
LFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEG
AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL
ICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号 699)

[0962]

(30) 69332

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQK
PGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYCYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIKGGGGSGGGGGSGG
GGSQVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVS
WIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRTLTISKDTSK
NQVVLTMNTMDPVDATYCYCARGHNHNLNYIIHWGQGT LVT
VSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA
PDKAITQEQCCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSY
KLENLSSSEMGTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMME
TERNLHFTTIKDPANRRYEVPLET
PHVHSRAPSPLYSVEFSEE
PFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQY
ITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPT
PGANLYGSHPFYLALEDGGS
AHGVFL LNSNAMDVVLQPS
PALSWRSTGGILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPTYWGLGFHLCRW
GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTF
NKDGFRRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR
PYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTAL
AWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIIRGSEEDGCPNN
ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYG
LTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGGRYAGHWTGD
VWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEE
LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMR
KALTRLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDS
TWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ
TVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINV
HLRAGYIIPPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTCKGGEARGE
LFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEG
AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVL
ICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号 700)

[0963]

(31) 69340

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIHDSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE
PEDFVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDKAMHWV
RQVPKGKLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFTIISRDNACKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWGGLDVWGQGT
TVTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA
PDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY
PSYKLENLSSSEMGGYTATLTRTTPTFPPKDI LTLRLDVMM
ETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEF
SEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLP
SQYITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYG
SHPFYLALEDGGSAHG VFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRST
GGILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHL
CRWGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRD
FTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAG
SYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFP DFTNP
TALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGC
PNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHN
LYGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHW
TGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNT
SEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSSL LSLPQEPYSFSEPAQQ
AMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPK
DSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWY
DLQTPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDT
INVHLRAGYIIP LQGGPLTTTESRQQPMALAVALT KGGEA
RGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVT
SEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTK
VLDICVSLLMGEQFLVSWC

(配列番号701)

[0964]

(32) 69348

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRNVLGWFQQK
PGKAPQRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
PEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGKTKVEIKGGGGSGGGGGSGG
GGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWV
RQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYGDSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGF D YWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA P
DKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSY P
SYKLENLSSSEMGGYTATLTRTTPTFPPKDI LTLRLDVMM E
TENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFS
EFPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPS
QYITGLAEHLSPMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGS
HPFYLALEDGGSAHG VFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTG
GILDVYIFLGPPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHL C
RWGYSSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRD F
TFNKGDFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSSGPAGS
YRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFP DFTNP T

A L A W W E D M V A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P
N N E L E N P P Y V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L
Y G L T E A I A S H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T
G D V W S S W E Q L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S
E E L C V R W T Q L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A
M R K A L T L R Y A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D
S S T W T V D H Q L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D
L Q T V P V E A L G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I
N V H L R A G Y I I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R
G E L F W D D G E S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S
E G A G L Q L Q K V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V
L D I C V S L L M G E Q F L V S W C

(配列番号702) ;

(1)

M H R P R R R G T R P P P L A L L A A L L L A A R G A D A D I Q M T Q S P S S
V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I A S W L A W Y Q Q K P G K A P E L L I Y A
A S S L Q G G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A I Y Y C Q Q
A N Y F P W T F G Q G T K V E I K G G G G S G G G G S G G G G S Q I T L K E S G
P T L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G V G V V W I R Q P P G K A L E
W L A L I Y W N D H K R Y S P S L G S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D
P V D T A T Y Y C A H Y S G S Y S Y Y Y Y G L D V W G Q G T T V T V S S G G G G
S G G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D K A I T Q E Q C
E A R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S Y K L E N L S S
S E M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T E N R L H F T I
K D P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S E E P F G V I V R
R Q L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S Q Y I T G L A E H
L S P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S H P F Y L A L E D
G G S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G G I L D V Y I F L
G P E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C R W G Y S S T A I
T R Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F T F N K D G F R D
F P A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P A G S Y R P Y D E G L R
R G V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T A L A W W E D M V
A E F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P N N E L E N P P Y
V P G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L Y G L T E A I A S
H R A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G D V W S S W E Q
L A S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E E L C V R W T Q
L G A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M R K A L T L R Y
A L L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S S T W T V D H Q
L L W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D L Q T V P V E A L
G S L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I N V H L R A G Y I
I P L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R G E L F W D D G E
S L E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S E G A G L Q L Q K
V T V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V L D I C V S L L M
G E Q F L V S W C

(配列番号703 ; 任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLAARGADAを欠く(配列番号709)配列) ;

(2)

M H R P R R R G T R P P P L A L L A A L L L A A R G A D A D I Q M T Q S P S S
L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A
A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q

SYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSGGGGGSQVQLVES
GGGVVQPGRSLRLSCAASGFPPFSNYVMYWVRQAPGKGLEW
VALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLR
PEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTT VTVSSG
GGGSGGGGSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA PDKAITQ
EQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSPSYKLEN
LSSSEMGYTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM METENRLH
FTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGV
IVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGL
AEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYGSHPFYLA
LEDGGS AHGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVY
IFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMP PYWGLGFHLCRWGYSS
TAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RDFTFNKDG
FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR PYDE
GLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWE
DMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELEN
PPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEA
IASHRALVKARGTRP FVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSS
WEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVR
WTQLGAFYPFMRNHNSSL LSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALT
LRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTV
DHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTPPV
EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRA
GYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALT KGGGEARGELFWD
DGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ
LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVS
LLMGEQFLVSWC

10

20

(配列番号704；任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLAARGADAを欠く(配列番号709)配列)；

(3)

30

MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLAARGADADIQMTQSPSS
LSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA
ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
SYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVES
GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFNIFEMNWVRQAPGKGLEW
ISYISSRGTTTTYYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARDYEATIPFD FWGQGT LVTVSSGGGGSGGGG
GSAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA PDKAITQE EQCEARG
CCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSPSYKLENLSSSEM G
YTATLTTRTTP TFFPKDILTLRLDVM METENRLHFTIKDPA
NRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLD
GRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPL
MLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYGSHPFYLALEDGGS A
HGVFL LNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEP
KSVVQQYLDVVGYPFMP PYWGLGFHLCRWGYSSSTAITRQV
VENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR RDFTFNKDGFRDFPAM
VQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR PYDEGLRRGVF
ITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFH
DQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELENPPYVPGV
VGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEA IASHRAL

40

50

V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G D V W S S W E Q L A S S
V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E E L C V R W T Q L G A F
Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M R K A L T L R Y A L L P
H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S S T W T V D H Q L L W G
E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D L Q T V P V E A L G S L P
P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I N V H L R A G Y I I P L Q
G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R G E L F W D D G E S L E V
L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S E G A G L Q L Q K V T V L
G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V L D I C V S L L M G E Q F
L V S W C

10

(配列番号705;任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLAARGADAを欠く(配列番号709)配列);

(4)

M H R P R R R G T R P P P L A L L A A L L L A A R G A D A D I Q M T Q S P S S
L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A
A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
S Y S T P P I T F G Q G T R L E I K G G G G S G G G G S G G G G S E V Q L V E S
G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M N W V R Q A P G K G L E W
V S G I S W S S G S M D Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R
T E D T A L Y Y C A K A R E V G D Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S G G G G S G
G G G S A H P G R P R A V P T Q C D V P P N S R F D C A P D K A I T Q E Q C E A
R G C C Y I P A K Q G L Q G A Q M G Q P W C F F P P S Y P S Y K L E N L S S S E
M G Y T A T L T R T T P T F F P K D I L T L R L D V M M E T E N R L H F T I K D
P A N R R Y E V P L E T P H V H S R A P S P L Y S V E F S E E P F G V I V R R Q
L D G R V L L N T T V A P L F F A D Q F L Q L S T S L P S Q Y I T G L A E H L S
P L M L S T S W T R I T L W N R D L A P T P G A N L Y G S H P F Y L A L E D G G
S A H G V F L L N S N A M D V V L Q P S P A L S W R S T G G I L D V Y I F L G P
E P K S V V Q Q Y L D V V G Y P F M P P Y W G L G F H L C R W G Y S S T A I T R
Q V V E N M T R A H F P L D V Q W N D L D Y M D S R R D F T F N K D G F R D F P
A M V Q E L H Q G G R R Y M M I V D P A I S S S G P A G S Y R P Y D E G L R R G
V F I T N E T G Q P L I G K V W P G S T A F P D F T N P T A L A W W E D M V A E
F H D Q V P F D G M W I D M N E P S N F I R G S E D G C P N N E L E N P P Y V P
G V V G G T L Q A A T I C A S S H Q F L S T H Y N L H N L Y G L T E A I A S H R
A L V K A R G T R P F V I S R S T F A G H G R Y A G H W T G D V W S S W E Q L A
S S V P E I L Q F N L L G V P L V G A D V C G F L G N T S E E L C V R W T Q L G
A F Y P F M R N H N S L L S L P Q E P Y S F S E P A Q Q A M R K A L T L R Y A L
L P H L Y T L F H Q A H V A G E T V A R P L F L E F P K D S S T W T V D H Q L L
W G E A L L I T P V L Q A G K A E V T G Y F P L G T W Y D L Q T V P V E A L G S
L P P P P A A P R E P A I H S E G Q W V T L P A P L D T I N V H L R A G Y I I P
L Q G P G L T T T E S R Q Q P M A L A V A L T K G G E A R G E L F W D D G E S L
E V L E R G A Y T Q V I F L A R N N T I V N E L V R V T S E G A G L Q L Q K V T
V L G V A T A P Q Q V L S N G V P V S N F T Y S P D T K V L D I C V S L L M G E
Q F L V S W C

20

30

40

(配列番号706;任意選択的に、N末端MHRPRRRRGTRPPPLALLAALLAARGADAを欠く(配列番号709)配列)

[0965]

結合インビトロについてスクリーニングされた抗ヒトTfR抗体を検証するために、本発明者らは、Tfrc^{hum/hum}ノックインマウスにおいてインビボマウス試験を実施して、血液脳関門(BBB)通過を評価した。ウェスタンブロットによって検出された脳ホモジネート中に成熟hGAAタンパク質を有する11個のクローンを、31個の抗体

50

のこの最初のスクリーニングから選択した。

【0966】

流体力学的送達（HDD）によるGAA融合。3ヶ月齢のヒトTFRCノックインマウスに、肝臓特異的マウスTTRプロモーター下で抗hTfRscfv：2xG4S：hGAAフォーマットで様々な抗hTfR抗体を発現すDNAプラスミドを注射した。マウスに、マウスの体重の10%（0.1mL/g体重）に希釈した0.9%滅菌生理食塩水中の50μgのDNAを与えた。注射の48時間後、CO₂窒息による殺直後にマウスから組織を切除し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で保存した。

【0967】

組織溶解物を、プロテアーゼ阻害剤（1861282, Thermo Fisher、米国マサチューセッツ州ウォルサム）を含むRIPA緩衝液中での溶解によって調製した。組織溶解物をビーズホモジェナイザー（FastPrep5、MP Biomedicals、サンタナ、カリフォルニア州、米国）で均質化した。細胞又は組織溶解物を、Novexシステム（LifeTech Thermo、XPO4200BOX、LC2675、LC3675、LC2676）を用いてSDS-PAGEゲル上で泳動させた。ゲルを低蛍光ポリビニリデンfluoride（PVDF）膜（IPFL07810, LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン）に移し、Revert 700 Total Protein Stain（TPS；926-11010 LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン）で染色した後、0.1% Tween（登録商標）20を含むTris緩衝生理食塩水中のOdysseyブロッキング緩衝液（927-500000, LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン）でブロッキングし、GAAに対する抗体（ab137068, Abcam、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）又は抗GAPDHに対する抗体（ab9484, Abcam、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）及び適切な二次抗体（926-32213又は925-68070, LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン）で染色した。プロットをLI-COR Odyssey CLxで画像化した。

【0968】

タンパク質バンド強度を、LI-COR Image Studioソフトウェアで定量化した。各サンプルについての成熟77kDa GAAバンドの定量化を、まずレーンのTPSシグナルに対して正規化し、次いで血清中のGAAレベル（それぞれローディング対照及び肝臓発現対照）に対して正規化することによって判定した。次いで、値を、Wtマウスにおける陽性対照群抗マウスTfRscfv：hGAA、及びTfrc^{hum}/^{hum}マウスにおける陰性対照群抗mTfRscfv：hGAAと比較した（図18A～18C、表31）。8D3 scFv（抗マウスTfR scFv）は、重鎖アミノ酸配列：EVQLVESGGGLVQPGNSLTLSCLVASGFTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIIYYDSSKMNYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLEMNSLRSEDTAMYYCAVPTSHYVVDVWGQGVSVTVSS（配列番号536）、及び軽鎖アミノ酸配列：DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLAWYQQKPKSPQLLIYGATSLADGVP SRFSGSRSGTQFSLKISR VQVEDIGIYYCLQAYNTPTWTFGGGTTKLELK（配列番号537）を有する。

【0969】

10

20

30

40

【表 3 1】

表 3 1 抗 h T f R s c f v : h G A A プラスミドで HDD を処置したマウスからの脳ホモジネート中の成熟 h G A A タンパク質の定量化

処置群	遺伝子型	脳内の成熟 hGAA タンパク質 (陽性対照に対して正規化)
抗 mTfRscfv:hGAA (陽性対照)	Wt	1.00±0.43*
抗 mTfRscfv:hGAA (陰性対照)	Tfrc ^{hum/hum}	0.02±0.03
69261scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.67±0.50
69307scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.08±0.19
69323scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.91±0.46
69329scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.65±0.13
69340scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.55±0.58
69348scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.50±0.05
12795scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.27±0.20
12798scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.72±0.42
12799scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.05±0.51*
12801scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.49±0.18
12802scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.29±0.27
12839scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.29±0.27**
12841scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.72±0.06***
12843scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.79±0.85***
12845scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	3.08±0.92***
12847scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.24±0.30
12848scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.59±0.16
12850scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.47±0.05

10

20

【0970】

データをウェスタンブロットから任意単位として定量化した (図 18 A ~ 18 C)。全ての値は平均±SD、n=3~6/群である。Tfrc^{hum/hum} マウスにおける一元配置分散分析対陰性対照抗 mTfRscfv:hGAA; *p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0001。

【0971】

抗 h T f R s c f v : h G A A プラスミドの HDD 後の脳サンプルの毛細管枯渇。表 3 1 から選択された抗 h T f R s c f v : h G A A を Tfrc^{hum/hum} マウスにおける二次スクリーニングで試験して、hGAA が脳実質に存在し、BBB 内皮細胞に捕捉されていないかどうかを判定した。本発明者らは、ウェスタンブロット上の実質画分中の成熟 hGAA 並びにカニクイザル TfR に対する高親和性に基づいて、このスクリーニングから 4 つの scFv (12799、12839、12843 及び 12847) を選択した。

30

【0972】

3 ヶ月齢の動物を、上記で詳述したように HDD で処置した。注射の 48 時間後、CO₂ 窒息によって 殺した直後に、マウスを 30 mL の 0.9% 生理食塩水で灌流した。ブレグマと -2 mm ブレグマグマとの間で大脳の 2 mm の冠状切片を採取し、氷上の 700 µL の生理学的緩衝液 (0.9% 生理食塩水 pH 7.4 中の 10 mM の HEPES、4 mM の KCl、2.8 mM の CaCl₂、1 mM の MgSO₄、1 mM の NaH₂PO₄、10 mM の D-グルコース) 中に置いた。脳切片をガラスダウンスホモジナイザーを用いて氷上で穏やかに均質化した。等量の 26% デキストラン (MW 70000 Da) を添加し (最終 13% デキストラン)、更に 10 回以上のストロークで均質化した。実質 (上清) 及び内皮 (ペレット) 画分を 5400 g での遠心分離によって、4℃で 15 分間分離した。抗 hGAA ウェスタンブロットを、上で詳述したように画分に対して行った (図 19 及び表 3 2)。ブロットをまた、抗 CD 31 内皮マーカー (Abcam ab182982) でプローブした。

40

【0973】

50

【表 3 2】

表 3 2 抗 h T f R s c f v : h G A A プラスミドで HDD を処置したマウスの脳実質画分及び B B B 内皮画分における成熟 h G A A タンパク質の定量化

処置群	遺伝子型	脳実質組織における成熟 hGAA タンパク質 (陽性対照に対して正規化)	脳内皮における成熟 hGAA タンパク質 (陽性対照に対して正規化)	mfTfR に対する親和性 (hTfR 結合%)
抗 mTfRscfv:hGAA (陽性対照)	Wt	1.00	5.82	ND
抗 mTfRscfv:hGAA (陰性対照)	Tfrc ^{hum/hum}	0.00	0.01	ND
69307scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.24	10.73	0%
69323scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.62	4.18	7%
12798scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.91	8.37	34%
12799scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.44	3.99	126%
12839scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.05	0.84	78%
12841scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.78	4.23	8%
12843scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.13	12.99	75%
12845scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	2.04	13.06	25%
12847scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.60	4.96	102%
12848scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.17	1.24	29%
12850scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.22	2.25	13%

【0974】

h G A A タンパク質をウェスタンブロットから任意単位として定量した (図 19)。n = 1 / 群。h T f R への結合のパーセントとして計算したカニクイザル T f R L u m i n e x データへの親和性: (m f T f R 結合 ÷ h T f R 結合) × 100

【0975】

【表 3 3】

表 3 3 抗 h T f R s c f v : h G A A プラスミドで HDD を処置したマウスの大腿四頭筋における h G A A タンパク質の定量化

処置群	遺伝子型	大腿四頭筋における hGAA タンパク質 (陽性対照に対して正規化)
生理食塩水 (ビヒクル)	Tfrc ^{hum/hum}	0.38 ± 0.25
抗 mTfRscfv:hGAA (陽性対照)	Wt	1.07 ± 0.27
抗 mTfRscfv:hGAA (陰性対照)	Tfrc ^{hum/hum}	0.56 ± 0.17
69307scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.58 ± 0.18
69323scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.10 ± 0.19
12798scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.33 ± 0.56
12799scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.67 ± 0.18
12839scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.80 ± 0.18
12841scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.15 ± 0.12
12843scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.78 ± 0.43
12845scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.70 ± 1.33
12847scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	7.74 ± 9.42
12848scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.82 ± 0.18
12850scFv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.76 ± 0.34

【0976】

データをウェスタンブロットから任意単位として定量化した (図 19)。全ての値は平均である。± S D、n = 1 群当たり 2 ~ 4。

【0977】

肝臓デポ A A V 8 抗 h T f R s c f v : h G A A 処置後のマウス脳サンプルの毛細管枯渇より長期の処置モデルにおける本発明者らの HDD スクリーニングの知見を確認するために、本発明者らは、T T R プロモーター下でエピソーム h T f R s c f v デポ A A V 8

抗肝臓：G A Aとして送達された選択された抗h T f R s c f v：G A AでT f r c h u mマウスを処置した。本発明者らは、A A V 8として送達された場合、4つ全ての抗h T f R s c f v：G A Aが成熟h G A Aを脳実質に送達することを見出した。

【0978】

A A V産生及びインビボ形質導入組換えA A V 8（A A V 2／8）を、H E K 2 9 3細胞において産生した。細胞を、アデノウイルスヘルパー遺伝子、A A V 8 r e p及びc a p遺伝子、並びにA A V 2逆位末端反復（I T R）に隣接する導入遺伝子を含む組換えA A Vゲノムをコードする3つのプラスミドでトランスフェクトした。5日目に、細胞及び培地を収集し、遠心分離し、A A V精製のために処理した。細胞ペレットを凍結融解によって溶解し、遠心分離によって清澄化した。処理した細胞溶解物及び培地をイオジキサノール勾配カラム上に重層し、超遠心機で遠心分離した。ウイルス画分を40%及び60%イオジキサノール溶液の間の界面から除去し、脱塩カラムを用いて1×P B Sに交換した。A A V v gをd d P C Rによって定量した。注射直前にA A VをP B S＋0.001%F－68 P l u r o n i c（登録商標）で希釈した。3ヶ月齢T f r c h u mマウスに、約100μLの体積で3e12 v g／体重k gを投与した。注射の4週間後にマウスを殺し、毛細管枯渇及びウェスタンブロッティングを上記のように実施した（図20、表34）。

【0979】

【表34】

表34肝臓デポA A V 8抗h T f R s c f v：h G A Aで処置したマウスの脳実質画分及びB B B内皮画分における成熟h G A Aタンパク質の定量化

処置群	遺伝子型	脳実質組織における 成熟hGAAタンパク質 (陽性対照に対して正規化)	脳内皮における 成熟hGAAタンパク質 (陽性対照に対して正規化)
抗mTfRscfv:hGAA (陽性対照)	Wt	1.00	1.00
抗mTfRscfv:hGAA (陰性対照)	Tfrc ^{hum/hum}	0.02	0.01
12799scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.94	0.94
12839scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.49	0.62
12843scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	0.61	0.63
12847scfv:hGAA	Tfrc ^{hum/hum}	1.90	1.33

【0980】

データをウェスタンブロットから任意単位として定量化した（図20）。n＝1／群。

【0981】

A A V 8エピソード肝臓デポ抗h T f R s c f v：G A Aを有するG a a^{-/-}／T f r c h u mマウスにおけるグリコーゲン貯蔵表現型のレスキュー。本発明者らは、ポンペ病モデルマウスにおける上記実験からの抗h T f R s c f v：G A Aのうちの4つを試験して、h T f R s c f v：G A Aがグリコーゲン貯蔵表現型をレスキューするかどうかを判定した。本発明者らは、4つ全て（12839、12843、12847、12799）がグリコーゲンをW tレベルに正規化したことを見出した。

【0982】

A A V産生及びインビボ形質導入を上記のように実施した。3ヶ月齢のG a a^{-/-}／T f r c h u mマウスに、2e12 v g／k gのA A V 8を投与した。注射の4週間後に組織を採取し、上記のように急速冷凍した。h G A Aウェスタンブロットを上記のように行った（図21、表35）。

【0983】

グリコーゲン定量化（表36、図22A～22C）。C O₂窒息による殺直後にマウスから組織を切除し、液体窒素中で急速凍結し、－80℃で保存した。グリコーゲン測定のために蒸留水中で、又はタンパク質分析のためにR I P A緩衝液中でステンレス鋼ビー

ズを用いて、ベンチトップホモジナイザー上で組織を溶解した。グリコーゲン分析溶解物を煮沸し、遠心分離して破片を除去した。グリコーゲン測定は、市販のキット（K 6 4 6, BioVision、米国カリフォルニア州ミルピータス）を製造業者の指示に従って用いて蛍光定量的に行った。全ての群は、注射後4週間で正常な鉄ホメオスタシスを有していた（血清鉄、TIBC、ヘプシジン、組織鉄、組織トランスフェリン）。

【0984】

【表35】

表35 肝臓デポAAV8抗hTfRscfv:hGAAで処置したGaa^{-/-}/Tfrc^{hum}マウスの組織中のhGAAタンパク質の定量化

処置群	n	血清 *	肝臓 *	大脳 **	小脳 **	脊髄 **	心臓 **	大腿四頭筋 **
Gaa ^{-/-} 未処置	1	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01
Gaa ^{-/-} 12839scfv: hGAA	3	2.42± 2.41	1.63± 0.96	0.14± 0.12	0.13± 0.12	0.19± 0.19	0.53± 0.52	0.14± 0.16
Gaa ^{-/-} 12843scfv: hGAA	3	2.07± 1.35	2.23± 0.08	0.17± 0.07	0.11± 0.05	0.17± 0.09	0.49± 0.31	0.18± 0.06
Gaa ^{-/-} 12847scfv: hGAA	3	1.56± 0.71	1.40± 0.13	0.25± 0.04	0.21± 0.09	0.42± 0.19	0.58± 0.17	0.19± 0.08

【0985】

データをウェスタンブロットから任意単位として定量化した（図21）。全ての値は平均である。±SD、n=1~3/群。*総hGAAタンパク質；**成熟hGAAタンパク質。

【0986】

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 3 6 肝臓デポ AAV8 抗 hTfRscfv : hGAA で処置した $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスの組織中のグリコーゲンの定量化

処置群	大脳	小脳	脊髄	心臓	大腿四頭筋	DRG
Wt未処置	0.06± 0.04*	0.01± 0.04*	0.05± 0.05*	0.08± 0.02*	0.34± 0.19*	0.018
$Gaa^{-/-}$ 未処置	2.34± 0.58	2.51± 0.38	3.08± 0.23	25.30± 6.06	13.05± 0.98	2.58
$Gaa^{-/-}$ 12839scfv: hGAA	0.11± 0.03*	0.46± 0.08*	0.08± 0.10*	0.68± 0.68*	2.15± 2.52*	
$Gaa^{-/-}$ 12843scfv: hGAA	0.09± 0.02*	0.09± 0.08*	0.13± 0.13*	0.09± 0.01*	1.22± 1.39*	
$Gaa^{-/-}$ 12847scfv: hGAA	0.05± 0.01*	0.02± 0.03*	0.20± 0.33*	0.11± 0.11*	0.80± 0.79*	0.066
処置群	大脳	小脳	脊髄	心臓	大腿四頭筋	
Wt未処置	0.043± 0.016*	0.023± 0.008*	0.105± 0.093*	0.083± 0.022*	0.247± 0.045*	
$Gaa^{-/-}$ 未処置	3.16± 0.837	3.043± 0.932	3.22± 0.414	34.48± 5.580	11.05± 2.192	
$Gaa^{-/-}$ 12799scfv: hGAA	0.063± 0.023*	0.107± 0.078*	0.084± 0.019*	0.123± 0.113*	0.725± 0.599*	

10

20

【0987】

全ての値は、グリコーゲン $\mu g / mg$ 組織である。±SD、 $n = 3 \sim 4$ / 群。 $Gaa^{-/-}$ 未処置群に対して一元配置 ANOVA * $p < 0.0001$ 。DRG については、1 群当たり 5 匹のマウスからプールした腰部 DRG から単一の値を生成した。

【0988】

AAV8 エピソーム肝臓デポ抗 hTfRscfv : GAA を有する $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスの脳及び筋肉におけるグリコーゲン貯蔵表現型のレスキュー。本発明者らは、ポンペ病モデルマウスにおいて 3 つの選択された抗 hTfRscfv : GAA (12799、12843、及び 12847) を試験して、hTfRscfv : GAA がグリコーゲン貯蔵表現型をレスキューしたかどうかを判定した。この実験において、本発明者らは、組織中のグリコーゲンを可視化するために、脳及び筋肉切片に対して組織学的検査を行った。本発明者らは、3 つ全ての選択された抗 hTfRscfv : GAA が、脳及び筋肉中のグリコーゲン染色を減少させることを見出した。本発明者らは、これらのデータに基づいて更なる分析のために 12847scfv : GAA を選択した。

30

【0989】

AAV 産生及びインビボ形質導入を上記のように実施した。3 ヶ月齢の $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスに、 $4e11vg / kg$ の AAV8 を投与した。注射の 4 週間後、組織を上記のようにグリコーゲン分析のために凍結した (表 3 7)。組織学のために、動物を生理食塩水 (0.9% NaCl) で灌流し、組織を 10% 正常緩衝ホルマリン中で一晩滴下固定した。組織を PBS で 3 回洗浄し、包埋するまで PBS / 0.01% アジ化ナトリウム中で保存した。組織をパラフィンに包埋し、脳 (冠状、約 2mm プレグマ) 及び大腿四頭筋 (線維断面) から 5 μm 切片を切断した。切片を、標準プロトコルを使用して過ヨウ素酸シッフ及びヘマトキシリンで染色した (図 23A ~ 23D)。

40

【0990】

50

【表 3 7】

表 3 7 肝臓デポ AAV8 抗 hTfR scfv : hGAA で処置した $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスの組織中のグリコーゲンの定量化

処置群	小脳	大腿四頭筋
Wt 未処置	$0.02 \pm 0.03^*$	$0.55 \pm 0.10^*$
$Gaa^{-/-}$ 未処置	1.91 ± 0.26	12.19 ± 3.02
$Gaa^{-/-}12799scfv:hGAA$	$0.10 \pm 0.06^*$	$1.34 \pm 0.9^*$
$Gaa^{-/-}12843scfv:hGAA$	$0.09 \pm 0.06^*$	$1.09 \pm 1.27^*$
$Gaa^{-/-}12847scfv:hGAA$	$0.07 \pm 0.06^*$	$0.72 \pm 0.64^*$

10

【0991】

全ての値は、グリコーゲン $\mu g / mg$ 組織である。平均 $\pm SD$ 、 $n = 5 \sim 8$ / 群。 $Gaa^{-/-}$ 未処置群に対して一元配置 ANOVA * $p < 0.0001$ 。

【0992】

$Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスにおける抗 hTfR 12847scfv : GAA の挿入。本発明者らは、アルブミン挿入によってポンペ病モデルマウスにおいて選択された抗 hTfR 12847scfv : GAA を試験して、本発明者らがエピソード AAV8 肝臓デポ発現で見た結果を再現することができるかどうかを判定した。12847scfv : GAA のアルブミン挿入は、成熟 hGAA タンパク質を脳及び筋肉に送達し、 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスにおいてグリコーゲン貯蔵表現型をレスキューした。これらのデータは、最適化されていない天然 12847scfv : GAA 配列を用いて生成された。

20

【0993】

本発明者らは、 $Gaa^{-/-}/Cd63^{hum}$ マウスにおいて、12847scfv : GAA を筋肉標的化抗 hCD63scfv : GAA と比較した。この特定の実験では、抗 hCD63scfv : GAA の発現は通常よりも低く、筋肉に多くの GAA タンパク質を送達せず、通常のようにグリコーゲンを正常化しない。これは、抗 hCD63scfv : GAA が筋肉において 12847scfv : GAA よりも有効性が低いように思わせるかもしれないが、ほとんどの実験において、本発明者らは、それらが筋肉において同等であることを見出した。

30

【0994】

AAV 産生。12847scfv : GAA 配列及びマウスアルブミンエクソン 1 スプライスアクセプター部位を 3' 末端に有するプロモーターレス AAV ゲノムプラスミドを作製した。組換え AAV8 (AAV2/8) を、HEK293 細胞において産生した。細胞を、アデノウイルスヘルパー遺伝子、AAV8 rep 及び cap 遺伝子、並びに AAV2 逆位末端反復 (ITR) に隣接する導入遺伝子を含む組換え AAV ゲノムをコードする 3 つのプラスミドでトランスフェクトした。5 日目に、細胞及び培地を収集し、遠心分離し、AAV 精製のために処理した。細胞ペレットを凍結融解によって溶解し、遠心分離によって清澄化した。処理した細胞溶解物及び培地をイオジキサノール勾配カラム上に重層し、超遠心機で遠心分離した。ウイルス画分を 40% 及び 60% イオジキサノール溶液の間の界面から除去し、脱塩カラムを用いて 1xPBS に交換した。AAV vg を ddPCR によって定量した。

40

【0995】

インビボのアルブミン遺伝子座への CRISPR/Cas9 挿入 3 ヶ月齢 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ マウスに、PBS + 0.001% F-68 Pluronic (登録商標) で希釈した 3e12vg/kg の AAV8 12847scfv : GAA 及び 3mg/kg の LNP G666/Cas9 mRNA を尾静脈注射により投与した。注射の 3 週間後にマウスを殺した。陰性対照マウスは、LNP を伴わない挿入 AAV8 を受けた。陽性対照マウスに、TTR プロモーター下の 4e11vg/kg のエピソード AAV8 12847scfv : GAA を投薬した (表現型レスキューデータは以前に示

50

した)。CO₂ 窒息による 殺直後にマウスから組織を切除し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で保存した。CO₂ 窒息直後に心臓穿刺によってマウスから血液を採取し、血清分離チューブ (BD Biosciences、365967) を使用して血清を分離した。

【0996】

【表38】

表38 処置群及び対照

処置群	遺伝子型	機能
Wt未処置	Tfrc ^{hum}	正常な未処置マウス対照
Gaa ^{-/-} 未処置	Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum}	未処置ポンペ病マウス
Gaa ^{-/-} 挿入AAVのみ	Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum}	挿入についての陰性対照 (Cas9/gRNA送達なし)
Gaa ^{-/-} エピソード AAV8 TTR 12847scfv:hGAA	Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum}	陽性対照、以前に示されたグリコーゲン 貯蔵表現型のレスキュー
Gaa ^{-/-} 挿入 12847scfv:hGAA	Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum}	実験的挿入群
Gaa ^{-/-} 未処置	Gaa ^{-/-} /Cd63 ^{hum}	未処置ポンペ病マウス (CD63ヒト化)
Gaa ^{-/-} 挿入抗 CD63scfv:hGAA	Gaa ^{-/-} /Cd63 ^{hum}	BBB通過の陰性対照 (筋肉標的化)

10

【0997】

ウェスタンブロット (表39、図24A)。組織溶解物を、プロテアーゼ阻害剤 (1861282, Thermo Fisher、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を含む RIPA 緩衝液中での溶解によって調製した。組織溶解物をビーズホモジェナイザー (FastPrep5、MP Biomedicals、サンタナ、カリフォルニア州、米国) で均質化した。細胞又は組織溶解物を、Novex システム (LifeTech Thermo、XPO4200BOX、LC2675、LC3675、LC2676) を用いて SDS-PAGE ゲル上で泳動させた。ゲルを低蛍光ポリビニリデンfluoride v (PVDF) 膜 (IPFL07810, LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン) に移し、Revert 700 Total Protein Stain (TPS; 926-11010 LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン) で染色した後、0.1% Tween (登録商標) 20 を含む Tris 緩衝生理食塩水中の Odyssey ブロッキング緩衝液 (927-500000, LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン) でブロッキングし、GAA に対する抗体 (ab137068, Abcam、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ) 又は抗 GAPDH に対する抗体 (ab9484, Abcam、米国マサチューセッツ州ケンブリッジ) 及び適切な二次抗体 (926-32213 又は 925-68070, LI-COR、米国ネブラスカ州リンカーン) で染色した。ブロットを LI-COR Odyssey CLx で画像化した。

20

30

【0998】

タンパク質バンド強度を、LI-COR Image Studio ソフトウェアで定量化した。各サンプルについての成熟 77 kDa GAA バンドの定量を、レーンの TPS シグナル (ローディング対照) に対して正規化することによって決定した。

40

【0999】

グリコーゲン定量化 (表40、図24B)。CO₂ 窒息による 殺直後にマウスから組織を切除し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で保存した。グリコーゲン測定のために蒸留水中で、又はタンパク質分析のために RIPA 緩衝液中でステンレス鋼ビーズを用いて、ベンチトップホモジナイザー上で組織を溶解した。グリコーゲン分析溶解物を煮沸し、遠心分離して破片を除去した。グリコーゲン測定は、市販のキット (K646, BioVision、米国カリフォルニア州ミルピータス) を製造業者の指示に従って用いて蛍光定量的に行った。

【1000】

50

【表 3 9】

表 3 9 挿入抗 h T f R 1 2 8 4 7 s c f v : h G A A で処置した G a a ^{-/-} / T f r c ^{hum} マウスの組織中の h G A A タンパク質の定量化

処置群	肝臓 総hGAA	血清 総hGAA	大脳成熟 hGAA	大腿四頭筋成熟 hGAA
Gaa ^{-/-} 挿入AAV のみの陰性対照	0.02±0.003	0.03±0.02	0.002±0.001	0.006±0.002
Gaa ^{-/-} エピソーム AAV8 TTR 12847scfv:hGAA	2.35±0.72	3.65±2.09	0.49±0.20 ^{§§}	0.148±0.043 ^{§§}
Gaa ^{-/-} 挿入 12847scfv:hGAA	4.31±0.87*	3.47±2.37	0.57±0.26 ^{§§}	0.141±0.062 ^{§§}
Gaa ^{-/-} 挿入抗 CD63scfv:hGAA	2.67±1.04*	0.93±0.55*	0.01±0.003	0.060±0.037

10

【1 0 0 1】

全ての値は任意単位である。平均±SD、n=群当たり3~8一元配置ANOVA * p<0.05 対 G a a ^{-/-} エピソーム A A V 8 T T R 1 2 8 4 7 s c f v : G A A 群 ; § § p<0.001 対 A A V のみの陰性対照群

【1 0 0 2】

【表 4 0】

表 4 0 挿入抗 h T f R 1 2 8 4 7 s c f v : h G A A で処置した G a a ^{-/-} / T f r c ^{hum} マウスの組織中のグリコーゲンの定量化

処置群	大脳	大腿四頭筋
Wt未処置	0.10±0.07	0.37±0.13
Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum} 未処置(Tfrc ^{hum})	2.76±0.41	12.75±1.88
Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum} 挿入AAVのみ	2.17±0.40*	10.64±2.56
Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum} エピソームAAV8 TTR 12847scfv:hGAA	0.13±0.03***§	2.44±2.21***§
Gaa ^{-/-} /Tfrc ^{hum} 挿入12847scfv:hGAA	0.16±0.05***§	1.67±0.76***§
Gaa ^{-/-} /Cd63 ^{hum} 未処置	2.34±0.30	11.91±1.01
Gaa ^{-/-} /Cd63 ^{hum} 挿入抗Cd63scfv:hGAA	1.71±0.20*	4.06±0.13**

20

30

【1 0 0 3】

全ての値は、グリコーゲン μ g / m g 組織である。±SD、n=群当たり3~8一元配置ANOVA * p<0.01 対 G a a ^{-/-} / C d 6 3 ^{hum} ** 未処置群 ; p<0.001 対 G a a ^{-/-} / C d 6 3 ^{hum} 未処置群 ; *** p<0.0001 対 G a a ^{-/-} / T f r c ^{hum} 未処置群 ; § 非有意対 W t 未処置群。

【1 0 0 4】

次に、新生児 G a a ^{-/-} ; T f r c ^{hu} / ^{hu} マウスに P 1 で以下のものを静脈内投与する同様の実験を行う。(1) 抗 T f R : G A A をコードする組換え A A V 8 ; 又は (2) L N P - g 6 6 6 及び組換え A A V 8 抗 T f R : G A A 挿入鑄型。未処置 G a a ^{-/-} ; T f r c ^{hu} / ^{hu} マウス及び野生型マウスを対照として使用する。投与後の様々な時点で血液を採取し、血清を調製し、投与後の様々な時点で組織を採取する。様々な筋肉及び C N S 組織内の血清抗 T f R : G A A レベル及びグリコーゲンレベルを経時的に測定する。

40

【1 0 0 5】

グリコーゲン減少が筋機能の改善につながるかどうかを評価するために、投与後のある時点でマウスを握力装置で試験する。力計 (C o l u m b u s I n s t r u m e n t s 、米国オハイオ州コロンバス) を用いて肢の握力を測定する。全ての試験を三重に行う。

【1 0 0 6】

要約すると、L N P によって送達される高度に正確かつ標的化された C R I S P R / C

50

a s 9 技術と、選択された r A A V 8 ベクターによって送達される抗 T f R : G A A D N A 鑄型との組み合わせは、肝細胞からの抗 T f R : G A A タンパク質の長期発現並びに P D に罹患した筋細胞及び C N S 細胞への送達を可能にし、新生児患者を含む P D 患者に生涯にわたる有効な治療を潜在的に提供する。

【1007】

実施例 7 最適化抗 T f R : G A A D N A 鑄型

最適化抗 T f R : G A A 鑄型を設計し、非ヒト霊長類 (N H P) 研究のためのリードを開発するために作製した。開発候補を選択するために、抗 T f R : G A A をコードするヌクレオチド配列が修飾されている (例えば、C p G を枯渇させることによって) 4 つの候補抗 T f R : G A A 挿入鑄型のいくつかのバージョンを生成した。表 4 1 及び 4 2 は、設計された抗 T f R : G A A インサートの異なるバージョンを列挙する。表 4 2 中の抗 T f R : G A A インサートの各々は、配列番号 1 7 6 に記載の最適化 G A A 配列を使用する。

【1008】

【表 4 1】

表 4 1 挿入カセットのための抗 T f R : G A A インサート

抗TfR:GAAインサート	CpGs	配列番号(最適化GAA)
12799-DC	0	205
12799-GS	0	206
12799-第1世代	160	174
12839-DC	0	207
12839-GS	0	208
12839-第1世代	163	174
12843-DC	0	209
12843-GS	0	210
12843-第1世代	160	174
12847-DC	0	211
12847-GS	0	212
12847-第1世代	160	174

【1009】

【表 4 2】

表 4 2 挿入カセットのための抗 T f R : G A A 挿入

抗TfR:GAA挿入	導入遺伝子中のCpG	配列番号
12799第1世代	160	574
12799 GA 0	0	578
12799 GS 0	0	579
12799 GS 0v2	0	580
12843 第1世代	160	576
12843 GA 0	0	581
12843 GS 0	0	582
12843 GS 0v2	0	583
12847 第1世代	160	577
12847 GA 0	0	584
12847 GS 0	0	585
12847 GS 0v2	0	586

【1010】

これを実証するために、末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell、P B M C) をヒト血液から単離した。形質細胞様樹状細胞 (p D C) を濃縮し、P B M C と組み合わせた (ウェル当たり 1 e 4 個の p D C + 1 e 5 個の p B M C)。細胞を A A V 又は対照 C p G -オリゴデオキシヌクレオチド (O D N) と共に 1 6 ~ 1 8 時間インキュベートした。上清を回収し、I F N α E L I S A を実施した。このアッセイは、C

p G 枯渴抗 T f R : G A A 配列が、非 C p G 枯渴配列と比較して、初代ヒト形質細胞様 D C ベースのアッセイにおいて I F N - I 応答の低下を示すかどうかを評価する。

【1011】

様々な 1 2 8 4 7 個の最適化された抗 T f R : G A A 鑄型（配列番号 7 3 2 ~ 7 3 5 又は 5 8 4 ~ 5 8 6（コード配列））及び 1 2 8 4 3 個の最適化抗 T f R : G A A 鑄型（配列番号：7 2 9 ~ 7 3 1 又は 5 8 1 - 5 8 3（コード配列））の活性を、初代ヒト肝細胞アッセイにおいて試験した。A A V 鑄型を A A V 2 ウイルスにパッケージングした。初代ヒト肝細胞を 9 6 ウェルプレート中で増殖させ、鑄型 D N A 及び L N P - g 9 8 6 0 を含有する A A V を固定 M O I（6 e 4）で L N P 用量滴定により投与した。投与 7 日後に上清を回収し、- 8 0 ° C で保存した。上清を解凍し、上清中の G A A 活性を、細胞から産生及び分泌された酵素的に活性な G A A の量の測定として、4 - メチルウンベリフェロンベースの蛍光定量アッセイ（K 6 9 0, B i o V i s i o n、米国カリフォルニア州ミルピータス）を使用して測定した。図 2 5 A ~ 2 5 B に示すように、全ての C p G 枯渴抗 T f R : G A A 鑄型は、天然抗 T f R : G A A 鑄型と比較して、初代ヒト肝細胞上清における G A A 活性の増加を示した。

10

【1012】

最適化鑄型の活性を、初代ヒト肝細胞アッセイにおいて試験する。A A V 鑄型は A A V 2 ウイルスにパッケージングされる。初代ヒト肝細胞を 9 6 ウェルプレート中で増殖させ、鑄型 D N A 及び固定 L N P 濃度の L N P - g 9 8 6 0 を含有する A A V を、A A V 用量滴定により投与する。投与の 7 日後に上清を回収し、- 8 0 ° C で保存する。上清を解凍し、上清中の G A A 活性を、細胞から産生及び分泌された酵素的に活性な G A A の量の測定として、4 - メチルウンベリフェロンベースの蛍光定量アッセイ（K 6 9 0, B i o V i s i o n、米国カリフォルニア州ミルピータス）を使用して測定する。

20

【1013】

1 2 8 4 7 s c F v : G A A 0 C p G v 0 最適化鑄型（配列番号 7 3 3 又は 5 8 4（コード配列））の活性を、実施例 6 に記載されるように、P D マウスモデル、G a a - / - ; T f r c h u / h u において検証した。3 ヶ月齢のマウス（G a a - / - ; T f r c h u / h u マウス及び G a a - / - ; C D 6 3 h u / h u マウス）に、3 m g / k g の L N P - g 9 8 6 0 及び 3 e v 1 2 v g / k g の A A V 8 抗 T f R : G A A 鑄型（天然又は 1 2 8 4 7 0 C p G v 0）及び最適化抗 C D 6 3 : G A A 鑄型（G A 0 C p G 抗 C D 6 3 : G A A 鑄型；配列番号 7 3 6 又は 1 9 6（コード配列））を静脈内投与した。G A A（s c F v : G A A 及び成熟 G A A）についてのウェスタンブロットを実施例 6 のように行い、天然抗 T f R : G A A 鑄型又は 0 C p G 抗 T f R : G A A 鑄型のアルブミン挿入後の脳（大脳）への G A A の送達を確認した（図 2 6 A）。大脳、大腿四頭筋、横隔膜、及び心臓におけるグリコーゲン定量も実施例 6 と同様に行い、0 C p G 抗 T f R : G A A 鑄型のアルブミン挿入がインビボでの T f R 結合及び G A A 活性を保持すること、並びに C p G 枯渴配列が G a a - / - ; T f r c h u / h u マウスにおけるグリコーゲン貯蔵表現型のレスキューにおいて天然配列と同様に有効であることを確認した（図 2 6 B 及び表 4 3）。

30

【1014】

40

【表 4 3】

表 4 3 抗 h T f R s c f v : h G A A 挿入鑄型で処置した G a a ^{-/-} / T f r c ^{hum} マウスの組織中のグリコーゲンの定量化

処置群	大脳	横隔膜	心臓	大腿四頭筋
hTFRC Wt	0.256± 0.175*	2.44± 1.97*	0.042± 0.022*	0.724± 0.611*
hTFRC Gaa ^{-/-} 未処置	2.56± 0.237	17.54± 1.72	34.56± 6.36	7.96± 1.38
hTFRC Gaa ^{-/-} 12847:GAA天然	0.076± 0.022*	1.30± 0.973*	0.405± 0.351*	1.48± 0.867*
hTFRC Gaa ^{-/-} 12847:GAA 0 CpG	0.114± 0.049*	1.55± 1.60*	0.35± 0.372*	1.21± 0.821*
hCD63 Gaa ^{-/-} 未処置	2.39± 0.432	18.30± 2.62	30.88± 2.451	7.37± 1.134
hCD63 Gaa ^{-/-} CD63:GAA 0 CpG	1.68± 0.220*	0.544± 0.294*	0.0634± 0.045*	0.803± 0.297*

10

全ての値は、グリコーゲン $\mu\text{g} / \text{mg}$ 組織である。±SD、n = 5 ~ 8 / 群。h T F R C G a a ^{-/-} 未処置群に対して一元配置分散分析 * p < 0.0001。

【1015】

最適化鑄型 (12847 s c F v : G A A 0 C p G v 0 (配列番号 733 又は 584 (コード配列)) 及び 12843 s c F v : G A A 0 C p G v 0 (配列番号 729 又は 581 (コード配列))) の発現を非ヒト霊長類において評価する。発現は、実施例 1 に記載されるような L N P - g 9860 及び各最適化鑄型を含む r A A V 8 を投与することによって評価する。発現を、複数週の試験にわたって分析する。G A A の生体内分布の分析のために組織も収集し、収集した組織において G A A 活性を評価する。

20

【1016】

【表 4 4】

表 4 4 非ヒト霊長類における C p G 枯渇抗 T f R : G A A 挿入鑄型の発現の評価試験

群	名称	AAV8ベクター	AAV8用量	LNP用量	ガイド	n
1	ビヒクル対照	ビヒクルのみ	ビヒクルのみ	ビヒクルのみ	N/A	1
2	抗CD63:GAA AAVのみの対照	抗CD63:GAA	1.5e13vg/kg	ビヒクルのみ	N/A	1
3	抗CD63:GAA	抗CD63:GAA	1.5e13vg/kg	3mg/kg LNP	G9860	4
4	抗CD63:GAA alt gRNA	抗CD63:GAA	1.5e13vg/kg	3mg/kg LNP	G9844	4
5	12847抗TfR:GAA AAVのみの対照	抗TfR:GAA#1	1.5e13vg/kg	ビヒクルのみ	N/A	1
6	12847抗TfR:GAA	抗TfR:GAA#1	1.5e13vg/kg	3mg/kg LNP	G9860	4
7	12847抗TfR:GAA alt gRNA	抗TfR:GAA#1	1.5e13vg/kg	3mg/kg LNP	G9844	4
8	12843抗TfR:GAA AAVのみの対照	抗TfR:GAA#2	1.5e13vg/kg	ビヒクルのみ	N/A	1
9	12843抗TfR:GAA	抗TfR:GAA#2	1.5e13vg/kg	3mg/kg LNP	G9860	4
10	12843抗TfR:GAA alt gRNA	抗TfR:GAA#2	1.5e13vg/kg	3mg/kg LNP	G9844	4
					全動物:	28

30

40

【1017】

50

【表 4 5】

表 4 5 追加の G A A 配列

配列名	アミノ酸
GAA_1 77 (配列番号 213)	GHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQGGASRPGPRDAQAHGPRPRAV PTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQECCARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFF PPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMETENRLHFT IKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTT VAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGP ANLYGSHPFYLALEDGGSAGHVFLNLSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVY IFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYWGFGFHLRCRWGYSSTAITRQVVENMT RAHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIV DPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTA LAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVP GVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVI SRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGF LGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNLSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALT LRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLIT PVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWV TLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELF WDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGV ATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
GAA_2 22 (配列番号 214)	LLVPRELSGSSPVLEETHPAHQGGASRPGPRDAQAHGPRPRAVPTQCDVPP NSRFDCAPDKAITQECCARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYK LENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMETENRLHFTIKDPANRR YEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFAD QFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGPANLYGSH PFYLALEDGGSAGHVFLNLSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEP KSVVQQYLDVVGYPFMPYWGFGFHLRCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPL DVQWNDLDYMDSRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISS SGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAWWE DMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGT LQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFA GHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNLSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLYALL PHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQA GKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLAP LDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGE SLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQV LSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
GAA_3 61 (配列番号 215)	AHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQECCARGCCYIPAKQGLQGA QMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVM METENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRR QLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRIT LWNRDLAPTGPANLYGSHPFYLALEDGGSAGHVFLNLSNAMDVVLQSPAL SWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPYWGFGFHLRCRWGYS STAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTFNKDGFRDFPAMVQE LHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVW GSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGC PNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRA LVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLL GVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNLSLLSLPQEPYSFS EPAQQAMRKALTLYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTV DHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAA PREPAIHSEGQWVTLAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAV ALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGA GLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLV SWC

10

20

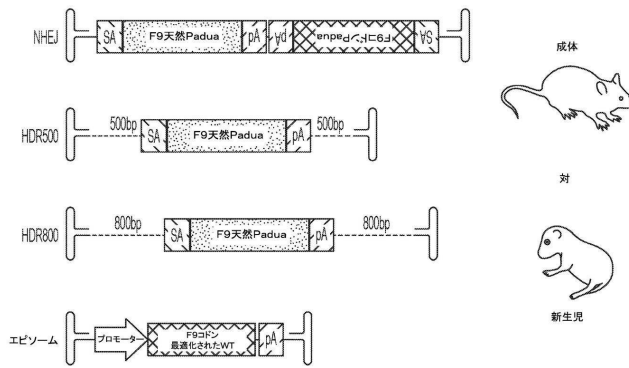
30

40

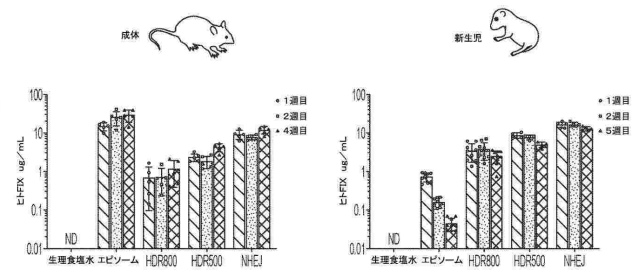
50

【図面】

【図 1】

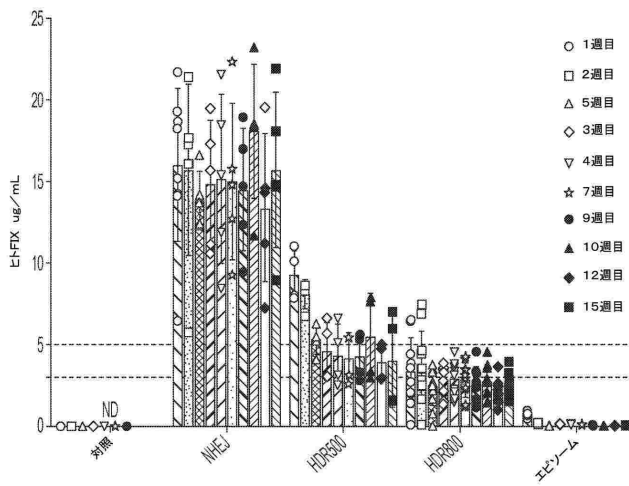


【図 2 A】

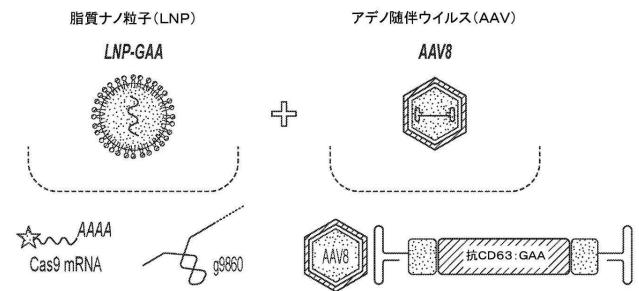


10

【図 2 B】



【図 3】



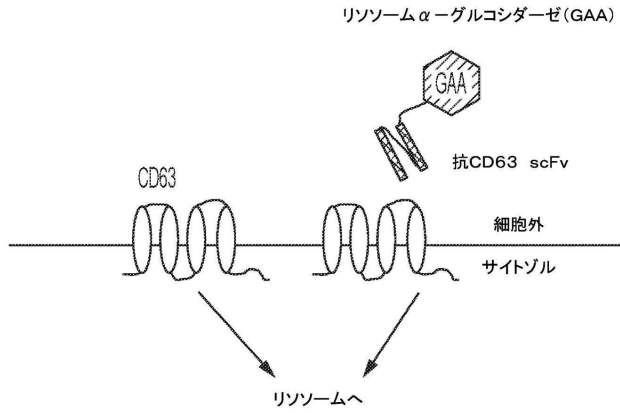
20

30

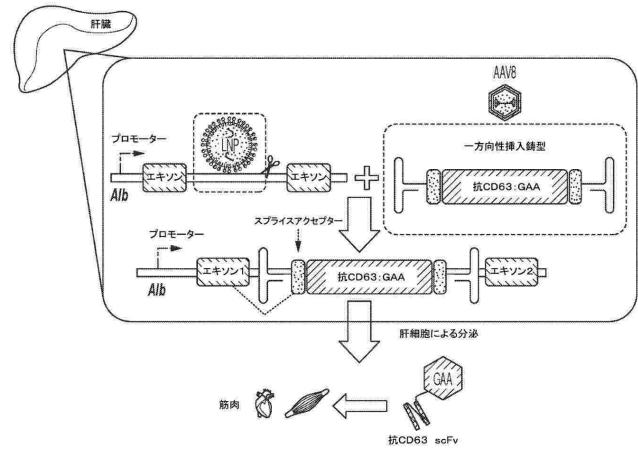
40

50

【図 4】

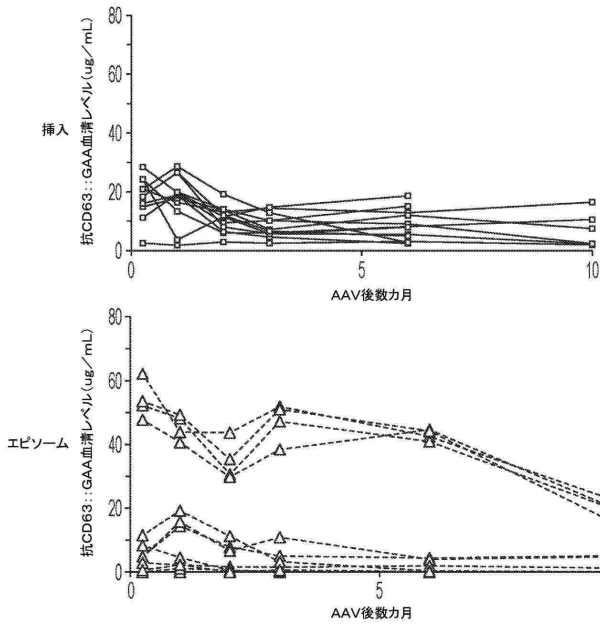


【図 5】

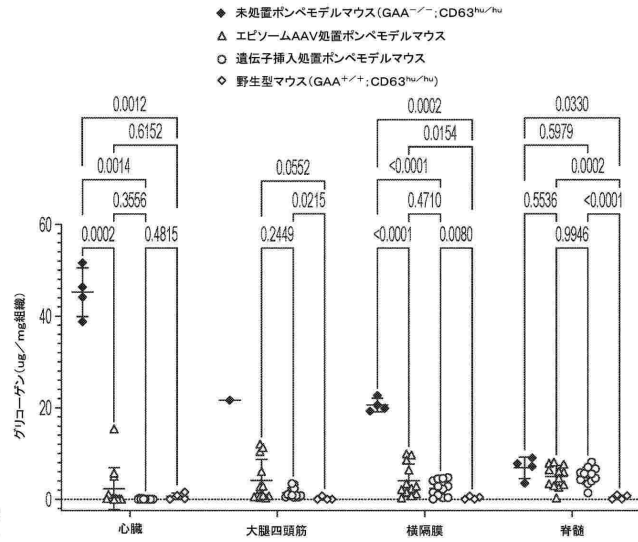


10

【図 6】



【図 7】



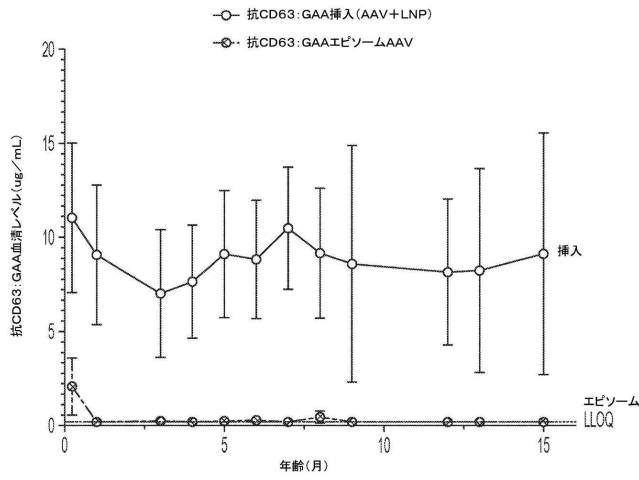
20

30

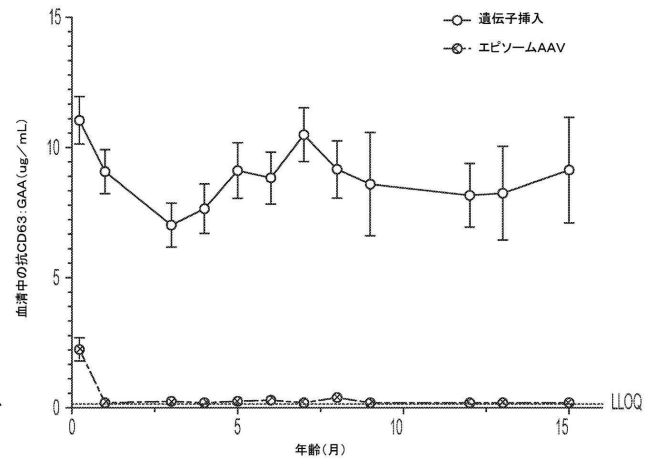
40

50

【図 8 A】

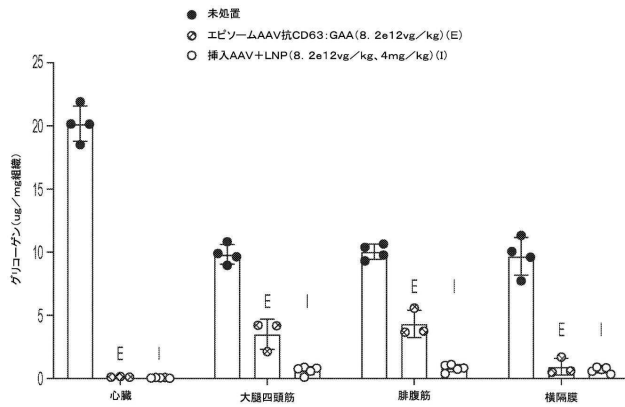


【図 8 B】

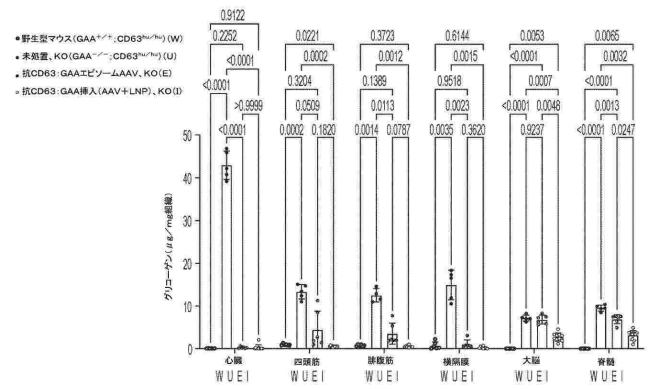


10

【図 9 A】



【図 9 B】



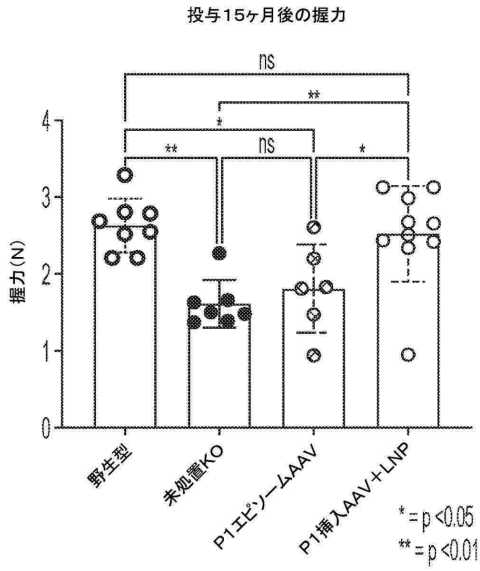
20

30

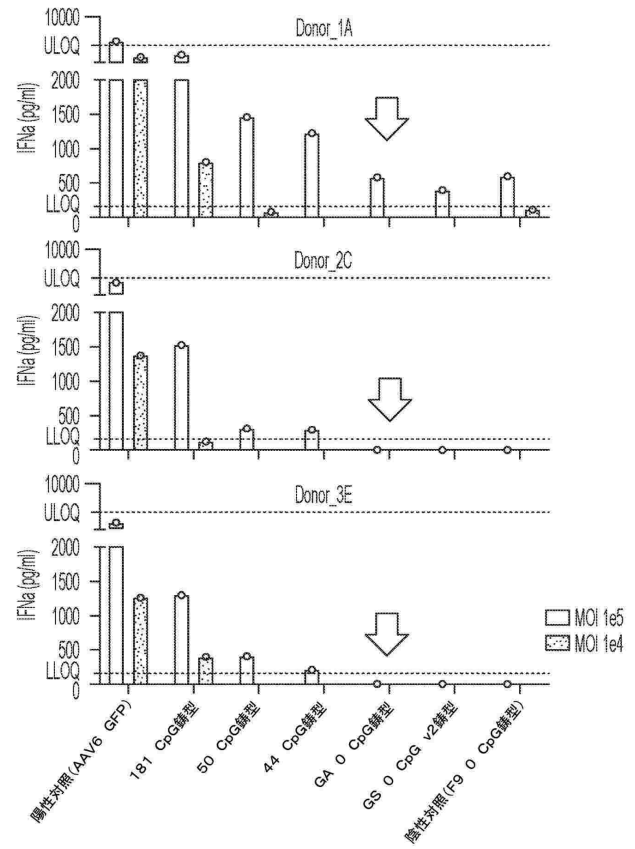
40

50

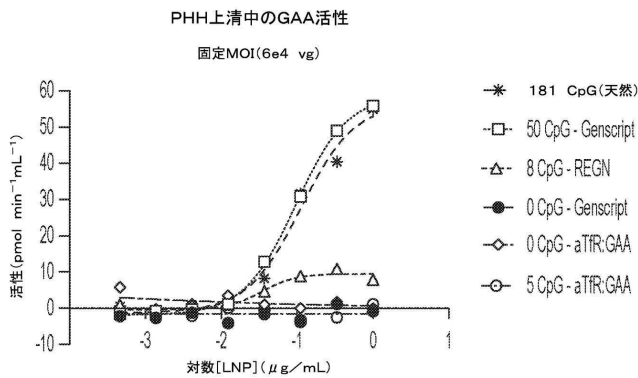
【図 10】



【図 11】

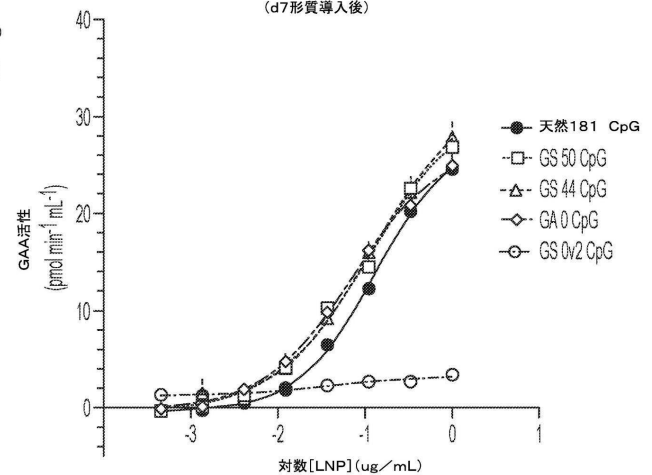


【図 12】



【図 13】

抗CD63:GAA挿入で処置した初代ヒト肝細胞由来の上清中のGAA活性 (d7形質導入後)



10

20

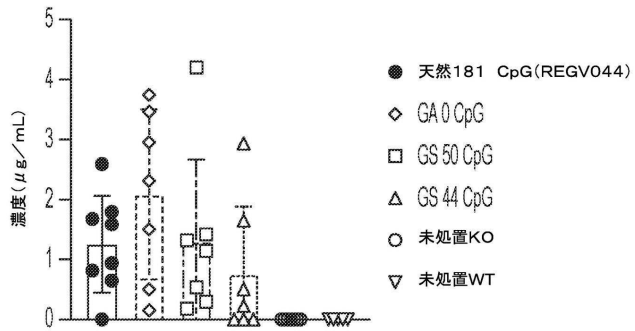
30

40

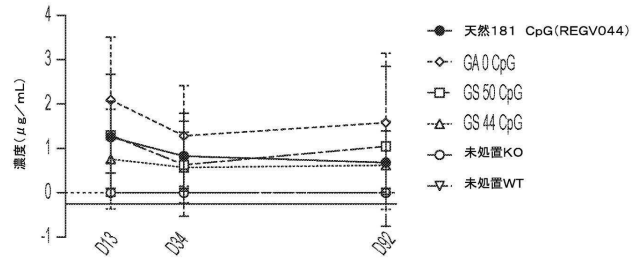
50

【図 14 A】

抗hCD63:GAA挿入で処置した成体雄GAA KO
マウスにおける血清hCD63 scFv:GAAレベル
iv注射後d13



【図 14 B】

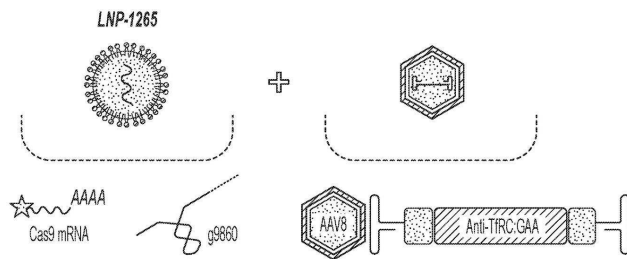


10

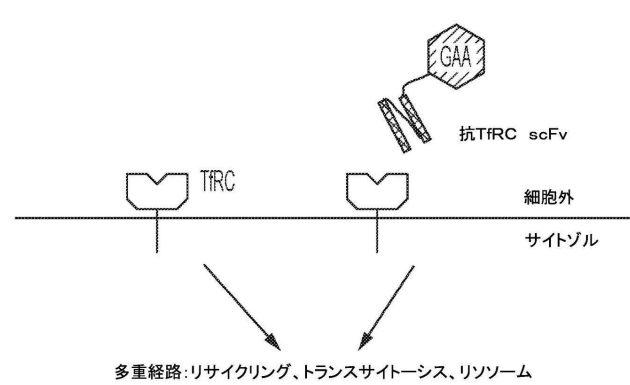
【図 15】

脂質ナノ粒子(LNP)

アデノ随伴ウイルス(AAV)



【図 16】

リソソーム α グルコシダーゼ (GAA)

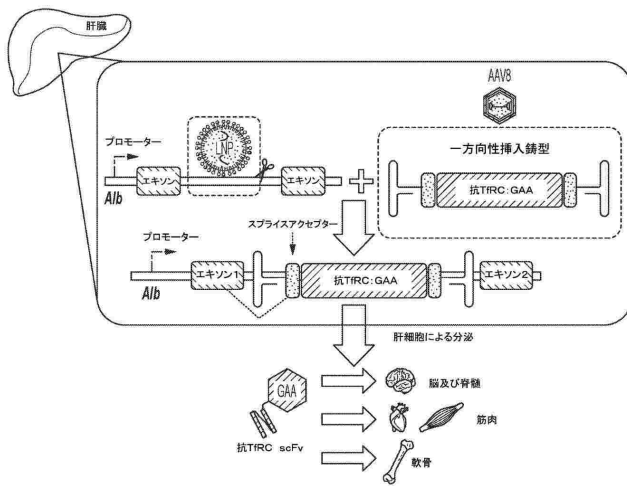
20

30

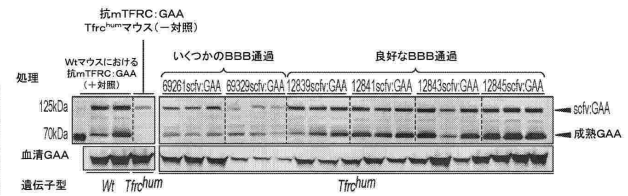
40

50

【図 17】

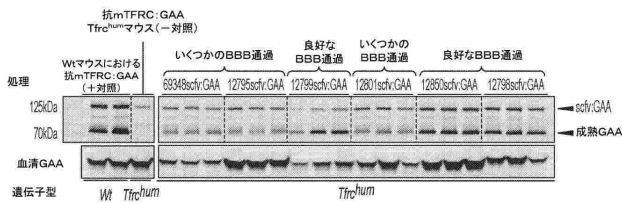


【図 18 A】

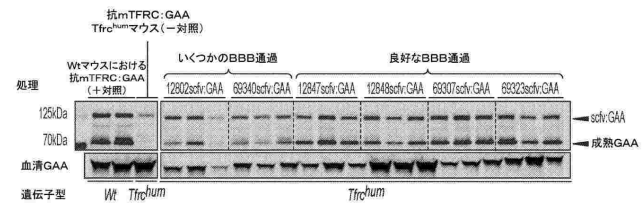


10

【図 18 B】

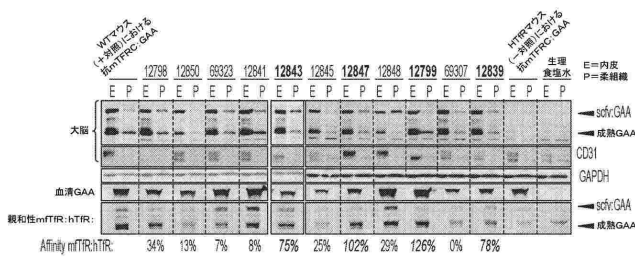


【図 18 C】

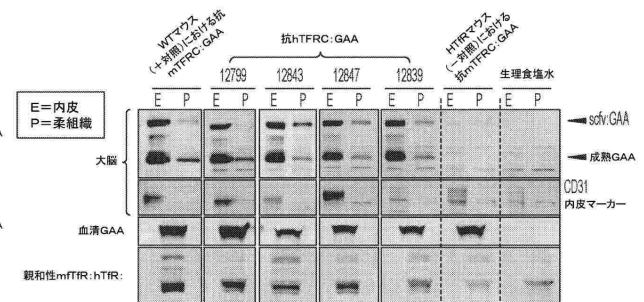


20

【図 19】



【図 20】

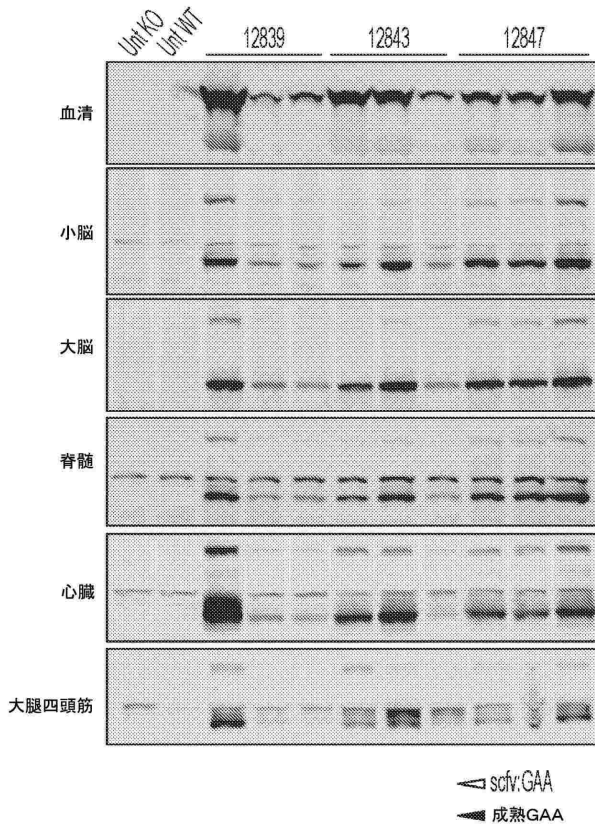


30

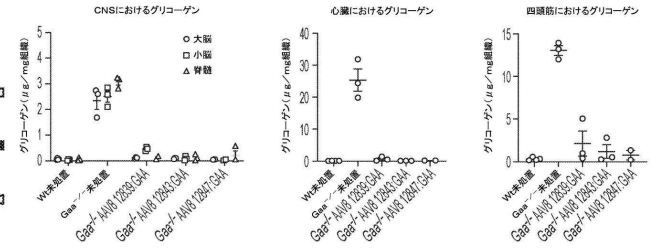
40

50

【図 2 1】



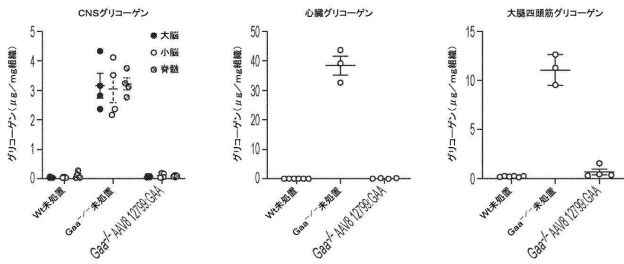
【図 2 2 A】



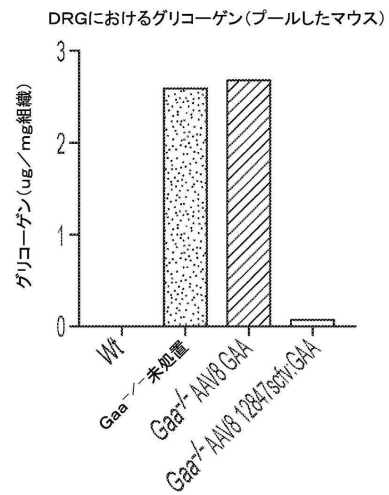
10

20

【図 2 2 B】



【図 2 2 C】

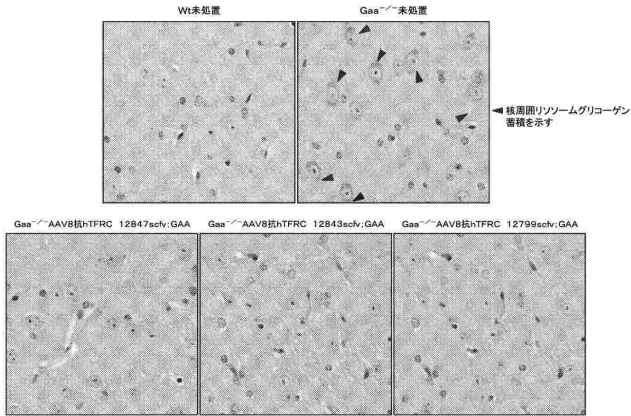


30

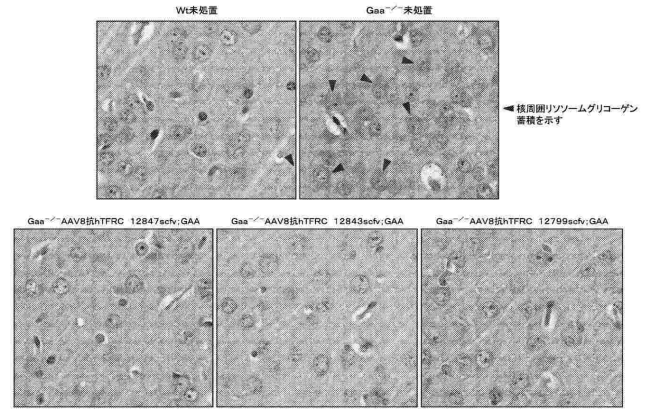
40

50

【図 2 3 A】

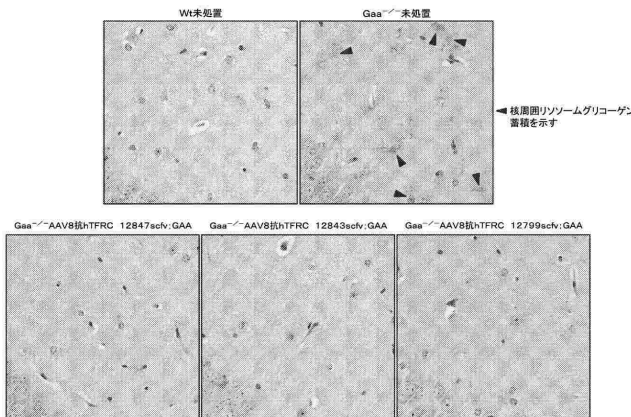


【図 2 3 B】

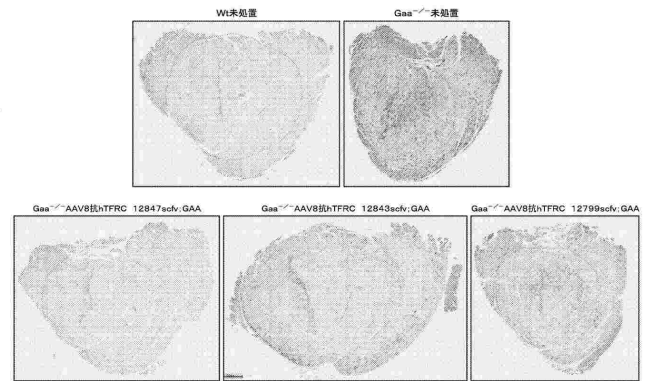


10

【図 2 3 C】

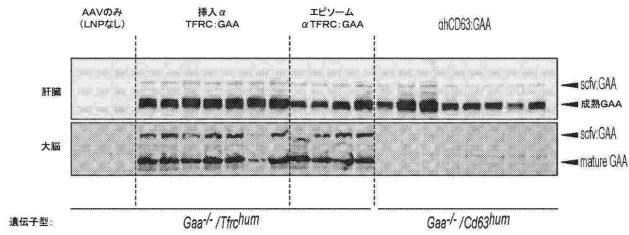


【図 2 3 D】

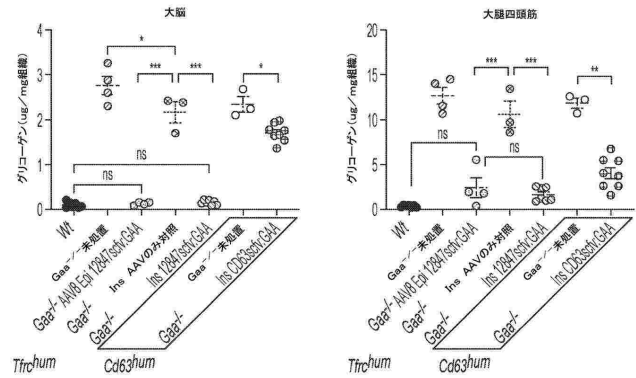


20

【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



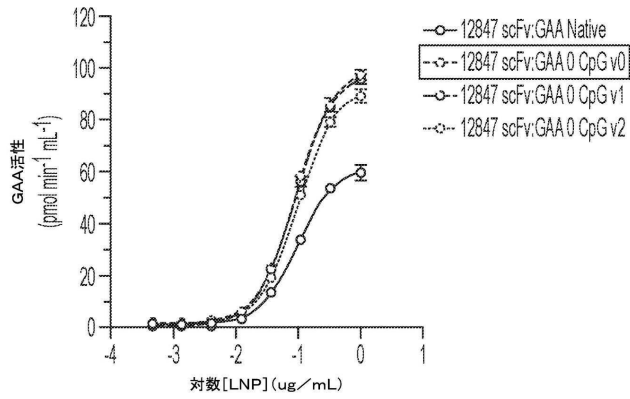
30

40

50

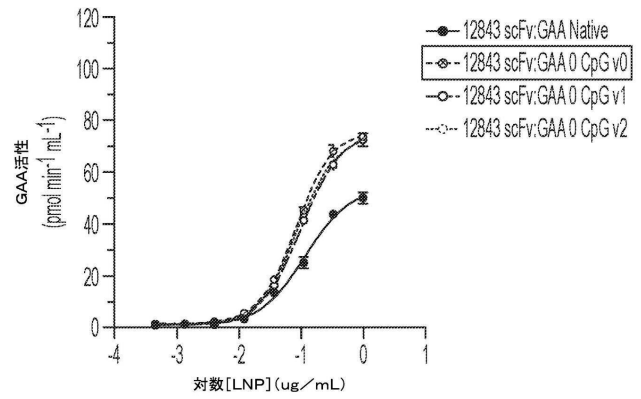
【図 2 5 A】

抗TFRC(クローン12847):GAA鑄型バージョン



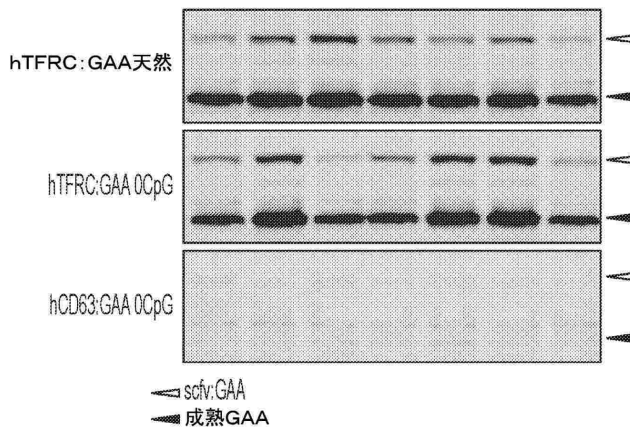
【図 2 5 B】

抗TFRC(12843):GAA鑄型バージョン

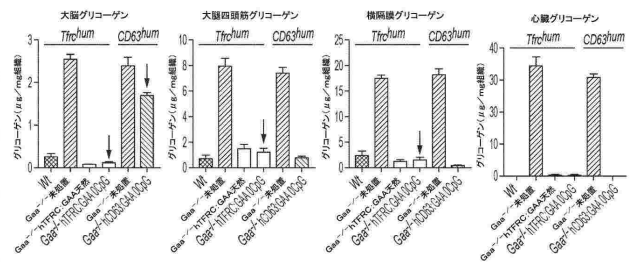


【図 2 6 A】

脳hGAA WB



【図 2 6 B】



10

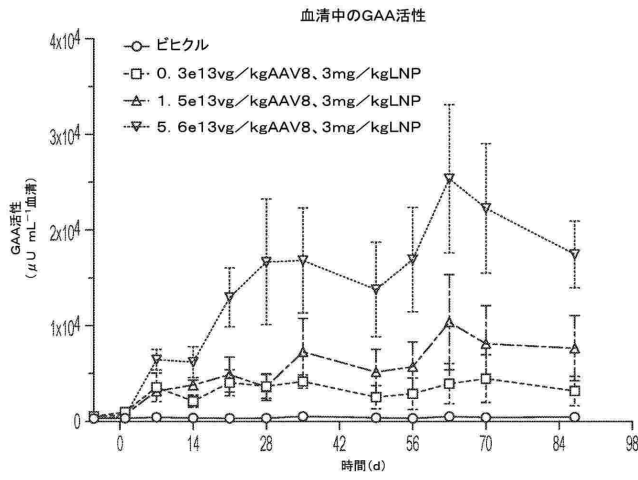
20

30

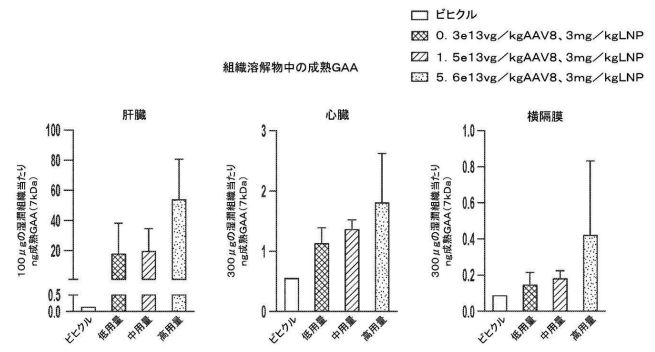
40

50

【図 27 A】



【図 27 B】



10

【配列表】

2025508677000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061858

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N9/26	C07K16/00
	C12N15/861	C12N15/86
	A61P43/00	
	C07K19/00	C12N9/22
	C12N15/90	A61K48/00
		C12N15/11
		A61P3/00
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 C07K A61K A61P		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/046774 A1 (GENETHON [FR]; INST NAT SANTÉ RECH MED [FR] ET AL.) 15 March 2018 (2018-03-15) INVENTION 1 page 25, paragraph 2 page 47; table 1 sequence co2 ----- -/-	1, 3-110, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 636
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July 2023		Date of mailing of the international search report 07/08/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tudor, Mark

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061858

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UNNISA ZEENATH ET AL: "Gene Therapy Developments for Pompe Disease", BIOMEDICINES, vol. 10, no. 2, 28 January 2022 (2022-01-28), pages 1-26, XP093038222, DOI: 10.3390/biomedicines10020302 INVENTION 1 abstract Section 3.1.2 figure 3	1,3-110, 619,621, 623,625, 627,629, 631,633, 635,636
Y	SUSAN M. FAUST ET AL: "CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 123, no. 7, 17 June 2013 (2013-06-17), pages 2994-3001, XP055646367, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI68205 INVENTION 1 abstract page 2994 - page 3001	1,3-110, 619,621, 623,625, 627,629, 631,633, 635,636
Y	WO 2019/157224 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 15 August 2019 (2019-08-15) cited in the application INVENTION 2 = anti-CD63 GAA - not codon optimized paragraphs [0009], [0014], [0163] examples 1,6,7,8	1,2,111, 119,132, 147,161, 170,183, 619,635
Y	WO 2019/222663 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 21 November 2019 (2019-11-21) cited in the application INVENTION 2 = anti-CD63-GAA example 2 claims 13,14	1,2,111, 119,132, 147,161, 170,183, 619,635
Y	BAIK ANDREW ET AL: "Next-generation antibody-guided enzyme replacement therapy in Pompe disease mice", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 123, no. 2, 6 February 2018 (2018-02-06), XP085441670, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2017.12.028 INVENTION 2 = hGAA+anti-CD63 abstract	1,2,111, 119,132, 147,161, 170,183, 619,635

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061858

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/151539 A1 (JAPAN CHEM RES [JP]) 8 August 2019 (2019-08-08) INVENTION 3 = anti-hTfR-GAA paragraphs [0084] - [0090] claims 30-32 -----	1,218, 343,356, 369,381, 386,400, 619,635, 638,646
Y	TANAKA SATOWA ET AL: "A novel approach to CNS dysfunction of Pompe disease with a fusion protein consisting of anti-transferrin receptor antibody and GAA enzyme", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 129, no. 2, 31 January 2020 (2020-01-31), XP086021702, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2019.11.399 INVENTION 3 = anti-TfR-GAA abstract -----	1,218, 343,356, 369,381, 386,400, 619,635, 638,646
Y	WO 2020/102645 A1 (ASKLEPIOS BIOPHARMACEUTICAL INC [US]) 22 May 2020 (2020-05-22) Y INVENTIONS 1-3 = targeted codon optimized, CpG depleted GAA + signal sequence paragraphs [0012], [0014], [0016], [0031], [0321] claims 1-4,12,14,16,57,58,61,63,65,69-71 sequences 73-76 ----- -/--	1-111, 119,132, 147,161, 170,183, 218,343, 356,369, 381,386, 400,619, 621,623, 625,627, 629,631, 633,635, 636,638, 646

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061858

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/222411 A1 (SPARK THERAPEUTICS INC) 21 November 2019 (2019-11-21) Y INVENTIONS 1-3 = codon optimized, CpG depleted GAA paragraphs [0003] - [0091] claims 1-88 -----	1-111, 119, 132, 147, 161, 170, 183, 218, 343, 356, 369, 381, 386, 400, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 636, 638, 646

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/061858

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/061858**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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-433, 619-647
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.:

30

40

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2023/061858

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 3-110, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 636(all partially)

A composition comprising a nucleic acid construct comprising a coding sequence for a multidomain therapeutic protein comprising a delivery domain fused to a lysosomal alpha-glucosidase (GAA), wherein the GAA coding sequence is CpG-depleted relative to a wild type GAA coding sequence.

2. claims: 2(completely); 1, 3-217, 619-637(partially)

A composition comprising a nucleic acid construct comprising a coding sequence for a multidomain therapeutic protein comprising a CD63-binding delivery domain fused to a GAA, wherein the GAA coding sequence is CpG-depleted relative to a wild type GAA coding sequence.

3. claims: 218-433, 638-647(completely); 1, 619-637(partially)

A composition comprising a nucleic acid construct comprising a coding sequence for a multidomain therapeutic protein comprising a TfR-binding delivery domain fused to a GAA, wherein the GAA coding sequence is CpG-depleted relative to a wild type GAA coding sequence.

4. claims: 434-618(completely); 619-637(partially)

A composition comprising a nucleic acid construct comprising a coding sequence for GAA, wherein the GAA coding sequence is CpG-depleted relative to a wild type GAA coding sequence.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2023/061858

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 112-118, 120-131, 133-146, 148-160, 162-169, 171-182, 184-217, 219-342, 344-355, 357-368, 370-380, 382-385, 387-399, 401-618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 637, 639-645, 647 (completely); 1-111, 119, 132, 147, 161, 170, 183, 218, 343, 356, 369, 381, 386, 400, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 636, 638, 646 (partially). Regarding invention 2, invention 2 appears to contain 236 claims, of which 58 are independent. There is little clear distinction between the independent claims because of their considerable overlapping scope. Additionally, there are so many dependent claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, because they create a smoke screen in front of the skilled reader when assessing what should be the subject-matter to search. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19 and 9.25).

The search for invention 2 was based on the subject-matter that, as far as can be understood, could reasonably be expected to be claimed later in the procedure, and the corresponding claims, namely independent claims 2, 111, 119, 132, 147, 161, 170, 183, 619 and 635.

Regarding invention 3, invention 3 appears to contain 237 claims, of which 36 are independent. There is no clear distinction between the independent claims because of their overlapping scope.

Additionally, there are so many dependent claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, because they create a smoke screen in front of the skilled reader when assessing what should be the subject-matter to search. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19 and 9.25).

The search for invention 3 was based on the subject-matter that, as far as can be understood, could reasonably be expected to be claimed later in the procedure, and the corresponding claims, namely independent claims 218, 343, 356, 369, 381, 386, 400, 619, 635, 638 and 646.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/061858

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018046774 A1	15-03-2018	AU 2017322376 A1	28-03-2019
		BR 112019004785 A2	04-06-2019
		CA 3035868 A1	15-03-2018
		CL 2019000609 A1	05-07-2019
		CN 110050063 A	23-07-2019
		CO 2019002252 A2	21-05-2019
		EP 3510149 A1	17-07-2019
		IL 265084 A	30-04-2019
		IL 299325 A	01-02-2023
		JP 7245155 B2	23-03-2023
		JP 2019533990 A	28-11-2019
		JP 2023072007 A	23-05-2023
		KR 20190057327 A	28-05-2019
		PE 20191203 A1	10-09-2019
		PH 12019500408 A1	20-01-2020
		RU 2019110773 A	12-10-2020
		SG 11201901494U A	28-03-2019
		US 2019390225 A1	26-12-2019
		US 2022275396 A1	01-09-2022
		WO 2018046774 A1	15-03-2018
WO 2019157224 A1	15-08-2019	AU 2019218892 A1	01-10-2020
		BR 112020016005 A2	15-12-2020
		CA 3090519 A1	15-08-2019
		CL 2020002043 A1	23-07-2021
		CN 112040985 A	04-12-2020
		CO 2020011068 A2	10-12-2020
		EP 3749373 A1	16-12-2020
		IL 276464 A	30-09-2020
		JP 2021512899 A	20-05-2021
		JP 2023054256 A	13-04-2023
		KR 20200118151 A	14-10-2020
		MA 51796 A	16-12-2020
		PH 12020551180 A1	07-06-2021
		RU 2020129184 A	09-03-2022
		SG 11202007363T A	28-08-2020
		US 2020399623 A1	24-12-2020
		WO 2019157224 A1	15-08-2019
WO 2019222663 A1	21-11-2019	AU 2019269685 A1	03-12-2020
		BR 112020023145 A2	02-02-2021
		CA 3100021 A1	21-11-2019
		CL 2020002965 A1	06-08-2021
		CL 2022000094 A1	24-02-2023
		CN 112135624 A	25-12-2020
		CO 2020015052 A2	10-12-2020
		EP 3793591 A1	24-03-2021
		JP 2021524231 A	13-09-2021
		KR 20210010916 A	28-01-2021
		MA 52626 A	24-03-2021
		PH 12020551955 A1	16-08-2021
		SG 11202011232V A	30-12-2020
		US 2021079109 A1	18-03-2021
		WO 2019222663 A1	21-11-2019
WO 2019151539 A1	08-08-2019	AU 2019215782 A1	16-07-2020
		BR 112020013305 A2	02-02-2021
		CA 3090373 A1	08-08-2019

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/061858

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 111683972 A	18-09-2020
		EA 202091816 A1	26-10-2020
		EP 3750921 A1	16-12-2020
		IL 276327 A	30-09-2020
		JP 2019137675 A	22-08-2019
		KR 20200116952 A	13-10-2020
		SG 11202006433P A	28-08-2020
		US 2021038739 A1	11-02-2021
		WO 2019151539 A1	08-08-2019

WO 2020102645 A1	22-05-2020	AU 2019381776 A1	01-07-2021
		CA 3120105 A1	22-05-2020
		CN 113316639 A	27-08-2021
		EP 3880823 A1	22-09-2021
		JP 2022513067 A	07-02-2022
		US 2022054656 A1	24-02-2022
		WO 2020102645 A1	22-05-2020

WO 2019222411 A1	21-11-2019	AU 2019268363 A1	07-01-2021
		BR 112020023393 A2	09-02-2021
		CA 3100213 A1	21-11-2019
		CL 2020002973 A1	19-07-2021
		CN 112334489 A	05-02-2021
		CO 2020015707 A2	19-03-2021
		EP 3794043 A1	24-03-2021
		JP 2021523718 A	09-09-2021
		KR 20210021310 A	25-02-2021
		PE 20210337 A1	19-02-2021
		PH 12020551957 A1	20-09-2021
		SG 11202011191W A	30-12-2020
		TW 202016310 A	01-05-2020
		US 2021222141 A1	22-07-2021
		WO 2019222411 A1	21-11-2019

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	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	38/47	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	38/47	
			A 6 1 K	47/68	

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,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,V
N,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 石川 大輔

(74)代理人

230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者

バイク, アンドリュー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ブラガスティス, マリア

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

シグナー, キャサリン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

サビン, リア

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

サマイ, ポウラミ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ペファニス, エヴァンゲロス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

カラファティ, フィリップ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

キーティング, ニコル

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

エメーウィルソン, パスカリーヌ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ドウガン, ジョン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

-
- (72)発明者 ガオ, ミン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
 ド ７７７, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 バブ, ロバート
 アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
 ド ７７７, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 フォルゲット, アンソニー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９, ケンブリッジ, エリー ストリート ４０, イ
 ンテリア セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
- F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA44
 4C076 BB11 BB13 CC21 CC26 CC29 EE41 EE59
 4C084 AA13 MA17 MA55 MA66 NA14 ZB211 ZB212 ZC021 ZC022 ZC211
 ZC212 ZC511 ZC512