

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-508987

(P2025-508987A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/16 (2006.01)	C 1 2 N 15/16	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-552447(P2024-552447)	(71)出願人	502409813 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ ーシティ・オブ・ペンシルベニア
(86)(22)出願日	令和5年3月3日(2023.3.3)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191 04フィラデルフィア・ナインスフロア ー・シビックセンターブルバード36 00
(85)翻訳文提出日	令和6年11月1日(2024.11.1)	(74)代理人	110000741 弁理士法人小田島特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063687	(72)発明者	ウイルソン, ジェームズ・エム アメリカ合衆国ペンシルベニア州191 03フィラデルフィア・デランシースト リート1831
(87)国際公開番号	WO2023/168411	(72)発明者	ヒンデラー, クリスチャン アメリカ合衆国メリーランド州2121
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	63/384,196		
(32)優先日	令和4年11月17日(2022.11.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/316,220		
(32)優先日	令和4年3月3日(2022.3.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 G L P - 1 受容体アゴニスト融合物の送達のための A A V ベクター

(57)【要約】

対象における代謝性疾患を治療するための組成物及び方法が、提供される。G L P - 1 受容体アゴニスト融合タンパク質をコードする配列と、その発現を指示する調節配列とを含む核酸分子を含むウイルスベクターが、提供される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

GLP-1類似体及びIgG4Fcを含む融合タンパク質をコードする配列を含む核酸を含む組成物であって、前記融合タンパク質が、配列番号14の配列、又はそれに対して少なくとも99%同一の配列を有する、組成物。

## 【請求項 2】

前記融合タンパク質をコードする前記配列が、配列番号15、又はそれに対して少なくとも75%の同一性を共有する配列である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 3】

ウイルスベクターを含む組成物であって、

(a) アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドと、

(b) 前記AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、前記ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復(ITR)、GLP-1類似体及びIgG4Fcを含む融合タンパク質のコード配列を含み、前記融合タンパク質が、配列番号14の配列、又はそれに対して少なくとも99%同一の配列、及び前記融合タンパク質の発現を指示する調節配列を有する、ベクターゲノムと、を含む、組成物。

## 【請求項 4】

前記ウイルスベクターが、AAVrh91又はAAVhu68の前記AAVカプシドを有する組換えAAV(rAAV)である、請求項3に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記融合タンパク質が、誘導性遺伝子発現系の制御下にある、請求項1~4のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記誘導性遺伝子発現系が、調節可能なプロモーター、活性化ドメイン、及びDNA結合ドメインを含む、請求項5に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記AAV逆位末端反復(ITR)が、前記融合タンパク質のコード配列及び調節配列に隣接する、AAV2'5'ITR及びAAV2'3'ITRである、請求項3~6のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記ベクターゲノムが、CB7プロモーター及びウサギグロビンポリAを含む、請求項3~7のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記誘導性遺伝子発現系が、

(a) トランス活性化ドメイン及びFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメインを含む活性化ドメインと、

(b) ジンクフィンガーホメオドメイン(ZFH)及び1、2、又は3個のFK506結合タンパク質ドメイン(FKBP)サブユニット遺伝子を含むDNA結合ドメインと、

(c) 少なくとも1つのコピーのZFHに対する結合部位、それに続く最小プロモーターと、

(d) 調節可能なプロモーターと、を含む、請求項5~8のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記誘導性遺伝子発現系が、1つのベクターに含まれる、請求項9に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記誘導性遺伝子発現系が、2つのベクターに含まれる、請求項9に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記トランス活性化ドメインが、NF-Bp65の一部を含む、請求項9~11のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

前記調節可能なプロモーターが、構成的プロモーターである、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記調節可能なプロモーターが、CMVプロモーターである、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 15】

IRES又は2Aを更に含む、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 16】

少なくとも8つのコピーのZFHDに対する結合部位を含む、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。 10

## 【請求項 17】

調節可能なプロモーターと、p65トランス活性化ドメイン及びFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメインを含む活性化ドメインと、ジンクフィンガーホメオドメイン(ZFHD)及び3つのFK506結合タンパク質ドメイン(FKBP)サブユニット遺伝子を含むDNA結合ドメインと、12個のコピーの前記ZFHDに対する結合部位と、GLP-1類似体及びヒトIgG4Fcを含む融合タンパク質をコードする配列と、を含む、請求項 5 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 18】

水性液体と、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の組成物と、を含む、対象における代謝性疾患の治療に使用するのに好適な、薬学的組成物。 20

## 【請求項 19】

代謝性疾患を有する対象を治療するための方法において使用するための、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 20】

代謝性疾患を有する対象を治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 21】

前記組成物が、 $1 \times 10^9$  GC/kg ~  $5 \times 10^{13}$  GC/kgの用量の前記rAAVを投与されるように製剤化される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物又は使用。 30

## 【請求項 22】

前記患者が、ヒトであり、 $1 \times 10^{10}$  ~  $1.5 \times 10^{15}$  GCの用量の前記rAAVを投与される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物又は使用。

## 【請求項 23】

前記rAAVが、筋肉内又は静脈内に送達される、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物又は使用。

## 【請求項 24】

代謝性疾患を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、アデノ随伴ウイルスrh91又はhu68由来のAAVカプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)と、前記AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムとを送達することを含み、前記ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復(ITR)と、GLP-1類似体及びヒトIgG4Fcを含む融合タンパク質をコードする配列と、前記融合タンパク質の発現を指示する調節配列と、を含む、方法。 40

## 【請求項 25】

前記患者が、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物を投与される、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記患者が、 $1 \times 10^9$  GC/kg ~  $5 \times 10^{13}$  GC/kg体重の用量の前記rAAV 50

Vを投与される、請求項24又は25に記載の方法。

【請求項27】

前記rAAVが、筋肉内又は静脈内に送達される、請求項24～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

ヒトにおける糖尿病を治療するための、請求項1～18のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子配列表の参照

電子配列表の内容(22-10015.PCT\_Seq\_Listing.xml; サイズ:91.5kb、及び作成日:2023年3月3日)は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

グルカゴン様ペプチド1(GLP-1)は、グルコース恒常性において中心的役割を果たす内因性ペプチドホルモンである。GLP-1は、グルカゴンプレタンパク質のタンパク質分解切断から、胃腸(GI)管で産生されるペプチドホルモンである。GLP-1及び他のGLP-1受容体アゴニストは、インスリン放出を増強し、インスリン感受性を増加させ、ベータ細胞の喪失を防止し、胃内容排出を遅延させることによって、高血糖を制御する能力を有する。しかしながら、GLP-1は、半減期が短く、そのことが薬物としてのその使用を妨げてきた。他のGLP-1受容体アゴニストは、現在、糖尿病の治療のためにヒトにおいて使用されている。アゴニストをより長い半減期を有するタンパク質に融合させることによって、天然ホルモンの短い半減期を克服するように操作されたGLP-1受容体アゴニストは、2型糖尿病(T2DM)の治療のための重要な治療薬として浮上している。

【発明の概要】

【0003】

グルカゴン様ペプチド1(GLP-1)受容体アゴニスト融合タンパク質構築物をコードするウイルスベクターが、本明細書において提供される。これらのウイルスベクターは、いくつかの実施形態では、融合パートナーを含まないGLP-1受容体アゴニストのベクター媒介送達と比較して、対象におけるGLP-1受容体アゴニストの持続的発現及び/又は循環半減期の増加を達成し得る。かかるウイルスベクターを作製及び使用方法が、更に提供される。

【0004】

一態様では、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸を含むウイルスベクターが、提供される。融合タンパク質は、(a)分泌シグナルペプチドを含むリーダー配列と、(b)グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)受容体アゴニストと、(c)IgGFc又はその機能的バリエーションを含む融合ドメインと、を含む。一実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターである。

【0005】

一実施形態では、(i)リーダー配列の分泌シグナルペプチドが、トロンピンシグナルペプチドを含み、(ii)リーダー配列が、トロンピンプロペプチドを含み、かつ/又は(iii)リーダー配列が、トロンピンリーダー配列を含む。

【0006】

別の実施形態では、ウイルスベクターは、AAVカプシドと、AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムとを含み、当該ベクターゲノムは、AAV逆位末端反復(ITR)、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列、及び融合タンパク質の発現を指示する調節配列を含む。

10

20

30

40

50

## 【0007】

別の態様では、対象における代謝性疾患の治療に使用するのに好適な薬学的組成物が、提供される。組成物は、水性液体と、本明細書に記載のウイルスベクターと、を含む。一実施形態では、対象は、ヒトである。

## 【0008】

更に別の態様では、本明細書に記載のウイルスベクターの使用は、代謝性疾患、任意選択的に、糖尿病を有する対象を治療するための医薬の製造のために提供される。

## 【0009】

別の態様では、代謝性疾患を有する対象を治療する方法が、提供される。本方法は、対象に、有効量の明細書に記載のウイルスベクター又は組成物を投与することを含む。

10

## 【0010】

本発明の他の態様及び利点は、以下の発明の詳細な説明から容易に明らかとなるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】デュラグルチドの概略図である。

【図2】誘導性hGLP-1-Fc対CB7を示す。インビトロでのGLP-1-Fc。GLP-1-Fc融合物を、プラスミドでトランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清中で、ヒトロニンシグナル配列を有する誘導性ヒトGLP-1-Fc(TF.GT2A.GLP-1-Fc)及びネコロニンシグナル配列を有するCB7ネコデュラグルチド(CB7.feGLP-1-Fc)について測定した。上清を、ラパマイシン(Rapa)による処理から48時間後、0、4、及び40nMで、又はCB7.feGLP-1-Fcのトランスフェクションから48時間後に収集した。GLP-1-Fcを、キットのSTDとともに活性型GLP-1 ELISAによって定量化した。

20

【図3】Rag1KO(RAG1<sup>-/-</sup>)マウス(n=5/ベクター)におけるGLP-1の誘導性発現を示す。Rag1KO雌マウスに、示されるベクター(すなわち、AAVrh91.TF.hGLP-1-Fc.3w.rBG及びAAVrh91.TF.rhGLP-1-Fc.3w.rBG)の筋肉内(I.M.又はIM)送達を介して、1x10<sup>11</sup>GC/マウスを投与した。毎週採血が行われた。活性型GLP-1に特異的なGLP-1 ELISAが、行われた。AAVベクターを0日目に注射し、ラパマイシンを、AAV注射後14日目及び15日目頃に経口胃管投与によって投与した。

30

【図4】pAAV.CMV.TF.GT2A.hGLP-1-Fc.3w.rBGのプラスミドマップの概略図である。

【図5】マウスにおける操作されたGLP-1構築物のAAV媒介発現を示す。

【図6A】2ベクター系で使用するための誘導性構築物を含む例示的な発現カセットの概略図を示す。

【図6B】IRESリンカーを含む1ベクター系で使用するための誘導性構築物を含む発現カセットの概略図を示す。

【図7A】F2A切断配列リンカー及び分泌シグナルを有するヒトGLP-1-Fcを含む、1ベクター系で使用するための誘導性構築物を含む発現カセットの概略図を示す。

40

【図7B】GT2A切断配列の更なる詳細図を示し、GT2A\_\_V1は、配列番号21のアミノ酸配列を含み、GT2A\_\_V2は、配列番号22のアミノ酸配列を含む。

【図8】様々な構築物でトランスフェクトし、0nM、4nM、及び40nMで、ラパマイシンで処理した後に測定し、rhTTのIU/mLとしてプロットしたときのHEK293細胞上清中のアカゲザルの例示的な治療用導入遺伝子(rhTT)の発現を示す。

【図9】インビトロでの誘導性ヒト(h)及びアカゲザル(rh)GLP-1の発現を示す。GLP-1-Fc融合物を、プラスミドでトランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清中で、誘導性hGLP-1-Fc(ロニンシグナル配列を含む)、2ベクター系を含むrhGLP-1-Fc、及びCB7.rhGLP-1-Fcについて測定した。細胞を、0日目に播種し、1日目にトランスフェクトし、2日目に0nM、4nM、及び

50

40 nMで、ラパマイシンで処理し、細胞からの上清を、4日目又はCB7.rhGLP-1-Fcのトランスフェクションから48時間後に収集し、GLP1-Fcを、キットのSTDとともに活性型GLP1 ELISAによって定量した。

【図10A】NHP1(18-128)の抗rhGLP1-Fc ADA(抗薬物抗体)検出アッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。

【図10B】NHP1(18-128)の抗rhGLP1-Fc ADA(抗薬物抗体)検出アッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされた血清中のラパマイシンレベルを $\mu\text{g}/\text{L}$ として示す。

【図10C】NHP1(18-128)の抗rhGLP1-Fc ADA(抗薬物抗体)検出アッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

10

【図11A】NHP1(18-072)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。

【図11B】NHP1(18-072)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされた血清中のラパマイシンレベルを $\mu\text{g}/\text{L}$ として示す。

【図11C】NHP1(18-072)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

20

【図12A】NHP1(18-013)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイの抗rhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。

【図12B】NHP1(18-013)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイの抗rhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされた血清中のラパマイシンレベルを $\mu\text{g}/\text{L}$ として示す。

【図12C】NHP1(18-013)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイの抗rhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。0~200日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

30

【図12D】NHP1(18-013)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイの抗rhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。NHP1(18-013)における長期rhGLP-1発現を示す。矢印は、ラパマイシンの投与を表す。

【図12E】NHP1(18-013)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイの抗rhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。血中ラパマイシンレベル( $\text{ng}/\text{mL}$ )を示す。

【図13】実施例5に記載の実験の実験設計を示す。

【図14】構成的プロモーターを使用して処置した動物の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。Aは、0~300日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。Bは、0~230日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

40

【図15】2ベクター誘導性プロモーター系を使用してIMを処置した動物の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。Aは、0~約120日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。Bは、0~230日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。矢印は、ラパマイシンの投与を示す。

【図16】1ベクター誘導性プロモーター系を使用して処置した動物の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。Aは、0~約120日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして

50

示す。Bは、0～230日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

【図17】GLP-1-Fc導入遺伝子産物の力価アッセイの結果を示す。精製されたヒト及びアカゲザルGLP-1-Fcを薬局由来のデュラグルチド(Trulicity)と比較し、本明細書に記載のヒト構築物は、Trulicityと同等又はより良好な効力を示した。

【図18A】0～60日目に測定された、プロットされた血清中のhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。

【図18B】0～60日目にサンプリングされたNHP血漿由来のhGLP-1-Fcの効力を示す。

【図18C】0～80日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。

【図18D】研究における2つのNHPの体重を示す。

【図18E】血中グルコースレベル(mg/dL)を示す。アカゲザルの血糖基準値は、63～130mg/dLである。動物18-007は、無症候性を示し、両方の動物は、0日目に比較的低いベースラインBGを有した。60日目の時点で、ADAは検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0012】

長時間作用型GLP-1受容体アゴニスト融合タンパク質発現構築物は、ヒトを含む、それを必要とする対象での使用のために開発されている。分泌シグナルペプチドを含むリーダー配列、並びに得られた融合タンパク質の循環時間を延長することを意図した融合ドメインが、提供される。

【0013】

多数の経路を介して、特にrAAVベクターなどの組換えベクターによって媒介されるインビボでの発現によって、送達を必要とする対象へのこれらの構築物の送達が、記載される。糖尿病又はメタボリックシンドロームを治療することを必要とする対象におけるレジメンにおいて、これらの構築物を使用し、対象におけるGLP-1の半減期を増加させる方法も、提供される。加えて、対象におけるGLP-1の活性を増強するための方法が、提供される。また、それを必要とする対象における体重の減少を誘導するための方法も、提供される。

【0014】

GLP-1融合タンパク質

グルカゴン様ペプチド1又はGLP-1は、プログルカゴン遺伝子の転写産物に由来するインクレチンである。インビボでは、グルカゴン遺伝子は、GLP-1及びGLP-2の2つの形態であるグルカゴンを形成するためにタンパク質分解処理される180個のアミノ酸プレプロポリペプチドを発現する。元の配列決定研究は、GLP-1が37個のアミノ酸残基を有することを示した。しかしながら、その後の情報は、このペプチドがプロペプチドであり、アミノ末端から6個のアミノ酸を除去して、GLP-1の活性型である形態GLP-1(7-37)に更に処理されたことを示した。37位のグリシンもまた、インビボでアミドに形質転換されて、GLP-1(7-36)アミドを形成する。GLP-1(7-37)及びGLP-1(7-36)アミドは、同等の効力を有するインスリン刺激ホルモンである。したがって、本明細書で使用される場合、本明細書で有用であるGLP-1の生物学的に「活性」な形態は、GLP-1-(7-37)及びGLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>である。

【0015】

GLP-1受容体アゴニストは、グルカゴン様ペプチドの作用を模倣する抗糖尿病薬の一種である。GLP-1は、消化中に腸から放出された後に体に影響を与えるいくつかの天然に存在するインクレチン化合物のうちの一つである。GLP-1受容体に結合し活性化することによって、GLP-1受容体アゴニストは、血糖値を低下させることができ、

10

20

30

40

50

これはT2DM患者が血糖制御を達するのに役立つ。本明細書で使用される場合、「GLP-1受容体アゴニスト」という用語は、少なくともGLP-1又はその機能的フラグメント、GLP-1のアミノ酸配列バリエーション又はその機能的フラグメント、及びGLP-1受容体の他のポリペプチドアゴニスト（例えば、エキセジン-4及びそのバリエーション）を指す。本開示は、1つ以上のコピーのGLP-1受容体アゴニスト、並びにかかると融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド及びベクターを含む融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、(a)分泌シグナルペプチドを含むリーダー配列と、(b)グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)受容体アゴニストと、(c)融合ドメインと、を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、GLP-1受容体アゴニストは、トロンピンリーダー配列、GLP-1受容体アゴニスト、及びIgGFc又はその機能的バリエーションを含む。

10

#### 【0016】

いくつかの実施形態では、GLP-1受容体アゴニストは、野生型配列の機能を保持する、本明細書に記載の、又は当該技術分野で既知のGLP-1核酸又はアミノ酸配列から最大約10%のバリエーションを含み得るバリエーションを含む。本明細書で使用される場合、「機能を保持する」とは、必ずしも同じレベルの発現又は活性ではないが、核酸又はアミノ酸が野生型配列と同じ方法で機能することを意味する。例えば、一実施形態では、機能的バリエーションは、野生型配列と比較して、発現又は活性の増加を有する。別の実施形態では、機能的バリエーションは、野生型配列と比較して、発現又は活性の減少を有する。一実施形態では、機能的バリエーションは、野生型配列と比較して、発現又は活性の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上の増加又は減少を有する。

20

#### 【0017】

GLP-1受容体アゴニストを安定化融合ドメインに融合させるいくつかのヒト用薬物は、当該技術分野で既知である。これらには、アルビグルチド、リラグルチド、デュラグルチド、及びリキシセナチド（化学名デス-38-プロリン-エキセジン-4(Heloderma suspectum)-(1-39)-ペプチジルペンタ-L-リシル-L-リシンアミドとしても知られている)が含まれる。デュラグルチドは、各モノマーが1つのGLP-1類似体部分及び1つのIgG4Fc領域からなるジスルフィド結合ホモ二量体融合ペプチドである。Yu M, et al. (2018) *Battle of GLP-1 delivery technologies*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* デュラグルチドの概略図を、図1に示す。WO2005/000892A2を参照されたい(参照により本明細書に組み込まれる)。

30

#### 【0018】

一実施形態では、融合物は、異種配列と組み合わせたGLP-1類似体を含む。GLP-1類似体は、天然ヒトGLP-1(7-37)と少なくとも90%、95%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性を共有するポリペプチドを意味する。一実施形態では、GLP-1類似体は、天然配列と比較して、最大で1、2、又は3個のアミノ酸置換を有する。天然ヒトGLP-1(1-37)は、HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(配列番号1)の配列を有し、GLP-1(7-37)は、HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(配列番号2)の配列を有する。いくつかの実施形態では、天然GLP-1配列を変更して、その1つ以上の特徴を最適化することが望ましい。例えば、一実施形態では、GLP-1類似体は、天然配列と比較して、A8G、G22E、及びR36Gから選択される1、2、又は3個のアミノ酸置換を含む。これらの置換は、DPP-4不活性化からの保護を含むGLP-1(A8G)の臨床プロファイルの有効性の改善、溶解度の増加(G22E)、及び潜在的なT細胞エピトープを除去するために位置36(R36G)のアルギニンをグリシン残基で置換することによる免疫原性の低減を示されている。一実施形態では、GLP-1類似体は、GLP-1のDPP-IV耐性バリエーションである。一実施形態では、GLP-1類似体は、配列番号3:HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEF

40

50

I A W L V K G G Gを含むか、又はそれからなる配列を有する。G L P - 1類似体アルビルグルチドは、配列番号4に示される配列を有する。G L P - 1類似体エキセンジン - 4は、配列番号5に示される配列を有する。G L P - 1類似体des - 38 - プロリン - エキセンジン - 4 ( H e l o d e r m a s u s p e c t u m ) - ( 1 - 3 9 ) - ペプチジルペンタ - L - リシル - L - リジンアミドは、配列番号6に示される配列を有する。一実施形態では、1つ超のコピーのG L P - 1類似体が、融合タンパク質に存在する。別の実施形態では、G L P - 1受容体アゴニストは、G L P - 1 ( 7 - 3 7 ) 又はそのD P P - I V耐性バリエーションの2つのタンデムコピーである。

#### 【0019】

融合タンパク質は、分泌シグナルペプチドを含み得るリーダー配列を含み得る。本明細書で使用される場合、「リーダー配列」という用語は、ポリペプチドの任意のN末端配列を指す。

10

#### 【0020】

リーダー配列は、投与が最終的に意図されるのと同じ種、例えば、ヒトに由来し得る。本明細書で使用される場合、「由来する」又は「から由来する」という用語は、配列又はタンパク質が特定の対象種から供給されるか、又は特定の対象種から供給されるタンパク質又は配列と同じ配列を共有することを意味する。例えば、ヒトに「由来する」リーダー配列は、ヒトで発現されるのと同じリーダー配列と同じ配列（又は本明細書で定義されるようなそのバリエーション）を共有する。しかしながら、特定された核酸又はアミノ酸は、実際にはヒトから供給される必要はない。類似のタンパク質（例えば、ホモログ）の変異誘発、又は核酸若しくはアミノ酸配列の人工産生を含む、所望の配列を産生することができる様々な技術が、当該技術分野で既知である。「誘導された」核酸又はアミノ酸は、誘導された配列の実際の供給源にかかわらず、それが「誘導」される種において同じ核酸又はアミノ酸の機能を保持する。

20

#### 【0021】

「アミノ酸置換」という用語及びその同義語は、アミノ酸を別の代替アミノ酸で置換することによるアミノ酸配列の修飾を包含することを意図している。置換は、保存的置換であり得る。それはまた、非保存的置換であり得る。保存的という用語は、2つのアミノ酸を指す場合、それらのアミノ酸が、当業者によって認識される一般的な特性を共有することを意味することを意図している。例えば、疎水性非酸性側鎖を有するアミノ酸、疎水性酸性側鎖を有するアミノ酸、親水性非酸性側鎖を有するアミノ酸、親水性酸性側鎖を有するアミノ酸、及び親水性塩基性側鎖を有するアミノ酸。一般的な特性はまた、疎水性側鎖を有するアミノ酸、脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸、芳香族疎水性側鎖を有するアミノ酸、極性中性側鎖を有するアミノ酸、電荷を有する側鎖を有するアミノ酸、電荷を有する酸性側鎖を有するアミノ酸、及び電荷を有する塩基性側鎖を有するアミノ酸であり得る。天然に存在するアミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸の両方が、当該技術分野で既知であり、実施形態では、代替アミノ酸として使用され得る。アミノ酸を置換するための方法は、当業者に周知であり、アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の変異を含むが、これに限定されない。本明細書における「1つ以上」への言及は、例えば、1、2、3、4、5、6つ、又はそれ以上の個々の実施形態を包含することを意図している。

30

40

#### 【0022】

一実施形態では、リーダーは、ヒトトロニン（第II因子）配列である。一実施形態では、トロニンリーダーは、配列番号7：M A H V R G L Q L P G C L A L A A L C S L V H S Q H V F L A P Q Q A R S L L Q R V R Rで示される配列、又は最大で1、2、若しくは3個のアミノ酸置換を有するその機能的バリエーションを有する。いくつかの実施形態では、リーダーは、シグナルペプチド及びプロペプチドを含む。一実施形態では、リーダー配列の分泌シグナルペプチドは、ヒトトロニンシグナルペプチドを含む。一実施形態では、シグナルペプチドは、M A H V R G L Q L P G C L A L A A L C S L V H S（配列番号8）、又は最大で1、2、若しくは3個のアミノ酸置換を有するその機能的バリエーションである。別の実施形態では、リーダー配列は、ヒトトロニンプロペプチドを含む。

50

一実施形態では、プロペプチドは、QHVF LAPQQARSLLQRVRR（配列番号9）の配列、又は最大で1、2、若しくは3個のアミノ酸置換を有するその機能的バリエーションを有する。

【0023】

一実施形態では、所望のリーダーの機能的バリエーションは、野生型配列の機能を保持する、本明細書に記載の、又は当該技術分野で既知のリーダー核酸又はアミノ酸配列から最大約10%のバリエーションを含み得るバリエーションを含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、プロペプチド及びGLP-1ペプチドの両方についてのコード領域は、プロペプチド及びGLP-1のコード配列の間にリンカーを伴うことなく単一の核酸配列に組み込まれる。

【0025】

融合タンパク質は、融合ドメインを更に含む。融合ドメインは、一実施形態では、ヒトIgG Fcフラグメント又はその機能的バリエーションである。免疫グロブリンは、典型的には、インビボで長い循環半減期を有する。GLP-1受容体アゴニスト（及びリーダー）をIgG Fcに融合させることによって、GLP-1の機能が維持されたまま、融合タンパク質の循環時間が延長される。別の実施形態では、融合ドメインは、アカゲザルIgG Fcフラグメント又はその機能的バリエーションである。

【0026】

本明細書で使用される場合、免疫グロブリンのFc部分は、免疫学の分野における用語に一般的に付与される意味を有する。具体的には、この用語は、抗体からの2つの抗原結合領域（Fabフラグメント）を含まない抗体フラグメントを指す。Fc部分は、非共有結合相互作用及びジスルフィド結合によって会合する、両方の重鎖からの抗体の定常領域からなる。Fc部分は、ヒンジ領域を含み、CH2及びCH3ドメインを通じて抗体のc末端まで及び得る。Fc部分は、1つ以上のグリコシル化部位を更に含み得る。一実施形態では、融合ドメインは、ヒトIgG Fcである。高度に保存されている4つのサブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4は、それらの定常領域、特にそれらのヒンジ及び上部CH2ドメインの点で異なる。Vidarsson et al, IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions, Front Immunol. Oct. 2014; 5: 520を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。Fcドメインは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、又はヒトIgG4を含む任意のヒトIgGに由来することができる。一実施形態では、ヒトIgG Fcは、IgG4 Fcである。一実施形態では、ヒトIgG Fcは、配列番号11:

AESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISR TPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGである。別の実施形態では、ヒトIgG Fcは、配列番号11に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を共有する。

【0027】

別の実施形態では、融合ドメインは、アカゲザルIgG Fcである。Fcドメインは、アカゲザルIgG1、アカゲザルIgG2、アカゲザルIgG3、又はアカゲザルIgG4を含む任意のアカゲザルIgGに由来し得る。一実施形態では、アカゲザルIgG Fcは、IgG4 Fcである。一実施形態では、アカゲザルIgG Fcは、配列番号17:

PPCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKD TLMISR TPEV

10

20

30

40

50

T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A Q T K P R E R Q  
 F N S T Y R V V S V L T V T H Q D W L N G K E Y T C K V S N K G L P A P I  
 E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y I L P P P Q E E L T K N Q V S L T C L  
 V T G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N T Y K T T P P V L D S D G S Y  
 L L Y S K L T V N K S R W Q P G N I F T C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
 S V S P G Kである。別の実施形態では、アカゲザル I g G F c は、配列番号 17 に  
 対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 99% の同一  
 性、又は少なくとも 100% の同一性を共有する。一実施形態では、アカゲザル I g G は  
 、ヒンジ配列を更に含む。

【0028】

本開示の融合タンパク質のインビボ機能及び安定性は、例えば、潜在的に望ましくない  
 ドメイン相互作用を防止するために、又は他の理由で、少量のペプチドリンカーを添加す  
 ることによって最適化され得る。更に、グリシンリッチリンカーは、GLP-1 類似体部  
 分が、膵臓のベータ細胞などの標的細胞上の GLP-1 受容体と生産的に相互作用するこ  
 とができるように、ある程度の構造的柔軟性を提供し得る。したがって、GLP-1 類似  
 体の C 末端及び融合タンパク質の融合ドメインの N 末端は、一実施形態では、リンカーを  
 介して融合される。一実施形態では、リンカーは、配列 G G G G S G G G G S G G G G S  
 (配列番号 13) を有するグリッチペプチドリンカーの 1、1.5、又は 2 回の反復を含  
 む。

【0029】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) ヒトロンピンリーダー、(b) GLP-1  
 (7-37) の DPP-IV 耐性バリエーション、リンカー、及び(c) ヒト I g G F c  
 を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 14 の配列、又はそれに対して少  
 なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 同一  
 の配列を有する。

配列番号 14 :

M A H V R G L Q L P G C L A L A A L C S L V H S Q H V F L A P Q Q A R S L L Q R  
 V R R H G E G T F T S D V S S Y L E E Q A A K E F I A W L V K G G G G G G S G  
 G G G S G G G S A E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K  
 D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K  
 T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L  
 P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L  
 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S  
 R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G

【0030】

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号 15、又はそれに対し  
 て少なくとも 75%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なく  
 とも 98%、若しくは少なくとも 99% 同一の配列である。

配列番号 15 :

a t g g c t c a c g t t c g a g g a c t g c a g c t g c c t g g a t g t c t g g  
 c t c t t g c c g c t c t g t g t a g c c t g g t g c a c a g c c a g c a c g t  
 g t t t c t g g c t c c t c a g c a a g c c a g a t c a c t g c t g c a g a g a  
 g t t a g a a g g c a c g g c g a g g g c a c c t t t a c c t c c g a c g t g t  
 c t a g c t a c c t g g a a g a a c a g g c c g c c a a a g a g t t t a t c g c  
 c t g g c t g g t c a a a g g t g g c g g c g g a g g c g g a g g a a g c g g t  
 g g c g g a g g t t c a g g t g g t g g t g g a t c t g c c g a g t c t a a g t  
 a c g g c c c t c c t t g t c c t c c c t g t c c t g c t c c c g a a g c t g c  
 t g g c g g c c c a t c c g t g t t t c t g t t c c c t c c a a a g c c t a a g  
 g a c a c c c t g a t g a t c a g c a g a a c c c c t g a a g t g a c c t g c g  
 t g g t g g t c g a c g t g t c c c a a g a g g a t c c t g a g g t g c a g t t

c a a t t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a a g t g c a c a a c g c c a a g  
a c c a a g c c t a g a g a g g a a c a g t t c a a c a g c a c c t a c a g a g  
t g g t g t c c g t g c t g a c c g t g c t g c a c c a g g a t t g g c t g a a  
c g g c a a a g a g t a c a a g t g c a a g g t g t c c a a c a a g g g c c t g  
c c t a g c t c c a t c g a g a a a a c c a t c a g c a a g g c c a a g g g c c  
a g c c a a g a g a a c c c c a g g t g t a c a c a c t g c c t c c a a g c c a  
a g a g g a a a t g a c c a a g a a c c a g g t g t c c c t g a c c t g c c t c  
g t g a a g g g c t t c t a c c c t t c c g a t a t c g c c g t g g a a t g g g  
a g a g c a a t g g c c a g c c t g a g a a c a a c t a c a a g a c c a c a c c  
t c c t g t g c t g g a c a g c g a c g g c t c a t t c t t c c t g t a c a g c  
a g a c t g a c c g t g g a c a a g a g c a g a t g g c a a g a g g g c a a c g  
t g t t c a g c t g c a g c g t g a t g c a c g a g g c c c t g c a c a a c c a  
c t a c a c c c a g a a g t c t c t g a g c c t g a g c c t g g g c

10

【0031】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a)ヒトロンピンリーダー、(b)GLP-1(7-37)のDPP-IV耐性バリエーション、リンカー、及び(c)アカゲザルIgGFcを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、(a)ヒトロンピンリーダー、(b)GLP-1(7-37)のDPP-IV耐性バリエーション、リンカー、及び(c)アカゲザルIgGFcを含む。

【0032】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号37の配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%同一の配列を有する。

20

配列番号37

M A H V R G L Q L P G C L A L A A L C S L V H S Q H V F L A P Q Q A L S L L Q R  
V R R H G E G T F T S D V S S Y L E E Q A A K E F I A W L V K G G G G G G S G  
G G G S G G G S A E F T P P C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T  
L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A Q T K  
P R E R Q F N S T Y R V V S V L T V T H Q D W L N G K E Y T C K V S N K G L P A  
P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y I L P P P Q E E L T K N Q V S L T C L V T  
G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N T Y K T T P P V L D S D G S Y L L Y S K L  
T V N K S R W Q P G N I F T C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S V S P G

30

【0033】

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号36、又はそれに対して少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%同一の配列である。

配列番号36

a t g g c t c a c g t t c g a g g a c t g c a g c t g c c t g g a t g t c t g g  
c t c t t g c c g c t c t g t g t a g c c t g g t g c a c a g c c a g c a t g t  
g t t t c t g g c t c c t c a a c a a g c c c t g a g c c t g c t g c a a a g a  
g t t a g a a g g c a c g g c g a g g g c a c c t t c a c c t c c g a c g t g t  
c c a g c t a c c t g g a a g a a c a g g c c g c c a a a g a g t t t a t c g c  
c t g g c t g g t c a a a g g c g g t g g t g g t g g c g g a g g a t c t g g c  
g g a g g t g g a a g c g g c g g a g g c g g a t c t g c t g a g t t t a c a c  
c t c c t t g t c c t c c c t g t c c t g c t c c c g a g c t g c t c g g a g g  
c c c t t c c g t g t t t c t g t t c c c t c c a a a g c c t a a g g a c a c c  
c t g a t g a t c a g c a g a a c c c c t g a a g t g a c c t g c g t g g t c g  
t g g a c g t g t c c c a a g a g g a t c c t g a g g t g c a g t t c a a t t g  
g t a c g t g g a c g g c g t g g a a g t g c a c a a c g c c c a g a c a a a g  
c c c a g a g a g c g g c a g t t c a a c a g c a c c t a c a g a g t g g t g t

40

50

```

c c g t g c t g a c c g t g a c a c a c c a g g a t t g g c t g a a c g g c a a
a g a g t a c a c c t g t a a a g t c t c c a a c a a g g g c c t g c c t g c t
c c t a t c g a g a a a a c c a t c a g c a a g g c c a a g g g c c a g c c t a
g a g a a c c c c a g g t g t a c a t c c t g c c t c c a c c t c a a g a g g a
a c t g a c c a a g a a c c a g g t g t c c c t g a c c t g t c t g g t c a c c
g g c t t c t a c c c t t c c g a t a t c g c c g t g g a a t g g g a g a g c a
a c g g a c a g c c c g a g a a c a c c t a c a a g a c c a c a c c t c c a g t
g c t g g a c a g c g a c g g c a g c t a t c t g c t g t a c t c c a a g c t g
a c a g t g a a c a a g a g c c g g t g g c a g c c c g g c a a c a t c t t c a
c c t g t t c t g t g a t g c a c g a g g c c c t g c a c a a c c a c t a c a c
c c a g a a g t c t c t g a g c g t c a g c c c t g g c

```

【0034】

リーダー配列、GLP-1受容体アゴニスト、又は融合ドメインのバリエーション又はフラグメントが所望される場合、これらのペプチドのコード配列は、野生型核酸配列の部位特異的変異誘発を使用して生成され得る。代替的又は追加的に、ウェブベース又は市販のコンピュータプログラム、並びにサービス会社を使用して、アミノ酸配列をRNA及び/又はcDNAの両方を含む核酸コード配列に逆翻訳し得る。例えば、backtransseq by EMBOSSE, ebi.ac.uk/Tools/st/; Gene Infinity (geneinfinity.org/sms-/sms\_\_backtranslation.html); Expasy (expasy.org/tools/)を参照されたい。一実施形態では、RNAコード配列及び/又はcDNAコード配列は、投与が最終的に意図される対象種、例えば、ヒトにおける最適な発現のために設計される。

【0035】

コード配列は、コドン最適化を使用して最適な発現のために設計され得る。コドン最適化されたコード領域は、様々な異なる方法によって設計され得る。この最適化は、オンラインで利用可能な方法、公開された方法、又はコドン最適化サービスを提供する企業を使用して行われ得る。1つのコドン最適化方法は、例えば、国際特許出願公開第2015/012924号に記載され、これは、参照により本明細書に組み込まれる。簡潔に述べると、産物をコードする核酸配列は、同義コドン配列で修飾される。好適には、産物のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長を修飾する。しかしながら、いくつかの実施形態では、ORFのフラグメントのみが改変され得る。これらの方法のうちの1つを使用することによって、任意の所与のポリペプチド配列に頻度を適用し、ポリペプチドをコードするコドン最適化されたコード領域の核酸フラグメントを産生し得る。

【0036】

本明細書において提供されるリーダー配列、GLP-1受容体アゴニスト、融合ドメイン、及び融合タンパク質に加えて、これらのポリペプチドをコードする核酸配列が、提供される。一実施形態では、本明細書に記載のGLP-1融合タンパク質をコードする核酸配列が、提供される。別の実施形態では、これは、配列番号14のGLP-1融合タンパク質をコードする任意の核酸配列を含む。

【0037】

発現カセット

別の態様では、本明細書に記載のGLP-1融合タンパク質をコードする核酸を含む発現カセットが、本明細書において提供される。本明細書で使用される場合、「発現カセット」とは、生物学的に有用な核酸配列と、核酸配列(例えば、タンパク質、酵素、又は他の有用な遺伝子産物、mRNAなどをコードする遺伝子cDNA)及びその遺伝子産物の転写、翻訳、及び/又は発現を指示又は調節する、それと操作可能に連結された調節配列と、を含む、核酸分子を指す。本明細書で使用される場合、「操作可能に連結された」配列は、核酸配列と連続又は非連続である調節配列(要素とも称される)及びトランス又はシス核酸配列で作用する調節配列の両方を含む。かかる調節配列は、典型的には、例えば

、プロモーター、エンハンサー、転写因子、転写終結因子、イントロン、翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）、スライシング及びポリアデニル化配列などの効率的なRNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化する配列、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHP）翻訳後調節要素（WPRE）、及びTATAシグナルのうちの一つ以上を含む。発現カセットは、他の要素の中で、遺伝子配列の上流（5'～）の調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどの一つ以上、及びエンハンサー、又は遺伝子配列の下流（3'～）の調節配列、例えば、ポリアデニル化部位を含む3'非翻訳領域（3'UTR）のうちの一つ以上を含み得る。ある特定の実施形態では、制御性配列は、遺伝子産物の核酸配列と操作可能に連結され、制御性配列は、介在する核酸配列、すなわち、5'非翻訳領域（5'UTR）によって、遺伝子産物の核酸配列から分離される。ある特定の実施形態では、発現カセットは、1つ以上の遺伝子産物の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、モノシストロン性又はバイシストロン性発現カセットであり得る。他の実施形態では、「導入遺伝子」という用語は、標的細胞に挿入される外因性供給源からの一つ以上のDNA配列を指す。

#### 【0038】

一実施形態では、発現カセットは、GLP-1構築物コード配列（例えば、GLP-1融合タンパク質のコード配列）、プロモーターを含む核酸分子を指し、それらのための他の調節配列を含み得、このカセットは、遺伝子要素に操作され得、かつ/又はウイルスベクターのカプシド（例えば、ウイルス粒子）にパッケージングされ得る。典型的に、ウイルスベクターを産生するためのかかる発現カセットは、ウイルスゲノム（及び「ベクターゲノム」と称される）のパッケージングシグナルに隣接する本明細書に記載のGLP-1構築物配列と、本明細書に記載のものなどの他の発現制御配列とを含む。発現制御配列のうちの一つ以上は、例えば、本明細書に記載されるように、コドン最適化を含む当該技術分野で既知の技術を使用して特定の種に対して最適化することができる。

#### 【0039】

ある特定の実施形態では、発現カセットは、構成的プロモーターを含む。別の実施形態では、CB7が使用される。CB7は、サイトメガロウイルスエンハンサー要素を有するニワトリアクチンプロモーターである。いくつかの実施形態では、CB7プロモーターは、配列番号33の核酸配列を有する。一実施形態では、プロモーターは、CMVプロモーターである。いくつかの実施形態では、CMVプロモーターは、配列番号27の核酸配列である。

#### 【0040】

一実施形態では、プロモーターは、誘導性遺伝子発現系に含まれる。誘導性遺伝子調節/発現系は、少なくとも以下の成分、本明細書に記載のGLP-1融合タンパク質をコードする導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター（調節可能なプロモーターとも称される）、活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、及びジンクフィンガーホメオドメイン結合部位（複数可）を含む。他の実施形態では、本明細書に更に記載されるように、追加の成分が発現系に含まれ得る。例示的な誘導性発現系の設計を示すプラスミドを、図4に示す。

#### 【0041】

系は、GLP-1融合タンパク質のコード配列の上流にプロモーターを含む。CMV及びCB7プロモーターなどの本明細書に記載のプロモーターが、使用され得る。一実施形態では、プロモーターは、配列番号27に示されるようなCMVプロモーターである。一実施形態では、プロモーターは、12個の反復コピーのZFHD1に対する結合部位及びIL2最小プロモーターを含む、ユビキタス誘導性プロモーターZ12Iである。例えば、Chen et al, Hum Gene Ther Methods. 2013 Aug; 24(4): 270-278を参照されたい（本明細書に組み込まれる）。

#### 【0042】

発現系は、活性化ドメインを含み、これは、好ましくは、DNA結合ドメインの上流に位置する。一実施形態では、活性化ドメインは、NF-カッパBのp65サブユニットが

らのカルボキシ末端と、FKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメインとの融合である。一実施形態では、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-カッパBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメインである。一実施形態では、FRBドメインは、配列番号24に示されるアミノ酸配列を有する。一実施形態では、FRBドメインは、配列番号23の核酸配列によってコードされる配列番号24に示されるアミノ酸配列を有する。一実施形態では、p65サブユニットは、配列番号26に示される配列を有する。一実施形態では、p65サブユニットは、配列番号25の核酸配列によってコードされる配列番号26に示される配列を有する。

10

## 【0043】

誘導系は、融合タンパク質のコード配列を含む単一のベクター、又は2ベクター系に含まれ得る。GLP1融合タンパク質を組み込んだ2ベクター(図6A)及び1ベクター(図6B及び図7A)系の例は、本明細書に記載されている。

## 【0044】

一実施形態では、トランス活性化ドメインとDNA結合ドメインとの間にリンカーがあり、リンカーは、F2A又はIRESであり得る。一実施形態では、リンカーは、IRES又は2Aペプチドから選択される。一実施形態では、リンカーは、切断可能な2Aペプチドである。一実施形態では、リンカーは、配列番号21のアミノ酸配列を含むGT2A\_\_V1ペプチドを含む。一実施形態では、リンカーは、配列番号22のアミノ酸配列を含むGT2A\_\_V2ペプチドを含む。一実施形態では、2Aペプチドは、単一のベクター系を可能にするために、パッケージング限度を増加させるように選択される。

20

## 【0045】

DNA結合ドメインは、最大3つのコピーのFK506結合タンパク質(FKBP)に接合されたジンクフィンガーホメオドメイン1(ZFHD1)のDNA結合融合物からなる。誘導剤、例えばラパマイシンなどのラパログの存在下で、DNA結合ドメイン及び活性化ドメインは、それらのFKBP及びFRBドメインの相互作用を介して二量体化され、導入遺伝子の転写活性化をもたらす。いくつかの実施形態では、ZFHD1は、GT2A又はIRESとともにフレーム内に含まれる。一実施形態では、ZFHD1は、配列番号29に示される配列を有する。一実施形態では、ZFHD1は、配列番号28の核酸配列によってコードされる、配列番号28の配列を有する。

30

## 【0046】

発現系は、1、2、又は3個のコピーのFKBP配列を有するように設計される。これらは、本明細書では、FKBPサブユニットと称される。一実施形態では、サブユニットは、組換えを最小限にするために、同じタンパク質を発現するように設計されるが、互いに異なる核酸を有するように設計される。例えば、配列番号30は、FKBPの3つの「揺らいだ」コード配列を提供し、これらの各々は、配列番号31:

G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R  
D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y  
A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E に示される配列をコードする

40

## 【0047】

発現系は、ジンクフィンガーホメオドメイン結合部位を更に含む。核酸分子は、ZFHD1に対して少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12個の結合部位を含む。一実施形態では、発現系は、8個のジンクフィンガーホメオドメイン結合部位(結合パートナー)(8XZFHD)を含む。しかしながら、本発明は、2~約12個のコピーのジンクフィンガー結合部位を有する発現系を包含する。単一コピーのZFHD結合部位の一例は、a a t g a t g g g c g c t c g a g t (配列番号32)である。

## 【0048】

50

いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーホメオドメイン結合部位の下流に最小 I L 2 プロモーターがある。例示的な I L 2 プロモーターは、配列番号 1 0 に示される。

【 0 0 4 9 】

かかる誘導系は、当該技術分野で既知であり、例えば、Rivera et al, A humanized system for pharmacologic control of gene expression, Nature Medicine volume 2, pages 1028 - 1032 (September 1996) 及び Rivera et al, Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer, Blood, 15 February 2005, volume 105, number 4 によって記載される、例えば、ラパマイシン誘導系を含み、これらの両方は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、誘導性遺伝子発現系は、CMVプロモーターを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-カッパBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン、GT2Aペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、8XZFHD、及び最小sIL2プロモーターである。これらの配列は、GLP-1融合タンパク質のコード配列、及び任意選択的に他の調節配列に加えらる。

10

【 0 0 5 0 】

プロモーターに加えて、発現カセット及び/又はベクターは、好適な転写開始配列、終結配列、エンハンサー配列、スプライシング及びポリアデニル化(ポリA)シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化させる配列、翻訳効率を高める配列(すなわち、コザックコンセンサス配列)、タンパク質の安定性を増強させる配列、及び必要に応じて、コードされた産物の分泌を増強させる配列を含み得る。好適なポリA配列の例としては、例えば、SV40、ウシ成長ホルモン(bGH)、ヒト成長ホルモン(hGH)、SV40、ウサギ-グロビン(ウサギグロビンポリA; RGBとも称される)、修飾RGB(mRGB)、及びTKポリAが挙げられる。好適なエンハンサーの例としては、例えば、とりわけアルファフェトタンパク質エンハンサー、TTR最小プロモーター/エンハンサー、LSP(TH結合グロブリンプロモーター/アルファ1-マイクログロブリン/ピクニンエンハンサー)が挙げられる。一実施形態では、ポリAは、ウサギグロビンポリAである。

20

30

【 0 0 5 1 】

これらの制御配列は、GLP-1構築物配列に「操作可能に連結されている」。本明細書で使用される場合、「操作可能に連結された」という用語は、目的の遺伝子に連続している発現制御配列、及びトランスで又は離れて作用して目的の遺伝子を制御する発現制御配列の両方を指す。

【 0 0 5 2 】

一実施形態では、5' ITR、CB7プロモーター、ニワトリベータ-アクチンイントロン、配列番号14の融合タンパク質のコード配列、ウサギグロビンポリA、及び3' ITRを含むrAAVが、提供される。別の実施形態では、rAAVは、CMVプロモーターを含むポリヌクレオチドを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-カッパBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン、GT2Aペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、8XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号14のGLP-1融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAである。

40

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、CB7プロモーター、ニワトリベータ-アクチンイントロン、配列番号14の融合タンパク質のコード配列、及びウサギグロビンポリAを含むポリヌクレオチ

50

ドを含む発現カセットが提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号34に見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号34、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5'及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、提供される。

**【0054】**

別の実施形態では、CB7プロモーター、ニワトリベータ-アクチンイントロン、配列番号37の融合タンパク質のコード配列、及びウサギグロビンポリAを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットが、提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号35に見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号35、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5'及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、提供される。

10

**【0055】**

別の実施形態では、CMVプロモーター、ヒト由来のNF-カッパBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン、GT2Aペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、8XZFHD、最小IL2プロモーター、配列番号14のGLP-1融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットが、提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号38に見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号38、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5'及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、提供される。

20

**【0056】**

別の実施形態では、CMVプロモーター、ヒト又はアカゲザル由来のNF-カッパBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒト又はアカゲザルFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン、GT2Aペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、8XZFHD、最小IL2プロモーター、配列番号37のGLP-1融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットが、提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号39に見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号39、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5'及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、提供される。

30

40

**【0057】**

別の実施形態では、Z12Iプロモーター(12個のZFHD1部位及び最小IL2プロモーターを含む)、配列番号37のGLP-1融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含む発現カセットが、提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号40に見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号40、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5'及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、提供される。CMVプロモーター、

50

キメライントロン、ヒト又はアカゲザル（又はその一部）由来のNF - カップBのp65サブユニットに融合されたヒト又はアカゲザルFKBP12 - ラパマイシン関連タンパク質（FRAP）のFKBP12 - ラパマイシン結合（FRB）ドメイン、IRES又は2Aペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、8XZFHD、及びポリA配列を含むポリヌクレオチドを含む第2の発現カセットが、提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号41に見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号41、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5'及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、

10

#### 【0058】

##### ウイルスベクター

別の態様では、本明細書に記載の発現カセットを含むウイルスベクターが、提供される。本明細書に記載のウイルスベクターのある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ウイルスベクター又は組換えAAV（rAAV）である。本明細書で使用される場合の「組換えAAV」又は「rAAV」という用語は、天然に存在するアデノ随伴ウイルス、当業者に利用可能な、及び/又は本明細書に記載の組成物（複数可）及び方法（複数可）の観点において利用可能なアデノ随伴ウイルス、並びに人工AAVを指す。アデノ随伴ウイルス（AAV）ウイルスベクターは、AAVタンパク質カプシドを有するAAV DNase耐性粒子であり、その中にパッケージされた発現カセットは、標的細胞に送達するためのAAV逆位末端反復配列（ITR）に隣接している（併せて「ベクターゲノム」と称される）。AAVカプシドは、60個のカプシド（cap）タンパク質サブユニット、VP1、VP2、及びVP3で構成され、選択されるAAVに応じて、およそ1:1:10~1:1:20の比で二十面体対称に配置される。上に特定されたAAVウイルスベクターのカプシドの供給源として、様々なAAVが選択され得る。一実施形態では、AAVカプシドは、AAVrh91カプシド又はそのバリエーションである。ある特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、rAAVベクターの名称で「AAV」という用語の後の数値又は数値と文字との組み合わせによって指定される。特に明記しない限り、本明細書に記載のAAVカプシド、ITR、及び他の選択されるAAV成分は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37、AAVrh32.33、AAVanc80、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh74、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAVhu.37、AAVrh.64R1、及びAAVhu68として特定されたAAVを含むが、これらに限定されない任意のAAVの中から容易に選択され得る。例えば、米国特許出願公開第2007-0036760-A1号、米国特許出願公開第2009-0197338-A1号、EP1310571を参照されたい。WO2003/042397（AAV7及び他のサルAAV）、米国特許第7790449号及び米国特許第7282199号（AAV8）、WO2005/033321及びUS7,906,111（AAV9）、並びにWO2006/110689、及びWO2003/042397（rh.10）、WO2005/033321、WO2018/160582（AAVhu68）も参照されたく、これらは参照により本明細書に組み込まれる。他の好適なAAVには、AAVrh90[2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30273]、AAVrh91[2020年4月28日に出願された、PCT/US20/030266、2020年11月5日に公開された現在の公開WO2020/223231]AAVrh92、AAVrh93、AAVrh91.93[2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30281]が含まれるが、これらに限定されず、これらは参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、AAVは、rh91である。他の好適なAAVには、2019年10月21日に出願された米国仮特許出願第62/924,112号、及び2020年5月15日に出願された米国仮

20

30

40

50

特許出願第 63 / 025 , 753 号に記載される AAV3B バリエントが含まれ、そこには、AAV3B . AR2 . 01、AAV3B . AR2 . 02、AAV3B . AR2 . 03、AAV3B . AR2 . 04、AAV3B . AR2 . 05、AAV3B . AR2 . 06、AAV3B . AR2 . 07、AAV3B . AR2 . 08、AAV3B . AR2 . 10、AAV3B . AR2 . 11、AAV3B . AR2 . 12、AAV3B . AR2 . 13、AAV3B . AR2 . 14、AAV3B . AR2 . 15、AAV3B . AR2 . 16、又は AAV3B . AR2 . 17 が記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。また、2021年8月13日に出願された国際特許出願第 PCT / US 21 / 45945 号、2020年8月14日に出願された米国仮特許出願第 63 / 065 , 616 号、及び 2020年11月4日に出願された米国仮特許出願第 63 / 109 , 734 号を参照にされたく、それらは全て参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。これらの文書はまた、rAAV を生成するために選択され得る他の AAV カプシドについても記載されており、参照により組み込まれる。ヒト又は非ヒト霊長類 (NHP) から単離又は操作され、十分に特徴付けられた AAV のうち、ヒト AAV2 は、遺伝子導入ベクターとして開発された最初の AAV であり、種々の標的組織及び動物モデルにおける効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。

10

#### 【0059】

本明細書で使用される場合、AAV に関して、「バリエント」という用語は、既知の AAV 配列に由来する任意の AAV 配列を意味し、保存的アミノ酸置換を有する AAV 配列、及びアミノ酸配列又は核酸配列にわたって少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 又はそれ以上の配列同一性を共有する AAV 配列を含む。別の実施形態では、AAV カプシドは、任意の記載の、又は既知の AAV カプシド配列から最大約 10% のバリエーションを含み得るバリエントを含む。すなわち、AAV カプシドは、本明細書において提供され、かつ / 又は当該技術分野で既知の AAV カプシドと、約 90% の同一性 ~ 約 99.9% の同一性、約 95% ~ 約 99% の同一性、又は約 97% ~ 約 98% の同一性を共有する。一実施形態では、AAV カプシドは、AAV カプシドと少なくとも 95% の同一性を共有する。AAV カプシドの同一性パーセントを決定する場合、比較は、可変タンパク質 (例えば、vp1、vp2、又は vp3) のうちのいずれかにわたって行われ得る。

20

#### 【0060】

一実施形態では、ウイルスペクターは、AAV8 のカプシド又はその機能的バリエントを有する rAAV である。一実施形態では、ウイルスペクターは、AAVrh91 のカプシド又はその機能的バリエントを有する rAAV である。一実施形態では、ウイルスペクターは、AAV3 . AR . 2 . 12 のカプシド又はその機能的バリエントを有する rAAV である。一実施形態では、ウイルスペクターは、AAV9、AAVrh64R1、AAVhu37、又は AAVrh10 から選択されるカプシドを有する rAAV である。

30

#### 【0061】

ある特定の実施形態では、AAV は、rh91 である。AAVrh91 カプシドをコードする核酸配列は、配列番号 18 に提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号 20 に提供される。AAVrh91 (配列番号 20) の vp1、vp2、及び vp3 のうちの少なくとも 1 つを含む rAAV が、本明細書において提供される。また、AAVrh91 (配列番号 18) の vp1、vp2、及び vp3 のうちの少なくとも 1 つによってコードされる AAV カプシドを含む rAAV も、本明細書において提供される。なお別の実施形態では、AAVrh91 アミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号 19 において提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号 20 において提供される。また、AAVrh91 (配列番号 19) の vp1、vp2、及び vp3 のうちの少なくとも 1 つによってコードされる AAV カプシドを含む rAAV も、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、vp1、vp2、及び / 又は vp3 は、AAVrh91 (配列番号 20) の全長カプシドタンパク質である。他の実施形態では、vp1、vp2、及び / 又は vp3 は、N 末端及び / 又は C 末端の切断 (例えば、約 1 ~ 約 10 個のアミノ酸の切断

40

50

)を有する。

【0062】

ある特定の実施形態では、AAVrh91カプシドは、以下のうちの1つ以上を特徴とする：(1)AAVrh91カプシドタンパク質であって、配列番号20の1~736の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるvp1タンパク質、配列番号18から産生されるvp1タンパク質、又は配列番号20の1~736の予測アミノ酸配列をコードする配列番号18に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質から選択されるAAVrh91 vp1タンパク質の異種集合体、配列番号20の少なくとも約138~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるvp2タンパク質、配列番号18の少なくともヌクレオチド412~2208を含む配列から産生されるvp2タンパク質、又は配列番号20の少なくとも約138~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号18の少なくともヌクレオチド412~2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質から選択されるAAVrh91 vp2タンパク質の異種集合体、配列番号20の少なくとも約203~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現から産生されるvp3タンパク質、配列番号18の少なくともヌクレオチド607~2208を含む配列から産生されるvp3タンパク質、又は配列番号20の少なくとも約203~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号18の少なくともヌクレオチド607~2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質から選択されるAAVrh91 vp3タンパク質の異種集合体を含む、AAVrh91カプシドタンパク質、並びに/あるいは(2)配列番号20のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集合体、配列番号20の少なくとも約138~736のアミノ酸のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集合体、及び配列番号20の少なくとも約203~736のアミノ酸をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集合体であって、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質が、配列番号20のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸の変化をもたらす、vp1タンパク質の異種集合体、vp2タンパク質の異種集合体、vp3タンパク質の異種集合体、並びに(B)AAVrh91カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復配列、及び宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と操作可能に連結される産物をコードする非AAV核酸配列を含む核酸分子を含む、ベクターゲノム。

10

20

30

【0063】

ある特定の実施形態では、AAVrh91カプシドは、以下のうちの1つ以上を特徴とする：(1)AAVrh91カプシドタンパク質であって、配列番号20の1~736の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるvp1タンパク質、配列番号19から産生されるvp1タンパク質、又は配列番号20の1~736の予測アミノ酸配列をコードする配列番号19に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質から選択されるAAVrh91 vp1タンパク質の異種集合体、配列番号20の少なくとも約138~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるvp2タンパク質、配列番号19の少なくともヌクレオチド412~2208を含む配列から産生されるvp2タンパク質、又は配列番号20の少なくとも約138~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号19の少なくともヌクレオチド412~2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質から選択されるAAVrh91 vp2タンパク質の異種集合体、配列番号20の少なくとも約203~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現から産生されるvp3タンパク質、配列番号19の少なくともヌクレオチド607~2208を含む配列から産生されるvp3タンパク質、又は配列番号20の少なくとも約203~736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコード

40

50

する配列番号19の少なくともヌクレオチド607~2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質から選択されるAAVrh91 vp3タンパク質の異種集合体を含む、AAVrh91カプシドタンパク質、並びに/あるいは(2)配列番号20のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集合体、配列番号20の少なくとも約138~736のアミノ酸のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集合体、及び配列番号20の少なくとも約203~736のアミノ酸をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集合体であって、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質が、配列番号20のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸の変化をもたらす、vp1タンパク質の異種集合体、vp2タンパク質の異種集合体、vp3タンパク質の異種集合体ものうちの1つ以上を含むAAVrh91カプシド、並びに(B)AAVrh91カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復配列、及び宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と操作可能に連結される産物をコードする非AAV核酸配列を含む核酸分子を含む、ベクターゲノム。

10

【0064】

ある特定の実施形態では、AAVrh91のvp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質は、配列番号20のアスパラギン-グリシン対中に少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸変化をもたらす。配列番号20の数と比較して、N-G対N57、N383、及び/又はN512で高レベルの脱アミド化が、観察される。脱アミド化は、他の残基において観察されている。ある特定の実施形態では、AAVrh91は、例えば、典型的には10%未満で脱アミド化された他の残基を有し得、及び/又はリン酸化(例えば、存在する場合、約2~約30%、若しくは約2~約20%、若しくは約2~約10%の範囲)(例えば、S149で)、又は酸化(例えば、ほぼW22、ほぼM211、W247、M403、M435、M471、W478、W503、ほぼM537、ほぼM541、ほぼM559、ほぼM599、M635、及び/又はW695のうちの1つ以上で)を含む他の修飾を有し得る。任意選択的に、Wは、キヌレニンに酸化され得る。

20

30

【表1】

表 A-AAVrh91 脱アミド化

VP1 番号付けに基づく AAVrh91 脱アミド化	脱アミド化%
N57+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、又は90~100
N94+脱アミド化	2~15 又は 2~5
N303+脱アミド化	2~15 又は 5~10
N383+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、又は90~100
N497+脱アミド化	2~15 又は 5~10
N512+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、又は90~100
~N691+脱アミド化	2~15、2~10、又は5~10

40

【0065】

ある特定の実施形態では、AAVrh91カプシドは、トリプシン酵素を用いた質量分

50

析を使用して決定される場合、上記の表で特定された位置のうちの一つ以上で、以下に提供する範囲で修飾される。ある特定の実施形態では、一つ以上の位置、又はNに続くグリシンは、本明細書に記載されるように修飾されている。残基番号は、本明細書において提供される A A V r h 9 1 配列に基づく。配列番号 2 0 を参照されたい。

【 0 0 6 6 】

ある特定の実施形態では、A A V r h 9 1 カプシドは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 1 タンパク質の異種集合体、配列番号 2 0 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 2 タンパク質の異種集合体、及び配列番号 2 0 の少なくともアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 をコードする核酸配列の産物である v p 3 タンパク質の異種集合体を含む。

10

【 0 0 6 7 】

ある特定の実施形態では、修飾 A A V r h 9 1 の核酸配列は、天然 A A V r h 9 1 カプシドよりも低い脱アミド化を含むカプシドを有する変異体 r A A V を生成するために使用され得る。かかる変異体 r A A V は、免疫原性が低減しており、かつ / 又は貯蔵、特に懸濁形態での貯蔵の際の安定性を増加させ得る。

【 0 0 6 8 】

一態様では、組換え A A V ( r A A V ) が、提供される。r A A V は、アデノ随伴ウイルス r h 9 1 由来の A A V カプシドと、A A V カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムとを含み、当該ベクターゲノムは、A A V 逆位末端反復 ( I T R )、配列番号 1 4 の G L P - 1 受容体アゴニストのコード配列、及び G L P - 1 受容体アゴニストの発現を指示する調節配列を含む。

20

【 0 0 6 9 】

ある特定の実施形態では、A A V 6 8 カプシドは、更に、以下のうちの一つ以上を特徴とする。A A V h u 6 8 カプシドタンパク質は、配列番号 4 2 の 1 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される A A V h u 6 8 v p 1 タンパク質、配列番号 4 3 若しくは 4 4 から産生される v p 1 タンパク質、又は配列番号 4 2 の 1 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする配列番号 4 3 若しくは 4 4 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 1 タンパク質；配列番号 4 2 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される A A V h u 6 8 v p 2 タンパク質、配列番号 4 3 若しくは 4 4 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 1 1 を含む配列から産生される v p 2 タンパク質、又は配列番号 4 2 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする配列番号 4 3 若しくは 4 4 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 1 1 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 2 タンパク質、並びに / あるいは配列番号 4 2 の少なくとも約アミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される A A V h u 6 8 v p 3 タンパク質、配列番号 4 3 若しくは 4 4 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 1 1 を含む配列から産生される v p 3 タンパク質、又は配列番号 4 2 の少なくとも約アミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする配列番号 4 3 若しくは 4 4 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 1 1 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 3 タンパク質を含む。

30

40

【 0 0 7 0 】

追加的に、又は代替的に、任意選択的に、位置 1 5 7 にバリンを含む v p 1 タンパク質の異種集団、任意選択的に、位置 1 5 7 にバリンを含む v p 2 タンパク質の異種集団、及び v p 3 タンパク質の異種集団を含む A A V カプシドが提供され、少なくとも v p 1 タンパク質及び v p 2 タンパク質の亜集団は、位置 1 5 7 にバリンを含み、任意選択的に、配列番号 4 2 の v p 1 カプシドの番号付けに基づいて、位置 6 7 にグルタミン酸を更に含む。追加的に、又は代替的に、配列番号 4 2 のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 1 タンパク質の異種集団、配列番号 4 2 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 2 タンパク質の異種集団、及び配列番号 4 2 の少なくともアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 をコードする核酸配列の産物である v p

50

3タンパク質の異種集団を含むAAVhu68カプシドが提供され、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質は、アミノ酸修飾を有する亜集団を含む。

【0071】

AAVhu68のvp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質は、典型的には、配列番号42の全長vp1アミノ酸配列(アミノ酸1~736)をコードする同じ核酸配列によってコードされる代替的スプライシングバリエーションとして発現される。任意選択的に、vp1コード配列は、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質を発現させるために単独で使用される。代替的に、この配列は、vp1固有領域(約aa1~約aa137)及び/又はvp2固有領域(約aa1~約aa202)を有しない配列番号42のAAVhu68 vp3アミノ酸配列(約aa203~736)をコードする核酸配列、又はそれに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA(配列番号43若しくは44の約nt607~約nt2211)、又は配列番号42のaa203~736をコードする配列番号43若しくは44に対して少なくとも70%~少なくとも99%(例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%)同一の配列のうちの一つ以上と共発現され得る。追加的に、又は代替的に、vp1コード配列及び/又はvp2コード配列は、vp1固有領域(約aa1~約137)を有しない配列番号42のAAVhu68 vp2アミノ酸配列(約aa138~736)をコードする核酸配列、又はそれに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA(例えば、配列番号43若しくは44のnt412~2212)、又は配列番号42の約aa138~736をコードする配列番号43若しくは44と少なくとも70%~少なくとも99%(例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%)同一の配列と共発現され得る。

10

20

【0072】

本明細書に記載されるように、rAAVhu68は、配列番号42のvp1アミノ酸配列をコードするAAVhu68核酸、及び任意選択的に、追加の核酸配列、例えば、vp1固有領域及び/又はvp2固有領域を含まないvp3タンパク質をコードする配列、からカプシドを発現する産生系で産生されるrAAVhu68カプシドを有する。単一の核酸配列vp1を使用した産生から得られるrAAVhu68は、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質の異種集団を産生する。より具体的には、AAVhu68カプシドは、vp1タンパク質内、vp2タンパク質内、及びvp3タンパク質内に亜集団を含有し、配列番号42の予測アミノ酸残基からの修飾を有する。これらの亜集団は、最低限、脱アミド化アスパラギン(N又はAsn)残基を含む。例えば、アスパラギン-グリシン対におけるアスパラギンは、高度に脱アミド化される。

30

【0073】

一実施形態では、AAVhu68 vp1核酸配列は、配列番号43若しくは44の配列、又はそれに相補的な鎖、例えば、対応するmRNA若しくはtRNAを有する。ある特定の実施形態では、vp2タンパク質及び/又はvp3タンパク質は、追加的又は代替的に、例えば、選択された発現系においてvpタンパク質の比率を変化させるために、vp1とは異なる核酸配列から発現され得る。ある特定の実施形態では、vp1固有領域(約aa1~約aa137)及び/又はvp2固有領域(約aa1~約aa202)、又はそれらに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA(配列番号43若しくは44の約nt607~約nt2211)を含まない、配列番号42のAAVhu68 vp3アミノ酸配列(約aa203~736)をコードする核酸配列も、提供される。ある特定の実施形態では、vp1固有領域(約aa1~約137)、又はそれらに相補的な鎖、対応するmRNA若しくはtRNA(配列番号43若しくは44のnt412~2211)を含まない、配列番号42のAAVhu68 vp2アミノ酸配列(約aa138~736)をコードする核酸配列も、提供される。

40

【0074】

しかしながら、配列番号42のアミノ酸配列をコードする他の核酸配列は、rAAVhu

50

u 6 8 カプシドの産生に使用するために選択され得る。ある特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 4 3 若しくは 4 4 の核酸配列、又は配列番号 4 2 をコードする配列番号 4 3 若しくは 4 4 と少なくとも 7 0 % ~ 9 9 % 同一、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を有する。ある特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 4 3 若しくは 4 4 の核酸配列、又は配列番号 4 3 若しくは 4 4 の約 n t 4 1 2 ~ 約 n t 2 2 1 1 と少なくとも 7 0 % ~ 9 9 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を有し、配列番号 4 2 の v p 2 カプシドタンパク質 ( 約 a a 1 3 8 ~ 7 3 6 ) をコードする。ある特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 4 3 若しくは 4 4 の約 n t 6 0 7 ~ 約 n t 2 2 1 1 の核酸配列、又は n t 配列番号 4 3 若しくは 4 4 の約 n t 6 0 7 ~ 約 n t 2 2 1 1 と少なくとも 7 0 % ~ 9 9 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を有し、配列番号 4 2 の v p 3 カプシドタンパク質 ( 約 a a 2 0 3 ~ 7 3 6 ) をコードする。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

予測された AAVHu68[配列番号 42]に基づく脱アミド化	AAVhu68 カプシドの VP1/VP2/VP3 タンパク質に基づく平均%	
脱アミド化残基+1(隣接 AA)	広い範囲のパーセンテージ(%)	狭い範囲(%)
N57 (N-G)	78~100%	80~100、85~97
N66 (N-E)	0~5	0、1~5
N94 (N-H)	0~15、	0、1~15、5~12、8
N113 (N-L)	0~2	0、1~2
約 N253 (N-N)	10~25	15~22
Q259 (Q-I)	8~42	10~40、20~35
約 N270 (N-D)	12~30	15~28
約 N304 (N-N)(位置 303 も N)	0~5	1~4
N319 (N-I)	0~5	0、1~5、1~3
N329* (N-G)*(位置 328 も N)	65~100	70~95、85~95、80~100、85~100、
N336 (N-N)	0~100	0、1~10、25~100、30~100、30~95
約 N409 (N-N)	15~30	20~25
N452 (N-G)	75~100	80~100、90~100、95~100、
N477 (N-Y)	0~8	0、1~5

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

予測された AAVHu68 [配列番号 42] に基づく脱アミド化	AAVhu68 カプシドの VP1/VP2/VP3 タンパク質に基づく平均%	
脱アミド化残基+1 (隣接 AA)	広い範囲のパーセンテージ (%)	狭い範囲 (%)
N512 (N-G)	65~100	70~95、85~95、80~100、85~100、
約 N515 (N-S)	0~25	0、1~10、5~25、15~25
約 Q599 (Asn-Q-Gly)	1~20	2~20、5~15
N628 (N-F)	0~10	0、1~10、2~8
N651 (N-T)	0~3	0、1~3
N663 (N-K)	0~5	0、1~5、2~4
N709 (N-N)	0~25	0、1~22、15~25
N735	0~40	0、1~35、5~50、20~35

10

20

## 【0075】

ある特定の実施形態では、AAVhu68 カプシドが、配列番号 42 のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、少なくとも 45% の N 残基が、位置 N57、N329、N452、及び/又は N512 のうちの少なくとも 1 つで脱アミド化されているカプシドタンパク質を有することを特徴とする。ある特定の実施形態では、これらの N-G の位置 (すなわち、配列番号 42 のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、N57、N329、N452、及び/又は N512) のうちの 1 つ以上で、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、又は少なくとも約 90% の N 残基が脱アミド化されている。これら及び他の実施形態では、AAVhu68 カプシドが、配列番号 42 のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、位置 N94、N253、N270、N304、N409、N477、及び/又は Q599 のうちの 1 つ以上で、約 1% ~ 約 20% の N 残基が脱アミド化を有する、タンパク質の集団を有することを更に特徴とする。ある特定の実施形態では、AAVhu68 は、配列番号 42 のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、位置 N35、N57、N66、N94、N113、N252、N253、Q259、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N329、N336、N409、N410、N452、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709、N735 のうちの 1 つ以上、又はそれらの組み合わせで脱アミド化されている、vp1 タンパク質、vp2 タンパク質、及び/又は vp3 タンパク質の少なくとも亜集団を含む。ある特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、1 つ以上のアミド化アミノ酸を有し得る。

30

40

## 【0076】

別の実施形態では、AAVhu68 カプシド及びベクターゲノムを有する組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) が、提供され、(a) AAVhu68 カプシドは、AAVhu68 vp1 タンパク質の異種集団、AAVhu68 vp2 タンパク質の異種集団、及び AAVhu68 vp3 タンパク質の異種集団を含み、異種 AAVhu68 vp1、

50

AAVhu68 vp2、及びAAVhu68 vp3タンパク質は、質量分析を使用して決定される場合、配列番号42のN57、N329、N452、N512のうちの上記2つ以上において、アスパラギン - グリシン対中の少なくとも2つのアスパラギン(N)中の50% ~ 100%の脱アミド化を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸の変化をもたらす、脱アミド化アスパラギンが、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、相互転換するアスパル酸 / イソアスパル酸対、又はそれらの組み合わせに脱アミド化され、AAVhu68カプシドは、

配列番号42の番号付けに基づいて、vp1タンパク質のN57位に位置するアスパラギン - グリシン対中の少なくとも65%のアスパラギン(N)が、脱アミド化されること

10

、  
配列番号42のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質のN329位でアスパラギン - グリシン対中の少なくとも75%のNが、脱アミド化されること、

配列番号42のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質のN452位でアスパラギン - グリシン対中の少なくとも50%のNが、脱アミド化されること、並びに / 又は

配列番号42のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質のN512位でアスパラギン - グリシン対中の少なくとも75%のNが、脱アミド化されること、

20

AAVhu68カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復配列と、標的細胞中でGLP-1融合物の発現を指示する配列と操作可能に連結される、本明細書に記載のGLP-1融合物をコードする非AAV核酸配列と、を含む、ベクターゲノムのうちの1つ以上を有する亜集団を更に含む。

#### 【0077】

一実施形態では、rAAVは、scAAVである。略称「sc」は、自己相補性 (self-complementary) を指す。「自己相補的AAV」は、組換えAAV核酸配列によって担持されるコード領域が、分子内二本鎖DNA鋳型を形成するように設計されている発現カセットを有するプラスミド又はベクターを指す。感染時には、第2の鎖の細胞媒介性合成を待つのではなく、scAAVの2つの相補的な片割れが会合して、即時の複製及び転写に備えのある1つの二本鎖DNA(dsDNA)ユニットを形成するであろう。例えば、D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248 - 1254を参照されたい。自己相補的AAVは、例えば、米国特許第6,596,535号、同第7,125,717号、及び同第7,456,683号に記載されており、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0078】

一実施形態では、本明細書に記載のGLP-1構築物をコードする核酸配列は、任意の好適な遺伝子要素、例えば、裸のDNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、RNA分子 (例えば、mRNA)、エピソームなどに操作され、それらは、例えば、パッケージング宿主細胞中でDNA又はRNA、ウイルスベクターを担持するナノ粒子を生成するために、及び / 又は対象における宿主細胞への送達のために、その上に担持されるGLP-1配列を宿主細胞へと導入する。一実施形態では、遺伝子要素は、プラスミドである。選択される遺伝子要素は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングベレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合を含む任意の好適な方法によって送達され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合

40

50

成技法を含む。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照されたい。

【0079】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、ベクター（例えば、組換えAAV又はrAAV）が産生プラスミドから産生されるパッケージング細胞株を指し得る。代替的に、「宿主細胞」という用語は、本明細書に記載の遺伝子産物の発現が所望される任意の標的細胞を指し得る。したがって、「宿主細胞」は、任意の手段、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、形質転換、ウイルス感染、トランスフェクション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合によって細胞に導入された外因性又は異種DNAを含む原核細胞又は真核細胞（例えば、細菌性細胞、ヒト細胞、又は昆虫細胞）を指す。本明細書のある特定の実施形態では、「宿主細胞」という用語は、本明細書に記載の組成物のインビトロ評価のための様々な哺乳動物種の細胞の培養物を指す。本明細書の他の実施形態では、「宿主細胞」という用語は、ウイルスベクター又は組換えウイルスを生成及びパッケージングするために用いられる細胞を指す。更なる実施形態では、「宿主細胞」という用語は、腸細胞、小腸細胞、膵臓細胞、肝臓細胞である。

10

【0080】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」という用語は、異種核酸配列又はタンパク質の発現が所望される任意の標的細胞を指す。ある特定の実施形態では、標的細胞は、肝臓細胞である。他の実施形態では、標的細胞は、筋細胞である。

20

【0081】

一実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含むrAAVが提供され、発現カセットは、CMVプロモーターを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF- $\kappa$ Bのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン、GT2A\_\_V1ペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、8XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号14のGLP-1融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含む。別の実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含むrAAVが、提供され、発現カセットは、CMVプロモーターを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF- $\kappa$ Bのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメイン、GT2A\_\_V2ペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、8XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号14のGLP-1融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAである。

30

【0082】

発現カセットをAAVウイルス粒子にパッケージするのに必要とされる最小配列は、AAV5'及び3' ITRであり、それらは、カプシドと同じAAV起源のものであり得るか、又は異なるAAV起源のものであり得る(AAV疑似型を生成するため)。一実施形態では、AAV2からのITR配列、又はその欠失型バージョン(ITR)が、利便性のため、及び規制承認を加速させるために使用される。しかしながら、他のAAV供給源からのITRが選択され得る。好ましくは、ITRの供給源は、製造のためにトランスで提供されるRepタンパク質の供給源と同じである。典型的には、AAVベクターのための発現カセットは、AAV 5' ITR、GLP-1融合タンパク質コード配列、及び任意の調節配列、並びにAAV 3' ITRを含む。しかしながら、これらの要素の他の構成も好適であり得る。D配列及び末端分離部位(trs)が欠失している、5' ITRの短縮バージョン(ITRと称される)が記載されている。他の実施形態では、全長AAV 5'及び3' ITRが使用される。

50

## 【 0 0 8 3 】

発現カセットをビリオンにパッケージングするために、ITRは、遺伝子と同じ構築物中のシスに必要とされる唯一のAAV構成要素である。一実施形態では、複製(rep)及び/又はカプシド(cap)のコード配列は、AAVゲノムから除去され、トランスで供給されるか、又はAAVベクターを生成するためにパッケージング細胞株によって供給される。例えば、上述のように、疑似型AAVは、AAVカプシドの供給源とは異なる供給源からのITRを含み得る。一実施形態では、キメラAAVカプシドが、利用され得る。更に他のAAV成分が、選択され得る。かかるAAV配列の供給源は、本明細書に記載されており、学術的、商業的、又は公的な供給源(例えば、American Type Culture Collection、Manassas, VA)から単離又は入手され得る。AAV配列は、文献又はデータベース(例えば、GenBank(登録商標)、PubMed(登録商標)など)で利用可能であるような公開された配列を参照することによって、合成又は他の好適な手段を通して入手され得る。

10

## 【 0 0 8 4 】

対象に送達するのに好適なAAVウイルスベクターを生成し、単離するための方法は、当該技術分野で既知である。例えば、米国特許第7790449号、米国特許第7282199号、WO2003/042397、WO2005/033321、WO2006/110689、及びUS7588772 B2]を参照されたい。1つの系では、プロデューサー細胞株は、ITRに隣接する導入遺伝子をコードする構築物、並びにrep及びcapをコードする構築物で一過性にトランスフェクトされる。第2の系では、rep及びcapを安定的に供給するパッケージング細胞株は、ITRに隣接する導入遺伝子をコードする構築物(複数可)で一過性にトランスフェクトされる。これらの系の各々では、AAVビリオンは、ヘルパーアデノウイルス又はヘルペスウイルスへの感染にตอบสนองして産生され、rAAVを汚染ウイルスから分離することを必要とする。より最近では、AAVを復元するためにヘルパーウイルスへの感染を必要としない系が開発されており、必要なヘルパー機能(すなわち、アデノウイルスE1、E2a、VA、及びE4、又はヘルペスウイルスUL5、UL8、UL52、及びUL29、並びにヘルペスウイルスポリメラーゼ)もまた、トランスで系によって供給される。これらのより新しい系では、ヘルパー機能は、必要とされるヘルパー機能をコードする構築物での細胞の一過性トランスフェクションによって供給され得るか、又は細胞は、ヘルパー機能をコードする遺伝子を安定的に含むように操作され得、その発現は、転写レベル又は転写後レベルで制御され得る。更に別の系では、ITRに隣接する導入遺伝子及びrep/cap遺伝子は、バキュロウイルス由来のベクターによる感染によって、昆虫細胞に導入される。これらの産生系に関するレビューについては、概して、例えば、Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus associated virus hybrid for large-scale recombinant adenovirus production," Human Gene Therapy 20:922-929を参照されたい(その各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される)。これら及び他のAAV産生系を作製及び使用する方法はまた、以下の米国特許に記載されており、これらの各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる: 5,139,941、5,741,683、6,057,152、6,204,059、6,268,213、6,491,907、6,660,514、6,951,753、7,094,604、7,172,893、7,201,898、7,229,823、及び7,439,065。一般に、例えば、Grieger & Samulski, 2005, "Adenovirus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99:119-145、Buning et al., 2008, "Recent developments in adenovirus vector technology," J

20

30

40

50

. Gene Med. 10: 717 - 733、及び以下に引用される参考文献（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。本発明の任意の実施形態を構築するために使用される方法は、核酸操作における技術者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技術が挙げられる。例えば、Green and Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照されたい。同様に、rAAVピリオンを生成する方法は周知であり、好適な方法の選択は、本発明を限定するものではない。例えば、K. Fisher et al, (1993) J. Virol., 70: 520 - 532 及び米国特許第 5,478,745 号を参照されたい。

10

## 【0085】

本明細書に記載の rAAV は、内側にパッケージングされたベクターゲノムを有する選択されたカプシドを含む。ベクターゲノム（又は rAAV ゲノム）は、5' 及び 3' AAV 逆位末端反復 (ITR)、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列、及び宿主細胞のゲノムへの融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の挿入を指示する調節配列を含む。一実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号 16 に示される配列、又はそれと少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、若しくは少なくとも 99% の同一性を共有する配列である。

## 【0086】

20

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」は、ウイルス粒子を形成するパルボウイルス（例えば、rAAV）カプシドの内側にパッケージングされた核酸配列を指す。かかる核酸配列は、AAV 逆位末端反復配列 (ITR) を含む。本明細書の例では、ベクターゲノムは、少なくとも、5' から 3' へ、AAV 5' ITR、コード配列（複数可）（すなわち、導入遺伝子（複数可））、及び AAV 3' ITR を含む。AAV 2 からの ITR、カプシドとは異なる供給源 AAV、又は全長 ITR 以外が選択され得る。ある特定の実施形態では、ITR は、産生中の rep 機能又はトランス相補性 AAV を提供する AAV と同じ AAV 供給源由来である。更に、他の ITR、例えば、自己相補的 (scAAV) ITR が使用され得る。一本鎖 AAV 及び自己相補的 (sc) AAV の両方が rAAV に含まれる。導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、機能性 RNA 分子（例えば、miRNA、miRNA 阻害剤）、又は他の遺伝子産物をコードするベクター配列とは異種の核酸コード配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞中で導入遺伝子の転写、翻訳、及び/又は発現を可能にする様式で調節要素に作動可能に連結されている。ベクターゲノムの好適な成分が本明細書でより詳細に考察される。一例では、「ベクターゲノム」は、少なくとも、5' から 3' へと、ベクター特異的配列と、（標的配列においてその発現を指示する）調節制御配列に操作可能に連結された GLP-1 構築物をコードする核酸配列とを含み、ベクター特異的配列が、ベクターゲノムをウイルスベクターカプシド又はエンベロープタンパク質に特異的にパッケージングする末端反復配列であり得る。例えば、AAV 逆位末端反復は、AAV 及びある特定の他のパルボウイルスカプシドにパッケージングするために利用される。

30

40

## 【0087】

ベクターの AAV 配列は、典型的には、シス作用性 5' 及び 3' 逆位末端反復配列を含む（例えば、B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990) を参照されたい）。ITR 配列は、約 145 bp の長さである。好ましくは、ITR をコードする実質的に完全な配列が分子中で使用されるが、これらの配列のある程度の最小限の修飾は許容される。これらの ITR 配列を修飾する能力は、当業者の範囲内である。（例えば、Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) 及び K. F

50

isher et al., J. Virol., 70: 520 532 (1996) を参照されたい)。本発明で用いられるかかる分子の一例は、導入遺伝子を含む「シス作用性」プラスミドであり、選択された導入遺伝子配列及び関連する調節要素は、5'及び3' AAV ITR配列に隣接している。一実施形態では、ITRは、カプシドを供給するのとは異なるAAVからのものである。一実施形態では、AAV2からのITR配列。しかしながら、他のAAV供給源からのITRが選択され得る。D配列及び末端分離部位(trs)が欠失している、5' ITRの短縮バージョン( ITRと呼称される)が記載されている。ある特定の実施形態では、ベクターゲノムは、外部A要素が欠失している、130塩基対の短縮AAV2 ITRを含む。理論に拘束されることを望むものではないが、短縮されたITRは、内部(A')要素を鋳型として使用して、ベクターDNA増幅中に145塩基対の野生型長に戻されると考えられる。他の実施形態では、全長AAV5'及び3' ITRが使用される。ITRの供給源がAAV2からであり、AAVカプシドが別のAAV供給源からである場合、得られるベクターは、疑似型と呼称され得る。しかしながら、これらの要素の他の構成も好適であり得る。

10

#### 【0088】

任意選択的に、本明細書に記載のGLP-1構築物は、rAAV以外のウイルスベクターを介して送達され得る。かかる他のウイルスベクターは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなどを含むが、これらに限定されない、遺伝子療法に好適な任意のウイルスを含み得る。好適には、これらの他のベクターのうちの1つが生成される場合、それは、複製欠損ウイルスベクターとして産生される。

20

#### 【0089】

「複製欠損ウイルス」又は「ウイルスベクター」は、合成又は人工ウイルス粒子を指し、ここで、目的の遺伝子を含む発現カセットは、ウイルスカプシド又はエンベロープ中にパッケージングされ、同様にウイルスカプシド又はエンベロープ内にパッケージングされた任意のウイルスゲノム配列は、複製欠損である、すなわち、それらは、後代ビリオンを生成することができないが、標的細胞に感染する能力を保持する。一実施形態では、ウイルスベクターのゲノムは、複製に必要とされる酵素をコードする遺伝子を含まない(ゲノムは、人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要とされるシグナルに隣接する目的の導入遺伝子のみを含む「ガットレス(gutless)」であるように操作されることができ)が、これらの遺伝子は、産生中に供給され得る。したがって、それは、後代ビリオンによる複製及び感染が、複製に必要とされるウイルス酵素の存在下以外で生じることができないために、遺伝子療法における使用のために安全であると考えられる。

30

#### 【0090】

本明細書に記載のウイルスベクター構築物を含む組成物も、提供される。本明細書に記載の薬学的組成物は、任意の好適な経路又は異なる経路の組み合わせによって、それを必要とする対象に送達されるように設計される。肝臓への直接送達(任意選択的に静脈内、肝動脈を介して、又は移植によって)、経口、吸入、鼻腔内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮膚内、及び他の非経口投与経路。本明細書に記載のウイルスベクターは、単一の組成物又は複数の組成物で送達され得る。任意選択的に、2つ以上の異なるAAV、又は複数のウイルスが送達され得る[例えば、WO2011/126808及びWO2013/049493を参照されたい]。別の実施形態では、複数のウイルスは、異なる複製欠損ウイルス(例えば、AAV及びアデノウイルス)を含み得る。一実施形態では、投与は、筋肉内である。別の実施形態では、投与は、静脈内である。

40

#### 【0091】

複製欠損ウイルスは、遺伝子導入及び遺伝子療法用途で使用するための生理学的に許容される担体とともに製剤化することができる。AAVウイルスベクターの場合、ゲノムコピー(「GC」)の定量化は、製剤中に含有される用量の尺度として使用され得る。当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、本発明の複製欠損ウイルス組成物のゲノムコピー(GC)数を決定することができる。AAVのGC数滴定を行うための1つの方法は、以下の通りである。精製されたAAVベクター試料は、まずDNaseで処理され、非力

50

プシド化 AAV ゲノム DNA 又は産生プロセスからの汚染プラスミド DNA を排除する。次いで、ヌクレアーゼ耐性粒子を熱処理に供して、カプシドからゲノムを放出させる。次に、ウイルスゲノムの特定の領域（通常はポリ A シグナル）を標的とするプライマー/プロベセットを使用したリアルタイム PCR によって、放出されたゲノムを定量化する。ゲノムコピーを決定するための別の好適な方法は、定量的 PCR (qPCR)、特に最適化された qPCR 又はデジタル液滴 PCR である [Lock Martin, et al, Human Gene Therapy Methods. April 2014, 25(2): 115-125. doi: 10.1089/hgtb.2013.131, 2013 年 12 月 13 日に編集する前にオンラインで公開]。

#### 【0092】

また、複製欠損ウイルス組成物は、約  $1.0 \times 10^9$  GC ~ 約  $1.0 \times 10^{15}$  GC の範囲にある量の複製欠損ウイルスを含有するように投与量単位で製剤化することができる。別の実施形態では、この量のウイルスゲノムは、分割用量で送達され得る。一実施形態では、用量は、約 70 kg の平均ヒト対象については、約  $1.0 \times 10^{10}$  GC ~ 約  $3.0 \times 10^{14}$  GC である。別の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^9$  GC である。例えば、AAV ウイルスの用量は、約  $1 \times 10^{10}$  GC、 $1 \times 10^{11}$  GC、約  $5 \times 10^{11}$  GC、約  $1 \times 10^{12}$  GC、約  $5 \times 10^{12}$  GC、又は約  $1 \times 10^{13}$  GC であり得る。別の実施形態では、投与量は、ヒト対象について、約  $1.0 \times 10^9$  GC/kg ~ 約  $3.0 \times 10^{14}$  GC/kg である。別の実施形態では、用量は、約  $1 \times 10^9$  GC/kg である。例えば、AAV ウイルスの用量は、約  $1 \times 10^{10}$  GC/kg、 $1 \times 10^{11}$  GC/kg、約  $5 \times 10^{11}$  GC/kg、約  $1 \times 10^{12}$  GC/kg、約  $5 \times 10^{12}$  GC/kg、又は約  $1 \times 10^{13}$  GC/kg であり得る。一実施形態では、構築物は、 $1 \mu\text{L}$  ~ 約 100 mL の体積で送達され得る。本明細書で使用される場合、「投与量」又は「量」という用語は、治療の過程で対象に送達される総投与量若しくは総量、又は単一単位（又は複数単位若しくは分割投与量）投与で送達される投与量若しくは量を指し得る。

#### 【0093】

上述の組換えベクターは、公開された方法に従って宿主細胞に送達され得る。好ましくは、生理学的に適合性のある担体に懸濁された rAAV は、ヒトを含む所望の対象に投与され得る。好適な担体は、導入ウイルスが指向される適応症の観点で、当業者によって容易に選択され得る。例えば、1つの好適な担体としては、生理食塩水が挙げられ、様々な緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）とともに製剤化され得る。他の例示的な担体としては、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油、及び水が挙げられる。担体の選択は、本発明の制限ではない。

#### 【0094】

別の実施形態では、組成物は、担体、希釈剤、賦形剤及び/又はアジュバントを含む。ある特定の実施形態では、ヒト患者への投与のために、rAAV は、好適には、生理食塩水、界面活性剤、並びに薬学的に及び/又は生理学的に適合性の塩又は塩の混合物を含有する水溶液に懸濁される。好適には、製剤は、生理学的に許容される pH、例えば、pH 6 ~ 9、又は pH 6.0 ~ 7.5、又は pH 6.2 ~ 7.7、又は pH 6.5 ~ 7.5、pH 7.0 ~ 7.7、又は pH 7.2 ~ 7.8、又は約 pH 7.0 の範囲に調整される。ある特定の実施形態では、製剤は、約 6.0、約 6.1、約 6.2、約 6.3、約 6.4、約 6.5、約 6.6、約 6.7、約 6.8、約 6.9、約 7.0、約 7.1、約 7.2、約 7.3、約 7.4、約 7.5、約 7.6、約 7.7、又は約 7.8 の pH に調整される。ある特定の実施形態では、約 7.28 ~ 約 7.32、約 6.0 ~ 約 7.5、約 6.2 ~ 約 7.7、約 7.5 ~ 約 7.8、約 6.0、約 6.1、約 6.2、約 6.3、約 6.4、約 6.5、約 6.6、約 6.7、約 6.8、約 6.9、約 7.0、約 7.1、約 7.2、約 7.3、約 7.4、約 7.5、約 7.6、約 7.7、又は約 7.8 の pH が、望ましい可能性がある。ある特定の実施形態では、静脈内送達のためには、約 6.8 ~ 約 7.2 の pH が、所望され得る。しかしながら、より広範囲にある他の pH、及びこれらの下位

10

20

30

40

50

範囲が、他の送達経路のために選択され得る。

【0095】

任意選択的に、本発明の組成物は、rAAV並びにノ又はバリエーション及び担体（複数可）に加えて、防腐剤又は化学的安定剤などの他の従来の薬学的成分を含有し得る。好適な例示的な防腐剤には、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルパニリン、グリセリン、フェノール、及びパラクロロフェノールが含まれる。好適な化学的安定剤には、ゼラチン及びアルブミンが含まれる。

【0096】

本明細書で使用される場合、「担体」は、任意及び全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁物、コロイドなどを含む。薬学的活性物質に対するかかる媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。補足活性成分を組成物中に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という句は、宿主に投与されるときにアレルギー又は類似の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。リポソーム、ナノカプセル、ミクロ粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などの送達ビヒクルが、本発明の組成物を好適な宿主細胞に導入するために使用され得る。特に、rAAVベクター送達導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフィア、又はナノ粒子などに封入化された送達のいずれかのために製剤化され得る。

【0097】

一実施形態では、組成物は、対象への送達に好適な最終製剤を含み、例えば、生理学的に適合するpH及び塩濃度まで緩衝された水性液体懸濁液である。任意選択的に、1つ以上の界面活性剤が、製剤中に存在する。別の実施形態では、組成物は、対象への投与のために希釈される濃縮物として輸送され得る。他の実施形態では、組成物は、凍結乾燥され、投与時に再構築され得る。

【0098】

好適な界面活性剤、又は界面活性剤の組み合わせは、非毒性である非イオン性界面活性剤の中から選択され得る。一実施形態では、例えば、中性pHを有し、8400の平均分子量を有する、ポロキサマー188としても知られている、Pluronic（登録商標）F68[BASF]などの、一級ヒドロキシル基末端の二機能的ブロックコポリマー界面活性剤が選択される。他の界面活性剤及び他のポロキサマー、すなわち、ポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリブロックコポリマー、SOLUTOL HS 15（マクロゴール-15ヒドロキシステアレート）、LABRASOL（ポリオキシカプリル酸グリセリド）、ポリオキシ10オレイルエーテル、TWEEN（ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル）、エタノール、及びポリエチレングリコールが選択され得る。一実施形態では、製剤は、ポロキサマーを含有する。これらのコポリマーは、一般的に、文字「P」（ポロキサマーの場合）の後に3桁の数字で命名され、最初の2桁×100は、ポリオキシプロピレンコアのおおよその分子質量を与え、最後の1桁×10は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを与える。一実施形態では、ポロキサマー188が選択される。界面活性剤は、懸濁液の最大約0.0005%～約0.001%の量で存在し得る。

【0099】

ウイルスベクターの投与量は、主に、治療される状態、患者の年齢、体重、及び健康状態などの要因に依存し、したがって、患者間で異なり得る。例えば、ウイルスベクターの治療上有効なヒト投与量は、概して、約25～約1000マイクロリットル～約100mLの範囲の、（体重が70kgの平均的な対象を治療するために）約 $1 \times 10^9$ ～ $1 \times 10^{16}$ ゲノムウイルスベクターの濃度（その範囲内の全ての整数又は分数量を含み、好ましくは、ヒト患者に対して、 $1.0 \times 10^{12}$  GC～ $1.0 \times 10^{13}$  GC）を含む溶液である。本発明の組成物は、治療される領域のサイズ、使用されるウイルス力価、投与経

10

20

30

40

50

路、及び本方法の所望の効果に応じて、範囲内の全ての数値を含めて、約  $0.1 \mu\text{L}$  ~ 約  $10 \text{ mL}$  の容量で送達され得る。一実施形態では、容量は、約  $50 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $70 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $100 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $125 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $150 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $175 \mu\text{L}$  である。更に別の実施形態では、容量は、約  $200 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $250 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $300 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $450 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $500 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $600 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $750 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $850 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $1000 \mu\text{L}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $1.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $2 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $2.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $3 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $3.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $4 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $5.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $6 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $6.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $7 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $8 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $8.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $9 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $9.5 \text{ mL}$  である。別の実施形態では、容量は、約  $10 \text{ mL}$  である。

10

#### 【0100】

20

いくつかの実施形態では、調節配列の制御下にある所望の導入遺伝子をコードする核酸配列を有する組換えアデノ随伴ウイルスの濃度は、組成物中で、望ましくは、1ミリリットル当たり約  $10^7 \sim 10^{14}$  個のベクターゲノム ( $\text{vg/mL}$ ) の範囲である (ゲノムコピー ( $\text{GC/mL}$ ) とも称される)。

#### 【0101】

一実施形態では、組成物中の rAAV の投与量は、体重の約  $1.0 \times 10^9 \text{ GC/kg}$  ~ 約  $1.5 \times 10^{13} \text{ GC/kg}$  である。一実施形態では、投与量は、約  $1.0 \times 10^{10} \text{ GC/kg}$  である。一実施形態では、投与量は、約  $1.0 \times 10^{11} \text{ GC/kg}$  である。一実施形態では、投与量は、約  $1.0 \times 10^{12} \text{ GC/kg}$  である。一実施形態では、投与量は、約  $5.0 \times 10^{12} \text{ GC/kg}$  である。一実施形態では、投与量は、約  $1.0 \times 10^{13} \text{ GC/kg}$  である。本明細書に記載の全ての範囲は、エンドポイントを含む。

30

#### 【0102】

一実施形態では、有効投与量 (送達される総ゲノムコピー) は、約  $10^7 \sim 10^{13}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^8$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^9$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^{10}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^{11}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^{12}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^{13}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^{14}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約  $10^{15}$  ゲノムコピーである。

40

#### 【0103】

毒性などの望ましくない効果のリスクを低減するために、ウイルスの最低有効濃度を利用することが望ましい。これらの範囲の更に他の投与量及び投与容量は、治療される対象、好ましくはヒトの、身体状態、対象の年齢、特定の障害、及び進行性の場合はその障害の進行の程度、を考慮して、主治医によって選択され得る。

#### 【0104】

ある特定の実施形態では、組成物は、誘導性 GLP-1 アゴニスト構築物を含む rAAV を含む。ある特定の実施形態では、誘導剤又は分子は、ラパマイシン又はラパログである。ある特定の実施形態では、誘導剤は、ラパマイシンであり、rAAV を含む組成物の後に少なくとも1回以上、少なくとも2回以上、少なくとも3回以上投与される。いくつかの実施形態では、ラパマイシンは、少なくとも約  $4 \sim$  少なくとも約  $40 \text{ nM}$  の用量で投

50

与される。ある特定の実施形態では、誘導剤（すなわち、ラパマイシン）は、少なくとも約 0.1 mg/kg ~ 少なくとも約 3.0 mg/kg の用量で投与される。ある特定の実施形態では、誘導剤（すなわち、ラパマイシン）は、少なくとも約 0.5 mg/kg ~ 少なくとも約 2.0 mg/kg の用量で投与される。

【0105】

本明細書に記載のウイルスベクター及び他の構築物は、GLP-1 融合タンパク質構築物を、それを必要とする対象に送達するための、半減期が増加した GLP-1 を対象に供給するための、及び/又は対象における I 型糖尿病、II 型糖尿病若しくはメタボリックシンドロームを治療するための医薬を調製するために使用され得る。したがって、別の態様では、糖尿病を治療する方法が、提供される。本方法は、本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。一実施形態では、本組成物は、本明細書に記載の GLP-1 融合タンパク質発現カセットを含むウイルスベクターを含む。

10

【0106】

本明細書で使用される場合、「治療」又は「治療すること」という用語は、I 型糖尿病、II 型糖尿病、又はメタボリックシンドロームのうちの一つ以上の症状を軽減する目的で、本明細書に記載の一つ以上の化合物又は組成物を対象に投与することを包含すると定義される。したがって、「治療」は、所与の対象において、I 型糖尿病、II 型糖尿病、又はメタボリックシンドロームの進行を低減すること、症状の重症度を低減すること、疾患の症状を除去すること、疾患の進行を遅延させること、又は療法の有効性を増加させること、のうちの一つ以上を含み得る。

20

【0107】

本明細書で使用される場合、「寛解」という用語は、対象がもはや糖尿病の臨床的徴候を示さず、正常な血糖値を有する場合に、インスリン治療を中止する能力を指す。

【0108】

別の実施形態では、対象における T2DM を治療するための方法が、提供される。方法は、本明細書に記載の融合タンパク質をコードする配列を含む核酸分子を含むウイルスベクターを投与することを含む。一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0109】

別の態様では、対象における代謝性疾患を治療する方法が、提供される。本方法は、本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。一実施形態では、本組成物は、本明細書に記載の GLP-1 融合タンパク質発現カセットを含むウイルスベクターを含む。一実施形態では、代謝性疾患は、I 型糖尿病である。一実施形態では、代謝性疾患は、II 型糖尿病である。一実施形態では、代謝性疾患は、メタボリックシンドロームである。一実施形態では、対象は、ヒトである。

30

【0110】

別の態様では、対象における体重を減少させる方法が、提供される。本方法は、本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。一実施形態では、本組成物は、本明細書に記載の GLP-1 融合タンパク質発現カセットを含むウイルスベクターを含む。

【0111】

治療の経過は、任意選択的に、同じウイルスベクター（例えば、AAVrh91 ベクター）又は異なるウイルスベクター（例えば、AAVrh91 及び AAV3B、AR2.12）の反復投与を含み得る。本明細書に記載のウイルスベクターを使用して、更に他の組み合わせが選択され得る。任意選択的に、本明細書に記載の組成物は、他の糖尿病薬又はタンパク質ベースの療法（例えば、GLP-1 類似体、インスリン、経口抗高血糖薬（スルホニル尿素、ピグアナイド、チアゾリジンジオン、及びアルファグルコイダーゼ阻害剤）を含む）を含むレジメンにおいて組み合わせられ得る。任意選択的に、本明細書に記載の組成物は、食事療法及び運動療法を含む生活習慣の変化を伴うレジメンにおいて組み合わせられ得る。ある特定の実施形態では、AAV ベクター及び併用療法は、本質的に同時に投与される。他の実施形態では、AAV ベクターが、初めに投与される。他の実施形態

40

50

では、併用療法が、初めに投与される。

【0112】

一実施形態では、組成物は、有効量のインスリンと組み合わせて投与される。プロタミン亜鉛組換えヒトインスリン（ProZinc（登録商標））、ブタインスリン亜鉛懸濁液（Vetsulin（登録商標））、インスリングルギン（Lantus（登録商標））、リスプロ（Humalog）、アスパルト（Novolog）、グルリジン（Apidra）、ノボリン、及びペロスリンを含むが、これらに限定されない、様々な市販のインスリン製品が、当該技術分野で既知である。

【0113】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の rAAV とインスリンとの組み合わせは、ウイルスベクターでの治療前と比較して、対象におけるインスリン用量要件を減少させる。かかる用量要件は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、又は90%以上低減され得る。治療する医師は、対象が必要とするインスリンの正しい投与量を決定することができる。例えば、対象は、インスリン又は他の療法を使用して治療され得、治療する医師は、AAVベクターの投与時に継続し得る。かかるインスリン又は他の併用療法は、その後、必要に応じて、継続、低減、又は中止され得る。

10

【0114】

一実施形態では、遺伝子療法のための本明細書に記載の発現カセット、ベクターゲノム、rAAVを含む組成物、又は他の組成物は、患者当たり単回用量として送達される。一実施形態では、対象は、治療有効量の本明細書に記載の組成物を送達される。本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、治療目標を達成するために十分なGLP1-Fcの量を標的細胞に送達して発現する、発現カセット若しくはベクター、又はその組み合わせの量を指す。治療有効量は、治療する医師によって選択され得るか、又は以前に決定されたガイドラインに基づいて導かれ得る。例えば、デュラグルチドは、週に1回、0.75mgの初期用量で、皮下で提供され得る。用量は、追加の血糖管理のために、1.5mgの増分で増加され得る。患者は、用量を週に1回3mgに増加させる前に、少なくとも4週間、週に1回1.5mgの用量に留まるべきである。患者は、用量を週に1回4.5mgに増加させる前に、少なくとも4週間、週に1回3mgの用量に留まるべきである。デュラグルチドの維持用量は、週に1回0.75~4.5mgの皮下で、毎週4.5mgの最大用量であり得る。rAAVは、対象に送達され、その後、経口若しくは皮下のデュラグルチド、インスリン、又は必要に応じて他の薬物を補充して、週に1回0.75~4.5mgの所望の投与量の当量に到達させ得る。

20

30

【0115】

ある特定の実施形態では、治療目標は、I型糖尿病、II型糖尿病、又はメタボリックシンドロームの症状のうちの一つ以上を緩和又は治療することである。治療有効量は、ヒト患者ではなく、むしろ動物モデルに基づいて決定され得る。別の実施形態では、治療目標は、対象における代謝性疾患の寛解である。本明細書で使用される場合、vpカプシドタンパク質を指すために使用される場合、「異種」という用語又はその任意の文法的な変形は、例えば、異なる修飾アミノ酸配列を有するvp1モノマー（タンパク質）、vp2モノマー（タンパク質）、又はvp3モノマー（タンパク質）を有する、同じではない要素からなる集団を指す。配列番号20は、AAVrh91 vp1タンパク質のコードされたアミノ酸配列を提供する。vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質（代替的にアイソフォームと称される）に関連して使用される「異種」という用語は、カプシド内のvp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質のアミノ酸配列の違いを指す。AAVカプシドは、予測されたアミノ酸残基の修飾を有する、vp1タンパク質内、vp2タンパク質内、及びvp3タンパク質内に亜集団を含む。これらの亜集団は、最低限、特定の脱アミド化アスパラギン（N又はAsn）残基を含む。例えば、ある特定の亜集団は、アスパラギン-グリシン対に少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの高度に脱アミド化されたアスパラギン（N）位置を含み、任意選択的に、他の脱ア

40

50

ミド化アミノ酸を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸変化及び他の任意選択的な修飾を生じる。

【0116】

本明細書で使用される場合、vpタンパク質の「亜集団」とは、別途指定されない限り、少なくとも1つの定義された共通の特徴を有し、少なくとも1つの群メンバーから、参照群の全てのメンバーよりも少ないメンバーからなるvpタンパク質の群を指す。例えば、vp1タンパク質の「亜集団」は、別途指定されない限り、組み立てられたAAVカプシド中の少なくとも1つのvp1タンパク質であり、全てのvp1タンパク質未満である。vp3の「亜集団」は、別途指定されない限り、組み立てられたAAVカプシドにおいて、1つのvp3タンパク質から、全てのvp3タンパク質よりも少ないvp3タンパク質であり得る。例えば、組み立てられたAAVカプシドにおいて、vp1タンパク質は、vpタンパク質の亜集団であり得、vp2タンパク質は、vpタンパク質の別の亜集団であり得、vp3はなお、vpタンパク質の更なる亜集団である。別の例では、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質は、例えば、少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの高度脱アミド化アスパラギン、例えば、アスパラギン-グリシン対で異なる修飾を有する亜集団を含み得る。

10

【0117】

本明細書で使用される場合、rAAVの「ストック」は、rAAVの集団を指す。脱アミド化に起因するカプシドタンパク質の不均一性にもかかわらず、ストック内のrAAVは、同一のベクターゲノムを5つ共有することが予想される。ストックは、例えば、選択されたAAVカプシドタンパク質及び選択された産生系に特徴的な不均一な脱アミド化パターンを有するカプシドを有するrAAVを含み得る。ストックは、単一の産生系から産生され得るか、又は産生系の複数の実行からプールされ得る。本明細書に記載されるものを含むが、これらに限定されない様々な産生系が選択され得る。本明細書で使用される場合、「GLP-1構築物」、「GLP-1発現構築物」という用語及び同義語は、リーダー及び融合ドメインと組み合わせて本明細書に記載のGLP-1配列を含む。「GLP-1構築物」、「GLP-1発現構築物」という用語及び同義語は、GLP-1融合タンパク質をコードする核酸配列又はその発現産物を指すために使用され得る。

20

【0118】

核酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、又は「同一なパーセント」という用語は、対応するようにアラインメントさせたときに同じである2つの配列中の塩基を指す。配列同一性の比較の長さは、ゲノムの全長、遺伝子コード配列の全長、又は、少なくとも約100~150個のヌクレオチドのフラグメントにわたり得るか、又は所望に応じ得る。しかしながら、例えば、少なくとも約9個のヌクレオチド、通常は少なくとも約20~24個のヌクレオチド、少なくとも約28~32個のヌクレオチド、少なくとも約36個以上のヌクレオチドの、より小さいフラグメント間の同一性も望まれ得る。多重配列アラインメントプログラムはまた、核酸配列についても利用可能である。かかるプログラムの例としては、インターネット上のウェブサーバを通してアクセス可能な「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「BLAST」、「MAP」、及び「MEME」が挙げられる。かかるプログラムの他のソースは、当業者に既知である。代替的に、Vector NTIユーティリティもまた使用される。また、当該技術分野で既知のいくつかのアルゴリズムが存在し、上に記載のプログラムに含まれるものを含め、ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができる。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、GCGバージョン6.1のプログラムであるFastA(商標)を用いて比較することができる。FastA(商標)は、照会及び検索配列の間の最良の重複領域のアラインメント及び配列同一性パーセントを提供する。例えば、核酸配列間のパーセント配列同一性は、本明細書に参照により組み込まれる、GCGバージョン6.1で提供される、そのデフォルトパラメータ(ワードサイズ6及びスコアリングマトリックスのためのNOPAM因子)を用いるFastA(商標)を使用して決定することができる。

30

40

50

## 【0119】

「高度に保存された」という用語は、少なくとも80%の同一性、好ましくは、少なくとも90%の同一性、より好ましくは、97%超の同一性を意味する。同一性は、当業者によって知られているアルゴリズム及びコンピュータプログラムに頼ることによって、当業者によって容易に決定される。

## 【0120】

上限の範囲で特に明記しない限り、同一性のパーセンテージは、同一性の最小レベルであり、参照配列に対して最大100%の同一性までの全てのより高いレベルの同一性を包含することが理解されるであろう。特に明記しない限り、同一性のパーセンテージは、同一性の最小レベルであり、参照配列に対して最大100%の同一性までの全てのより高いレベルの同一性を包含することが理解されるであろう。例えば、「95%の同一性」及び「少なくとも95%の同一性」は、互換的に使用され得、参照配列に対する95%、96%、97%、98%、99%、最大100%の同一性、及びそれらの間の全ての分数を含む。

10

## 【0121】

アミノ酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、又は「同一性パーセント」という用語は、対応するようにアラインメントさせたときに同じである2つの配列中の残基を指す。同一性パーセントは、タンパク質の全長ポリペプチド、ポリペプチド、約70個のアミノ酸～約100個のアミノ酸、若しくはそのペプチドフラグメント又はシーケンスをコードする対応する核酸配列について容易に決定することができる。好適なアミノ酸フラグメントは、長さが少なくとも約8個のアミノ酸であり得、最大で約150個のアミノ酸であり得る。一般に、2つの異なる配列間の「同一性」、「相同性」、又は「類似性」について言及する場合、「同一性」、「相同性」、又は「類似性」は、「アラインメントされた」配列を参照して決定される。「アラインメントされた」配列又は「アラインメント」とは、複数の核酸配列又はタンパク質(アミノ酸)配列を指し、参照配列と比較して、多くの場合、欠損又は追加塩基又はアミノ酸についての補正を含む。アラインメントは、公的又は商業的に利用可能な様々な多重配列アラインメントプログラムのいずれかを使用して行われる。配列アラインメントプログラムは、アミノ酸配列について利用可能であり、例えば、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及び「Match-Box」プログラムが挙げられる。一般的に、これらのプログラムのいずれかをデフォルト設定で使用するが、当業者は、これらの設定を必要に応じて変更し得る。代替的に、当業者は、参照のアルゴリズム及びプログラムによって提供されるものと少なくとも同じレベルの同一性又はアラインメントを提供する、別のアルゴリズム又はコンピュータプログラムを利用することができる。例えば、J. D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13): 2682-2690 (1999)を参照されたい。

20

30

## 【0122】

「a」又は「an」という用語は、1つ以上を指すことに留意されたい。したがって、「a」(又は「an」)、「1つ以上(one or more)」、及び「少なくとも1つ(at least one)」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

40

## 【0123】

「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、及び「含む(comprising)」という用語は、排他的ではなく包括的に解釈される必要がある。「なる(consist)」、「なる(consisting)」という用語、及びその変形は、包括的ではなく排他的に解釈される必要がある。本明細書の様々な実施形態は、「含む(comprising)」という言葉を用いて示されているが、他の状況では、関連する実施形態は、「からなる(consisting of)」又は「本質的に～からなる(consisting essentially of)」という言葉を用いて解

50

釈及び記載されるべきことも意図される。

【0124】

本明細書で使用される場合、「患者」又は「対象」は、哺乳動物を指し、ヒト、獣医学用動物又は農業用動物、家庭用動物又は愛玩動物、並びに通常臨床研究に使用される動物を意味する。一実施形態では、これらの方法及び組成物の対象は、ヒトである。別の実施形態では、対象は、ネコではない。

【0125】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、別途指定されない限り、与えられた参照から10% (±10%、例えば、±1、±2、±3、±4、±5、±6、±7、±8、±9、±10、又はそれらの間の値)の可変性を意味する。

10

【0126】

ある特定の場合では、「E + #」又は「e + #」という用語は、指数を指すために使用される。例えば、「5E10」又は「5e10」は、 $5 \times 10^{10}$ である。これらの用語は、互換的に使用され得る。

【0127】

本明細書で使用される場合の「調節」という用語又はその変形形態は、生物学的経路の1つ以上の成分を阻害する組成物の能力を指す。

【0128】

本明細書で使用される場合、「疾患」、「障害」、及び「状態」は、対象における異常な状態を示すために互換的に使用される。

20

【0129】

本明細書で別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、当業者によって、及び本明細書で使用されている多数の用語に対して当業者に一般的な手引きを提供する公開された文書を参照することによって、一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0130】

一実施形態を説明する際の「一実施形態」又は「別の実施形態」への言及は、別途明示的な指定がない限り、参照される実施形態が別の実施形態 (例えば、参照される実施形態の前に説明される実施形態) と相互に排他的であることを意味するものではない。

【実施例】

30

【0131】

以下の実施例は、本発明の様々な実施形態を例解するために提供される。本実施例は、本発明をいかなる方法でも限定することを意図するものではない。

【0132】

グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) は、グルカゴンプレタンパク質のタンパク質分解切断から、胃腸 (GI) 管で産生されるホルモンである。GLP-1 は、ベータ細胞からのインスリン放出を増強し、いくつかの組織のインスリン感受性を増加させ、胃内容排出を遅くし (低血糖を引き起こすことなく)、満腹感を高めることによって、グルコース恒常性を広く調節する。GLP-1 は、半減期が極めて短いため、薬物として効果的に使用することができなかったが、GLP-1 の長時間作用型類似体は、2型糖尿病の治療に広く使用されている薬剤となっている。GLP-1 アゴニストは、優れた安全性プロファイルを有し、繰り返し、しばしば生涯にわたる非経口投与を必要とし、単回投与後に長期発現を達成することができるAAV媒介遺伝子導入のための良好な候補となる。GLP-1 及びGLP-1 アゴニストは、タンパク質が、小腸のL細胞に特異的なプロテアーゼによる処理を必要とするその天然の内容物 (グルカゴンタンパク質) で発現することができないため、AAVベクターから発現することが困難である。異種シグナルペプチドを使用してGLP-1を発現する試みは、高レベルの発現を達成することに失敗した。シグナルペプチドは、受容体結合に関与するGLP-1のN末端の適切な処理をもたらさないため、信頼できる発現を達成し得ないことを提案した。代わりに、遊離GLP-1タンパク質を産生するために切断されるプロペプチドを使用してGLP-1を発現させた。これらは

40

50

、ユビキタスプロテアーゼ（例えば、フリリン）によって切断することができ、免疫原性にはならない内因性ペプチドであるため、GLP-1発現のためのトロンピン及び第IX因子などの凝固因子からプロペプチドを選択した。トロンピンプロペプチドは、シグナルペプチド単独と比較して、ヒトGLP-1類似体の発現を少なくとも100倍増加させた。この技術を使用して、1つはIgG4Fc融合を含み、もう1つはアルブミン融合を含み、両方がヒトプロペプチドを担持する、AAVベクターから発現することができる2つの長時間作用型GLP-1類似体を開発した。GLP-1アゴニスト配列の転写を活性化し、小分子薬物の投与を介して、これらのタンパク質を構成的に又は制御された様式で発現する発現カセットを開発した。標的産物プロファイルは、単回筋肉内注射として設計される。一実施形態では、単回注射は、治療用GLP-1アゴニストレベルを維持するよう

10

#### 【0133】

このイノベーションは、特に、3カ月後にメトホルミン単独又は他の経口薬剤で糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビン、ヘモグロビンA1c、HbA1c、又はA1cとも称される）の目標を達成していない患者において、2型糖尿病の単発の、潜在的に生涯にわたる治療を可能にする。標準的治療は、現在、リラグルチド（毎日投与）、デュラグルチド（毎週投与）、DPP（例えば、ジベプチジルベプチダーゼ-4）IV阻害剤（PO）、及びセマグルチドPO（毎日投与）などの長時間作用型皮下GLP-1アゴニストを含む。AAV媒介GLP-1発現を達成するための以前の試みは、劇的により低い発現をもたらすか、又は免疫原性であり、かつ臨床応用には好適でない異種リーダー配列の使用を必要とするかのいずれかであった。

20

#### 【0134】

##### 実施例1 - GLP-1ベクターの構築

GLP-1アゴニストは、アデノ随伴ウイルス（AAV）を介して発現することが困難である。GLP-1は、通常、グルカゴン前駆体タンパク質から発現され、それは、組織特異的プロテアーゼを必要とし、望まれないタンパク質を産生する。従来の異種シグナルペプチドを使用する発現系は、低発現をもたらす。ユニバーサルプロテアーゼ切断部位を有する異種プロペプチドを使用する発現系は、T細胞の標的となり得る外来タンパク質配列をもたらす。外来タンパク質配列を導入することなく、肝臓又は筋細胞からGLP-1発現を約300倍増加させる系を開発した。図5は、マウスにおける操作されたGLP-1構築物のAAV媒介発現を示す。マウスは、開発された（構築物）標準IL-2シグナルペプチド又は内因性前駆体を用いて、GLP-1アゴニストを発現するAAVベクターの筋肉内注射を受けた。血清GLP-1濃度は、注射の3週間後にELISAによって測定した。

30

#### 【0135】

より具体的には、いくつかのGLP-1受容体アゴニストアミノ酸配列の1つの上流にリーダー配列を配置し、続いて融合ドメインを配置して、ベクターを構築した。例えば、図4を参照されたい。得られたタンパク質配列を逆翻訳し、続いて、コザックコンセンサス配列、終止コドン、及びクローニング部位を追加した。配列を生成し、誘導性発現系の制御下で、CMVプロモーターを含む発現ベクターにクローニングした。発現構築物は、AAV2 ITRに隣接させた。得られたプラスミドは、pAAV.TF.GT2A.hGLP-1-Fc.3w.rBGと呼ばれる。ヒトトロンピン-GLP-1-Fcアミノ酸配列は、配列番号14に示され、コード配列は、配列番号15に示され、ベクターゲノムは、配列番号16に示される。

40

#### 【0136】

50

現在利用可能な誘導性構築物は、2ベクター誘導系及び1ベクター誘導系を含む。例えば、図6A及び図6Bを参照されたい。図6Aは、2ベクター系で使用するための誘導性構築物を含む例示的な発現カセットの概略図を示す。図6Bは、IRESリンカーを含む1ベクター系で使用するための誘導性構築物を含む発現カセットの概略図を示す。

#### 【0137】

更に、GLP1-Fc導入遺伝子を含む発現ベクターにGT2Aペプチドを導入した。分泌シグナルを有するヒトGLP1-Fcは、954bpである。hGLP-1-Fc構築物の発現については、上述のように、図6Bに示されるような発現ベクターにおいて、IRESリンカーをGT2A切断配列に置き換え、これにより、IRESリンカーがパッケージング限界に適合することを可能にする(図7A; GLP-1-Fcに対する単一誘導性カセット)。GT2Aペプチドは、配列番号21のアミノ酸配列を含むGT2A\_\_V1ペプチド、又は配列番号22のアミノ酸配列を含むGT2A\_\_V2ペプチドから選択される。F2A切断配列リンカー及び分泌シグナルを含むヒトGLP1-Fcを含む、1ベクター系で使用するための誘導性構築物を含む発現カセットの概略図を示す。

#### 【0138】

##### 実施例2 - インビトロでの発現

GLP1-Fc融合物を、プラスミドでトランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清中で、ヒトロンピンシグナル配列を有する誘導性ヒトデュラグルチド(TF, GT2A, hGLP-1-Fc)及びCB7ネコデュラグルチド(feGLP-1-Fc)について測定した。ネコデュラグルチドとは、デュラグルチドのIgGFc部分がネコIgG配列に置き換えられ、任意選択的に、ネコロンピンリーダー(feTrb)と組み合わせられている構築物を意味する。上清を、ラパマイシン(Rapa)による処理から48時間後、0、4、及び40nMで、又はCB7, feGLP-1-Fcのトランスフェクションから48時間後に収集した)。GLP1-Fcを、キットのSTDとともに活性型GLP1 ELISAによって定量化した。3つの構築物の発現を、図2に示す。ラパマイシンの投与量の増加は、GLP-1の発現の増加をもたらした。

#### 【0139】

更に、GT2A\_\_V1又はGT2A\_\_V2ペプチドを含む設計された構築物におけるアカゲザルの例示的な治療用導入遺伝子(rhTT)の発現を評価した(図6B、7A、及び7B)。図8は、GT2Aペプチドを含む様々な構築物でトランスフェクトし、0nM、4nM、及び40nMで、ラパマイシンで処理した後に測定し、rhTTのIU/mLとしてプロットしたときのHEK293細胞上清中のアカゲザルの例示的な治療用導入遺伝子(rhTT)の発現を示す。次に、GT2A\_\_V1及びGT2A\_\_V2ペプチドを含む設計された単一誘導性カセットを使用して、インビトロでのヒト及びアカゲザルGLP-1-Fc発現の発現を調査した。図9は、インビトロでの誘導性ヒト(h)及びアカゲザル(rh)GLP-1の発現を示す。GLP1-Fc融合物を、プラスミドでトランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清中で、誘導性hGLP-1-Fc、2ベクター系を含むrhGLP-1-Fc、及びCB7, rhGLP-1-Fcについて測定した。細胞を、0日目に播種し、1日目にトランスフェクトし、2日目に0nM、4nM、及び40nMで、ラパマイシンで処理し、細胞からの上清を、4日目又はCB7, rhGLP-1-Fc(rhTrbを含む)のトランスフェクションから48時間後に収集した。GLP1-Fcを、キットのSTDとともに活性型GLP1 ELISAによって定量化した。

#### 【0140】

##### 実施例3 - Rag1KOマウスにおけるパイロット発現

以下の構築物を、前述のように、トリプルトランスフェクション及びヨウジキサノール勾配精製により、AAVrh91ベクター中にパッケージングした。

ヒトロンピンシグナルを有するAAVrh91.TF.hGLP-1-Fc.3w.rBG

アカゲザルトロンピンシグナルを有するAAVrh91.TF.rhGLP-1-Fc

. 3 w . r B G

【 0 1 4 1 】

R a g 1 K O 雌マウス ( n = 5 / ベクター ) を、 I M 投与経路を介して、ベクター ( 1 x 1 0 <sup>11</sup> G C / マウス ) の注射で処置した。血清を、 5 マイクロリットルの D P P - I V 阻害剤 ( M i l l i p o r e ) を含む血清分離管中で全血を分離することによって連続的に収集し、上記の活性 G L P - 1 発現及び活性についてアッセイした。 0 日目にベクターを注射し、 1 4 日目及び 1 5 日頃にラパマイシンを投与した。血清活性 G L P - 1 濃度を、 図 3 に示す。血清レベルは、ラパマイシン投与の約 1 週間後に最大値に達した。

【 0 1 4 2 】

実施例 4 - N H P における長期発現研究

この研究では、非ヒト霊長類 ( N H P ; すなわち、アカゲザル ) におけるアカゲザル G L P - 1 ( r h G L P - 1 - F c ) の発現を調査した。表 1 A 及び 1 B は、 A A V 投与及びラパマイシン投与 ( すなわち、誘導 ) を含む研究の概要を示す。簡潔には、 N H P に、以下の表に従って、筋肉内注射 ( I M ) を介して、 A A V r h 9 1 で指定されたベクターを投与した。 N H P 2 については、ラパマイシンを、 2 1 日目に 0 . 5 m g / k g の用量で、 5 6 日目に 0 . 5 m g / k g の用量で、及び 1 2 6 日目に 2 . 0 m g / k g の用量で投与した。 N H P 3 については、ラパマイシンを、 2 1 日目に 0 . 5 m g / k g の用量で、 7 8 日目に 0 . 5 m g / k g の用量で、及び 1 4 8 日目に 2 . 0 m g / k g の用量で投与した。

【 表 3 】

表 1A.

動物 ID	ベクター	用量	経路
18-128	AAVrh91. CB7. rhGLP-1-Fc. rBG	1e12 GC/kg	IM
109G	AAVrh91. CB7. rhGLP-1-Fc. rBG	1e10 GC/kg	IM
18-072	AAVrh91. CMV. TF1. hGH	各々、5e12 GC/kg	IM
	AAVrh91. Z12I. rhGLP-1-Fc. rBG		
73G	AAVrh91. CMV. TF1. hGH	各々、5e12 GC/kg	IM
	AAVrh91. Z12I. rhGLP-1-Fc. rBG		
18-013	AAVrh91. TF. GT2A. rhGLP-1-Fc. rBG	1e13 GC/kg	IM
77G	AAVrh91. TF. GT2A. rhGLP-1-Fc. rBG	1e13 GC/kg	IM

【 表 4 】

表 1B.

誘導	NHP2 (18-072)	NHP3 (18-013)
1 回目: ラパマイシン IV、 0. 5mg/kg	21 日目	21 日目
2 回目: ラパマイシン IV、 0. 5mg/kg	56 日目	78 日目
3 回目: ラパマイシン PO、 2. 0mg/kg	126 日目	148 日目

【 0 1 4 3 】

図 1 0 A ~ 図 1 0 C は、 N H P 1 ( 1 8 - 1 2 8 ) の抗 r h G L P 1 - F c A D A ( 抗薬物抗体 ) 検出アッセイの r h G L P 1 - F c の発現及び分析を示す。図 1 0 A は、 0 ~ 2 0 0 日目に測定された、プロットされた血清中の r h G L P 1 - F c 発現レベルを n M として示す。図 1 0 B は、 0 ~ 2 0 0 日目に測定された、プロットされた血清中のラパマイシンレベルを μ g / L として示す。図 1 0 C は、 0 ~ 2 0 0 日目に測定された、プロットされた A D A 検出アッセイの結果を外径 4 5 0 n m として示す。

## 【0144】

図11A～図11Cは、NHP1(18-072)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。図11Aは、0～200日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。図11Bは、0～200日目に測定された、プロットされた血清中のラパマイシンレベルをμg/Lとして示す。図11Cは、0～200日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

## 【0145】

図12A～図12Dは、NHP1(18-013)の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。図12Aは、0～200日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。図12Bは、0～200日目に測定された、プロットされた血清中のラパマイシンレベルをμg/Lとして示す。図12Cは、0～200日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。図12Dは、2ベクター系を使用して処理されたNHP1(18-013)の長期発現データを示す。矢印は、ラパマイシンの投与を示す。

10

## 【0146】

要約すると、ヒトGLP1-Fc融合物の発現のための1ベクター誘導系を開発した。加えて、Rag1KOマウスにおけるラパマイシンにおけるヒトGLP1-Fcの誘導を確認した。NHPにおいて、サルGLP1-Fcを発現する1ベクター及び2ベクター誘導性ベクターがラパマイシンに应答し、20日を超える持続時間で1nM超の血清GLP1-Fcの一過性増加をもたらすことを観察した。ベクターを構成的に発現する低用量が、NHPにおける血清GLP1-Fcの高く持続的な発現を提供することを観察した。

20

## 【0147】

## 実施例5 - NHPにおける長期発現研究

この研究では、非ヒト霊長類(NHP;すなわち、アカゲザル)におけるアカゲザルGLP-1(rhGLP-1-Fc)の発現を調査した。図13は、実施例4で試験したNHP(本研究で利用した試料)を含む、AAV投与及びラパマイシン投与(すなわち、誘導)を含む研究の概要を示す。

## 【0148】

図14A及び図14Bは、構成的プロモーターを使用して処置した動物の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。図14Aは、0～300日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。図14Bは、0～230日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

30

## 【0149】

図15A及び15Bは、2ベクター誘導性プロモーター系を使用して処置した動物の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。図15Aは、0～約120日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。図15Bは、0～230日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

40

## 【0150】

図16A及び16Bは、1ベクター誘導プロモーター系を使用して処置した動物の抗rhGLP1-Fc ADAアッセイのrhGLP1-Fcの発現及び分析を示す。図16Aは、0～約450日目に測定された、プロットされた血清中のrhGLP1-Fc発現レベルをnMとして示す。図16Bは、0～230日目に測定された、プロットされたADA検出アッセイの結果を外径450nmとして示す。

## 【0151】

## 実施例6 - 効力アッセイ

本明細書に記載のプラスミドから精製されたヒト及びアカゲザルGLP-1-Fcを、

50

Cell Sensor (登録商標) CRE - bla CHO - K1細胞株に安定的に組み込まれたヒトグルカゴン様ペプチド1受容体 (GLP1R) を含む Gene Blazer (登録商標) GLP1R - CRE - bla CHO - K1細胞 (ThermoFisher) を使用して、効力について比較した。Cell Sensor (登録商標) CRE - bla CHO - K1細胞は、CRE 応答要素の制御下で、ベータ - ラクタマーゼレポーター遺伝子を含む。

【0152】

図17は、GLP - 1 - Fc 導入遺伝子産物の力価アッセイの結果を示す。精製されたヒト及びアカゲザル GLP - 1 - Fc を薬局由来のデュラグルチド (Trulicity) と比較し、本明細書に記載のヒト構築物は、Trulicity と同等又はより良好な効力を示した。

10

【0153】

実施例7 - NHPにおける構成的 GLP - 1 - Fc の発現

この研究では、非ヒト霊長類 (NHP ; すなわち、アカゲザル) におけるヒト GLP - 1 (hGLP - 1 - Fc) の発現を調査した。表2は、AAV投与及びラパマイシン投与 (すなわち、誘導) を含む研究の概要を示す。

【表5】

表2

動物 ID	ベクター	用量	経路
18-007	AAVrh91.CB7.hGLP-1-Fc.rBG	1e12 GC/kg	IM
18-122	AAVrh91.CB7.hGLP-1-Fc.rBG	1e10 GC/kg	IM

20

【0154】

図18Aは、0 ~ 150日目に測定された、プロットされた血清中の hGLP1 - Fc 発現レベルを nM として示す。図18Bは、0日目 ~ 60日目にサンプリングされた NHP 血漿由来の hGLP - 1 - Fc の効力を示す。比較として、図18Cは、血清中の rhGLP - 1 - Fc 発現レベルを示す。

30

【0155】

図18Dは、研究における2つのNHPの体重を示す。図18Eは、血中グルコースレベル (mg / dL) を示す。アカゲザルの血糖基準値は、63 ~ 130 mg / dL である。動物18 - 007は、無症候性を示し、両方の動物は、0日目に比較的低いベースラインBGを有した。60日目の時点で、ADAは検出されなかった。

【0156】

要約すると、トロンピンリーダーを有する hGLP - 1 - Fc 導入遺伝子は、デュラグルチドと同様に強力な導入遺伝子産物をもたらす。構成的に発現するベクターは、ベクターの効力及び導入遺伝子産物の安全性を示す、NHPにおける低ベクター用量での GLP - 1 - Fc の治療レベルの100 ~ 1000倍をもたらす。ラパマイシン誘導性ベクターは、静脈内又は経口ラパマイシンを用いたNHPにおけるGLP - 1 - Fc の長期反復誘導を示す。

40

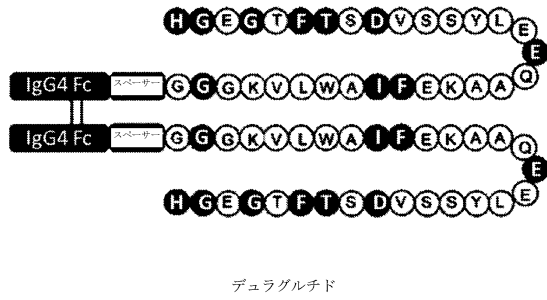
【0157】

本明細書で引用される全ての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。同様に、「22 - 10015 . PCT\_\_Seq - Listing」とラベル付けされ本明細書とともに提出された配列表、並びにその中の配列及びテキストは、参照により組み込まれる。米国仮特許出願第63 / 316 , 220号及び同第63 / 384 , 196号は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、特定の実施形態を参照して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができることが理解されよう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲の範囲に収まることが意図される。

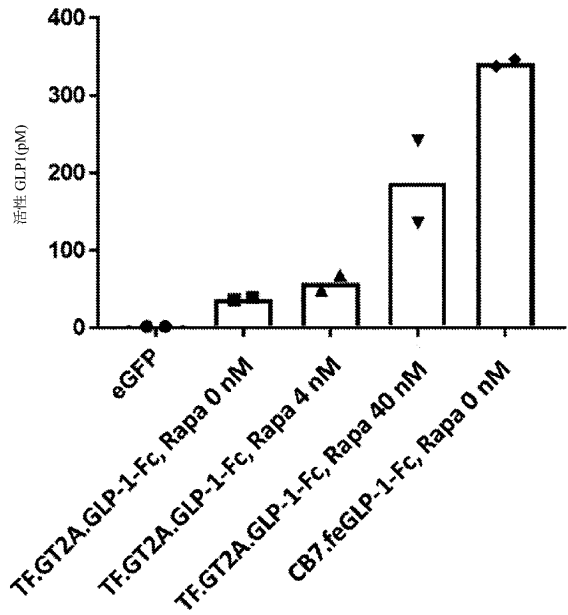
50

【 図 面 】

【 図 1 】



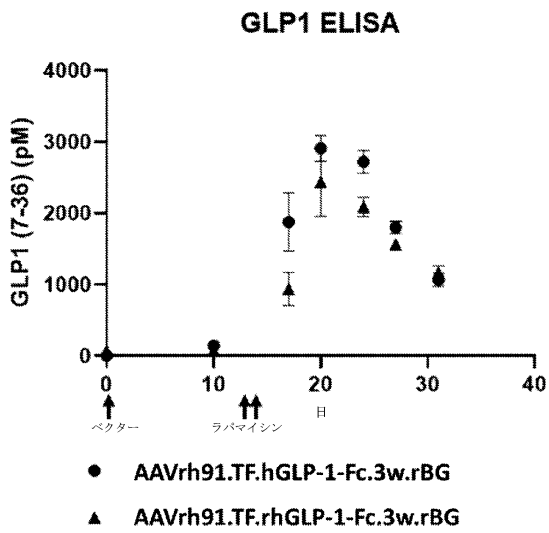
【 図 2 】



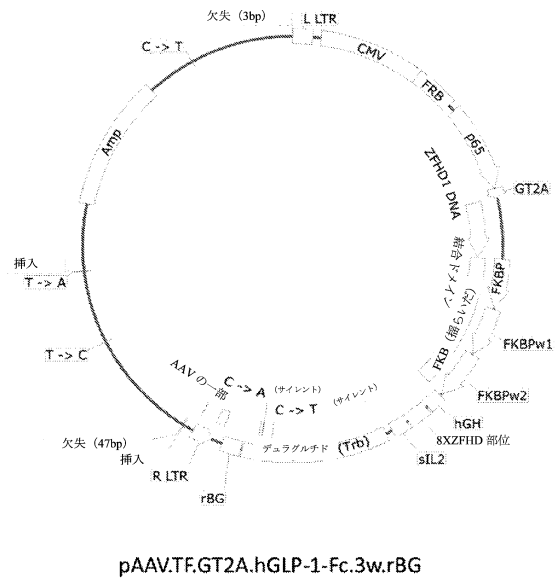
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

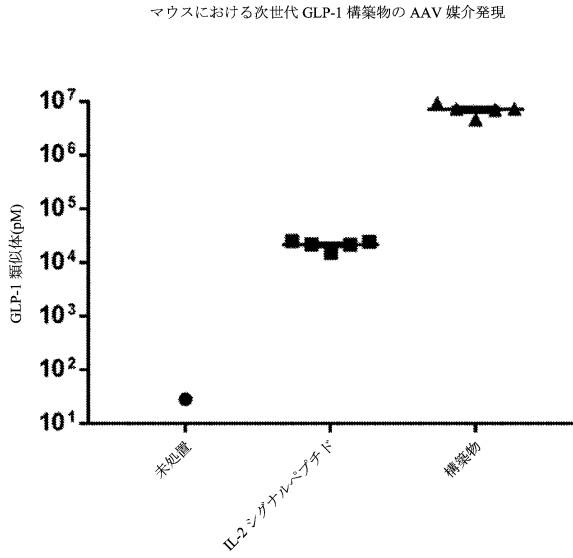


30

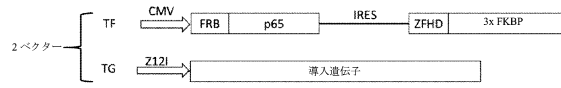
40

50

【 図 5 】

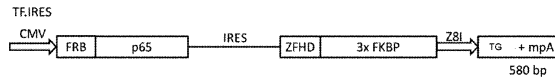


【 図 6 A 】

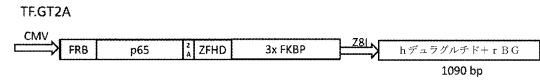


10

【 図 6 B 】



【 図 7 A 】



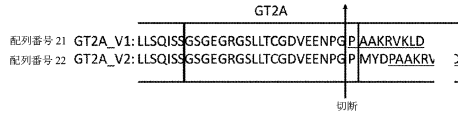
20

30

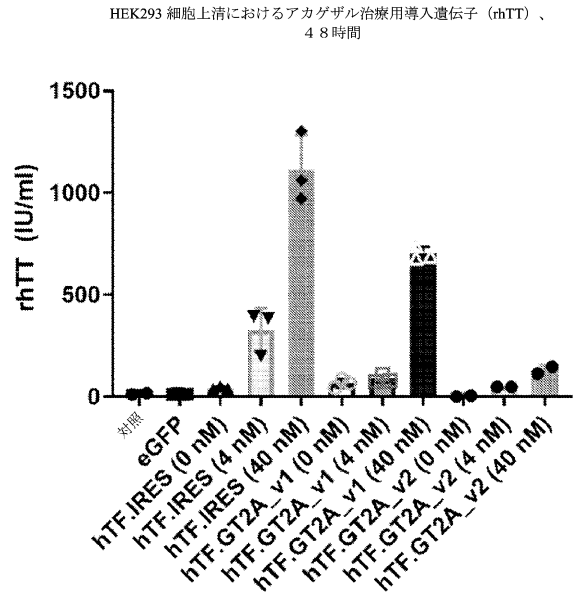
40

50

【 図 7 B 】



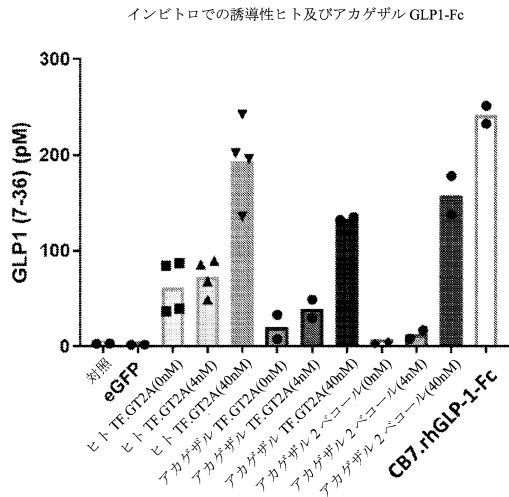
【 図 8 】



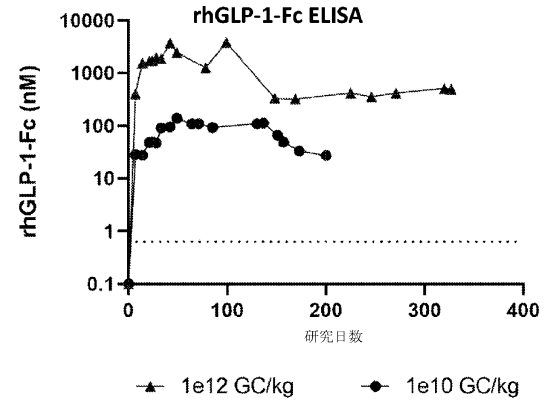
10

20

【 図 9 】



【 図 10 A 】

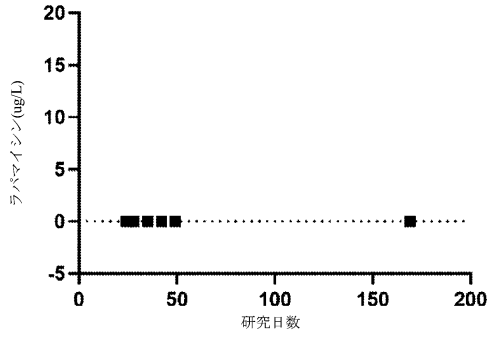


30

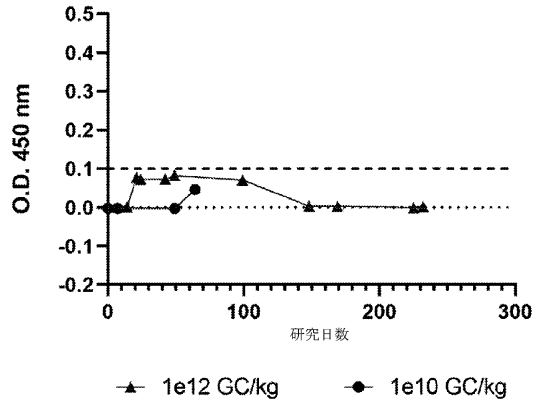
40

50

【 10 B 】

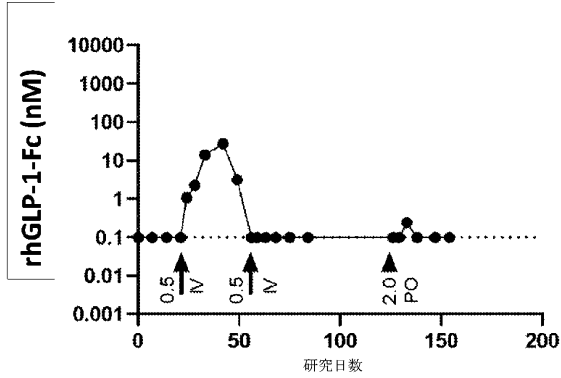


【 10 C 】

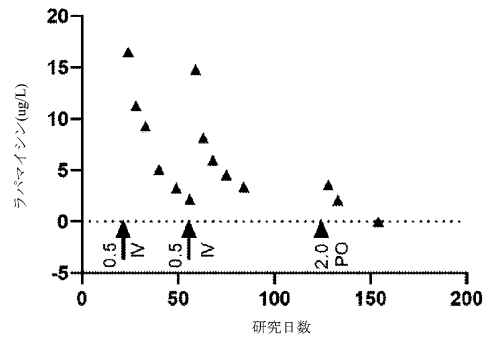


10

【 11 A 】



【 11 B 】



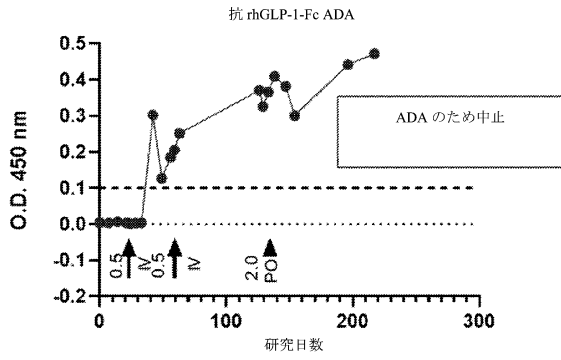
20

30

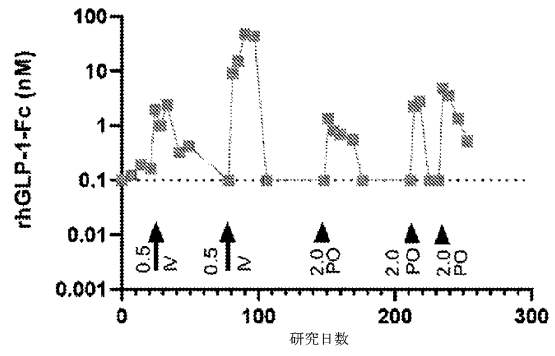
40

50

【 図 1 1 C 】

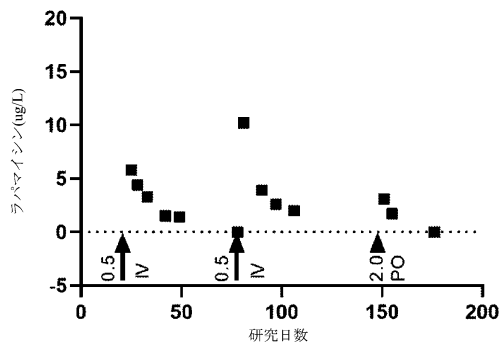


【 図 1 2 A 】

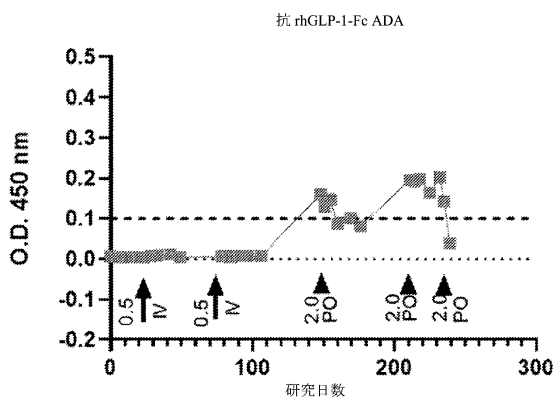


10

【 図 1 2 B 】



【 図 1 2 C 】



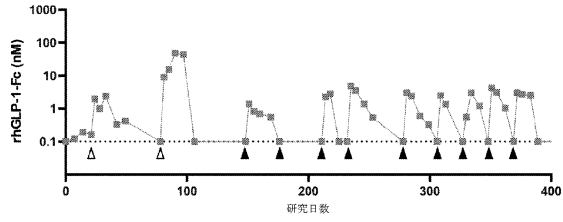
20

30

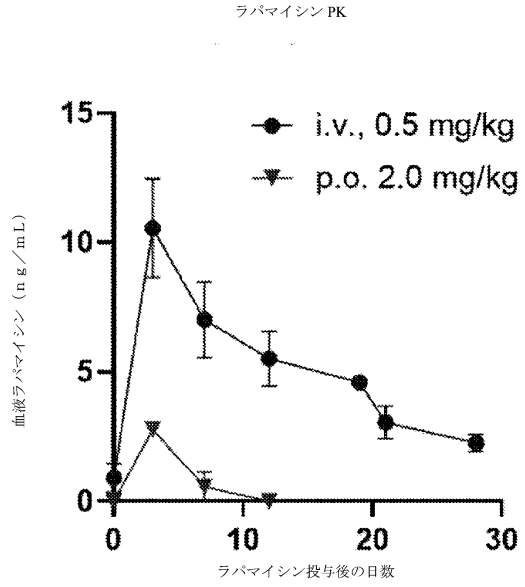
40

50

【 図 1 2 D 】



【 図 1 2 E 】



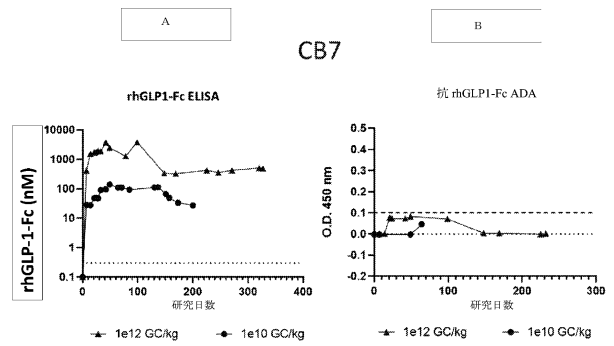
10

20

【 図 1 3 】

動物 ID	ベクター	用量	経路
18-128	AAVrh91.CB7.rhGLP-1-Fc.rBG	1e12 GC/kg	IM
109G	AAVrh91.CB7.rhGLP-1-Fc.rBG	1e10 GC/kg	IM
18-072	AAVrh91.CMVTFNc.3 AAVrh91.Z121.rhGLP-1-Fc.rBG	各々、5e12 GC/kg	IM
73G	AAVrh91.CMVTFNc.3 AAVrh91.Z121.rhGLP-1-Fc.rBG	各々、5e12 GC/kg	IM
18-013	AAVrh91.TF6T2A.rhGLP-1-Fc.rBG	1e13 GC/kg	IM
77G	AAVrh91.TF6T2A.rhGLP-1-Fc.rBG	1e13 GC/kg	IM

【 図 1 4 】

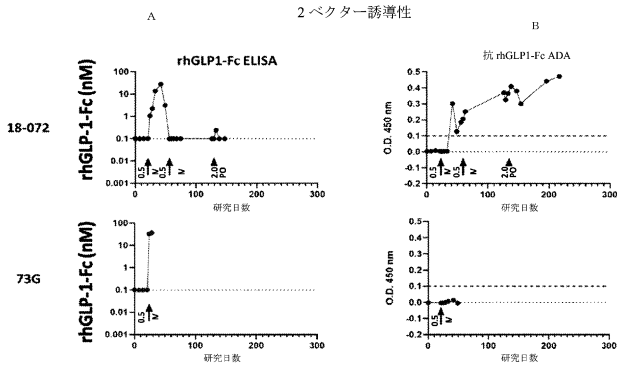


30

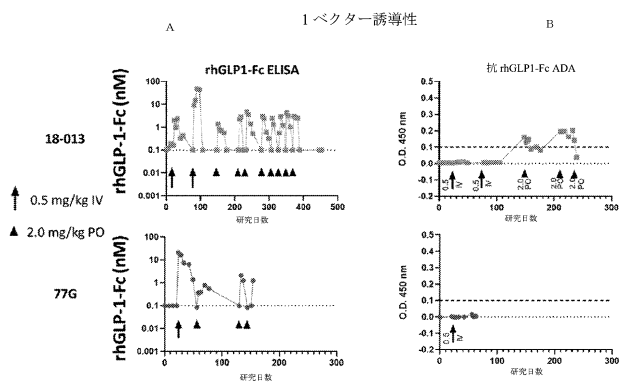
40

50

【 図 15 】

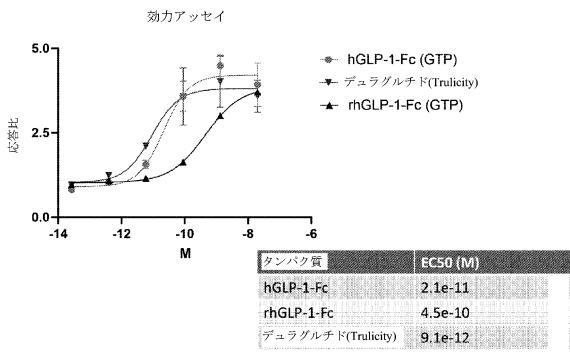


【 図 16 】

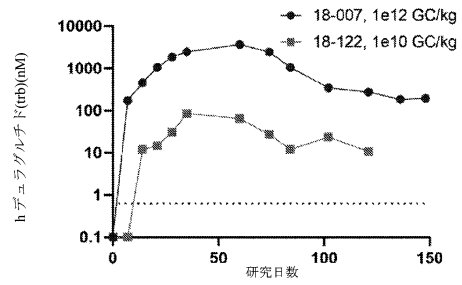


10

【 図 17 】



【 図 18 A 】



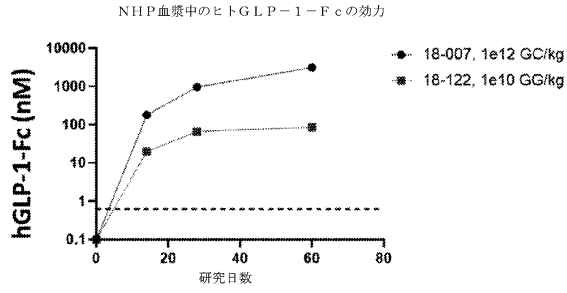
20

30

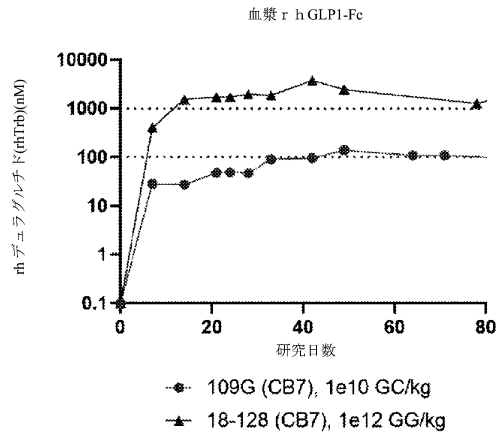
40

50

【 図 1 8 B 】

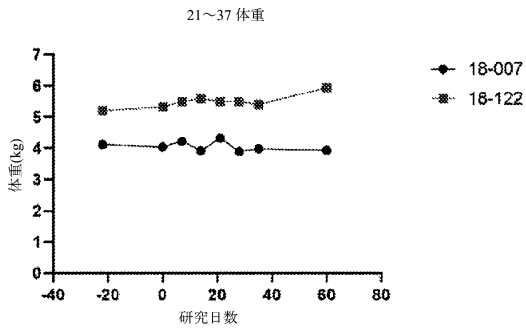


【 図 1 8 C 】

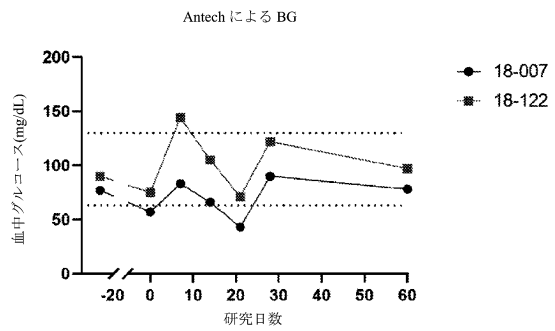


10

【 図 1 8 D 】



【 図 1 8 E 】



20

【 配列表 】

2025508987000001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 23/63687

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC - INV. A61K 38/26, C07K 14/605, C12N 15/86, C07K 19/00 (2023.01)  
 ADD. C12P 21/02, A61P 3/00, A61K 35/761, A61K 48/00 (2023.01)  
 CPC - INV. A61K 38/26, C07K 14/605, C12N 15/86  
 ADD. C07K 2319/30, C07K 2319/90, A61P 3/00, C12N 2750/14143  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 See Search History document  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 See Search History document  
 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 See Search History document

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2022/0000984 A1 (JIANGSU GENSCIENCES INC.) 06 January 2022 (06.01.2022) para [0007]-[0012]; [0018]; [0077]-[0084]; [0125]; SEQ ID NO: 1	1-6, 24
Y	WO 2022/036220 A1 (THE TRUSTEES OF UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 17 February 2022 (17.02.2022) abstract; p. 5, ln 3-12; p. 14, ln 1-6; p. 34, ln 19-22; p. 42, ln 27-29; p. 47, ln 25-30; p. 50, ln 5-14; p. 51, ln 1-20	3-6, 24
Y	WO 2021/026254 A2 (PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC.) 11 February 2021 (11.02.2021) para [0005]; [0059]; [0067]; Table 7; SEQ ID NO: 37	1-6
Y	WO 2022/010319 A1 (GI INNOVATION, INC.) 13 January 2022 (13.01.2022) para [0062]-[0063]; SEQ ID NO: 18, 20, 23	2, (5-6)2
X,P	WO 2022/046815 A1 (THE TRUSTEES OF UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 03 March 2022 (03.03.2022) full document	1-6, 24
A	US 2018/0230488 A1 (THE TRUSTEES OF UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 16 August 2018 (16.08.2018) full document	1-6, 24

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

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "D" document cited by the applicant in the international application  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 May 2023

Date of mailing of the international search report  
**JUN 26 2023**

Name and mailing address of the ISA/US  
Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer  
Kari Rodriguez  
Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 23/63687

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/63687

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 7-23, 25-26  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

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

30

40

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

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 3/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/26 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)  
 A 6 1 K 9/08 (2006.01)  
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 3/00  
 A 6 1 K 35/76  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 38/26  
 A 6 1 K 47/68  
 A 6 1 K 9/08  
 A 6 1 P 3/10

## テーマコード (参考)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . L A B R A S O L

2 . T W E E N

7 ボルチモア・ウェストラファイエットアヴェニュー 2 0 0

(72)発明者 堀内 真

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8 6 ウォーリングフォード・パトナムブルバード 1 0 4  
 9

F ターム (参考)

4C076 AA12 AA95 BB13 BB15 CC21 CC41 EE41 EE59 FF63  
 4C084 AA13 BA01 BA44 DB35 MA66 NA03 NA05 ZC21 ZC35  
 4C087 AA01 AA02 BC83 MA17 MA66 NA03 NA05 ZC21 ZC35