

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-514110
(P2024-514110A)

(43)公表日 令和6年3月28日(2024.3.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 P	9/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/06		
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全65頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-561167(P2023-561167)		(71)出願人	506115514	
(86)(22)出願日	令和4年4月12日(2022.4.12)			ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ	
(85)翻訳文提出日	令和5年11月6日(2023.11.6)			ィ オブ カリフォルニア	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/024478			The Regents of the U	
(87)国際公開番号	WO2022/221320			niversity of Califo	
(87)国際公開日	令和4年10月20日(2022.10.20)			rnia	
(31)優先権主張番号	63/173,527			アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9	
(32)優先日	令和3年4月12日(2021.4.12)			4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	100079108	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			弁理士 稲葉 良幸	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		(74)代理人	100109346	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			弁理士 大貫 敏史	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		(74)代理人	100117189	
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 不整脈原性右心室心筋症に対する遺伝子療法

(57)【要約】

心臓不整脈を防止及び治療するための組成物及び方法。不整脈原性右心室筋症（ARVC）を防止又は治療する方法であって、必要のある対象に、予防又は治療有効量のプラコフィリンー2（PKP2）遺伝子を含む組成物を投与することを含む、方法。本組成物は、PKP2遺伝子を送達するためのアデノウイルス随伴ベクター（AAV）を更に含む。実施形態では、本発明は、AAVが心臓作用性AAV血清型であり、心臓特異のプロモーターを含有することを提供する。異常な心臓細胞間結合部複合体を特徴とする心血管疾患を治療する方法であって、必要のある対象に、予防又は治療有効量のプラコフィリンー2（PKP2）遺伝子を含む組成物を投与することを含む、方法。

【選択図】 図1A

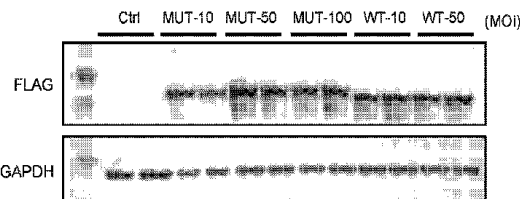


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターであって、5'から3'方向に、

a) 第1のAAV ITR配列と、

b) プロモーター配列と、

c) 導入遺伝子核酸分子であって、前記導入遺伝子核酸分子が、プラコフィリン-2（PKP2）ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、導入遺伝子核酸分子と、

d) 転写後調節エレメントと、

e) ポリA配列と、

f) 第2のAAV ITR配列と、を含む、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）

10

ベクター。

【請求項 2】

配列番号9、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号26、配列番号29、又は配列番号30に記載の核酸配列を含む、rAAVベクター。

【請求項 3】

前記PKP2ポリペプチドが、配列番号1又は配列番号13に記載のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項 4】

前記PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号4又は配列番号14に記載の核酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載のrAAVベクター。

20

【請求項 5】

前記第1のAAV ITR配列が、配列番号7、配列番号8、配列番号15、配列番号15、配列番号19、配列番号20、又は配列番号25に記載の核酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載のrAAVベクター。

【請求項 6】

前記第2のAAV ITR配列が、配列番号7、配列番号8、配列番号15、配列番号15、配列番号19、配列番号20、又は配列番号25に記載の核酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載のrAAVベクター。

【請求項 7】

前記プロモーター配列が、心臓特異的プロモーター配列である、先行請求項のいずれか一項に記載のrAAVベクター。

30

【請求項 8】

前記プロモーター配列が、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意選択的に、RSVエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、ベター-アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、U6プロモーター、H1プロモーター、CAGプロモーター、ハイブリッドチキンβ-アクチンプロモーター、MeCP2プロモーター、EF1プロモーター、遍在性チキンβ-アクチンハイブリッド（CBh）プロモーター、U1aプロモーター、U1bプロモーター、MeCP2プロモーター、MeP418プロモーター、MeP426プロモーター、最小MeCP2プロモーター、VMD2プロモーター、mRhoプロモーター、EF1aプロモーター、Ubcプロモーター、ヒトβ-アクチンプロモーター、TREプロモーター、Ac5プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、CaMKIIaプロモーター、Gal1プロモーター、TEF1プロモーター、GDSプロモーター、ADH1プロモーター、Ubiプロモーター、又はα-1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーターを含む、先行請求項のいずれか一項に記載のrAAVベクター。

40

【請求項 9】

前記プロモーター配列が、心臓トロポニンT（cTnT）プロモーター配列を含む、請求項8に記載のrAAVベクター。

50

【請求項 10】

前記 c T n T プロモーター配列が、配列番号 2 に記載の核酸配列を含む、請求項 9 に記載の r A A V ベクター。

【請求項 11】

前記ポリ A 配列が、ウサギベーターグロビンポリ A 配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

【請求項 12】

前記ウサギベーターグロビンポリ A 配列が、配列番号 6 に記載の核酸配列を含む、請求項 11 に記載の r A A V ベクター。

【請求項 13】

前記転写後調節エレメントが、o P R E 転写後調節エレメントである、先行請求項のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

【請求項 14】

前記 o P R E 転写後調節エレメントが、配列番号 5、配列番号 27、又は配列番号 28 に記載の核酸配列を含む、請求項 13 に記載の r A A V ベクター。

【請求項 15】

5' から 3' 方向に、

- a) 配列番号 7 に記載の核酸配列を含む第 1 の A A V I T R 配列と、
- b) 配列番号 2 に記載の核酸配列を含むプロモーター配列と、
- c) 導入遺伝子核酸分子であって、前記導入遺伝子核酸分子が、P K P 2 ポリペプチドをコードする核酸配列を含み、前記 P K P 2 ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 4 に記載の核酸配列を含む、導入遺伝子核酸分子と、
- d) 配列番号 5 に記載の核酸配列を含む転写後調節エレメントと、
- e) 配列番号 6 に記載の核酸配列を含むポリ A 配列と、
- f) 配列番号 8 に記載の核酸配列を含む第 2 の A A V I T R 配列と、を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の r A A V ベクター。

【請求項 16】

(i) A A V キャプシドタンパク質と、

(i i) 先行請求項のいずれか一項に記載の r A A V ベクターと、を含む、r A A V ウイルスベクター。

【請求項 17】

前記 A A V キャプシドタンパク質が、A A V 1 キャプシドタンパク質、A A V 2 キャプシドタンパク質、A A V 4 キャプシドタンパク質、A A V 5 キャプシドタンパク質、A A V 6 キャプシドタンパク質、A A V 7 キャプシドタンパク質、A A V 8 キャプシドタンパク質、A A V 9 キャプシドタンパク質、A A V 10 キャプシドタンパク質、A A V 11 キャプシドタンパク質、A A V 12 キャプシドタンパク質、A A V 13 キャプシドタンパク質、A A V P H P . B キャプシドタンパク質、A A V r h 7 4 キャプシドタンパク質、又は A A V r h 10 キャプシドタンパク質である、請求項 16 に記載の r A A V ウイルスベクター。

【請求項 18】

前記 A A V キャプシドタンパク質が、A A V 9 又は A A V r h 10 キャプシドタンパク質である、請求項 17 に記載の r A A V ウイルスベクター。

【請求項 19】

a) 請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の r A A V ウイルスベクターと、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤及び／又は添加剤と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 20】

P K P 2 遺伝子が関与する疾患及び／又は障害を有する対象を治療するための方法であって、前記方法が、少なくとも 1 つの治療有効量の請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の r A A V ウイルスベクター、又は請求項 19 に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2 1】

前記 P K P 2 遺伝子が関与する疾患及び／又は障害が、異常な心臓細胞間結合部複合体を特徴とする心血管疾患である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 P K P 2 遺伝子が関与する疾患及び／又は障害が、不整脈原性右心室心筋症（A R V C）である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記有効量が、前記対象における電氣的及び構造的な心臓の完全性を改善する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記有効量が、前記対象における細胞間結合部タンパク質を救済し、再構築する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記有効量が、前記対象における心臓機能を改善する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記有効量が、前記対象において、電氣的及び構造的な完全性を維持して、A R V C を防止する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 r A A V ウイルスペクター又は前記薬学的組成物が、約 1.0×10^{12} v g / k g ～約 2.5×10^{14} v g / k g の範囲の用量で前記対象に投与される、請求項 2 0 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 r A A V ウイルスペクター又は前記薬学的組成物が、約 1.0×10^{12} v g / k g ～約 5.0×10^{13} v g / k g の範囲の用量で前記対象に投与される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 r A A V ウイルスペクター又は前記薬学的組成物が、前記対象に、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内、又は眼周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸膜内、局所、リンパ管内、大槽内、又は神経内投与される、請求項 2 0 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

P K P 2 遺伝子が関与する疾患及び／又は障害の治療を、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の r A A V ウイルスペクター、又は請求項 1 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 1】

前記 P K P 2 遺伝子が関与する疾患及び／又は障害が、A R V C である、請求項 3 0 に記載の使用。

【請求項 3 2】

前記 r A A V ウイルスペクター又は前記薬学的組成物が、約 1.0×10^{12} v g / k g ～約 2.5×10^{14} v g / k g の範囲の用量での前記対象への投与のためのものである、請求項 3 0 又は 3 1 に記載の使用。

【請求項 3 3】

前記 r A A V ウイルスペクター又は前記薬学的組成物が、約 1.0×10^{12} v g / k g ～約 5.0×10^{13} v g / k g の範囲の用量での前記対象への投与のためのものである、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 3 4】

前記 r A A V ウイルスペクター又は前記薬学的組成物が、前記対象への、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内、又は眼周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸膜内、局所、リンパ管内、大槽内、又は神経内投与のためのものである、請求項 3 0 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

使用。

【請求項 35】

前記 r A A V ウイルスベクター又は前記薬学的組成物が、静脈内投与のためのものである、請求項 34 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 4 月 12 日出願の米国仮出願第 63 / 173, 527 号の優先権及び利益を主張する。本出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

参照による配列表の組み込み

2022 年 4 月 12 日に作成され、サイズが 89 KB である「24978-0711__SeqList__ST25」という名称のテキストファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

政府資金援助

本発明は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) によって授与された No. HL142251 に基づき、政府の支援を受けて作製された。政府は、本発明において、ある特定の権利を有する。

20

【0004】

参照による配列表の組み込み

X X X に作成され、サイズが X X X KB である「X X X X」という名称のテキストファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0005】

本発明は、不整脈原性右心室心筋症 (ARVC) に対する遺伝子療法に関する。

【背景技術】

【0006】

これまでのところ、不整脈原性右心室心筋症 (ARVC) に対する有効な治療又は治療、並びに ARVC に特異的な治療モダリティ、スクリーニングレジメン、又は医薬品の無作為化臨床試験は存在しない (1)。現在のアプローチは、症状の緩和を対象としており、ライフスタイルの変更 (心臓突然死を引き起こし得る競技スポーツを回避すること) 及び薬理的介入 (抗不整脈薬、ベータ遮断薬) を中心としている (2、3)。これらのアプローチは、患者が薬理的療法に応答しないようになるか又は不耐容性になった場合、植込み型心臓除細動器 (ICD)、心臓カテーテルアブレーション、又は心臓移植を含む、より侵襲的な行為へと移行する場合がある (2、3)。ICD は、デバイス / リードに関連する合併症が頻繁に生じ、カテーテルアブレーションは、新しい不整脈誘発箇所の発生に起因して再発しやすく、心臓移植は、術後 10 年で 23 % の死亡率を有する (3)。これらの要因は、疾患進行を防止又は停止する手段として、ARVC の分子トリガー (細胞間結合部破壊) を標的とすることができる新しい予防戦略及び治療戦略を同定する重要な必要性を強調している。

30

40

【発明の概要】

【0007】

本開示は、5' から 3' 方向に、a) 第 1 の A A V I T R 配列と、b) プロモーター配列と、c) 導入遺伝子核酸分子であって、導入遺伝子核酸分子が、プラコフィリン-2 (PKP2) ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、導入遺伝子核酸分子と、d) 転写後調節エレメントと、e) ポリ A 配列と、f) 第 2 の A A V I T R 配列と、を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクターを提供する。

【0008】

本開示は、配列番号 9、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、

50

配列番号 24、配列番号 26、配列番号 29、又は配列番号 30 に記載の核酸配列を含む、rAAVベクターを提供する。

【0009】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 13 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0010】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号 4 又は配列番号 14 に記載の核酸配列を含む。

【0011】

いくつかの態様では、第 1 の AAV ITR 配列は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 15、配列番号 15、配列番号 19、配列番号 20、又は配列番号 25 に記載の核酸配列を含む。いくつかの態様では、第 2 の AAV ITR 配列は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 15、配列番号 15、配列番号 19、配列番号 20、又は配列番号 25 に記載の核酸配列を含む。

【0012】

いくつかの態様では、プロモーター配列は、心臓特異的プロモーター配列である。

【0013】

いくつかの態様では、プロモーター配列は、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR プロモーター (任意選択的に、RSV エンハンサーを伴う)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、SV40 プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、ベーターアクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター、U6 プロモーター、H1 プロモーター、CAG プロモーター、ハイブリッドチキンβ-アクチンプロモーター、MeCP2 プロモーター、EF1 プロモーター、遍在性チキンβ-アクチンハイブリッド (CBh) プロモーター、U1a プロモーター、U1b プロモーター、MeCP2 プロモーター、MeP418 プロモーター、MeP426 プロモーター、最小 MeCP2 プロモーター、VMD2 プロモーター、mRhο プロモーター、EF1a プロモーター、Ubc プロモーター、ヒトβ-アクチンプロモーター、TRE プロモーター、Ac5 プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、CaMKIIa プロモーター、Gal1 プロモーター、TEF1 プロモーター、GDS プロモーター、ADH1 プロモーター、Ubi プロモーター、又はα-1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーターを含む。いくつかの態様では、プロモーター配列は、心臓トロポニン T (cTnT) プロモーター配列を含む。いくつかの態様では、cTnT プロモーター配列は、配列番号 2 に記載の核酸配列を含む。

【0014】

いくつかの態様では、ポリ A 配列は、ウサギベーターグロビンポリ A 配列を含む。いくつかの態様では、ウサギベーターグロビンポリ A 配列は、配列番号 6 に記載の核酸配列を含む。

【0015】

いくつかの態様では、転写後調節エレメントは、oPRE 転写後調節エレメントである。いくつかの態様では、oPRE 転写後調節エレメントは、配列番号 5、配列番号 27、又は配列番号 28 に記載の核酸配列を含む。

本開示は、5' から 3' 方向に、a) 配列番号 7 に記載の核酸配列を含む第 1 の AAV ITR 配列と、b) 配列番号 2 に記載の核酸配列を含むプロモーター配列と、c) 導入遺伝子核酸分子であって、導入遺伝子核酸分子が、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列を含み、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号 4 に記載の核酸配列を含む、導入遺伝子核酸分子と、d) 配列番号 5 に記載の核酸配列を含む転写後調節エレメントと、e) 配列番号 6 に記載の核酸配列を含むポリ A 配列と、f) 配列番号 8 に記載の核酸配列を含む第 2 の AAV ITR 配列と、を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の rAAVベクターを提供する。

【0016】

10

20

30

40

50

本開示は、(i) AAVキャプシドタンパク質と、(ii) 先行請求項のいずれか一項に記載の rAAVベクターと、を含む、rAAVウイルスベクターを提供する。

【0017】

いくつかの態様では、AAVキャプシドタンパク質は、AAV1キャプシドタンパク質、AAV2キャプシドタンパク質、AAV4キャプシドタンパク質、AAV5キャプシドタンパク質、AAV6キャプシドタンパク質、AAV7キャプシドタンパク質、AAV8キャプシドタンパク質、AAV9キャプシドタンパク質、AAV10キャプシドタンパク質、AAV11キャプシドタンパク質、AAV12キャプシドタンパク質、AAV13キャプシドタンパク質、AAVPHP.Bキャプシドタンパク質、AAVrh74キャプシドタンパク質、又はAAVrh10キャプシドタンパク質である。いくつかの態様では、AAVキャプシドタンパク質は、AAV9又はAAVrh10キャプシドタンパク質である。

10

【0018】

本開示は、a) 本開示のいずれかの実施形態の rAAVウイルスベクターと、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤及び／又は添加剤と、を含む、薬学的組成物を提供する。

【0019】

本開示は、PKP2遺伝子が関与する疾患及び／又は障害を有する対象を治療するための方法であって、方法が、少なくとも1つの治療有効量の本開示のいずれかの実施形態の rAAVウイルスベクター又は本開示のいずれかの実施形態の薬学的組成物を対象に投与

20

【0020】

いくつかの態様では、PKP2遺伝子が関与する疾患及び／又は障害は、異常な心臓細胞間結合部複合体を特徴とする心血管疾患である。

【0021】

いくつかの態様では、PKP2遺伝子が関与する疾患及び／又は障害は、不整脈原性右心室心筋症 (ARVC) である。

【0022】

いくつかの態様では、有効量は、対象における電氣的及び構造的な心臓の完全性を改善する。いくつかの態様では、有効量は、対象における細胞間結合部タンパク質を救済し、再構築する。いくつかの態様では、有効量は、対象における心臓機能を改善する。いくつかの態様では、有効量は、対象において電氣的及び構造的な完全性を保持して、ARVCを防止する。

30

【0023】

いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、約 1.0×10^{12} vg/kg ~ 約 2.5×10^{14} vg/kg の範囲の用量で対象に投与される。いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、約 1.0×10^{12} vg/kg ~ 約 5.0×10^{13} vg/kg の範囲の用量で対象に投与される。

【0024】

いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、対象に、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内、又は眼周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸腔内、局所、リンパ管内、大槽内、又は神経内投与される。

40

【0025】

いくつかの態様では、PKP2遺伝子が関与する疾患及び／又は障害の治療を、それを必要とする対象において行うことに使用するための、本開示の実施形態のうちのいずれか1つの rAAVウイルスベクター又は本開示のいずれかの実施形態の薬学的組成物。

【0026】

いくつかの態様では、PKP2遺伝子が関与する疾患及び／又は障害は、ARVCである。

50

【0027】

いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、約 1.0×10^{12} vg/kg～約 2.5×10^{14} vg/kgの範囲の用量での対象への投与のためのものである。いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、約 1.0×10^{12} vg/kg～約 5.0×10^{13} vg/kgの範囲の用量での対象への投与のためのものである。

【0028】

いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、対象への、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内、又は眼周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸腔内、局所、リンパ管内、大槽内、又は神経内投与のためのものである。いくつかの態様では、rAAVウイルスベクター又は薬学的組成物は、静脈内投与のためのものである。

10

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】アデノ（随伴）ウイルス技術が、PKP2タンパク質を安定的に発現することができることを示す。図1Aは、新生児心筋細胞のアデノウイルス形質導入後の変異型（MUT）及び野生型（WT）PKP2タンパク質の、示された感染多重度（MOI）でのウエスタンブロット分析を示す。FLAG抗体は、PKP2を認識し、GAPDHは、ローディング対照として機能する。

【図1B】アデノ（随伴）ウイルス技術が、PKP2タンパク質を安定的に発現することができることを示す。図1Bは、野生型（WT）マウスにおける出生後2日目（P2）のAAV9 PKP2の早期腹腔内注射、及び4週間後の心臓の分析の概略図を示す。

20

【図1C】アデノ（随伴）ウイルス技術が、PKP2タンパク質を安定的に発現することができることを示す。図1Cは、生後2日目（P2）のAAV9 PKP2注射後のPKP2タンパク質のウエスタンブロット分析を示す。PKP2抗体は、内因性及び形質導入されたPKP2を認識し、FLAG抗体は、形質導入されたPKP2のみを認識し、GAPDHは、ローディング対照として機能する。

【図2】インビトロでのPKP2タンパク質量の上昇が、心臓細胞間結合部を再構築することを示す。PKP2ホモ接合型変異型新生児心筋細胞（Hom CM）の、野生型（WT）又は変異型（MUT）PKP2アデノウイルスによる形質導入後の、デスモソーム（PKP2、DSP、DSG2、JUP）、付着筋膜（fascia-adherens）（N-Cad）、及びギャップ結合部（Cx43）のタンパク質のウエスタンブロット分析。GAPDHは、ローディング対照として機能する。

30

【図3A】早期AAV9 PKP2投与が、心臓細胞間結合部を復元し、心臓形態を改善することを示す。図3Aは、PKP2ホモ接合型変異型（PKP2 Hom）マウスにおける出生後2日目（P2）のAAV9 PKP2の早期腹腔内注射、及び4週間後の心臓の分析の概略図を示す。

【図3B】早期AAV9 PKP2投与が、心臓細胞間結合部を復元し、心臓形態を改善することを示す。図3Bは、デスモソームタンパク質（PKP2、DSP、DSG2、JUP）、付着筋膜タンパク質（N-CAD）、及びギャップ結合部タンパク質（Cx43）についての、対照（Ctrl）、AAV9-PKP2で治療したPKP2 Hom心臓、及びウイルス治療を伴わないPKP2 Hom心臓のウエスタンブロット分析を示す。GAPDHは、ローディング対照として機能する。

40

【図3C】早期AAV9 PKP2投与が、心臓細胞間結合部を復元し、心臓形態を改善することを示す。図3Cは、対照（Ctrl）、未治療のPKP2ホモ接合型変異型（Hom）心臓、及びAAV9-PKP2で治療したPKP2 Hom心臓の心臓重量（HW）対体重（BW）比分析を示す。標準偏差を用いた中央値。 $n=5$ Ctrl、 $n=5$ Hom、 $n=3$ Hom-AAV9 PKP2。Tukey事後検定による一元配置分散分析。 $**$ 、 $p<0.01$ 。

【図4A】早期AAV9 PKP2投与が、心臓の機能的及び電気的機能障害を防止する

50

ことを示す。図4Aは、対照 (Ctrl)、AAV9 GFPで治療したPKP2ホモ接合型変異型 (Hom)、及びAAV9 PKP2で治療したPKP2 Homの心臓の代表的な短軸心臓磁気共鳴画像を示す。

【図4B】早期AAV9 PKP2投与が、心臓の機構的及び電気的機能障害を防止することを示す。図4Bは、左心室 (LV) 及び右心室 (RV) における心拍数、並びに駆出率 (EF)、拡張末期容積 (EDV)、及び収縮末期容積 (ESV) の定量化を示す。標準偏差を用いた中央値。n=5 Ctrl、n=5 Hom-AAV9 GFP、n=6 Hom-AAV9 PKP2。Tukey事後検定による二元配置分散分析。****、 $p < 0.0001$ 。**、 $p < 0.01$ 。*、 $p < 0.05$ 。

【図4C】早期AAV9 PKP2投与が、心臓の機構的及び電気的機能障害を防止することを示す。図4Cは、対照 (Ctrl)、AAV9 GFPで治療したPKP2ホモ接合型変異型 (Hom)、及びAAV9 PKP2で治療したPKP2 Homの心臓の代表的な複合的表面心電図を示す。スケールバー=20ms。

【図4D】早期AAV9 PKP2投与が、心臓の機構的及び電気的機能障害を防止することを示す。図4Dは、心拍数、PR間隔、及びQRS間隔の定量化を示す。標準偏差を用いた中央値。n=5 Ctrl、n=5 Hom-AAV9 GFP、n=4 Hom-AAV9 PKP2。Tukey事後検定による一元配置分散分析。*、 $p < 0.05$ 。

【図4E】早期AAV9 PKP2投与が、心臓の機構的及び電気的機能障害を防止することを示す。図4Eは、経時的な電気活動を示す代表的な表面心電図を示す。心室期外収縮 (PVC) を、矢印で示す。PVCを有するマウスのパーセンテージの各条件での定量化。

【図5A】早期AAV9 PKP2投与が、心臓形態を保存し、病原性のある組織リモデリングを防止することを示す。図5Aは、ヘマトキシリン及びエオシン染色した、対照 (Ctrl)、AAV9 GFPで治療したPKP2ホモ接合型変異型 (Hom)、及びAAV9 PKP2で治療したPKP2 Homの心臓からの代表的な心臓組織学的切片を示す。スケールバー=1mm。

【図5B】早期AAV9 PKP2投与が、心臓形態を保存し、病原性のある組織リモデリングを防止することを示す。図5Bは、線維症についてマッソントリクローム染色した、左心室 (LV) 及び右心室 (RV) 内のCtrl、Hom-AAV9 GFP、及びHom-AAV9 PKP2からの代表的な心臓組織学的切片を示す。スケールバー=100µm。

【図5C】早期AAV9 PKP2投与が、心臓形態を保存し、病原性のある組織リモデリングを防止することを示す。図5Cは、Ctrl、Hom-AAV9 GFP、及びHom-AAV9 PKP2の心臓からの線維症促進性遺伝子コラーゲンI型アルファ1 (Col1a1) の、RNAを用いた逆転写定量PCR分析を示す。標準偏差を用いた中央値。n=4 Ctrl、n=4 Hom-AAV9 GFP、n=6 Hom-AAV9 PKP2。Tukey事後検定による一元配置分散分析。*、 $p < 0.05$ 。

【図6A】早期AAV9 PKP2投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図6Aは、Ctrl、PKP2ホモ接合型変異型 (Hom)、及びPKP2 Hom-AAV9 PKP2マウスの生存率分析を示す。

【図6B】早期AAV9 PKP2投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図6Bは、月齢6か月のCtrl及びPKP2 Hom-AAV9 PKP2の心臓の代表的な短軸心臓磁気共鳴画像を示す。

【図6C】早期AAV9 PKP2投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図6Cは、月齢6か月の左心室 (LV) 及び右心室 (RV) の駆出率 (EF) 定量化を示す。標準偏差を用いた中央値。n=2 Ctrl、n=4 Hom-AAV9 PKP2。Tukey事後検定による二元配置分散分析。

【図6D】早期AAV9 PKP2投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図6Dは、月齢6か月のCtrl及びPKP2 Hom-AAV9 PKP2の心臓の代表的な複合的表面心電図を示す。スケールバー=10ms。

【図 6 E】早期 AAV9 PKP2 投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図 6 E は、心拍数、PR 間隔、及び QRS 間隔の定量化を示す。標準偏差を用いた中央値。n = 2 Ctrl、n = 4 Hom-AAV9 PKP2。対応のない t 検定。

【図 6 F】早期 AAV9 PKP2 投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図 6 F は、デスモソームタンパク質 (PKP2、DSP、DSG2、JUP)、付着筋膜タンパク質 (N-CAD)、及びギャップ結合部タンパク質 (CX43) についての、Ctrl 及び PKP2 Hom-AAV9 PKP2 の心臓のウエスタンブロット分析を示す。GAPDH は、ローディング対照として機能する。

【図 6 G】早期 AAV9 PKP2 投与が、生存率を改善し、耐久性のある心臓保護を提供することを示す。図 6 G は、アルカリホスファターゼ (ALP) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 肝臓酵素レベルについての血清分析を示す。標準偏差を用いた中央値。n = 5 Ctrl、n = 6 Hom-AAV9 PKP2。対応のない t 検定。

【図 7 A】遅い段階での AAV9 PKP2 の投与が、細胞間結合部タンパク質レベル及び機能的機能を改善することを示す。図 7 A は、PKP2 ホモ接合型変異型 (PKP2 Hom) マウス (疾患特徴が存在する) における 4 週間での AAV9 PKP2 の後眼窩注射、及び 2 週間後の心臓の分析の概略図を示す。

【図 7 B】遅い段階での AAV9 PKP2 の投与が、細胞間結合部タンパク質レベル及び機能的機能を改善することを示す。図 7 B は、デスモソームタンパク質 (PKP2、DSP、DSG2、JUP)、付着筋膜タンパク質 (N-CAD)、及びギャップ結合部タンパク質 (CX43) についての、Ctrl、PKP2 Hom-AAV9 GFP、及び PKP2 Hom-AAV9 PKP2 の心臓のウエスタンブロット分析を示す。GAPDH は、ローディング対照として機能する。

【図 7 C】遅い段階での AAV9 PKP2 の投与が、細胞間結合部タンパク質レベル及び機能的機能を改善することを示す。図 7 C は、注射 2 週間後の拡張末期及び収縮末期の両方における、PKP2 Hom-AAV9 GFP 及び PKP2 Hom-AAV9 PKP2 の心臓の代表的な短軸心臓磁気共鳴画像を示す。

【図 7 D】遅い段階での AAV9 PKP2 の投与が、細胞間結合部タンパク質レベル及び機能的機能を改善することを示す。図 7 D は、注射 2 週間後の左心室 (LV) 及び右心室 (RV) の駆出率 (EF) 定量化を示す。標準偏差を用いた中央値。n = 6 Hom-AAV9 GFP、n = 6 Hom-AAV9 PKP2。Tukey 事後検定による二元配置分散分析。**, p < 0.01。*, p < 0.05。

【図 7 E】図 7 E は、Ctrl、PKP2 Hom-AAV9 GFP、及び PKP2 Hom-AAV9 PKP2 マウスの生存率分析を示す。ログランク検定。***, p < 0.001。

【図 8 A】アデノ (随伴) ウイルス技術が、成体マウス心臓においてヒト PKP2 タンパク質を安定的に発現し、PKP2 Hom マウスにおいて ARVC 疾患の転帰を回避することができることを示す。成体野生型対照マウスの心臓に送達された AAV9-hPKP2 又は AAVrh10-PKP2 のウエスタンブロット分析である。AAV9-hPKP2 を用いた研究 1 は、マウスの心臓における発現を評価する前に、10 日間の持続時間を有した。AAVrh10-hPKP2 を用いた研究 2 は、マウスの心臓及び肝臓における発現を評価する前に、21 日間の持続時間を有した。PKP2 及び DSP の発現は、ベータアクチン、及びローディング対照として機能する GAPDH を用いて評価した。

【図 8 B】アデノ (随伴) ウイルス技術が、成体マウス心臓においてヒト PKP2 タンパク質を安定的に発現し、PKP2 Hom マウスにおいて ARVC 疾患の転帰を回避することができることを示す。PKP2 Hom マウスにおける、(AAV9 及び AAVrh10 を介した) 製剤及び hPKP2 の早期投与 (出生後 2 日目 (P2)) 後の 4 週間の生存率曲線を示す (deipct)。

【図 8 C】アデノ (随伴) ウイルス技術が、成体マウス心臓においてヒト PKP2 タンパク質を安定的に発現し、PKP2 Hom マウスにおいて ARVC 疾患の転帰を回避する

10

20

30

40

50

ことができることを示す。(AAV9及びAAVrh10を介した)製剤及びhPKP2の表面ECG分析及び早期投与(P2)後の、PKP2 Homマウスにおける異所性拍動/心室期外収縮(PVC)の棒グラフ分析を示す。

【図8D】アデノ(随伴)ウイルス技術が、成体マウス心臓においてヒトPKP2タンパク質を安定的に発現し、PKP2 HomマウスにおいてARVC疾患の転帰を回避することができることを示す。野生型対照未治療マウス、製剤で治療したPKP2 Hom、AAV9-hPKP2治療PKP2 Hom、及びAAVrh10-hPKP2治療PKP2 Homからの、拡張末期における磁気共鳴画像の代表的な心臓短軸図を示す。拡張末期の各群の右心室(RV)及び左心室(LV)の寸法を概説している。

【図8E】アデノ(随伴)ウイルス技術が、成体マウス心臓においてヒトPKP2タンパク質を安定的に発現し、PKP2 HomマウスにおいてARVC疾患の転帰を回避することができることを示す。野生型対照未治療マウス、製剤で治療したPKP2 Hom、AAV9-hPKP2治療PKP2 Hom、及びAAVrh10-hPKP2治療PKP2 Homからの心臓における、PKP2及び細胞間結合部タンパク質(デスモプラキン(DSP)、デスモグレイン-2(DSG2)、コネキシン43(Cx43)、N-カドヘリン(NCAD)、プラコグロビン(JUP)のウェスタンブロット分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本出願において言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個々に示された場合と同じ程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【0031】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語、並びに任意の頭字語は、本発明の分野における当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様の又は等価な任意の方法及び材料が本発明の実施に使用され得るが、例示的な方法、デバイス、及び材料が本明細書に記載されている。

【0032】

本発明の実施は、特に示さない限り、当該技術分野内である、分子生物学(組換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の従来技法を用いるであろう。そのような技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Sambrook et al., 1989)、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)、Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987)、Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987、及び定期的な更新)、PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994)、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003)、及びRemington, The Science and Practice of Pharmacy, 22th ed., (Pharmaceutical Press and Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences 2012)などの文献で完全に説明されている。

【0033】

本発明は、心臓不整脈を防止及び治療するための組成物及び方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、不整脈原性右心室心筋症(ARVC)を防止又は治療する方法であって、必要のある対象に、予防又は治療有効量のプラコフィリン-2(PKP2)遺伝子を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0034】

いくつかの態様では、組成物がPKP2遺伝子を送達するためのアデノウイルス随伴ベクター(AAV)を更に含む、本発明を提供する。いくつかの態様では、AAVが心臓作用性AAV血清型であり、心臓特異的プロモーターを含有する、本発明を提供する。

【0035】

本開示は、とりわけ、プラコフィリン-2(PKP2)ポリペプチドをコードする核酸配列を含む導入遺伝子核酸分子を含む、単離ポリヌクレオチド、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター、及びrAAVウイルスベクターを提供する。本開示はまた、これらの単離ポリヌクレオチド、rAAVベクター、及びrAAVウイルスベクターを製造する方法、並びにPKP2遺伝子の喪失及び／又は不適切な機能に関連付けられる疾患を含む疾患又は障害を治療又は防止するために導入遺伝子を送達するためのそれらの使用を提供する。

【0036】

本開示は、ARVCにおける、心臓細胞間結合部複合体を足場形成及び再構築し、電氣的及び構造的な異常の両方を緩和するための、プラコフィリン-2(PKP2)をコードする核酸配列を含むrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターを提供する。公開されている研究は、心臓細胞間結合部複合体を再構築し、ARVC疾患の発症を防止するための、単一の遺伝子(デスモソーム又はそれ以外)の十分性を示していない。多くのものの中でも、本開示は、蔓延しているヒトPKP2変異を有する新生児心筋細胞におけるPKP2のAAV媒介性送達、このモデルにおいて心臓の電氣的及び構造的な異常を駆動する心臓細胞間結合部タンパク質の喪失を救済することができることを実証している。更に、本開示は、この蔓延しているヒトPKP2変異を有するPKP2変異型新生児心筋細胞における、PKP2のAAV媒介性送達、同様に、心臓細胞間結合部タンパク質の喪失を救済することができることを示しており、PKP2タンパク質投薬量の喪失が、このモデルにおける心臓の構造的及び電氣的欠損の重要な推進力であることを示唆している。本開示は、この蔓延しているヒトPKP2変異を有する新生児マウスにおけるAAV媒介性PKP2遺伝子療法の早期段階投与が、心臓細胞間結合部複合体の出生後の分解を防止し、成体ARVC疾患の発症を防止(心臓の電氣的及び機能的機能の保存)し、並びにマウスの寿命を有意に改善するのに十分であったことを更に実証している。本開示は、この蔓延しているヒトPKP2変異を有する成体マウスにおけるアデノ随伴ウイルス媒介性PKP2遺伝子療法の後期段階での投与が、細胞間結合部タンパク質を救済及び再構築し、心臓機能を改善し、並びに死亡を防止するのに十分であったことを更に示している。このデータは、PKP2が、心臓細胞間結合部を再構成することが可能な効率的な分子足場として機能し、PKP2遺伝子療法が、予防的に又は疾患進行の後期に投与された場合、ARVC患者にとって貴重な治療選択肢として機能することができることをことごとく強調している。

【0037】

本明細書で使用される「アデノ随伴ウイルス」又は「AAV」という用語は、この名称に関連付けられ、Dependoparvovirus属Parvoviridae科に属するウイルスのクラスのメンバーを指す。アデノ随伴ウイルスは、ある特定の機能が同時感染ヘルパーウイルスによって提供される、細胞内で成長する一本鎖DNAウイルスである。AAVの一般情報及び考察は、例えば、Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol 1, pp. 169-228、及びBerns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York)に見出すことができる。様々な血清型が、遺伝子レベルにおいてでさえ、構造的及び機能的の両方で非常に密接に関連していることが周知であるので、これらの考察に記載の同じ原理が、考察の公開日後に特徴評価された追加のAAV血清型に適用可能であろうことが十分予想される。(例えば、Blacklowe, 1988, Parvoviruses and Human Diseaseの165~174頁, J. R. Pattison, ed.、及びRose, Comprehensive Vir

ology 3:1-61 (1974) を参照されたい)。例えば、全ての AAV 血清型は、相同 rep 遺伝子によって媒介される非常に類似した複製特性を明らかに呈し、これらは全て、AAV2 で発現されたものなどの 3 つの関連キャプシドタンパク質を有する。関連性の程度は、ゲノムの長さに沿った血清型間の広範なクロスハイブリダイゼーション、及び「逆位末端反復配列」(ITR) に対応する末端における類似の自己アニーリングセグメントの存在を明らかにするヘテロ二本鎖分析によって更に示唆される。同様の感染性パターンは、各血清型における複製機能が同様の調節制御下にあることも示唆する。このウイルスの複数の血清型は、遺伝子送達に好適であることが知られており、全ての既知の血清型は、様々な組織タイプからの細胞に感染し得る。当該技術分野では、少なくとも 11 個の連番の AAV 血清型が既知である。本明細書に開示の方法において有用な、非限

10

定的な例示的な血清型としては、11 個の血清型、例えば、AAV2、AAV8、AAV9、又はバリエーション血清型、例えば、AAV-DJ 及び AAV-PPH. B のうちのいずれかが挙げられる。AAV 粒子は、3 つの主要なウイルスタンパク質：VP1、VP2、及び VP3 を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、AAV は、血清型 AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-PPH. B、AAVrh74、又は AAVrh10 を指す。

【0038】

例示的なアデノ随伴ウイルス及び組換えアデノ随伴ウイルスとしては、限定されないが、全ての血清型（例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-PPH. B、AAVrh74、及び AAVrh10）が挙げられる。例示的なアデノ随伴ウイルス及び組換えアデノ随伴ウイルスとしては、限定されないが、1 つの血清型のゲノム及び別の血清型のキャプシド（例えば、AAV2/5、AAV-DJ、及び AAV-DJ8）を含有する自己相補型 AAV (scAAV) 及び AAV ハイブリッドが挙げられる。例示的なアデノ随伴ウイルス及び組換えアデノ随伴ウイルスとしては、限定されないが、rAAV-LK03、AAV-KP-1 (Kerun et al. JCI Insight, 2019; 4(22): e131610 に詳細に記載されている)、及び AAV-NP59 (Paulk et al. Molecular Therapy, 2018; 26(1): 289-303 に詳細に記載されている) が挙げられる。

20

30

【0039】

AAV の構造及び機能

AAV は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖 DNA ゲノムは、2 つの 145 ヌクレオチド逆位末端反復 (ITR) を含み、長さが約 4.7 kb である。AAV には複数の血清型が存在する。AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列が既知である。例えば、AAV-1 の完全なゲノムは、GenBank 受託番号 NC_002077 に提供され、AAV-2 の完全なゲノムは、GenBank 受託番号 NC_001401 及び Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983) に提供され、AAV-3 の完全なゲノムは、GenBank 受託番号 NC_01829 に提供され、AAV-4 の完全なゲノムは、GenBank 受託番号 NC_001829 に提供され、AAV-5 ゲノムは、GenBank 受託番号 AF085716 に提供され、AAV-6 の完全なゲノムは、GenBank 受託番号 NC_001862 に提供され、AAV-7 及び AAV-8 ゲノムの少なくとも一部分は、GenBank 受託番号 AX753246 及び AX753249 にそれぞれ提供され、AAV-9 ゲノムは、Gao et al. J. Virol., 78: 6381-6388 (2004) に提供され、AAV-10 ゲノムは、Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006) に提供され、AAV-11 ゲノムは、Virology, 330(2): 375-383 (2004) に提供される。AAVrh. 74 ゲノムの配列は、米国特許第 9,434,928 号に提供される。米国特許第 9,434,928 号はまた、キャプシドタンパク質及び自己相補型ゲノムの配列を提供する。一態様では、AAV ゲノムは、自己相補型ゲノムである。

40

50

ウイルスDNA複製 (rep)、キャプシド化／パッケージング、及び宿主細胞染色体組み込みを指示するシス作用配列は、AAV ITR内に含有される。(それらの相対的なマップ位置に対してp5、p19、及びp40と名付けられている) 3つのAAVプロモーターは、rep及びcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一のAAVイントロンの(ヌクレオチド2107及び2227における) 差動スプライシングによって結合した2つのrepプロモーター(p5及びp19)は、rep遺伝子から4つのrepタンパク質(rep78、rep68、rep52、及びrep40)の産生を生じる。repタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製を担う複数の酵素特性を有する。

【0040】

cap遺伝子は、p40プロモーターから発現され、3つのキャプシドタンパク質、VP1、VP2、及びVP3をコードする。代替的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連するキャプシドタンパク質の産生を担う。より具体的には、VP1、VP2、及びVP3タンパク質の各々が翻訳される単一のmRNAが転写された後、2つの異なる様式でスプライシングされ得る：より長い又はより短いイントロンのいずれかが切除され得、mRNAの2つのプール：2.3 kb長及び2.6 kb長のmRNAプールの形成を生じる。多くの場合、長いイントロンが好ましく、したがって、2.3 kb長のmRNAは、メジャースプライスバリエーションと呼ばれ得る。この形態は、VP1タンパク質の合成が始まる最初のAUGコドンを欠き、VP1タンパク質合成の全体レベルの低減を生じる。メジャースプライスバリエーションに残存する最初のAUGコドンは、VP3タンパク質の開始コドンである。しかしながら、同じオープンリーディングフレーム内のそのコドンの上流には、最適なKozak (翻訳開始) 配列によって囲まれたACG配列(スレオニンをコードする)が存在する。いくつかの態様では、Kozak配列は、配列番号3に記載されている。これは、VP2タンパク質の低レベルの合成に寄与し、VP1と同様に、これは、実際には、追加のN末端残基を含むVP3タンパク質であり、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Becerra SP et al., (December 1985). "Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82 (23): 7919-23, Cassinotti P et al., (November 1988). "Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1". Virology. 167 (1): 176-84, Muralidhar S et al., (January 1994). "Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons: effects on regulation of synthesis and biological activity". Journal of Virology. 68 (1): 170-6、及びTrempe JP, Carter BJ (September 1988). "Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein". Journal of Virology. 62 (9): 3356-63に記載されている。単一のコンセンサスポリA部位は、AAVゲノムのマップ95位に位置する。AAVのライフサイクル及び遺伝学は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992)に考察されている。

【0041】

10

20

30

40

50

各VP1タンパク質は、VP1部分、VP2部分、及びVP3部分を含有する。VP1部分は、VP1タンパク質に固有である、VP1タンパク質のN末端部分である。VP2部分は、VP2タンパク質のN末端部分にも見出される、VP1タンパク質内に存在するアミノ酸配列である。VP3部分及びVP3タンパク質は、同じ配列を有する。VP3部分は、VP1及びVP2タンパク質と共有される、VP1タンパク質のC末端部分である。

【0042】

VP3タンパク質は、別個の可変表面領域I-I X (VR-I-I X)へと更に分割することができる。その内容が参照により本明細書に組み込まれるDimatta et al., "Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9" J. Virol., Vol. 86 (12): 6947-6958, June 2012に記載されているように、可変表面領域(VR)の各々は、単独で、又は他のVRの各々の特定のアミノ酸配列と組み合わせるのいずれかで、固有の感染血清型(例えば、他のAAV血清型と比較して、抗原性の減少、形質導入の改善、及び/又は組織特異的傾向性)を、特定の血清型に付与することができる、特定のアミノ酸配列を含み得るか又は含有し得る。

【0043】

AAVは、例えば、遺伝子療法において、細胞に外来DNAを送達するためのベクターとして魅力的である、固有の特徴を有する。培養物中の細胞のAAV感染は、非細胞変性であり、ヒト及び他の動物の自然感染は、無痛性及び無症候性である。更に、AAVは、多くの哺乳動物細胞に感染し、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を可能にする。更に、AAVは、ゆっくりと分裂する細胞及び非分裂細胞を形質導入し、転写活性核エピソーム(染色体外エレメント)としてそれらの細胞の生涯にわたって本質的に持続し得る。AAVプロウイルスゲノムは、プラスミド中にクローンDNAとして挿入され、これによって、組換えゲノムの構築が実現可能になる。更に、AAV複製及びゲノムキャプシド化を指示するシグナルは、AAVゲノムのITR内に含有されるので、(複製及び構造キャプシドタンパク質、rep-capをコードする)ゲノムの内部およそ4.3 kbの一部又は全てが、外来DNAで置き換えられて、AAVベクターを生成することができる。repタンパク質及びcapタンパク質は、トランスで提供され得る。AAVの別の重要な特徴は、非常に安定的かつ豊富なウイルスであることである。アデノウイルスを不活化するために使用される条件(数時間にわたって56℃~65℃)に容易に耐え、AAVの低温保存の重要性を低くする。AAVは、凍結乾燥することさえできる。最後に、AAV感染細胞は、重感染に耐性ではない。

【0044】

複数の研究によって、筋肉における長期(>1.5年)の組換えAAV媒介性タンパク質発現が実証されている。Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659-669 (1997)、Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 14082-14087 (1996)、及びXiao et al., J Virol, 70: 8098-8108 (1996)を参照されたい。また、Chao et al., Mol Ther, 2: 619-623 (2000)及びChao et al., Mol Ther, 4: 217-222 (2001)も参照されたい。更に、Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804-5809 (1997)及びMurphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13921-13926 (1997)に記載されているように、筋肉は高度に血管化されているので、組換えAAV形質導入は、筋肉内注射後、全身循環において導入遺伝子産生物の出現を生じる。更に、Lewis et al., J Virol, 76: 8769-8775 (2002)は、骨格筋繊維が、正しい抗体グリコシル化、折り畳み、及び分泌に必要な細胞因子を有することを実証しており、筋肉が、分泌タンパク質療法薬の安定的な発現が可能であることを示して

いる。本発明の組換えAAV (rAAV) ゲノムは、療法用タンパク質 (例えば、PKP2) をコードする核酸分子と、核酸分子に隣接する1つ以上のAAV ITRを含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。擬似型rAAVの産生は、例えば、WO2001/083692に開示されている。他のタイプのrAAVバリエーション、例えば、キャプシド変異を有するrAAVも企図される。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22 (11): 1900-1909 (2014) を参照されたい。当該技術分野では、様々なAAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列が既知である。

【0045】

導入遺伝子配列を含む単離ポリヌクレオチド

10

本開示は、少なくとも1つの導入遺伝子核酸分子を含む単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0046】

いくつかの態様では、導入遺伝子核酸分子は、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列、又はその少なくとも1つの断片を含み得る。当業者によって理解されるであろうように、PKP2は、ヒトゲノムにおいて、PKP2遺伝子によってコードされる。したがって、導入遺伝子核酸分子は、PKP2配列又はその任意の断片を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。いくつかの態様では、導入遺伝子核酸分子は、PKP2ポリペプチドの生物学的等価物をコードする核酸配列を含み得る。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、当該技術分野で既知のPKP2の任意のアイソフォームであり得る。いくつかの態様では、PKP2アイソフォームは、PKP2 2aアイソフォームであり得る。いくつかの態様では、PKP2アイソフォームは、PKP2 2bアイソフォームであり得る。

20

【0047】

本明細書で使用される場合、かつ特に指定しない限り、本明細書に記載のプラコフィリン-2 (PKP2) 遺伝子は、機能的PKP2タンパク質をコードする核酸配列を意味する。遺伝子又はコードされたタンパク質は、天然に存在し得るか、又は修飾され得るが、本明細書に記載のその療法的活性を保持している。遺伝子又はコードされたタンパク質は、公開された文献で周知であるような、ヒト由来のものを含む、哺乳動物における単離された天然に存在するPKP2遺伝子又はタンパク質のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を有し得る。

30

【0048】

「PKP2」という用語は、プラコフィリン-2完全長タンパク質、及びその機能的断片を指し、100%の配列同一性を有する完全長ドメイン及びそのバリエーションの少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、最も好ましくは99%のセグメントを含むアミノ酸配列を含む。本開示によって包含されるように、アミノ酸配列の変動が企図されるが、ただし、アミノ酸配列のバリエーションが、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、最も好ましくは99%を維持することを条件とする。75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、及び99%の配列同一性などの間のある特定のパーセンテージが含まれる。特に、保存的アミノ酸置き換えが企図される。保存的置き換えは、それらの側鎖に関連するアミノ酸のファミリー内で行われるものである。遺伝学的にコードされるアミノ酸は、一般に、以下のファミリーへと分割される：

40

(1) 酸性アミノ酸は、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩であり、(2) 塩基性アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジンであり、(3) 非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンであり、並びに(4) 非荷電極性アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸としては、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸塩、グルタミン、グルタミン酸塩、ヒスチジン、リ

50

ジン、セリン、及びスレオニンが挙げられる。疎水性アミノ酸としては、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、及びバリンが挙げられる。アミノ酸の他のファミリーとしては、(i) 脂肪族ヒドロキシファミリーであるセリン及びスレオニン、(ii) アミド含有ファミリーであるアスパラギン及びグルタミン、(iii) 脂肪族ファミリーであるアラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、並びに(iv) 芳香族ファミリーであるフェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンが挙げられる。例えば、具体的には、置き換えが、フレームワーク部位内のアミノ酸に関与しない場合、ロイシンをイソロイシン若しくはバリンで、アスパラギン酸塩をグルタミン酸塩で、スレオニンをセリンで単離して置き換えること、又はアミノ酸を構造的に関連するアミノ酸で同様に置き換えることが、生じる分子の結合又は特性に対して大きな効果を有さないであろうことを予想することが合理的である。アミノ酸変化が、機能性PKP2タンパク質を生じるかどうかは、タンパク質誘導体の特定の活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。PKP2タンパク質の断片又は類似体は、当業者によって容易に調製され得る。断片又は類似体の好ましいアミノ末端及びカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界の近くに存在する。配列は、療法的活性の改善のために修飾され得る。

10

【0049】

「PKP2遺伝子」という用語は、100%の配列同一性を有する完全長ヌクレオチド配列及びそのバリエーションの少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、最も好ましくは99%のセグメントを含むヌクレオチド配列を含む、完全長ヌクレオチド配列、DNA、若しくはRNA、又はそれらの機能的断片をコードするプラコフィリン2タンパク質を指す。断片は、100%の配列同一性を有する完全長遺伝子及びそのバリエーションの少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、最も好ましくは99%のセグメントを含む核酸配列、DNA、又はRNAを含む。本開示によって包含されるように、遺伝子配列におけるバリエーションが企図されるが、ただし、核酸配列におけるバリエーションが、少なくとも75%、又は少なくとも80%、90%、95%、若しくは99%の同一性を維持することを条件とする。75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、及び99%の配列同一性などの間のある特定のパーセンテージが挙げられる。配列は、療法的活性の改善のために修飾され、アデノ随伴ウイルス(AAV)又は他の周知の遺伝子送達ベクター系などを用いて、送達のために最適化され得る。

20

30

【0050】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1若しくは配列番号13に記載のアミノ酸配列、又はそれらの断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1若しくは配列番号13に記載のアミノ酸配列の少なくとも一部分、又はそれらの断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

40

【0051】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも一部分、又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意の

50

パーセンテージ) 同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

【0052】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号13に記載のアミノ酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号13に記載のアミノ酸配列の少なくとも一部分、又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

10

【0053】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4又は配列番号14に記載の核酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4又は配列番号14に記載の核酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、PKP2配列と称され得る。

20

【0054】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4に記載の核酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4に記載の核酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

30

【0055】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号14に記載の核酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号14に記載の核酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100% (又はその間の任意のパーセンテージ) 同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

40

【0056】

コドン最適化

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列であり得る。PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列に対して65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% (又はその間の任意のパーセンテージ) 以下同一である核酸配列を含み得るか

50

、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0057】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、ドナースプライス部位を含まない場合がある。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、約1つ、又は約2つ、又は約3つ、又は約4つ、又は約5つ、又は約6つ、又は約7つ、又は約8つ、又は約9つ、又は約10個以下のドナースプライス部位を含み得る。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と比較して、少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つ、又は少なくとも4つ、又は少なくとも5つ、又は少なくとも6つ、又は少なくとも7つ、又は少なくとも8つ、又は少なくとも9つ、又は少なくとも10個少なくドナースプライス部位を含む。理論に拘束されることを望まないが、不可解なスプライシングが防止されるので、コドン最適化核酸配列におけるドナースプライス部位の除去は、インビボでのPKP2ポリペプチドの発現を予想外にかつ予測不可能に増加させ得る。更に、不可解なスプライシングは、異なる対象間で変動し得、ドナースプライス部位を含むPKP2ポリペプチドの発現レベルが、異なる対象間で予測不可能に変動し得ることを意味する。そのような予測不可能性は、ヒト療法の文脈では受け入れられない。

10

【0058】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列のGC含有量とは異なるGC含有量を有し得る。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列のGC含有量は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と比較して、核酸配列全体にわたってより均一に分布する。理論に拘束されることを望まないが、核酸配列全体にわたってGC含有量をより均一に分布させることによって、コドン最適化核酸配列は、転写物の長さにわたってより均一な融解温度（「T_m」）を呈する。核酸配列の転写及び／又は翻訳は、ポリメラーゼ及び／又はリボソームの停滞が少ない状態で生じるので、融解温度の均一性は、ヒト対象におけるコドン最適化核酸の発現の増加を予想外に生じる。

20

【0059】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と比較して、より少ない抑制性マイクロRNA標的結合部位を有し得る。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型ヒト核酸配列と比較して、少なくとも1つ、又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つ、又は少なくとも4つ、又は少なくとも5つ、又は少なくとも6つ、又は少なくとも7つ、又は少なくとも8つ、又は少なくとも9つ、又は少なくとも10個、又は少なくとも10個少なく抑制性マイクロRNA標的結合部位を有し得る。理論に拘束されることを望まないが、より少ない抑制性マイクロRNA標的結合部位を有することによって、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、ヒト対象において発現の増加を予想外に呈する。

30

【0060】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードするコドン最適化核酸配列は、PKP2ポリペプチドをコードする野生型又は非コドン最適化核酸配列と比較して、ヒト対象において、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも500%、又は少なくとも1000%の発現の増加を呈する。

40

【0061】

AAVベクター

いくつかの態様では、本明細書に記載の少なくとも1つの導入遺伝子核酸分子を含む単離ポリヌクレオチドは、組換えAAV（rAAV）ベクターであり得る。

50

【0062】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、そのままのレプリコンを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる核酸を指すので、ベクターが、細胞内に配置される場合、例えば、トランスフェクション、感染、又は形質転換のプロセスによって複製され得る。一度細胞内に入ると、ベクターは、染色体外（エピソーム）エレメントとして複製され得るか、又は宿主細胞染色体に組み込まれ得ることが当該技術分野では理解されている。ベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、修飾バキュロウイルス、パポバウイルス、又は修飾された天然に存在するウイルスに由来する核酸を含み得る。核酸を送達するための例示的な非ウイルスベクターは、裸のDNA；カチオン性脂質と複合体化された、単独の、又はカチオン性ポリマーと組み合わされたDNA；アニオン性及びカチオン性リポソーム；異種ポリリジン、規定長オリゴペプチド、及びポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーと縮合されたDNAを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる、場合によってはリポソームに含有されたDNA-タンパク質複合体及び粒子；並びにウイルス及びポリリジン-DNAを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる三元複合体の使用を含む。

10

【0063】

一般組換え技法に関して、ポリヌクレオチドが動作可能に連結され得るプロモーター及びクロニング部位の両方を含むベクターが、当該技術分野で周知である。そのようなベクターは、インビトロ又はインビボでRNAを転写することが可能であり、Agilent Technologies (Santa Clara, Calif) 及びPromega Biotech (Madison, Wis.) などの供給元から市販されている。発現及び／又はインビトロ転写を最適化するには、転写又は翻訳のレベルのいずれかで発現を妨害又は低減させ得る、余分な潜在的に不適切な代替的な翻訳開始コドン又は他の配列を排除するように、クロニングされた導入遺伝子の5'及び／又は3'非翻訳部分を除去、追加、又は変更することが必要であり得る。代替的に、発現を増強するために、コンセンサスリポソーム結合部位が開始コドンのすぐに5'に挿入され得る。

20

【0064】

本明細書で使用される「rAAVベクター」は、1つ以上の導入遺伝子配列及び1つ以上のAAV逆位末端反復配列（ITR）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるベクターを指す。そのようなAAVベクターは、rep及びcap遺伝子産物の機能性を提供する宿主細胞に存在する場合、例えば、宿主細胞のトランスフェクションによって、複製され、感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。いくつかの態様では、AAVベクターは、プロモーター、少なくとも1つのタンパク質若しくはRNAをコードし得る少なくとも1つの核酸、並びに／又は感染性AAV粒子にパッケージングされた隣接ITR内のエンハンサー及び／若しくはターミネーターを含有する。キャプシド化核酸部分は、AAVベクターゲノムと称され得る。rAAVベクターを含有するプラスミドはまた、製造目的のための要素、例えば、抗生物質耐性遺伝子、複製配列の起点などを含有し得るが、これらはキャプシド化されておらず、したがって、AAV粒子の一部を形成しない。

30

【0065】

いくつかの態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つの導入遺伝子核酸分子を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのAAV逆位末端（ITR）配列を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのプロモーター配列を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのエンハンサー配列を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つの転写後調節エレメントを含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、少なくとも1つのポリA配列を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、第1のAAV ITR配列と、プロモーター配列と、導入遺伝子核酸分子と、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベ

40

50

クターは、5'から3'方向に、第1のAAV ITR配列と、プロモーター配列と、導入遺伝子核酸分子と、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。

【0066】

いくつかの態様では、rAAVベクターは、第1のAAV ITR配列と、プロモーター配列と、導入遺伝子核酸分子と、転写後調節エレメントと、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、5'から3'方向に、第1のAAV ITR配列と、プロモーター配列と、導入遺伝子核酸分子と、転写後調節エレメントと、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。

【0067】

いくつかの態様では、rAAVベクターは、2つ以上の導入遺伝子核酸分子を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、rAAVベクターが第1の導入遺伝子核酸分子及び少なくとも第2の導入遺伝子核酸分子を含むように、少なくとも2つの導入遺伝子核酸分子を含み得る。いくつかの態様では、第1及び少なくとも第2の導入遺伝子核酸分子は、同じ核酸配列を含み得る。いくつかの態様では、第1及び少なくとも第2の導入遺伝子核酸分子は、異なる核酸配列を含み得る。いくつかの態様では、第1及び少なくとも第2の導入遺伝子核酸配列は、互いに隣接し得る。

10

【0068】

いくつかの態様では、rAAVベクターは、2つ以上のプロモーター配列を含み得る。いくつかの態様では、rAAVベクターは、rAAVベクターが第1のプロモーター配列及び少なくとも第2のプロモーター配列を含むように、少なくとも2つのプロモーター配列を含み得る。いくつかの態様では、第1及び少なくとも第2のプロモーター配列は、同じ配列を含み得る。いくつかの態様では、第1及び少なくとも第2のプロモーター配列は、異なる配列を含み得る。いくつかの態様では、第1及び少なくとも第2のプロモーター配列は、互いに隣接し得る。rAAVベクターがまた、第1の導入遺伝子核酸分子及び少なくとも第2の導入遺伝子核酸分子を含むいくつかの態様では、第1のプロモーターは、第1の導入遺伝子核酸分子の上流(5')に位置し得、少なくとも第2のプロモーターは、少なくとも第2のプロモーターが第1の導入遺伝子核酸分子の下流(3')及び少なくとも第2の導入遺伝子核酸分子の上流(5')にあるように、第1の導入遺伝子核酸分子と少なくとも第2の導入遺伝子核酸分子との間に位置し得る。

20

【0069】

前述のrAAVベクターのうちのいずれかは、少なくとも1つのエンハンサーを更に含み得る。少なくとも1つのエンハンサーは、rAAVベクター内の任意の場所に位置し得る。いくつかの態様では、少なくとも1つのエンハンサーは、プロモーターのすぐ上流(5')に位置し得る。したがって、rAAVベクターは、5'から3'方向に、第1のAAV ITR配列と、エンハンサーと、プロモーター配列と、導入遺伝子核酸分子と、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。いくつかの態様では、少なくとも1つのエンハンサーは、プロモーターのすぐ下流(3')に位置し得る。したがって、rAAVベクターは、5'から3'方向に、第1のAAV ITR配列と、プロモーター配列と、エンハンサーと、導入遺伝子核酸分子と、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。いくつかの態様では、少なくとも1つのエンハンサーは、導入遺伝子核酸分子のすぐ下流に位置し得る。したがって、rAAVベクターは、5'から3'方向に、第1のAAV ITR配列と、プロモーター配列と、導入遺伝子核酸分子と、エンハンサーと、ポリA配列と、第2のAAV ITR配列と、を含み得る。

30

40

【0070】

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号9に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%(又はその間の任意のパーセンテージ)同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【0071】

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号18に記載の核酸配列又

50

はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【0072】

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号21に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【0073】

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号22に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。f

【0074】

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号23に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【0075】

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号24に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号26に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号29に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、配列番号30に記載の核酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【0076】

AAV ITR配列

いくつかの態様では、AAV ITR配列は、当該技術分野で既知の任意のAAV ITR配列を含み得る。いくつかの態様では、AAV ITR配列は、AAV1 ITR配列、AAV2 ITR配列、AAV4 ITR配列、AAV5 ITR配列、AAV6 ITR配列、AAV7 ITR配列、AAV8 ITR配列、AAV9 ITR配列、AAV10 ITR配列、AAV11 ITR配列、AAV12 ITR配列、AAV13 ITR配列、AAVrh74 ITR配列、又はAAVrh10 ITR配列であり得る。

【0077】

したがって、いくつかの態様では、AAV ITR配列は、AAV1 ITR配列、AAV2 ITR配列、AAV4 ITR配列、AAV5 ITR配列、AAV6 ITR配列、AAV7 ITR配列、AAV8 ITR配列、AAV9 ITR配列、AAV10 ITR配列、AAV11 ITR配列、AAV12 ITR配列、AAV13 ITR配列、AAVrh74 ITR配列、又はAAVrh10 ITR配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

【0078】

いくつかの態様では、本開示の r A A V ベクターは、A A V 2 I T R 配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。いくつかの態様では、本開示の r A A V ベクターは、A A V 2 I T R 配列又は修飾 A A V 2 I T R 配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

【0079】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 7 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

10

【0080】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 8 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0081】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 15 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

20

【0082】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 16 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0083】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 19 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

30

【0084】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 20 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0085】

いくつかの態様では、A A V 2 I T R 配列は、配列番号 25 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

40

【0086】

いくつかの態様では、第 1 の A A V I T R 配列は、配列番号 7 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得、第 2 の A A V I T R 配列は、配列番号 8 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0087】

いくつかの態様では、第 1 の A A V I T R 配列は、配列番号 8 に対して少なくとも 6

50

10

20

40

50

50

50

50

50

50

50

いくつかの態様では、第1のAAV ITR配列は、配列番号19に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得、第2のAAV ITR配列は、配列番号20に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得

る。

【0093】

いくつかの態様では、第1のAAV ITR配列は、配列番号20に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得、第2のAAV ITR配列は、配列番号19に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

10

【0094】

いくつかの態様では、本開示のITR配列は、前方方向などの任意の順序であり得るか、又は逆方向に反転され得る。いくつかの態様では、本開示のITR配列は、ITR配列をコードする核酸配列における1つ以上のヌクレオチドの変異、欠失、挿入、又は再配列を含み得る。

【0095】

プロモーター配列及びエンハンサー

本明細書で使用される「プロモーター」及び「プロモーター配列」という用語は、遺伝子又は導入遺伝子などのコード配列の開始及び転写速度が制御される、ポリヌクレオチド配列の領域である制御配列を意味する。プロモーターは、例えば、構成的、誘導的、抑制的、又は組織特異的であり得る。プロモーターは、調節タンパク質、及びRNAポリメラーゼなどの分子、及び転写因子が結合し得る遺伝子要素を含有し得る。非限定的な例示的なプロモーターとしては、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意選択的に、RSVエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、U6プロモーター、H1プロモーター、ユビキタスチキン β -アクチンハイブリッド（CBh）プロモーター、小核RNA（U1a又はU1b）プロモーター、MeCP2プロモーター、MeP418プロモーター、MeP426プロモーター、最小MeCP2プロモーター、VMD2プロモーター、mRhoプロモーター、又はEF1プロモーターが挙げられる。

20

30

【0096】

本明細書に提供される追加の非限定的な例示的なプロモーターとしては、限定されないが、EF1a、Ubc、ヒト β -アクチン、CAG、TRE、Ac5、ポリヘドリン、CaMKIIa、Gal1、TEF1、GDS、ADH1、Ubi、及び α -1-アンチトリプシン（hAAT）が挙げられる。そのようなプロモーターのヌクレオチド配列が、mRNA転写の効率を増加又は減少させるために修飾され得ることは、当該技術分野で既知である。例えば、Gao et al. (2018) Mol. Ther. : Nucleic Acids 12:135-145 (modifying TATA box of 7SK, U6 and H1 promoters to abolish RNA polymerase III transcription and stimulate RNA polymerase II-dependent mRNA transcription) を参照されたい。合成由来のプロモーターは、遍在性又は組織特異的発現に使用され得る。更に、いくつかは上に記載されているウイルス由来のプロモーター、例えば、CMV、HIV、アデノウイルス、及びAAVプロモーターは、本明細書に開示の方法で有用であり得る。いくつかの態様では、プロモーターは、転写効率を増加させるために、少なくとも1つのエンハンサーと一緒に使用される。エンハンサーの非限定的な例としては、間質性レチノイド結合タンパク質（IRBP）エンハンサー、RSVエンハンサー、又はCMVエンハンサーが挙げられる。

40

【0097】

いくつかの態様では、プロモーター配列は、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロ

50

モーター配列（任意選択的に、RSVエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列、SV40プロモーター配列、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター配列、 β -アクチンプロモーター配列、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター配列、U6プロモーター配列、H1プロモーター配列、ユビキタスチキン β -アクチンハイブリッド（CBh）プロモーター配列、小核RNA（U1a又はU1b）プロモーター配列、MeCP2プロモーター配列、MeP418プロモーター配列、MeP426プロモーター配列、最小MeCP2プロモーター配列、VMD2プロモーター配列、mRhoproモーター配列、EFIプロモーター配列、EFlaプロモーター配列、Ubcプロモーター配列、ヒト β -アクチンプロモーター配列、CAGプロモーター配列、TRE配列、Ac5プロモーター配列、ポリヘドリンプロモーター配列、CaMKIIaプロモーター配列、Gal1プロモーター配列、TEF1プロモーター配列、GDSプロモーター配列、ADH1プロモーター配列、Ubiプロモーター配列、又は α -1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

10

20

30

40

50

【0098】

いくつかの態様では、プロモーター配列は、心臓特異的プロモーターであり得る。いくつかの態様では、心臓特異的プロモーターは、TNNI2プロモーターである。いくつかの態様では、心臓特異的プロモーターは、NKX2.5プロモーターである。いくつかの態様では、心臓特異的プロモーターは、心臓トロポニンT（cTnT）プロモーターである。いくつかの態様では、心臓トロポニンTプロモーターは、心臓特異的発現を駆動する。いくつかの態様では、心臓トロポニンTプロモーターは、心筋細胞特異的発現を駆動する。

【0099】

エンハンサーは、標的配列の発現を増加させる調節エレメントである。「プロモーター／エンハンサー」は、プロモーター及びエンハンサー機能の両方を提供することが可能な配列を含有するポリヌクレオチドである。例えば、レトロウイルスの長い末端反復は、プロモーター及びエンハンサー機能の両方を含有する。エンハンサー／プロモーターは、「内因性」、又は「外因性」若しくは「異種」であり得る。「内因性」エンハンサー／プロモーターは、ゲノム内の所与の遺伝子と天然に連結されるものである。「外因性」又は「異種」エンハンサー／プロモーターは、遺伝子操作（すなわち、分子生物学的技法）の手段によって、又はその遺伝子の転写が連結されたエンハンサー／プロモーターによって指示されるような合成技法によって、遺伝子と並置して配置されるものである。本明細書に提供される方法、組成物、及び構築物で使用するための連結されたエンハンサー／プロモーターの非限定的な例としては、PDEプロモーター＋IRBPエンハンサー、又はCMVエンハンサー＋U1aプロモーターが挙げられる。エンハンサーは、ある距離から、内因性又は異種プロモーターの位置に対するそれらの方向に関係なく動作することができる。したがって、プロモーターからある距離で動作するエンハンサーは、したがって、ベクター内のその位置又はプロモーターの位置に対するその方向に関係なく、そのプロモーターに「動作可能に連結」されることが更に理解される。

【0100】

本開示を通して使用される場合、「動作可能に連結された」という用語は、それが空間的に接続されているプロモーターの制御下にある遺伝子（すなわち、導入遺伝子）の発現を指す。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5'（上流）又は3'（下流）に位置し得る。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5'（上流）に位置し得る。プロモーターと遺伝子との間の距離は、そのプロモーターと、プロモーターが由来する遺伝子において制御する遺伝子との間の距離とほぼ同じであり得る。プロモーターと遺伝子との間の距離の変動は、プロモーター機能を喪失することがなく適合され得る。

【0101】

いくつかの態様では、プロモーター配列は、心臓トロポニンT（cTnT）プロモーター

一配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。c T n T プロモーター配列は、配列番号2に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0102】

いくつかの態様では、本開示の細菌プラスミドは、原核生物プロモーターを含み得る。

【0103】

導入遺伝子核酸分子

いくつかの態様では、導入遺伝子核酸分子は、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列、又はその少なくとも1つの断片を含み得る。いくつかの態様では、導入遺伝子核酸分子は、PKP2ポリペプチドの生物学的等価物をコードする核酸配列、又はその少なくとも1つの断片を含み得る。

【0104】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1若しくは配列番号13に記載のアミノ酸配列、又はそれらの断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1若しくは配列番号13に記載のアミノ酸配列の少なくとも一部分、又はそれらの断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

【0105】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも一部分、又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

【0106】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号13に記載のアミノ酸配列又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドは、配列番号13に記載のアミノ酸配列の少なくとも一部分、又はその断片に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

【0107】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4又は配列番号14に記載の核酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4又は配列番号14に記載の核酸配列に対して少なくとも65

%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、PKP2配列と称され得る。

【0108】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4に記載の核酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4に記載の核酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

10

【0109】

いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号14に記載の核酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。いくつかの態様では、PKP2ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号14に記載の核酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

20

【0110】

いくつかの態様では、導入遺伝子核酸分子は、レポータータンパク質をコードする核酸配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。本明細書で用いられる場合、レポータータンパク質は、プロモーターの発現（例えば、組織特異性及び／又は強度）をアッセイするために、プロモーターに動作可能に連結された、検出可能なタンパク質である。態様では、レポータータンパク質は、ポリペプチドに動作可能に連結され得る。態様では、レポータータンパク質は、DNA送達方法、プロモーター及びエンハンサーエレメントの機能的同定及び特徴評価、翻訳及び転写調節、mRNAプロセッシング、並びにタンパク質：タンパク質相互作用の監視において使用され得る。レポータータンパク質の非限定的な例は、β-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）又は赤色蛍光タンパク質（RFP）などの蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、及びマルトース結合タンパク質である。

30

【0111】

いくつかの態様では、導入遺伝子核酸分子は、シグナルペプチドをコードする核酸配列を更に含み得る。

【0112】

いくつかの態様では、rAAVベクターに存在する導入遺伝子核酸分子は、同じrAAVベクターにも存在するプロモーター配列の転写制御下にあり得る。

40

【0113】

転写後調節エレメント

例えば、宿主細胞において目的のタンパク質の発現レベルを増加させるために、様々な転写後調節エレメントがウイルスベクターにおいて使用され得る。いくつかの実施形態では、転写後調節エレメントは、ウイルス転写後調節エレメントであり得る。ウイルス転写後調節エレメントの非限定的な例としては、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）、B型肝炎ウイルス転写後調節エレメント（HBVPRE）、RNA輸送エレメント（RTE）、及びそれらの任意のバリエーションが挙げられる。いくつかの態

50

様では、転写後調節エレメントは、最適化転写後調節エレメント（oPRE）であり得る。oPREは、配列番号5、配列番号27、又は配列番号28に記載の核酸配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる核酸配列を含み得る。

【0114】

ポリA配列

いくつかの態様では、ポリアデニル化（ポリA）配列は、当該技術分野で既知の任意のポリA配列を含み得る。ポリA配列の非限定的な例としては、限定されないが、MeCP2ポリA配列、レチノールデヒドロゲナーゼ1（RDH1）ポリA配列、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリA配列、SV40ポリA配列、SPA49ポリA配列、sNRP-TK65ポリA配列、sNRPポリA配列、ウサギベータグロビンポリA配列、又はTK65ポリA配列が挙げられる。

10

【0115】

したがって、ポリA配列は、MeCP2ポリA配列、レチノールデヒドロゲナーゼ1（RDH1）ポリA配列、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリA配列、SV40ポリA配列、SPA49ポリA配列、sNRP-TK65ポリA配列、sNRPポリA配列、又はTK65ポリA配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

【0116】

いくつかの態様では、ポリA配列は、ウサギベータグロビンポリA配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。いくつかの態様では、ウサギベータグロビンポリA配列は、配列番号6に記載の配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

20

【0117】

いくつかの態様では、ポリA配列は、BGHポリA配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。いくつかの態様では、BGHポリA配列は、配列番号17に記載の配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

30

【0118】

細菌プラスミド

いくつかの態様では、本開示のrAAVベクターは、インビトロでのrAAVベクターの増殖を可能にするために、細菌プラスミド内に含有され得る。したがって、本開示は、本明細書に記載のrAAVベクターのうちのいずれかを含む細菌プラスミドを提供する。細菌プラスミドは、複製起点配列を更に含み得る。細菌プラスミドは、抗生物質耐性遺伝子を更に含み得る。細菌プラスミドは、原核生物プロモーターを更に含み得る。

【0119】

非限定的な実施例では、細菌プラスミド中のrAAVベクターは、5'から3'方向に、5' ITR、cTnTプロモーター配列と、PKP2ポリペプチドをコードする導入遺伝子核酸分子と、oPRE配列と、BGHポリA配列と、3' ITRと、を含む。

40

【0120】

いくつかの態様では、本開示の細菌プラスミドは、配列番号10に記載の核酸配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。

【0121】

複製起点配列

いくつかの態様では、複製起点配列は、当該技術分野で既知の任意の複製起点配列を含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、又はそれらからなり得る。複製起点配列は、細菌

50

複製起点配列であり得、それによって、当該技術分野で標準的な方法を使用して、当該細菌複製起点配列を含む r A A V ベクターが、細菌内で産生、増殖、及び維持されることが可能になる。

【0122】

いくつかの態様では、複製起点配列は、p U C 複製起点配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。p U C 19 複製起点配列は、配列番号 11 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0123】

抗生物質耐性遺伝子

いくつかの態様では、本開示の r A A V ベクター及び／又は r A A V ウイルスベクターは、抗生物質耐性遺伝子を含み得る。

【0124】

いくつかの態様では、抗生物質耐性遺伝子は、当該技術分野で既知の任意の抗生物質耐性遺伝子を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。当該技術分野で既知の抗生物質耐性遺伝子の例としては、限定されないが、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子、プレオマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、ポリミキシン B 耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、及びクロラムフェニコール耐性遺伝子が挙げられる。

【0125】

いくつかの態様では、抗生物質耐性遺伝子は、アンピシリン抗生物質耐性遺伝子を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。アンピシリン抗生物質耐性遺伝子は、配列番号 12 に対して少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又はその間の任意のパーセンテージ）同一の核酸配列を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。

【0126】

A A V ウイルスベクター

「ウイルスベクター」は、インビボ、エクスピボ、又はインビトロのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含有する組換え産生ウイルス又はウイルス粒子として定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、A A V ベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。また、セムリキ森林ウイルススペースのベクター及びシンドビスウイルススペースのベクターなどのアルファウイルスベクターも、遺伝子療法及び免疫療法での使用のために開発されている。例えば、Schlesinger and Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5: 434-439 及び Ying, et al. (1999) Nat. Med. 5 (7): 823-827 を参照されたい。

【0127】

「A A V ビリオン」又は「A A V ウイルス粒子」又は「A A V ウイルスベクター」又は「r A A V ウイルスベクター」又は「A A V ベクター粒子」又は「A A V 粒子」は、少なくとも 1 つの A A V キャプシドタンパク質及びキャプシド化ポリヌクレオチド r A A V ベクターで構成されるウイルス粒子を指す。したがって、そのようなベクターが r A A V ベクター内に含有されるので、r A A V ウイルスベクターの産生は、必然的に r A A V ベクターの産生を含む。

【0128】

本明細書で使用される場合、「ウイルスキャプシド」又は「キャプシド」という用語は、ウイルス粒子のタンパク質性シェル又はコートを指す。キャプシドは、ウイルスゲノムをキャプシド化し、保護し、輸送し、宿主細胞へと放出するように機能する。キャプシド

10

20

30

40

50

は、一般に、タンパク質のオリゴマー構造サブユニット（「キャプシドタンパク質」）で構成される。本明細書で使用される場合、「キャプシド化された」という用語は、ウイルスキャプシド内に封入されることを意味する。AAVのウイルスキャプシドは、3つのウイルスキャプシドタンパク質：VP1、VP2、及びVP3の混合物で構成される。VP1、VP2、及びVP3の混合物は、各々全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sonntag F et al., (June 2010). "A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107 (22) : 10220-5、及びRabinowitz JE, Samulski RJ (December 2000). "Building a better vector: the manipulation of AAV virions". Virology. 278 (2) : 301-8に記載されるように、1:1:10 (VP1:VP2:VP3) 又は1:1:20 (VP1:VP2:VP3) の比のT=1正十二面体で配置されている60個のモノマーを含有する。

10

【0129】

本開示は、a) 本明細書に記載のrAAVベクターのうちのいずれかと、b) AAVキャプシドタンパク質と、を含む、rAAVウイルスベクターを提供する。

【0130】

AAVキャプシドタンパク質は、当該技術分野で既知の任意のAAVキャプシドタンパク質であり得る。AAVキャプシドタンパク質は、AAV1キャプシドタンパク質、AAV2キャプシドタンパク質、AAV4キャプシドタンパク質、AAV5キャプシドタンパク質、AAV6キャプシドタンパク質、AAV7キャプシドタンパク質、AAV8キャプシドタンパク質、AAV9キャプシドタンパク質、AAV10キャプシドタンパク質、AAV11キャプシドタンパク質、AAV12キャプシドタンパク質、AAV13キャプシドタンパク質、AAVPHP.Bキャプシドタンパク質、AAVrh74キャプシドタンパク質、又はAAVrh10キャプシドタンパク質であり得る。いくつかの態様では、キャプシドタンパク質は、AAV9キャプシドタンパク質であり得る。いくつかの態様では、キャプシドタンパク質は、AAVrh10キャプシドタンパク質であり得る。

20

【0131】

組成物及び薬学的組成物

本開示は、本明細書に記載の単離ポリヌクレオチド、rAAVベクター、及び／又はrAAVウイルスベクターのうちのいずれかを含む組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物は、薬学的組成物であり得る。したがって、本開示は、本明細書に記載の単離ポリヌクレオチド、rAAVベクター、及び／又はrAAVウイルスベクターのうちのいずれかを含む薬学的組成物を提供する。

30

【0132】

本明細書に記載の薬学的組成物は、限定されないが、有効成分（例えば、ウイルス粒子又は組換えベクター）を賦形剤及び／又は添加剤及び／又は他の付属成分と接触させ、製品を用量単位に分割又はパッケージングすることを含む、薬理学の分野で既知の又は開発された任意の方法によって製剤化され得る。本開示のウイルス粒子は、望ましい特徴、例えば、増加した安定性、増加した細胞トランスフェクション、持続的放出又は遅延放出、生体内分布又は傾向性、インビボでのコードされたタンパク質の調節された又は増強された翻訳、並びにインビボでのコードされたタンパク質の放出プロファイルを有するように製剤化され得る。

40

【0133】

そのため、薬学的組成物は、生理食塩水、リピドイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コア-シェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、（例えば、対象への移植のために）ウイルスベクターでトランスフェクトされた細胞、ナノ粒子模倣物、又はそれらの組み合わせを更に含み得る。いくつかの態様では、薬学的組成物は、ナノ

50

粒子として製剤化される。いくつかの態様では、ナノ粒子は、自己組織化核酸ナノ粒子である。

【0134】

本開示による薬学的組成物は、単回単位用量として、及び／又は複数の単回単位用量として、バルクで調製、パッケージング、及び／又は販売され得る。活性成分の量は、一般に、対象に投与されるであろう活性成分の投薬量、及び／又は例えば、そのような投薬量の2分の1若しくは3分の1などのそのような投薬量の都合のよい小部分に等しい。本発明の製剤は、各々が、ウイルスベクターの安定性を一緒に増加させ、ウイルスベクターによる細胞トランスフェクション若しくは形質導入を増加させ、タンパク質をコードするウイルスベクターの発現を増加させ、及び／又はタンパク質をコードするウイルスベクターの放出プロファイルを変更する量で、1つ以上の賦形剤及び／又は添加剤を含み得る。いくつかの態様では、薬学的組成物は、賦形剤及び／又は添加剤を含む。賦形剤及び／又は添加剤の非限定的な例としては、溶媒、分散媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散若しくは懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘若しくは乳化剤、防腐剤、又はそれらの組み合わせが挙げられる。

10

【0135】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、抗凍結剤を含む。「抗凍結剤」という用語は、凍結中の物質に対する損傷を低減又は排除することが可能な薬剤を指す。抗凍結剤の非限定的な例としては、スクロース、トレハロース、ラクトース、グリセロール、デキストロース、ラフィノース、及び／又はマンニトールが挙げられる。

20

【0136】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、動物、より具体的にはヒト及び／又は非ヒト哺乳動物での使用に安全である他の製剤に加えて、連邦政府若しくは州政府の規制当局によって承認されていること、又は米国薬局方、一般に認められている他の薬局方に列挙されていることを意味する。

【0137】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝生理食塩水、水などの標準的な薬学的担体、並びに油／水又は水／油エマルションなどのエマルション、並びに様々なタイプの湿潤剤のうちのいずれかを包含する。組成物はまた、安定剤及び防腐剤を含み得る。担体、安定剤、及びアジュバントの例については、Martin (1975) Remington's Pharm. Sci., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton) を参照されたい。

30

【0138】

いくつかの態様では、本開示の薬学的組成物は、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、ポロキサマー、スクロース、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。

【0139】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、塩化ナトリウムを含み得、塩化ナトリウムが、約100mM～約500mM、又は約200mM～約400mM、又は約300mM～約400mMの濃度で存在する。いくつかの態様では、塩化ナトリウムは、約200mMの濃度で存在し得る。

40

【0140】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、トリスを含み得、トリスが、約10mM～約100mM、又は約10mM～約50mM、又は約15mM～約25mMの濃度で存在する。いくつかの態様では、トリスは、約20mMの濃度で存在し得る。

【0141】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、塩化マグネシウムを含み得、塩化マグネシウムが、約0.1mM～約50mM、又は約0.1mM～約5mM、又は約0.5mM～約2.5mMの濃度で存在する。いくつかの態様では、塩化マグネシウムは、約1mMの濃度で存在し得る。

50

【0142】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、ポロキサマー188を含み得、ポロキサマー188が、約0.001%～約0.1%、又は約0.005%～約0.05%の濃度で存在する。いくつかの態様では、ポロキサマー188は、約0.01%の濃度で存在し得る。

【0143】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、スクロースを含み得、スクロースが、約0.1%～約10%、又は約0.5%～約5%の濃度で存在する。いくつかの態様では、スクロースは、約1%の濃度で存在し得る。

【0144】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、約6.5～約8.5、又は約7.0～約8.0、又は約7.4～約7.8のpHで製剤化され得る。いくつかの態様では、薬学的組成物は、約7.6のpHで製剤化され得る。

【0145】

本開示の組成物を使用する方法

本開示は、開示の組成物及び薬学的組成物を使用して、例えば、治療有効量の組成物又は薬学的組成物を細胞、組織、臓器、動物、又は対象に投与するか又は接触させて、当該技術分野で既知であるか、又は本明細書に記載される細胞、組織、臓器、動物、又は対象における疾患又は障害の治療のための、開示の組成物又は薬学的組成物の使用を提供する。一態様では、対象は哺乳動物である。好ましくは、対象は、ヒトである。本明細書では、「対象」及び「患者」という用語は、互換的に使用される。例えば、「対象」及び「患者」という用語は、霊長類（例えば、ヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含む哺乳動物対象を指し得る。

【0146】

本開示は、治療有効量の、本明細書に開示のrAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、及び／又は薬学的組成物のうちのいずれか1つを対象に投与することを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる、障害を防止又は治療する方法を提供する。

【0147】

いくつかの態様では、本開示は、心臓不整脈を防止又は治療する方法を提供する。実施形態では、本発明は、不整脈原性右心室心筋症（ARVC）を防止又は治療する方法を提供する。いくつかの態様では、疾患は、PKP2遺伝子が関与する遺伝子障害であり得る。当業者によって理解されるであろうように、ARVC又はPKP2関連遺伝子障害は、限定されないが、心臓不整脈、失神、心臓動悸、めまい、息切れ、胸痛、疲労、持続性咳、心室期外収縮、心室頻拍（VT）、心不全、心臓線維症、及び／又は心臓停止を含む、対象における1つ以上の症状を引き起こし得る。いくつかの態様では、ARVC又はPKP2関連遺伝子障害は、心室不整脈及び心臓突然死をもたらす、心筋の左心室機能不全及び／又は線維脂肪変性に関連付けられる。

【0148】

いくつかの態様では、ARVCは、心臓デスモソームの欠陥を特徴とする。本明細書で使用される場合、「デスモソーム」という用語は、細胞間接着に特化した細胞構造を指す。デスモソームは、形質膜の側面側に無作為に配置された局所的な斑点様接着である、一種の結合複合体である。心臓組織に見出されるデスモソームは、心臓デスモソームと称される。

【0149】

いくつかの態様では、疾患は、対象のゲノムにおけるPKP2遺伝子の少なくとも1つのコピーの機能喪失を特徴とする疾患であり得る。いくつかの態様では、疾患は、対象のゲノムにおけるPKP2遺伝子の少なくとも1つのコピーの機能減少を特徴とする疾患であり得る。いくつかの態様では、疾患は、対象のゲノムにおけるPKP2遺伝子の少なくとも1つのコピーにおける少なくとも1つの変異における少なくとも1つの変異を特徴とする疾患であり得る。

【0150】

PKP2遺伝子の変異は、当該技術分野で既知である任意のタイプの変異であり得る。変異の非限定的な例としては、体細胞変異、単一ヌクレオチドバリエーション（SNV）、ナンセンス変異、挿入、欠失、重複、フレームシフト変異、反復拡張、短い挿入及び欠失（INDEL）、長いINDEL、選択的スプライシング、選択的スプライシングの産生物、翻訳開始の変更、翻訳開始の変更の産生物、プロテオミクス切断、プロテオミクス切断の産生物が挙げられる。

【0151】

いくつかの態様では、疾患は、疾患を有さない対照対象と比較して、対象におけるPKP2遺伝子の発現の減少を特徴とする疾患であり得る。いくつかの態様では、発現減少は、少なくとも約10%、又は少なくとも約20%、又は少なくとも約30%、又は少なくとも約40%、又は少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約99%、又は少なくとも約100%であり得る。

10

【0152】

いくつかの態様では、疾患は、疾患を有さない対照対象と比較して、対象におけるPKP2の量の減少を特徴とする疾患であり得る。いくつかの態様では、PKP2の量の減少は、少なくとも約10%、又は、少なくとも約20%、又は、少なくとも約30%、又は、少なくとも約40%、又は、少なくとも約50%、又は、少なくとも約60%、又は、少なくとも約70%、又は、少なくとも約80%、又は、少なくとも約90%、又は、少なくとも約95%、又は、少なくとも約99%、又は、少なくとも約100%であり得る。

20

【0153】

いくつかの態様では、疾患は、疾患を有さない対照対象と比較して、対象におけるPKP2の活性減少を特徴とする疾患であり得る。いくつかの態様では、PKP2の活性減少は、少なくとも約10%、又は、少なくとも約20%、又は、少なくとも約30%、又は、少なくとも約40%、又は、少なくとも約50%、又は、少なくとも約60%、又は、少なくとも約70%、又は、少なくとも約80%、又は、少なくとも約90%、又は、少なくとも約95%、又は、少なくとも約99%、又は、少なくとも約100%であり得る。

30

【0154】

いくつかの態様では、PKP2をコードする核酸配列決定を含むrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターは、対象における心臓デスモソームを安定化し得る。いくつかの態様では、PKP2をコードする核酸配列決定を含むrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターは、対象における心臓細胞間結合部タンパク質の喪失を救済し得る。いくつかの態様では、PKP2をコードする核酸配列決定を含むrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターは、対象における細胞間結合部タンパク質を再構築し得る。いくつかの態様では、デスモソームタンパク質としては、PKP2、デスモプラキン（DSP）、デスモグレイン-2（DSG2）、プラコグロビン（JUP）が挙げられる。いくつかの態様では、細胞間結合部タンパク質は、コネキシン43（CX43）を含む。

40

【0155】

いくつかの態様では、PKP2をコードする核酸配列決定を含むrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターは、対象におけるARVCに関連付けられる電氣的及び構造的な完全性を改善し得る。いくつかの態様では、PKP2をコードする核酸配列決定を含むrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターは、対象において電氣的及び構造的な完全性を保存して、ARVCを防止し得る。

【0156】

本開示の方法、組成物、薬学的組成物、rAAVベクター、又はrAAVウイルスベクターを使用して治療される対象は、本明細書に記載の疾患及び／又は症状のうちのいずれかを有し得る。

50

【0157】

いくつかの態様では、対象は、0.5歳未満、又は1歳未満、又は1.5歳未満、又は2歳未満、又は2.5歳未満、又は3歳未満、又は3.5歳未満、又は3.5歳未満、又は4歳未満、又は4.5歳未満、又は5歳未満、又は5.5歳未満、又は6歳未満、又は6.5歳未満、又は7歳未満、又は7.5歳未満、又は8歳未満、又は8.5歳未満、又は9歳未満、又は9.5歳未満、又は10歳未満であり得る。いくつかの態様では、対象は、11歳未満、12歳未満、13歳未満、14歳未満、15歳未満、20歳未満、30歳未満、40歳未満、50歳未満、60歳未満、70歳未満、80歳未満、90歳未満、100歳未満、110歳未満、又は120歳未満であり得る。いくつかの態様では、対象は、0.5歳未満であり得る。いくつかの態様では、対象は、4歳未満であり得る。いくつかの態様では、対象は、10歳未満であり得る。いくつかの態様では、対象は、18歳以上であり得る。

10

【0158】

本明細書に開示の治療及び防止の方法は、療法又は防止のための患者を識別及び選択するための適切な診断技法と組み合わせられ得る。

【0159】

本開示は、宿主細胞におけるタンパク質のレベルを増加させる方法であって、宿主細胞を本明細書に開示のrAAVウイルスベクターのうちのいずれか1つと接触させることを含み、rAAVウイルスベクターが、タンパク質をコードする導入遺伝子核酸分子を含む、本明細書に開示のrAAVベクターのうちのいずれか1つを含む、方法を提供する。いくつかの態様では、タンパク質は、療法用タンパク質である。いくつかの態様では、宿主細胞は、インビトロ、インビボ、又はエクスビボである。いくつかの態様では、宿主細胞は、対象に由来する。いくつかの態様では、対象は、正常な対象におけるタンパク質のレベル及び／又は機能性と比較して、タンパク質のレベル及び／又は機能性の低減を生じる障害に罹患している。

20

【0160】

いくつかの態様では、PKP2タンパク質のレベルは、内因性PKP2発現以上のレベルまで増加される。いくつかの態様では、PKP2タンパク質ノレベルは、治療前のPKP2発現レベルと比較して、少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約100%、少なくとも約105%、少なくとも約110%、少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約140%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、又は少なくとも約500%増加される。

30

【0161】

本開示は、対象の細胞に、目的の遺伝子を導入する方法であって、細胞を有効量の本明細書に開示のrAAVウイルスベクターのうちのいずれか1つと接触させることを含み、rAAVウイルスベクターが、目的の遺伝子を含む、本明細書に開示のrAAVベクターのうちのいずれか1つを含有する、方法を提供する。

40

【0162】

本開示の方法のいくつかの態様では、本開示のrAAVベクター又はrAAVウイルスベクターを対象に投与することに加えて、対象は、予防的免疫抑制剤治療レジメンも投与され得る。いくつかの態様では、免疫抑制剤治療レジメンは、少なくとも1つの免疫抑制療法薬を投与することを含み得る。免疫抑制療法薬の非限定的な例としては、限定されないが、シロリムス（ラパマイシン）、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミン、IVメチルプレドニゾン、プレドニゾン、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。免疫抑制療法薬は、rAAVベクター及び／若しくはrAAVウイルスベクターの投与前日、rAAVベクター及び／若しくはrAAVウイルスベクターの投与と同じ日、又はrAA

50

Vベクター及び／若しくはrAAVウイルスベクターの投与後の任意の日に投与され得る。

【0163】

診断又は治療の「対象」は、細胞、又は哺乳動物などの動物、又はヒトである。対象は、特定の種に限定されず、診断又は治療の対象となる非ヒト動物、及び感染の対象となるもの、又は限定されないが、サル、ネズミ、ラット、イヌ、又はレポリダエ科種、並びに他の家畜、スポーツ動物、若しくはペットを含む動物モデルが挙げられる。いくつかの態様では、対象は、ヒトである。

【0164】

本明細書で使用される場合、対象における疾患の「治療すること」又は「治療」は、（1）疾患の素因があるか、若しくはまだその症状を示していない対象において症状若しくは疾患が発生するのを防止すること、（2）疾患を阻害するか、若しくはその発症を阻止すること、又は（3）疾患若しくは疾患の症状を回復させるか、若しくは退行を引き起こすことを指す。当該技術分野で理解されるように、「治療」は、臨床結果を含む有益な又は望ましい結果を得るためのアプローチである。本技術の目的のために、有益な又は望ましい結果としては、限定されないが、検出可能であるか検出不可能であるかにかかわらず、1つ以上の症状の緩和又は回復、状態（疾患を含む）の程度の減少、状態（疾患を含む）の安定的な（すなわち、悪化しない）段階、状態（疾患を含む）の遅延又は緩徐、状態（疾患を含む）の進行、回復、又は緩和、段階及び寛解（部分的又は完全な）の1つ以上を挙げることができる。

【0165】

本明細書で使用される場合、かつ特に指定しない限り、「予防する」、「予防すること」、及び「予防」という用語は、疾患若しくは障害、又はそれらの1つ以上の症状の発病、再発、又は蔓延の予防を指す。ある特定の実施形態では、これらの用語は、症状の発病前に、特に本明細書に提供される疾患又は障害のリスクのある対象への、1つ以上の他の追加の活性剤を伴うか又は伴わない、本明細書に提供される化合物又は剤形による治療又はそれらの投与を指す。これらの用語は、特定の疾患の症状の阻害又は低減を包含する。ある特定の実施形態では、疾患の家族歴を有する対象は、予防レジメンの潜在的な候補である。ある特定の実施形態では、再発する症状の病歴を有する対象もまた、予防の潜在的な候補である。この点に関して、「予防」という用語は、「予防的治療」という用語と互換的に使用され得る。

【0166】

本明細書で使用される場合、かつ特に指定しない限り、化合物の「予防的有効量」は、疾患若しくは障害を予防するか、又はその再発を予防するのに十分な量である。予防的有効量の化合物は、単独で、又は1つ以上の他の薬剤と組み合わせて、疾患の予防において予防的利益を提供する療法剤の量を意味する。「予防的有効量」という用語は、全体的な予防を改善するか、又は別の予防剤の予防有効性を増強させる量を包含し得る。

【0167】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、望ましい効果を達成するのに十分な量を意味することを意図する。療法的又は予防的用途の文脈において、有効量は、問題の状態のタイプ及び重症度、並びに一般的な健康状態、年齢、性別、体重、及び薬学的組成物に対する忍容性などの個々の対象の特徴に依存するであろう。遺伝子療法の文脈において、有効量は、対象において欠損している遺伝子の部分的又は完全な機能の回復を生じるのに十分な量であり得る。いくつかの態様では、rAAVウイルスベクターの有効量は、PKP2が産生されるように、対象において遺伝子の発現を生じるのに十分な量である。いくつかの態様では、有効量は、ガラクトース代謝を増加させることを、それを必要とする対象において行うのに必要な量である。当業者は、これら及び他の要因に応じて適切な量を決定することが可能であろう。

【0168】

いくつかの態様では、有効量は、問題の用途のサイズ及び性質に依存するであろう。ま

10

20

30

50

50

50

50

50

50

50

いくつかの態様では、本明細書に開示の rAAVベクター、rAAVウイルスベクター、組成物、及び／又は薬学的組成物は、約 1.0×10^{11} ベクターゲノム(vg)/kg～約 1.0×10^{15} vg/kgの範囲の用量で対象に投与される。いくつかの態様では、用量は、約 1.0×10^{12} vg/kg～約 1.0×10^{14} vg/kgの範囲で投与される。いくつかの態様では、用量は、約 1.0×10^{12} vg/kg～約 1.0×10^{13} vg/kgの範囲で投与される。いくつかの態様では、用量は、約 1.0×10^{12} vg/kg、約 1.5×10^{12} vg/kg、約 2.0×10^{12} vg/kg、約 2.5×10^{12} vg/kg、約 3.0×10^{12} vg/kg、約 4.0×10^{12} vg/kg、約 4.5×10^{12} vg/kg、約 5.0×10^{12} vg/kg、約 5.5×10^{12} vg/kg、約 6.0×10^{12} vg/kg、約 6.5×10^{12} vg/kg、約7.0×10¹²vg/kg、約7.5×10¹²vg/kg、約8.0×10¹²vg/kg、約8.5×10¹²vg/kg、約9.0×10¹²vg/kg、約9.5×10¹²vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg、約 1.5×10^{13} vg/kg、約 2.0×10^{13} vg/kg、約 2.5×10^{13} vg/kg、約 3.0×10^{13} vg/kg、約 4.0×10^{13} vg/kg、約 4.5×10^{13} vg/kg、約 5.0×10^{13} vg/kg、約 5.5×10^{13} vg/kg、約 6.0×10^{13} vg/kg、約6.

$5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $7.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $7.5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $8.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $8.5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $9.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $9.5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、約 $8.0 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、約 $8.5 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、約 $9.0 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、約 $9.5 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、約 $1.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $1.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $2.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $2.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $3.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $4.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $4.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $5.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $5.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $6.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $6.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $7.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $7.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $8.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $8.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、約 $9.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、又は約 $9.5 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ である。

10

【0174】

いくつかの態様では、組成物、薬学的組成物中のウイルス粒子の量、又は患者に投与されるウイルス粒子の量は、ウイルスゲノムを含有すると予測されるウイルス粒子のパーセンテージに基づいて計算され得る。

【0175】

いくつかの態様では、本開示の rAAV ウイルスベクターは、静脈内、髄腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内、若しくは眼周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸腔内、局所、リンパ内、大槽内で対象に導入され得、そのような導入はまた、動脈内、心臓内、脳室下帯内、硬膜外、脳内、脳室内、網膜下、脳内、網膜下、硝子体内、関節内、腹腔内、子宮内、神経内、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの態様では、ウイルス粒子は、非限定的な例として、所望の標的組織、例えば、心臓組織に送達される。いくつかの態様では、ウイルス粒子の送達は、全身性である。大槽内投与経路は、脳室の脳脊髄液に薬物を直接投与することを伴う。それは、脳槽マグナへの直接注射によって、又は恒久的に位置されたチューブを介して実施され得る。いくつかの態様では、本開示の rAAV ウイルスベクターは、非経口投与される。いくつかの態様では、本開示の rAAV ウイルスベクターは、腹腔内投与を介して投与される。いくつかの態様では、本開示の rAAV ウイルスベクターは、静脈内投与される。

20

【0176】

いくつかの態様では、本開示の rAAV ウイルスベクターは、対象における遺伝子欠損を修復する。いくつかの態様では、正常に治療された細胞、組織、臓器、又は対象における、修復された標的ポリヌクレオチド又はポリペプチド対修復されていない標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの比は、少なくとも約 1.5 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1、約 10 : 1、約 20 : 1、約 50 : 1、約 100 : 1、約 1000 : 1、約 10,000 : 1、約 100,000 : 1、又は約 1,000,000 : 1 である。修復された標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの量又は比は、限定されないが、ウエスタンブロット、ノーザンブロット、サザンブロット、PCR、配列決定、質量分析、フローサイトメトリー、免疫組織化学、免疫蛍光、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、次世代配列決定、免疫ブロット、及び ELISA を含む、当該技術分野で任意の既知の方法によって決定され得る。

30

40

【0177】

本開示の rAAV ベクター、rAAV ウイルスベクター、組成物、又は薬学的組成物の投与は、治療過程を通じて、1 回の用量で、連続的に、又は断続的に行われ得る。いくつかの態様では、本開示の rAAV ベクター、rAAV ウイルスベクター、組成物、又は薬学的組成物は、注射、注入、又は移植によって非経口投与される。いくつかの態様では、本開示の rAAV ベクター、rAAV ウイルスベクター、組成物、又は薬学的組成物は、繰り返し投与される。いくつかの態様では、本開示の rAAV ベクター、rAAV ウイルスベクター、組成物、又は薬学的組成物は、単回用量で投与される。

【0178】

50

いくつかの態様では、本開示の r A A V ウイルスベクターは、心臓組織に対して増強された傾向性を示す。

【0179】

製造方法

本開示の r A A V ウイルスベクターは、多様なアプローチを使用して産生され得る。いくつかの態様では、パッケージングは、ヘルパーウイルス又はヘルパープラスミド、及び細胞株を使用することによって達成される。ヘルパーウイルス又はヘルパープラスミドは、ウイルスベクター産生を促進するエレメント及び配列を含有する。別の態様では、ヘルパープラスミドは、パッケージング細胞株のゲノムに安定的に組み込まれるので、パッケージング細胞株は、ヘルパープラスミドによる追加のトランスフェクションを必要としない。

10

【0180】

いくつかの態様では、本開示の r A A V ウイルスベクターは、昆虫細胞のバキュロウイルス感染に従って製造され得る。

【0181】

いくつかの態様では、細胞は、パッケージング又はヘルパー細胞株である。いくつかの態様では、ヘルパー細胞株は、真核細胞、例えば、H E K 2 9 3 細胞又は 2 9 3 T 細胞である。いくつかの態様では、ヘルパー細胞は、酵母細胞又は昆虫細胞である。

【0182】

いくつかの態様では、細胞は、テトラサイクリン活性化因子タンパク質をコードする核酸と、テトラサイクリン活性化因子タンパク質の発現を調節するプロモーターと、を含む。いくつかの態様では、テトラサイクリン活性化因子タンパク質の発現を調節するプロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの態様では、プロモーターは、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター（P G K）又は C M V プロモーターである。

20

【0183】

ヘルパープラスミドは、例えば、複製不能な A A V を産生することなく、複製不能な A A V をパッケージングし、高い力価で複製不能な A A V をパッケージングすることが可能なビリオンタンパク質を産生するのに必要な、全てのビリオンタンパク質をトランスにコードする複製不能なウイルスゲノムに由来する少なくとも 1 つのウイルスヘルパー D N A 配列を含み得る。

30

【0184】

A A V をパッケージングするためのヘルパープラスミドは、当該技術分野で既知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第 2 0 0 4 / 0 2 3 5 1 7 4 A 1 号を参照されたい。本明細書に記載されるように、A A V ヘルパープラスミドは、非限定的な例として、それぞれの元のプロモーター又は異種プロモーターによって制御される A d 5 遺伝子 E 2 A、E 4、及び V A をヘルパーウイルス D N A 配列として含有し得る。加えて、A A V ヘルパープラスミドは、所望の標的細胞のトランスフェクションの単純な検出を可能にするために、蛍光タンパク質などのマーカータンパク質の発現のための発現カセットを含有し得る。

【0185】

本開示は、本明細書に開示の A A V ヘルパープラスミドのうちのいずれか 1 つ及び本明細書に開示の r A A V ベクターのうちのいずれか 1 つでパッケージング細胞株をトランスフェクションすることを含む、r A A V ウイルスベクターを産生する方法を提供する。いくつかの態様では、A A V ヘルパープラスミド及び r A A V ベクターは、パッケージング細胞株に共トランスフェクトされる。いくつかの態様では、細胞株は、哺乳動物細胞株、例えば、ヒト胚性腎臓（H E K）2 9 3 細胞株である。本開示は、本明細書に開示の r A A V ベクター及び／又は r A A V ウイルスベクターのうちのいずれか 1 つを含む細胞を提供する。

40

【0186】

本明細書で使用される場合、ウイルス又はプラスミドに対する言及における「ヘルパー

50

」という用語は、本明細書に開示の r A A V ベクターのうちのいずれか 1 つの複製及びパッケージングに必要な追加の構成要素を提供するために使用される、ウイルス又はプラスミドを指す。ヘルパーウイルスによってコードされる構成要素としては、ビリオンアセンブリ、キャプシド化、ゲノム複製、及び／又はパッケージングに必要な任意の遺伝子を挙げることができる。例えば、ヘルパーウイルス又はプラスミドは、ウイルスゲノムの複製に必要な酵素をコードし得る。A A V 構築物とともに使用するのに好適なヘルパーウイルス及びプラスミドの非限定的な例としては、p H E L P（プラスミド）、アデノウイルス（ウイルス）、又はヘルペスウイルス（ウイルス）が挙げられる。いくつかの態様では、p H E L P プラスミドは、アンピシリン発現カセットが、カナマイシン発現カセットと交換されている p H E L P K プラスミドであり得る。

10

【0187】

本明細書で使用される場合、パッケージング細胞（又はヘルパー細胞）は、ウイルスベクターを産生するために使用される細胞である。組換え A A V ウイルスベクターを産生するには、トランスで提供される R e p 及び C a p タンパク質、並びに A A V の複製を助けるアデノウイルスからの遺伝子配列が必要である。いくつかの態様では、プラスミドを含有するパッケージング／ヘルパー細胞は、細胞のゲノムに安定的に組み込まれる。他の態様では、パッケージング細胞は、一過性にトランスフェクトされ得る。典型的には、パッケージング細胞は、哺乳動物細胞又は昆虫細胞などの真核細胞である。

【0188】

キット

20

本明細書に記載の単離ポリヌクレオチド、r A A V ベクター、r A A V ウイルスベクター、組成物、及び／又は薬学的組成物は、療法、診断、又は研究用途でのそれらの使用を容易にするために、薬学又は診断又は研究キットへと組み立てられ得る。いくつかの態様では、本開示のキットは、本明細書に記載の単離ポリヌクレオチド、r A A V ベクター、r A A V ウイルスベクター、組成物、薬学的組成物、宿主細胞、単離組織のうちのいずれか 1 つを含む。

【0189】

いくつかの態様では、キットは、使用説明書を更に含む。具体的には、そのようなキットは、これらの薬剤の意図される用途及び適切な使用について記載する説明書とともに、本明細書に記載の 1 つ以上の薬剤を含み得る。いくつかの態様では、キットは、キットの 1 つ以上の構成要素を混合するための、及び／又は試料を単離及び混合し、対象に適用するための説明書を含み得る。いくつかの態様では、キットの薬剤は、特定の用途及び薬剤の投与の方法に好適な薬学的製剤及び投薬量である。研究目的のキットは、様々な実験を実行するための適切な濃度又は量で構成要素を含有し得る。

30

【0190】

キットは、本明細書に記載の方法の使用を容易にするように設計され得、多くの形態を取り得る。キットの組成物の各々は、該当する場合、液体形態（例えば、溶液）、又は固体形態（例えば、乾燥粉末）で提供され得る。ある特定の場合では、組成物のうちのいくつかは、例えば、キットとともに提供されてもされなくてもよい、好適な溶媒又は他の種（例えば、水又は細胞培養培地）の添加によって、（例えば、活性形態へと）構成可能であり得るか又は処理可能であり得る。いくつかの態様では、組成物は、保存溶液（例えば、凍結保存溶液）中で提供され得る。保存溶液の非限定的な例としては、D M S O、パラホルムアルデヒド、及び C r y o S t o r（登録商標）（S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s, V a n c o u v e r, C a n a d a）が挙げられる。いくつかの態様では、保存溶液は、ある量のメタロプロテアーゼ阻害剤を含有する。

40

【0191】

いくつかの態様では、キットは、1 つ以上の容器に本明細書に記載の構成要素のうちのいずれか 1 つ以上を含有する。したがって、いくつかの態様では、キットは、本明細書に記載の容器収容剤を含み得る。薬剤は、液体、ゲル、又は固体（粉末）の形態であり得る。薬剤は、無菌調製され、シリンジにパッケージングされ、冷蔵出荷され得る。代替的に

50

、保管のためにバイアル又は他の容器に収容され得る。第2の容器は、無菌調製された他の薬剤を有し得る。代替的に、キットは、予め混合され、シリンジ、バイアル、チューブ、又は他の容器内で出荷される活性剤を含み得る。キットは、注射器、局所適用デバイス、又はIV針チューブ及びバッグなどの、薬剤を対象に投与するのに必要な構成要素のうちの1つ以上又は全てを有し得る。

【0192】

更なる定義

文脈が特に示さない限り、本明細書に記載の本発明の様々な特徴を任意の組み合わせで使用的ことができることが具体的に意図されている。更に、本開示はまた、いくつかの態様では、本明細書に記載の任意の特徴又は特徴の組み合わせが除外又は省略され得ることを企図する。例示するために、本明細書が、複合体が構成要素A、B、及びCを含むと述べる場合、A、B、若しくはCのいずれか、又はそれらの組み合わせを、単独で又は任意の組み合わせで省略し、排除することができることが具体的に意図されている。

10

【0193】

特に明示的に示さない限り、全ての特定の態様、実施形態、特徴、及び用語は、列挙された態様、実施形態、特徴、又は用語、及びそれらの生物学的等価物の両方を含むことを意図する。

【0194】

本技術の実施は、特に示さない限り、当該技術分野の範囲内にある、有機化学、薬理学、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、及び組換えDNAの従来技法を用いるであろう。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989)、Current Protocols In Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987))、the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))、Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, a Laboratory Manual、及びAnimal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987))を参照されたい。

20

30

【0195】

本明細書で使用される場合、「含む」という用語は、組成物及び方法が、列挙された要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味することを意図する。本明細書で使用される場合、「本質的に〜からなる」（及び文法的変形）という移行句は、列挙された材料又はステップ、及び列挙された実施形態の基本的かつ新規の特徴に物質的に影響を与えないものを包含するものとして解釈されるものである。したがって、本明細書で使用する「本質的に〜からなる」という用語は、「を含む」と等価であると解釈されるべきではない。「からなる」は、他の成分の微量の要素及び本明細書に開示の組成物を投与するための実質的な方法ステップを超えるものを除外することを意味するものとする。これらの移行用語の各々によって定義される態様は、本開示の範囲内である。本明細書の各例では、「含む」、「本質的に〜からなる」、及び「からなる」という用語のうちのいずれかは、それらの通常の意味を維持しながら、他の2つの用語のうちのいずれかで置き換えられ得る。

40

【0196】

本発明又はその好ましい実施形態の要素を導入するとき、冠詞「a」、「an」、「the」、及び「said」は、要素のうちの1つ以上が存在することを意味すると意図される。「含むこと (comprising)」、「含むこと (including)」、及び「有する」という用語は、包括的であることを意図し、列挙される要素以外の追加の要素が存在する可能性があることを意味する。

50

【0197】

範囲形式の記載は、単に利便性及び簡潔性のためであり、本発明の範囲に関する確固たる限定として解釈するべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、その範囲内の全ての可能な部分範囲並びに個々の数値を具体的に開示したものとみなされるべきである。例えば、1～6などの範囲の説明は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの部分範囲、並びにその範囲内の個々の数字、例えば、1、2、3、4、5、及び6が具体的に開示されるとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。また、本明細書では、値又は範囲は、「約」、「約」1つの特定の値から、及び／又は「約」別の特定の値まで、として表され得る。そのような値又は範囲が表される場合、開示される他の実施形態は、1つの特定の値から、及び／又は他の特定の値まで、列挙された特定の値を含む。同様に、値が近似値として表現される場合、先行詞「約」を使用することによって、特定の値は別の実施形態を形成することが理解されるであろう。本明細書で開示される値がいくつかあり、各値が、本明細書では、値自体に加えて、「約」その特定の値としても開示されることが更に理解されよう。実施形態では、「約」は、例えば、列記された値の10%以内、列記された値の5%以内、又は列記された値の2%以内を意味するために使用され得る。

10

【0198】

範囲を含む全ての数値表記、例えば、pH、温度、時間、濃度、及び分子量は、必要に応じて、1.0若しくは0.1の増分、又は代替的に+/-15%、10%、5%、2%の変動によって、(+)又は(-)変動する近似値である。常に明示的に記載されているわけではないが、全ての数値表記は、「約」という用語が先行していることが理解されるものである。また、常に明示的に記載されているわけではないが、本明細書に記載の試薬は単なる例示であり、そのようなものの等価物が当該技術分野で既知であることが理解されるものである。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、量又は濃度などの測定可能な値を指す場合、指定された量の20%、10%、5%、1%、0.5%、又は更には0.1%の変動を包含することが意味される。

20

【0199】

本明細書に開示の任意の構成要素、範囲、用量形態などの選択について記載するために使用される場合、「許容される」、「有効な」、又は「十分な」という用語は、当該構成要素、範囲、用量形態などが開示の目的に好適であることを意図する。

30

【0200】

また、本明細書で使用される場合、「及び／又は」は、関連付けられ列挙された項目のうちの1つ以上の任意及び全ての可能な組み合わせ、並びに代替的に(「又は」)解釈される場合の組み合わせの欠如を指し、かつ包含する。

【0201】

「組み合わせ」という用語は、1つの投薬単位形態における固定された組み合わせ、又は組み合わせ投与のためのパーツキットのいずれかを指し、1つ以上の活性化合物と組み合わせパートナー(例えば、「療法剤」又は「補助薬剤」とも称される、以下で説明される別の薬物)とが同時に独立して、又は時間間隔内に別々に投与され得る。いくつかの状況では、組み合わせパートナーは協同的効果、例えば、相乗効果を示す。本明細書で利用される場合、「併用投与」又は「組み合わせ投与」などの用語は、選択された組み合わせパートナーを、それを必要としている単一の対象(例えば、患者)に投与することが包含されることを意味し、薬剤が必ずしも同じ投与経路又は同じ時間で投与されるわけではない治療レジメンが含まれることを意図する。

40

【0202】

本明細書で使用される場合、「薬学的な組み合わせ」という用語は、2つ以上の活性成分の混合又は組み合わせによって得られ、活性成分の組み合わせが固定されているものも固定されていないものも含まれる生成物を意味する。「固定された組み合わせ」という用語は、活性成分、例えば、化合物及び組み合わせパートナーの両方が単一の実体又は用量の形態で同時に患者に投与されることを意味する。「固定されていない組み合わせ」とい

50

う用語は、活性成分、例えば、化合物及び組み合わせパートナーの両方が、特定の時間的制約を設けることなく別々の実体として同時に（*simultaneously*）、同時に（*concurrently*）、又は連続して患者に投与されることを意味し、ここで、そのような投与によって、2つの化合物が療法上有効な濃度で患者の体内で提供される。後者は、カクテル療法、例えば、3つ以上の活性成分の投与にも適用される。

【0203】

具体的に列挙されない限り、「宿主細胞」という用語は、例えば、真菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、及び哺乳動物細胞を含む、真核宿主細胞を含む。真核宿主細胞の非限定的な例としては、サル、ウシ、ブタ、ネズミ、ラット、鳥類、爬虫類、及びヒト、例えば、HEK293細胞及び293T細胞が挙げられる。

10

【0204】

本明細書で使用される「単離」という用語は、他の材料を実質的に含まない分子、又は生物学的若しくは細胞材料を指す。

【0205】

核酸の「配列」は、核酸中のヌクレオチドの順序及び同一性を指す。配列は、典型的には、5'から3'の方向に読み取られる。2つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈における「同一」又は「同一性」パーセントという用語は、例えば、当業者に利用可能な配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用して、又は目視検査によって測定して、最大対応物に対して比較し整列させた場合、同じであるか、又は同じであるアミノ酸残基若しくはヌクレオチドの特定のパーセンテージを有する、2つ以上の配列又は部分配列を指す。配列同一性パーセント及び配列類似性を決定するのに好適である例示的なアルゴリズムは、BLASTプログラムであり、これは、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool" J. Mol. Biol. 215:403-410、Gish et al. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" Nature Genet. 3:266-272、Madden et al. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266:131-141、Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" Nucleic Acids Res. 25:3389-3402、及びZhang et al. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" Genome Res. 7:649-656に記載されている。また、多くの他の最適なアライメントアルゴリズムが、当該技術分野で既知であり、任意選択的に、配列同一性パーセントを決定するために利用されている。

20

30

【0206】

本明細書で使用される場合、「核酸配列」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すために互換的に使用される。したがって、この用語は、限定されないが、一本鎖、二本鎖、若しくは多重鎖-DNA若しくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、又はプリン及びピリミジン塩基、又は他の天然の、化学的若しくは生化学的に修飾された非天然若しくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるポリマーを含む。

40

【0207】

「核酸」又は「核酸分子」は、ヌクレオシドが、ホスホジエステル結合又は他の結合によって一緒に連結されてポリヌクレオチドを形成している、窒素含有複素環式塩基又は塩基類似体を有する2つ以上の共有結合したヌクレオシド又はヌクレオシド類似体を含む多

50

量体化合物を指す。核酸としては、RNA、DNA、又はキメラDNA-RNAポリマー若しくはオリゴヌクレオチド、及びそれらの類似体が挙げられる。核酸骨格は、糖-ホスホジエステル結合、ペプチド-核酸結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、又はそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含む、多様な結合で構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、又は既知の置換基（例えば、2'-メトキシ置換基及び2'-ハロゲン化物置換基）を有する同様の化合物であり得る。窒素含有塩基は、従来の塩基（A、G、C、T、U）、又はそれらの類似体（例えば、イノシン、5-メチルイソシトシン、イソグアニン）であり得る。核酸は、RNA及びDNAに見出される従来の糖、塩基、及び結合のみを含み得るか、又は従来の構成要素及び置換基（例えば、2'-メトキシ骨格によって連結された従来の塩基、又は従来の塩基及び1つ以上の塩基類似体の混合物を含む核酸）を含み得る。核酸としては、1つ以上のヌクレオチドモノマーが、一本鎖RNA（ssRNA）、一本鎖DNA（ssDNA）、又は二本鎖DNA（dsDNA）における相補的配列に対するハイブリダイゼーション親和性を増強する、糖コンフォメーションを模倣するRNAにおいてロックされた二環式フラノース単位を有する、「ロック核酸」（LNA）を挙げることができる。核酸は、核酸の機能又は挙動を変更するための修飾塩基（例えば、追加のヌクレオチドが核酸に付加されることを遮断するための3'-末端ジデオキシヌクレオチドの付加）を含み得る。インビトロで核酸を作製するための合成方法は、当該技術分野で周知であるが、核酸は、通常の技法を使用して天然源から精製され得る。核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。

10

20

【0208】

「遺伝子」は、特定のポリペプチド又はタンパク質をコードすることが可能である少なくとも1つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含有する、ポリヌクレオチドを指す。「遺伝子産生物」又は代替的に「遺伝子発現産生物」は、遺伝子が転写及び翻訳されると生成されるアミノ酸配列（例えば、ペプチド又はポリペプチド）を指す。

【0209】

核酸は、典型的には一本鎖又は二本鎖であり、一般にホスホジエステル結合を含有するであろうが、本明細書に概説されるように、いくつかの場合では、例えば、限定されないが、ホスホラミド（各々が本明細書に組み込まれる、Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49 (10): 1925 及び文献中の参考文献、Lettinger (1970) J. Org. Chem. 35: 3800、Sprinzl et al. (1977) Eur. J. Biochem. 81: 579、Lettinger et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487、Sawai et al. (1984) Chem. Lett. 805、Lettinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470、及びPaulwels et al. (1986) Chemica Scripta 26: 1419、ホスホロチオエート（両方が参照により組み込まれる、Mag et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437 及び米国特許第5,644,048号）、ホスホロジチオエート（参照により組み込まれる、Briu et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 2321）、O-メチルホスホロアミダイト結合（参照により組み込まれる、Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992) を参照されたい）、並びにペプチド核酸骨格及び結合（各々が参照により組み込まれる、Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 1895、Meier et al. (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008、Nielsen (1993) Nature 365: 566、及びCarlsson et al. (1996) Nature 380: 207 を参照されたい）を含む、交互の骨格を有し得る核酸類似体が含まれる。他の類似の核酸としては、正荷電骨格（参照により組み込まれる、Denpcy et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097）、非イオン性骨格（各々が参照により組み込まれる、米国特許第5,386,

30

40

50

023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号、及び同第4,469,863号、Angew (1991) Chem. Intl. Ed. English 30:423、Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470、Letsinger et al. (1994) Nucleoside & Nucleotide 13:1597、Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan Cook、Meismaeker et al. (1994) Bioorganic & Medicinal Chem: Lett. 4:395、Jeffs et al. (1994) J. Biomolecular NMR 34:17、及びTetrahedron Lett. 37:743 (1996))、並びに参考文献が、各々が参照により組み込まれる、米国特許第5,235,033号及び同第5,034,506号、及びChapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan Cookに記載のものを含む非リボース骨格を有するものが挙げられる。1つ以上の炭素環式糖を含有する核酸もまた、核酸の定義内に含まれる(参照により組み込まれる、Jenkins et al. (1995) Chem. Soc. Rev. pp169-176を参照されたい)。また、いくつかの核酸類似体が、例えば、参照により組み込まれる、Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 page 35に記載されている。リボース-ホスフェート骨格のこれらの修飾は、標識などの追加の部分の付加を容易にするために、又は生理学的環境におけるそのような分子の安定性及び半減期を変更するために行われ得る。

10

20

【0210】

核酸(例えば、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、及びウラシル)に典型的に見出されるこれらの天然に存在する複素環式塩基に加えて、また、核酸類似体は、天然に存在しない複素環式塩基又は修飾された塩基を有するものを含み、これらの多くは、本明細書に記載されているか、又は言及されている。特に、多くの天然に存在しない塩基は、例えば、各々が参照により組み込まれる、Seela et al. (1991) Helv. Chim. Acta 74:1790、Grein et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:971-976、及びSeela et al. (1999) Helv. Chim. Acta 82:1640に更に記載されている。更に例示するために、融解温度として作用するヌクレオチドで使用されるある特定の塩基(TO修飾剤が、任意選択的に挙げられる。例えば、これらのうちのいくつかとしては、7-デアザプリン(例えば、7-デアザグアニン、7-デアザアデニンなど)、ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、プロピニル-dN(例えば、プロピニル-dU、プロピニル-dCなど)などが挙げられる。例えば、参照により組み込まれる、Seelaに1999年11月23日に発行された「SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES」と題された米国特許第5,990,303号を参照されたい。他の代表的な複素環式塩基としては、例えば、ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン; 2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシン、及びキサンチンの8-アザ誘導体; アデニン、グアニン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシン、及びキサンチンの7-デアザ-8-アザ誘導体; 6-アザシトシン; 5-フルオロシトシン; 5-クロロシトシン; 5-ヨードシトシン; 5-ブロモシトシン; 5-メチルシトシン; 5-プロピニルシトシン; 5-ブロモビニルウラシル; 5-フルオロウラシル; 5-クロロウラシル; 5-ヨードウラシル; 5-ブロモウラシル; 5-トリフルオロメチルウラシル; 5-メトキシメチルウラシル; 5-エチニルウラシル; 5-プロピニルウラシルなどが挙げられる。

30

40

【0211】

50

また、修飾された塩基及びヌクレオチドの例は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Froehler et al. に1996年1月16日に発行された「OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 5-PROPYNYL

【0212】
PYRIMIDINES」と題された米国特許第5,484,908号、Froehler et al. に1997年7月8日に発行された「ENHANCED TRIPL
E-HELIX AND DOUBLE-HELIX FORMATION WITH
OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINE
S」と題された米国特許第5,645,985号、Froehler et al. に1
998年11月3日に発行された「METHODS OF USING OLIGOME
RS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES」と題された
米国特許第5,830,653号、Kochkine et al. に2003年10月
28日に発行された「SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NU
CLEOSIDES」と題された米国特許第6,639,059号、Skouyに200
1年10月16日に発行された「ONE STEP SAMPLE PREPARATI
ON AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMP
LEX BIOLOGICAL SAMPLES」と題された米国特許第6,303,3
15号、及び2003年5月15日に公開されたKochkine et al.による「
SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NUCLEOSIDES」
と題された米国特許出願公開第2003/0092905号に記載されている。

10

20

【0213】
本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写される2
段階プロセス、及び／又は転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド、若し
くはタンパク質へと翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来
する場合、発現は、真核生物細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

【0214】
「転写制御下で」は、当該技術分野でよく理解されている用語であり、ポリヌクレオチ
ド配列、通常はDNA配列の転写が、転写の開始に寄与するか、又は転写を促進する要素
に動作可能に連結されていることに依存することを示す。「動作可能に連結された」とは
、ポリヌクレオチドが、それらが細胞内で機能することを可能にする様式で配置されてい
ることを意図する。一態様では、プロモーターは、下流配列に動作可能に連結され得る。

30

【0215】
ポリヌクレオチド及び／又は核酸配列に適用される「コードする」という用語は、その
天然状態で、又は当業者に周知の方法によって操作される場合、ポリペプチド及び／又は
その断片のmRNAを産生するように転写され得る、ポリヌクレオチド及び／又はポリヌ
クレオチドを「コードする」と言われる核酸配列を指す。アンチセンス鎖は、そのような
核酸の相補鎖であり、コード配列は、それから推定され得る。

【0216】
「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸、アミ
ノ酸類似体、又はペプチド模倣物の2つ以上のサブユニットの化合物を指すために、互換
的にかつそれらの最も広い意味で使用される。サブユニットは、ペプチド結合によって連
結され得る。別の態様では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテルな
どによって連結され得る。タンパク質又はペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有
する必要がある、タンパク質又はペプチドの配列を含み得るか、本質的にそれからなり得
るか、又はそれからなり得るアミノ酸の最大数に制限はない。本明細書で使用される場合
、「アミノ酸」という用語は、グリシン、並びにD及びL光学異性体の両方、アミノ酸類
似体、及びペプチド模倣体を含む、天然及び／又は非天然若しくは合成アミノ酸のいずれ
かを指す。

40

【0217】
本明細書で使用される場合、「シグナルペプチド」又は「シグナルポリペプチド」とい

50

う用語は、新しく合成された分泌又は膜ポリペプチド又はタンパク質のN末端に通常存在するアミノ酸配列を意図する。それは、ポリペプチドを特定の細胞位置に、例えば、細胞膜を通して、細胞膜に、又は核に誘導するように作用する。いくつかの態様では、シグナルペプチドは、局在化後に除去される。シグナルペプチドの例は、当該技術分野で周知である。非限定的な例は、米国特許第8,853,381号、同第5,958,736号、及び同第8,795,965号に記載されているものである。いくつかの態様では、シグナルペプチドは、IDUAシグナルペプチドであり得る。

【0218】

「等価物」又は「生物学的等価物」という用語は、特定の分子、生物学的材料、又は細胞材料を指す場合、互換的に使用され、所望の構造又は機能性を依然として維持しながら、最小限の相同性を有するものを意図する。等価なポリペプチドの非限定的な例としては、参照ポリペプチド（例えば、野生型ポリペプチド）に対して少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%の同一性、若しくは少なくとも約99%の同一性を有するポリペプチド、又は参照ポリヌクレオチド（例えば、野生型ポリヌクレオチド）に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約97%の配列同一性、若しくは少なくとも約99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが挙げられる。

【0219】

「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つのペプチド間又は2つの核酸分子間の配列類似性を指す。同一性パーセントは、比較の目的で整列され得る各配列における位置を比較することによって決定され得る。比較配列中の位置が同じ塩基又はアミノ酸によって占有される場合、分子は、その位置で同一である。配列間の同一性の程度は、配列によって共有される一致する位置の数に相関する。「非関連」又は「非相同」配列は、本開示の配列のうちの1つと、40%未満の同一性、25%未満の同一性を共有する。本明細書に提供される核酸又はアミノ酸配列についてのアラインメント及び配列同一性パーセントは、当該核酸又はアミノ酸配列をClustalW(<https://genome.jp/tools-bin/clustalw/>で入手可能)にインポートし、それを使用することによって決定され得る。例えば、本明細書に見出されるタンパク質配列アラインメントを実施するために使用したClustalWパラメータは、Gonnet（タンパク質用）重量マトリックスを使用して生成した。いくつかの態様では、本明細書に見出される核酸配列を使用して核酸配列アラインメントを実施するために使用するClustalWパラメータは、ClustalW（DNA用）重量マトリックスを使用して生成する。

【0220】

本明細書で使用される場合、アミノ酸修飾は、アミノ酸置換、アミノ酸欠失、又はアミノ酸挿入であり得る。アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換又は非保存的アミノ酸置換であり得る。保存的置換（保存的変異、保存的置換、又は保存的バリエーションとも呼ばれる）は、所与のアミノ酸を、同様の生化学的特性（例えば、電荷、疎水性、又はサイズ）を有する異なるアミノ酸に変化させるタンパク質中のアミノ酸置換である。本明細書で使用される場合、「保存的バリエーション」は、別の生物学的に同様の残基によるアミノ酸残基の置き換えを指す。保存的バリエーションの例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、若しくはメチオニンなどの1つの疎水性残基の別のものへの置換、又はアルギニンのリジンへの、グルタミン酸のアスパラギン酸への、グルタミンのアスパラギンへの置換などの1つの荷電残基若しくは極性残基の別のものへの置換が挙げられる。保存的置換の他の例示的な例としては、アラニンからセリンへの、アスパラギンからグルタミン又はヒスチジンへの、アスパラギン酸からグルタミン酸への、システインからセリンへの、グリシンからプロリンへの、ヒスチジンからアスパラギン又はグルタミンへの、リジンからアルギニン、グルタミン、又はグルタミン酸への、フェニルアラニンからチロ

シンへの、セリンからスレオニンへの、スレオニンからセリンへの、トリプトファンからチロシンへの、チロシンからトリプトファン又はフェニルアラニンへの変更などが挙げられる。

【0221】

本明細書に開示のポリヌクレオチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して細胞又は組織に送達され得る。本明細書で使用される「遺伝子送達」、「遺伝子移入」、「形質導入」などは、導入に使用される方法に関係なく、宿主細胞への外因性ポリヌクレオチド（「導入遺伝子」と称されることもある）の導入を指す用語である。そのような方法としては、（例えば、ウイルス感染／トランスフェクション、又は様々な他のタンパク質ベース若しくは脂質ベースの遺伝子送達複合体による）ベクター媒介性遺伝子移入などの多様な周知の技法、並びに「裸」ポリヌクレオチドの送達を容易にする技法（エレクトロポレーション、「遺伝子銃」送達、及びポリヌクレオチドの導入に使用される様々な他の技法など）が挙げられる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞において安定に又は一過性に維持され得る。安定的な維持は、典型的には、導入されたポリヌクレオチドが、宿主細胞と適合性の複製起点を含有するか、又は染色体外レプリコン（例えば、プラスミド）若しくは核若しくはミトコンドリア染色体などの宿主細胞のレプリコンに組み込まれるかのいずれかを必要とする。当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されているように、いくつかのベクターは、哺乳動物細胞への遺伝子の移入を媒介することが可能であることが知られている。

10

【0222】

「プラスミド」は、典型的には染色体DNAから分離され、染色体DNAとは独立して複製することが可能であるDNA分子である。多くの場合、それは円形かつ二本鎖である。プラスミドは、微生物の集団内で遺伝子水平伝播の機構を提供し、典型的には、所与の環境状態で選択的利点を提供する。プラスミドは、競争の激しい環境ニッチにおいて天然に存在する抗生物質に耐性を提供する遺伝子を担持し得るか、又は代替的に、産生されるタンパク質は、同様の状況下で毒素として作用し得る。プラスミドベクターは、多くの場合、染色体外の環式DNA分子として存在するが、プラスミドベクターはまた、無作為に又は標的化された様式のいずれかで宿主染色体に安定的に組み込まれるように設計され得、そのような組み込みは、環式プラスミド、又は宿主細胞に導入される前に線状化されているプラスミドのいずれかを使用して達成され得ることが、当該技術分野で知られている。

20

30

【0223】

遺伝子工学で使用される「プラスミド」は、「プラスミドベクター」と呼ばれる。そのような使用のための多くのプラスミドが市販されている。複製される遺伝子は、特定の抗生物質に対して細胞を耐性にする遺伝子を含有するプラスミド、及びいくつかの一般的に使用される制限部位を含有する短い領域であるマルチクローニング部位（MCS、又はポリリンカー）のコピーに挿入され、この位置でのDNA断片の容易な挿入を可能にする。プラスミドの別の主な使用は、大量のタンパク質を作製することである。この場合、研究者は、目的の遺伝子を有するプラスミドを含有する細菌又は真核細胞を増殖させ、挿入された遺伝子から大量のタンパク質を産生するように細菌又は真核細胞を誘導することができ

40

【0224】

遺伝子移入が、アデノウイルス（Ad）又はアデノ随伴ウイルス（AAV）などのDNAウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物は、ウイルスゲノム又はその一部及び導入遺伝子を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるポリヌクレオチドを指す。

【0225】

「組織」という用語は、生きているか若しくは死んだ生物の組織、又は生きているか若しくは死んだ生物に由来するか、若しくは模倣するように設計された任意の組織を指すために本明細書で使用される。組織は、健康であっても、病気であっても、及び／又は遺伝

50

子変異を有していてもよい。生物学的組織としては、任意の単一の組織（例えば、相互接続され得る細胞の集合体）、又は生物の臓器、若しくは体の部分若しくは領域を構成する組織の群を挙げることができる。組織は、均質な細胞材料を含み得るか、本質的にそれからなり得るか、若しくはそれからなり得るか、又は例えば、肺組織、骨格組織、及び／若しくは筋肉組織を含み得る、胸部を含む身体の領域に見出されるような複合構造であり得る。例示的な組織としては、限定されないが、肝臓、肺、甲状腺、皮膚、脾臓、血管、膀胱、腎臓、脳、胆管樹、十二指腸、腹部大動脈、腸骨静脈、心臓及び腸に由来するものが挙げられ、それらの任意の組み合わせが含まれる。

【実施例】

【0226】

10

実施例 1

不整脈原性右心室心筋症（ARVC）は、主に遺伝子に基づく心臓疾患であり、右心室のみならず、最近ではまた左心室機能不全を特徴とし、心筋の線維性脂肪置き換えが若者及びアスリートの心室不整脈及び心臓突然死をもたらしている（1）。ARVCは、 ≤ 65 歳の人では心臓突然死の 10%、 ≤ 30 歳の人では 24% を占めている（2、3）。ARVCは、1000～5000 人に 1 人に発生すると考えられているが、一部の患者は、診断マーカーの不良に起因して、診断されていないか又は誤診されているので、有病率はより高い場合がある（4、5）。乳児から 10 代の子供までの範囲の小児集団もまた、ARVC に対して特に脆弱であることからの証拠の増加によって、より早期の発症が明らかになっており（6～10）、疾患の早期段階で患者を同定し治療する重要な必要性が強調されている。

20

【0227】

過去 10 年間にわたり、ARVC は、40～50% の症例がデスモソームに関連付けられる複数の遺伝子（デスモグレイン-2、デスモコリン-2、プラコグロビン、プラコフィリン-2、デスモブラキン）における変異／欠損に関連しているので、心臓デスモソーム（特化した細胞間結合部）の疾患として認識されており、したがって、決して単一遺伝子の疾患とはみなされない（11）。この疾患にとって重要なのは、デスモソーム複合体の 1 つの構成要素における変異／欠損が、デスモソーム複合体の他のメンバー、並びに心臓細胞間結合部の他の部分（収縮機構に関連する付着筋膜結合部、及び電気的結合に関連するギャップ結合部）に壊滅的なカスケード効果を有し、ARVC の基礎となる心臓の構造的及び電気的欠損を駆動することである。機能的に重要な隣接する細胞結合構成要素とともにデスモソーム複合体の階層的溶解は、デスモソーム自体だけでなく、心臓細胞間結合複合体全体に対する復元効果を標的とする戦略の必要性を強調する。本開示は、心臓細胞間結合部複合体を再構築し、ARVC 疾患の発症を防止するための単一遺伝子戦略（プラコフィリン-2）を実証する研究を提供する。

30

【0228】

本発明は、PKP2 cDNA を送達し、最終的に心臓における PKP2 タンパク質レベルを増加させる、標的遺伝子療法である（図 1A～C）。この遺伝子療法は、心筋細胞特異的発現を駆動するために、心臓作用性 AAV 血清型 9（AAV9）又は AAVrh10、並びに心臓特異的プロモーターの心臓トロポニン T を利用する（図 1B～C、図 8A）。PKP2 発現は、心臓デスモソームを有効に再構築することができ（図 2、図 3A～B、図 6F、図 7B、図 8A、8E）、これは、ARVC の基礎となる心臓細胞間結合部欠損を回避するための分子足場として機能する。PKP2 は、デスモソーム、並びに疾患進行の基礎となる下流のカスケード欠損である他の細胞間結合部複合体（ギャップ結合部及び付着筋膜結合部）を安定化する（図 2、図 3A～B、図 6F、図 7B、図 8A、8E）。AAV9 PKP2 遺伝子療法は、疾患発症前の早期送達による予防として、又は既存の疾患を有する患者における疾患進行を停止させるために機能し得る（図 3C、図 4、図 5、図 6A～F、図 7D、7E、図 8B～D）。

40

【0229】

本開示は、PKP2 変異型新生児心筋細胞における、PKP2 を含む AAV ベクターに

50

よる治療が、細胞間結合部タンパク質レベル（PKP2、DSP、DSG2、JUP、CX43）を改善したことを示す研究を提供する（図1A、図2）。本開示は、インビボで心臓において、心臓トロポニンTプロモーターの制御下でPKP2を正常に発現することができるPKP2をコードする配列を含む、AAV9又はAAVrh10ベクターを提供する（図1B～C、図8A）。PKP2変異型マウスの出生後2日目に、AAV9 PKP2の 5×10^{11} 個のウイルス粒子の単回腹腔内注射を実施した（図3）。注射4週間後に、ウエスタンブロットを介して心臓溶解物を分析し、AAV9 PKP2投与が、細胞間結合部タンパク質（PKP2、DSP、DSG2、JUP、CX43）のレベルを改善することができることを見出した（図3B）。早期のAAV9 PKP2注射はまた、4週齢でのARVC疾患の発症を防止することができ（図3C）、これは、心臓の機構的及び電氣的機能の保存、心筋における有意に少ない線維症、及び生存期間の延長があったことを理由とする（図4、図5、図6A）。細胞間結合部タンパク質レベル、心臓の機構的機能、及び心臓の電氣的機能は、AAV9 PKP2注射の6か月後も依然として保存され（図6B～6F）、ARVC疾患発症に対するPKP2遺伝子療法の持続的な影響を強調した。また、全ての疾患特徴が存在する時点（4週齢）でPKP2変異型マウスをAAV9 PKP2で治療し、PKP2変異型マウスへのAAV9 PKP2注射の2週間後、AAV9 GFPを受けたPKP2変異型マウスと比較して、心臓細胞間結合部タンパク質（PKP2、DSP、DSG2、JUP、N-Cad）及び心臓の機構的機能の改善（LV/RV駆出率におよそ15%の改善）を示した（図7）。

10

20

30

40

50

【0230】

AAVrh10キャプシド化PKP2 rAAVベクターを用いた研究も行った。これらの研究は、AAV9及びAAVrh10ベクター血清型を含む本開示のAAVベクターが、成体マウス心臓においてヒトPKP2タンパク質を安定的に発現し、PKP2 HomマウスにおいてARVC疾患転帰を回避することができることを実証している。図8Aは、注射されていない野生型対照と比較して、hPKP2が、 $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g }$ の用量でAAV9を使用して、成体野生型対照マウス的心臓において早ければ10日で発現することができるというウエスタンブロット分析を示す（より高い移動サイズのバンドがhPKP2に対応することに対して、より低い内因性の移動バンドがマウスPKP2に対応する）。ウエスタンブロット分析は、 $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g }$ の用量でAAVrh10を使用した、成体PKP2ヘテロ接合型（HET）変異型マウス的心臓において、感染21日後にhPKP2の発現がより堅牢になることを更に示している。hPKP2の発現は、低レベルではあるが、肝臓でも検出することができた。更に、AAVrh10-hPKP2は、成体PKP2 Het心臓において、PKP2への即時結合パートナーであるデスモプラキン（DSP）レベルを安定化するので、「オンターゲット」効果を有する。DSPレベルは、野生型対照未注射マウスと比較して、対照レベルまで復元される。GAPDH及びベクターアクチンは、ローディング対照として機能させた。これらのデータは、AAV9及びAAVrh10-PKp2構築物が成体マウス心臓で発現し、AAVrh10-PKPKP2が成体PKP2 Hetマウス心臓の心臓デスモソームにおける欠損を機能的に救済することを示している。

【0231】

図8Bは、PKP2 Homマウスにおける、（AAV9及びAAVrh10を介した）製剤及びhPKP2の早期投与（出生後2日目（P2））後の4週間の生存率曲線を示す。AAV9-hPKP2及びAAVrh10-hPKP2は、PKP Homマウスにおける早期死亡を防止するのに十分であり、これは、製剤治療PKP2 Homマウスにおいて観察されることに留意されたい。 $n = 5 \text{ AAVrh10 hPKP2}$ 、 $n = 5 \text{ Hom-AAV9 PKP2}$ 、 $n = 5 \text{ 製剤}$ 。

【0232】

図8Cは、（AAV9及びAAVrh10を介した）製剤及びhPKP2の表面ECG分析及び早期投与（P2）後の、PKP2 Homマウスにおける異所性拍動／心室期外収縮（PVC）の棒グラフ分析を示す。AAV9-hPKP2（ $n = 2$ ）及びAAVrh

10-hPKP2 (n=4) は、4週齢までこれらの群においてPVCが観察されなかったため、PKP Homマウスにおいて心室期外収縮を防止するのに十分であることに留意されたい。対照的に、4週間齢の、3つの製剤で治療されたPKP2 Homマウスのうちの2匹に早期死亡が観察された。n=4AAVrh10-hPKP2、n=2Hom-AAV9-PKP2、n=3製剤。

【0233】

図8Dは、野生型対照未治療マウス、製剤で治療したPKP2 Hom、AAV9-hPKP2治療PKP2 Hom、及びAAVrh10-hPKP2治療PKP2 Homからの、拡張末期における磁気共鳴画像の代表的な心臓短軸図を示す。拡張末期の各群の右心室(RV)及び左心室(LV)の寸法は、色付きで概説されている。製剤治療マウスと比較した場合の、AAVrh10-hPKP2で治療したPKP2 HomにおけるRV及びLV寸法の有意な低減に留意されたい。製剤治療マウスと比較した場合の、AAVrh10-hPKP2で治療したPKP2 HomにおけるLV寸法の有意な低減に留意されたい。

10

【0234】

図8Eは、野生型対照未治療マウス、製剤で治療したPKP2 Hom、AAV9-hPKP2治療PKP2 Hom、及びAAVrh10-hPKP2治療PKP2 Homからの心臓における、PKP2及び細胞間結合部タンパク質(デスモプラキン(DSP)、デスモグレイン-2(DSG2)、コネキシン43(Cx43)、N-カドヘリン(NCAD)、プラコグロビン(JUP)のウエスタンブロット分析を示す。hPKP2治療PKP2 Hom心臓における心臓細胞間結合部溶解の防止を強調する、AAV9-hPKP2治療PKP2 Hom及びAAVrh10-hPKP2治療PKP2 Homにおける、DSP、DSG2、Cx43(製剤治療マウスで見出されるその分解された形態と比較した)、JUPの心臓タンパク質発現における有意な上方調節に留意されたい。ローディング対照としてGAPDHを使用する。死亡した製剤治療マウスを、アスタリスクによって示していることに留意されたい。

20

【0235】

ARVCのための療法薬：

1) ARVC患者におけるPKP2レベルを復元する手段として、PKP2 cDNAを含有するアデノ関連ウイルスベクターを生成することによって、PKP2は、ARVCの療法を目的とすることができる。

30

2) ARVC患者におけるPKP2機能を復元する手段として、PKP2の新規の直接的な薬理学的活性化因子を開発することによって、PKP2は、ARVCの療法を目的とすることができる。

3) ARVC患者における細胞間結合部複合体再構成を復元するために、PKP2機能の下流の経路を標的とする薬物を開発又は利用することによって、PKP2は、ARVCの療法を目的とすることができる。

【0236】

参考文献

1. Idris, A., S. R. Shah, and K. Park, Right ventricular dysplasia: management and treatment in light of current evidence. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2018. 8 (3): p. 101-106.
2. Elias Neto, J., et al., Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D) - What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. Arq Bras Cardiol, 2019. 112 (1): p. 91-103.

40

50

3. Wang, W. , C. A. James, and H. Calkins, Diagnostic and therapeutic strategies for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patient. *Europace*, 2019. 21 (1) : p. 9–21.
4. Sen-Chowdhry, S. , et al. , Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med*, 2010. 61: p. 233–53
5. Tabib, A. , et al. , Undetected cardiac lesions cause unexpected sudden cardiac death during occasional sport activity. A report of 80 cases. *Eur Heart J*, 1999. 20 (12) : p. 900–3. 10
6. Tabib, A. , et al. , Circumstances of death and gross and microscopic observations in a series of 200 cases of sudden death associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and/or dysplasia. *Circulation*, 2003. 108 (24) : p. 3000–5. 20
7. Thiene, G. , D. Corrado, and C. Basso, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2007. 2: p. 45.
8. Peters, S. , M. Trummel, and W. Meyners, Prevalence of right ventricular dysplasia–cardiomyopathy in a non-referral hospital. *Int J Cardiol*, 2004. 97 (3) : p. 499–501.
9. Nishikawa, T. , et al. , Programmed cell death in the myocardium of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in children and adults. *Cardiovasc Pathol*, 1999. 8 (4) : p. 185–9. 30
10. Wong, A. R. , et al. , Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in an 11-year-old girl and typical echocardiographic features. *Pediatr Cardiol*, 2008. 29 (2) : p. 427–30.
11. Rey, C. , et al. , Life-saving automated external defibrillation in a teenager: a case report. *J Med Case Rep*, 2007. 1: p. 76. 40
12. Daliento, L. , et al. , Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in young versus adult patients: similarities and differences. *J Am Coll Cardiol*, 1995. 25 (3) : p. 655–64.
13. Garcia-Gras, E. , et al. , Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 2006. 116 (7) 50

: p. 2012-21.

14. Marcus, F. I., S. Edson, and J. A. Towbin, Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a practical guide for physicians. J Am Coll Cardiol, 2013. 61 (19) : p. 1945-8.

15. Sen-Chowdhry, S., et al., Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. Annu Rev Med, 2010. 61: p. 233-53.

16. Elliott, PM., et al., Definition and treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy: an updated expert panel report. Eur J Heart Fail, 2019. 8: p. 955-964.

17. Elias Neto, J., et al., Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D) -What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. Arq Bras Cardiol, 2019. 112 (1) : p. 91-103.

【図面】

【図1A】

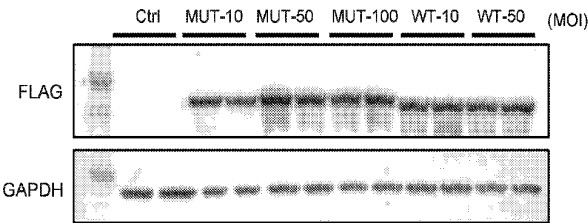
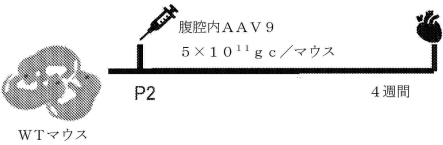


FIG. 1A

【図1B】



10

20

30

40

50

【図 1 C】

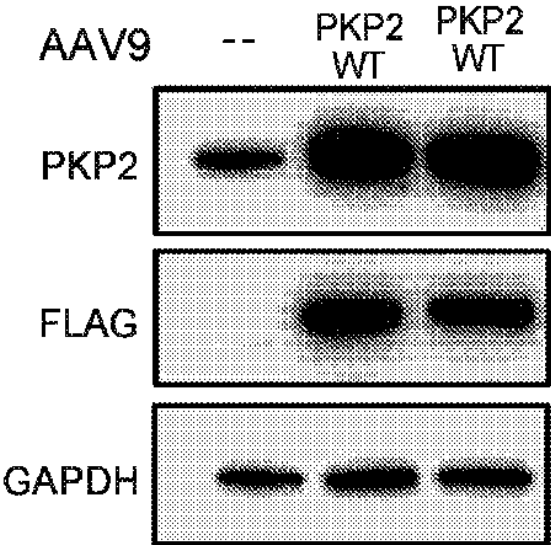
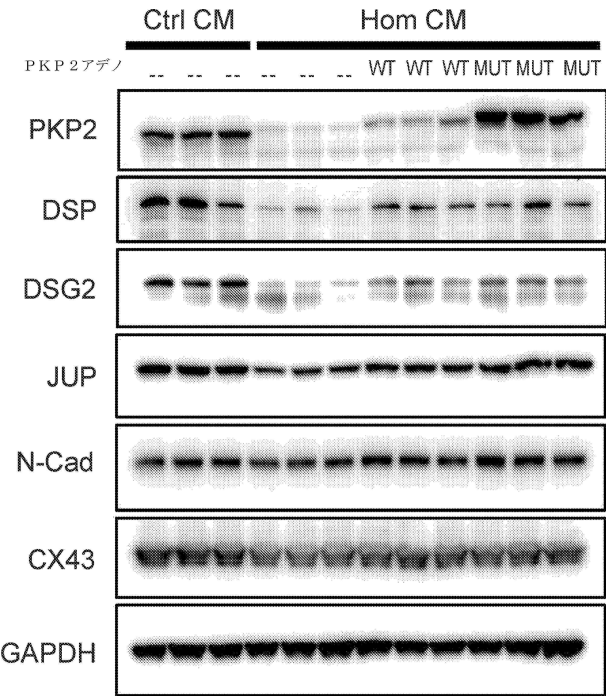


FIG. 1C

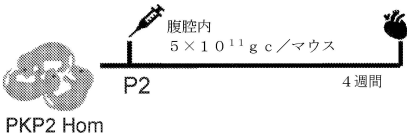
【図 2】



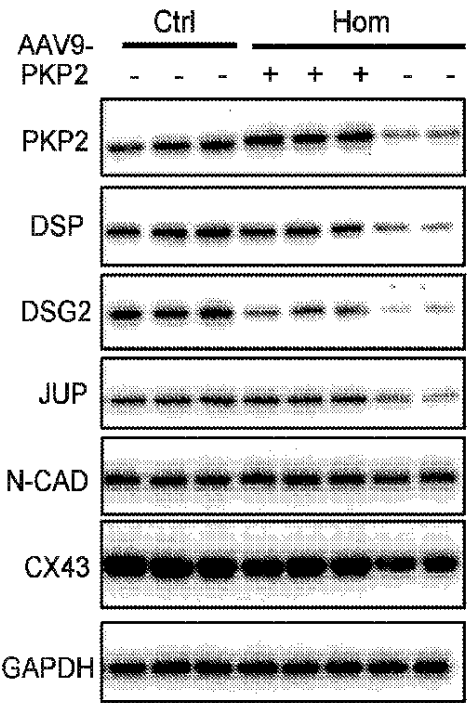
10

20

【図 3 A】



【図 3 B】

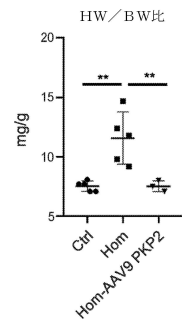


30

40

FIG. 3B

【図 3 C】



【図 4 A】

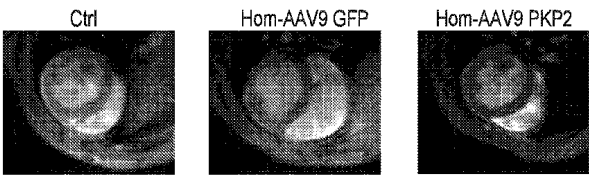
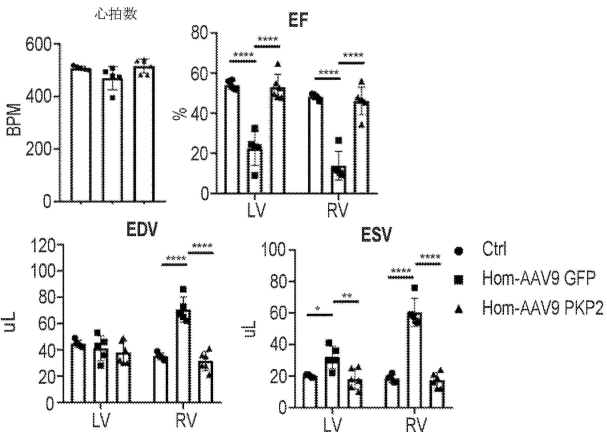


FIG. 4A

【図 4 B】



【図 4 C】

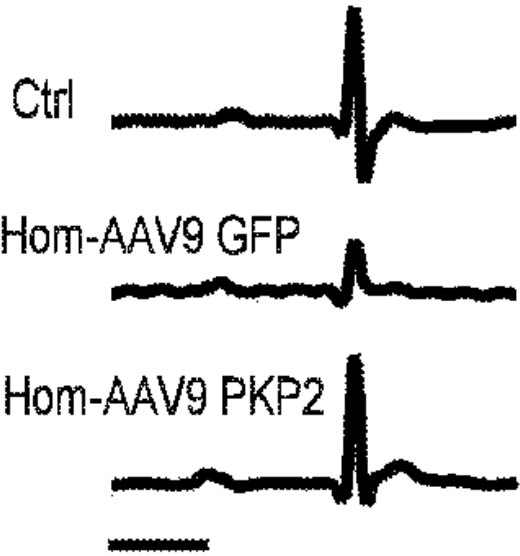


FIG. 4C

10

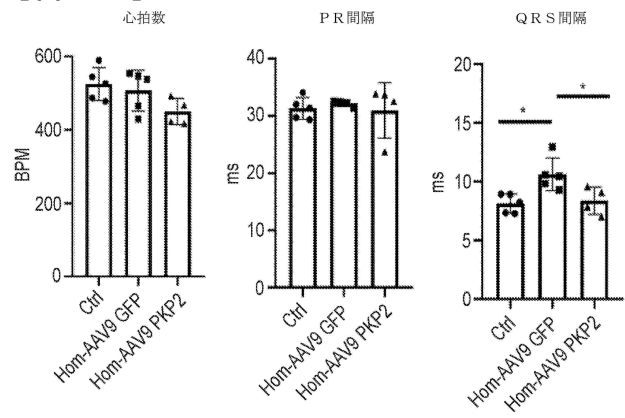
20

30

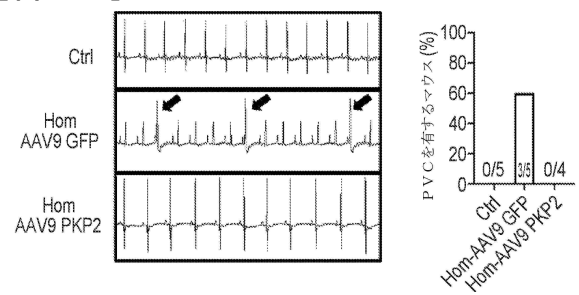
40

50

【図 4 D】



【図 4 E】



10

【図 5 A】

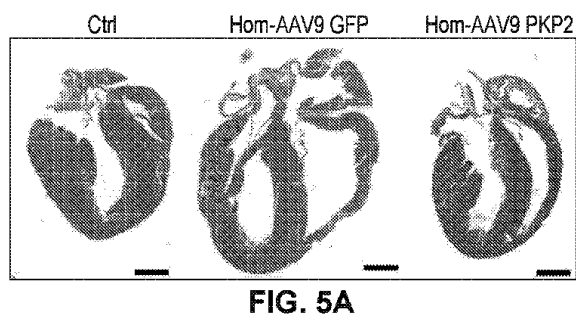


FIG. 5A

【図 5 B】

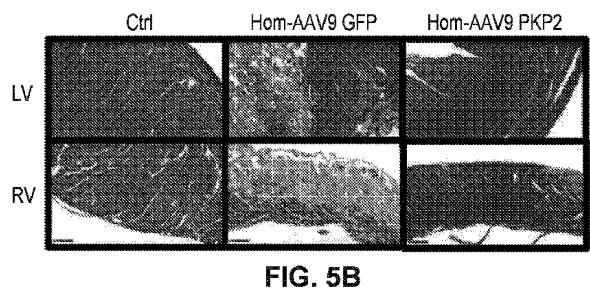
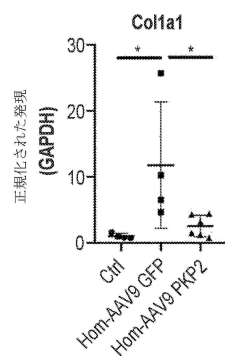


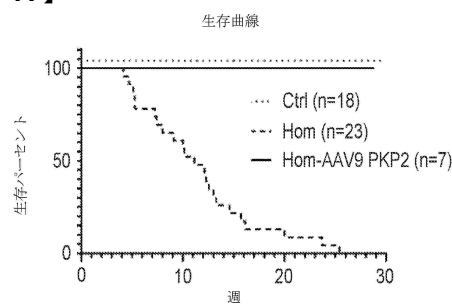
FIG. 5B

20

【図 5 C】



【図 6 A】



30

40

50

【図 6 B】

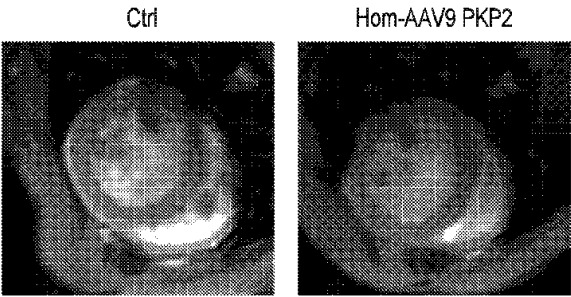
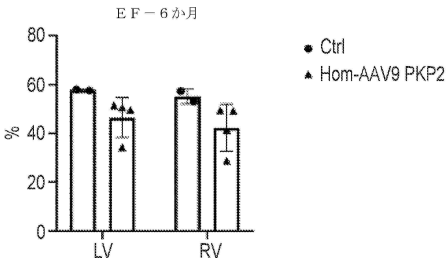


FIG. 6B

【図 6 C】



10

【図 6 D】

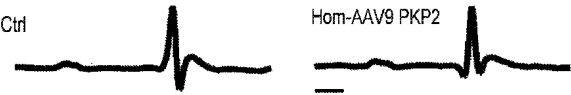
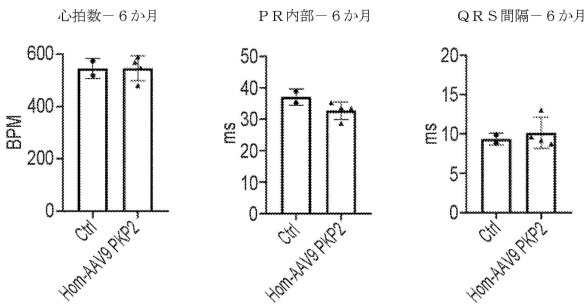


FIG. 6D

【図 6 E】



20

30

40

50

【図 6 F】

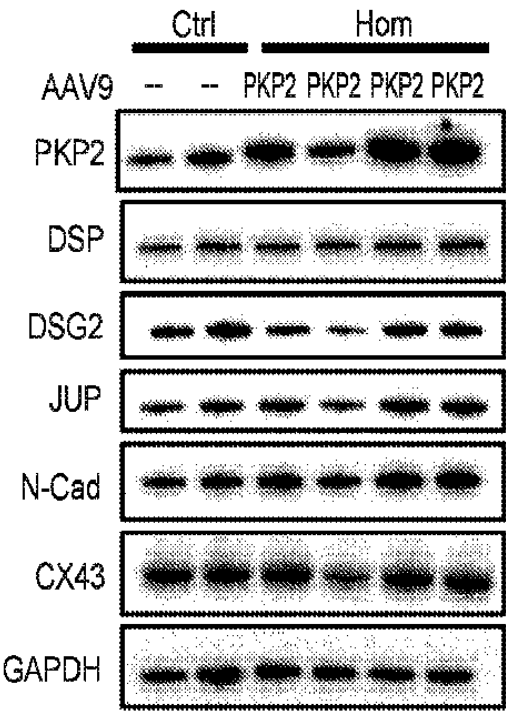


FIG. 6F

【図 6 G】

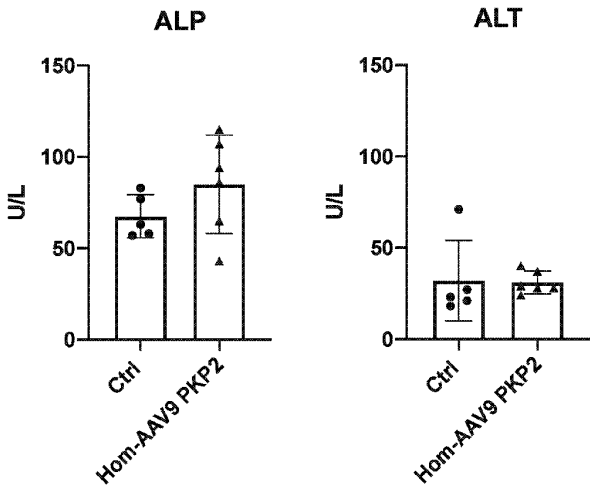
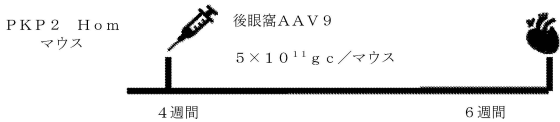


FIG. 6G

【図 7 A】



【図 7 B】

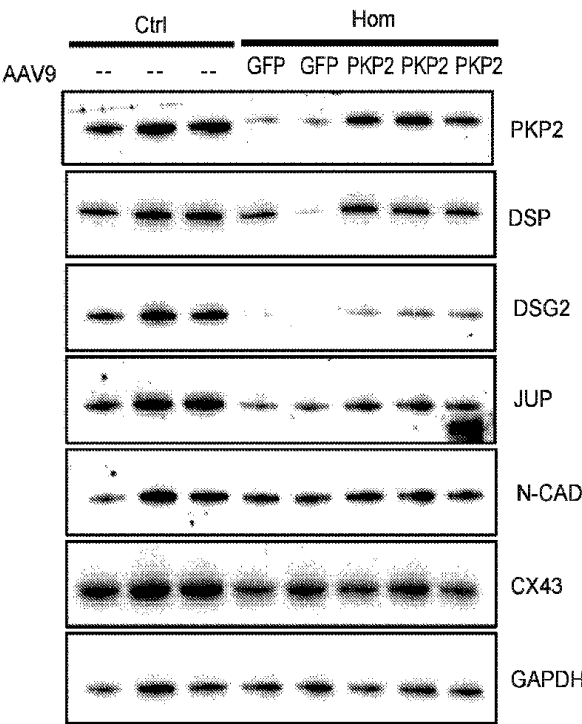


FIG. 7B

10

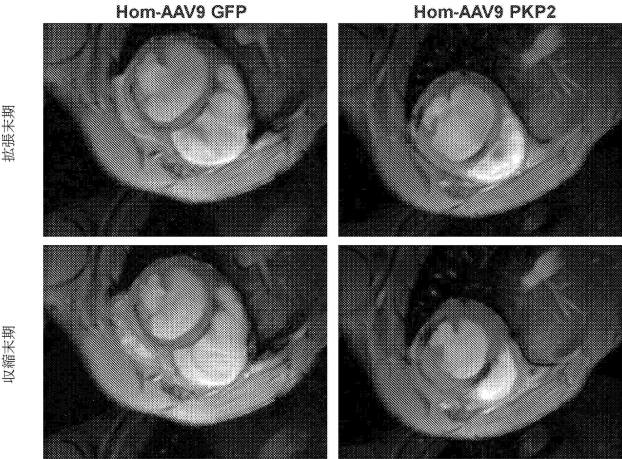
20

30

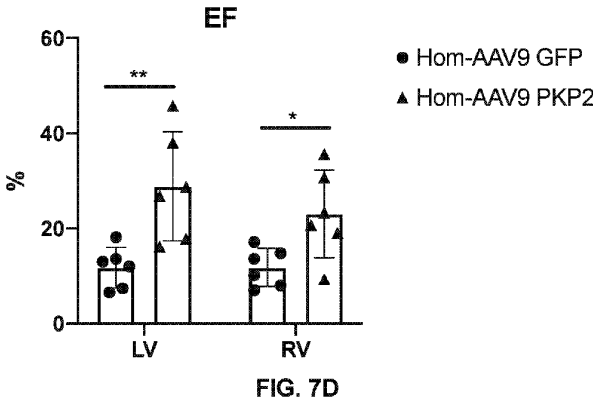
40

50

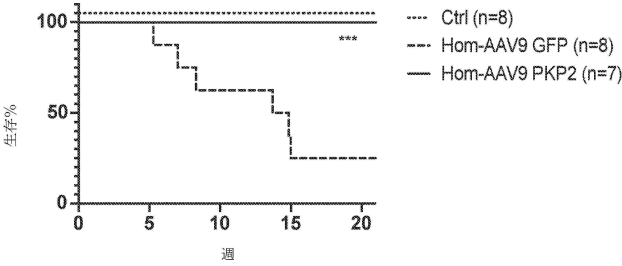
【図 7 C】



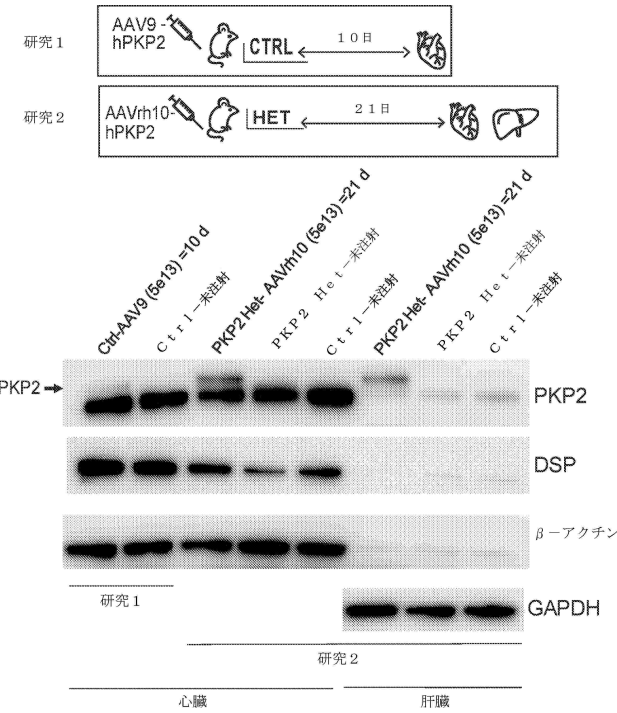
【図 7 D】



【図 7 E】



【図 8 A】



10

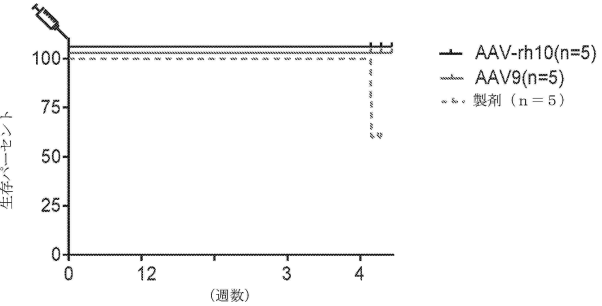
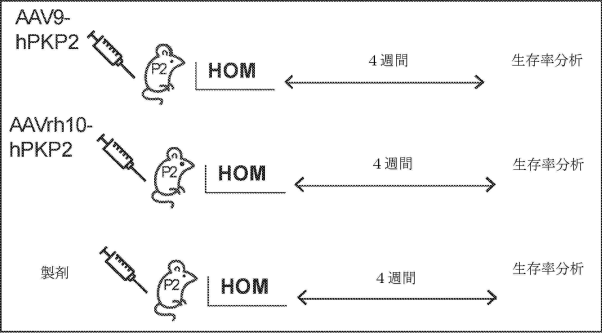
20

30

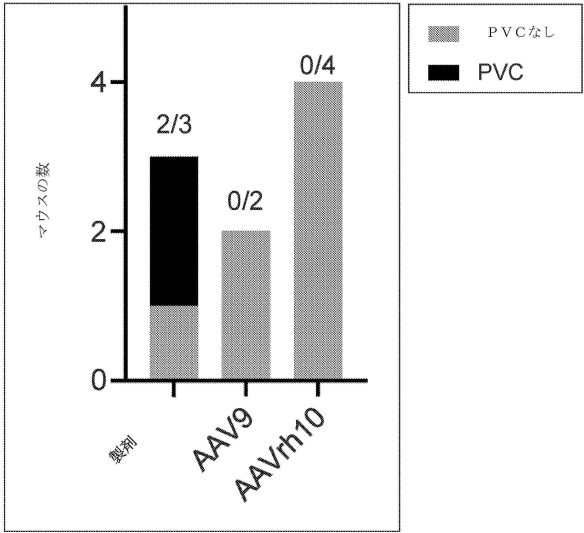
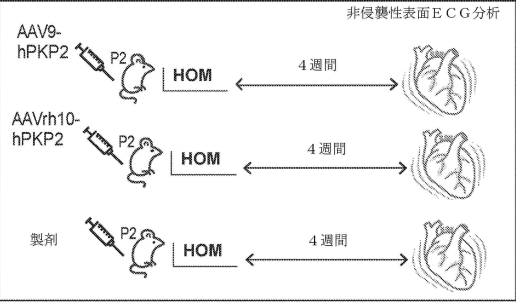
40

50

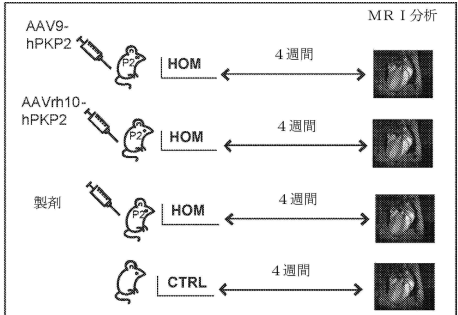
【図 8 B】



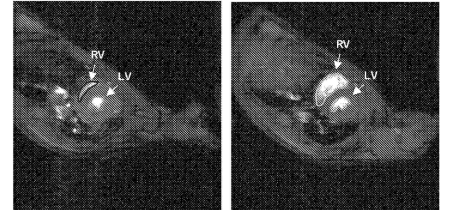
【図 8 C】



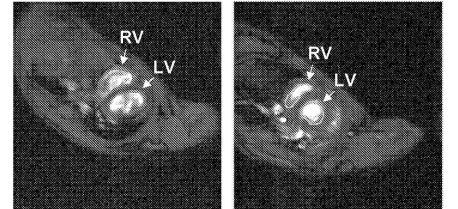
【図 8 D】



野生型CTRL-未治療 AAV9 hPKP2で治療したP
KP2 Hom

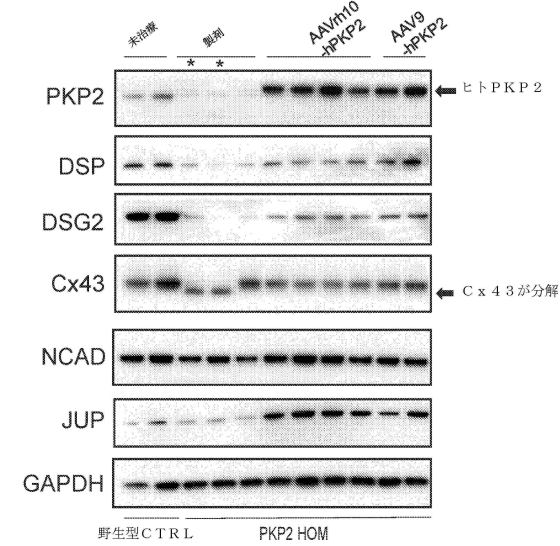
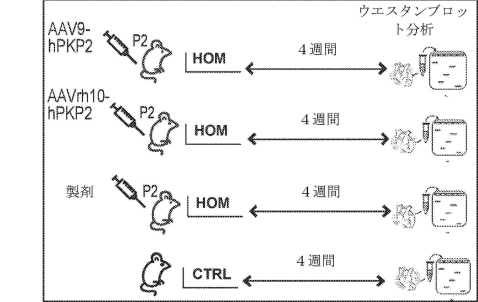


拡張末期 拡張末期



拡張末期 拡張末期

【図 8 E】



【手続補正書】
【提出日】令和5年11月7日(2023.11.7)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】

2024514110000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/24478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/86 (2022.01)

CPC - C12N 15/63; C12N 15/62; C12N 15/86; C12N 2740/16043

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	WO 2021/053222 A1 (UCL BUSINESS LTD) 25 March 2021; paragraph [0061]; paragraph [0005]	1, 3, 4/1, 4/3
Y	US 2019/0203212 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 04 July 2019; paragraph [0277]; paragraph [0082]	1, 3, 4/1, 4/3
Y	US 2007/0083334 A1 (MINTZ LIAT) 12 April 2007; SEQ ID NO: 915097	3, 4/3
Y	US 2011/0296544 A1 (DOMON BRUNO) 01 December 2011; SEQ ID NO: 1153	4/1, 4/3
A	US 2007/0072175 A1 (COOPER MATTHEW T) 29 March 2007; SEQ ID NO: 48204	2, 4/2
A	US 2014/0010861 A1 (MODERNA THERAPEUTICS) 09 January 2014; SEQ ID NO: 22646	2, 4/2
A	US 2014/0208755 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 24 July 2014; SEQ ID NO: 22647	2, 4/2

☐ 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

22 June 2022 (22.06.2022)

Date of mailing of the international search report

JUL 25 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/24478
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: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/24478

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-35
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,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,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,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

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 シャイフ, ファラー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 0 3 7 サン ディエゴ ハンブルク スクエア 3 1 3 0

(72)発明者 ブラッドフォード, ウィリアム

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 0 7 5 ソラナ ビーチ ビア ミル カンプレス 9 3 0
ユニット 1 7 6

F ターム (参考) 4C084 AA13 DC50 MA55 MA59 MA60 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA361
ZA381
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA52 MA55 MA59 MA60 MA63 MA65
MA66 ZA36 ZA38 ZC41