

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7534961号

(P7534961)

(45)発行日 令和6年8月15日(2024.8.15)

(24)登録日 令和6年8月6日(2024.8.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 17 (全50頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-570457(P2020-570457)

(86)(22)出願日 令和1年6月18日(2019.6.18)

(65)公表番号 特表2021-527418(P2021-527418
A)

(43)公表日 令和3年10月14日(2021.10.14)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/037769

(87)国際公開番号 WO2019/246125

(87)国際公開日 令和1年12月26日(2019.12.26)

審査請求日 令和4年6月20日(2022.6.20)

(31)優先権主張番号 62/686,522

(32)優先日 平成30年6月18日(2018.6.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 515289842

リサーチ インスティテュート アット
ネーションワイド チルドレンズ ホスピ
タルアメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5 ,
コロンバス, チルドレンズ ドライブ
7 0 0 , ルーム ダブルユー 1 7 2

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ジストログリカノパチーおよびラミン欠損筋ジストロフィーを治療するための組換えアデノ随伴ウイルス生成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、

i) 前記ポリヌクレオチドが、5'から3'の方向配列番号13のヌクレオチド配列、直後に続く配列番号15のヌクレオチド配列を含む、またはii) 前記ポリヌクレオチドが、5'から3'の方向配列番号13のヌクレオチド配列、直後に続く配列番号16のヌクレオチド配列を含む、
ポリヌクレオチド。

【請求項2】

i) 配列番号1のヌクレオチド配列、またはii) 配列番号19のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項3】

i) 配列番号5のヌクレオチド配列、またはii) 配列番号21のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)であって、前記rAAVのゲノムが、請求項1~3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含み、前記rAAVは細胞に感染できる、rAAV。

【請求項5】

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)であって、前記rAAVのゲノムが、 20

a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列、または

b) 配列番号5のポリヌクレオチド配列

を含み、前記 r A A V は細胞に感染する能力を有する、r A A V。

【請求項6】

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、a) 配列番号2のヌクレオチド3590~8215、またはb) 配列番号6のヌクレオチド3609~6929を含み、前記 r A A V は細胞に感染する能力を有する、r A A V。

【請求項7】

前記 r A A V のゲノムが、筋肉特異的転写制御因子をさらに含む、請求項5に記載の r A A V。

【請求項8】

前記ゲノムが、CMVプロモーターをさらに含む、請求項5に記載の r A A V。

【請求項9】

A A V 9、A A V 10、A A V r h 7 4、A A V 8、またはA A V 6カプシドを含む、請求項4~8のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項10】

請求項4~9のいずれか一項に記載の r A A V を含む、r A A V 粒子。

【請求項11】

請求項1~3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞。

【請求項12】

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞またはH E K 2 9 3細胞である、請求項11に記載の組換え宿主細胞。

【請求項13】

請求項1~3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、タンパク質。

【請求項14】

請求項1~3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項4~9のいずれか一項に記載の r A A V、請求項10に記載の r A A V 粒子、または請求項13に記載のタンパク質を含む、組成物。

【請求項15】

ラミニン欠損筋ジストロフィーまたはジストログリカノパチーの治療を必要とする患者において前記治療を行う際に使用するための組成物であって、前記組成物が、請求項1~3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項4~9のいずれか一項に記載の r A A V、請求項10に記載の r A A V 粒子、もしくは請求項13に記載のタンパク質、または請求項14に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項16】

前記ラミニン欠損筋ジストロフィーが、M D C 1 Aである、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

前記ジストログリカノパチーが、ウォーカー・ワールブルグ症候群、筋眼脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、M D C 1 C、M D C 1 D、L G M D 2 I、L G M D 2 K、L G M D 2 M、L G M D 2 N、L G M D 2 O、L G M D 2 P、L G M D 2 T、またはL G M D 2 Uである、請求項15に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年6月18日に出願された米国仮特許出願第62/686,522号の優先権を主張し、この仮特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明は、米国国立衛生研究所により与えられたA R 0 7 0 6 0 4の下、政府の支援により為された。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

本出願は、本開示の別個の部分として、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、ファイル名：53147A_SeqListing.txt、サイズ：125,439バイト、作成：2019年6月18日として認識されるコンピュータ可読形態の配列表を含む。

【0003】

ジストログリカノパチーおよびラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための生成物および方法が提供される。この方法では、ヘパリン結合上皮成長因子様成長因子(HBEGF)のヘパリン結合ドメインなどのリンカードメインを含むタンパク質が患者に送達される。このリンカータンパク質は、導入遺伝子を筋肉細胞の細胞外マトリックス(ECM)に対して標的化するのに役立つ。

10

【背景技術】

【0004】

筋ジストロフィー(MD)は遺伝性疾患のグループである。このグループは、動作を制御する骨格筋の進行性の衰弱および変性を特徴とする。MDのいくつかの形態は乳児期または小児期に発症するが、他の形態は中年以降まで現れない場合がある。障害は、筋力低下の分布および程度(MDのいくつかの形態は心筋にも影響を及ぼす)、発病年齢、進行速度、ならびに遺伝形式の点で異なる。

【0005】

先天性筋ジストロフィー(CMD)は、筋肉の構成成分の喪失が新生児の筋緊張低下および進行性の骨格筋の衰弱をもたらすMDのグループを表す。これらの障害は、脳および眼の発達障害、認知障害、発作、ならびに呼吸器および心臓の異常を含む重大な筋肉外合併症に関連していることが多く、学際的なチームによる定期的な医学的管理が必要である。CMDの推定発生率は、世界中で21,500人の出生に1人である。これらの障害の重大さにもかかわらず、現在、承認された効果的な療法はない。ジストログリカノパチーおよびメロシン欠損CMD1A型(MDC1A)は、CMDの最も一般的な形態のうちの2つである[Sframeli et al., Neuromuscul Disord., 27(9):793-803(2017)]。

20

【0006】

ジストログリカノパチーは、
- ジストログリカンのグリコシル化に必要な18以上の遺伝子のうちのいずれかにおける変異によって引き起こされる。適切なグリコシル化により、
- ジストログリカンが細胞外マトリックス(ECM)の要素に結合することができる。次に、
- ジストログリカンは、膜貫通タンパク質である
- ジストログリカンに結合することにより、筋鞘に固定される。感受性遺伝子の数により、ジストログリカノパチーのための単一の遺伝子置換療法の開発は不可能である。ジストログリカノパチーの例には以下が含まれる。ウォーカー・ワールブルグ症候群(WWS)は、B3GLNT2、B4GAT1、DAG1、FKRP、FKTN、GMPPB、ISPD、またはLARGEにおける遺伝子変異を伴う。筋眼脳病(MEB)は、B3GLNT2、B4GAT1、DAG1、FKRP、FKTN、GMPPB、ISPD、またはLARGEにおける遺伝子変異を伴う。福山型CMDは、FKTN遺伝子における変異を伴う。認知障害を伴う先天性筋ジストロフィーのグループは、FKRP、LARGE、POMT1、POMT2、またはPOMGNT1における変異に起因する。認知障害のないCMDのグループは、FKRPまたはFKTNの遺伝子変異の結果である。肢帯型筋ジストロフィーLGMD2I、2K、2M、2N、および2Oは、FKRP、FKTN、POMGNT1、POMT1、またはPOMT2における遺伝子変異を伴うグリコシル化異常に関連する。肢帯型筋ジストロフィーLGMD2Tおよび2Uは、それぞれGMPPBおよびISPDにおける遺伝子変異の結果である。ジストログリカノパチーにおける他の変異遺伝子には、DOLK、DPM1、DPM2、DPM3、GTDC2/AG061、TMEM5、およびSK196が含まれる。

30

40

【0007】

50

MDC1Aは、筋鞘でグリコシル化された -ジストログリカンに結合する重要なECMタンパク質であるラミニン-2をコードするLAMA2遺伝子における変異によって引き起こされる。完全なLAMA2遺伝子の長さは、9,000塩基対を超える。

【0008】

Reinhardおよび同僚による研究[Reinhard et al., Sci Transl Med., 9(396), (2017)]は、ラミニン-4およびミニアグリンからの融合ドメインの生殖系列発現を伴い、MDC1AのdyW/dyWマウスモデルにおける疾患症状を不完全に寛解させた。

【0009】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは、2つの145ヌクレオチド逆方向末端反復(ITR)を含む約4.7kb長である。AAVの複数の血清型がある。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列が既知である。例えば、AAV-1の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC_002077に提供されており、AAV-2の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC_001401およびSrivastava et al., J. Virol., 45:555-564(1983)に提供されており、AAV-3の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC_1829に提供されており、AAV-4の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC_001829に提供されており、AAV-5ゲノムは、GenBank受入番号AF085716に提供されており、AAV-6の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC_001862に提供されており、AAV-7およびAAV-8ゲノムの少なくとも部分は、それぞれ、GenBank受入番号AX753246およびAX753249に提供されており、AAV-9ゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78:6381-6388(2004)に提供されており、AAV-10ゲノムは、Mol. Ther., 13(1):67-76(2006)に提供されており、AAV-11ゲノムは、Virology, 330(2):375-383(2004)に提供されており、AAV-12ゲノムの部分は、GenBank受入番号DQ813647に提供されており、AAV-13ゲノムの部分は、GenBank受入番号EU285562に提供されている。AAVrh.74ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,434,928号に提供されている。ウイルスDNA複製(rep)、カプシド形成/パッケージング、および宿主細胞染色体組込みを指示するCis作用配列は、AAV ITR内に含有される。3つのAAVプロモーター(それらの相対マップ位置に対してp5、p19、およびp40と名付けられる)は、repおよびcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を推進する。単一のAAVイントロンの差別的スプライシング(ヌクレオチド2107および2227における)と相まって、2つのrepプロモーター(p5およびp19)により、rep遺伝子から4つのrepタンパク質(rep78、rep68、rep52、およびrep40)が生成される。Repタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に参与する複数の酵素特性を有する。cap遺伝子は、p40プロモーターから発現され、3つのカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連カプシドタンパク質の産生に参与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、AAVゲノムのマップ位置95に位置する。AAVの生活環および遺伝学は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158:97-129(1992)においてレビューされる。

【0010】

AAVは、例えば、遺伝子療法において、外来DNAを細胞に送達するためのベクターとして魅力的にする固有の特徴を有する。培養中の細胞のAAV感染は、非細胞変性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染は、サイレントかつ無症候性である。さらに、AAVは、多くの哺乳動物細胞を感染させ、インビボで多くの異なる組織を標的化する可能性を可能にする。さらに、AAVは、緩徐に分裂する細胞および非分裂細胞を形質導入し、転

10

20

30

40

50

写的に活性な核エピソーム（染色体外要素）として本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続し得る。AAVプロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド内のクローニングされたDNAとして挿入される。さらに、AAV複製およびゲノムカプシド形成を指示するシグナルが、AAVゲノムのITR内に含有されるため、内部約4.3 kbのゲノム（複製および構造カプシドタンパク質をコードする、rep-cap）の一部またはすべてが、外来DNAで置換されてもよい。AAVベクターを生成するために、repおよびcapタンパク質は、トランスで提供され得る。AAVの別の重要な特徴は、それが極めて安定した頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件（56 ~ 65 で数時間）に容易に耐え、AAVの低温保存の重要性を低くする。AAVは、凍結乾燥され得る。最後に、AAV感染細胞は、重複感染に耐性を示さない。

10

ジストログリカノパチーおよびMDC1AなどのCMDの治療に対する当該技術分野の必要性は依然として残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【文献】Sframeli et al., Neuromuscul Disord., 27(9):793-803(2017)

【文献】Reinhard et al., Sci Transl Med., 9(396), (2017)

20

【文献】Srivastava et al., J. Virol., 45:555-564(1983)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

ジストログリカノパチーおよびラミニン欠損筋ジストロフィーなどのCMDの治療のための方法および生成物が本明細書で提供される。生成物には、治療用タンパク質および開示される治療用タンパク質をコードするrAAVが含まれる。

【0013】

a) ヘパリン結合上皮成長因子様成長因子(HBEGF)のヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトラミニンアルファ2(LAMA2)遺伝子のG1-G5ドメインを含む第2のドメイン、

30

b) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1-G5ドメインを含む第2のドメイン、

c) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3-G5ドメインを含む第2のドメイン、

d) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3-G5ドメインを含む第2のドメイン、

40

e) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびDAG1アルファを含む第2のドメイン、または

f) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびDAG1アルファを含む第2のドメインを含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドが提供される。

【0014】

一実施形態では、提供されるポリヌクレオチドはタンパク質をコードし、タンパク質の第1のドメインは、配列番号13または配列番号14のヌクレオチド配列によってコードされ、タンパク質の第2のドメインは、配列番号15、配列番号16、または配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされる。

50

【 0 0 1 5 】

例えば、提供されるポリヌクレオチドは、配列番号 1 3 および配列番号 1 5 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 1 3 および配列番号 1 6 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 1 4 および配列番号 1 5 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 1 4 および配列番号 1 6 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 1 3 および配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 1 4 および配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 6 】

一実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの 1 つ：i) 図 3 に示されるヌクレオチド配列、ii) 図 3 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 3 2 3 5 を含むヌクレオチド配列、iii) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、またはiv) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 1 7 】

別の実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの 1 つ：i) 図 4 に示されるヌクレオチド配列、ii) 図 4 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 3 3 6 1 を含むヌクレオチド配列、iii) 配列番号 3 のヌクレオチド配列、またはiv) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 8 】

さらなる実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの 1 つ：i) 図 5 に示されるヌクレオチド配列、ii) 図 5 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 1 9 3 0 を含むヌクレオチド配列、iii) 配列番号 5 のヌクレオチド配列、またはiv) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 1 9 】

別の実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの 1 つ：i) 図 6 に示されるヌクレオチド配列、ii) 図 6 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 2 0 5 6 を含むヌクレオチド配列、iii) 配列番号 7 のヌクレオチド配列、またはiv) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 0 】

一実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの 1 つ：i) 図 7 に示されるヌクレオチド配列、ii) 図 7 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 1 3 6 0 を含むヌクレオチド配列、iii) 配列番号 9 のヌクレオチド配列、またはiv) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 0 2 1 】

別の実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの 1 つ：i) 図 8 に示されるヌクレオチド配列、ii) 図 8 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 1 4 8 6 を含むヌクレオチド配列、iii) 配列番号 1 1 のヌクレオチド配列、またはiv) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 2 】

提供されるポリヌクレオチドのいずれかによってコードされる治療用タンパク質も提供される。例えば、提供されるタンパク質は、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、または配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 2 3 】

加えて、本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれかを含む組換え宿主細胞を提供する。例示的な実施形態では、宿主細胞、ポリヌクレオチドは、転写制御因子に作動可能に連結されており、これらの宿主細胞は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれかを発現する。例えば、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはヒト HEK 2 9 3 細胞である。

【 0 0 2 4 】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) がさらに提供され、rAAV のゲノムは、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれかを含む。例えば、rAAV が提供され、rAA

50

Vのゲノムは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、または配列番号11のポリヌクレオチド配列を含む。例示的な実施形態では、rAAVゲノムは、CMVプロモーター（配列番号18）、MCK、NHCK、LAMA2、またはtMCKなどの筋肉特異的転写制御因子をさらに含む。本明細書に記載のrAAVのいずれも、AAV9、AAV10、AAVrh74、AAV8、またはAAV6カプシドを含む。

【0025】

rAAVも提供され、rAAVのゲノムは、配列番号2のヌクレオチド3590～8215、配列番号4のヌクレオチド3590～8341、配列番号6のヌクレオチド3609～6929、配列番号8のヌクレオチド3590～7036、配列番号10のヌクレオチド3590～6340、配列番号12のヌクレオチド3590～6049、図13に示されるヌクレオチド配列、または図14に示されるヌクレオチド配列を含む。

10

【0026】

本明細書に記載のrAAVのいずれかを含むrAAV粒子も提供される。本開示はまた、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、本明細書に開示されるrAAVのいずれか、本明細書に開示されるrAAV粒子のいずれか、または本明細書に開示されるタンパク質のいずれかを含む組成物を提供する。

【0027】

ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための方法が提供され、これには、治療を必要とする患者にrAAVを投与することが含まれ、rAAVのゲノムは、

a) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1-G5ドメインを含む第2のドメイン、

20

b) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1-G5ドメインを含む第2のドメイン、

c) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3-G5ドメインを含む第2のドメイン、または

d) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3-G5ドメインを含む第2のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0028】

30

例えば、ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療する方法は、治療を必要とする患者に、次のいずれか：第2のドメインとしてLAMA2（G1-G5）またはLAMA2（G3-G5）を含むタンパク質をコードする、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、第2のドメインとしてLAMA2（G1-G5）またはLAMA2（G3-G5）を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に開示されるrAAVまたはrAAV粒子のいずれかを投与することを含む。

【0029】

ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための方法がさらに提供され、これには、治療を必要とする患者に、

a) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1-G5ドメインを含む第2のドメイン、

40

b) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1-G5ドメインを含む第2のドメイン、

c) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3-G5ドメインを含む第2のドメイン、または

d) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3-G5ドメインを含む第2のドメイン、を含むタンパク質を投与することが含まれる。

【0030】

50

例えば、ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための方法は、治療を必要とする患者にタンパク質を投与することを含み、タンパク質は、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、または配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。

【0031】

rAAVを含むラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための組成物も提供され、rAAVのゲノムは、

a) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1 - G5ドメインを含む第2のドメイン、

b) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1 - G5ドメインを含む第2のドメイン、

c) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3 - G5ドメインを含む第2のドメイン、または

d) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3 - G5ドメインを含む第2のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0032】

例えば、ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための組成物は、次のいずれか：第2のドメインとしてLAMA2(G1 - G5)またはLAMA2(G3 - G5)を含むタンパク質をコードする、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、第2のドメインとしてLAMA2(G1 - G5)またはLAMA2(G3 - G5)を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に開示されるrAAVまたはrAAV粒子のいずれかを含む。

【0033】

タンパク質を含むラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための組成物がさらに提供され、タンパク質は、

a) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1 - G5ドメインを含む第2のドメイン、

b) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1 - G5ドメインを含む第2のドメイン、

c) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3 - G5ドメインを含む第2のドメイン、または

d) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3 - G5ドメインを含む第2のドメインを含む。

【0034】

例えば、ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための組成物は、タンパク質を含み、タンパク質は、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、または配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。

【0035】

本開示はまた、ラミニン欠損筋ジストロフィーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のためのrAAVの使用を提供し、rAAVのゲノムは、

a) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1 - G5ドメインを含む第2のドメイン、

b) HBEGFのヘパリン結合ドメインと、HBEGFのEGF様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG1 - G5ドメインを含む第2のドメイン、

c) HBEGFのヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒトLAMA2遺伝子のG3 - G5ドメインを含む第2のドメイン、または

d) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒト L A M A 2 遺伝子の G 3 - G 5 ドメインを含む第2のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0036】

例えば、本開示はまた、次のいずれか：ラミニン欠損筋ジストロフィーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のための、第2のドメインとして L A M A 2 (G 1 - G 5) または L A M A 2 (G 3 - G 5) を含むタンパク質をコードする、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、第2のドメインとして L A M A 2 (G 1 - G 5) または L A M A 2 (G 3 - G 5) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に開示される r A A V または r A A V 粒子のいずれかの使用を提供する。

10

【0037】

本開示は、さらにラミニン欠損筋ジストロフィーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のためのタンパク質の使用を提供し、タンパク質は、

a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒト L A M A 2 遺伝子の G 1 - G 5 ドメインを含む第2のドメイン、

b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒト L A M A 2 遺伝子の G 1 - G 5 ドメインを含む第2のドメイン、

c) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、およびヒト L A M A 2 遺伝子の G 3 - G 5 ドメインを含む第2のドメイン、または

20

d) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第1のドメイン、およびヒト L A M A 2 遺伝子の G 3 - G 5 ドメインを含む第2のドメインを含む。

【0038】

例えば、本開示はまた、ラミニン欠損筋ジストロフィーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のためのタンパク質の使用を提供し、タンパク質は、配列番号19、配列番号20、配列番号21、または配列番号22のアミノ酸配列を含む。

【0039】

ジストログリカノパチーを治療するための方法も提供され、これには、治療を必要とする患者に r A A V を投与することが含まれ、r A A V のゲノムは、

30

a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第2のドメイン、または

b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第1のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第2のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0040】

例えば、ジストログリカノパチーを治療する方法は、治療を必要とする患者に、次のいずれか：第2のドメインとして D A G 1 アルファを含むタンパク質をコードする、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、第2のドメインとして D A G 1 アルファを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に開示される r A A V または r A A V 粒子のいずれかを投与することを含む。

40

【0041】

ジストログリカノパチーを治療するための方法がまたさらに提供され、これには、治療を必要とする患者に、

a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第1のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第2のドメイン、または

b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第1のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第2のドメイン、を含むタンパク質を投与することが含まれる。

50

【 0 0 4 2 】

例えば、治療を必要とする患者にタンパク質を投与することを含む、ジストログリカノパチーを治療するための方法であって、タンパク質は、配列番号 2 3 または配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 3 】

r A A V を含むジストログリカノパチーを治療するための組成物も提供され、r A A V のゲノムは、

- a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、または
- b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを含む。

10

【 0 0 4 4 】

例えば、本開示は、次のいずれか：第 2 のドメインとして D A G 1 アルファを含むタンパク質をコードする、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、または第 2 のドメインとして D A G 1 アルファを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に開示される r A A V もしくは r A A V 粒子のいずれかを含む、ジストログリカノパチーを治療するための組成物を提供する。

【 0 0 4 5 】

タンパク質を含むジストログリカノパチーを治療するための組成物がまたさらに提供され、タンパク質は、

- a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、または
- b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメインを含む。

20

【 0 0 4 6 】

例えば、ジストログリカノパチーを治療するための組成物は、タンパク質を含み、タンパク質は、配列番号 2 3 または配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 7 】

ジストログリカノパチーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のための r A A V の使用も提供され、r A A V のゲノムは、

- a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、または
- b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを含む。

30

【 0 0 4 8 】

例えば、本開示は、次のいずれか：ジストログリカノパチーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のための、第 2 のドメインとして D A G 1 アルファを含むタンパク質をコードする、本明細書に開示されるポリヌクレオチドのいずれか、または第 2 のドメインとして D A G 1 アルファを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に開示される r A A V もしくは r A A V 粒子のいずれかの使用を提供する。

40

【 0 0 4 9 】

ジストログリカノパチーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のためのタンパク質の使用がまたさらに提供され、タンパク質は、

- a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、または
- b) H B E G F のヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメインを含む。

50

【 0 0 5 0 】

例えば、本開示は、ジストログリカノパチーの治療を必要とする患者における、治療を行うための薬剤の調製のためのタンパク質の使用を提供し、タンパク質は、配列番号配列番号 2 3 または配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 1 】

提供されるラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための方法、使用、または組成物において、ラミニン欠損筋ジストロフィーは、例えば、MDC 1 A であり得る。

【 0 0 5 2 】

ジストログリカノパチーを治療するための方法、使用、または組成物のいずれにおいても、ジストログリカノパチーは、例えば、ウォーカー・ワールブルグ症候群、筋眼脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、MDC 1 C、MDC 1 D、LGMD 2 I、LGMD 2 K、LGMD 2 M、LGMD 2 N、LGMD 2 O、LGMD 2 P、LGMD 2 T、または LGMD 2 U である。

10

【 0 0 5 3 】

提供されるタンパク質の例を表 1 に示す。

【表 1】

表 1 :

治療用タンパク質	リンカー/ラミニン	図	図のヌクレオチドまたは配列番号によってコードされる：	タンパク質配列番号	プラスミド配列番号/図
HB-LAMA2(G1-G5)	HB ドメインの後に終了	3	図 3 の 14~3235 配列番号 1	19	配列番号 2 図 19
HBEGF-LAMA2(G1-G5)	完全な可溶型 HBEGF	4	図 4 の 14~3361 配列番号 3	20	配列番号 4 図 20
HB-LAMA2(G3-G5)	HB ドメインの後に終了	5	図 5 の 14~1930 配列番号 5	21	配列番号 6 図 21
HBEGF-LAMA2(G3-G5)	完全な可溶型 HBEGF	6	図 6 の 14~2056 配列番号 7	22	配列番号 8 図 22
HB-DAG1	HB ドメインの後に終了	7	図 7 の 14~1360 配列番号 9	23	配列番号 10 図 23
HBEGF-DAG1	完全な可溶型 HBEGF	8	図 8 の 14~1486 配列番号 11	24	配列番号 12 図 24

20

30

【 0 0 5 4 】

特許または出願ファイルには、カラーで作成された図面が少なくとも 1 つ含まれている。カラー図面およびカラー写真を含むこの特許または特許出願の出版物のコピーは、要請および必要な料金の支払いに応じて、官庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 5 】

【図 1 - 1】 [図 1 A] ジストロフィン関連糖タンパク質 (DAG) 複合体を示す。 [図 1 B] ジストログリカンがジストログリカノパチーにおいて異常にグリコシル化される (その正常なラミニン結合機能が失われる) だけでなく、ジストログリカンタンパク質が罹患筋肉において低減することを示す。 [図 1 C] 本明細書に記載の治療用タンパク質が、ジストログリカンが正常な量で存在するジストログリカンに結合することによって筋膜に連結し、ECM のヘパリン硫酸プロテオグリカンへの HBEGF の結合を介して、その適切な ECM 結合グリカンがなくても ECM に連結することを可能にすることを示す。これにより、ジストログリカンの ECM および筋膜への失われた連結が再構成される。これらの治療用タンパク質を提供する本明細書に記載の方法の使用は、18 以上の遺伝子型のジストログリカノパチーすべての治療に適応され、本方法は、各ジストログリカノパチーが異なる遺伝子療法の開発を必要とする遺伝子置換戦略の強力な代替法となる。

40

【図 1 - 2】 同上。

50

【図2-1】[図2A] MDC1Aが、体内の各筋肉細胞を取り囲む細胞外マトリックス（ECM）タンパク質であるラミニン2をコードするLAMA2遺伝子の機能喪失変異によって引き起こされることを示す。LAMA2は、ECMへの筋肉細胞接着および筋膜の安定性に必要である。[図2B]本明細書に記載の治療用タンパク質は、LAMA2 G1-G5ドメインが通常存在するECMにLAMA2 G1-G5ドメインを固定することができるため、LAMA2 G1-G5ドメインは天然ラミニン2と同様に機能することができることを示す。したがって、これらの治療用タンパク質を提供する本明細書に記載の方法の使用は、MDC1Aに適応される。

【図2-2】同上。

【図3-1】治療用タンパク質HB-EGF（ヘパリン結合ドメインで終了）-LAMA2 G1-G5をコードするポリヌクレオチド配列を示す。治療用タンパク質は、本発明のヌクレオチドによってコードされ、配列番号1にも対応するヌクレオチド14~3235を含む。

10

【図3-2】同上。

【図3-3】同上。

【図3-4】同上。

【図4-1】治療用タンパク質HB-EGF（完全な可溶型）-LAMA2 G1-G5をコードするポリヌクレオチド配列を示す。治療用タンパク質は、本発明のヌクレオチドによってコードされ、配列番号3にも対応するヌクレオチド14~3361を含む。

【図4-2】同上。

20

【図4-3】同上。

【図4-4】同上。

【図4-5】同上。

【図4-6】同上。

【図4-7】同上。

【図5-1】治療用タンパク質HB-EGF（ヘパリン結合ドメインで終了）-LAMA2 G3-G5をコードするポリヌクレオチド配列を示す。治療用タンパク質は、本発明のヌクレオチドによってコードされ、配列番号5にも対応するヌクレオチド14~1930を含む。

【図5-2】同上。

30

【図5-3】同上。

【図6-1】治療用タンパク質HB-EGF（完全な可溶型）-LAMA2 G3-G5をコードするポリヌクレオチド配列を示す。治療用タンパク質は、本発明のヌクレオチドによってコードされ、配列番号7にも対応するヌクレオチド14~2056を含む。

【図6-2】同上。

【図7-1】治療用タンパク質HB-EGF（ヘパリン結合ドメインで終了）-DAG1（天然のプロセッシングされたアルファDG遺伝子）をコードするポリヌクレオチド配列を示す。治療用タンパク質は、本発明のヌクレオチドによってコードされ、配列番号9にも対応するヌクレオチド14~1360を含む。

【図7-2】同上。

40

【図8-1】治療用タンパク質HB-EGF（完全な可溶型）-DAG1（天然のプロセッシングされたアルファDG遺伝子）をコードするポリヌクレオチド配列を示す。治療用タンパク質は、本発明のヌクレオチドによってコードされ、配列番号11にも対応するヌクレオチド14~1486を含む。

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

【図8-4】同上。

【図9-1】組換え哺乳類宿主細胞による、本明細書に記載の治療用タンパク質の発現を示す。

【図9-2】同上。

50

【図10】sHB-EGFが筋肉から分泌され得、細胞外マトリックスに付着することを示す。

【図11】sHB-EGFが治療用代理筋ジストロフィー遺伝子の発現を誘導することを示す。全長HBEGFは、治療用遺伝子発現を誘導しない。

【図12】sHB-EGFが骨格筋においてAktチロシンキナーゼカスケードを誘導し、筋肉の成長および再生を刺激することができることを示す。

【図13-1】治療用タンパク質HB-EGF（完全な可溶型）-LAMA2 G1-G5をコードする例示的なrAAVゲノムを示す。

【図13-2】同上。

【図13-3】同上。

【図13-4】同上。

【図14-1】治療用タンパク質HB-EGF（完全な可溶型）-DAG1（天然のプロセシングされたアルファDG遺伝子）をコードする例示的なrAAVゲノムを示す。

【図14-2】同上。

【図14-3】同上。

【図15】野生型マウスにおいて、HBEGF、HBEGF・LAMA2（G1-G5）、HBEGF・LAMA2（G3-G5）、HB・LAMA2（G1-G5）、HB・LAMA2（G3-G5）、またはLAMA2（G1-G5）を含有するrAAV9・CMVベクターの筋肉内注射後のHB-EGFおよびLG5（図では4H8-2と表される）の免疫組織化学的染色を提供する。偽注射されたマウス（緩衝液のみ）は、陰性対照として示される。4H8-2は、切片の筋肉細胞を示す抗ラミニン抗体である。

【図16】rAAV9・HBEGF-LAMA2（G1-G5）、HB-LAMA2（G1-G5）、またはLAMA2（G1-G5）をIM注射した筋肉のHB-EGFおよびラミニン球状ドメイン（LG5）の免疫組織化学的染色を提供する。下の下部のパネルは、二次抗体のみの染色を示す。

【図17】rAAV9・CMV・HB・LAMA（G1-G5）がdy/dyマウスの筋力低下を防止したことを示すグラフである。マウスに、HBEGF・LAMA2（G1-G5）、HB・LAMA2（G1-G5）、またはHB・LAMA2（G3-G5）を含有する 1×10^{12} vgのrAAV9・CMVベクターをIV注射した。マウスを、注射の2ヶ月および3ヶ月後に、偽注射されたdy/dy疾患対照および野生型正常対照と比較した。混合（50：50）雌：雄の性別をすべてのグループで使用した。エラーは、グループあたりn=12匹（野生型および偽dy/dy）、6匹（sHB-EGF・LAMA2 G1-G5およびHB・LAMA2 G1-G5）または5匹（HB・LAMA2 G3-G5）の動物のSEMであり、データ点あたり5つの測定を平均化した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001

【図18】P1でのIV注射後の4ヶ月齢のdy/dy筋肉（三頭筋）におけるHB・LAMA2（G1-G5）の発現を示すために、HB-EGFおよびLG5の免疫組織化学的染色を提供する。偽注射されたか、または 1×10^{12} vgのrAAV9・CMV・HB-LAMA2（G1-G5）を注射されたかのいずれかの4ヶ月齢の野生型およびdy/dyマウスの三頭筋からの筋肉切片を、トランスジェニックタンパク質を認識するためにHBEGF（緑色）、およびすべての筋肉細胞を認識するためにコラーゲンIV（Col（IV）、赤色）に特異的な抗体で染色した。核を染色するためにDAPIが青色で追加されている。統合した三色画像を示す。

【図19-1】pAAV・CMV・HB・LAMA1（G1-G5）のプラスミド配列（配列番号2）を提供し、rAAVゲノムはヌクレオチド3590～8215に対応する。

【図19-2】同上。

【図19-3】同上。

【図19-4】同上。

【図20-1】pAAV・CMV・HBEGF LAMA2（G1-G5）のプラスミド配列（配列番号4）を提供し、rAAVゲノムはヌクレオチド3590～8341に対応

10

20

30

40

50

する。

【図 20 - 2】同上。

【図 20 - 3】同上。

【図 20 - 4】同上。

【図 21 - 1】pAAV・CMV・HB LAMA2 (G3 - G5) のプラスミド配列 (配列番号 6) を提供し、rAAVゲノムはヌクレオチド 36909 ~ 6929 に対応する。

【図 21 - 2】同上。

【図 21 - 3】同上。

【図 21 - 4】同上。

【図 22 - 1】pAAV・CMV・HBEGF・LAMA2 (G3 - G5) のプラスミド配列 (配列番号 8) を提供し、rAAVゲノムはヌクレオチド 3590 ~ 7036 に対応する。

10

【図 22 - 2】同上。

【図 22 - 3】同上。

【図 23 - 1】pAAV・CMV・HB・DAG1 (アルファ) のプラスミド配列 (配列番号 10) を提供し、rAAVゲノムはヌクレオチドに対応し、rAAVゲノムはヌクレオチド 3590 ~ 6340 に対応する。

【図 23 - 2】同上。

【図 23 - 3】同上。

【図 24 - 1】pAAV・CMV・HB・DAG1 (アルファ) のプラスミド配列 (配列番号 12) を提供し、rAAVゲノムはヌクレオチド 3590 ~ 6049 に対応する。

20

【図 24 - 2】同上。

【図 24 - 3】同上。

【発明を実施するための形態】

【0056】

本明細書では、ジストログリカノパチー (ウォーカー・ワールブルグ症候群、筋眼脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、MDC1C、MDC1D、LGMD2I、LGMD2K、LGMD2M、LGMD2N、LGMD2O、LGMD2P、LGMD2T、および LGMD2U を含むが、これらに限定されない) およびラミニン欠損筋ジストロフィー (MDC1A を含むが、これに限定されない) の治療のための方法および生成物が提供され、これらは HBEGF のリジンに富むヘパリン結合ドメインを利用する。ヘパリン硫酸プロテオグリカンは、細胞外マトリックス (ECM) に豊富であり、ここに示されるように、筋肉での HBEGF の過剰発現は、筋肉 ECM での HBEGF の局在化につながる。本明細書に記載の方法では、ジストログリカノパチーおよびラミニン欠損筋ジストロフィーにおける膜固定欠損は、治療用タンパク質の「リンカー」ドメインとして HBEGF のヘパリン結合ドメインを使用して治療される。

30

【0057】

ここで、「HBEGF」という用語は、生物活性EGFドメインまでのHBEGF配列全体を指すが、膜貫通ドメインを欠いており、そのため、HBEGF分泌が可能となる (図4)。HBEGFフラグメントは、分泌経路への侵入を可能にするシグナルペプチド、タンパク質の折り畳みおよび安定化を可能にするプレプロペプチド、細胞外マトリックスとの相互作用の増加を可能にするヘパリン結合ドメイン、およびHBEGFシグナル伝達を可能にする生物活性EGFドメインの、HBEGF遺伝子からの4つのドメインを含有する。本明細書に開示されるタンパク質において、次に、次に、これらのドメインのコード配列は、ラミニンアルファ2またはジストログリカンコード配列に連結される。第2の「HB」フラグメントも使用される (図3)。HBフラグメントは、HBEGFに見られる4つのドメインのうち、シグナルペプチド、プレプロペプチド、およびヘパリン結合ドメインの3つのみを含有する (したがって、HBは生物活性EGFドメインを欠いている)。ラミニンアルファ2またはジストログリカタンパク質フラグメントに連結されると、HBドメインはECMとの関連を増大させることができるが、EGFまたはHBEGF

40

50

シグナル伝達は増大させない。

【 0 0 5 8 】

H B E G F または H B リンカードメインは、タンパク質を細胞の細胞外マトリックスに対して標的化し、このタンパク質を筋肉細胞などの細胞の細胞外ドメインに固定するように作用する。治療用タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、患者に送達される（例えば、治療用タンパク質をコードする組換え A A V による送達）か、または治療用タンパク質が患者に送達される。

【 0 0 5 9 】

例えば、ジストログリカノパチーのすべてに関して、H B E G F ヘパリン結合ドメインのコード配列が、 - ジストログリカンのコード配列に融合され、治療用タンパク質 H B E G F - D A G 1 () をコードするポリヌクレオチドが作製される。 - ジストログリカンの低グリコシル化 (h y p o g l y c o s y l a t i o n) に加えて、 - ジストログリカントタンパク質レベルが、ジストログリカノパチーにおいて低下する。本明細書に記載の方法において、H B E G F - D A G 1 () の H B E G F ドメインは、E C M ヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合し、一方、 - ジストログリカンドメインは、 - ジストログリカンに結合し、ジストログリカノパチーにおける低グリコシル化にもかかわらず、筋鞘を E C M に連結する。このような H B E G F - D A G 1 () 治療用タンパク質の 4 つの例は、

H B - E G F (ヘパリン結合ドメインで終了) - L A M A 2 G 1 - G 5 (図 3 のポリヌクレオチドによってコードされる)、

H B - E G F (完全な可溶型) - L A M A 2 G 1 - G 5 (図 4 のポリヌクレオチドによってコードされる)、

H B - E G F (ヘパリン結合ドメインで終了) - L A M A 2 G 3 - G 5 (図 5 のポリヌクレオチドによってコードされる)、および

H B - E G F (完全な可溶型) - L A M A 2 G 3 - G 5 (図 6 のポリヌクレオチドによってコードされる)である。

【 0 0 6 0 】

本明細書における「完全な可溶型」という用語は、治療用タンパク質が、H B E G F ヘパリン結合ドメインおよび E G F 様ドメインを含むが、H B E G F の膜貫通部分を含まないことを示す。H B E G F の H B E G F ヘパリン結合ドメインと E G F 様ドメインとの組み合わせは、H B E G F の切断された活性の可溶性アイソフォームに対応する。この用語は、本明細書において「H B E G F」と呼ばれる。

【 0 0 6 1 】

本明細書における「ヘパリン結合ドメインで終了」という用語は、治療用タンパク質が H B E G F ヘパリン結合ドメインのみを含み、H B E G F の E G F 様ドメインまたは膜貫通部分を含まないことを示す。この用語は、本明細書において「H B」と略される。

【 0 0 6 2 】

例えば、M D C 1 A などのラミニン欠損筋ジストロフィーに関して、H B E G F ヘパリン結合ドメインのコード配列が、ラミニン - 2 の球状 (G) ドメイン 1 - 5 のコード配列に融合され、治療用タンパク質 H B E G F - L A M A 2 (G 1 - 5) をコードするポリヌクレオチドが作製される。ラミニン - 2 G ドメインは、筋鞘でグリコシル化された - ジストログリカンと、インテグリンにも結合し、L A M A 2 遺伝子の一部によってコードされる。本明細書に記載の方法において、H B E G F - L A M A 2 (G 1 - 5) の H B E G F ドメインは、E C M ヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合し、G ドメインは、 - ジストログリカンに結合し、全長のラミニン - 2 が M D C 1 A に存在しないにもかかわらず、筋鞘を E C M に連結する。このような H B E G F - L A M A 2 (G 1 - 5) 治療用タンパク質の 2 つの例は、

H B - E G F (ヘパリン結合ドメインで終了) - D A G 1 (天然のプロセッシングされたアルファ D G 遺伝子) (図 7 のポリヌクレオチドによってコードされる) および

H B - E G F (完全な可溶型) - D A G 1 (天然のプロセッシングされたアルファ D G 遺伝

10

20

30

40

50

子) (図8のポリヌクレオチドによってコードされる)である。

【0063】

さらに、ジストログリカノパチーおよびラミニン欠損筋ジストロフィー (MDC1Aなど)の両方が筋肉再生の低下に関連しており、治療用タンパク質がHBEGFヘパリン結合ドメインおよびHBEGF EGF様ドメインを含む本明細書に記載の方法の実施形態では、患者はまた、Pax7、MyoD、ミオゲニン、Myh3を含む遺伝子の発現が変化し、筋形成および筋肉再生の増加をもたらす治療用タンパク質のHBEGF EGF様ドメインの栄養シグナル伝達から利益を得る。

【0064】

したがって、治療用タンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。実施形態は、図3、4、5、6、7、または8に示されるポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む。他の実施形態は、図3、4、5、6、7、または8に示されるポリヌクレオチド配列と同じアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む。さらに他の実施形態は、図3、4、5、6、7、または8に示されるポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。

10

【0065】

一実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの1つ：i)図3に示されるヌクレオチド配列、ii)図3に示されるヌクレオチド14~3235を含むヌクレオチド配列、iii)配列番号1のヌクレオチド配列、またはiv)配列番号19のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0066】

別の実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの1つ：i)図4に示されるヌクレオチド配列、ii)図4に示されるヌクレオチド14~3361を含むヌクレオチド配列、iii)配列番号3のヌクレオチド配列、またはiv)配列番号20のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0067】

さらなる実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの1つ：i)図5に示されるヌクレオチド配列、ii)図5に示されるヌクレオチド14~1930を含むヌクレオチド配列、iii)配列番号5のヌクレオチド配列、またはiv)配列番号21のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【0068】

別の実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの1つ：i)図6に示されるヌクレオチド配列、ii)図6に示されるヌクレオチド14~2056を含むヌクレオチド配列、iii)配列番号7のヌクレオチド配列、またはiv)配列番号22のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0069】

一実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの1つ：i)図7に示されるヌクレオチド配列、ii)図7に示されるヌクレオチド14~1360を含むヌクレオチド配列、iii)配列番号9のヌクレオチド配列、またはiv)配列番号23のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【0070】

別の実施形態では、提供されるポリヌクレオチドは、次のうちの1つ：i)図8に示されるヌクレオチド配列、ii)図8に示されるヌクレオチド14~1486を含むヌクレオチド配列、iii)配列番号11のヌクレオチド配列、またはiv)配列番号24のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0071】

提供される他のポリヌクレオチドには、限定されないが、治療用タンパク質の結合活性を保持する治療用ポリペプチドのアミノ酸変異体をコードするポリヌクレオチドが含まれ、このポリヌクレオチドは、図3、4、5、6、7、または8に示されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列または提供されるポリヌクレオチドのいずれかのヌクレオチド

50

配列と少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列を有する。

【0072】

治療用タンパク質の結合活性を保持する治療用ポリペプチドのアミノ酸変異体をコードするポリヌクレオチドも本明細書で提供され、このポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で、図3、4、5、6、7、または8に示されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列もしくはそれらの補体、または提供されるポリヌクレオチドのいずれかのヌクレオチド配列にハイブリダイズする。「ストリンジェントな」という用語は、ストリンジェントとして当該技術分野において一般に理解される条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のためのストリンジェントな条件の例は、0.015Mの塩化ナトリウム、65~68の0.0015Mのクエン酸ナトリウムまたは0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、および42の50%ホルムアミドである。Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)を参照されたい。

【0073】

「結合活性を保持する」は、本明細書において、ポリヌクレオチドによってコードされる治療用タンパク質のアミノ酸変異体が、図3、4、5、または6に示されるヌクレオチド配列によってコードされる治療用タンパク質とヘパリン硫酸プロテオグリカンおよび - ジストログリカンへの結合について、または図7もしくは8に示されるヌクレオチド配列によってコードされる治療用タンパク質とヘパリン硫酸プロテオグリカンおよび - ジストログリカンへの結合について、または配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、もしくは配列番号24のアミノ酸配列を含む治療用タンパク質とヘパリン硫酸プロテオグリカンおよび - ジストログリカンへの結合について競合することを意味することが企図される。

【0074】

本明細書に記載のポリヌクレオチドの1つ以上を含む組換え発現ベクターも提供される。本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む組換えAAVゲノムも提供される。

【0075】

本明細書に記載の発現ベクターまたは組換えAAVゲノムにおいて、治療用タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、転写制御因子(プロモーター、エンハンサー、および/またはイントロンを含むが、これらに限定されない)、特に目的の標的細胞において機能的な転写制御因子に作動可能に連結される。例えば、哺乳類宿主細胞で使用するのに好適なプロモーターは周知であり、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(アデノウイルス2など)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、およびサルウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノムから得られるものが含まれるが、これらに限定されない。他の好適な哺乳類プロモーターには、異種哺乳類プロモーター、例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターが含まれる。また、例えば、AAVの送達方法は、アクチンおよびミオシン遺伝子ファミリー、例えばmyoD遺伝子ファミリーに由来するもの[Weintraub et al., *Science*, 251:761-766(1991)を参照されたい]、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF-2[Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol*, 11:4854-4862(1991)]、ヒト骨格アクチン遺伝子[Muscat et al., *Mol Cell Biol*

10

20

30

40

50

, 7 : 4 0 8 9 - 4 0 9 9 (1 9 8 7)]、筋クレアチンキナーゼ配列因子 [J o h n s o n e t a l . , M o l C e l l B i o l , 9 : 3 3 9 3 - 3 3 9 9 (1 9 8 9) を参照されたい]、およびマウスクレアチンキナーゼエンハンサー (m C K) 因子に由来する制御因子、骨格速収縮トロポニンC遺伝子、遅収縮心筋トロポニンC遺伝子、および遅収縮トロポニンI遺伝子に由来する制御因子: 低酸素誘導性核内因子 [S e m e n z a e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 8 8 : 5 6 8 0 - 5 6 8 4 (1 9 9 1)]、グルココルチコイド応答因子 (G R E) を含むステロイド誘導性因子およびプロモーター [M a d e r a n d W h i t e , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 5 6 0 3 - 5 6 0 7 (1 9 9 3)]、tMCKプロモーター [W a n g e t a l . , G e n e T h e r a p y , 1 5 : 1 4 8 9 - 1 4 9 9 (2 0 0 8) を参照されたい]、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー - / MCKエンハンサー - プロモーター (M H C K 7) プロモーター [S a l v a e t a l . M o l T h e r , 1 5 : 3 2 0 - 3 2 9 (2 0 0 7)]、CK6プロモーター [W a n g e t a l . , 上記を参照されたい]、ならびに他の制御因子を含むが、これらに限定されない筋肉特異的転写制御因子を使用する形質導入筋肉または肝細胞を含み得る。したがって、筋肉特異的転写制御因子の一例は、tMCKプロモーターである。肝臓特異的プロモーターの例は、LSPである [W a n g a n d V e r m a , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 6 , 3 9 0 6 - 3 9 1 0 (1 9 9 9)]。別のプロモーターの例として、組換え宿主細胞における治療用タンパク質の産生に関して、プロモーターは、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーターなどの構成的プロモーターであり得る。別の例は、L A M A 2 である。

【 0 0 7 6 】

本明細書に記載の治療用タンパク質の発現のために、本明細書に記載される少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態の発現系および構築物、ならびにこのような発現系または構築物を含む宿主細胞が提供され、また提供される。本明細書で使用される場合、「ベクター」は、タンパク質コード情報を宿主細胞に導入するために使用するのに好適な任意の分子または実体 (例えば、ポリヌクレオチド、プラスミド、バクテリオファージ、またはウイルス) を意味する。ベクターの例には、プラスミド、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳類ベクター、および発現ベクター、例えば、組換え発現ベクターが含まれるが、これらに限定されない。組換え発現ベクターなどの発現ベクターは、宿主細胞の形質転換に有用である。

【 0 0 7 7 】

組換え発現ベクターなどの発現ベクターが導入された宿主細胞が提供される。宿主細胞は、任意の原核細胞 (例えば、E . c o l i) または真核細胞 (例えば、酵母、昆虫、または哺乳類細胞 (例えば、CHO細胞)) であり得る。発現ベクターは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核細胞または真核細胞に導入することができる。哺乳類細胞の安定したトランスフェクションのために、選択可能なマーカーをコードする遺伝子 (例えば、抗生物質に対する耐性のために) は、一般に、目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。好ましい選択可能なマーカーには、G 4 1 8、ハイグロマイシン、およびメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与するものが含まれる。導入されたポリヌクレオチドで安定にトランスフェクトされた細胞は、他の方法の中でもとりわけ、薬物選択によって同定することができる。異種ポリヌクレオチドを哺乳類細胞に導入するための方法は、当該技術分野で周知であり、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームへのポリヌクレオチド (複数可) のカプセル化、核酸と正に帯電した脂質との混合、およびDNAの核への直接マイクロインジェクションが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 8 】

選択される方法は、部分的には使用される宿主細胞の種類の間数である。これらの方法および他の好適な方法は当業者に周知であり、例えば、S a m b r o o k e t a l . ,

10

20

30

40

50

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001に記載されている。

【0079】

宿主細胞は、適切な条件下で培養されると、タンパク質を合成し、その後、タンパク質は、培養培地から（宿主細胞がタンパク質を培地に分泌する場合）、またはそれを産生する宿主細胞から直接（溶解しない場合）収集され得る。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいまたは必要なポリペプチド修飾（グリコシル化またはリン酸化など）、および生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さなどの様々な要因に依存する。一例として、LARGEを過剰発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-LARGE細胞）[Yoon et al., A Method to Produce and Purify Full-Length Recombinant Alpha Dystroglycan: Analysis of N- and O-Linked Monosaccharide Composition in CHO Cells with or without LARGE Overexpression, PLoS Curr. (2013 January 2)]は、本明細書に記載のグリコシル化治療用タンパク質の産生に使用することが企図される。

10

【0080】

発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞株は、当該技術分野で周知であり、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、CHO-LARGE細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、および当該技術分野で標準的な他の細胞株を含むがこれらに限定されない、American Type Culture Collection（ATCC）から入手可能な不死化細胞株を含むが、これらに限定されない。

20

【0081】

本明細書で提供されるrAAVゲノムは、AAV repおよびcap DNAを欠く。本明細書で提供される組換えAAVゲノムは、上記に記載される治療用タンパク質をコードするポリヌクレオチド、およびポリヌクレオチドに隣接する1つ以上のAAV ITRを含む。rAAVゲノム内のAAV DNAは、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型からであり得、AAV血清型 AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、およびAAV rh.74が挙げられるが、これらに限定されない。他の種類のrAAV変異体、例えば、カプシド変異を有するrAAVも企図される。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11):1900-1909(2014)を参照されたい。上記の背景技術の部分に記載されたように、様々なAAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野において既知である。骨格筋特異的発現を促進するために、AAV1、AAV5、AAV6、AAV8、またはAAV9を使用することができる。

30

【0082】

rAAVゲノムを含むDNAプラスミドが提供される。DNAプラスミドは、rAAVゲノムの感染性ウイルス粒子へのアセンブリのために、AAVのヘルパーウイルス（アデノウイルス、E1欠失アデノウイルス、またはヘルペスウイルスを含むが、これらに限定されない）の感染に許容される細胞に導入される。パッケージングされるべきAAVゲノム、repおよびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される、rAAV粒子を産生する技術は、当該技術分野において標準的である。rAAVの産生は、以下の成分、rAAVゲノム、rAAVゲノムから分離した（すなわち、その中に存在しない）AAV repおよびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。AAV ITRならびにrepおよびcap遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型からであり得、AAV血清型 AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4

40

50

、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、およびAAV rh.74を含むがこれらに限定されないrAAVゲノムITRとは異なるAAV血清型からであり得る。偽型rAAVの生成は、例えば、WO01/83692に開示され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0083】

パッケージング細胞を生成する方法は、AAV粒子の産生に必要なすべての成分を安定して発現する細胞株を作成することである。例えば、AAV repおよびcap遺伝子を欠くrAAVゲノム、rAAVゲノムから分離したAAV repおよびcap遺伝子、およびネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能なマーカーを含むプラスミド（または複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれる。AAVゲノムは、GCテーリング（Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含有する合成リンカーの付加（Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73）、または直接平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666）などの手順により細菌プラスミドに導入されている。次いで、パッケージング細胞株を、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスに感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、rAAVの大規模産生に好適であることである。好適な方法の他の例は、rAAVゲノムならびに/または repおよびcap遺伝子をパッケージング細胞に導入するためにプラスミドではなくアデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いる。

【0084】

rAAV産生の一般的な原理は、例えば、Carter, Current Opinions in Biotechnology, 1533-1539 (1992); and Muzyczka, Curr. Topics in Microbiol. And Immunol., 158:97-129 (1992) にレビューされる。様々なアプローチは、Ratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4:2072 (1984)、Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984)、Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 5:3251 (1985)、McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988)、ebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988)、Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828 (1989);、米国特許第5,173,414号、WO95/13365および対応する米国特許第5,658,776号、WO95/13392、WO96/17947、PCT/US98/18600、WO97/09441 (PCT/US96/14423)、WO97/08298 (PCT/US96/13872)、WO97/21825 (PCT/US96/20777)、WO97/06243 (PCT/FR96/01064)、WO 99/11764、Perrin et al., Vaccine, 13:1244-1250 (1995)、Paul et al., Human Gene Therapy, 4:609-615 (1993)、Clark et al., Gene Therapy 3:1124-1132 (1996)、米国特許第5,786,211号、米国特許第5,871,982号、米国特許第6,258,595号、およびMcCarty, Mol. Ther., 16(10):1648-1656 (2008) に記載されている。前述の文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、rAAV産生に関する文書の部分を特に強調する。

【0085】

したがって、本発明は、感染性rAAVを産生するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、HeLa細胞、293細胞、およびPerC.6細胞（同種293株）などの安定して形質転換された癌細胞であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換された癌細胞ではない細胞、例えば、低継代293

細胞（アデノウイルスのE1で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、MRC-5細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、WI-38細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Vero細胞（サル腎細胞）、およびFRhL-2細胞（アカゲザル胎児肺細胞）である。

【0086】

本明細書において、複製欠損、感染性、カプシド形成ウイルス粒子（rAAV）である組換えAAVは、rAAVゲノムを含む。rAAVは、本明細書に記載の治療用タンパク質をコードする。rAAVのゲノムは、AAVのrepおよびcap DNAを欠いており、すなわち、rAAVゲノムのITR間にAAVのrepまたはcap DNAが存在しない。

【0087】

rAAVは、当該技術分野で標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によって精製され得る。ヘルパーウイルスからrAAVベクターを精製するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999)、Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002)、米国特許第6,566,118号、およびWO98/09657に開示される方法を含む。

【0088】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のrAAVまたは治療用タンパク質を含む組成物を企図する。本発明の組成物は、薬学的に許容される担体にrAAVまたは治療用タンパク質を含む。組成物はまた、希釈剤およびアジュバントなどの他の成分を含んでもよい。許容される担体、希釈剤、およびアジュバントは、レシピエントに非毒性であり、好ましくは、用いられる投薬量および濃度で不活性であり、リン酸、クエン酸、もしくは他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに/またはTween（登録商標）、プルロニック（登録商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

【0089】

本明細書に記載の方法で投与されるrAAVの力価は、例えば、特定のrAAV、投与モード、治療目標、個体、および標的化される細胞型（複数可）に応じて異なり、当該技術分野における標準的な方法によって決定され得る。rAAVの力価は、1mLあたり約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} ～約 1×10^{14} 以上のDNase耐性粒子（DRP）の範囲であり得る。投薬量は、当該技術分野において理解されるウイルスゲノム（vg）の単位で表されてもよい。

【0090】

インビボまたはインビトロで、標的細胞にrAAVを形質導入する方法が、本発明によって企図される。インビボ方法は、有効用量または複数回有効用量の、本明細書に記載のrAAVを含む組成物を、それを必要とする動物（ヒト患者を含む）に投与するステップを含む。

【0091】

本明細書に記載の治療用タンパク質の投薬量および投与頻度は、投与経路、投与される特定の治療用タンパク質、および患者のサイズおよび全身状態などの要因によって異なり得る。適切な投薬量は、関連技術分野で既知の手順によって、例えば、用量漸増研究を伴い得る臨床試験において決定することができる。これらの要因を考慮して、本明細書に記載の治療用タンパク質の典型的な用量は、約 0.1 pg/kg ～最大約 30 mg/kg 以上の範囲であり得る。さらに、用量は、 0.1 pg/kg ～最大約 30 mg/kg 、1 p

10

20

30

40

50

g / k g ~ 最大約 30 m g / k g、10 p g / k g ~ 最大約 10 m g / k g、約 0.1 m g / k g ~ 5 m g / k g、または約 0.3 m g / k g ~ 3 m g / k g の範囲であり得る。

【0092】

したがって、本明細書に記載の治療用タンパク質で患者を治療する方法も提供される。本方法は、有効用量または複数回有効用量の、本明細書に記載の治療用タンパク質を含む組成物を、それを必要とする動物（ヒト患者を含む）に投与するステップを含む。

【0093】

用量が、障害 / 疾患の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が、障害 / 疾患の発症後に投与される場合、投与は治療的である。「有効用量」は、治療される障害 / 疾患状態に関連する少なくとも1つの症状を緩和（排除または低減）する用量、障害 / 疾患状態への進行を遅らせるかもしくは防止する用量、障害 / 疾患状態の進行を遅らせるかもしくは防止する用量、疾患の程度を縮小する用量、疾患の寛解（部分的または完全）をもたらす用量、および / または生存を延長させる用量である。本明細書に記載の方法は、治療された患者において、歩行時間、四肢握力の改善、筋肉病理の減少、および神経病理の減少のうち1つ以上をもたらす。本明細書に記載の方法によって達成される他のエンドポイントは、治療された患者における筋線維サイズの増加、小さな酸化線維数の減少、筋萎縮の矯正、筋力の増加、および筋肉再生の増加のうち1つ以上である。ジストログリカノパチーおよびラミニン欠損筋ジストロフィーは、本発明の方法による予防または治療のために企図される。

【0094】

併用療法も本発明により企図される。本明細書で使用される併用療法は、同時治療または連続治療の両方を含む。新規療法との組み合わせであるため、本明細書に記載の方法と標準的な薬物治療との組み合わせが特に企図される。

【0095】

有効用量の r A A V または治療用タンパク質の組成物の投与は、筋肉内、非経口、静脈内、髄腔内、経口、口腔、鼻腔、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、または腔内を含むが、これらに限定されない当該技術分野で標準的な経路によるものであり得る。本発明の r A A V の A A V 成分（具体的には、A A V I T R およびカプシドタンパク質）の投与経路（複数可）および血清型（複数可）は、治療される感染症および / または疾患状態、ならびに治療用タンパク質を発現する標的細胞 / 組織（複数可）を考慮して、当業者によって選択および / または適合され得る。

【0096】

特に、本発明の r A A V の実際の投与は、r A A V 組換えベクターを動物の標的組織に輸送する任意の物理的方法を使用することにより達成され得る。本発明による投与としては、筋肉内への注入、血流への注入、および / または肝臓への直接注入が挙げられるが、これらに限定されない。リン酸緩衝生理食塩水または乳酸リンゲル液中に r A A V を単に再懸濁させることが、筋肉組織発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、r A A V と同時投与され得る担体または他の成分に対する既知の制限はない（しかし、DNA を分解する組成物は r A A V との通常の方法で避けられるべきである）。r A A V のカプシドタンパク質は、r A A V が筋肉などの目的の特定の標的組織を標的とするように修飾されてもよい。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる W O 0 2 / 0 5 3 7 0 3 を参照されたい。医薬組成物は、注射可能な製剤として、または経皮輸送により筋肉に送達される局所製剤として調製することができる。筋肉内注射と経皮輸送の両方のための多数の製剤がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用することができる。r A A V は、投与および取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用することができる。

【0097】

筋肉内注射の目的のために、ゴマ油もしくはピーナッツ油などのアジュバント中、または水性プロピレングリコール、ならびに滅菌水溶液中の r A A V または治療用タンパク質の溶液を用いることができる。そのような水溶液は、必要に応じて緩衝化することができ

10

20

30

40

50

、液体希釈剤は最初に生理食塩水またはグルコースで等張にされる。遊離酸（DNAは酸性リン酸基を含む）または薬理的に許容される塩としてのrAAVの溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水で調製することができる。rAAVの分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびに油中で調製することができる。通常の保存状態および使用下においては、これらの製剤は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。これに関連して、用られる滅菌水性媒体はすべて、当業者に周知の標準的な技術により容易に入手可能である。

【0098】

全身性（例えば、静脈内）注射使用に好適なrAAVまたは治療用タンパク質の医薬品形態としては、滅菌水溶液または分散剤、および滅菌注射溶液または分散剤の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。すべての場合において、形態は滅菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度に流動性でなければならない。製造および保管の条件下で安定していなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散剤の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期の吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらすことができる。

【0099】

滅菌されている注射可能な溶液は、必要な量のrAAVを適切な溶媒に、必要に応じて上記に列挙した他の様々な成分とともに組み込み、その後濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散剤は滅菌した活性成分を、基礎的な分散媒および上に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルへと混合することによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分と、その以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分との粉末をもたらず、真空乾燥およびフリーズドライ技術である。

【0100】

rAAVによる形質導入は、インビトロで行うこともできる。一実施形態では、所望の標的筋肉細胞を対象から取り出し、rAAVで形質導入し、対象に再導入する。代替的に、同系または異種の筋肉細胞は、それらの細胞が対象において不適切な免疫応答を生成しない場合に使用され得る。

【0101】

対象への形質導入および形質導入細胞の再導入のための好適な方法は、当該技術分野で既知である。一実施形態では、細胞は、例えば適切な培地でrAAVを筋肉細胞と組み合わせ、サザンブロットおよび/またはPCRなどの従来の技術を使用して、または選択可能なマーカーを使用して目的のDNAを持つ細胞をスクリーニングすることにより、インビトロで形質導入することができる。次いで、形質導入された細胞を医薬組成物に製剤化し、組成物を、筋肉内、静脈内、皮下、および腹腔内注射による、または例えばカテーテルを使用して平滑筋および心筋への注射によるなど、様々な技術により対象に導入することができる。

【0102】

本発明のrAAVでの細胞の形質導入は、本明細書に記載の治療用タンパク質の持続発現をもたらす。したがって、本発明は、本明細書に記載の治療用タンパク質を発現するrAAVを患者、好ましくはヒトに投与する方法を提供する。これらの方法は、本発明の1つ以上のrAAVを組織（筋肉などの組織、肝臓や脳などの臓器、唾液腺などの腺を含む

10

20

30

40

50

が、これらに限定されない)に形質導入することを含む。

【0103】

筋肉組織は生命維持に必須な臓器ではなく、アクセスしやすいため、インビボDNA送達の魅力的な標的である。本発明は、形質導入された筋肉細胞からの本明細書に記載の治療用タンパク質の持続発現を企図する。

【0104】

「筋肉細胞」または「筋肉組織」とは、任意の種類 of 筋肉 [例えば、骨格筋および平滑筋(例えば、消化管、膀胱、血管、または心臓組織)] に由来する細胞または細胞群を意味する。そのような筋肉細胞は、筋芽細胞、筋細胞、筋管、心筋細胞、および心筋芽細胞など、分化または未分化であり得る。

10

【0105】

「形質導入」という用語は、レシピエント細胞による治療用タンパク質の発現をもたらす、本発明のrAAVを介した、インビボまたはインビトロのいずれかでの、レシピエント細胞への治療用タンパク質の投与/送達を指すように使用される。

【0106】

したがって、有効用量(または本質的に同時に投与される用量もしくは間隔を置いて与えられる用量)の、本明細書に記載の治療用タンパク質をコードするrAAVを、それを必要とする患者に投与する方法が本明細書で提供される。

【0107】

有効用量(または本質的に同時に投与される用量もしくは間隔を置いて与えられる用量)の、本明細書に記載の治療用タンパク質を、それを必要とする患者に投与する方法も本明細書で提供される。

20

【実施例】

【0108】

本発明の態様および実施形態は、以下の実施例によって示される。実施例1は、本開示の治療用タンパク質をコードする構築物を記載する。実施例2は、培養宿主細胞における治療用タンパク質の組換え発現を記載する。実施例3は、ヘパリン結合ドメインが野生型マウスの筋肉に対してLAMA2(g1-G50)を標的化することを実証する実験を記載する。実施例4は、MDC1Aのdy^W/dy^Wマウスモデルにおける症状および病理の低減においてAAV媒介HBEGF-LAMA2(G1-5)発現の有効性を実証するための実験を記載する。実施例5は、ジストログリカノパチーのマウスモデルにおける症状および病理の低減においてAAV媒介HBEGF-DAG1()発現の有効性を実証するための実験を記載する。実施例6は、本明細書に記載の治療用タンパク質におけるリンカドメインとして、および本明細書に記載の様々な方法における栄養素としてその適用に有用であると本明細書で企図されるsHBEGF(のドメイン)の特性を記載する。

30

【0109】

実施例1

治療用タンパク質をコードする構築物

HBEGF EGFドメインを含む治療用タンパク質をコードする6つの例示的なDNA構築物を以下のように生成した:

40

HB-EGF(ヘパリン結合ドメインで終了)-LAMA2 G1-G5(図3のポリヌクレオチドによってコードされる)、

HB-EGF(完全な可溶型)-LAMA2 G1-G5(図4のポリヌクレオチドによってコードされる)、

HB-EGF(ヘパリン結合ドメインで終了)-LAMA2 G3-G5(図5のポリヌクレオチドによってコードされる)、

HB-EGF(完全な可溶型)-LAMA2 G3-G5(図6のポリヌクレオチドによってコードされる)、

HB-EGF(ヘパリン結合ドメインで終了)-DAG1(天然のプロセッシングされたアルファDG遺伝子)(図7のポリヌクレオチドによってコードされる)、および

50

HB - EGF (完全な可溶型) - DAG1 (天然のプロセシングされたアルファDG遺伝子) (図8のポリヌクレオチドによってコードされる)である。

【0110】

構築物は、CHO細胞中のプラスミドから発現された。CHO細胞は、構築物の1つを含むプラスミドでトランスフェクトされるか、偽トランスフェクト(-)された。

【0111】

トランスフェクトされたCHO細胞を、HB - EGF、ジストログリカン、またはラミニニン - 2 G5ドメインに対する抗体で染色した。結果を図9Aに示す。また、トランスフェクションの48時間後に各プレートから培養培地を収集し、細胞溶解を行った。ヘパリン - アガロースプルダウンを、細胞溶解物および培養培地の両方で行い、全細胞溶解物とともにウエスタンブロットにロードした。結果を図9Bに示す。

10

【0112】

実施例2

培養宿主細胞における治療用タンパク質の組換え発現

実施例1の構築物を、プラスミドにサブクローニングして、治療用タンパク質をコードするAAV9ベクターも生成した。

【0113】

サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの転写制御下にある実施例1の治療遺伝子のうちの1つを保有するAAVベクターを生成した。

【0114】

rAAVベクターは、AAV2型ベクターゲノムを複数のAAVカプシド血清型にパッケージングすることができる修正されたクロスパッケージングアプローチによって生成された[Rabinowitz et al., J Virol. 76(2):791-801(2002)]。生成は、HEK293細胞を使用した標準的な3プラスミドDNA/CaPO4沈殿法を使用して達成された。HEK293細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)およびペニシリンおよびストレプトマイシンを補充したDMEM中で維持された。生成プラスミドは、(i)治療用タンパク質をコードするプラスミド、(ii)cap血清型9分離体をコードするrep2-capX修飾AAVヘルパープラスミド、ならびに(iii)アデノウイルスE2A、E4 ORF6、およびVA I/II RNA遺伝子を発現するアデノウイルス5型ヘルパープラスミド(pAdHelper)であった。定量的PCRベースの滴定法を使用して、Prism 7500 Taqman検出器システム(PE Applied Biosystems)を利用してカプシド形成されたベクターゲノム(vg)力価を決定した。[Clark et al., Hum Gene Ther. 10(6):1031-1039(1999)]。最終的な力価(vgml⁻¹)は、Prism 7500リアルタイム検出器システム(PE Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA)を利用した特定のプライマーおよびプローブを使用して定量的逆転写酵素PCRによって決定された。分割したウイルスは、使用するまで-80で保存された。

20

30

【0115】

表2に示されるrAAVは、本明細書に記載の実験で使用された。

40

【表 2】

表 2

AAV 構築物	膜リンカー (第1のドメイン)	第2のドメイン	本明細書での表示	配列番号	rAAVゲノム nt
rAAV.CMV.HB.LAMA2(G1-G5)	ヘパリン結合ドメインのみ	ラミニンアルファ2G1-G5	HB-LAMA2(G1-G5)	2	Nt.3590-8215
rAAV9.CMV.HBEGF.LAMA2(G1-G5)	完全な可溶性	ラミニンアルファ2G1-G5	HBEGF-LAMA2(G1-G5)	4	Nt.3590-8341
rAAV.CMV.HB.LAMA2(G3-G5)	ヘパリン結合ドメインのみ	ラミニンアルファ2G3-G5	HB-LAMA2(G3-G5)	6	Nt.3609-6929
rAAV.CMV.HBEGF.LAMA2(G3-G5)	完全な可溶性	ラミニンアルファ2G3-G5	HBEGF-LAMA2(G3-G5)	8	Nt.3590 - 7036
rAAV.CMV.HB.DAG1	ヘパリン結合ドメインのみ	DAG1	HB-DAG1	10	Nt.3590~6340
rAAV.CMV.HBEGF.DAG1	完全な可溶性	DAG1	HBEGF.DAG1	12	Nt.3590~6049

【0116】

実施例 3

ヘパリン結合ドメインは LAMA2 (G1 - G5) を野生型マウスの筋肉に対して標的化する

野生型マウスは、HBEGF、HBEGF・LAMA2 (G1 - G5)、HBEGF・LAMA2 (G3 - G5)、HB・LAMA2 (G1 - G5)、HB・LAMA2 (G3 - G5)、または LAMA2 (G1 - G5) (表 2 を参照) を含有する 5×10^{11} v g p f r A A V 9 . C M V ベクターを腓腹筋に筋肉内注射された。細胞を、ヒト HB - E G F または LAMA2 の組換え G5 ドメインに特異的な抗体で染色した。偽注射されたマウス (緩衝液のみ) は、陰性対照として示される。4H8 - 2 は、切片の筋肉細胞を示す抗ラミニン抗体である。

【0117】

図 15 に示すように、HBEGF の過剰発現に関して以前に示したが、HBEGF および HBEGF・LAMA2 (G1 - G5) は、筋肉成長を低減し、かつ / または軽度の筋萎縮を誘導したが、rAAV9.CMV.HB.LAMA2 (G1 - G5) の IM 注射は、細胞外マトリックスにおける LAMA2 (G1 - G5) タンパク質の分泌および局在化につながる。加えて、HB・LAMA2 (G1 - G5) を発現する筋肉は、正常な野生型筋肉よりも大きいように思われた。HB・LAMA2 (G3 - G5) は、HB・LAMA2 (G1 - G5) よりも低い全体的なタンパク質染色を示した。HBEGF の HB ドメインの ECM 標的化機能により、LAMA2 (G1 - G5) タンパク質の筋肉細胞外マトリックスへの分泌および標的化が可能となる。対照的に、HB ドメインのない LAMA2 (G1 - G5) の発現は、タンパク質生成が非常に低く、ECM の局在化は検出されなかった。したがって、完全な HB - E G F ドメインではなく、HB ドメインのみを含む構築物は、LAMA2 (G1 - G5) を筋肉の ECM に対して標的化する目的を果たし、この構築物は HBEGF から EGF ドメインが削除されているため、EGF シグナル伝達の悪影響なく良好に目的を果たす。

【0118】

10

20

30

40

50

HB構築物にまだ存在するHBEGFのプレプロペプチド部分は、HBEGFからのシグナルペプチドのみを含有するLAMA2(G1-G5)のみと比較して、LAMA2(G1-G5)のタンパク質折り畳みおよび/または発現も改善し得る。最後に、HB・LAMA2(G1-G5)は、適切に局在化されると、正常な筋肉においても筋肉の成長を改善し得る。

【0119】

図16は、ヒトHBEGFタンパク質に対する抗体、およびヒトLAMA2のG5ドメインに対する抗体を使用して、HBEGF・LAMA2(G1-G5)、HB・LAMA2(G1-G5)、およびLAMA2(G1-G5)の染色を示す。このデータにより、LAMA2(G1-G5)のみの発現は筋肉でのタンパク質生成を非常に低下させる一方で、HBドメインを含めるとLAMA2(G1-G5)の発現が改善されることが確認され、これは、抗ラミニン抗体およびHBEGF抗体で視覚化された。

10

【0120】

実施例4

MDC1Aのdy^W/dy^Wマウスモデルにおける症状および病理の低減におけるAAV9媒介HBEGF-LAMA2(G1-5)発現の有効性

dy^W/dy^Wマウス[Nonaka, Lab Anim Sci., 48(1): 8-17(1998)]は、Lama2に機能喪失変異を有し、MDC1Aの病因と同様にラミニン-2生成の障害を引き起こす。Dy^W/dy^Wマウスは、野生型マウスと比較して、サイズ、握力、および寿命が減少している。マウスは、3ヶ月齢までに筋萎縮、ジストロフィー筋病理、および重度の歩行障害を示す。そのため、これらのマウスは、MDC1A療法をテストするための適切で堅牢なモデルである。

20

【0121】

実施例2で提供されるLAMA2発現rAAVゲノムの治療効果を実証するために、生後1日目に、8匹のdy^W/dy^Wの仔に、低用量の10¹¹ウイルスゲノム(vg)または高用量の10¹²vgのいずれかの、rAAV9.CMV.HBEGF.LAMA2(G1-G5)またはrAAV9.CMV.HB.LAMA2(G1-G5)またはrAAV9.CMV.HB.LAMA2(G3-G5)を顔面静脈から静脈内注射した。対照dy^W/dy^Wの仔のAAV緩衝液の偽注射も行った。

【0122】

注射後2ヶ月および3ヶ月に、前肢の筋肉の握力を分析した(図17)。4ヶ月齢で、マウスを安楽死させ、四肢の筋肉を解剖し、組換えタンパク質の発現について分析した。図17に示されるように、HB・LAMA2(G3-G5)およびHB・LAMA2(G1-G5)の両方が、dy/dyマウスの握力の低下を防ぎ、偽治療したdy/dyマウスからの有意な変化を示し、強度値を同じ年齢の未処置の野生型マウスで見られる範囲内に導いた。したがって、HB-LAMA2(G3-G5)およびHB-LAMA2(G1-G5)の両方が、MDC1Aのdy/dyモデルで治療効果を示す。この実験では、HB・LAMA2(G3-G5)は、偽処置されたdy/dyマウスと比較して、2ヶ月で有意に達しなかったが、HB・LAMA2(G1-G5)は有意に達した。

30

【0123】

処置したdy/dyマウスの中心核を有する筋線維の割合、筋線維の直径および面積、ならびに筋線維の直径の変動を比較することにより、筋肉病理を予防する際の導入遺伝子発現の役割も分析した。三頭筋の筋肉を使用して、導入遺伝子を発現する筋線維の筋肉病理を、非発現筋線維における同じ病理測定と比較した。この実験は、HB・LAMA2(G1-G5)の発現が筋肉サイズを増加させることを実証した。このような変化を示す染色の例を図18に示す。すべての筋肉にわたって定量化したとき、平均横断筋肉領域は、発現筋線維の2328mm²対非発現筋線維の1082mm²(n=4つの筋肉、各々筋肉あたり400の筋線維を分析)であり、これは、処置を伴う筋肉のサイズにおいて2倍の平均増加であった。筋線維直径指数(直径SD/平均×1000)の分散は、非発現筋肉の620から発現筋肉の431(250以下は正常と見なされる)に減少し、筋肉変性

40

50

および再生のサイクルの指標である中心核を有する筋線維の割合は、非発現筋線維の28%から発現筋線維の14%に減少した(各々n=2)。

【0124】

病理がゼロに低減されることはないが、AAVが最大遺伝子発現を達成するのに3~4週間かかるため、これらの動物では、治療用導入遺伝子の発現が起こる前にある程度の病理が発生することを覚えておくことが重要である。このようなすべての実験において、筋肉変換の平均レベルは $26 \pm 1\%$ であった(n=4の三頭筋を分析、各々400の繊維)。これらの病理学的測定から取得したものは、HB-LAMA2(G1-G5)が、少なくとも部分的に、dy/dy筋肉の筋肉損傷を防ぐだけでなく、野生型に戻る、そしておそらくそれを超えて筋肉の成長を増加させるように思えることである。

10

【0125】

実施例5

ジストログリカノパチーのマウスモデルにおける症状および病理の低減におけるAAV媒介HBEGF-DAG1()発現の有効性

ジストログリカン、またはFktn遺伝子によってコードされる、-ジストログリカン-グリコシル化酵素であるフクチンを欠くマウスは、胚致死性であり、ジストログリカノパチー療法の研究には使用することができない。Fktn欠失が骨格筋に限定されるMyf5Cre-Fktn^{loxP}マウス[Kanagawa et al., Hum Mol Genet., 22(15):3003-3015(2013)]を使用して、有効性を実証する。Myf5Cre-Fktn^{loxP}マウスは、野生型マウスと比較して、体重、握力、および寿命が減少している。マウスはまた、ジストロフィー筋の病理を示す。

20

【0126】

Myf5Cre-Fktn^{loxP}マウスモデルにおけるrAAV9.CMV.HBEGF-DAG1()の治療効果を実証するために、実施例3に記載されるのと同じ注射プロトコルおよび評価を行う。

【0127】

ジストログリカノパチーの別のマウスモデルであるLarge-vlsマウス変異体(Le et al., Mol. Cell. Neurosci. 30:160-172, 2005)。何匹かのLarge-vlsマウスに、P1で顔面静脈から 1×10^{12} vg rAAV9.CMV.HB-DAG1IVをIM注射した。これらのマウスの握力テストは、潜在的な改善を示唆する。2ヶ月でグループごとに分析された4~7匹の動物のうち、前肢の握力は野生型の $4.7 \pm .2$ g/gから未処置のLarge-vlsマウスの 3.8 ± 0.1 g/gに低下し(p=0.0005)、一方、pAAV9.CMV.HB-DAG1()処置のLarge-vlsマウス(P1で 1×10^{12} vgをIV)は、握力が $4.4 \pm .3$ g/gに改善したことを示した(偽治療のLarge-vlsに対してp=0.06)。このデータは有意性に非常に近く、追加の測定で有意差が達成される可能性がある。

30

【0128】

実施例6

リンカータンパク質としてのsHBEGFおよび栄養素

40

本明細書に記載の様々な例示的な治療用タンパク質において可溶性HBEGF(sHBEGF)のヘパリン結合ドメインおよびEGF様ドメインを使用することは、患者に二重の利益を提供する。両方のドメインを含めると、LAMA2(G1-5)またはDAG1()とともにヘパリン結合ドメインを含めることで筋肉膜の安定性が増大され、EGF様ドメインを含めるとさらに筋肉再生の刺激が得られる。図10、11、および12は、sHBEGFが筋肉におけるAktキナーゼ経路を活性化し、筋肉再生マーカーの発現を増加させることを示す。筋肉における活性化されたAktキナーゼの発現は、ミオスタチン阻害剤で見られるものと同様に、著しい筋肉の成長を刺激することが以前に示されている。したがって、本明細書に記載の様々な治療用タンパク質におけるHBEGFのEGF様ドメインの存在は、本明細書に記載の疾患の治療にさらなる治療効果を追加する。

50

【 0 1 2 9 】

5 週齢の雄の C 5 7 B L / 6 J マウスの左側の腓腹筋に、筋肉の midpoint 近くで、0.3 mL のインスリン注射器を使用して、50 μ L の滅菌 PBS の量で、 5×10^{10} ベクターゲノムの r (d s) A A V 9 . C M V . H B - E G F または r (d s) A A V 9 . C M V . s H B - E G F を注射した。マウスの反対側 (右側) の筋肉に、同量の滅菌 PBS を偽注射した。注射の 4 週間または 12 週間後に、マウスを 殺し、解剖した。腓腹筋を、O . C . T . コンパウンド ((F i s h e r S c i e n t i f i c , P i t t s b u r g h , P A) に埋め込み、液体窒素で冷却されたイソペンタンで急速冷凍した。

【 0 1 3 0 】

s H B - E G F の発現は、s H B - E G F を認識する抗体を使用して視覚化し、G a l t 2 タンパク質または C T グリカンに対する抗体のいずれかで共染色した。s H B - E G F は、r (d s) A A V 9 . C M V . s H B - E G F の注射の 4 週間後に分析された筋肉の骨格筋線維の筋鞘膜に沿って発現した。図 9 は、s H B - E G F が筋肉から分泌され得、細胞外マトリックスに付着することを示し、リンカータンパク質としてのその使用を支持する。

10

【 0 1 3 1 】

図 10 は、s H B - E G F が治療用代理筋ジストロフィー遺伝子の発現を誘導することを示す。

【 0 1 3 2 】

図 11 は、s H B - E G F が骨格筋において A k t チロシンキナーゼカスケードを誘導し、筋肉の成長および再生を刺激することができることを示す。

20

【 0 1 3 3 】

本発明は特定の実施形態に関して記載されてきたが、当業者には変形および修正が発生するであろうことを理解する。したがって、特許請求の範囲に見られるそのような制限のみが、本発明に課せられるべきである。

【 0 1 3 4 】

本出願で参照されるすべての文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

a) ヘパリン結合上皮成長因子様成長因子 (H B E G F) のヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、およびヒトラミニンアルファ 2 (L A M A 2) 遺伝子の G 1 - G 5 ドメインを含む第 2 のドメイン、

b) H B E G F の前記ヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第 1 のドメイン、および前記ヒト L A M A 2 遺伝子の前記 G 1 - G 5 ドメインを含む第 2 のドメイン、

c) H B E G F の前記ヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、および前記ヒト L A M A 2 遺伝子の G 3 - G 5 ドメインを含む第 2 のドメイン、または

d) H B E G F の前記ヘパリン結合ドメインと、H B E G F の前記 E G F 様ドメインと、を含む第 1 のドメイン、および前記ヒト L A M A 2 遺伝子の前記 G 3 - G 5 ドメインを含む第 2 のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

30

40

(項目 2)

前記タンパク質の前記第 1 のドメインが、配列番号 13 または配列番号 14 のヌクレオチド配列によってコードされる、項目 1 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 3)

前記タンパク質の前記第 2 のドメインが、配列番号 15 または配列番号 16 のヌクレオチド配列によってコードされる、項目 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 13 および配列番号 15 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

50

(項目 5)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 3 および配列番号 1 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 6)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 4 および配列番号 1 5 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 7)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 4 および配列番号 1 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 8)

i) 図 3 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 3 2 3 5、i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、または i i i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 1 (a) に記載のポリヌクレオチド。

10

(項目 9)

i) 図 4 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 3 3 6 1、i i) 配列番号 3 のヌクレオチド配列、または i i i) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 1 (b) に記載のポリヌクレオチド。

(項目 1 0)

i) 図 5 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 1 9 3 0、i i) 配列番号 5 のヌクレオチド配列、または i i i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 1 (c) に記載のポリヌクレオチド。

20

(項目 1 1)

i) 図 6 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 2 0 5 6、配列番号 7 のヌクレオチド配列、または i i i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 1 (d) に記載のポリヌクレオチド。

(項目 1 2)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 。

(項目 1 3)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、または配列番号 7 のポリヌクレオチド配列を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 。

30

(項目 1 4)

前記 r A A V のゲノムが、筋肉特異的転写制御因子をさらに含む、項目 1 2 または 1 3 に記載の r A A V 。

(項目 1 5)

前記筋肉特異的転写制御因子が、C M V プロモーターである、項目 1 4 に記載の r A A V 。

(項目 1 6)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、配列番号 2 のヌクレオチド 3 5 9 0 ~ 8 2 1 5、配列番号 4 のヌクレオチド 3 5 9 0 ~ 8 3 4 1、配列番号 6 のヌクレオチド 3 6 0 9 ~ 6 9 2 9、配列番号 8 のヌクレオチド 3 5 9 0 ~ 7 0 3 6、または図 1 3 に記載のヌクレオチド配列を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 。

40

(項目 1 7)

A A V 9、A A V 1 0、A A V r h 7 4、A A V 8、または A A V 6 カプシドを含む、項目 1 2 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の r A A V 。

(項目 1 8)

項目 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の r A A V を含む、r A A V 粒子。

50

(項目 1 9)

項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞。

(項目 2 0)

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞または H E K 2 9 3 細胞である、項目 1 9 に記載の宿主細胞。

(項目 2 1)

項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、タンパク質。

(項目 2 2)

配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、または配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む、タンパク質。

10

(項目 2 3)

項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の r A A V、項目 1 8 に記載の r A A V 粒子、または項目 2 1 もしくは 2 2 に記載のタンパク質を含む、組成物。

(項目 2 4)

ラミニン欠損筋ジストロフィーを治療するための方法であって、前記治療を必要とする患者に、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項のポリヌクレオチド、項目 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の r A A V、項目 1 8 に記載の r A A V 粒子、項目 2 1 もしくは 2 2 に記載のタンパク質、または項目 2 3 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

20

(項目 2 5)

ラミニン欠損筋ジストロフィーの治療を必要とする患者において前記治療を行う際に使用するための組成物であって、前記組成物が、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の r A A V、項目 1 8 に記載の r A A V 粒子、項目 2 1 もしくは 2 2 に記載のタンパク質、または項目 2 3 に記載の組成物を含む、組成物。

(項目 2 6)

ラミニン欠損筋ジストロフィーの治療のための薬剤の調製のための、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の r A A V、項目 1 8 に記載の r A A V 粒子、項目 2 1 もしくは 2 2 に記載のタンパク質、または項目 2 3 に記載の組成物の使用。

30

(項目 2 7)

前記ラミニン欠損筋ジストロフィーが、M D C 1 A である、項目 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法、組成物、または使用。

(項目 2 8)

a) H B E G F のヘパリン結合ドメインを含む第 1 のドメイン、およびヒトジストログリカン遺伝子のプロセシングされた天然アルファ鎖 (D A G 1 アルファ) を含む第 2 のドメイン、または

b) H B E G F の前記ヘパリン結合ドメインと、H B E G F の E G F 様ドメインと、を含む、第 1 のドメイン、および D A G 1 アルファを含む第 2 のドメイン、を含むタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

40

(項目 2 9)

前記タンパク質の前記第 1 のドメインが、配列番号 1 3 または配列番号 1 4 のヌクレオチド配列によってコードされる、項目 2 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 3 0)

前記タンパク質の前記第 2 のドメインが、配列番号 1 7 のヌクレオチド配列によってコードされる、項目 2 8 または 2 9 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 3 1)

前記ポリペプチドが、配列番号 1 3 および配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含む、項目 2 8 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

50

(項目 3 2)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 4 および配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を含む、項目 2 8 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 3 3)

i) 図 7 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 1 3 6 0、i i) 配列番号 9 のヌクレオチド配列、または i i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 2 8 (a) に記載のポリヌクレオチド。

(項目 3 4)

i) 図 8 に示されるヌクレオチド 1 4 ~ 1 4 8 6、i i) 配列番号 1 1 のヌクレオチド配列、または i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 2 8 (b) に記載のポリヌクレオチド。

10

(項目 3 5)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、項目 2 8 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 。

(項目 3 6)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、配列番号 配列番号 9 または配列番号 1 1 のポリヌクレオチド配列を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 。

(項目 3 7)

前記 r A A V のゲノムが、筋肉特異的転写制御因子をさらに含む、項目 3 5 または 3 6 に記載の r A A V 。

20

(項目 3 8)

前記筋肉特異的転写制御因子が、C M V プロモーターである、項目 3 7 に記載の r A A V 。

(項目 3 9)

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) であって、前記 r A A V のゲノムが、配列番号 1 0 のヌクレオチド 3 5 9 0 ~ 6 3 4 0、配列番号 1 2 のヌクレオチド 3 5 9 0 ~ 6 0 4 9、または図 1 4 に記載のヌクレオチド配列を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 。

30

(項目 4 0)

A A V 9、A A V 1 0、A A V r h 7 4、A A V 8、または A A V 6 カプシドを含む、項目 3 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の r A A V 。

(項目 4 1)

項目 3 5 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の r A A V を含む、r A A V 粒子。

(項目 4 2)

項目 2 8 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞。

(項目 4 3)

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞または H E K 2 9 3 細胞である、項目 4 2 に記載の宿主細胞。

40

(項目 4 4)

項目 2 8 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、タンパク質。

(項目 4 5)

配列番号 2 3 または配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む、タンパク質。

(項目 4 6)

項目 2 8 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 3 5 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の r A A V、項目 4 1 に記載の r A A V 粒子、または項目 4 4 もしくは 4 5 に記載のタンパク質を含む、組成物。

(項目 4 7)

50

ジストログリカノパチーを治療するための方法であって、前記治療を必要とする患者に、項目 28 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 35 ~ 40 のいずれか一項に記載の rAAV、項目 41 に記載の rAAV 粒子、項目 44 もしくは 45 に記載のタンパク質、または項目 46 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 48)

ジストログリカノパチーの治療を必要とする患者において、前記治療を行う際に使用するための組成物であって、前記組成物が、項目 28 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 35 ~ 40 のいずれか一項に記載の rAAV、項目 41 に記載の rAAV 粒子、項目 44 もしくは 45 に記載のタンパク質、または項目 46 に記載の組成物を含む、組成物。

10

(項目 49)

ジストログリカノパチーの治療のための薬剤の調製のための、項目 28 ~ 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、項目 35 ~ 40 のいずれか一項に記載の rAAV、項目 41 に記載の rAAV 粒子、項目 44 もしくは 45 に記載のタンパク質、または項目 46 に記載の組成物の使用。

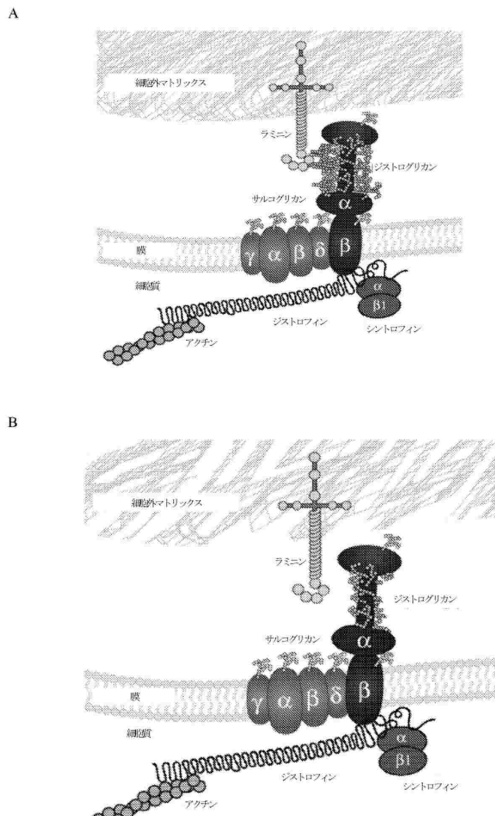
(項目 50)

前記ジストログリカノパチーが、ウォーカー・ワールブルグ症候群、筋眼脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、MDC1C、MDC1D、LGMD2I、LGMD2K、LGMD2M、LGMD2N、LGMD2O、LGMD2P、LGMD2T、またはLGMD2Uである、項目 47 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法、組成物、または使用。

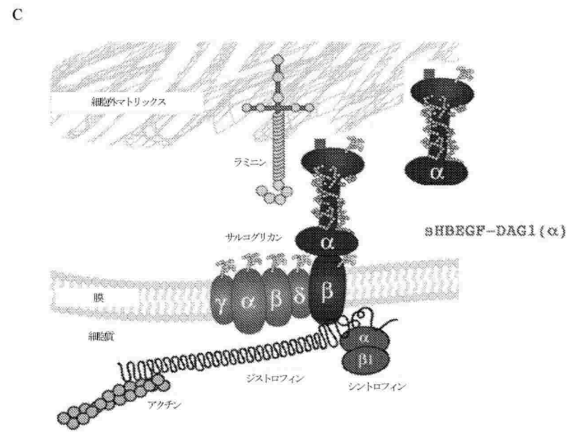
20

【図面】

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



30

40

50

【 図 3 - 3 】

```

5' CCGTCTGAGAGTGGCTCTCCGACGGGCGDNRACNKTGAGGABAATTCATCAGACGACAGCGAATCTGTTTCATG 1760
0
1 R L E V H L S T G A R T Y M K I V I R P E F N L F H
2
3 ATGGAAGGACATTCGGTTCATGAGAGGACTGAGGCACTTTACAGTTCAGTGGATGAAACAGAGATACATG 1840
0
1 D G R E H S V H V E R T R C I P T Y V O D E N B R Y M
2
3 CAAAACCTGACAGTTGAAAGCTTGTGAACTAAAAGCTTCTGGTGGCTGCTGACGCAATGATGCTGCTG

```

【 図 3 - 4 】

```

5' E A D S P N P A S T S A D T N D P V P V G O F P D D L
2
3 CAGGCAGTTGGCTTACACAGCAGTATTCGGTCCGAGGTTGCATGAGTCCCTGAGGCTCACCAAGGCACAGGAGCC 3200
0
1 K Q F G L T T S I F F A G C I R S L K L T K G Y A B
2
3 ACTGAGGTATTTGGCAGGCCCTGGACTGACTAGTGGGCGCCGAA
0
1 H W R L L L P R P W N T S A A A 3251
2
3

```

```

5' T H T M I P T K I N D S Q W N K I K I M R S K D E G
2
3 TCTTTATGATGAGTGGGCTCCACAGAACCATAGTCCCAAAAAGCGACATCGTGGATGTCGGGAAAGCTGAT 2550
0
1 L Y V D G A S N R T I S P K K A D I L D Y V G M L V
2
3 GTGTGGGTTACCACTACACTACACTACCCAGAGATGGTCCAGGAGCTATAGCATTGATGCTGCTGAGGATCT 2640
0
1 V G G L P I N V T T R A I S P V T V S I D G C V R N L
2
3

```

【 図 4 - 1 】

HB-EGF (完全欠明瞭) -LAMA2 G1-G5

```

5' AAGCGCCGACACATGAGCTGCTGCCGTGCGTGGTGTCTGAAGCTCTTTCTGGCTGCAGT 60
0
1 S G R T M K L L P S V V L K L F L A A V
2
3 TCTCTGGCACTGGTGA CTGGCGAGGAGCCTGGAGCGGCTTCGGAGAGGGCTAGCTGCTGG 120
0
1 L S A L V T G E S L E R L R R G L A A G
2
3 AACCAGCACCCGGACCTCCCACTGTATCCAGGACAGCTGCTACCCCTAGGAGGCGG 180
0
1 T S N P D P P T V S T D Q L L P L B G G
2
3 CCGGACCGGAAATCCGTGACTTGCAGAGGCAGATCTGGACCTTTTGAGAGTCACTTT 240
0
1 R D R K V R D L Q E A D L D L L R V T L
2
3 ATCCTCCAGCCACAAGCACTGGCCACACCAACAGGAGGACACGGGAUAGAAGAA 300
0
1 S S K P Q A L A T P N K E E H G K R K
2
3 GAAAGGCAAGGGCTAGGGAGAGAGGGGACCATGCTTCGGAAATCAAGGACTTCTG 360
0
1 K G K G L G K K R D P C L R K Y K D F C
2
3 CATCCATGGAGAATGCAATATGTGAAGGAGCTCCGGCTCCCTCTGCATCGCCACC 420
0
1 I H G E C K Y V K E L R A P S C I C H P
2
3

```

【 図 4 - 2 】

```

5' GGGTACCATGGAGAGGTTGTCATGGGCTGAGGCTCCAAAAGTATCTGTGCTTCAGG 480
0
1 G Y H G E R C H G L S L P K V S Y S S G
2
3 AGGTGACTGCATTCGAACATACAAACCCAGAAATCAAGAAGGAGGTTACAATATATTGT 540
0
1 I D F L A I E M R K G K V S F L W D V G 660
2
3 ATCTGGAGTTGACGGTGTAGAGTACCAGATTTGACTATTTGATGACTCATATTTGGTACCG 720
0
1 S G V G R V E Y P D L T I D D S Y W Y R
2
3 TATCTGACATCPAGACTGGGAGAAATGGAACTTTCCTGTGAGAGCCCTGGATGGACC 780
0
1 I V A S R T G R N G T I S V R A L D G P
2
3 CAAAGCCAGCATTTGGCCCGACACACCACTTCGAGGCTTCCTCCAGGGTACAGGATCT 840
0
1 K A S I V P S T H S T S P P G Y T I L
2
3 AGATGTGGATGCAATGCANTGCTGTTGTGTGGTGGCTGACTGGGAATTAAGAAGGC 900
0
1 D V D A N A M L F V G G L T S K L K K A
2
3

```

10

20

30

40

50

【 4 - 3 】

```

5' TGATGCTGACGGTGTATTACATTCACCTGGCTGCATGGGAGAAACATACTTTGACAACAA
960
2 D A V R V I T F T G C M G E T Y F D N K
5' ACCTATAGGTTTGGGAAATTCCEGAGAAAAGAGGTGACTGCAAAAGGATGCACTGTGAC
1020
2 P I G L W N F R E K E G D C K G C T V S
5' TCCTCAGGTGGAAGATAGTGGGGGACTATTCAAATTCATGGAGAAGGTTATGCATTGGT
1080
2 P Q V E D S E S T I Q F D G E G Y A L V
5' CAGCCGTCCCATTCGCTGGTACCACCAACATCCACATGTCATGTCAGTTTCAGAACATT
1140
2 S R P I R W Y P N I S T V M F K F R T F
5' TTCCTCAGTGGCTCTCTGATGATCTTGCCACAGAGACTGAGAGATTCATGAGTGT
1200
2 S S S A L L M Y L A T R D L R D F M S V
5' GGAGCTCACTGATGGCACATRAAAGTCAGTTACGATCTGGGCTCAGGAATGGCTCCGT
1260
2
5'
2
0 K Q A N I S I V D I D T H Q E E N I A T
1380
5' TTCGTCCTTGGAAACCACTTTGGCTTGTACTTGAAGCAGATGACAAATATATTTGG
1440
2 S S S G H N F G L D L K A D D K I Y F G

```

【 4 - 4 】

```

5' TGGCCCTGCCAACCGTGGAAACCTTGAGTATGAAAGCAGGGCCAGAAGTAATCTGAGGAA
1500
2 G L P T L R N L S M K A R P E V N L K K
5' ATATTCGGCTGCCTCAAGATATTGAAATTCGAAGACTCCGTACAATATACTCAGTAG
1560
2
5'
2
0 P K P G F V E L S F V P I D V G T E I N
1740
5' CCTGTCAATCAGCACCAAGAAATGAGTCCGGCATCATCTTTGGGAAGTGGAGGGACACC
1740
2 L S F S T K N E S G I I L L G S G G T P
5' AGCACCCCTAGGAGAAAAGGACAGACTGGACAGGCCATATATGTAATACTCTCAA
1800
2
5'
2 A P P R R K R R Q T G Q A Y Y V I L L N
1860
5' CAGGGCCGCTCGAAGTGCATCTCCACAGGGGACGAACAATGAGGAAAATGTGAT
1860
2
5'
2 R G R L E V H L S T G A R T M R K I V I
1920
5' CAGCCAGAGCCGAATCTGTTTCATGATGGAAGAGAACATCCCTTCATGTAGAGCCGAC
1920
2 R P E P N L F H D G R E H S V H V E R T

```

10

20

【 4 - 5 】

```

5'
2
0 S P L R N I P P F E G C I I W N L V I N S
2100
5' TGTCCCATGGACTTTGCAAGGCTGTGTCTTCAAAATGCTGACATTTGGTCGCTGTGC
2160
2 V P M D F A R P V S F K N A D I G R C A
5' CCATCAGAACTCCGTGAAGATGAAGTGGAGCAGCTCCAGCTGAAATAGTTATCCAGCC
2220
2 H Q K L R E D E D G A A P A E I V I Q P
5' TGAGCCAGTTCACCCACCCCTTCTCTAGGCCACCCAGTTCGACACATGATGCTCTTG
2280
2 E P V P T P A F P T P T P V L T H G P C
5' TGTGCGAATCAGAACCAGCTCTTTTGTAGGGAGCAGCAGTTCGGGCTTTCAAGAAA
2340
2 A A E S E P A L L I G S K Q P F G L S R N
5' CAGTCACATTCGAATTTGATGACACCAAGTTAAAACCCGCTTCACAAATGAGTT
2400
2 S H I A I A F D D T K V K N R L T I E L
5' GGANGTANGAACCGAAGCTGAATCCGGCTTGCTTTTACATGGCTCGCATCAATCATGC
2460
2 E V R T E A E S G L L F Y M A R I N H A

```

【 4 - 6 】

```

5' TGATTTGCAACAGTTCAGCTGGAATGGATTGCCCTACTTCAGCTATGACTTGGGGAG
2520
2 D F A T V Q L R N G L P Y F S Y D L G S
5' TGGGACACCCACACCATGATCCCCACCAAAATCAATGATGGCCAGTGGCACAAAGTAA
2580
2 G D T H T M I P T K I N D G Q W H K I K
5' GATATGAGAGTATGCAAGCAGGAATCTTATGTAGATGGGGCTTCCAAACAGAACCT
2640
2 I M R S K Q E G I L Y V D G A S N R T I
5' CAGTCCAAAAGCCGACATCTGGATGTCGTGGGAATGCTGTATGTTGGTGGGTACC
2700
2
5'
2
0 N L H M A E A P A D L E Q P T S S F H V
2880
5' TGGGACATGTTTCCAAATGCTCRAGGGGACATATTTGACGGAACGGTGTGCCAA
2880
2 G T C F A N A Q R G T Y F D G T G F A K
5' AGCAGTTGGTGGATCAAGTGGGATGGACCTCTTGTGAAATTTGAATCCGCACAC
2940
2 A V G G F K V G L D L L V E F E F R T T
5' TACAACGACTGGAGTCTTCTGGGATCAGTAGTCAAAAATGGATGGAATGGGTATGGA
3000
2 T T T G V L L G I S S Q K M D G M G I E

```

30

40

50

【図 4 - 7】

```

50: AATGATTGATGAAAAGTTGATGTTTCATGTGGACAAATGGTGGGGCAGATTCACTGCTGT
00: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
02: M I D E K L M F H V D N G A G R F T A V
04: CTATGATGCTGGGGTTCAGGGGCATTTGGTGTGATGGACAAATGGCATAAAGTCACTGCCAA
06: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
08: Y D A G V P G H I C G G A W H K V Y T A M

3060

10: NPASTSTSDTNDPVFVVGFPD
12: TGACCTCAAGCAGTTGGCCATAACAACAGTATCCGTTCCGAGGTTCATCAGATCCCT
14: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
16: D L K Q F G L T T S I P P R G C I R S L
18: GNAAGCTACCAAGGCACAGCAAGCCACTGGAGGTTAATTTGCCAAGGCCCTGGAACTG
20: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
22: K L T K G T A S H W R L I L P R P W N
24: AACTAGTCGGGCGCAA
26: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
28: T S A A A

```

【図 5 - 1】

HB-EGF (ヘリン結合ドメインで終) -LAMA2 G3-G5

```

80: AAGCGCCGACATGAGGCTGTGGCGTGGTGTGCTGAACTCTTTCGGCTCAATCTCTGGGCACTGGTACTG
00: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
02: S S R Y M K L L P S V V L K L P L A A V E S A L V T
04: GCGAGAGCCTGGGGGCGTTCGGAGAGGGCTAGCTGTGACACAGCAACCGGACCTCCACTGTATACAGGGCCAG
06: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
08: G E S L E R L R R G L A A G T S H P D P P T V S Y D Q
10: CTGTACCCCTAGGAGCGGGCGGACCGGAAAGTCCGTGACTTGCAGAGGCAGATCTGGACCTTTGAGAGTCACTT
12: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
14: L L F L G G G R D K K V R D L Q E A D L D L L V Y T I
16: ATCCCTCAGCCACAGCCTGCCACCAACAGGAGGAGGACACGGAAAGAGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
18: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
20: S S R P D A L A T P R K E E H G R K K K K G K B L O
22: AGAGAGGGGCGGCGGAGCTGACAGGCTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
24: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
26: K K R D P Q T G D A Y Y V I L L H R G R L E V H L S T
28: GGGCAGACAAATGGGAAATTTGATCAGACAGAGGAGATCTGTTCATGATGAGAGACATTCCTTCAATG
30: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
32: W N T S A A A

```

10

【図 5 - 2】

```

880: CCACCCAGCCCTTCTACGCGCCAGTCTGACACATGGTCTGTGGTGGAGATCAGAACCCAGCTTTTGATA
900: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
920: F T P A P P T P T P V L T H S P C A A E S E P A L L I
940: GGGACGAGCAGTTGGGCTTCAGAAACGCTCAGCAATGCATTCGATGACACCAAGTTAAAGCCGCTCAC
960: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
980: Q S K Q P Q L S R N S H I A I A F D D T K V K R R L T
1000: AATGAGTGGAGTAAAGCCAGCTGATCCGGCTGCTTTTACAGGCTGCGATGATCAGTATTTSCAA
1020: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1040: I S L E V R T E A E S G L L F Y M A R I N H A D E A
1060: CAGTTCAGCTGAGAAATGATTCGCTACTTCAGCTATGACTGGGAGTGGGGACCCACCAATGATCCCCCAAA
1080: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1100: T V D L R N G L P Y F S Y D L G S D D T H T M I P T K
1120: ATCAATGATGGCAGTGGCACAGKTATAGATATAGAGAGTAAAGCAGAAAGATTCITATGAGATGGGGTTCCAA
1140: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1160: I N D G G W H K I K I M R B K D E G I L Y V D G A S N
1180: CAGAACCATGGTCCCAAAAAGCCAGATCTGGATGCTGGGAGTGTGATGTTGGGGTTACCCATCACATCA
1200: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1220: R T Y S F K E A D I L D V V G M L Y V G D L P I S Y
1240: CTACCCAGAAATTTGTCAGTGACTATAGATGATGCTGGTCCAGAAATCTCCAGTGCAGAGGCCCTGGCAT
1260: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1280: T T R B I Q P V T Y S I D G O V R H L H M A E A P A D
1300: CTGGACACCCCTCCAGCTTCCATGTTGGGAGTGTGCAATGCTCAGAGGGACATATTTGACGAGACCGG
1320: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1340:
1360: GACAAAGTGGGGCAGATTCAGTCTGTGTATGATGCTGGGGTCCAGGCCATTTGTTGATGGACATGGCATAAAGT
1380: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1400: D N G A G R F T A Y Y Q A G Y P G N L O D G G W H K V
1420: CACTGCCAACAGATCAACACCGATGAGCTCAGCTGATGGGAGCCAGGTGGAGCCCAAGCCCAAGCCAGCAT
1440: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1460: T A N K I K H R I E L T V D G N O V E A O S P R P A

```

【図 5 - 3】

```

1840: CTACACACCTGACACAAATGACCTGTGTTTGGAGGCTTCCAGATGACCTCAGGAGTTGGCCATCAACACAGT
1860: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1880: S T S A D T N D P V F V G F P D D L K Q F G L T T S
1900: ATTCCCTCCGAGGTTCATCAGATCCCTGAGCTCACCAGGCGCAGCAGGACACTGGAGGTTAATTTGCCAGGCC
1920: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1940: I P P R G C I R S L E L T A G T A S H W R L I L P R P
1960: CTGGAAGTAACTAGTGGGCGGCAA
1980: +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2000: W N T S A A A

```

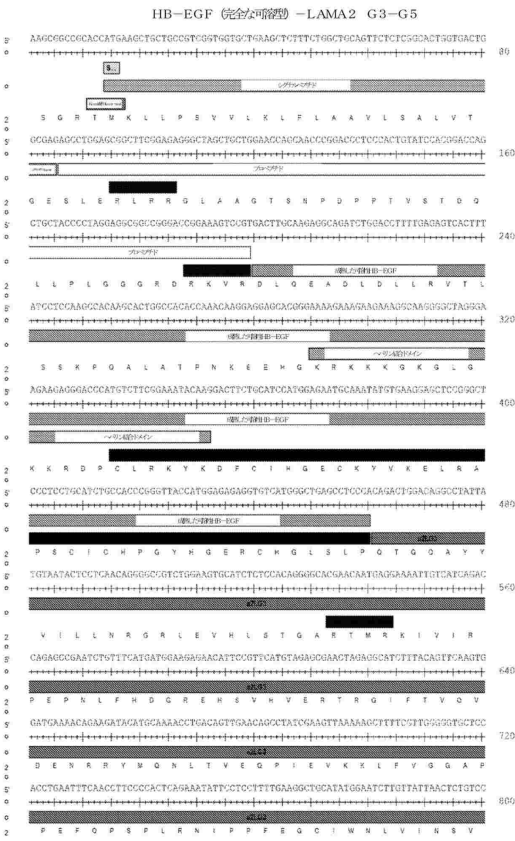
20

30

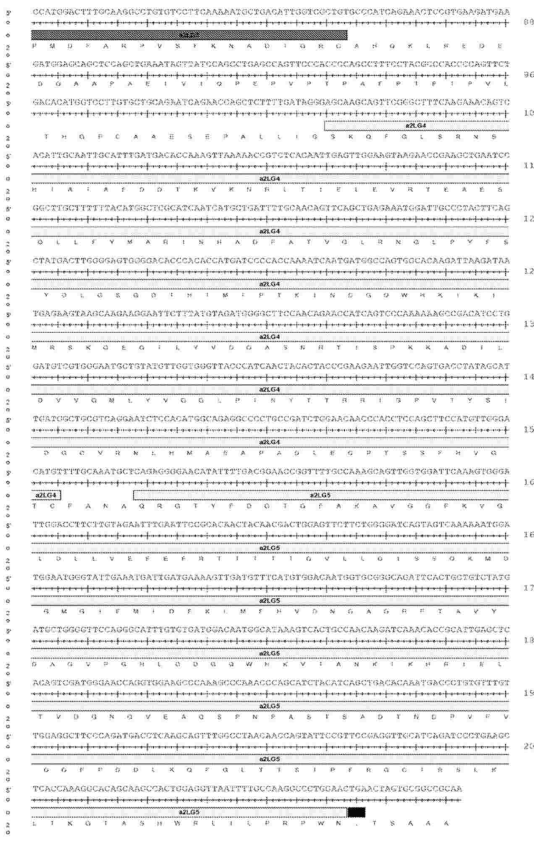
40

50

【図6-1】



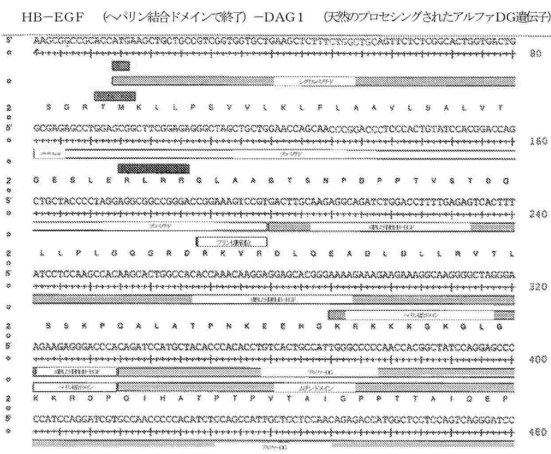
【図6-2】



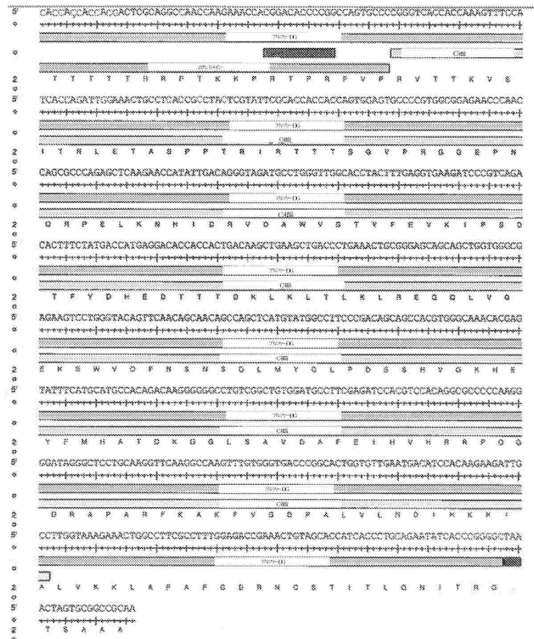
10

20

【図7-1】



【図7-2】

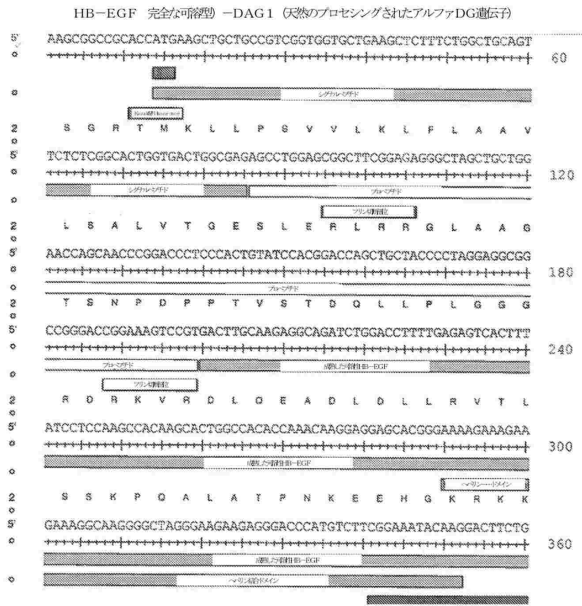


30

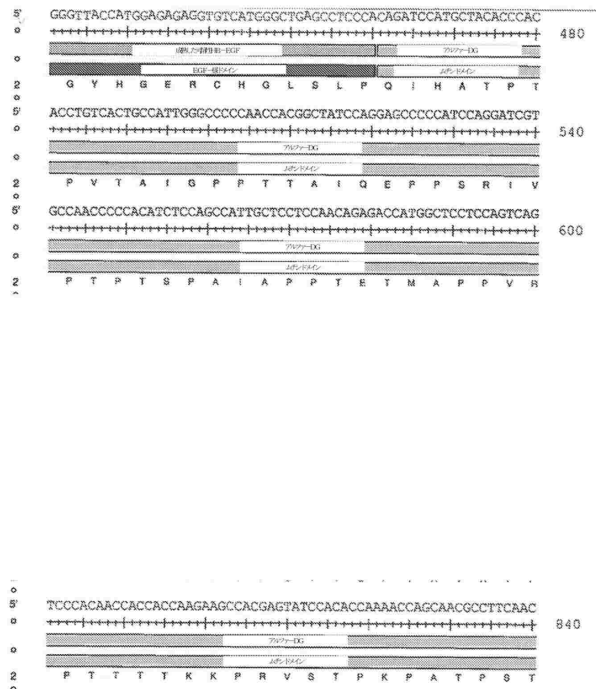
40

50

【 図 8 - 1 】



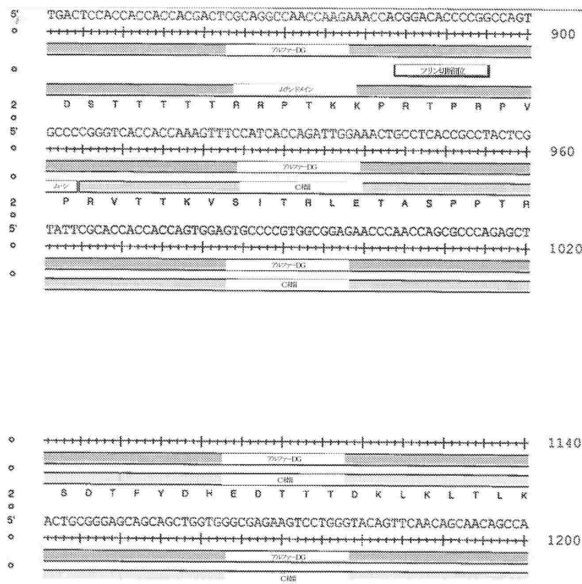
【 図 8 - 2 】



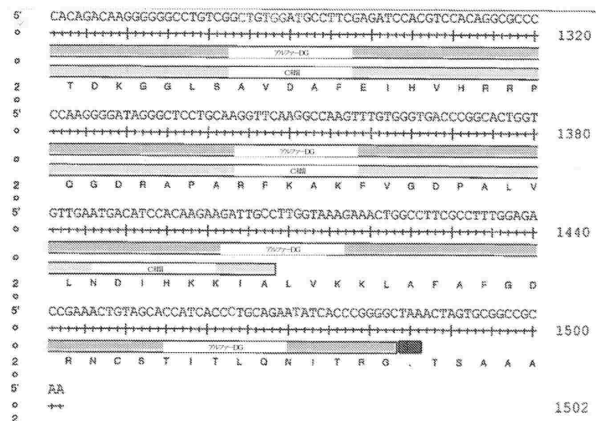
10

20

【 図 8 - 3 】



【 図 8 - 4 】

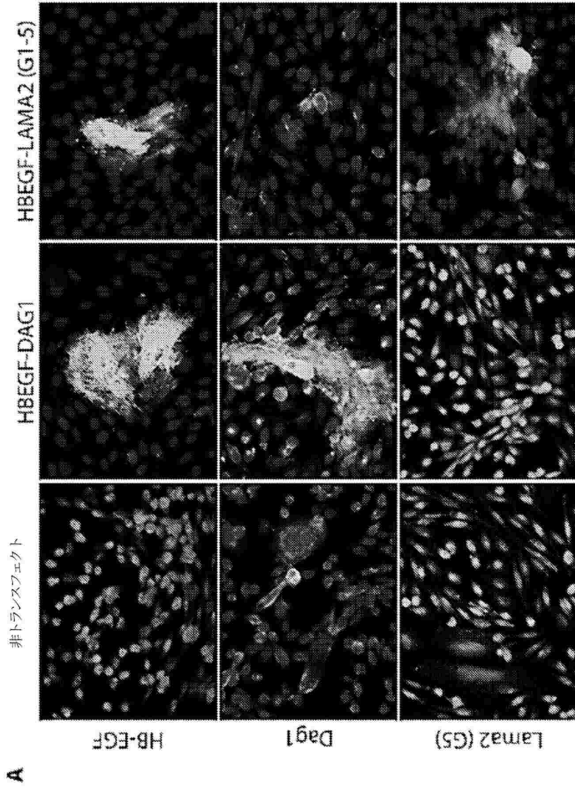


30

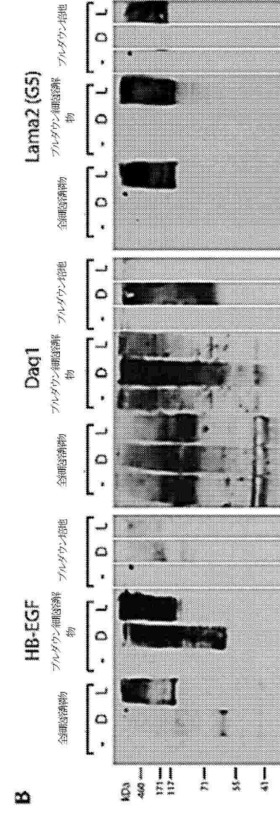
40

50

【 9 - 1 】



【 9 - 2 】



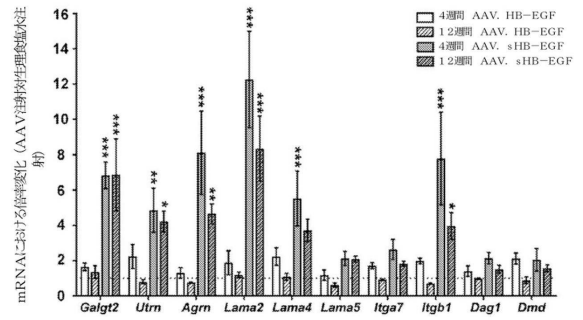
10

20

【 1 0 】



【 1 1 】

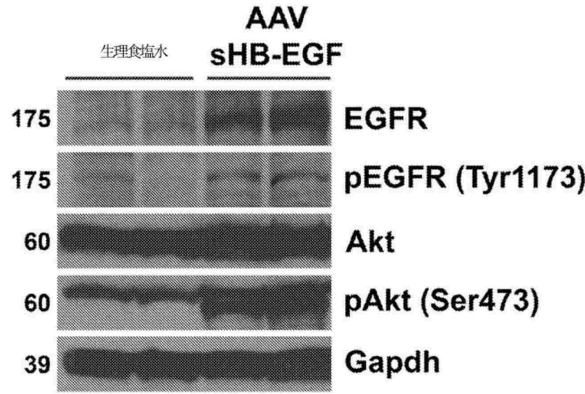


30

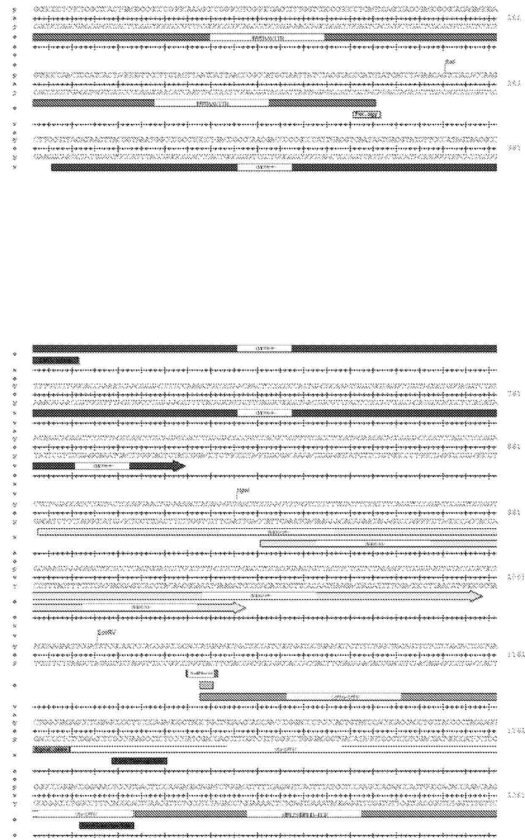
40

50

【 図 1 2 】



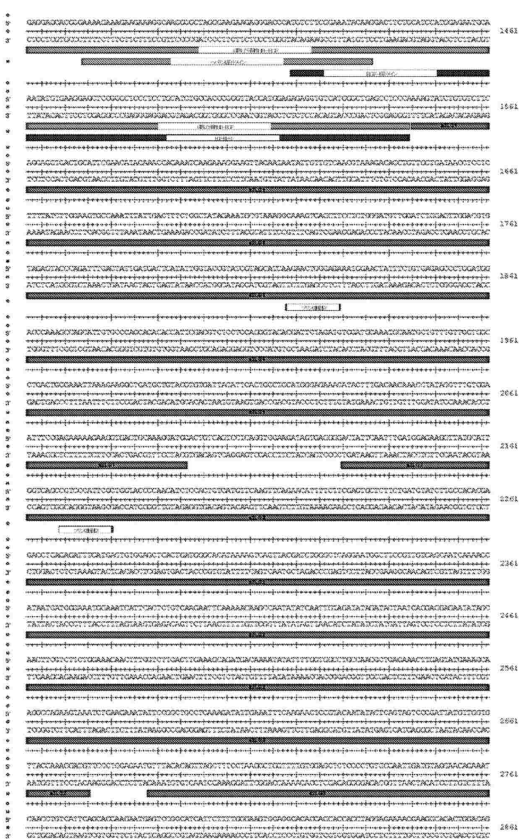
【 図 1 3 - 1 】



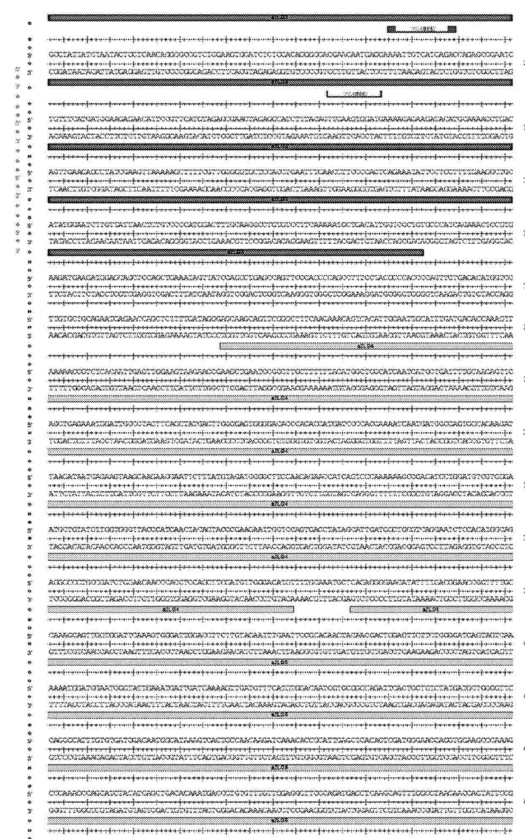
10

20

【 図 1 3 - 2 】



【 図 1 3 - 3 】

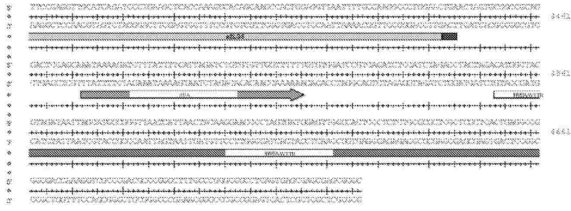


30

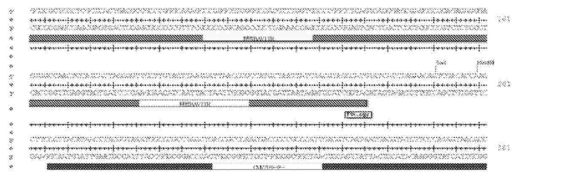
40

50

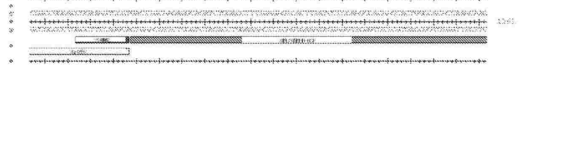
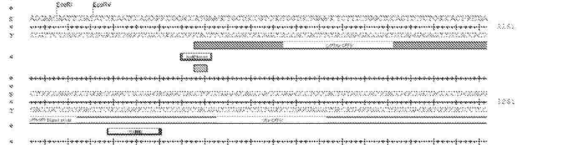
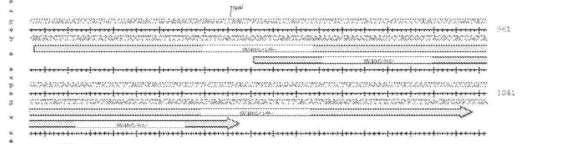
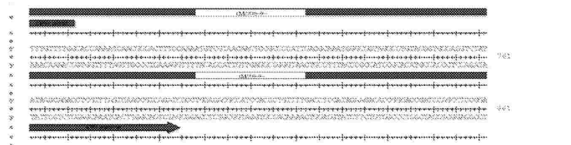
【 図 1 3 - 4 】



【 図 1 4 - 1 】

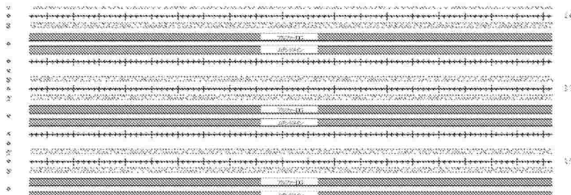


10

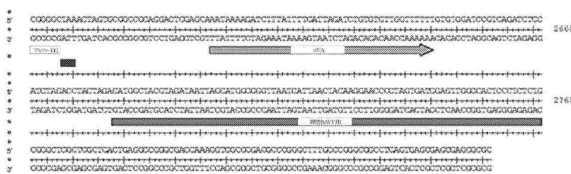


20

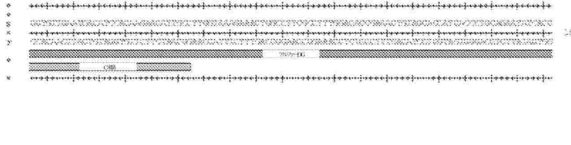
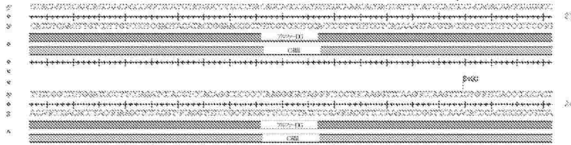
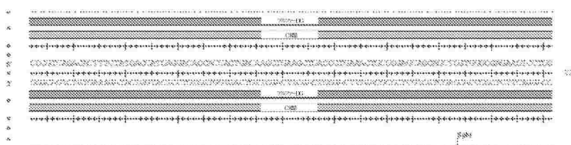
【 図 1 4 - 2 】



【 図 1 4 - 3 】



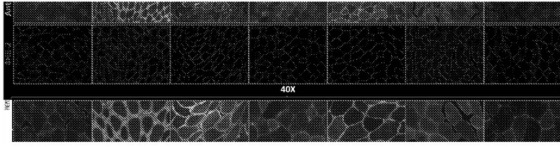
30



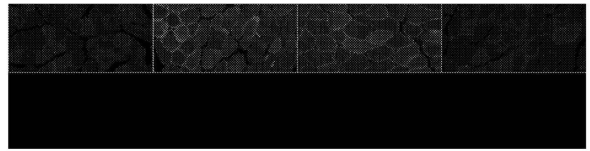
40

50

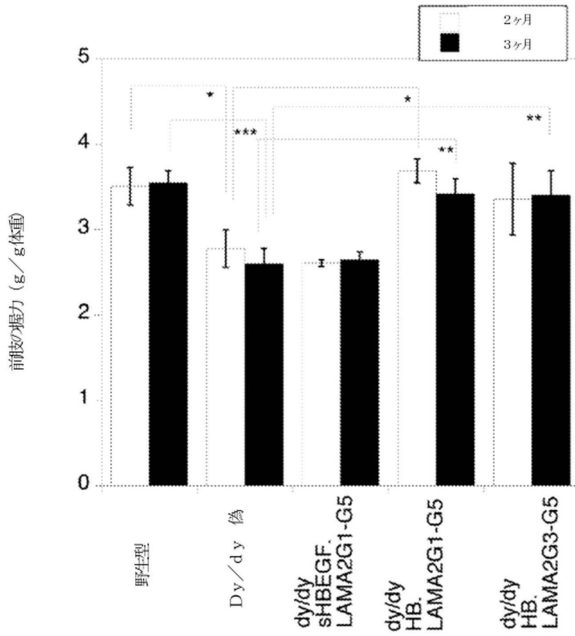
【 図 1 5 】



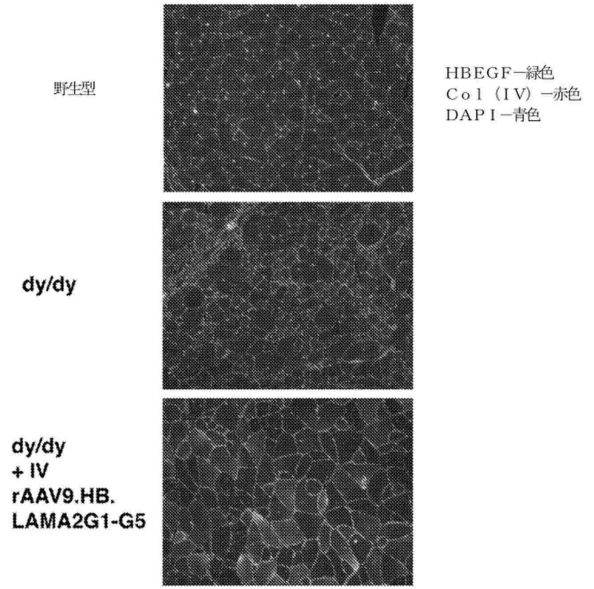
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



10

20

30

40

50

【 図 1 9 - 1 】

r AAV. CMV. HB. LAMA2 (G1-G5) (配列番号2)



GCTCTCCGCTTGGTCGCTACTGACTCGTCCGCTCGTCTCGGCTCGCGCGG
 AGCGGTATAGCTCACTCAAAACCCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
 TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
 AAAAGGCCCGGTGCTGGCGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCAGCAGATCA
 AAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGAGGTCGGCAAAACCCGACAGGACTAAAGATA
 CCAGGCGTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTTCGCACCTCGCCG
 TTACCGGATACCTGCTTCTTCTTCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCTAATG
 TCACGCTGTAGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGCTTCCAGCTGGGCTGTG
 TCAGCAACCCCGTTAGCCAGCCAGCTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
 CAGGATAGCAGAGCGAGGTATGTACCGCGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGT
 GCCTAACCTACCGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGGCTCTCTGAAG
 CCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTGTGATGCTCTGTACCCGCAAAACAAACC
 GCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGTATTCGCGCAGAAAAAAG
 GATCTCAAGAAATCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTAGTGGAAACGA
 AAACACTAGTTAAGGATTTTGGTCTATGAGATTTCAAAAAAGGATCTCACCTAG
 ATCTTTTAAATTAATAAGTGTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
 CTGTGCTGACAGTTACCAAGTCTTAACTAGTGGCCACTCTCCAGGATCTG
 TCTATTCGTTTACTCATAGTTGGCTGACTCCCGCTGTGTAGATACTACGATC
 GGGAGGCTTACCAGTCCGCGAGTCTGCAATGATACCCGAGACCTGAGCGGCT
 CACCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGCGGAGCGCA
 GAAGTGGTCTCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTAATTTGTTCCGGGA
 AGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAGTFAATAGTTTGGCAACGTGTTGTCACATGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTGTGGTATGGCTTCTTACGCTCCGGTTC
 CCAACGATCAAGCGGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAG
 CTCCTTCGGTCTCCGATCGTGTGCAAGAAAGTGTGGCGCAGTGTATCTACTC
 ATGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTT
 TTCTGTAGCTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCTTCTGAGAATAGTGTATGCGCGCA
 CCGAGTTGCTTCTTCCCGCGCTCAATACCGGATAATACCCGACCATAGCAGA
 ACTTAAAGAGTGCATCATTTGAAAGCTTCTTCCGGGGGAAAAACTTCAAGGA
 TTTACCGCTGTGTAGATCTGAGTGTGATGTAACCCACTGTCGGCAACCACTG
 TTAGCATCTTTTACTTCAACAGGCTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGCAA
 AATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTGAATACTCATACT

【 図 1 9 - 2 】

TTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATA
 CATATTGAAATGATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGGCCACATTTCCC
 CGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTATA
 AAAATAGGGGATACACAGGACCCCTTTCGCTCGCGGCTTTCGGGTATGACGGGTGA
 AAACCTCTGACACATGACGCTCCGGGAGCGGTACAGCTTGTCTGTAAAGCGGAT
 GCGGGGAGCAGCAAGCCCTCAGGGCGGCTCAGCGGGTGTTCGGCGGTTGCG
 GCTGGCTTAACATGCGGCTACAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATG
 GGTGTAAATACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAATACCCGATCAGGAACTCC
 AACATCCAATAATCATACAGGCAAGGCAAGAAATTAGCAAAATTAAGCAATA
 AGCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGGTGTACCAAAAAACATATGACCTGTAAT
 ACTTTTGGGGAGAAGCTTTATTTCAACGCAAGGATAAAAAATTTTGAACCT
 CATATTTTAAATGCAATGCTGAGTATGTGTAGTAAAGATTTCAACCGGGT
 AGAAAGGCCGGAGACAGTCAAACTACCATCAATATGATATTCACCGTTTCTAGC
 TGATAAATTCATGCGGGAGGGTGTAGTATTTTGTAGAGGTCTCTCAAAAGGCTA
 TCAGGTCTTGCCTGAGAGTCTGGAGCAAAACAAGAAATCGATGACCGGTAAT
 GTAAAACAGTGTCAATCATATGACCCCGGTGTATAATCAGAAAAAGGCCA
 AAAACAGGAAGATGTATAAGCAATATTTAAATTTGAACATTTTAAATTTTGT
 AAAATTCGGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCTTTTTTAAACCAATAGGCCGAA
 ATCGGCAAAATCCCTTAATAAACAAGAAATAGACCGGATAGGGTGTAGTGT
 GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCATTTAAAGAACTGTGACCTCAACGCTAA
 GGGCGAAAACCGCTCTACGGGCGATGGCCGATGTGCAACCTCAACCTTAA
 TCAAGTTTGTGGGTCAGGGTGCCTAAATCCTAAATCGGAACCTTAAAGGGA
 CCCCCTTAAAGCTTACGGGGGAAAGCGGACCTGAGGCGGAGGAAAGGAA
 GGGAAAGAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAGCTAGCGGTCAC
 GCTCGCGTAACCCAGCCAGCCGCGCTTATCGCCGCTACAGGCGGCTA
 CTATGGTGTCTTTCAGCAGCAGTATAACGCTTCTTCTGTAGAAATCAGAGCG
 GGAGCTAAACAGGAGCGGATTAAGGAGATTTAGACAGGAACCGTACCGCCAA
 ATCTGAGAAGTGTTTTAAATCAATGAGTGGCCCGGATGAAAGATCTGTGCTCA
 TCAGCAAAATTAACCGTGTGCGAATCTCTTGTGATTAATAACATCACTTCC
 CTGAGTAAAGAACTAAACTAACTATCGGCCCTGTGGTAAATTCAGCAAAATTA
 CGCCAGCATTGCAACAGGAAAAACGCTCATGGAATACCTCATTTTTCAGCT
 CACTGTCTGGAATCTTCAATTCGCCATTCAGGCTTGGAAATTCAGTTGGAAAGGGG
 ATCGGTGCGGGCTCTTCCGCTATACGCCAGCTGNNNNNGCCCTTCTGCTCGC
 TCACTGAGCGCGCCGGGCAAGCGCCGCGGAGGAGGAGTGGCCAACTCCATCA
 CGCCCTCAGTGGCGAGGAGCGCGGAGGAGGAGGAGTGGCCAACTCCATCA
 TTAGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCGCATGCTAATTTACGTA
 GCCATGTCTAGGGTCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCC
 AACGCCCCCCCCATTGACGTCAATAAGTACGATGTTCCTCATAGTAAAGCCAAATAGG
 GACTTTCATGACGCTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTAC
 ATCAAGGTATCATATGCCAAGTACGCCCTTATGGACGTACGAGTAAATGGCC
 GCTTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCA
 CCTATTAGTATCGCTATTACCTATGGTGTATGGGTTTGGCAGTACATTAATGGCGGT
 GATAGCGGTGTACTACCGGGATTTCAAGTCTCCACCTTACGCTAATGGCGG
 TTTGTTTGGCAACAAATCAACGGGACTTCCAAATGTCTGTAACCTCGCCCAAT
 TGACCAATGGCGGTAGCGGTGTACGGTGGGAGGCTATATAAGCAGGCTCGT
 AGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGAGCGCATCAACGCTGTTTGGCAGCTCAATGAA
 GACACCGGGACCGATCCAGCTCCGGACTTACGAGGACTCGGACTCGAGGAACTG
 AAAACAGAAAGTTAAGTGTAAAGTTAGTCTTTTGTCTTTTATGAGTCCGGAT
 CCGGTGGTGGTCAAACTAAAGACTGCTCTCAGTGGATGTGCTTACTCTTAGG
 CCTGACGGAAGTGTACTCTCTGCTCTAAAAAGTGGCAATTGTACCCCGCGGCCAC

10

20

【 図 1 9 - 3 】

CATGAAGCTGCTGCCGTCGGTGTGCTGAAGCTCTTTTGGCTGCAGTCTCTCG
 GCATGGTGAAGTGGCAGAGCTTGGAGCGCTTCCGAGAGGGCTAGCTGCTG
 GAAACGCAACCCCGGACCTCCACTGTTATCCACGGACAGCTGCTACCCC
 TAGGAGGCGCCCGGAGCCGAAAGTCCGCTGACTTGAAGAGGCAGATCTGG
 ACCTTTTGAGAGTCACTTTTCTTCAAGCCCAAGCACTGGCCACACAAA
 CAAGGAGGAGCCGGGAAAAGAAAGAAAGGCAAGGGGCTAGGGAGAA
 GAGGAGCCCAAAAGTATCTGTGTCTCAGGAGGTGACTGCTATTGCAACATACAA
 ACCAGAAATCAAGAAAGGAAAGTTCAATAATATTTGTTCAACGTAAGAGCAGC
 TGTTGTGATAACCTCTCTTTTATCTTGGAAAGTGCACAAATTTATGACTTTCTGG
 CTATAGAAATAGCGTAAAGCCAAAGTCAAGCTCTCTTGGGATGTTGGAATCTGGAGT
 TGGAGCTGTAGAGTACCCAGATTTGACTATTTGATGACTCATATTTGGTACCATG
 TAGCATCAAGAACTGGGAGAAATGGAACATTTCTGTGAGAGCCCTGGATGGA
 CCAAAAGCCAGCATTGTGCCAGCACACACCATTCGACGCTCTCCAGGGTACA
 CGATTTAGATGTGGATGCAAAATGCAATGCTGTTTGTGGTGGCTGACTGGGAA
 ATTAAGAAAGGCTGTGCTGACTGTGATTACATTCAGTGGCTGCATGGGAGAA
 ACATACATTTGACAACAACTATAGGTTTGTGGAATTTCCGAGAAAAAGAGGT
 GACTGCAAAAGGATGCACTGTCACTCTCAGTGGAAAGATAGTGAAGGGAATTT
 CAATTTGTAGGAGAAAGTTATGCTATGGTCAAGCCCTCCATCGCTGTTACCCCA
 ACATCTCCACTGTCAATGTTCAAGTTCAGAACATTTTCTTCAAGTGTCTTCTGATG
 TATCTTGGCACAAGAGCTGAGAGATTTATGATGTTGGAGCTCACTGATGGG
 ACATAAAAGTCAAGTACGATCTGGGCTCAGGAATGCTTCCGTTGTCAGCAATCA
 AAAACCAATATGTTGGGAAATGGAATCAATCACTCTGTCAAGAAATCAAAAAA
 AGCCAATATCAATTTAGATATAGATACTAATCAGGAGGAGAAATAGCAAC
 TTCGTTCTTGGAAACAACTTTGGTCTGACTTGAAGCAGATGACAAAAATATAT
 TTTGGTGGCTGCCACGCTGAGAAACTTGAATGAAAGCAAGGCCAGAAAGTAA
 AATCTGAAGAAATATTCGGCTGCTCAAGATATTGAAATTTCAAGAACTCCGT
 ACAATATACTAGTACCCGATATGTTGGTGTACCAAGGATGTTCCCTGGGA
 GAATGTTTACACAGTTAGCTTTCTTAAAGCTGTTTGTGGAGCTTCCCTGTG
 CAATGATGTAGGAACAGAAATCACTGTCACTCAGCAACAAAGATGAGTCCG
 GCATCTTTTGGGAAGTGGAGGACACCAGCACCACCTAGGAGAAACGAA
 GGCAGACTGGACAGGCTATTATGTAATCTCTCAACAGGGGCGCTTGG
 AAGTGCATCTCCACAGGGGCAAGCAATGAGGAAAAATGTCATCAGAC
 CAGAGCCGAATCTGTTTTCATGATGGAAGGAGAACATTCGGTTCATGTAGAGCG
 AACTAGAGGCATTTTACAGTCAAGTGGATGAAAAACAGAAATACATGCAAA
 AACCTGACAGTTGAAACAGCTATCGAAGTTAAAAAGCTTTTCGTTGGGGGTT
 CTCCACTGAAATTCACACTTCCCACTCAAGAAATATCTCTCTTTTGAAGG
 CTGCATATGGAATCTTGTATTAATCTGTCCTCCATGGACTTGTCAAAGGCT
 GTGTCCTTCAAAAATGCTGACATTTGTTGCTGTGCCCATCAGAAAACCTCGTG
 AAGATGAAAGTGGAGCAGCTCCAGCTGAAAATAGTTATCCAGCCGTAGCCAG
 TTCCACCCAGGCTTTCTCAGCCCAACCCAGTCTGACACATGGTCTTGT
 TGCTGAGAAATCAGAAACAGCTTCTTTGATAGGAGCAAGCAGTTCGGGCT
 TTCAAGAAACAGTCAATTTGCAATTTGATGACACCAAAAGTTAAAAAC
 CGTCTCAAAATGAGTTGGAAGTAAAGAACCGAAGCTGAATCCGGCTTGTCTT
 TTTACATGGCTCGCATCAATCACTGCTGATTTTGGCAACAGTTCAGCTGAGAAA
 TGGATTTGCCCTACTTCACTATGACTTGGGAGTGGGGACACCCACCAT
 GATCCCAACAAAATCAATGATGGCCAGTGGCACAAGTAAAGATAATGAG
 AAGTAAAGCAAGGAATCTTTATGATGAGTGGGCTTCCACAGAAACCAATC
 AGTCCCAAAAAGCCGACATCTTGGATGCTGTTGGGAATGCTGTATGTTGGT
 GGGTTACCCATCAACTACACTACCCGAAATTTGGTCCAGTGAACCTATAGCA
 TTGATGGCTGCTCAGGAATCTCCATGAGGAGGCGCTTGGCGATCTGG

【 図 1 9 - 4 】

AAACAACCCACCTCCAGCTTCCATGTTGGGACATGTTTGGCAATGCTCAGAG
 GGAACATATTTGACGGAAACCGTTTTGGCAAGCAGTGGTGGATTCAAA
 GTGGGATTTGGACTTCTTGTAGAATTTGAAATTCGGCAACTACAACGACTG
 GAGTCTTCTGGGGATCAGTGTCAAAATTTGGATGGAAITGGGTTATGAAAT
 GATTTAGTAAAGTTGATGTTTCATGTGGCAATTTGGTGGCGGAGATTCACT
 GCTGTCTATGATGTGGGGTTCCAGGGCAATTTGTGTGATGGCAATGGCAT
 AAAGTCTGCGCAACAGATCAAAACCCGCAATTTGAGCTCAGACTCGATGGG
 AAACAGGTGGAAAGCCCAAGCCCAACCCAGCATCTACATCAGCTGACACA
 AATGACCCCTGTTGTTTGGAGGCTTCCAGATGACCTCAAGAGTITGGCC
 TAACAACAGATTTCCGTTCCGAGGTGTGACTCAGATCCCTGAAGCTACCAA
 AGGCACAGCAAGCCACTGGAGTTAATTTGCCAAGGCCCTGGAACGTGAA
 TAGTGGCGCCGGGGATCCAGATGATAAGATACATGATGATGATTTGGACAA
 ACCAACAATAGAATGCAAGTAAAAAATGCTTTAATTTTGGAAATTTGTTGATG
 TTTGCTTAAATTTGTAACCTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAAACAAGAAATTT
 CATTTGATTTAGTTTCAAGTTCAGGGGAAAGTGGAGAGTGGTCTCCGATTT
 TAGATCGACACATGGCTACGTAGATAAATGAGTATGGCGGGTTAATCTTAA
 ACTCAAGGAACCCCTAGTGTAGGAGTTGGCACTTCCCTCTCTGGCGCTT
 GCTCGCTCACTGAGGCGGGGCAACAAAGGTCGCCCCAGCCCGGGCTTGG
 CCGGGCGGCTCAGTGTAGCGAGCGAGCGGCGNNNNNAGCTGCATTAATG
 AATCGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGGTATTTGG

30

40

50

【 図 2 0 - 1 】

p.AAV. CMV. HBEGF. LAMA2 (G1-G5) (配列番号4)

主要領域

アンシロン重複領域

ITRs

CMVプロモーター

SV40エンシオン

HBEGF シグナルペプチド

HBEGF フロノモチドドメイン

HBEGF 成熟したペプチドドメイン

HBEGF HBドメイン

HBEGF EGF-様ドメイン

LAMA2 G1-3

LAMA2 G3-5

SV40 ポリアニール

GCCTTCCGCTTGGTGGCTACTGACTCGTGGCTGGTGGTGGCGGCGG
 AGCGGTATCAGCTACTCAAACCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
 TAACCGAGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTA
 AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCA
 CAAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATA
 CCAGCGGTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTTCCCTGTTCGCGCCCTGGCC
 TTACCGGATACCTGTCCCGCTTTCCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAG
 TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCGTCCAAAGCTGGGTGTG
 TGCACGAACCCCGCTTACGCCGACCGCTGGCGCTTATCCGGTAATCATGCTCT
 TGAGTCCAACCCGGTAAGACAGCAGTTCAGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA
 CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTACGGCGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTA
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGATCTGCGCTCTGCTGAAG
 CTTACTTCCGAAAGAGTGTGGAGCTTTTGTATCCGCAACAAACAAACC
 GCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGCAAGCAGAGTACCGCGCAAGAAAAAAG
 GATCTCAAGGAAGCTTTTGTATCTTCTACGGGTGTGACCTCAGTGAACGA
 AAACCTCAGGTAAGGATTTTGGCTATGAGATTAACAAGGATCTTACCTAG
 ATCTTTTAAATTAAGAAAGTATTTAAATCAATCTAAAGATATATGAGTAATA
 TCTGGTCTGACAGTTTACCAATGTCTTAATCAGTGAAGCCACTATCTCAGGATCTG
 TCTATTTCGTTTCACTCAATAGTTCGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATAC
 GGGAGGGCTTACCAATTCGGCCCAAGTCTCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
 CACCGGCTCCAGATTTATAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCA
 GAAGTGGTCTGCACTTTTACCGGCTCCACTCCAGTCTATAAATTGGTGGCGGA
 AGTCTAGATAGTGTAGTTCGCAAGTAAATAGTTCGCAACAGTGTGGTCAATGCT
 ACAGGACTCGTGGTGTACGCTTCGCTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTT
 CCAAGCTAAGGCGAGTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGAGGGGTTAG
 TCTCTCGGCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGATGTTATCACT
 ATGGTATGGCAGCATGCAATATCTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
 TCTGTGACTGGTGTACTCAACCAAGTCTCTGAGAATAGTGTATGGCGCA
 CCGAGTTGCTCTTGGCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCCACATAGCAGGA
 ACTTTAAAGTGTCTCATATGGAAAACGTTCTCGGGGGCAAACTCTCAAGGA

【 図 2 0 - 2 】

TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC
 TTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTCCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCA
 AATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGCACAGGAAATGTTGAATCTCATACT
 TTCCTTTTCAATATTTAAGCAATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATA
 CATATTGAAATGATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGGTTCGGCGACATTTCCC
 CGAAAAGTCCACCTGACGCTTAAGAAACCAATTTATCATGACATTAACCTATA
 AAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTCCTGCTCGCGGCTTTCGGTGTAGCGGTGA
 AAACCTCTGACACATGACGCTCCGGAGACGGTACAGGTTGTCTGAAGCGGAT
 CCGGGAGCAGACAAGCCCTCAGGGCGCTCAGCGGTTGTTCGGGCGGTCCGG
 GGCTGGTCTAATCATGCGGCATCAGAGCAGATTTACTGAGAGTGCACCATATGC
 GGTGTAAATACCGCACAGATGGCTAAGGAGAAAAACCGCATCAGGAATTC
 AACATCCAATAATCATACAGGCAAGGCAAGAAATAGCAAAATTAAGCAATA
 AGCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGTTGATGTAAGTAAAGTAACTAGCCCTGTAAT
 ACTTTGGCGGGAAGGCTTTATTCACGCAAGGTAATAAATTTTGAACCCCT
 CATATAATTTAAATGCAATGCGCTGAGTATGTGTAGTAAAGTAACTAAACGGGTG
 AGAAAGCCGGAGACAGTCAAATCACCATAATGATATTCACCCCTTCTAGC
 TGATAAATCATGCGGAGAGGAGTACTTTTGGAGGCTCTACAAAGGCTA
 TCAGGCTATGCTGAGAGTGTGAGCAACAAGAGAAATCGATGACGGTATCT
 GTAAAACAGTGTGCAATCATATGTACCCCGTGTATAATCAGAAAAGCCCA
 AAAAAAGGAAGATTGTATAAGCAAAATTTAAATGTAAGCAAGTAAATTTTGT
 AAAATTCGCGTAAATTTTGTAAATCAGCTATTTTAAACAAATAGGCCGAA
 ATCGGCAAAATCCCTTATAAAATAAAGAATAGACCGAGATGGGTTGAGTGT
 GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATAAAGAAGCTGGACTCAACCTCAA
 GGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATACCCCTAA
 TCAAGTTTTTGGGTCGAGGTCGCGTAAATCACTAAATCGGAACCCATAAGGGA
 CCCCAGATTAGAGCTTACGGGGAAAGCCGGCGAACCTGGCGAGAAAGGAA
 GGGAAAGAAAGGCAAGGAGCGGGCGTATGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCAC
 GCGCGCTAACACACCACACCCCGCGCTTAAATGTAAGTAAACAACTATGCG
 CTATGTTGCTTGTGACGACAGTATAACGTGCTTCTCGTGTAGAATCAGAGCG
 GGAGCTAAACAGGAGGCGGATTAAGGGATTTAGACAGGAACCGTACGCCAGA
 ATCCTGAGAAGTGTTTTATAACTAGTGAAGCCAGGATGAAAGAGTCTGTCA
 TCAGCAAAATTAACCGTGTGCAATACTTCTTTGATTAATAAACAATCTGCG
 CTGAGTGAAGAAGTCAAATTCGGCTTGTGTAATATCCAGCAAAATTA
 CCGCAGCCATTGCAACAGGAAAAACCGCTCATGGAAATACCTATTTGAGCT
 CAATCGTGTGAACTTCCATTCGCCATCAGGCTGCGCACTGTGGGAAGGGCG
 ATGGTGGGGCTCTTCTGCTATTACCGCATCGGCTGCGCACTGGTTCGCTCGC
 TCACTGAGGCGCCCGGCAAGCCCGGGCTGCGGGGACCTTTGTCCGCG
 CGGCTCAGTGAAGCGGAGCGAGCCGACAGAGGGGAGTGGCCAACTTCCATA
 CTAGGGTTCCTTGTAGTAAATGATTAACCCCGCATGTAAATATCTACGTA
 GCCATGCTAGGGTCTTACATAACTACGTAATACGTAATACCGTTCAGCCG
 AACGCCCCCGCCATTGACGTCATAATGAGTGTTCGTCATGACCCCAATGAG
 GATTCCTATGACGTCATGGTGGGATTAACGTAATACCGTTCAGCCGAGTAC
 ATCAGGTATCATATGCAAGTACCGCCCTTATGACGTCATGACGGTAAATGGCC
 GCGCGCATTAATGCCCAGTACGCTTATGGCTTATGGCTTCTGTCAGTACTTA
 CGTATGTCATGCTTATCAATGAGTGTGCGGTTTGGCAGTACATGAGGGCGTG
 GATAGCGGTTTACTCAGGGGATTTTCAAGTCCACCCCTATTTGACCTCATAGA
 GACACCGGACCGATCCAGCTCCGGACTTAGAGGATCCGGTACTCGAGAACTG

10

20

【 図 2 0 - 3 】

AAAAACAGAAAGTTAAGTGGTAAAGTGTGCTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCGCGGAT
 CCGGTGTGGTGGCAAAATAAGAAAGCTGCTTCTCAGTGGATGTGGCTTACTCTAGG
 CCTGCTAGCGAAGGTACTTCTCTCTAAAGCTCCGGAATGTACTCCGCGCCGAC
 CATGAAGTGCIGCCGCTGGTGTGCTGAAGCTCTTTCGGTGCAGTTCICG
 GCACCTGTGACTGGCGAGGCTTGGAGCGGCTTCGGAGAGGGCTAGCTCTG
 GAACAGCAACCCGAGCCCTCCCACTTCCAGCGGACCGAGCTGCTACCC
 TAGGAGCGCGCGCGGAGCTGGTTCGCTGACTGCAAGAGGCGAGATCTGG
 ACCTTTTGAGAGTACCTTTTCTCTCAAGCCCAAGCACTGGCCACACAAA
 CAAGGAGGAGCAGCGGAAAAGAAAAGAAAGGCAAGGGGCTAGGGAAGAA
 GAGGGACCCATGCTTTCGGAATAACAAGGACTTCTGCTCAATGGAGAAATG
 AAATATGTGAAGGAGCTCCGGGCTCCCTCTGCTCTGCTGCACTGCCACCGGGTAC
 CATGGAGAGAGGTGCTATGGGCTGAGCTTCCCAAAAGTATCTGTGCTCAG
 GAGGTGACTGCTATTCGAACATACAAAACAGAAATCAAGAAAGGAAGTTACAATA
 ATATTGTTGTCACCTAAAGACAGCTGTTGCTGATAACCTCTCTTTATCTTGA
 AGTGCCAAATTTATGACTTTCTGGTATAGAAAATGCGTAAAGGCAAAAGTACGCT
 TCCTTGGGATGTTGGATCTGGAGTTGGAGCTGTAGAGTACCCAGATTTGACTAT
 TGATTGACTCATATGTTACCGTATCGTAGCTCAAGAACTGGGAGAAATGGAAC
 TATTCTGTGAGAGCCCTGGATGGACCAACAGCCAGCTTGTGCCAGCACACAC
 CATTCGAGCTTCCCTCAGGTTACAGATTTAGATGTTGGATGCAAAATGCAATGC
 TGTGTTGTTGGTGGCTGACTGGGAAATTAAGAAGGCTGATGCTGTACGTTGAT
 TACATTCACTGGCTGCATGGGAGAAACATACTTTGACAACAACCAATAGGTTTG
 TGGAAATTCGAGAAAAGAAAGGTGACTGCAAAAGGATGCACTGTCAGTCTCAG
 GTGGAAAGTATGAGGGGACTATTCAAATTTGATGGGAAAGGTTATGCAATTCAG
 AGCCGTCCTATTCGCTGGTACCCCAACATCTCCACTGTCTATGTTCAAGTTGAA
 CATTTCTTCGAGTCTTCTGATGATCTTGCACACGAGACCTGAGAGATTTC
 ATGAGTGGGAGCTACTGATGGGCAATAAAGTACGTTACGATCTGGGCTCA
 GGAATGGCTTCCGTTGTCAGCAATCAAAACCAATAATGATGGGAAATGGAATA
 TTCCTCTGCAAGAAATTCAAAACAAAGCCAAATATCAATTTGATAGATAGATA
 CTAATCAGGAGGAGATAAGCAACTTCGCTCTTGGAAAACACTTTGGTCTTGA
 CTGAAAGCAGATGACAAAATATTTTGGTGGCTTCCCAACGCTGAGAAACTTG
 AGTATGAAAGCAAGCCAGAAATTAATCTGAAGAAATATCCGGCTGCCTCAA
 GATATGAAATTTCAAGAACTCCGTAACAATATACCTAGTGTCCGATATGTTG
 GTGTTACCAAAGGATGTTCCCTGGGAGAAATGTTACACAGTTAGCTTTTCTAAGCC
 TGGTTTTGTTGGAGCTTCCCTGTGCGCAATGATGTAGGAAACAGAAATCAACCTG
 TCAITCAGCAACCAAGAAATGAGTCCGGCATCTTCTTTGGGAAAGTGGAGGGAC
 CAGCACCACTAGGAGAAAACGAAAGGAGACTGGACAGGCTTATTAAGTAAAT
 ACTCTCAACAGGGGCGCTTGGAAAGTCACTCTCCACAGGGGACAGAAAC
 AATGAGGAAAATGTCTACAGCAGAGCCGAAATCTGTTTCATGTGGAAGA
 GAACATTCGGTTCATGTAGAGCAAACTAGAGGCACTTTACAGTTCAGATGG
 ATGAAAACAGAAATATAGTGAACAACTGACAGTTGAACAGCCTATCGAAGT
 TAAAAGGCTTTTCTGTTGGGGTGTCTCCACTGAATTTCAACCTTCCCACTC
 AGAAATATCTCTCTTTTGAAGGCTGCATATGGAATCTGTTATTAACCTCTG
 CCCCAGGACTTTGCAAGGCTGTGCTCTTCAAAAATGCTGACATTTGGTTCG
 TGTGCCATCAGAAAACCTCCGTGAAGATGAAGATGGAGCAGCTCCAGCTGAA
 ATAGTTATCCAGCTGAGCCAGTTCACCCACAGCTTTCCTACGCCCAACCC
 CAGTTCAGCAGATGTTCTTGTGCTGCAAGATCAGAACAGCTCTTTTGTAT
 AGGGAGCAAGCATTCGGGCTTCAAGAAACAGTCAATTTGCAATTTGCAATTT
 GATGACCAAAAATTTAAAACCGTCTCAAAATGAGTTGGAAGTAAAGAACCC
 AAGCTGAATCCGGCTTGTCTTTTACATGGCTCGCATCAATGCTGATTT
 TGCAACAGTTCAGCTGAGAAATGGATTGGCCCTACTTACAGTATGACTTGGG

【 図 2 0 - 4 】

AGTGGGGACACCCACACCATGATCCCCACCAAAATCAATGATGGCCAGTGG
 CACAAGATTAAGATAATGAGAAGTAAGCAAGAAGGAATCTTTATGTAGATG
 GGGCTTCAACAGAACCATCAGTCCCAAAAAGCCGACATCTGGATGTGCTG
 TGGGAATGCTGTATGTTGGTGGGTTACCCATCAACTACACCCCAAGAAAT
 TGGTCCAGTGACTATAGCATTTGATGGCTGCGTCAAGGATCTCCCAATGGCA
 GAGGCGCCCTGGGATCTGGAAACAACCCACTCCGCTTCCATGTTGGGACA
 TGTGTTGCAAAATGCTCAGAGGGGAACATATTTGACGGCAACCGGTTTGGCA
 AGGCGATTGGTGGATTCAAAAGTGGGATTTAGACATCTTTGATAGAAATTTGAAAT
 CCGCAAACTCAACAGCATGGAAGTTCTTCTGGGGATCAGTAGTCAAAAATG
 GATGGAAATGGTATTGAAATGATTGATGAAAAGTGTGTTTCTCATGTGGACA
 ATGGTGGCGGAGATTCAGCTGCTGTCTATGATGCTGGGGTTCCAGGGGACTT
 TGTGTGATGGCAATGGCAAACTGACTGCAAGGATGCAAGTCAAAACCCGAT
 TGAGCTCACAGTGCATGGGAACAGGTTGGAAGCCAAAGCCAAACCCAGC
 ATCTACATCAGCTGACAAAATGACCCTGTGTTTGTGGAGGCTTCCAGAT
 GACCTCAAGCAGTTTGGCCATAACAAACAGATTTCCGATTCGGAGGTTGCACTA
 GAATCGCTGAAGCTCACCAGGCAAGGCAAGCCACTGGAAGTTAATTTTGC
 CAACCCCTGGAACTGAACTAGTGGCGCGGGGATCCAGACATGATAAGAT
 ACATTTGATGAGTTTGGCAAAACCAACTAGAAATGCAAGTGAAGAAATGCTTTA
 TTTGTGAAATTTTGTGATGCTATTTGCTTTTATGTAACCATTATAAGCTGCAATAAA
 CAAGTTAACAACAACAATTTGCTATTTCTTTTATGTTTCAAGGTTCAAGGGGAGTGT
 GGGAGGTTTTTTTTCGGATCCTTAGATGCGACCACTAGGCTTCCAGTATGATTAAG
 CATGGCGGTTAATCATTAACCTCAAGGAAACCCCTAGTGTGAGGATTTGGCC
 ACTCCCTCTCTGGCGCTCTGCTCACTGAGGCGGGGACCAAGGCTC
 CGCCACCGCGGGCTTTGCCGGGGCGCTCAGTGAAGGAGCGAGCGCG
 CNNNNACAGTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTGGC
 TATTGGGCMG

30

40

50

【 図 2 1 - 1 】

配列番号6

pAAV.CMV.HB.LAMA2(G3-G5)

主な特徴

- アンピシリン耐性遺伝子
- ITRs
- CMVプロモーター
- SV40エンハンサー
- HBEGF シグナルペプチド
- HBEGF プロペプチドドメイン
- HBEGF 成熟したペプチドドメイン
- HBEGF HBドメイン

LAMA2 G3-G5

SV40 ポリAテール

GCCTCTCCGCTTGGTCGCTCACTGACTCGCTGCTCGCTCGCTCGCTCGGCTCGGCGG
 ACGCGGTATCAGCTCACTCAAACCCGGTAATACGGTTATCCACAAGAATCAGGGGA
 TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
 AAAAGGCCCGGTTGGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCAGCAGCATCA
 CAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTTGGCGAAACCCGAGGACTATAAAGATA
 CCAGCGCTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGCTGCTCTCTGTTCCGACCTTGCCG
 TTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGC
 TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCGCTCAAGCTGGGCTGTG
 TGCACGAACCCCGCTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACCTAGCTGT
 TGAGTCCAACCCGGTAAGACAGCACTTATCCCACTGGCAGCAGCCAGGTGAA
 CAGGATTAGCAGAGCGAGTATGTACGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTG
 GCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGTGAAG
 CCAGTACCTTCGGA AAAAGAGTTTTCAGCTCTTGATCCCGCAAAACAAACC
 GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTCAAGCAGAGTACCGCGCAAGAAAAAG
 GATCTCAAGAAGACTCTTGTATCTTTTCACGGGCTGACGCTCAGTGGAAACGA
 AAACCTCACGTTAAGGGATTTGGTCTAGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAG
 ATCTTTAAATTA AAAAGTAAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAA
 CTGGCTGACAGTTACCAATGCTTAACTAGTAGGCACTTCTCAGCGATCTG
 TCTATTTCTGCTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGTGAGATAACTACGATA
 GGGAGGGCTTACCCTCGGCCAGTGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCT
 CACCGGCTCCAGATTTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCA
 GAAGTGGTCTCGCAACTTTATCCGCCCTCCACTCAGTCTATTAATTTGTCCGGGA
 AGCTAAGTAAGTAGTTGCTGCAAGTAAATAGTTTGCACAACAGTTGTGCTTGTCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGCTGTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTTC
 CCAACGATCAAGGCGAGTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAG
 CTCCTCGCTCCGATCGTGTGCAAGTAAGTGGCCGCAAGTGTATCACTC
 ATGGTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
 TTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTCTGAGAATAGTGTATGCGGCA

【 図 2 1 - 2 】

CCGAGTTGCTTTGCCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGA
 ACTTTAAAAGTGCTCATCTTTGAAAACGTTCTCGGGGCGAAAACCTCAAGGA
 TCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCCACTCGTGACCCCACTGATC
 TTCAGCATCTTTTACTTTCCAGCGCTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAA
 AATGCCGCAAAAAGGGGAATAAGGGCGACACGGGAATGTGAAATACCTACTACT
 TTCTTTTTTAAATATTTAAGCAATTTATCAGGGTATTTGTTCTCATGAGCCGATA
 CATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAACAATAGGGGTTCCGGCACAATTTCCC
 CGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATCTGTTACATAAATACGGTATATT
 ATCATGACATAAATATAAAAAATAGGGCATACAGAGCCCTTTGCTCGCCG
 GTTTCGGTGTACGGTGAACCTCTGACACATGACAGTCCCGGAGACGGTCA
 CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGCAAGCCGTCAGGGCGCGTCA
 CGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGT
 ACTGAGAGTGCCACATATGCGGTTGAAAACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAA
 ATACCGCATCAGGAACCTCCAACATCAATAAATCATACAGGCAAGGCAAGAAA
 TTAGCAAAATTAAGCAATAAGCCCTCAGACATAAAGCTAAATCGTTGTACCA
 AAAACATTATGACCCCTGTAATACTTTTGGGGGAGAAGCCTTATTTTCAACCGAAG
 GATAAAAAATTTTGAACCCCTCATATATTTTAAATGCAATGCGCTAGTAATGTGT
 AGGTAAGAATTCAAACGGGTGAGAAAAGCCGGAGACGATCAACTACCATAT
 ATGATATTAACCGTCTAGCTGATAAATTCATGCGGGAGAGGGTGTATTTTT
 GAGAGGCTCTCAAAAGGCTATAGGTCATTGCTGAGAGTCTGGAGCAAAACA
 GAGAATCGATGACGGTAATCGTAAAATAGCATGTCAATCATATGTACCCCG
 TTGATAATCAGAAAAGCCCAAAAACAGGAAGATTGTATAAGCAAAATTTAAA
 TTGTAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTAAAAATTTTGTTTAAATCAGCTCA
 TTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGATAGA
 CCGAAGTAGGGTTGAGTGTGTGCAAGTTTGGAAACAGCCCGCGCTTAATGCG
 CGTGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGCTTATCAGGGCGATGGCCACT
 ACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGCTAAATCACTA
 AATCGGAACCTAAAGGAGCCCGGATTTAGAGTCTGACGGGGAAGCCGGCG
 AACGTGGCGAGAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCT
 CCAAGTGTGCGGTACCGGTACCGTGCAGTAAACCCACACCCCGCGCTTAATGCG
 CGCTCACAGGGCGCTACTAGTGTGCTTTGACGACGACGATAACGTGCTTTTC
 CTGTTAGAATCAGAGCGGGAGTAAACAGGAGGCGGATTAAGGGATTTTGA
 CAGGAACGGTACCCAGAATCTCGAGAAGTCTGAGAAGTCTGAGGAGGAGGCGG
 GAGTAAAAGAGTCTGCCATCAGCAAAATTAACGGTTGCGCAATCTCTTTGTA
 TTAGTAATAACATCACTGCTGAGTGAAGAAGTCAAACTACCTGCGCTGCTGG
 TAATATCCAGAACAAATATCCCGCAGCCTTGAACAGGAAAACCGCTCATGG
 AAATACCTCATTTTGAACGCTCAATCTGCTGAGGAGTCTTCCATCGCTTACGCT
 GCGCAACTGTTGGGAAGGGGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTG
 NNNNNNGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCCCGGGCAAGCGCGGCGG
 TCGGGCACCTTTGGTGCAGCCGCTCAGTGAGCGGAGCAAGCCGCGAGAGA
 GGGAGTGGCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTTGAGTAAATGATTAACCCG
 CCACTGTAATTACTACGTAGCCATGCTCAGGGTGTGCTAGGGTGTGTTACATACT
 GGCCCGCTGGCTGACCCGCAACGACCCCGCCCAATGACGTCATAATGACGTAT
 GTTCCATAGTAAACCGAATAGGACTTTCATGAGCTCAATGGGTGGAGTATTACG

10

20

【 図 2 1 - 3 】

GTAACCTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTTATTG
 AGCTAATGACGAGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACTTATGGGA
 CTTTCTACTTGGCAGTACATCACTAGTATATGATCATCGCTTATACATGGTGTATGCGGTT
 TTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGGACTCAGGGGATTTCCAAAGTCT
 CACCCATGACGTCATATGGGAGTTTGTGTTGGCCACAAATCAACGGGACTTTCCAAA
 ATGCTGTAACACTCCGCCATTTAGCGCAAAATGGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGA
 GGCTATATAAGCAGAGCTCGTTTATGAAACCGTACAGTACGCTGGAGACCCATCC
 ACGCTGTTTGGACCTCATAGAAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACCTCT
 GAGGATCCGGTACTCGAGGAACTGAAAACCAAGAAAGTAACTGGTAAAGTTTATGCTTT
 TTGCTTTTATTTAGGTTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCATAAAGAACTGCTCTTCA
 GTTGAITGTGCTTTACTTCTAGGCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCAAAAAGCTG
 CGGAAITGTACCCCGCCGACCATGAAGCTGCTGCCGTCGGTGGTGTGTAAGC
 TCTTCTGGCTGACGTTCTCTCGGCACTGTTGACTGGCGAGAGCTTGGAGCGCG
 TCTGGAGAGGGTACTGCTGGAACCAAGCAACCGGACCTCCCACTGAT
 CCACGGACAGCTGCTACCTTAGGAGGCGGCGGGACCGGAAAGTCCGTTG
 ACTTGCAGAGGCGAGATCTGGACCTTTTGAAGTCACTTATCTCCTCAAGCC
 ACAAGCACTGGCCACCAAAACAAGGAGGAGCAGGGAAAAGAAAGAAAGAA
 AGGCAAGGGGCTAGGGAAAGAAAGAGGACCCACAGACTGGACAGGCTATATG
 TAATACTCTCAACAGGGGCGCTTGGAAAGTGCATCTCTCCACAGGGGACAGAA
 CAATGAGGAAAATGTCATCAGACAGAGCCGAATCTGTTTCATGATGGAAGAG
 AACATTCCTTATGATGAGGCAACTAGAGGCACTTTACAGTTCAGTGGATGA
 AAACAGAAGATACATGCAAAACCTGACAGTGTAAACAGCCATCGAAGTTAAAAA
 GCTTTTCTGGGTTGGGCTCCACCTGAATTTCAACCTTCCCCTCAGAAATATTC
 CTCCTTTGAAGGCTGCATATGGAATCTGTTATTAACCTGTCCTCCATGGACTTT
 GCAAGGCTGTGCTTCAAAAATGTGACATTTGGTGTGCTGTCCTCAGAAAAC
 TCCGTGAAGATGAAGATGGAGCAGCTCCAGCTGAAATAGTTATCCAGCTGAGC
 CAGTTCACCCAGCCTTCTACGCCCACCCAGTTCGACACATGTTCTTGT
 GCTCGAAGATCAGAACCAGCTCTTTGATAGGGAGCAAGCAGTTCGGGCTTTCAA
 GAAACAGTCACATIGCAATGCAATTTGATGACACCAAAAGTAAAAACCGTCTCAC
 AATTGAGTTGGAAGTAAAGAACCAGAGTGAATCCGGCTTGTCTTTTACATGGCT
 CGCATCAATATGCTGATTTTGCACAGTTCAGCTGAGAAAATGGATTGCCCTACT
 TCAGCTATGACTTGGGAGTGGGGACACCCACACCATGATCCCAACCAAAATCA
 ATGATGGCCAGTGGCAAGATTAAGATAATGAGAAAGTAAAGCAAGAAAGGAATTC
 TTTATGATGAGTGGGGTTCCAAAGAAACCATCAGTCCCAAAAAGCCGACATCT
 GGAATGCTGGGAATGCTGTATGTTGTGGTACCCTCAACTACACTACCCGA
 AGAATTGGTCCAGTACCTATAGCATTGATGGTGGTGGTCAAGAAATCCACATGG
 CAGAGGCCCTGCCGATCTGGAACAACCCACCTCCAGCTTCCATGTTGGGACATG
 TTTTGAACAATGCTCAGAGGGGAACATATTTGACGGAACCGGTTTTGCCAAAGCA
 GTTGGTGGATCAAAAGTGGGATGGACCTTCTTGTAGAAATTTGAAATCCGCACAA
 CTACAACGACTGGAGTTCTTCTGGGATCAGTAGTCAAAAAATGGATGGAATGG
 GTATTGAAATGATGATGAAAAGTGTATTTTCATGTTGACAATGGTGGGACAG
 ATTCACTGCTGTATGATGCTGGGGTTCCAGGGCATTGTGTGATGGACAATGG
 CATAAAGTCACTGCCAACAAGATCAACCCGCAATGAGCTCACAGTCGATGGG
 AACCAGTGGAAAGCCAAAGCCCAACCCAGCATCTACATCAGTGCACAAAAT

【 図 2 1 - 4 】

GACCCTGTGTTGTTGGAGGCTTCCAGATGACCTCAAGCAGTTTGGCCTAACAA
 CCAGTATTCGGTTCCGAGGTGTCATCAGATCCCTGAAGCTCACAAAGGCGACAGC
 AAGCCACTGGAGGTTAATTTTGGCAAGGCCCTGGAACTGACTAGTGGCGGCGC
 GGGATCCAGACATGATAAGTATACATTTGATGATGTTGGACAACCCAACTAGA
 ATGCAAGTGA AAAAATGCTTTAATTTGGTGAATTTTGGTGAAGTATTTGCTTTA
 AACCATLATAAGCTGCATAAAGCAAGTTAACAAACAATTTGGATTTAATTTATG
 TTTCAAGTTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCGGATCCTCTAGAGTGCACCA
 CATGGCTACGTAGATAATAGCATGGCGGGTAATCATTAACACAAAGGAAC
 CCCTAGTGTGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTCGCGCTCGCTCGGCTCACTGA
 CCGGGGCGCAAAAAGGTCGCGCCGACCGCGGCTTTTGGCCGCGGCGCT
 CAGTGAAGCAGCGAGCGCGNNNNNACGCTGCATTAATGAAATCGGCCAACG
 CGCGGGAGAGCGGTTTTGCGTATTGGCC

30

40

50

【 図 2 2 - 1 】

pAAV. CMV. HBEGF. LAMA2 (G3-G5) (番号番号8)



GCTCTCCGCTTGGCTGCTACTGACTCGCTGCGCTCGGCTGGTCCGGCTCGGGC
 AGCGGTATACGCTACTCAACCCGGTAATACGGTTATCCACAGATCAGGGGA
 TAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
 AAAAGGCCGGTGTCTGGCGTTTTCATAGGCTCGCCCGCTGACGAGCATCA
 CAAAATTCGACGCTCAAGTACAGAGGTGGCAGAACCCGACAGGACTATAAGATA
 CCAGCGCTTTCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTCCGACCTCGCCG
 TTACGGGATACCTGTCCGCTTTCCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGC
 TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGTTGAGTTCGCTCCAGCTGGGCTGTG
 TGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCT
 TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTGTA
 CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTACCGCGTCTACAGAGTTCTGAAGTGGTG
 GCCTAACTACGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTCGCTCTGTGTAAG
 CCAGTACCTTCGGAAGAAAGAGTGGTGTCTTATCCGGCAACAAACCCACT
 GCTGGTAGCGGTTGTTTTGTTGTAAGCAGCAGTACCGCCGAGAAAAGAA
 GATCTCAAGAAGATCCTTGAATTTCTACCGGGCTGACGCTCAGTGGGAACG
 AAACCTCAGTTAAAGGTTTTGTTGATGAGTATCAAAAAGGATCTTCACTAG
 ATCTTTTAAATTAAGAAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACA
 CTGGCTCAGACTFCAATGTAACTAGTAGAGGACCTATCTCAGCTAGCTG
 TCTATTTCGTTACTACTAGTTGCTGACTCCCGTGTGTAGTAACTACAGTAC
 GGGAGGCTTACTCTGCGCCAGCTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCT
 CACCGGCTCCAGATTATACAGCAATAAACACGACCGGAAAGCGGAGCGGCGCA
 GAAGTGGTCTCGCACTTTATCCGCTCCATCGACTATAAATGTTGCGGGGA
 AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCGAGTAAAGTTCGCGCAACGTTGTGCCATTGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACCGCTCGTGGTGTGGTATCGGCTTCACTCAGCTCGGTT
 CCAACGATCAAGCGGAGTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAG
 CTCCTTCGCTCCCGACTGTTGTCAGAAAGTAAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACT
 ATGTTATGGCAGCACTGCAATTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATTGCT
 TTGTTGACTGGTAGTACTCAACCAAGTCTTCGAGAATAGTGTATGGCGGCA
 CCGAGTTGCTTTCGCGCGGCTCAATACCGGATAAATACCGCCGCACATAGGCA
 ACTTTAAAGTGCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGA
 TCTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATTAACCCACTGTGACACCAACTGATC
 TTCAGACTTTTACTTTCACCCAGGCTTTCGGGTGAGCAAAAACAGGAAGCCAA
 AATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACATCACTC

【 図 2 2 - 2 】

TTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATA
 CATATTGAAATGTTATTAGAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
 CGAAAAGTGCCACCTGACGCTCAAGAAACCAATTTATCATGTACATTAACCTATA
 AAAATAGGGGATACACGAGGCGCTTTCGCTCGCGGCTTCCGGTATGACGGGTA
 AAACTCTGACACATGACGCTCCCGGAGCGGTACAGCTGTCTGTAAGCGGAT
 CCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCTGACGCGGTGTGGCGGGTGTGGC
 GGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGC
 GGTGTGAAATACCCGACAGATCGGTAAAGGAGAAAATACCCGATCAGGAACTCC
 AACATCCAATAAATCATACAGGCAAGGCAAGAAATTAGCAAAATTAAGCAATAA
 AGCCTCAGAGCATAAAGTAAATCGGTTGTACAAAACATATTAGCCCTGTAAAT
 ACTTTTGGGGGAGAAGCCTTTATTTCAACAGCAAGGATAAAAATTTTAGAACCT
 CATATATTTAAATGCAATGCTGAGTAAATGTTGAGTAAAGATCAAACCGGGT
 AGAAAAGCCGGAGACAGTCAATACCCATCAATATGATATTAACCCGCTTACG
 TGATAAATTCATGCGGAGAGGGTACTATTTTGAAGAGTCTCTACAAGGCTA
 TCAGGTACTTGGCTGAGAGTCTGGAGCAACAAGAGAAATCGATGAACGGTAATC
 GTAAACTAGCATGTCAATATATGACCCCGGTGTAATCAGAAAAGCCCA
 AAAACAGGAAGATTGTAAGCAAAATTTAAATTTTAAACAGTTAATTTTGT
 AAAATTCGGGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACAAATAGCCGCA
 ATCCGCAAAAATCCCTTAAATCAAAAGATAAGACCGGATAGGGTGTAGTGT
 GTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTTAAAGAACGTTGACTCAACAGCTCAAAA
 GCGGCAAAAACCGCTATCAGGGCGATGCGCCACTAGGTAACCTACCTAA
 TCAAGTTTTTGGGGTGGAGTCCGTAATCACTAAATCGGAACCTAAAGGGA
 GCCCCGATTTAGAGCTTACGGGGGAAGCCGCGGCAAGCTGGCGAAGAAAGGA
 GGGAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTACGGCTCAC
 GCTCGGCTAACACACACCCCGCGCTTAAATGGCCGCTAGACAGGCGGCTA
 CTATGTTGCTTGTGACGAGCAGTATAACGTGCTTTCCTGTAGTAATCAGAGCG
 GGAGCTAAACAGGAGCGGATTAAGGGATTTTACAGCAGGAAAGCTACGCCAGA
 ATCTCGAGAAGTGTTTTATAATCAGTGGCCAGCGAGTAAAAGAGTCTGTCCA
 TCAGCAAAATTAACCGTTGTCGAATCTTCTTGTAGTAAATTAACACTACTTTC
 CTAGTAGAAGAACTCAAACTATCCGCTTGTGGTAAATTTCCAGCAATATGTA
 CGCCAGCCATTGCAACAGGAAAACCGCTCATGGAATAACTCAATTTTGGAGCT
 CAATCTGTGGAACTTCCATTCGCAATCAGGCTCGCACTGTTGGGAAGGGG
 ATCCGTCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGNNNNNGCGGCTTCGCTCGC
 TCACTGAGGCCCGCCGGGCAAGCCGCGGCTCGGCGACTTCTACTACGTA
 CGCCCTCAGTGGAGCGGAGCGCGAGAGGGGATGGCCAACTTCACTCA
 TAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCTACTGTAATTTACTACGTA
 GCCATGCTAGGGTCTTACATAACTTACGTTAAATGGCCCGCTGGTGCACCCG
 AACGACCCCGCCCAITGACGCTCAATGAGTAAATGAGGAGTAAAGCAATAGG
 GACTTTCATGACGCTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAACTGGCCACTTGGCAGT
 ATCAAGTGTATCATGCAAGTACCGCCCTATGACGCTCAATGACGGTAAATGGCC
 CCTTGGCATATGCGGAGTACAGCTTATGAGGACTTACTTGGCAGTACATCTA
 TTAGTACTGCTATTATGCAATGAGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
 GATAGCGGTTGACTCAGCGGGATTTCAAGTCCACCCCATGACGCTCAATGGGAG
 TTGTTTGGACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACATGGGCGT
 TGACGCAAAATGGGCGTAGGCGGTGACGGTGGAGGTTATATGACGAGCTGTT
 AGTCAACCGCTCAGATCGCTGGAGCGCACTACCGCTTATGACCTCAATGAA
 GACACCGGACCGATCCAGCTCCCGACTTACAGGACTTGGAGTCTGAGGAACTG
 AAAACAGAAAGTTAACTGGTAAAGTTAGTCTTTTGTCTTTTACTTACTTACTG
 CCGTGTGGTGGTCAATCAAGAACTGCTCCCTAGTGGAGTGTGCTTACTTACTG
 CTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTTAAAGCTGCGGAATGTACCCGCGGCGCAC

10

20

【 図 2 2 - 3 】

CATGAAGCTGCTGCCGTGGTGGTGTGAGGCTTCTTGGCTGCAGTCTCTCG
 GCACCTGGTACTGGCGAGACCCCTGGAGCGGCTTCGGAGAGGGCTAGCTGCTG
 GAACCAAGCAACCCGGACCTCCCACTGATCCAGCGGACCGACTGCTACCCC
 TAGGAGCGCGCCGGACCCGAAAGTCCGCTGACTTGCAGAGGCGACTTTCG
 ACCTTTGAGAGTCACTTTATCTCCAGCCACAAGCACTGGCCACACCAAA
 CAAGGAGGACCGGCAAAAAGAAAGAAAGAAAGGCAAGGGGCTAGGGAAGAA
 GAGGGACCCATGCTTTCGGAATAACAAGGACTTCTGATCCATGGAGAATGC
 AAATATGTAAGGAGCTCCGGCTCCCTCTGCTGACTGCAACCCGGGTTAC
 CATGGAGAGAGGTGCTATGGCTGAGCTCCCAAGACTGGACAGGCTTAT
 ATGTAATACCTCCAACAGGGGCGCTTGGAAAGTGCATCTCCACAGGGGCAG
 AACAATGAGGAAAATTTGCTACAGACCCAGCGCAATCTGTTTATGATGGAA
 AGAACATTCGGTTCATGTAGAGCGCAACTAGAGGCACTTTACAGTCAAGTGGAT
 GAAAACAGAAAGATACATGCAAAAACCTGACAGTGTGAACAGCCCTATCGAA
 AAGCTTTTCGTTGGGGGCTCCACCTGAAATTTCAACCTTCCCACTCAGAAATA
 TTCTCTCTTTGAAAGCTGCAATAGGAAATCTTGTATTAACCTTCTGCCCATGG
 TTTGCAAGGGCTGTGCTTCAAAAATGCTGCAATGGCTGTGCCATCAGAA
 AACTCCGTGAAGATGAAGTGAAGTACAGCTGACTGAAATTTATCCAGCTGT
 AGCCAGTCCCAACCCAGCTTCTCAGCCCAACCCAGTCTGACACATGGTCT
 TTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
 TTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
 TCAAGAAACAGTCAATGCAATTTGATGACCAAAAGTAAACCCGCT
 TCACAATGAGTGGAAAGTAAAGCAAGTGAATCCGGCTTGTCTTTTACAT
 GGCTCGCATCAATCATGCTGATTTTGGCAAGTTCAGCTGAGAAATGGATGGCC
 TACTTCAGCTATGACTGGGGAGTGGGGACACCCACACCAATGATCCCAACCAA
 ATCAATGATGGCCAGTGGCCACAAGATTAAGATAATGAGAAGTAAGCAAGAAG
 AATCTTTATGTAGATGGGGCTCCACAGAACCCATCAGTCCCAAAAAGCCGAC
 ATCTGGATGTCGTGGGAATGCTGTATGTTGGTGGGTTACCCATCAACTACACTA
 CCGAAGAAATGGTCCAGTACCTATAGCATGATGGTGGCTCAGGAATTTCCA
 CATGGCAGAGGCCCTGCCGATCTGGAACAACCCACCTCCAGCTTCCATGTTGG
 ACATGTTTGAACATGCTCAGAGGGGAACATATTTGACGGAACCGGTTTGGCA
 AAGCAGTTGGTGGATTCAAAAGGGGATGGACCTTCTGTGAAATTTGAATTCG
 CACAACCTAACGACTGGATCTTCTGGGGATCAGTAGTCAAAAATGGATGG
 AATGGGTATTGAATGATGATGAAAGTGTATGTTTCAATGTTGCAATGGTGGC
 GGCAGATTCACTGCTGCTGATGTTGGTGGGTTCCAGGCCATTTGTTGATGGAC
 AATGGCATAAAGTCACTGCCCAACAAGTCAAAACCCAGCTTTGAGCTCAGTGT
 ATGGGAACCCAGGTGGAGCCCAACCCCAACCCAGCTTCACTCAGCTGACAA
 CAAATGACCCCTGTGTTTGTGGAGGCTTCCAGATGACCTCAAGCAGTTTGGCT
 AACAAACAGTATCCGTTCCGAGGTTGATCAGATCCCTCAAGCTCAGCAAGCC
 ACAGCAAGCCACTGGAGGTTAATTTTGGCAAGGCCCTGGAAGTGAAGTGGC
 GCCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTTGATGAGTTTGGCAAAACCAA
 CTAGATGACGTTGAAAATGCTTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLL
 LLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLL
 LLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLLTLL
 CGAACCATAGTGTAGGAGTTGGCCACTCCCTCTTCGGCGCTCGCTCGCTCACTG
 AGGCCGGCGACAAAGGTGCGCCGACGCCGGGCTTGGCCGGGGCGGCTCAG
 TGAGCGAGCGAGCCGNNNNNACGCTGCAATTAATGAATCGGCAACAGCCGCG
 GGAGAGCGGGTTTCGCTATTGGCC

【 図 2 3 - 1 】

pAAV. CMV. HB. DAG1a (番号番号10)



GCTCTCCGCTTGGTCTGCTACTGACTGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGGC
 AGCGGTATACGCTACTCAACCCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATAGGGGA
 TAACCGAGGAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCGCAGCAAAAGCCGAGGAAACCGTA
 AAAAGGCCGCTGTGGCGTTTTTCATAGGCTCAAGCCGCTACGAGCATCA
 CAAAATCGACGCTCAAGTACAGAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATA
 CCAGCGCTTTCCTCGGAAGCTCCCTGCTGCTCTCTGTTGACGCCCTGGCC
 TCACCGGATACCTGTCCGCTTTCCTTCGCGGAAAGCGTGGCGCTTTCATAGC
 TTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTGAGTGTGCTCTGCTCAAGCTGGCTGTG
 TGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATCTGCT
 TGACTCAACCCCGTAAGACACTTATCCGACTGACAGCAGCCACTGGTAA
 CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAACCGGTGCTACAGAGTTCGTAAGTGGT
 CCCTAACCTAGCGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTTCTGTAAG
 CGATACCTTCGGAAAAAGAGTGGTAGCTCTGATCCCGGCAACAAACCCACT
 GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGGCAAGCAGAGTATCCGCGAGAAAAGAA
 GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTTCAGCGCTAGTGGAAACGA
 AAACCTCAGTTAAAGGATTTTGGTCTAGAGATTATCAAAAAGGATCTCACTAG
 ATCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGATAAAA
 CTGCTGTCAGACTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGGACCTATCTCAGCGATCTG
 TCTATTCTGTTCACTCCATAGTGGCTGACTCCCGCTGTGTAGATATAACGATA
 GGGAGGGCTTACATCTGGCCAGTGTGCAATGATACCGGAGACCCAGCT
 CACCGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCGAGCCGA
 GAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTTCAACCGACTTAAATTTTGTGGCGGCA
 AGCTAGAGTAAAGTGTGCGCAAGTAAATGTTGCGCAAGTGTGTGCTTGTCT
 ACAGGATCTGTTGTGACGCTGCTGCTTGTGTTGTTGCTTACTTCAAGCTCCGTTG
 CCAACGATCAAGCGAGTACATGATCCCACTGTTGTGCAAGCTCGGGTTAG
 CTCCTTCGGTCTCCGATCGTGTGCAAGAAAGTGTGGCCGAAAGTATCACTE
 TTGTTATGCGAGCACTGCAATTTCTTACTGTCTAGGAACTCCGTAAGTGGCT
 ATCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGA
 CCGAGTTGCTTTCGCGGGCTCAATACGGGATAATACCCGCGACATAGCAGA
 ACTTTAAAGTGCTCATCTATTGAAAACGTTCTTCGGGGGCAAAAACCTCAAGGA
 TCTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTGTCGACCCAACTGATC
 TTCAGACTTTTTACTTTCACCCAGGCTTTCGGGTGAGCAAAAACAGGAAGCCAA
 AATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACATCACTC

30

40

50

【 図 2 3 - 2 】

TTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATTCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA
CATATTTGAAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGGCCACATTTCCC
CGAAAAGTCCACCTGACCTTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATA
AAAATAGGCGTATCACGAGGCTTTCCTGCTCGCGGCTTTCCGGTATGACGGGTGA
AAACCTTCGACACATGACGCTCCGGAGCGGTACAGCTTGTGTGTAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTACGGGCGGCTAGCGGGTGTGGCGGGTTCGG
GGTGCCTTAACATGCGGCTACAGGCAAGATTGTACTAGAGTGCACCATATGC
GGTGTGAAATACCCGACAGATCGGTAAGGAGAAAATACCCGATCAGGAATCC
AACATCAATAAATCATACAGCAAGGCAAGAATTAGCAAAATTAAGCAATAA
AGCCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGGTGTACCAAAAACATTATGACCCTGAAT
ACTTTTGGGGGAGAGGCTTTATTTCAACGCAAGGATAAAAATTTTGAACCCCT
AGAAAGGCGGAGACAGTCAAATCCCATCAATATGATATTCAACCGTTCAGC
TGATAAATCATCGCCGAGAGGGTGTATTTTGGAGAGTCTCTACAAAGGGTCA
TCAGGTCATTGGCTGAGAGTCTGAGCAAAACAGAGAAATCGATGAACGGTAATC
GTAAAATAGCATGTCAATCATATGATACCCCGGTGTATAATCAGAAAAGCCCCA
AAAACAGGAATGTTATAAGCAAAATTTAAATTTGTAACAGTGAATATTTTGT
AAAATTCGGCTTAAATTTTGTAAATCGCTCAATTTTAAACATAAGGCCGAA
ATGGCAAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGATAGCCAGATAGGGTGTAGTGT
ATGCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTTAAAGAAAGCTGGAACCTCAACGTCAA
GGGCGAAAACCGCTATACAGGGGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAA
TCAAAGTTTTTGGGGTCCAGGTGCGTAATACTAAATCGAAACCTAAAGGGA
GGCCCGGATTTAGAGCTTACGGGGGAAAGCGGCGAAGCTGGCGAGAAAGGAA
GGGAAGAAAGCGAAAGGAGGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTAC
GCTGGCGTAACCAACACCCGCGCTTAAATGCGCGCTACAGGGCGGCTA
CTGTGTGCTTACAGCGACAGTATAACGTGTTTCTCTGTTAGAAATCAGAGG
GGAGCTAAACAGGAGCGGATTAAGGGATTTAGACAGGAAACGGTACCGGAGA
ATCTGAGAAAGTGTTTTATAAATCAAGTGGGCCACCGAGTAAAAGAGTCTGTCCA
TCAGCAAAATTAACCGTGTGCGCAATCTTTGATTAGTAATAACATCACTTTC
CTAGTAGAAGAACTAAACATCGGCCCTGCTGGTAATATCCAGAAACAATTTA
CGCCAGCCATGTCAACAGGAAAACCGCTCATGGAATACCTACATTTTACGCT
CAATCGTCTGGAACCTTCAATTCGCTTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG
ATCGGTCGGGGCTTTCGCTATTACGCGAGCTGNNNNNGGCGCTCGCTCGC
TCACTAGGCCCGCCCGGCAAGCCGGGCTCGGGCGACTTTGCTGCC
CGGCTCAGTGAGCGGAGGCGGCGCAGAGGGAGTGGCCAATCCTCATCA
CTAGGGGTTCTTTGATTAATGATTAACCCGCAATGTAATTAATCACTAGTA
GCCATGCTAGGGTCTTACATAAATTCGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCC
AACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCAATAGG
GACTTTCATTGACGCTCAATGGTGGAGTATTAACGGTAAATGCCCCTTGGCAGTAC
ATCAAGTATCATATGCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGTAATGGCC
GCCCTGGCATATGCCAGTACATGACTTATGGGACTTTCTACTTGGGAGTACATCA
CGIATAGTCAATGCTATTACATGTTGATGCGGTTTGGCGTACATCAATGGCGTG
GATAGCGGTTTACTACCGGGATTTCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG
TTTGTITGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAATGTCGTAACAACTCCGCCCAT
TGACGCAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCATATAAGCAGAGCTCGTTT
AGTAAACCGTCAAGTGCCTGGAGACGCCATCCACCGCTTTTGGACTCCATAGAA
GACACCGGACCGATCCAGCTCCGGACTTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAATG
AAAAACAGAAAGTTAAGTAAAGTTTATGCTTTTGTCTTTTATTCAGGTCGGGAT
CCGGTGGGTGGCAAAATCAAGAACTGCTCCCTAGTGGATTTGCTTACTCTTAGG
CCITGACGGAAGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATGTACCCGCGCCGAC

【 図 2 3 - 3 】

CATGAAGCTGCTGCCGTGCGGTGCTGAAGCTCTTTCTGGCTGCAAGTCTCTCC
GCATGGTGACTGGCGAGGCTGGAGCGGCTTCGGGAGAGGCTGACTGCTG
GAACCAACCCCGGACCTTCCACTGTATTCCAGGAGCGGCTGACTCCG
TAGGAGGCGCGGGGACCGGAAGTCCGCTGCTGCAAGGAGGAGATCTCC
ACCTTTTGAAGTCACTTTATCTTCAAGCTCAACAAAGCACTGGCCACAAA
CAAGGAGGAGCAGCGGAAAAGAAAAGAAAGGCAAGGGGCTAGGGAAGAA
AGGGGACCCACAGATCCATGCTACACCCACACTGCTGCTGCTGCTGGCCCA
ACCACGGCTATCCAGGAGCCCCATCCAGGATCGTGCCAACCCCACTCTCCAG
CCATTGCTCTCCACAGAGACCATGGCTCTCCAGTCAAGGATCCGTCTCTGG
GAAACCCACGGTACCATCCGACTCGAGGCGCCATTATTAACACCCCAACCTA
GGCCCTTCCAGCTACTCGGGTGTGAGAAGCTGGCACCACAGTCTCTGGCCAGA
TTCCGCCAACAGATGACCATTTCTGGTATGTGGAGCTACTGCGTGTGCTACCC
TCCCAACACCCACCAAGAAAGCCAGGATTCACACAAAACAGCAACCGCT
TTCAACTGACTCCACCACCACCACTCCGAGGCAACCAAGAAACACCGGAC
ACCCCGGCGTGGCCCGGCTACCACAAAGTTTCCATCAGCAGATTTGGAAC
GCTTCCCGCTACTCGTATTCGACACCAACCAAGTGGAGTGGCGGAG
AACCAACCGCCAGAGCTCAAGAACATATTGACAGGGTATGCTCGGG
TTGGCACTACTTTGAGGTGAAAGTCCCGTACAGACTTCTATGACCATGAGGA
CACACACTGACAAAGTGAAGTGCACCTGAACTCGGGGAGCCAGCTGGT
GGGCGAGAAGTCTGGGTACAGTCAACAGCAACAGCCAGCTATGATGGCT
TCCCGACAGCAGCCAGTGGGCAACACAGAGTATTTCAATCCAGCAGACAA
GGGGGCTGTGGCTGTGGTGCCTTCGAGATCCAGCTCCACAGGCGCCCA
AGGGGATAGGGCTCTGCAAGGTTCAAGGCAAGTTTGTGGGTGAGGGGCACT
GGTGTGATGACATCCCAAGAAAGTGGCTTGGTAAAGAAATGGCCCTGCGC
TTGGAGCCGAAACTGTAGCACCATCCCTGAGAGATATCACCCGGGCTAA
ACTAGTGGCGGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTGGAC
AACCAACAATGAGATGACAGTGA AAAAATTTAATTTGTAAGTATTTGTAAGT
TATTTGCTTATTTGTAAGCATTATAAGCTGCAATAAAGAAATTTAAGAAAT
TGCATTTAATTTAATTTGTAAGCTGCAATAAAGAAATTTAAGAAATTTAAGAA
TCTAGAGTCAACACATGGCTACGTAGATTAATGATGAGTGGGGTTAAITAIT
AATCAACAGGAACCCCTAGTATGAGTGGTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTC
GCTGCTCACTAGGGCGGGGACAAAGGTCGCCGCGCCGCTGGGCTTTG
CCGGCGCGGCTCAGTGGGAGGCGGCTGCGNNNNAGCTGCATTAATG
AATCGGCCAGCCGCGGGGAGAGCGGCTTTGCTGATTTGGG

10

20

【 図 2 4 - 1 】

pAAV. CMV. HBEGF. DAG1 (複製番号 1 2)

主な特徴
【アミノ酸配列】
ITRs
CMVプロモーター
SV40エンハンサー
HBEGF シグナルペプチド
HBEGF フロペプチドドメイン
HBEGF 成熟したペプチドドメイン
HBEGF HBドメイン
HBEGF EGF一様ドメイン
DAG1a
SV40 終リターナル

GCTCTCCGCTTGGTGCCTCACTGACTCGTGCCTCGGCTTCCGGTCCGGCG
AGCGGTATCAGTCACTCAAACCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAGCCAGGAACCGTA
AAAAGGCCGCTTGTGGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTACAGGACATCA
CAAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATA
CAAGCGGTTTCCCGTGGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCG
TTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCACTCGGGAAGCTGGCGCTTTCCTATAGC
TACAGCTGTAGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGCTGCTCAACGCTGAGTGTG
TGACGAAACCCCGCTTCCGCCAGCTGCGGCTTATCCGTAACATCTGCTGT
TGATCCAAACCCGGTAAAGACAGCTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGATGTATGACCGGCTGCTACAGAGTCTTTGAAATGGT
GCCTAATCAGGCTACATAGAAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
CCAGTACCTTCGGAAAAGAGTGGTAGCTTGTATCCGGCAAAACAAACCCAC
CGGTTAGCGGTTTGTGTTTGGTGAAGAGATTAAGAGATTATCAAAAAGGATCTAC
ATCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATTAAGATATATATGAGTAA
AAACTCAGCTAAAGGATTTTGGCTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAG
ATCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATTAAGATATATATGAGTAA
CTTGGCTCAGAGTTACCAATGCTTAACTCAGTGGAGGCACTTCTCAGGCTCTG
TCTATTCTGTTTCAATCAGTGTGCTGCTCCCGTCTGTGATAGATACTACGATCA
GGAGGGCTTACCATCTGGCCGAGTCTGCAATGATACCCGAGACCCAGCT
CCAGGCTCAGATTATACGAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCGAGCGGAGCA
GAAGTGTCTGCAACTTTATCCGCTTCCATCAGTCTTATTAATTTGTCGGGGA
AGTGAAGTAAAGTGTGCGAGTAAATAGTTTGGCAACCTGTGTCAGCTTGTCT
ACAGCATCTGTTGAGTCAAGTCTGCGTGTGGTATGGCTTCACTTCCGCTGTT
CCAAGCATCAAGCGAGTACATGATCCCAATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAG
CTCTTCCGCTTCCGATCTGTTGTCAGAAAGTGGCCGCAAGTGTATCACTC
ATGTTTATGGACAGCATGCTAAATTTCTTACTGTCTAGCCAACTAGTAAAGTGT
TTCTGTGATCTGGTGTGATCAACAAAGTCTTCTGAGAAATGTTATGCGGCA
CCGAGTTGCTCTTGGCCGGGCTAAATCCGGGATAATACCCGCAACATAGCAGA
TCTTAAAGTGTCTCATAGTTGAAAACGTTCTCGGGCGGAAAACCTCTCAAGGA
TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTCTGAGTAAACCCACTCGTGCACCAACTGATC
TTCAGCATCTTACTTTCACAGGCTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAAGCA

【 図 2 4 - 2 】

AATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTC
TTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA
CATATTTGAAATGTATTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGGCCACATTTCCC
CGAAAAGTCCACCTGACCTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATA
AAAATAGGCGTATCACGAGGCTTTCCTGCTCGCGGCTTTCCGGTATGACGGGTGA
AAACCTTCGACACATGACAGTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTGTGTAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTACGGGCGCTAGCGGGTGTGGCGGGTTCGG
GGTGGCTTAACTATGCGGATCAGAGCAAGTGTACTGAGAGTGCACCATATGC
GGTGTGAAATACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCCGATCAGGAATCC
AACATCAATAAATCATACAGCAAGGCAAGAATTAGCAAAATTAAGCAATAA
AGCCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGGTGTACCAAAAACATTATGACCCCTGAAT
ACTTTTGGGGGAGAGGCTTTATTTCAACGCAAGGATAAAAATTTTGAACCCCT
CATATTTTAAATGCAATGCCTGAGTAAATGTTAGGTAAGAAATTCACACGGGTG
AGAAAGGCCGGAGACAGTCAAATACCATCAATATGATATTAACCCGCTTACG
TGATAAATTCATGCGGAGAGGGTGTGATTTTGGAGGTTCTACAAAGGCTA
TCAGGTACTTTCGAGAGTCTGGAGCAAAACAGAAATCGATGACAGGTAATC
TGAAAACAGTCAATCATATGATCCCGGTTGATAATCAGAAAAGGGCCCA
AAAACAGGAAGATTTGATAAGCAAAATTTAAATTTGTAAGCTTAAATTTTGT
AAAATTCGGTATAAATTTTGTAAATCAGCTCAITTTTAAACCAATAGGCGGAA
ATCCGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGATTAAGCCGATAGGGTGTGGTGT
GTTCAGTGTGGAACAAGAGTCCACTATAAAGAACCGTGGACTCCACCTCAA
GGGCAAAAACCCGCTTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAA
TCAAGTTTGGGGTGGAGGTCGTAATCACTAAATCGGAACCCTAAGGGGA
GCCCCGATTAGAGCTTACGGGGAAGCCGGCAAGCTGGCGAAGAAAGAA
GGGAAGAAAGGCAAGGAGCGGGGCTAGGGCGCTGCGAAGTGTAGCGGTCAC
GCTCGGCTAACCCACACCCCGCGCTTAAATGCGGCTACAGGCGGCTGTA
CTATGGTGTCTTACAGGACAGTATAACGTGCTTCTCTGTTAGAAATCAGAGG
GGAGTAAACAGGAGCGGATTAAGGGATTTAGACAGGAAACGGTACGCCAGA
ATCTGTAGAAAGTGTTTTATAATCAGTGGAGCCACCGAGTAAAAGAGTCTGTCCA
TCAGCAAAATTAACCGTGTCCGAATCTTCTTGTAGTAAATCAATCACTGCTG
CTAGTAGAAGAACTCAAATATCGGCTTGTGGTAAATATCCAGAAACATATTA
CCGCGAGCCATTCGAACAGGAAAACCGCTCATGGAATACTCTATTTGACGCT
CAATCGTCTGAAACTTCCATTCGCCATTCAGGCTCGCAACTGTATGGGAAGGGG
ATCCGTTGCGGGCTCTCGCTATTACCGCAGGCTGCGGCGGCGGCTCGCTCCG
TCACTAGGGCGCCCGGCAAGCCGGGCTGGGGCGACTTTGTTGCTGCC
CGGCTCAGTGAGCGGAGCGGCGCAGAGGGAGGGATGGCCAACTCCATCA
CTAGGGGTTTCTGTAGTTAATGATTAACCCGCAATGCTAATTTACTAGTA
GCCATGCTAGGGTCTGTTAATACTTACGTTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCC
AACCCCGCCGCTTACGCTCAATAATGACGATGTTCCTCATGATAACGCAATAGG
GACITTCATTGACGCTAATGGTGGAGTATTTACGTTAACTGCCACTTGGCAGTAC
ATCAAGTGTATCATATGCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGTAATGGCC
CGCTGGCATATGCCAGTACATGACTTATGGGACTTTCTACTTGGGAGTACATCA
CGIATAGTCAATGCTATTACATGTTGATGCGGTTTGGCGTACATCAATGGCGTG
GATAGCGGTTTACTACCGGGATTTCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG
TTTGTITGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAATGTCGTAACAACTCCGCCCAT
TGACGCAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCATATAAGCAGAGCTCGTTT
AGTAAACCGTCAAGTGCCTGGAGACGCCATCCACCGCTTTTGGACTCCATAGAA
GACACCGGACCGATCCAGCTCCGGACTTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAATG
AAAAACAGAAAGTTAAGTAAAGTTTATGCTTTTGTCTTTTATTCAGGTCGGGAT
CCGGTGGGTGGCAAAATCAAGAACTGCTCCCTAGTGGATTTGCTTACTCTTAGG
CCITGACGGAAGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATGTACCCGCGCCGAC

30

40

50

【 図 2 4 - 3 】

CCTGTACGGAAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCAC
 CATGAAGCTGCTGCGGTGGTGGTGAAGCTCTTTCTGGCTGCAGTTCTCTCG
 GCACTGGTGACTGGCGAGAGCCTGGAGCGGCTTCGGAGAGGGCTAGCTGCTG
 GAACAGCAACCGGACCCCTCCCACTGTATCCACGGACCAAGCTGTACCC
 TAGGAGGCGCGCGGACCGGAAAGTCCGTGACTTGCAGAGGCAGATCTGG
 ACCTTTTGTAGATCACTTATCTCCAAGCCACAGCACTGGCCACACAAA
 CAAGGAGGACACCGGGAAGAAAGAAAGAAAGCAAGGGGCTAGGGAAGAA
 GAGGGACCAAGTCTTCGCAATAGAAAGACTTCTGCACTCCATGGGAAATG
 AATATGTGAAGGAGCTCCGGGCTCCCTCTGCACTGCCACCCGGTJAC
 CAJGGAGAGGCTTCATGGCTGAGCTCCCAAGATCCATGCTACACCCA
 CACTGTCACTGCCATTGGGCCCCAACCCAGGCTATCCAGGAGCCCCATCCAG
 GATCGTGCCAAACCCACATCTCCAGCCATTGCTCCTCCAACAGAGACCATGGCT
 CCTCCAGTCAGGGATCCTGTCTCTGGGAAACCCACGGTCAACATCCGGACTCGAG
 GCGCCATTATTCAAACCCCAACCTAGGCCCATCCAGCCTACTCGGGTGTGAGA
 AGCTGGCACCACAGTTCCTGGCCAGATTCGCCAACAGTACCATCTGGCTAT
 GTGGAGCCTACTGGAGTGTCTACCCCTCCACAACCCACCAAGAAGCCACGA
 GTATCCACACCAAAACAGCAACGCCTTCACTGACTCCACCACCACCGACTC
 GCAGGCCAACCAAGAAACACCGGACACCCGGCCAGTGCCTCCGGTCAACCA
 AAGTTCCATCACCAGATTGGAAACTGCTCACCCGCTACTCGTATTGCAACCA
 CACCAGTGGAGTGCCTGGCGGGAACCAACAGCCGCCAGAGCTCAAGAA
 CCATATTGACAGGGTAGATGCTGGGTTGGCACCTACTTTGAGGTGAAGATCCCG
 TCAGACACTTCTATGACCATGAGGACACCACACTGACAAGCTGAAGTGAACC
 TGAAACTGCGGGAGCAGCAGCTGGTGGGCGAGAAGTCTGGGTACAGTTCAACA
 GCAACAGCCAGCTCATGTATGGCTTCCCGACAGCAGCCAGTGGGCAACACG
 AGTATTTCATGCATGCCACAGACAAGGGGGGCTGTGGCTGTGGATGCCTTCGA
 GATCCACCTCCACAGGCGCCCCAAGGGGATAGGGCTCCTGCAAGGTCAAGGC
 CAAGTTTGTGGTGACCCGGCACTGGTGTGAATGACATCCACAAGAAGATTGCC
 TTGGTAAAGAAACTGGCTTCGCTTTGGAGACCGAAACTGTAGCACCATCACC
 TGCAGAAATACACCCGGGGCTAAACTAGTGCGGCCGCGGGGATCCAGACATGAT
 AAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCAACTAGAATGCAGTGAAAAAATG
 CTJAJJTGTAALITIGTAIGCTATIGCTTJAJJTGTAACCATTATAAGCTGCA
 ATAAACAAGLTAACAACAACAATIGCATTJAJJTAGLITCAGGTTACGGGGGA
 GGJGTGGGAGGJLJLJLJCGGATCCTAGAGTCGACCACATGGCTACGTAGATA
 ATTAGCATGGCGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT
 GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGGACCAAA
 GGTGCGCCGACGCGCGGCTTTGCGCGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAG
 CGCGCANNNNACGTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGT
 TTGCGTATTGGC

10

20

【 配列表 】

0007534961000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 C 0 7 K 14/47 (2006.01)
 C 0 7 K 14/475 (2006.01)
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 19/00
 C 0 7 K 14/47
 C 0 7 K 14/475
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 38/16
 A 6 1 K 48/00

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マーティン, ポール テイラー

アメリカ合衆国 オハイオ 43209, ベックスリー, メリーランド アベニュー 2520

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献

国際公開第2017/049031(WO, A1)

国際公開第2017/181015(WO, A1)

J.Clin.Invest., 2017年, 127(3), 1075-1089

岡山医学会雑誌, 2009年, 121, 157-162

化学と生物, 2001年, vol.39,no.10, p.644-649

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 4 7

C 0 7 K 1 4 / 4 7 5

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d