

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509193
(P2025-509193A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/605 (2006.01)	C 0 7 K	14/605		4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/76 (2006.01)	C 0 7 K	14/76		4 C 0 8 7
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全58頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-552449(P2024-552449)			(71)出願人	502409813
(86)(22)出願日	令和5年3月3日(2023.3.3)				ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ
(85)翻訳文提出日	令和6年11月1日(2024.11.1)				ーシテイ・オブ・ペンシルベニア
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063681				アメリカ合衆国ペンシルベニア州191
(87)国際公開番号	WO2023/168405				04フィラデルフィア・ナインスフロア
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)				ー・シビックセンタービルボード36
(31)優先権主張番号	63/316,219				00
(32)優先日	令和4年3月3日(2022.3.3)			(74)代理人	110000741
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士法人小田島特許事務所
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(72)発明者	ウイルソン, ジェームズ・エム
	最終頁に続く				アメリカ合衆国ペンシルベニア州191
					03フィラデルフィア・デランシースト
					リート1831
				(72)発明者	ヒンデラー, クリスチャン
					アメリカ合衆国メリーランド州2121
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G L P－2 受容体アゴニスト融合物をコードするウイルスベクター及び短腸症候群の治療におけるその使用

(57)【要約】
対象における短腸症候群を治療するための組成物及び方法が、提供される。G L P－2 受容体アゴニスト融合タンパク質をコードする配列と、その発現を指示する調節配列と、を含む、核酸分子を含むウイルスベクターが、提供される。
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G L P - 2 タンパク質及び I g G 4 F c、アルブミン又は X T E N ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする配列を含む核酸を含む組成物であって、前記融合タンパク質が、配列番号 13、15、17、19、21、若しくは 23 の配列、又はそれに対して少なくとも 99% 同一の配列を有する、組成物。

【請求項 2】

前記融合タンパク質をコードする前記配列が、配列番号 14、16、18、20、22、若しくは 24、又はそれに対して少なくとも 75% の同一性を共有する配列である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 3】

ウイルスベクターを含む組成物であって、

(a) アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドと、

(b) 前記 A A V カプシド中にパッケージングされるベクターゲノムであって、前記ベクターゲノムが、A A V 逆位末端反復 (I T R) を含み、前記コード配列が、G L P - 2 タンパク質及び I g G 4 F c、アルブミン又は X T E N ポリペプチドを含み、前記融合タンパク質が、配列番号 13、15、17、19、21、又は 23 の配列、又はそれに対して少なくとも 99% 同一の配列、及び前記融合タンパク質の発現を指示する調節配列を有する、ベクターゲノムと、を含む、組成物。

【請求項 4】

前記ウイルスベクターが、A A V r h 9 1 又は A A V h u 6 8 の前記 A A V カプシドを有する r A A V である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 5】

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

【請求項 6】

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

【請求項 7】

前記 A A V 逆位末端反復 (I T R) が、前記融合タンパク質コード配列及び調節配列に隣接する、A A V 2 5 ' I T R 及び A A V 2 3 ' I T R である、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 8】

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

【請求項 9】

前記誘導性遺伝子発現系が、

(a) トランス活性化ドメイン及び F K B P 1 2 - ラパマイシン関連タンパク質 (F R A P) の F K B P 1 2 - ラパマイシン結合 (F R B) ドメインを含む活性化ドメインと、

(b) ジンクフィンガーホメオドメイン (Z F H D)、及び 1、2、又は 3 個の F K 5 0 6 結合タンパク質ドメイン (F K B P) サブユニット遺伝子を含む D N A 結合ドメインと、

40

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

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

【請求項 10】

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

【請求項 11】

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

50

【請求項 12】

前記トランス活性化ドメインが、NF- κ B p65の一部を含む、請求項9～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

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

【請求項 14】

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

【請求項 15】

IRES又は2Aを更に含む、請求項9～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

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

【請求項 17】

調節可能なプロモーターと、p65トランス活性化ドメイン及びFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質(FRAP)のFKBP12-ラパマイシン結合(FRB)ドメインを含む活性化ドメインと、ジンクフィンガーホメオドメイン(ZFHD)及び3つのFK506結合タンパク質ドメイン(FKBP)サブユニット遺伝子を含むDNA結合ドメインと、12個のコピーの前記ZFHDに対する結合部位と、GLP-2類似体及びヒトIgG4Fcを含む融合タンパク質をコードする配列と、を含む、請求項5～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

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

【請求項 19】

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

【請求項 20】

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

【請求項 21】

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

【請求項 22】

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

【請求項 23】

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

【請求項 24】

代謝性疾患を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、アデノ随伴ウイルスrh91又はhu68由来のAAVカプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)と、前記AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムと、を送達することを含み、前記ベクターゲノムが、AAV逆位末端反復(ITR)と、GLP-2類似体及びヒトIgG4Fcを含む融合タンパク質をコードする配列と、前記融合タンパク質の発現を指示する調節配列と、を含む、方法。

【請求項 25】

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

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 26】

前記患者が、 $1 \times 10^9 \text{ GC} / \text{kg} \sim 5 \times 10^{13} \text{ GC} / \text{kg}$ 体重の用量の前記 r A A V を投与される、請求項 24 又は 25 に記載の方法。

【請求項 27】

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

【請求項 28】

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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子配列表の参照

電子配列表の内容 (22-10018 PCT__Seq-Listing.xml; サイズ: 161 kb、及び作成日: 2023 年 3 月 3 日) は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

短腸症候群 (SBS) は、先天性又は後天性の理由による腸の外科的切除によって引き起こされる稀な臓器不全である。SBS は、腸不全 (IF) の主要な原因であり、腸機能の持続的な低減は、マクロ栄養素並びに／又は水及び電解質の吸収に必要な最小限を下回る。SBS / IF の標準的な治療法には、患者が毎日必要とする栄養を補給するために、特別な形態の食品を静脈内に注入する非経口栄養 (PN) を終生毎日行うことが含まれる。毎日 PN を行うことに伴う負担及びリスクに加えて、PN は、感染症、腸の低形成、肝疾患、腎機能障害、骨疾患を含む合併症を引き起こし、SBS 患者の生活の質に深刻な悪影響を及ぼす。SBS に使用された薬剤は、グルカゴン様ペプチド 2 (GLP-2) アゴニストであるテデュグルチドが開発され、FDA 及び EMA によって承認されるまで、SBS / IF に関連する症状のみを治療するためのものであった。

【0003】

GLP-2 は、33 アミノ酸からなる腸ペプチドホルモンで、強力な腸栄養効果がある。GLP-2 は確かに、小腸の長さ、腸上皮の絨毛の長さを増加させ、SBS 患者の残腸が短くても栄養を効果的に吸収し、PN の量及び数を低減させる。しかしながら、天然 GLP-2 は、DPP IV による切断のために、その非常に短い血清半減期を有する効果的な注射剤として使用することができない。IgG Fc ドメイン及び血清アルブミンとの融合物を含む DPP IV 耐性長時間作用型 GLP-2 アゴニストは、SBS の疾患修飾剤として開発されている。テデュグルチドは、DPP IV 耐性について A2G 変異を有する GLP-2 様ペプチドであり、血清半減期を 5 分から 1.5 時間に延長する。1 日当たり $0.05 \text{ mg} / \text{kg}$ の皮下でのテデュグルチド注射は、2 年間の処置を通して PN 体積の持続的かつ連続的な低減をもたらす。患者の 90% は、ベースラインから 1 週間当たりの PN 体積の 20% 超の低減を達成し、70% は、この治療で、優れた安全性プロファイルを用いて、ベースラインから 1 週間当たり更に 1 日超の PN オフを得た (Schwartz et al., 2016)。PN の体積及び数の低減を維持するために、生涯にわたって毎日のテデュグルチド注射が必要である (Compher et al., 2011)。

【0004】

必要とされるのは、SBS に対する改善された治療である。

【発明の概要】

【0005】

グルカゴン様ペプチド 2 (GLP-2) 受容体アゴニスト融合タンパク質構築物をコー

10

20

30

40

50

ドするウイルスベクターが、本明細書において提供される。これらのウイルスベクターは、いくつかの実施形態では、融合パートナーを含まないGLP-2受容体アゴニストのベクター媒介送達と比較して、対象におけるGLP-2受容体アゴニストの持続的発現及び／又は循環半減期の増加を達成し得る。かかるウイルスベクターを作製及び使用する方法が、更に提供される。

【0006】

一態様では、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸を含むウイルスベクターが、提供される。融合タンパク質は、(a) 分泌シグナルペプチドを含むリーダー配列と、(b) グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-2) 受容体アゴニストと、(c) (i) IgG Fc若しくはその機能的バリエーション、(ii) アルブミン若しくはその機能的バリエーション、又は(iii) XTENポリペプチド、を含む、融合ドメインと、を含む(Podust et al, 240:52-66 (Oct 2016))。一実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターである。

【0007】

一実施形態では、(i) リーダー配列の分泌シグナルペプチドが、トロンピンシグナルペプチドを含み、(ii) リーダー配列が、トロンピンプロペプチドを含み、かつ／又は(iii) リーダー配列が、トロンピンリーダー配列を含む。別の実施形態では、リーダー配列は、IL-2リーダー配列を含む。一実施形態では、GLP融合物は、配列番号13、15、17、19、21、若しくは23、及びその機能的バリエーションから選択される。

【0008】

一実施形態では、融合ドメインは、配列番号8の配列、又はそれと少なくとも90%の同一性を共有する配列、又はその機能的バリエーションを有するヒトIgG4 Fcである。別の実施形態では、融合ドメインは、配列番号11の配列、又はそれと少なくとも90%の同一性を共有する配列、又はその機能的バリエーションを有するヒトアルブミンである。一実施形態では、融合ドメインは、配列番号9の配列、又はそれと少なくとも90%の同一性を共有する配列、又はその機能的バリエーションを有するアカゲザルIgG4 Fcである。

【0009】

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

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

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

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 インビボでのプログルカゴンの処理の概略図である。GLP-1 (配列番号4) 及びGLP-2 (配列番号1) の配列を示す。

【図2】 GLP-2 及び類似体の配列を示す表である。

10

20

30

40

50

【図 3 A】 G L P 2 アミノ酸配列における A 2 G 置換、トロンビンリーダー、及び I g G 4 F c 融合物を含む、G L P 2 . G 2 . F c 構築物の概略図である。

【図 3 B】 G L P 2 アミノ酸配列における A 2 G 置換、トロンビンリーダー、及び血清アルブミン (a l b u m i n) 融合物を含む、G L P 2 . G 2 . S A 構築物の概略図である。

【図 3 C】 ヒト (配列番号 1)、カニクイザル (配列番号 5)、及びマウス (配列番号 6) の G L P 2 配列のアラインメントである。

【図 4 A】 a l b u p u r e カラム精製を使用した h G L P 2 - S A タンパク質の溶出プロファイルを示す。

【図 4 B】 図 4 A からの染色された h G L P 2 - S A タンパク質を有するゲルを示す。

10

【図 5 A】 1 e 1 1 g c / マウスで A A V r h 9 1 . C I . h G L P 2 . G 2 . S A . r B G を筋肉内投与した R a g K O マウスにおける h G L P 2 - S A レベルを示す。

【図 5 B】 図 5 A に記載のビヒクル及びベクターで処置したマウスの小腸の長さ及び重量を示す 2 つのグラフである。

【図 5 C】 図 5 A に記載のビヒクル及びベクターで処置したマウスの腸組織構造を示す。ベクターで処置したマウスの腸は、ビヒクルで処置したマウスと比較して、より健康な絨毛を示す。

【図 6 A】 1 e 1 1 g c / マウスの投与量で、A A V r h 9 1 . C I . h G L P 2 . G 2 . S A . r B G 又は A A V r h 9 1 . C I . h G L P 2 . G 2 . F c . r B G で処置したマウスにおける h G L P 2 - S A 及び h G L P 2 - F c レベルを示す。F c 構築物の G L P - 2 レベルは、およそ研究 7 日後により高かった。

20

【図 6 B】 h G L P 2 及び h G L P 2 . F c に対する効力アッセイを示す。E C 5 0 は、h G L P 2 については 0 . 4 n M であると決定されたが、融合タンパク質については E C が 1 3 . 6 n M であると決定された。

【図 7】 実施例 4 に記載の実験の研究設計を示す。

【図 8 A】 実施例 4 に記載の実験の結果を示す。2 つの N H P は、 1×10^{13} (1 e 1 3) G C / k g (E 1 8 5 N G) の用量及び 5×10^{10} (1 e 1 0) G C / k g (B M 2 3 9 H) の用量で、筋肉内注射 (I M) によって A A V r h 9 1 . C B 7 . C I . h G L P - 2 - F c . r B G を投与された。G L P - 2 - F c 融合タンパク質の血漿レベルを示す。

30

【図 8 B】 実施例 4 に記載の実験の結果を示す。2 つの N H P は、 1×10^{13} (1 e 1 3) G C / k g (E 1 8 5 N G) の用量及び 5×10^{10} (1 e 1 0) G C / k g (B M 2 3 9 H) の用量で、筋肉内注射 (I M) によって A A V r h 9 1 . C B 7 . C I . h G L P - 2 - F c . r B G を投与された。腸表面積のバイオマーカーである血清シトルリンを示す。

【図 8 C】 実施例 4 に記載の実験の結果を示す。2 つの N H P は、 1×10^{13} (1 e 1 3) G C / k g (E 1 8 5 N G) の用量及び 5×10^{10} (1 e 1 0) G C / k g (B M 2 3 9 H) の用量で、筋肉内注射 (I M) によって A A V r h 9 1 . C B 7 . C I . h G L P - 2 - F c . r B G を投与された。N H P 血清中の抗 G L P - 2 - F c 抗体の 1 : 1 0 0 の希釈での検出を示す。

40

【図 9 A】 実施例 5 に記載の実験の結果を示す。R a g 1 K O 雌マウスを、I M 投与経路を介して、 1×10^{10} G C / マウス、 3×10^{10} G C / マウス、又は 1×10^{11} G C / マウスの投与量でベクター A A V r h 9 1 . C B 7 . C I . h G L P - 2 - F c . r B G の注射で処置した。研究設計を、図 9 A に示す。

【図 9 B】 実施例 5 に記載の実験の結果を示す。R a g 1 K O 雌マウスを、I M 投与経路を介して、 1×10^{10} G C / マウス、 3×10^{10} G C / マウス、又は 1×10^{11} G C / マウスの投与量でベクター A A V r h 9 1 . C B 7 . C I . h G L P - 2 - F c . r B G の注射で処置した。血清 G L P 2 レベルを示す。

【図 9 C】 実施例 5 に記載の実験の結果を示す。R a g 1 K O 雌マウスを、I M 投与経路を介して、 1×10^{10} G C / マウス、 3×10^{10} G C / マウス、又は 1×10^{11} G

50

C / マウスの投与量でベクター AAVrh91, CB7, CI, hGLP-2-Fc, rBG の注射で処置した。経時的な体重を示す。

【図9D】実施例5に記載の実験の結果を示す。Rag1KO雌マウスを、IM投与経路を介して、 1×10^{10} GC / マウス、 3×10^{10} GC / マウス、又は 1×10^{11} GC / マウスの投与量でベクター AAVrh91, CB7, CI, hGLP-2-Fc, rBG の注射で処置した。56日目の体重を示す。

【図9E】実施例5に記載の実験の結果を示す。Rag1KO雌マウスを、IM投与経路を介して、 1×10^{10} GC / マウス、 3×10^{10} GC / マウス、又は 1×10^{11} GC / マウスの投与量でベクター AAVrh91, CB7, CI, hGLP-2-Fc, rBG の注射で処置した。小腸 (SI) の長さを示す。

【図9F】実施例5に記載の実験の結果を示す。Rag1KO雌マウスを、IM投与経路を介して、 1×10^{10} GC / マウス、 3×10^{10} GC / マウス、又は 1×10^{11} GC / マウスの投与量でベクター AAVrh91, CB7, CI, hGLP-2-Fc, rBG の注射で処置した。SI重量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

単一の筋肉内ベクター投与で SBS / IF 患者を治療するための GLP-2 アゴニストを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが、本明細書において記載される。導入遺伝子 GLP-2 アゴニストには、DPP IV 耐性のための A2G 変異、及び更なる血清半減期延長のためのヒト IgG Fc ドメイン又は血清アルブミンとの融合が含まれる。これらの半減期延長技術と組み合わせて、トロンピンプロペプチドの添加は、著しく低いベクター用量（すなわち、 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^2$ GC / kg）で治療レベルを超える GLP-2 アゴニストの発現を可能にする。GLP-2 アゴニスト配列の転写を活性化させる小分子薬物の投与を介して、これらのタンパク質を構成的に又は制御された様式で発現する発現カセットが、本明細書に記載される。

【0016】

多数の経路を介して、特に rAAV ベクターなどの組換えベクターによって媒介されるインビボでの発現によって、送達を必要とする対象へのこれらの構築物の送達、記載される。短腸症候群を治療することを必要とする対象におけるレジメンにおいて、これらの構築物を使用し、対象における GLP-2 の半減期を増加させる方法も、提供される。加えて、対象における GLP-2 の活性を増強するための方法が、提供される。

【0017】

GLP-2 融合タンパク質

プログルカゴンの翻訳後処理は、GLP-1 とともに、33 アミノ酸の腸栄養ペプチドホルモンであるグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) を生成する。GLP-2 は、胃内容の排出を遅らせ、胃の分泌物を低減し、腸の血流を増加させるように作用する。GLP-2 はまた、少なくとも、粘膜上皮の表面積を増加させるように、クリプト細胞の増殖及び絨毛の長さを増強することによって、大腸及び小腸の成長を刺激する。これらの効果は、GLP-2 が多種多様な胃腸状態を治療するために使用され得ることを示唆する。しかしながら、ヒト患者に GLP-2 を単独で投与することは、有望ではなかった。GLP-2 は、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) による GLP-2 の迅速なインビボでの切断が本質的に不活性なペプチドをもたらすため、治療薬としてのその使用を制限する短い半減期を有する。ヒト GLP-2 のアミノ酸配列は、HADGSGFSDEMNTILDNLAARDFINWL IQTKITD (配列番号 1) である。

【0018】

上述のように、アミノ酸残基 2 (アラニン) がグリシンで置換された、テデュグルチドという名前の GLP-2 類似体が、開発されている。この GLP-2 類似体の配列は、配列番号 2 HGDGSGFSDEMNTILDNLAARDFINWL IQTKITD に示されている。

【0019】

10

20

30

40

50

本開示は、1つ以上のコピーのGLP-2受容体アゴニスト、並びにかかる融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド及びベクターを含む融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、(a) 分泌シグナルペプチドを含むリーダー配列と、(b) グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体アゴニストと、(c) 融合ドメインと、を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、GLP-2受容体アゴニストは、トロンピンリーダー配列、GLP-2受容体アゴニスト、及びIgGFc又はその機能的バリエーションを含む。別の実施形態では、融合タンパク質は、トロンピンリーダー、GLP-2受容体アゴニスト、及びアルブミン又はその機能的バリエーションを含む。別の実施形態では、融合タンパク質は、トロンピンリーダー、2つのコピーのGLP-2受容体アゴニスト、及びアルブミン又はその機能的バリエーションを含む。

10

【0020】

いくつかの実施形態では、GLP-2受容体アゴニストは、野生型配列の機能を保持する、本明細書に記載の、又は当該技術分野で既知のGLP-2核酸又はアミノ酸配列から最大約10%のバリエーションを含み得るバリエーションを含む。本明細書で使用される場合、「機能を保持する」とは、必ずしも同じレベルの発現又は活性ではないが、核酸又はアミノ酸が野生型配列と同じ方法で機能することを意味する。例えば、一実施形態では、機能的バリエーションは、野生型配列と比較して、発現又は活性の増加を有する。別の実施形態では、機能的バリエーションは、野生型配列と比較して、発現又は活性の減少を有する。一実施形態では、機能的バリエーションは、野生型配列と比較して、発現又は活性の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上の増加又は減少を有する。

20

【0021】

他のGLP-2類似体が開発されており、グレパグルチド（配列番号3）、アブラグルチド、及び以下に示す他のもの、並びに図2に示すものを含む。

【表1】

薬物	型	会社	ステージ	T1/2(時間)	EC50 (/GLP2)	コメント
テデュグルチド	ペプチド	Shire	承認された	1.5 {0.1}	1	
グレパグルチド	ペプチド	Zealand	P3	50	4	
アブラグルチド	ペプチド	Ferring	P3	30	0.5	
HM-15912	Fc 融合	Hanmi	P2	?	5	
GX-G8	Fc 融合	Genexine	P1	?	?	
TAK-681	Fc 融合	Takeda (Shire)	P1	100	5	
ZP7570	ペプチド	Zealand	P1	?	10	二重作用
NB-1002	XTEN 融合	Amunix	プレ	240	100	

30

【0022】

一実施形態では、融合物は、異種配列と組み合わせたGLP-2類似体を含む。GLP-2類似体は、天然ヒトGLP-2（配列番号1）若しくはGLP-2-A2G（配列番号2）と少なくとも90%、95%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性を共有するポリペプチドを意味する。一実施形態では、GLP-2類似体は、天然配列と比較して、最大で1、2、又は3個のアミノ酸置換を有する。別の実施形態では、GLP-2配列は、ヒト以外の種に由来する。例えば、GLP-2は、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ウマなどに由来し得る。いくつかの実施形態では、天然GLP-2配列を変更して、その1つ以上の特徴を最適化することが望ましい。ある特定の実施形態では、GLP-2は、アミノ酸残基2（アラニン）がグリシン、例えば、配列番号2で置換されている配列を有する。例えば、他の実施形態では、GLP-2類似体は、天然配列と比較して、A2G、D3E、S5T、D8S、M10L、N11A、N16A、N24A、Q28Aから選択される1、2、3、4、5、6、7、8、又は最大9個のアミノ酸置換を含む。これらの置換は、DPP-4不活性化からの保護を含む、

40

50

GLP-2 (A2G) の臨床プロファイルの有効性を改善することが示されている。一実施形態では、GLP-2 類似体は、GLP-2 の DPP-IV 耐性バリエーションである。一実施形態では、GLP-2 類似体は、配列番号 2 を含むか、又はそれからなる配列を有する。一実施形態では、バリエーションは、配列番号 2 と少なくとも 90 % の同一性、95 % の同一性、97 % の同一性、98 % の同一性、99 % の同一性、又は 100 % の同一性を共有する。

【0023】

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

10

【0024】

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

20

【0025】

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

30

【0026】

一実施形態では、リーダーは、ヒトトロニン（第 I I 因子）配列である。一実施形態では、トロニンリーダーは、配列番号 7: MAHVRLQLPGCLALLAALCSLVHSQHVFLLAPQQARSLLQVRVR で示される配列、又は最大で 1、2、若しくは 3 個のアミノ酸置換を有するその機能的バリエーションを有する。

40

【0027】

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

【0028】

いくつかの実施形態では、プロペプチド及び GLP-2 ペプチドの両方についてのコード領域は、プロペプチド及び GLP-2 のコード配列の間にリンカーを伴うことなく単一

50

の核酸配列に組み込まれる。

【0029】

融合タンパク質は、融合ドメインを更に含む。融合ドメインは、一実施形態では、ヒト IgG Fc フラグメント又はその機能的バリエーションである。免疫グロブリンは、典型的には、インビボで長い循環半減期を有する。GLP-2 受容体アゴニスト（及びリーダー）を IgG Fc に融合させることによって、GLP-2 の機能が維持されたまま、融合タンパク質の循環時間が延長される。別の実施形態では、融合ドメインは、アカゲザル IgG Fc フラグメント又はその機能的バリエーションである。

【0030】

本明細書で使用される場合、免疫グロブリンの Fc 部分は、免疫学の分野における用語に一般的に付与される意味を有する。具体的には、この用語は、抗体からの 2 つの抗原結合領域（Fab フラグメント）を含まない抗体フラグメントを指す。Fc 部分は、非共有結合相互作用及びジスルフィド結合によって会合する、両方の重鎖からの抗体の定常領域からなる。Fc 部分は、ヒンジ領域を含み、CH2 及び CH3 ドメインを通じて抗体の c 末端まで及び得る。Fc 部分は、1 つ以上のグリコシル化部位を更に含み得る。一実施形態では、融合ドメインは、ヒト IgG Fc である。高度に保存されている 4 つのサブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 は、それらの定常領域、特にそれらのヒンジ及び上部 CH2 ドメインの点で異なる。Vidarsson et al, IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions, Front Immunol. Oct. 2014; 5: 520 を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。Fc ドメインは、ヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3、又はヒト IgG4 を含む任意のヒト IgG に由来することができる。一実施形態では、ヒト IgG Fc は、IgG4 Fc である。一実施形態では、ヒト IgG Fc は、配列番号 8:

AESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKD TLMISRTP
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVY TLP PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSSLG である。別の実施形態では、ヒト IgG Fc は、配列番号 8 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を共有する。

【0031】

別の実施形態では、融合ドメインは、アカゲザル IgG Fc である。Fc ドメインは、アカゲザル IgG1、アカゲザル IgG2、アカゲザル IgG3、又はアカゲザル IgG4 を含む任意のアカゲザル IgG に由来し得る。一実施形態では、アカゲザル IgG Fc は、IgG4 Fc である。一実施形態では、アカゲザル IgG Fc は、配列番号 9:

PPCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKD TLMISRTP
PEVTCVV VDVSDPEV QFNWYVDGVE VHNAQT KPRE RQ
FNSTYRVV SVLTVTHQDW LNGKEYTCKV SNKGLPAPI
E KTI SKAKGQP REPQVYILPP PQEELTKNQV SLTCL
VTGFY PSDIAVEWES NGQPENTYKT TPPVLDSDGS Y
LLYSKLT VN KSRWQPGNIF TCSVMHEALH NHYTQKSL
SV SP GK である。別の実施形態では、アカゲザル IgG Fc は、配列番号 9 に対して少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を共有する。一実施形態では、アカゲザル IgG は、ヒンジ配列を更に含む。

【0032】

別の実施形態では、融合ドメインは、ヒトアルブミン又はその機能的バリエーションである。一実施形態では、ヒトアルブミンは、

配列番号 10 :

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEV
DVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA
EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTTLEKC
CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFELGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS RN LGKVGSKCCKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES
LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKK
ADDKETCF AE EGKKLVAAASQAALGLである。別の実施形態では、ヒト

アルブミンは、配列番号 10 に対して少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 99 % の同一性、又は少なくとも 100 % の同一性を共有する。

【0033】

別の実施形態では、融合ドメインは、アカゲザルアルブミン又はその機能的バリエーションである。一実施形態では、アカゲザルアルブミンは、

配列番号 11 :

DTHKSEVAHRFKDLGEEHF KGLV LVAFSQYLQQCPFEEHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPPLVRPEV
DVMCTAFHDNEATFLKKYLYEVARRH P YFYAPELLFFAAR
YKAAFAECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGDRAFKAWAVARLSQKFPKAEFAEVSKLVTDLTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYMCENQDSISSSKLKECCD
KPLLEKSHCLA E VENDEMPADLP SLAADYVESKDVCKNYA
EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVM L LRLAKAYEATLEKC
CAAADPHECYAKVFDEFQPLVEEPQNLVKQNCLEFELGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS RN LGKVGAKCCKL
PEAKRMPCAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTES
LVNRRPCFSALELDEAYVPKAFNAETFTFHADMCTLSEKE
KQVKKQTALVELVKHKPKATKEQLKGVMDNF AAFVEKCKK
ADDKEACFAEEGP KFVAASQAALAである。別の実施形態では、アカゲ

ザルアルブミンは、配列番号 11 に対して少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 99 % の同一性、又は少なくとも 100 % の同一性を共有する。

【0034】

本開示の融合タンパク質のインビボ機能及び安定性は、例えば、潜在的に望ましくないドメイン相互作用を防止するために、又は他の理由で、少量のペプチドリンカーを添加することによって最適化され得る。更に、グリシンリッチリンカーは、GLP-2 類似体部分が、膵臓のベータ細胞などの標的細胞上の GLP-2 受容体と生産的に相互作用することができるように、ある程度の構造的柔軟性を提供し得る。したがって、GLP-2 類似体の C 末端及び融合タンパク質の融合ドメインの N 末端は、一実施形態では、リンカーを介して融合される。一実施形態では、リンカーは、配列 GGGGSGGGGSGGGGGS (配列番号 12) を有する G リッチペプチドリンカーの 1、1.5、又は 2 回の反復を含

む。

【0035】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) ヒトトロニンリーダー、(b) GLP-2 (A2G) のDPP-IV耐性バリエーション、リンカー、及び(c) ヒトIgG Fcを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号13の配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%同一の配列を有する。

配列番号13

MAHVRGLQLPGCLALAAALCSLVHSQHVF LAPQQARSLLQRR
VRRHGDGSGFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGGG
GGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LG*

10

【0036】

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号14、又はそれに対して少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なく

20

配列番号14：

ATGGCTCACGTTTCGGGGGACTGCGAGCTGCCCTGGATGTCTGG
CTCTTTCGCCGCTCTGTGTAGCCTGGTGCGACAGCCAGCACGT
GTTTCTGGCTCCTCAGCAAGCCAGATCACTGCTGCGAGAGA
GTTAGAAAGGCACGGCGACGGCGAGCTTCAGCGACGAGATGA
ACACCATCCTGGACAACCTGGCCGCGCAGAGACTTTCATCAA
CTGGCTGATCCAGACCAAGATCACCCGACGGGTGGCGGGAGGC
GGAGGATCTGGGTGGTGGTGGATCTGGCGGGCGGAGGTTCTG
CCGAGTCTAAGTACGGACCTCCTTGTCCTCCCTGTCCTGC
TCCAGAAAGCTGCTGGCGGGCCCATCCGTGTTTCTGTTCCCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAAACCCCTG
AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TGAGGTGCGAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGGTGGAAAGTG
CACAAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGGAACAGTTTCAACA
GCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGGTGCTGCAACCA
GGATTGGCTGAACGGCAAGAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC
AACAAAGGGCCTGCTTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCA
AGGCCCAAGGGGCCAGGCCAAGAGGAACCCAGGTGTACACACT
GCCCTCCAAGCCAAGAGGGAATGACCAAGAAACAGGTGTCC
CTGACCTGCTGCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTTCCGATATCG
CCGTGGAATGGGAGAGCAACGGGCCAGCCTGAGAAACAACCTA
CAAGACCAACACCTCCTGTGTGCTGGACTCCGATGGCTCATTC
TTCCTGTACAGCAGACTGACCGGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC
CCTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGTCT
CTGGGCTAA

30

40

【0037】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) ヒトトロニンリーダー、(b) GLP-2 (A2G) のDPP-IV耐性バリエーション、リンカー、及び(c) ヒト血清アルブミン

50

を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 15 の配列、又はそれに対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 同一の配列を有する。

配列番号 15 :

```

MAHVRLGLQLPGCLALLAALCSLVHSQHVFLLAPQQARSLLQRR
VRRHGDGSGFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGGGG
GSGSGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALLVLIASF
AQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLH
TLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKD
DNP NLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKKYLYE IARRHP
YFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDEL RD
EGKASSAKQRLKCA SLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAE
FAEVSKLVTDLT KVVHTECCHGDLLECADDDRADLAKYICEN
QDSISSK LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAA
DFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LL
RLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL
IKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS
RNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAV
MDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGKKLVAA SQAALG*
【0038】

```

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号 16、又はそれに対して少なくとも 75 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 同一の配列である。

配列番号 16 :

```

ATGGCTCACGTTTCGGGGACTGCGAGCTGCCCTGGATGTCTGG
CTCTTGCCGCTCTGTGTAGCCTGGGTGCACAGCCAGCACGCT
GTTTCTTGCTCCTCAGCAAGCCAGATCACTGCTGCAGAGGA
GTTAGAAAGGCACGGCGACGGCGAGCTTCAGCGACGAGATGA
ACACCATCCTGGACAACCTGGCCGCGCAGAGACTTCAATCAA
CTGGCTGATCCAGACCAAGATCACCGACGGGTGGCGGGAGGC
GGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCGGGCGGAGGTTCCTG
ACGCCCAACAATCTGAAGTGGCCCAACCGGTTCAGGACCT
GGGCGAAGAGAAATTTCAAGGCCCTGGTGTCTGATCGCCTTC
GCTCAGTACCTGCAGCAGTGCCCTTCGAGGACCAACGTGA
AGCTGGTCAACGAAGTGACCGAGTTTCGCCAAGACCTGCGT
GGCCGACGAGAGCGCCGAGAACTGTGATAAGAGCCTGCAC
ACCTGTTCGGCGACAAGCTGTGTACAGTGGCCACACTGA
GAGAAACCTACGGCGAGATGGCCGACTGCTGCGCCAAGCA
AGAGCCCGAGAGAAACGAGTGCTTCTCTGCAGCACAAAGGAC
GACAACCCCAACCTGCTTAGACTCGTGGCGGCTGAAAGTGG
ACGTGATGTGCAACCGCCTTCCACGACAACGAGGAAACCTT
CCTGAAGAAGTACCTGTACGAGATCGCCAGACGGCACCC
TACTTTTACGCCCTGAGCTGCTGTTCTTCGCCAAGCGGT
ATAAGGCCGCTTCAACCGAGTGTTGTAGGCCGCTGATAA
GGCTGCCCTGCTGCTGCTAAGCTGGACGAGCTTAGAGAC
GAGGGCAAAGCCAGCTCCGCCAAGCAGAGACTGAAGTGTG
CCAGCCTGCAGAAAGTTCGGCGAGAGAGCCTTTAAGGCCCTG
GGCCGTTGTAGACTGAGCCAGAGATTTC CCAAGGCCGAG

```

TTTGCCGAGGTGTCCAAGCTCGTGACCGACCTGACAAAGG
TGCAACACCGAGTGCTGCCACGGCGACCTGCTGGAATGCGC
CGACGATAGAGCCGACCTGGCCAAGTACATCTGCGAGAAC
CAGGACAGCATCAGCAGCAAGCTGAAAGAGTGCTGCGAGA
AGCCTCTGCTGGAAAGAGGCCACTGTATCGCCGAGGTGGA
AAACGACGAGATGCCCGCCGATCTGCCCTTCTCTGGCCGCC
GATTTTGTGGAAAGCAAGGACGTGTGCAAGAACTACGCCG
AGGCCAAGGACGTGTTCTCTGGGCATGTTTCTGTACGAGTA
CGCCCGCAGACACCCCGACTACTCTGTGTGTGCTGCTGCTG
AGACTGGCCCAAACCTACGAGACAAACCTGGAAAGAGTGCT
GTGCCCGCCGCTGATCCTCACGAGTGTTACGCCCAAGGTGTT
CGACGAGTTCAAGGCCACTGGTGGAAGAAACCCAGAACCTG
ATCAAGCAGAACTGCGAGCTGTTTCGAGCAGCTGGGGCGAGT
ACAAAGTTCCAGAACGCCCTGCTCGTGCGGTACACCAAGAA
GGTGCCCCAGGTTTCCACACCTACACTGGTTTGAGGTGTCC
CGGAACCTGGGGCAAAGTGGGGCAGCAAAGTGTTGCAAGCAC
CTGAGGCCCAAGAGAAATGCCCTGCGCCGAGGATTACCTGAG
CGTGGTGCTGAATCAGCTGTGCGTGCTGCAACGAGAAACCC
CCTGTGTCCGACAGAGTGACCAAGTGCTGTACCGAGAGGCC
TGGTCAACAGACGGGCCCTTGCTTTAGCGCCCTCGAGGTGGA
CGAGACATACGTGCCCAAAGAGTTCAACGCCCGAGACATTTC
ACCTTCCACGCCGACATCTGTACCTTGAGCGAGAAAGAGC
GGCAGATCAAGAAACAGACTGCCCTGGTGGAACCTGGTCAA
GCACAAAGCCCAAGGCCCAACCAAGAAACAGCTGAAGGCCGTG
ATGGACGACTTTCGCCCGCCTTCGTGGAAAGAGTGCTGCAAGG
CCGACGACAAAGAGACCTGCTTTCGCCGAAAGAGGGGCAAGAA
ACTGGTGCGCCGCTTCTCAGGCTGCTCTGGGATAA

【0039】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) ヒトトロニンリーダー、(b) GLP-2 (A2G) のDPP-IV耐性バリエーション、リンカー、及び(c) XTENポリペプチドを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17の配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%同一の配列を有する。

配列番号17：

MAHVRGLQLPGCLALLAALCSLVHSQHVF LAPQQARSLLQR
VRRHGDGSFSDMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGGG
GGSGGGGSGGGGSSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST
EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP
GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST
EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP
GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST
EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP
GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT

S T E E G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P
G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S E
S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S E S A T P
E S G P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G S P A G S P T S T E E
G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P G T S E
S A T P E S G P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G S E P A T S G
S E T P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P
G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G *

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号 18、又はそれに対し
て少なくとも 75 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なく
とも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 同一の配列である。

配列番号 18：

A T G G C T C A C G T T C G G G G A C T G C A G C T G C C T G G A T G T C T G G
C T C T T G C C G C T C T G T G T A G C C T G G T G C A C A G C C A G C A C G T
G T T T C T G G C T C C T C A G C A A G C C A G A T C A C T G C T G C A G A G A
G T T A G A A G G C A C G G C G A C G G C A G C T T C A G C G A C G A G A T G A
A C A C C A T C C T G G A C A A C C T G G C C G C C A G A G A C T T C A T C A A
C T G G C T G A T C C A G A C C A A G A T C A C C G A C G G T G G C G G A G G C
G G A G G A T C T G G T G G T G G T G G A T C T G G C G G C G G A G G A A G T T
C T C C T G C T G G C A G C C C T A C A A G C A C C G A G G A A G G C A C A A G
C G A G T C T G C C A C A C C T G A G T C T G G C C C T G G C A C A T C T A C A
G A G C C T A G C G A A G G A T C T G C C C C A G G A T C T C C T G C C G G C T
C T C C A A C A T C T A C C G A A G A G G G A A C C A G C A C C G A G C C A T C
T G A G G G A T C T G C T C C C G G A A C A A G C A C A G A G C C T T C A G A A
G G A T C C G C T C C T G G C A C C T C T G A A A G C G C C A C A C C A G A A A
G C G G A C C T G G A T C T G A G C C T G C C A C A A G C G G A T C T G A G A C
A C C T G G A A G C G A G C C A G C C A C A T C T G G C A G C G A A A C A C C T
G G T T C T C C A G C C G G A T C T C C C A C C A G C A C A G A A G A G G G C A
C A T C C G A A T C T G C T A C C C C T G A A T C T G G A C C A G G C A C C T C
C A C A G A A C C T T C C G A G G G T T C T G C C C C T G G A A C C T C T A C C
G A A C C A T C A G A A G G C A G C G C T C C A G G T T C A C C A G C T G G A A
G C C C A A C C T C T A C A G A G G A A G G G A C A T C C A C T G A G C C A A G
C G A G G G A A G C G C T C C C G G C A C T A G T A C A G A A C C G A G C G A G
G G C A G T G C T C C T G G A A C C A G C G A A T C C G C T A C T C C A G A G A
G T G G C C C A G G C A C C A G T A C T G A A C C C T C T G A G G G T A G C G C
A C C C G G A A C A T C T G A G A G C G C T A C T C C C G A A T C A G G C C C A
G G C T C T G A A C C T G C T A C C A G C G G A A G T G A A A C A C C C G G C A
C C T C T A C T G A G C C C T C C G A A G G C T C A G C A C C T G G C A C A A G
C A C T G A A C C A T C A G A G G G C T C C G C A C C A G G C A C C A G C G A A
A G T G C T A C A C C A G A G T C A G G A C C C G G A A C C T C C G A A A G T G
C A A C T C C T G A G A G C G G A C C A G G C T C T C C C G C T G G A T C T C C
T A C A T C A A C T G A A G A A G G G A C C T C C G A G A G C G C A A C C C C A
G A G T C T G G T C C A G G A T C A G A A C C T G C C A C C T C C G G C T C T G
A A A C C C C A G G C A C T T C T G A G T C C G C C A C G C C A G A A T C T G G
T C C T G G G A C T A G C A C C G A A C C G A G T G A A G G T T C A G C T C C C
G G G A C T T C T A C G G A A C C C A G T G A A G G A T C T G C A C C C G G C A
C A T C A A C C G A A C C G T C A G A G G G A T C A G C C C C T G G G A C T T C
C A C A G A G C C G T C T G A G G G C A G C G C C C C A G G G A C G T C T A C A
G A A C C A T C T G A A G G A T C A G C A C C A G G G A C C T C T A C C G A G C

10

20

30

40

50

CAAGTGAAGGCGAGTGCACCGGGAAGTCCAGCAGGCTCCCC
TACAAGTACTGAAGAGGGTACTAGCACGGGAACCCAGCGAG
GGTTCCGCTCCAGGGACATCTGAATCCGCAACTCCGGAAT
CCGGACCTGGCAGTGAACCAGCTACATCCGGGATCCGAGAC
TCCGGGAACCTCAGGAATCAGCTACACCCGAGAGTGGACCT
GGCTCCGAACCAAGCAACTAGCGGGCTCAGAAACTCCTGGGA
CAAGCGAGAGTGCACAACCCGAATCTGGACCTGGAAACAAG
TACTGAGCCCAGCGAAGGCGAGCGCCCCCTGGAACTTCTGAA
TCTGCCACTCCTGAAAGTGGCCCTGGGAAGCCCTGCAGGCT
CACCCACATCCACAGAAAGAAAGGATCACCCAGCAGGCCAGCCC
CACTTCAACGGAAGAGGGGATCCCCAGCTGGATCCCCCAACT
AGTACGGAAGAAAGGCACTTCAAGAAAGCGCTACGCCCCGAGT
CCGGTCCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAGGGGAAGTGC
CCCTGGCACTTCCGAGAGTGTCTACACCTGAAAGCGGGTCCC
GGCTCTGAACCAAGCCACTTCTGGATCTGAAACGCCCCGGGA
CATCCGAGTCAAGCAACGCCCGAAAGCGGGCCCAAGGTTCGGA
GCCGGGCTACTAGTGGTTCAAGAGACTCCAGGGGACTTCCGAG
TCTGCTACTCCTGAGTCCGGGACCGGGGAACATCAACCCGAGC
CTTCCGAAGGATCTGCACCTGGGAAGCCCTGCCCGGATCTCC
TACCAGTACTGAGGAAGGCGACCTCAGAGTCTGCCACTCCA
GAGTCAGGTCCTGGGAAGCGGAACCTGCAACAAGCGGGCAGCG
AAACTCCAGGCGACTAGCGAGTCAAGCTACCCCAAGAAATCAGG
ACCTGGATCTCCAGCAGGGGTCCCCAACATCTACTGAGGGA
GGCTCTCCTGCTGGCTCCCCCTACCTCTACCGAAGAGGGGA
CCTCAACAGAGCCATCCGAGGGGAGCGCACCTGGGTACATC
AGAGTCCGCAACTCCCCGAGTCTGGCCCCCGGAACCTAGCGAA
TCTGCAACCCCGGAAGAGTGGACCCCGGGACGAGTGAATCAG
CCACACCTGAATCCGGGTCCAGGATCCGAGGCCCTGCAACTTC
TGGAAAGCGAGACACCAGGATCTGAGCCAGCTACGTCTGGC
TCTGAGACTCCTGGATCTCCTGCTGGTAGTCCCACCTCCA
CTGAAGAGGGGAACCTTCCACCGAACCAGAGCGAGGGGATCAGC
ACCAGGCGACTAGCACAGAACCGTCCGAAGGATCTGCTCCA
GGCTCTGAACCCGCAACCTCCGGGATCAGAAACCCCTGGAA
CATCCGAAGAGCGCTACACCGGAAGAGTGGCCCCCGGAACCTC
TACAGAACCTAGCGAGGGGAAGCGCACCCAGGATAA

【0041】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) アカゲザルトロンピンリーダー、(b) GLP-2 (A2G) のDPP-IV耐性バリエーション、リンカー、及び(c) アカゲザルIgGFcを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号19の配列、又はそれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%同一の配列を有する。

配列番号19

MAHVRGLQLPGCLALLAALCSLVHSQHVF LAPQQALSL LQR
VRRHGDGSGFSDEMNTVLVDNLATRD FINWLIQT KITDGGG
GGGGSGGGGSGGGGSAEFTPPPCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAQTKPRERQFNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKV
SKGLPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYILPPPPQEELTKNQVS
LTCLVTGFYPSDIAVEWESNGQPENTYKTTTPPVLDSDGSY
LLYSKLT VNKSRWQPGNIFTCSVMHEALHNHYTQKSLSV

P G *

【 0 0 4 2 】

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号 20、又はそれに対して少なくとも 75%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 同一の配列である。

配列番号 20：

```
A T G G C T C A C G T T C G G G G A C T G C A G C T G C C T G G A T G T C T G G
C T C T T G C C G C T C T G T G T A G C C T G G T G C A C A G C C A G C A T G T
G T T T C T G G C T C C T C A G C A G G C C C T G A G C C T G C T G C A A A G A
G T T A G A A G G C A C G G C G A C G G C A G C T T C A G C G A C G A G A T G A
A T A C C G T G C T G G T G G A C A A C C T G G C C A C C A G A G A C T T C A T
C A A C T G G C T G A T C C A G A C C A A G A T C A C C G A C G G T G G T G G C
G G A G G C G G A G G A T C T G G T G G C G G T G G T T C T G G C G G T G G C G
G A T C T G C T G A G T T T A C C C C T C C T T G T C C T C C C T G T C C T G C
T C C A G A A C T G C T C G G C G G A C C T T C C G T G T T C C T G T T T C C T
C C A A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C A G A A C C C C T G
A A G T G A C C T G C G T G G T G G T G G A C G T G T C C C A A G A G G A T C C
T G A G G T G C A G T T C A A T T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A A G T G
C A C A A C G C C C A G A C A A A G C C C A G A G A G C G G C A G T T C A A C A
G C A C C T A C A G A G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G A C A C A C C A
G G A T T G G C T G A A C G G C A A A G A G T A C A C C T G T A A A G T C T C C
A A C A A G G G C C T G C C T G C T C C T A T C G A G A A A A C C A T C A G C A
A G G C C A A G G G C C A G C C T A G A G A A C C C C A G G T G T A C A T C C T
G C C T C C A C C T C A A G A G G A A C T G A C C A A G A A C C A G G T G T C C
C T G A C C T G T C T G G T C A C C G G C T T C T A C C C T T C C G A T A T C G
C C G T G G A G T G G G A G A G C A A C G G A C A G C C C G A G A A C A C C T A
C A A G A C C A C A C C T C C A G T G C T G G A C A G C G A C G G C T C T T A C
C T G C T G T A C T C C A A G C T G A C A G T G A A C A A G A G C C G G T G G C
A G C C C G G C A A C A T C T T C A C C T G T T C T G T G A T G C A C G A G G C
C C T G C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A A A G C C T G A G C G T G T C C
C C T G G A T A A
```

10

20

30

【 0 0 4 3 】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) アカゲザルトロンビンリーダー、(b) G L P-2 (A 2 G) の D P P-I V 耐性バリエーション、リンカー、及び (c) アカゲザル血清アルブミンを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 21 の配列、又はそれに対して少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 同一の配列を有する。

配列番号 21

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

40

50

L V K Q N C E L F E Q L G E Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T P T L V E V
S R N L G K V G A K C C K L P E A K R M P C A E D Y L S V V L N R L C V L H E K
T P V S E K V T K C C T E S L V N R R P C F S A L E L D E A Y V P K A F N A E T
F T F H A D M C T L S E K E K Q V K K Q T A L V E L V K H K P K A T K E Q L K G
V M D N F A A F V E K C C K A D D K E A C F A E E G P K F V A A S Q A A L A
【 0 0 4 4 】

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

配列番号22：

A T G G C T C A C G T T C G G G G A C T G C A G C T G C C T G G A T G T C T G G
C T C T T G C C G C T C T G T G T A G C C T G G T G C A C A G C C A G C A T G T
G T T T C T G G C T C C T C A G C A A G C C C T G A G C C T G C T G C A A A G A
G T T A G A A G G C A C G G C G A C G G C A G C T T C A G C G A C G A G A T G A
A T A C C G T G C T G G T G G A C A A C C T G G C C A C C A G A G A C T T C A T
C A A C T G G C T G A T C C A G A C C A A G A T C A C C G G T G G T G G C G G A
G G C G G A G G A T C T G G T G G C G G T G G T T C T G G C G G T G G C G G A T
C T G A T A C A C A C A A G T C T G A G G T G G C C C A C C G G T T C A A G G A
C C T G G G C G A A G A A C A C T T C A A A G G C C T G G T G C T G G T C G C C
T T C A G C C A G T A C C T G C A G C A G T G C C C T T T C G A G G A A C A C G
T G A A G C T G G T C A A C G A A G T G A C C G A G T T C G C C A A G A C C T G
C G T G G C C G A C G A G A G C G C C G A G A A C T G T G A T A A G A G C C T G
C A C A C C C T G T T C G G C G A C A A G C T G T G T A C A G T G G C C A C A C
T G A G A G A A A C C T A C G G C G A G A T G G C C G A C T G C T G C G C C A A
G C A A G A G C C C G A G A G A A A C G A G T G C T T C C T G C A G C A C A A G
G A C G A C A A C C C C A A C C T G C C T C C A C T C G T C A G A C C C G A A G
T G G A C G T G A T G T G C A C C G C C T T C C A C G A C A A T G A G G C C A C
C T T C C T G A A G A A A T A C C T G T A C G A G G T G G C C A G A C G G C A C
C C C T A C T T T T A C G C C C C T G A A C T G C T G T T C T T T G C C G C C A
G G T A C A A G G C C G C C T T C G C C G A A T G T T G T C A G G C C G C T G A
T A A G G C C G C T T G C C T G C T G C C T A A G C T G G A C G A G C T T A G A
G A C G A G G G C A A A G C C A G C T C C G C C A A G C A G A G A C T G A A G T
G T G C C A G C C T G C A G A A G T T C G G C G A T A G A G C C T T T A A G G C
C T G G G C C G T C G C T A G A C T G A G C C A G A A G T T T C C C A A G G C C
G A G T T T G C C G A G G T G T C C A A G C T C G T G A C C G A C C T G A C A A
A G G T G C A C A C C G A G T G C T G T C A C G G C G A C C T G C T G G A A T G
C G C C G A C G A T A G A G C C G A C C T G G C C A A G T A C A T G T G C G A G
A A C C A G G A C A G C A T C A G C A G C A A G C T G A A A G A G T G C T G C G
A C A A G C C T C T G C T G G A A A A G A G C C A C T G T C T G G C C G A G G T
G G A A A A C G A C G A G A T G C C C G C C G A T C T G C C T T C T C T G G C C
G C C G A T T A C G T G G A A A G C A A G G A C G T G T G C A A G A A C T A C G
C C G A G G C C A A G G A C G T G T T C C T G G G C A T G T T T C T G T A C G A
G T A C G C C C G C A G A C A C C C C G A C T A C T C T G T T A T G C T G C T G
C T G A G A C T G G C C A A G G C C T A C G A G G C C A C T C T G G A A A A G T
G T T G T G C C G C C G C T G A T C C C C A C G A G T G T T A C G C C A A A G T
G T T C G A C G A G T T C C A G C C A C T G G T G G A A G A A C C C C A G A A C
C T G G T C A A G C A G A A C T G C G A G C T G T T C G A G C A G C T G G G C G
A G T A C A A G T T C C A G A A C G C C C T G C T C G T G C G G T A C A C C A A
G A A G G T G C C C C A G G T T T C C A C A C C T A C A C T G G T T G A G G T G
T C C C G G A A C C T G G G A A A A G T G G G C G C C A A G T G T T G C A A G C

10

20

30

40

50

T G C C T G A G G C C A A G A G A A T G C C C T G C G C C G A G G A T T A C C T
 G A G C G T G G T G C T G A A C A G A C T G T G C G T G C T G C A C G A G A A A
 A C C C C T G T G T C C G A G A A A G T G A C C A A G T G C T G T A C C G A G A
 G C C T G G T C A A T C G G A G G C C T T G C T T T A G C G C C C T G G A A C T
 G G A C G A G G C C T A C G T G C C C A A G G C C T T C A A C G C C G A G A C A
 T T C A C C T T C C A C G C C G A C A T G T G T A C C C T G A G C G A G A A A G
 A A A A G C A A G T G A A G A A A C A G A C A G C C C T G G T C G A G C T G G T
 T A A G C A C A A G C C T A A G G C C A C C A A A G A A C A A C T G A A G G G C
 G T G A T G G A C A A C T T C G C C G C C T T T G T G G A A A A A T G C T G C A
 A G G C C G A C G A C A A A G A G G C C T G C T T C G C A G A A G A G G G C C C
 T A A G T T T G T G G C C G C C T C T C A A G C T G C T C T G G C T T A A
 【 0 0 4 5 】

一実施形態では、融合タンパク質は、(a) アカゲザルトロンピンリーダー、(b) G
 L P - 2 (A 2 G) の D P P - I V 耐性バリエーション、リンカー、及び (c) X T E N ポリ
 ペプチドを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 23 の配列、又はそれ
 に対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 9
 9 % 同一の配列を有する。

配列番号 23

M A H V R G L Q L P G C L A L A A L C S L V H S Q H V F L A P Q Q A L S L L Q R
 V R R H G D G S F S D E M N T V L V D N L A T R D F I N W L I Q T K I T D G G G
 G G G S G G G G S G G G G S S P A G S P T S T E E G T S E S A T P E S G P G T S
 T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S T E P S
 E G S A P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G S E P A T S G S E T
 P G S P A G S P T S T E E G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G T S
 T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S T E P S
 E G S A P G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G
 P G S E P A T S G S E T P G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P G T S
 E S A T P E S G P G T S E S A T P E S G P G S P A G S P T S T E E G T S E S A T
 P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A
 P G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P G T S
 T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S
 E G S A P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G
 P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G T S
 E S A T P E S G P G S P A G S P T S T E E G S P A G S P T S T E E G S P A G S P
 T S T E E G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G
 P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S
 E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S E S A T
 P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G S P A G S P T S T E
 E G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P G T S
 E S A T P E S G P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G S E P A T S
 G S E T P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A
 P G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G
 【 0 0 4 6 】

一実施形態では、融合タンパク質をコードする配列は、配列番号 24、又はそれに対
 して少なくとも 75 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少な
 くとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 同一の配列である。

配列番号 24 :

A T G G C T C A C G T T C G G G G A C T G C A G C T G C C T G G A T G T C T G G
 C T C T T G C C G C T C T G T G T A G C C T G G T G C A C A G C C A G C A T G T
 G T T T C T G G C T C C T C A G C A A G C C C T G A G C C T G C T G C A A A G A

G T T A G A A G G C A C G G C G A C G G C A G C T T C A G C G A C G A G A T G A
A T A C C G T G C T G G T G G A C A A C C T G G C C A C C A G A G A C T T C A T
C A A C T G G C T G A T C C A G A C C A A G A T C A C C G A C G G T G G C G G A
G G C G G A G G A T C T G G T G G T G G T G G A T C T G G C G G C G G A G G A A
G T T C T C C T G C T G G C A G C C C T A C A A G C A C C G A G G A A G G C A C
A A G C G A G T C T G C C A C A C C T G A G T C T G G C C C T G G C A C A T C T
A C A G A G C C T A G C G A A G G A T C T G C C C C A G G A T C T C C T G C C G
G C T C T C C A A C A T C T A C C G A A G A G G G A A C C A G C A C C G A G C C
A T C T G A G G G A T C T G C T C C C G G A A C A A G C A C A G A G C C T T C A
G A A G G A T C C G C T C C T G G C A C C T C T G A A A G C G C C A C A C C A G
A A A G C G G A C C T G G C T C T G A A C C T G C C A C A A G C G G A T C T G A
G A C A C C T G G A A G C G A G C C A G C C A C A T C T G G C A G C G A A A C A
C C T G G A T C A C C A G C C G G A T C T C C C A C C T C T A C C G A G G A A G
G G A C A T C C G A G A G C G C T A C C C C A G A A T C T G G A C C A G G C A C
C A G C A C A G A A C C C T C T G A A G G T T C A G C C C C T G G A A C C T C T
A C C G A A C C A T C A G A A G G C A G C G C T C C A G G T T C T C C C G C T G
G A T C C C C T A C A T C C A C A G A A G A G G G C A C C T C C A C T G A A C C
T A G C G A G G G A A G T G C T C C C G G C A C T T C C A C A G A A C C A T C C
G A G G G C A G T G C A C C T G G A A C C A G C G A A T C T G C T A C C C C T G
A G A G T G G A C C C G G A A C A T C C A C T G A G C C C T C C G A G G G T T C
A G C T C C A G G C A C A T C A G A A T C C G C C A C T C C A G A G T C C G G A
C C A G G A T C T G A G C C A G C T A C C A G C G G C T C T G A A A C A C C C G
G C A C T A G T A C C G A G C C A A G C G A G G G T A G C G C A C C A G G G A C
A A G T A C C G A A C C G T C T G A G G G C T C C G C A C C A G G C A C T T C C
G A A A G T G C T A C T C C T G A A A G C G G C C C A G G C A C T A G C G A A T
C C G C A A C A C C C G A G A G C G G T C C T G G A A G T C C T G C A G G T T C
A C C T A C C A G C A C T G A A G A G G G G A C T A G C G A G A G C G C A A C T
C C T G A A T C A G G C C C T G G A T C C G A A C C T G C T A C C T C C G G A A
G T G A A A C C C C T G G G A C A A G C G A A A G T G C A A C G C C C G A G T C
A G G A C C C G G G A C T A G C A C G G A A C C C A G T G A A G G A T C T G C A
C C C G G G A C A T C T A C C G A G C C G T C A G A A G G T T C T G C T C C A G
G G A C T A G T A C T G A G C C T T C C G A A G G T T C T G C A C C T G G A A C
T T C C A C A G A G C C C A G T G A A G G C A G T G C C C C T G G C A C A A G C
A C T G A A C C G T C C G A A G G C A G T G C T C C C G G G A C C A G T A C A G
A A C C G A G C G A G G G C T C T G C T C C T G G T A G T C C A G C A G G A T C
T C C A A C T A G C A C C G A A G A A G G G A C T T C C A C C G A G C C T T C C
G A G G G A A G C G C T C C T G G A A C A T C C G A G T C C G C T A C G C C A G
A G A G T G G C C C A G G T T C T G A A C C C G C T A C T T C C G G C T C A G A
G A C T C C T G G G A C T T C T G A G T C T G C A A C C C C G G A A A G T G G T
C C T G G T A G C G A A C C A G C A A C T A G C G G A A G C G A G A C A C C C G
G A A C C T C A G A G A G T G C T A C A C C G G A A T C C G G T C C A G G G A C
G T C T A C G G A A C C G T C T G A A G G A T C A G C T C C C G G C A C T A G C
G A A A G C G C T A C A C C T G A A A G T G G T C C C G G A T C T C C A G C A G
G C A G C C C A A C C T C T A C T G A A G A A G G T T C C C C A G C T G G A A G
C C C C A C T T C C A C T G A G G A A G G C T C T C C C G C A G G C T C A C C C
A C T A G T A C G G A A G A A G G C A C G T C C G A G T C T G C T A C T C C C G
A A T C C G G A C C T G G A A C T A G C A C T G A G C C A A G C G A A G G A T C
A G C A C C C G G A A C C T C T G A G T C C G C C A C A C C A G A A T C T G G T
C C T G G T T C C G A G C C T G C C A C T T C A G G A T C A G A A A C C C C G G
G C A C G A G T G A A T C A G C A A C G C C G G A A T C T G G C C C C G G A A G

10

20

30

40

50

CGAACCGGCTACGTCTGGATCTGAAACGCCAGGGGACCTCC
GAATCAGCTACGCCCTGAGTCTGGTCCAGGGGACATCCACCG
AACCTAGTGAAAGGCTCCGCACTCTGGAAGCCCTGCTGGAAG
CCCAACGAGTACTGAAGAGGGGCACTTCTGAGAGCGCTACG
CCTGAGTCAAGGACCTGGAAGCGAACCCTGCAACATCCGGCT
CAGAAACACCAGGGGACCAGCGAAAGCGCAACCCAGAGAG
TGGACCTGGATCTCCAGCTGGCTCTCCTACTAGTACAGAG
GAAGGCAGCCCTGCTGGCTCCCCAACGTCAACAGAAAGAAAG
GTACTAGCACAGAGGCCAGCGAGGGTTCCGCTCCGGGGAAC
TTCTGAATCTGCTACACCCGAGTCAAGGTCTTGTTACAAGC
GAGTCAGCTACGCCCCGAAGAGTGGACCTGGCACCTCAGAGT
CTGCAACTCCTGAGAGCGGTCCAGGATCAGAAACCAGCCAC
CTCTGGCTCTGAGACACCAGGTCTGAGCCTGCAACGTCC
GGAAGCGAAACACCAGGCAGTCTGCGGGAAGTCTTACTT
CAACCAGAAAGAGGGGACCTCTACAGAGCCATCAGAGGGCTC
TGCACCGGGGACCTCAACAGAAACCATCTGAAGGATCCGCA
CCGGGCTCTGAGCCTGCTACTAGTGGAAAGCGAAACTCCTG
GCACCAGTGAATCCGCTACTCCCGAGTCTGGCCCCGGGAAC
GTCTACTGAACCATCTGAGGGGAAGTGCCCCAGGCTAA

【0047】

リーダー配列、GLP-2受容体アゴニスト、又は融合ドメインのバリエーション又はフラグメントが所望される場合、これらのペプチドのコード配列は、野生型核酸配列の部位特異的変異誘発を使用して生成され得る。代替的又は追加的に、ウェブベース又は市販のコンピュータプログラム、並びにサービス会社を使用して、アミノ酸配列をRNA及び／又はcDNAの両方を含む核酸コード配列に逆翻訳し得る。例えば、backtransseq by EMBOS, ebi.ac.uk/Tools/st; Gene Infinity (geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html); Expasy (expasy.org/tools/)を参照されたい。一実施形態では、RNAコード配列及び／又はcDNAコード配列は、投与が最終的に意図される対象種、例えば、ヒトにおける最適な発現のために設計される。

【0048】

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

【0049】

本明細書において提供されるリーダー配列、GLP-2受容体アゴニスト、融合ドメイン、及び融合タンパク質に加えて、これらのポリペプチドをコードする核酸配列が、提供される。一実施形態では、本明細書に記載のGLP-2ペプチドをコードする核酸配列が、提供される。いくつかの実施形態では、これは、配列番号1のGLP-2配列をコードする任意の核酸配列を含み得る。別の実施形態では、これは、配列番号2のGLP-2配列を含む任意の核酸を含む。

【0050】

一実施形態では、本明細書に記載の G L P - 2 融合タンパク質をコードする核酸配列が、提供される。別の実施形態では、これは、配列番号 13、15、17、19、21、又は 23 の G L P - 2 融合タンパク質をコードする任意の核酸配列を含む。

【0051】

発現カセット

別の態様では、本明細書に記載の G L P - 2 融合タンパク質をコードする核酸を含む発現カセットが、本明細書において提供される。本明細書で使用される場合、「発現カセット」とは、生物学的に有用な核酸配列と、核酸配列（例えば、タンパク質、酵素、又は他の有用な遺伝子産物、mRNAなどをコードする遺伝子 cDNA）及びその遺伝子産物の転写、翻訳、及び／又は発現を指示又は調節する、それと操作可能に連結された調節配列と、を含む、核酸分子を指す。本明細書で使用される場合、「操作可能に連結された」配列は、核酸配列と連続又は非連続である調節配列（要素とも称される）及びトランス又はシス核酸配列で作用する調節配列の両方を含む。かかる調節配列は、典型的には、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写因子、転写終結因子、イントロン、翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）、スライシング及びポリアデニル化配列などの効率的な RNA プロセシングシグナル、細胞質 mRNA を安定化する配列、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHP）翻訳後調節要素（WPRE）、及び T A T A シグナルのうちの 1 つ以上を含む。発現カセットは、他の要素の中で、遺伝子配列の上流（5' ~）の調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどのうちの 1 つ以上、及びエンハンサー、又は遺伝子配列の下流（3' ~）の調節配列、例えば、ポリアデニル化部位を含む 3' 非翻訳領域（3' UTR）のうちの 1 つ以上を含み得る。ある特定の実施形態では、調節配列は、遺伝子産物の核酸配列と操作可能に連結され、調節配列は、介在する核酸配列、すなわち、5' 非翻訳領域（5' UTR）によって、遺伝子産物の核酸配列から分離される。ある特定の実施形態では、発現カセットは、1 つ以上の遺伝子産物の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、モノシストロン性又はバイシストロン性発現カセットであり得る。他の実施形態では、「導入遺伝子」という用語は、標的細胞に挿入される外因性供給源からの 1 つ以上の DNA 配列を指す。

【0052】

一実施形態では、発現カセットは、G L P - 2 構築物コード配列（例えば、G L P - 2 融合タンパク質のコード配列）、プロモーターを含む核酸分子を指し、それらのための他の調節配列を含み得、このカセットは、遺伝子要素に操作され得、かつ／又はウイルスベクターのカプシド（例えば、ウイルス粒子）にパッケージングされ得る。典型的に、ウイルスベクターを生成するためのかかる発現カセットは、ウイルスゲノム（及び「ベクターゲノム」と称される）のパッケージングシグナルに隣接する本明細書に記載の G L P - 2 構築物配列と、本明細書に記載のものなどの他の発現制御配列と、を含む。発現制御配列のうちのいずれかは、例えば、本明細書に記載されるように、コドン最適化を含む当該技術分野で既知の技術を使用して特定の種に対して最適化することができる。

【0053】

ある特定の実施形態では、発現カセットは、構成的プロモーターを含む。別の実施形態では、C B 7 が使用される。C B 7 は、サイトメガロウイルスエンハンサー要素を有するニフトリβアクチンプロモーターである。いくつかの実施形態では、C B 7 プロモーターは、配列番号 25 の核酸配列を有する。一実施形態では、プロモーターは、C M V プロモーターである。いくつかの実施形態では、C M V プロモーターは、配列番号 26 の核酸配列である。

【0054】

別の実施形態では、組織特異的プロモーターが、使用される。代替的に、他の肝臓特異的プロモーターは、例えば、the Liver Specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor, (rulai.schl.edu / LSPD) に列挙されているものを使用され得、アルファ1抗トリプシン（A1AT）、ヒトアルブミン（Miyatake et al., J. Viro

l. , 71 : 5124 32 (1997)) , h u m A l b ; B型肝炎ウイルスコアプロモーター (S a n d i g e t a l . , G e n e T h e r . , 3 : 1002 9 (1996)) 、 T T R 最小エンハンサー／プロモーター、アルファ抗トリプシンプロモーター、肝臓特異的プロモーター (L S P) (W u e t a l . M o l T h e r . 16 : 280-289 (2008)) 、 T B G 肝臓特異的プロモーターを含むが、これらに限定されない。ウイルスプロモーター、構成的プロモーター、調節可能なプロモーター (例えば、W O 2 0 1 1 / 1 2 6 8 0 8 及び W O 2 0 1 3 / 0 4 9 4 3 を参照されたい) 、又は生理学的キューに応答するプロモーターなどの他のプロモーターが使用され得、本明細書に記載のベクターに利用され得る。

【0055】

一実施形態では、プロモーターは、誘導性遺伝子発現系に含まれる。誘導性遺伝子調節／発現系は、少なくとも以下の成分、本明細書に記載の G L P - 2 融合タンパク質をコードする導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター (調節可能なプロモーターとも称される) 、活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、及びジンクフィンガーホメオドメイン結合部位 (複数可) を含む。他の実施形態では、本明細書に更に記載されるように、追加の成分が発現系に含まれ得る。

【0056】

系は、G L P - 2 融合タンパク質のコード配列の上流にプロモーターを含む。C M V 及び C B 7 プロモーターなどの本明細書に記載のプロモーターが、使用され得る。一実施形態では、プロモーターは、配列番号 26 に示されるような C M V プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは、12 個の反復コピーの Z F H D 1 に対する結合部位及び I L 2 最小プロモーターを含む、ユビキタス誘導性プロモーター Z 1 2 I である。例えば、C h e n e t a l , H u m G e n e T h e r M e t h o d s . 2 0 1 3 A u g ; 2 4 (4) : 2 7 0 - 2 7 8 を参照されたい (本明細書に組み込まれる) 。

【0057】

発現系は、活性化ドメインを含み、これは、好ましくは、DNA結合ドメインの上流に位置する。一実施形態では、活性化ドメインは、N F - カッパ B の p 6 5 サブユニットからのカルボキシ末端と、F K B P 1 2 - ラパマイシン関連タンパク質 (F R A P) の F K B P 1 2 - ラパマイシン結合 (F R B) ドメインとの融合である。一実施形態では、活性化ドメインは、ヒト由来の N F - カッパ B の p 6 5 サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒト F K B P 1 2 - ラパマイシン関連タンパク質 (F R A P) の F K B P 1 2 - ラパマイシン結合 (F R B) ドメインである。

【0058】

一実施形態では、トランス活性化ドメインと DNA 結合ドメインとの間にリンカーがあり、リンカーは、F 2 A 又は I R E S であり得る。一実施形態では、リンカーは、I R E S 又は 2 A ペプチドから選択される。

【0059】

DNA 結合ドメインは、最大 3 つのコピーの F K 5 0 6 結合タンパク質 (F K B P) に接合されたジンクフィンガーホメオドメイン 1 (Z F H D 1) の DNA 結合融合からなる。誘導剤、例えばラパマイシンなどのラパログの存在下で、DNA 結合ドメイン及び活性化ドメインは、それらの F K B P 及び F R B ドメインの相互作用を介して二量体化され、導入遺伝子の転写活性化をもたらす。いくつかの実施形態では、Z F H D 1 は、G T 2 A 又は I R E S とともにフレーム内に含まれる。

【0060】

発現系は、F K B P 配列の 1、2、又は 3 つのコピーを有するように設計される。これらは、本明細書では、F K B P サブユニットと称される。一実施形態では、サブユニットは、組換えを最小限にするために、同じタンパク質を発現するように設計されるが、互いに異なる核酸を有するように設計される。例えば、配列番号 27 は、F K B P の 3 つの「揺らいだ」コード配列を提供し、これらの各々は、配列番号 28 : G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L

10

20

30

40

50

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

【0061】

発現系は、ジンクフィンガーホメオドメイン結合部位を更に含む。核酸分子は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12個のZFHDに対する結合部位を含む。一実施形態では、発現系は、8個のジンクフィンガーホメオドメイン結合部位（結合パートナー）（8XZFHD）を含む。しかしながら、本発明は、ジンクフィンガー結合部位の2～約12個のコピーを有する発現系を包含する。単一コピーのZFHD結合部位の一例は、a a t g a t g g g c g c t c g a g t（配列番号29）である。

10

【0062】

いくつかの実施形態では、ジンクフィンガーホメオドメイン結合部位の下流に最小IL2プロモーターがある。例示的なIL2プロモーターは、配列番号30に示される。

【0063】

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

20

30

【0064】

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

40

【0065】

これらの制御配列は、GLP-2構築物配列に「操作可能に連結されている」。本明細書で使用される場合、「操作可能に連結された」という用語は、目的の遺伝子に連続している発現制御配列、及びトランスで又は離れて作用して目的の遺伝子を制御する発現制御配列の両方を指す。

【0066】

一実施形態では、5' ITR、CB7プロモーター、ニワトリベーターアクチニン

50

トロン、配列番号13、15、17、19、21、又は23の融合タンパク質のコード配列、ウサギグロビンポリA、及び3' ITRを含むrAAVが、提供される。別の実施形態では、rAAVは、CMVプロモーターを含むポリヌクレオチドを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-κBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質 (FRAP) のFKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン、IRES、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、8XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号13、15、17、19、21、又は23のGLP-2融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含む。

【0067】

別の実施形態では、2つのベクター誘導系が、提供される。第1のrAAVは、12XZFHD、最小IL2プロモーター、配列番号13、15、17、19、21、又は23のGLP-2融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含む。ベクターのパッケージサイズを増加させるために、スタッパー配列が、含まれ得る。第2のrAAVは、CMVプロモーターを含むポリヌクレオチド、イントロンを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-κBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質 (FRAP) のFKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン、IRES、ZFHD1 DNA結合ドメイン、及びポリAである。

【0068】

一実施形態では、CB7プロモーター、ニワトリベクターアクチンイントロン、配列番号13、15、17、19、21、若しくは23の融合タンパク質のコード配列、及びウサギグロビンポリAを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットが提供される。一実施形態では、発現カセットは、配列番号Xに見出されるもの、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列である。別の実施形態では、配列番号X-X、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、若しくは100%の同一性を共有する配列が、5' 及び3' AAV ITRに隣接している、ベクターゲノムが、提供される。

【0069】

別の実施形態では、CB7プロモーター、ニワトリベクターアクチンイントロン、配列番号13、15、17、19、21、又は23の融合タンパク質のコード配列、及びウサギグロビンポリAを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットが、提供される。

【0070】

ウイルスベクター

別の態様では、本明細書に記載の発現カセットを含むウイルスベクターが、提供される。本明細書に記載のウイルスベクターのある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ウイルスベクター又は組換えAAV (rAAV) である。本明細書で使用される場合の「組換えAAV」又は「rAAV」という用語は、天然に存在するアデノ随伴ウイルス、当業者に利用可能な、及び／又は本明細書に記載の組成物 (複数可) 及び方法 (複数可) の観点において利用可能なアデノ随伴ウイルス、並びに人工AAVを指す。アデノ随伴ウイルス (AAV) ウイルスベクターは、AAVタンパク質カプシドを有するAAV DNase耐性粒子であり、その中にパッケージングされた発現カセットは、標的細胞に送達するためのAAV逆位末端反復配列 (ITR) に隣接している (併せて「ベクターゲノム」と称される)。AAVカプシドは、60個のカプシド (cap) タンパク質サブユニット、VP1、VP2、及びVP3で構成され、選択されるAAVに応じて、およそ1:1:10~1:1:20の比で二十面体対称に配置される。上に特定されたAAVウイルスベクターのカプシドの供給源として、様々なAAVが選択され得る。一実施形態では、AAVカプシドは、AAVrh91カプシド又はそのバリエーションである。ある特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、rAAVベクターの名称で「AAV」という用語の後の数値又は数値と文字との組み合わせによって指定される。特

10

20

30

40

50

に明記しない限り、本明細書に記載のAAVカプシド、ITR、及び他の選択されるAAV成分は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37、AAVrh32.33、AAV Anc80、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh74、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAVhu.37、AAVrh.64R1、及びAAVhu68として特定されたAAVを含むが、これらに限定されない任意のAAVの中から容易に選択され得る。例えば、米国特許出願公開第2007-0036760-A1号、米国特許出願公開第2009-0197338-A1号、EP1310571を参照されたい。WO2003/042397 (AAV7及び他のサルAAV)、米国特許第7790449号及び米国特許第7282199号 (AAV8)、WO2005/033321及びUS7,906,111 (AAV9)、並びにWO2006/110689、及びWO2003/042397 (rh.10)、WO2005/033321、WO2018/160582 (AAVhu68)も参照されたく、これらは参照により本明細書に組み込まれる。他の好適なAAVには、AAVrh90 [2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30273]、AAVrh91 [2020年4月28日に出願された、PCT/US20/030266、2020年11月5日に公開された現在の公開WO2020/223231]、AAVrh92、AAVrh93、AAVrh91.93 [2020年4月28日に出願された、PCT/US20/30281]が含まれ得るが、これらに限定されず、これらは参照により本明細書に組み込まれる。他の好適なAAVには、2019年10月21日に出願された米国仮特許出願第62/924,112号、及び2020年5月15日に出願された米国仮特許出願第63/025,753号に記載されるAAV3Bバリエーションが含まれ、そこには、AAV3B.AR2.01、AAV3B.AR2.02、AAV3B.AR2.03、AAV3B.AR2.04、AAV3B.AR2.05、AAV3B.AR2.06、AAV3B.AR2.07、AAV3B.AR2.08、AAV3B.AR2.10、AAV3B.AR2.11、AAV3B.AR2.12、AAV3B.AR2.13、AAV3B.AR2.14、AAV3B.AR2.15、AAV3B.AR2.16、又はAAV3B.AR2.17が記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。また、2021年8月13日に出願された国際特許出願第PCT/US21/45945号、2020年8月14日に出願された米国仮特許出願第63/065,616号、及び2020年11月4日に出願された米国仮特許出願第63/109,734号を参照にされたく、それらは全て参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。これらの文書はまた、rAAVを生成するために選択され得る他のAAVカプシドについても記載されており、参照により組み込まれる。ヒト又は非ヒト霊長類 (NHP) から単離又は操作され、十分に特徴付けられたAAVのうち、ヒトAAV2は、遺伝子導入ベクターとして開発された最初のAAVであり、種々の標的組織及び動物モデルにおける効率的な遺伝子導入実験に広く使用されている。

【0071】

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

【0072】

一実施形態では、ウイルスペクターは、AAV8のカプシド又はその機能的バリエーションを有するrAAVである。一実施形態では、ウイルスペクターは、AAVrh91のカプシド又はその機能的バリエーションを有するrAAVである。一実施形態では、ウイルスペクターは、AAV3.AR.2.12のカプシド又はその機能的バリエーションを有するrAAVである。一実施形態では、ウイルスペクターは、AAV9、AAVrh64R1、AAVhu37、又はAAVrh10から選択されるカプシドを有するrAAVである。

【0073】

ある特定の実施形態では、新規の単離されたAAVrh91カプシドが、提供される。AAVrh91カプシドをコードする核酸配列は、配列番号31に提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号32に提供される。AAVrh91（配列番号32）のvp1、vp2、及びvp3のうちの少なくとも1つを含むrAAVが、本明細書において提供される。また、AAVrh91（配列番号31）のvp1、vp2、及びvp3のうちの少なくとも1つによってコードされるAAVカプシドを含むrAAVも、本明細書において提供される。なお別の実施形態では、AAVrh91アミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号19において提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号32において提供される。また、AAVrh91eng（配列番号19）のvp1、vp2、及びvp3のうちの少なくとも1つによってコードされるAAVカプシドを含むrAAVも、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、vp1、vp2、及び／又はvp3は、AAVrh91（配列番号32）の全長カプシドタンパク質である。他の実施形態では、vp1、vp2、及び／又はvp3は、N末端及び／又はC末端の切断（例えば、約1～約10個のアミノ酸の切断）を有する。

【0074】

ある特定の実施形態では、AAVrh91カプシドは、以下のうちの1つ以上を特徴とする：（1）AAVrh91カプシドタンパク質であって、配列番号32の1～736の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるvp1タンパク質、配列番号31から産生されるvp1タンパク質、又は配列番号32の1～736の予測アミノ酸配列をコードする配列番号31に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質から選択されるAAVrh91 vp1タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約138～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるvp2タンパク質、配列番号31の少なくともヌクレオチド412～2208を含む配列から産生されるvp2タンパク質、又は配列番号32の少なくとも約138～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号31の少なくともヌクレオチド412～2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質から選択されるAAVrh91 vp2タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約203～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現から産生されるvp3タンパク質、配列番号31の少なくともヌクレオチド607～2208を含む配列から産生されるvp3タンパク質、又は配列番号32の少なくとも約203～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号31の少なくともヌクレオチド607～2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質から選択されるAAVrh91 vp3タンパク質の異種集合体を含む、AAVrh91カプシドタンパク質、並びに／あるいは（2）配列番号32のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約138～736のアミノ酸のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集合体、及び配列番号32の少なくとも約203～736のアミノ酸をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集合体であって、vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質が、配列番号32のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン（N）を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸の変化をもたらす、vp1タンパク質の異種集合体、vp2タンパク質の異種集合体、vp3タンパク質の異種集合

体、(B) A A V r h 9 1 カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、A A V 逆位末端反復配列、及び宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と操作可能に連結される産物をコードする非 A A V 核酸配列を含む核酸分子を含む、ベクターゲノム。

【0075】

ある特定の実施形態では、A A V r h 9 1 カプシドは、以下のうちの1つ以上を特徴とする：(1) A A V r h 9 1 カプシドタンパク質であって、配列番号32の1～736の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される v p 1 タンパク質、配列番号19から産生される v p 1 タンパク質、又は配列番号32の1～736の予測アミノ酸配列をコードする配列番号19に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生される v p 1 タンパク質から選択される A A V r h 9 1 v p 1 タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約138～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される v p 2 タンパク質、配列番号19の少なくともヌクレオチド412～2208を含む配列から産生される v p 2 タンパク質、又は配列番号32の少なくとも約138～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号19の少なくともヌクレオチド412～2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生される v p 2 タンパク質から選択される A A V r h 9 1 v p 2 タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約203～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現から産生される v p 3 タンパク質、配列番号19の少なくともヌクレオチド607～2208を含む配列から産生される v p 3 タンパク質、又は配列番号32の少なくとも約203～736のアミノ酸の予測アミノ酸配列をコードする配列番号19の少なくともヌクレオチド607～2208に対して少なくとも70%同一の核酸配列から産生される v p 3 タンパク質から選択される A A V r h 9 1 v p 3 タンパク質の異種集合体を含む、A A V r h 9 1 カプシドタンパク質、並びに／あるいは(2) 配列番号32のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 1 タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約138～736のアミノ酸のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 2 タンパク質の異種集合体、及び配列番号32の少なくとも約203～736のアミノ酸をコードする核酸配列の産物である v p 3 タンパク質の異種集合体であって、v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質が、配列番号32のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸の変化をもたらす、v p 1 タンパク質の異種集合体、v p 2 タンパク質の異種集合体、v p 3 タンパク質の異種集合体と、(B) A A V r h 9 1 カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、A A V 逆位末端反復配列、及び宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と操作可能に連結される産物をコードする非 A A V 核酸配列を含む核酸分子を含む、ベクターゲノム。

【0076】

ある特定の実施形態では、A A V r h 9 1 の v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質は、配列番号32のアスパラギン-グリシン対中に少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸変化をもたらす。配列番号32の数と比較して、N-G対N57、N383、及び／又はN512で高レベルの脱アミド化が、観察される。脱アミド化は、他の残基において観察されている。ある特定の実施形態では、A A V r h 9 1 は、例えば、典型的には10%未満で脱アミド化された他の残基を有し得、及び／又はリン酸化(例えば、存在する場合、約2～約30%、若しくは約2～約20%、若しくは約2～約10%の範囲)(例えば、S149で)、又は酸化(例えば、ほぼW22、ほぼM211、W247、M403、M435、M471、W478、W503、ほぼM537、ほぼM541、ほぼM559、ほぼM599、M635、及び／又はW695のうちの1つ以上で)を含む他の修飾を有し得る。任意選択的に、Wは、キヌレニンに酸化され得る。

10

20

30

40

50

【表 2】

表A-AAVrh91脱アミド化

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

10

【0077】

ある特定の実施形態では、AAVrh91カプシドは、トリプシン酵素を用いた質量分析を使用して決定される場合、上記の表で特定された位置のうちの1つ以上で、以下に提供する範囲で修飾される。ある特定の実施形態では、1つ以上の位置、又はNに続くグリシンは、本明細書に記載されるように修飾されている。残基番号は、本明細書において提供されるAAVrh91配列に基づく。配列番号32を参照されたい。

20

【0078】

ある特定の実施形態では、AAVrh91カプシドは、配列番号32のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集合体、配列番号32の少なくとも約アミノ酸138～736でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集合体、及び配列番号32の少なくともアミノ酸203～736をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集合体を含む。

30

【0079】

ある特定の実施形態では、修飾AAVrh91の核酸配列は、天然AAVrh91カプシドよりも低い脱アミド化を含むカプシドを有する変異体rAAVを生成するために使用され得る。かかる変異体rAAVは、免疫原性が低減しており、かつ／又は貯蔵、特に懸濁形態での貯蔵の際の安定性を増加させ得る。

【0080】

一態様では、組換えAAV(rAAV)が、提供される。rAAVは、アデノ随伴ウイルスrh91由来のAAVカプシドと、AAVカプシド中にパッケージングされるベクターゲノムと、を含み、当該ベクターゲノムは、AAV逆位末端反復(ITER)、配列番号14のGLP-2受容体アゴニストのコード配列、及びGLP-2受容体アゴニストの発現を指示する調節配列を含む。

40

【0081】

ある特定の実施形態では、AAV68カプシドは、更に、以下のうちの1つ以上を特徴とする。AAVhu68カプシドタンパク質は、配列番号55の1～736の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるAAVhu68vp1タンパク質、配列番号53若しくは54から産生されるvp1タンパク質、又は配列番号55の1～736の予測アミノ酸配列をコードする配列番号53若しくは54と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質；配列番号55の少なくとも約アミノ酸138～736の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生されるAAVhu68vp2タンパク質、配列番号53若しくは54の少なくともヌク

50

レオチド 4 1 2 ~ 2 2 1 1 を含む配列から産生される v p 2 タンパク質、又は配列番号 5 5 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする配列番号 5 3 若しくは 5 4 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 1 1 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 2 タンパク質、並びに／あるいは配列番号 5 5 の少なくとも約アミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現によって産生される A A V h u 6 8 v p 3 タンパク質、配列番号 5 3 若しくは 5 4 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 1 1 を含む配列から産生される v p 3 タンパク質、又は配列番号 5 5 の少なくとも約アミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 の予測アミノ酸配列をコードする配列番号 5 3 若しくは 5 4 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 1 1 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 3 タンパク質を含む。

10

【0082】

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

20

【0083】

A A V h u 6 8 の v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質は、典型的には、配列番号 5 5 の全長 v p 1 アミノ酸配列（アミノ酸 1 ~ 7 3 6）をコードする同じ核酸配列によってコードされる代替的スプライシングバリエーションとして発現される。任意選択的に、v p 1 コード配列は、v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質を発現させるために単独で使用される。代替的に、この配列は、v p 1 固有領域（約 a a 1 ~ 約 a a 1 3 7）及び／又は v p 2 固有領域（約 a a 1 ~ 約 a a 2 0 2）を有しない配列番号 5 5 の A A V h u 6 8 v p 3 アミノ酸配列（約 a a 2 0 3 ~ 7 3 6）をコードする核酸配列、又はそれに相補的な鎖、対応する m R N A 若しくは t R N A（配列番号 5 3 若しくは 5 4 の約 n t 6 0 7 ~ 約 n t 2 2 1 1）、又は配列番号 5 5 の a a 2 0 3 ~ 7 3 6 をコードする配列番号 5 3 若しくは 5 4 に対して少なくとも 7 0 % ~ 少なくとも 9 9 %（例えば、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、若しくは少なくとも 9 9 %）同一の配列のうちの 1 つ以上と共発現され得る。追加的に、又は代替的に、v p 1 コード配列及び／又は v p 2 コード配列は、v p 1 固有領域（約 a a 1 ~ 約 1 3 7）を有しない配列番号 5 5 の A A V h u 6 8 v p 2 アミノ酸配列（約 a a 1 3 8 ~ 7 3 6）をコードする核酸配列、又はそれに相補的な鎖、対応する m R N A 若しくは t R N A（例えば、配列番号 5 3 若しくは 5 4 の n t 4 1 2 ~ 2 2 1 2）、又は配列番号 5 5 の約 a a 1 3 8 ~ 7 3 6 をコードする配列番号 5 3 若しくは 5 4 と少なくとも 7 0 % ~ 少なくとも 9 9 %（例えば、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、若しくは少なくとも 9 9 %）同一の配列と共発現され得る。

30

40

【0084】

本明細書に記載されるように、r A A V h u 6 8 は、配列番号 5 5 の v p 1 アミノ酸配列をコードする A A V h u 6 8 核酸、及び任意選択的に、追加の核酸配列、例えば、v p 1 固有領域及び／又は v p 2 固有領域を含まない v p 3 タンパク質をコードする配列、からカプシドを発現する産生系で産生される r A A V h u 6 8 カプシドを有する。単一の核酸配列 v p 1 を使用した産生から得られる r A A V h u 6 8 は、v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質の異種集団を産生する。より具体的には、A A V h

50

u 6 8 カプシドは、v p 1 タンパク質内、v p 2 タンパク質内、及び v p 3 タンパク質内に亜集団を含み、配列番号 5 5 の予測アミノ酸残基からの修飾を有する。これらの亜集団は、最低限、脱アミド化アスパラギン（N 又は A s n）残基を含む。例えば、アスパラギン-グリシン対におけるアスパラギンは、高度に脱アミド化される。

【0085】

一実施形態では、A A V h u 6 8 v p 1 核酸配列は、配列番号 5 3 若しくは 5 4 の配列、又はそれに相補的な鎖、例えば、対応する m R N A 若しくは t R N A を有する。ある特定の実施形態では、v p 2 タンパク質及び／又は v p 3 タンパク質は、追加的又は代替的に、例えば、選択された発現系において v p タンパク質の比率を変化させるために、v p 1 とは異なる核酸配列から発現され得る。ある特定の実施形態では、v p 1 固有領域（約 a a 1 ～約 a a 1 3 7）及び／又は v p 2 固有領域（約 a a 1 ～約 a a 2 0 2）、又はそれらに相補的な鎖、対応する m R N A 若しくは t R N A（配列番号 5 3 若しくは 5 4 の約 n t 6 0 7 ～約 n t 2 2 1 1）を含まない、配列番号 5 5 の A A V h u 6 8 v p 3 アミノ酸配列（約 a a 2 0 3 ～7 3 6）をコードする核酸配列も提供される。ある特定の実施形態では、v p 1 固有領域（約 a a 1 ～約 1 3 7）、又はそれらに相補的な鎖、対応する m R N A 若しくは t R N A（配列番号 5 3 若しくは 5 4 の n t 4 1 2 ～2 2 1 1）を含まない、配列番号 5 5 の A A V h u 6 8 v p 2 アミノ酸配列（約 a a 1 3 8 ～7 3 6）をコードする核酸配列も、提供される。

10

【0086】

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

20

30

40

50

【表 3】

予測された AAVHu68[配列番号 55]に基づく 脱アミド化	AAVhu68 カプシドの VP1/VP2/VP3 タンパク質に基づく平均%	
脱アミド化残基+1(隣接 AA)	広い範囲のパーセンテージ (%)	狭い範囲(%)
N57 (N-G)	78～100%	80～100、85～97
N66 (N-E)	0～5	0、1～5
N94 (N-H)	0～15	0、1～15、5～12、8
N113 (N-L)	0～2	0、1～2
約 N253 (N-N)	10～25	15～22
Q259 (Q-I)	8～42	10～40、20～35
約 N270 (N-D)	12～30	15～28
約 N304 (N-N)(位置 303 も N)	0～5	1～4
N319 (N-I)	0～5	0、1～5、1～3
N329* (N-G)*(位置 328 も N)	65～100	70～95、85～95、80～100、85～100、
N336 (N-N)	0～100	0、1～10、25～100、30～100、30～95
約 N409 (N-N)	15～30	20～25
N452 (N-G)	75～100	80～100、90～100、95～100、
N477 (N-Y)	0～8	0、1～5
N512 (N-G)	65～100	70～95、85～95、80～100、85～100、
約 N515 (N-S)	0～25	0、1～10、5～25、15～25
約 Q599 (Asn-Q-Gly)	1～20	2～20、5～15
N628 (N-F)	0～10	0、1～10、2～8
N651 (N-T)	0～3	0、1～3
N663 (N-K)	0～5	0、1～5、2～4
N709 (N-N)	0～25	0、1～22、15～25
N735	0～40	0.1～35、5～50、20～35

【0087】

ある特定の実施形態では、AAVhu68カプシドが、配列番号55のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、少なくとも45%のN残基が、位置N57、N329、N452、及び／又はN512のうちの少なくとも1つで脱アミド化されているカプシドタンパク質を有することを特徴とする。ある特定の実施形態では、これらのN-Gの位置（すなわち、配列番号55のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、N57、N329、N452、及び／又はN512）のうちの1つ以上で、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも90%のN残基が脱アミド化されている。これら及び他の実施形態では、AAVhu68カプシドが、配列番号55のアミノ酸配列の番号付け

に基づいて、位置 N 9 4、N 2 5 3、N 2 7 0、N 3 0 4、N 4 0 9、N 4 7 7、及び／又は Q 5 9 9 のうちの 1 つ以上で、約 1 % ～ 約 2 0 % の N 残基が脱アミド化を有する、タンパク質の集団を有することを更に特徴とする。ある特定の実施形態では、A A V h u 6 8 は、配列番号 5 5 のアミノ酸配列の番号付けに基づいて、位置 N 3 5、N 5 7、N 6 6、N 9 4、N 1 1 3、N 2 5 2、N 2 5 3、Q 2 5 9、N 2 7 0、N 3 0 3、N 3 0 4、N 3 0 5、N 3 1 9、N 3 2 8、N 3 2 9、N 3 3 6、N 4 0 9、N 4 1 0、N 4 5 2、N 4 7 7、N 5 1 5、N 5 9 8、Q 5 9 9、N 6 2 8、N 6 5 1、N 6 6 3、N 7 0 9、N 7 3 5 のうちの 1 つ以上、又はそれらの組み合わせで脱アミド化されている、v p 1 タンパク質、v p 2 タンパク質、及び／又は v p 3 タンパク質の少なくとも亜集団を含む。ある特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、1 つ以上のアミド化アミノ酸を有し得る。

10

【0088】

別の実施形態では、A A V h u 6 8 カプシド及びベクターゲノムを有する組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) が、提供され、(a) A A V h u 6 8 カプシドは、A A V h u 6 8 v p 1 タンパク質の異種集団、A A V h u 6 8 v p 2 タンパク質の異種集団、及び A A V h u 6 8 v p 3 タンパク質の異種集団を含み、異種 A A V h u 6 8 v p 1、A A V h u 6 8 v p 2、及び A A V h u 6 8 v p 3 タンパク質は、質量分析を使用して決定される場合、配列番号 5 5 の N 5 7、N 3 2 9、N 4 5 2、N 5 1 2 のうちの 2 つ以上において、アスパラギン-グリシン対中の少なくとも 2 つのアスパラギン (N) 中の 5 0 % ～ 1 0 0 % の脱アミド化を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸の変化をもたらし、脱アミド化アスパラギンが、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、相互転換するアスパル酸／イソアスパル酸対、又はそれらの組み合わせに脱アミド化され、A A V h u 6 8 カプシドは、

20

配列番号 5 5 の番号付けに基づいて、v p 1 タンパク質の N 5 7 位に位置するアスパラギン-グリシン対中の少なくとも 6 5 % のアスパラギン (N) が、脱アミド化されること、

配列番号 5 5 のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、v p 1 タンパク質、v 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質の N 3 2 9 位でアスパラギン-グリシン対中の少なくとも 7 5 % の N が、脱アミド化されること、

30

配列番号 5 5 のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、v p 1 タンパク質、v 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質の N 4 5 2 位でアスパラギン-グリシン対中の少なくとも 5 0 % の N が、脱アミド化されること、及び／又は

配列番号 5 5 のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、v p 1 タンパク質、v 2 タンパク質、及び v p 3 タンパク質の N 5 1 2 位でアスパラギン-グリシン対中の少なくとも 7 5 % の N が、脱アミド化されること、

A A V h u 6 8 カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、A A V 逆位末端反復配列と、標的細胞中で G L P - 2 融合物の発現を指示する配列と操作可能に連結される、本明細書に記載の G L P - 2 融合物をコードする非 A A V 核酸配列と、を含む、ベクターゲノムのうちの 1 つ以上を有する亜集団を更に含む。

40

【0089】

一実施形態では、r A A V は、s c A A V である。略称「s c」は、自己相補性 (s e l f - c o m p l e m e n t a r y) を指す。「自己相補的 A A V」は、組換え A A V 核酸配列によって担持されるコード領域が、分子内二本鎖 DNA 鑄型を形成するように設計されている発現カセットを有するプラスミド又はベクターを指す。感染時には、第 2 の鎖の細胞媒介性合成を待つのではなく、s c A A V の 2 つの相補的な片割れが会合して、即時の複製及び転写に備えのある 1 つの二本鎖 DNA (d s D N A) ユニットを形成するであろう。例えば、D M M c C a r t y e t a l, “S e l f - c o m p l e m e n t a r y r e c o m b i n a n t a d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s (s c A A V) v e c t o r s p r o m o t e e f f i c i e n t t r a n s

50

duction independently of DNA synthesis”, Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254を参照されたい。自己相補的AAVは、例えば、米国特許第6,596,535号、同第7,125,717号、及び同第7,456,683号に記載されており、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0090】

一実施形態では、本明細書に記載のGLP-2構築物をコードする核酸配列は、任意の好適な遺伝子要素、例えば、裸のDNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、RNA分子（例えば、mRNA）、エピソームなどに操作され、それらは、例えば、パッケージング宿主細胞中でDNA又はRNA、ウイルスベクターを担持するナノ粒子を生成するために、及び／又は対象における宿主細胞への送達のために、その上に担持されるGLP-2配列を宿主細胞へと導入する。一実施形態では、遺伝子要素は、プラスミドである。選択される遺伝子要素は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合を含む任意の好適な方法によって送達され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技法を含む。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)を参照されたい。

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

一実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含むrAAVが、提供され、発現カセットは、CMVプロモーターを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-κBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質（FRAP）のFKBP12-ラパマイシン結合（FRB）ドメイン、GT2A-V1ペプチド、ZFHD1 DNA結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、12XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号13、15、17、19、21、又は23のGLP-2融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含む。別の実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含むrAAVが、提供され、発現カセットは、CMVプロモーターを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-κBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質（FRAP）のFKBP12-ラパマイ

シン結合 (FRB) ドメイン、GT2A__V2 ペプチド、ZFHD1 DNA 結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、12XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号13、15、17、19、21、又は23のGLP-2融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAである。

【0094】

一実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含むrAAVが、提供され、発現カセットは、CB7プロモーター、ニワトリベクターアクチンイントロン、配列番号13、15、17、19、21、又は23の融合タンパク質のコード配列、ウサギグロビンポリA、及び3' ITRを含む。別の実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含むrAAVが、提供され、発現カセットは、CMVプロモーターを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-κBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質 (FRAP) のFKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン、IRES、ZFHD1 DNA 結合ドメイン、3つのFKBPサブユニット、hGHポリA、8XZFHD、最小sIL2プロモーター、配列番号13、15、17、19、21、又は23のGLP-2融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAである。

【0095】

別の実施形態では、2つのベクター誘導系が、提供される。一実施形態では、発現カセットを含むベクターゲノムを含む第1のrAAVが、提供され、発現カセットは、12XZFHD、最小IL2プロモーター、配列番号13、15、17、19、21、又は23のGLP-2融合タンパク質のコード配列、及びウサギベータグロビンポリAを含む。ベクターのパッケージサイズを増加させるために、スタッファ配列が、含まれ得る。第2のrAAVは、発現カセットを含むベクターゲノムを含み、発現カセットは、CMVプロモーターを含むポリヌクレオチド、イントロンを含み、活性化ドメインは、ヒト由来のNF-κBのp65サブユニットからのカルボキシ末端に融合されたヒトFKBP12-ラパマイシン関連タンパク質 (FRAP) のFKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン、IRES、ZFHD1 DNA 結合ドメイン、及びポリAである。

【0096】

一実施形態では、rAAVは、CB7プロモーターを含むポリヌクレオチド、ニワトリベクターアクチンイントロン、配列番号13、15、17、19、21、又は23の融合タンパク質のコード配列、及びウサギグロビンポリAを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットを含むベクターゲノムを含む。

【0097】

発現カセットをAAVウイルス粒子にパッケージするのに必要とされる最小配列は、AAV5' 及び3' ITRであり、それらは、カプシドと同じAAV起源のものであり得るか、又は異なるAAV起源のものであり得る (AAV疑似型を生成するため)。一実施形態では、AAV2からのITR配列、又はその欠失型バージョン (ΔITR) が、利便性のため、及び規制承認を加速させるために使用される。しかしながら、他のAAV供給源からのITRが選択され得る。好ましくは、ITRの供給源は、製造のためにトランスで提供されるRepタンパク質の供給源と同じである。典型的には、AAVベクターのための発現カセットは、AAV 5' ITR、GLP-2融合タンパク質コード配列、及び任意の調節配列、並びにAAV 3' ITRを含む。しかしながら、これらの要素の他の構成も好適であり得る。D配列及び末端分離部位 (trs) が欠失している、5' ITRの短縮バージョン (ΔITRと称される) が記載されている。他の実施形態では、全長AAV 5' 及び3' ITRが使用される。

【0098】

発現カセットをビリオンにパッケージングするために、ITRは、遺伝子と同じ構築物中のシスに必要とされる唯一のAAV構成要素である。一実施形態では、複製 (rep) 及び/又はカプシド (cap) のコード配列は、AAVゲノムから除去され、トランスで供給されるか、又はAAVベクターを生成するためにパッケージング細胞株によって供給

10

20

30

40

50

される。例えば、上述のように、疑似型 AAV は、AAV カプシドの供給源とは異なる供給源からの ITR を含み得る。一実施形態では、キメラ AAV カプシドが、利用され得る。更に他の AAV 成分が、選択され得る。かかる AAV 配列の供給源は、本明細書に記載されており、学術的、商業的、又は公的な供給源（例えば、American Type Culture Collection、Manassas, VA）から単離又は入手され得る。AAV 配列は、文献又はデータベース（例えば、GenBank（登録商標）、PubMed（登録商標）など）で利用可能であるような公開された配列を参照することによって、合成又は他の好適な手段を通して入手され得る。

【0099】

対象に送達するのに好適な AAV ウイルスベクターを生成し、単離するための方法は、当該技術分野で既知である。例えば、米国特許第 7790449 号、米国特許第 7282199 号、WO2003/042397、WO2005/033321、WO2006/110689、及び US7588772 B2 を参照されたい。1つの系では、プロドューサー細胞株は、ITR に隣接する導入遺伝子をコードする構築物、並びに rep 及び cap をコードする構築物（複数可）で一過性にトランスフェクトされる。第2の系では、rep 及び cap を安定的に供給するパッケージング細胞株は、ITR に隣接する導入遺伝子をコードする構築物で一過性にトランスフェクトされる。これらの系の各々では、AAV ビリオンは、ヘルパーアデノウイルス又はヘルペスウイルスへの感染に応答して産生され、rAAV を汚染ウイルスから分離することを必要とする。より最近では、AAV を復元するためにヘルパーウイルスへの感染を必要としない系が開発されており、必要なヘルパー機能（すなわち、アデノウイルス E1、E2a、VA、及び E4、又はヘルペスウイルス UL5、UL8、UL52、及び UL29、並びにヘルペスウイルスポリメラーゼ）もまた、トランスで系によって供給される。これらのより新しい系では、ヘルパー機能は、必要とされるヘルパー機能をコードする構築物での細胞の一過性トランスフェクションによって供給され得るか、又は細胞は、ヘルパー機能をコードする遺伝子を安定的に含むように操作され得、その発現は、転写レベル又は転写後レベルで制御され得る。更に別の系では、ITR に隣接する導入遺伝子及び rep/cap 遺伝子は、バキュロウイルス由来のベクターによる感染によって、昆虫細胞に導入される。これらの産生系に関するレビューについては、概して、例えば、Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929 を参照されたい（その各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される）。これら及び他の AAV 産生系を作製及び使用方法はまた、以下の米国特許に記載されており、これらの各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：5,139,941、5,741,683、6,057,152、6,204,059、6,268,213、6,491,907、6,660,514、6,951,753、7,094,604、7,172,893、7,201,898、7,229,823、及び 7,439,065。一般に、例えば、Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99:119-145、Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10:717-733、及び以下に引用される参考文献（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。本発明の任意の実施形態を構築するために使用される方法は、核酸操作における技術者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技術が挙げられる。例えば、Green and Sambrook et al, Molecular Cloning: A Labor

10

20

30

40

50

atory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照されたい。同様に、rAAV ビリオンを生成する方法は周知であり、好適な方法の選択は、本発明を限定するものではない。例えば、K. Fisher et al., (1993) J. Virol., 70: 520-532 及び米国特許第 5, 478, 745 号を参照されたい。

【0100】

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

10

【0101】

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

20

30

【0102】

ベクターの AAV 配列は、典型的には、シス作用性 5' 及び 3' 逆位末端反復配列を含む（例えば、B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990) を参照されたい）。ITR 配列は、約 145 bp の長さである。好ましくは、ITR をコードする実質的に完全な配列が分子中で使用されるが、これらの配列のある程度の最小限の修飾は許容される。これらの ITR 配列を修飾する能力は、当業者の範囲内である。（例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)；及び K. Fisher et al., J. Virol., 70: 520-532 (1996) を参照されたい）。本発明で用いられるかかる分子の一例は、導入遺伝子を含む「シス作用性」プラスミドであり、選択された導入遺伝子配列及び関連する調節要素は、5' 及び 3' AAV ITR 配列に隣接している。一実施形態では、ITR は、カプシドを供給するのとは異なる AAV からのものである。一実施形態では、AAV 2 からの ITR 配列。

40

50

しかしながら、他の A A V 供給源からの I T R が選択され得る。D 配列及び末端分離部位 (t r s) が欠失している、5' I T R の短縮バージョン (Δ I T R と呼称される) が記載されている。ある特定の実施形態では、ベクターゲノムは、外部 A 要素が欠失している、130 塩基対の短縮 A A V 2 I T R を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、短縮された I T R は、内部 (A') 要素を鋳型として使用して、ベクター D N A 増幅中に 145 塩基対の野生型長に戻されると考えられる。他の実施形態では、全長 A A V 5' 及び 3' I T R が使用される。I T R の供給源が A A V 2 からであり、A A V カプシドが別の A A V 供給源からである場合、得られるベクターは、疑似型と呼称され得る。しかしながら、これらの要素の他の構成も好適であり得る。

【0103】

任意選択的に、本明細書に記載の G L P - 2 構築物は、r A A V 以外のウイルスベクターを介して送達され得る。かかる他のウイルスベクターは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなどを含むが、これらに限定されない、遺伝子療法に好適な任意のウイルスを含み得る。好適には、これらの他のベクターのうちの 1 つが生成される場合、それは、複製欠損ウイルスベクターとして産生される。

【0104】

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

【0105】

本明細書に記載のウイルスベクター構築物を含む組成物も、提供される。本明細書に記載の薬学的組成物は、任意の好適な経路又は異なる経路の組み合わせによって、それを必要とする対象に送達されるように設計される。肝臓への直接送達 (任意選択的に静脈内、肝動脈を介して、又は移植によって)、経口、吸入、鼻腔内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮膚内、及び他の非経口投与経路。本明細書に記載のウイルスベクターは、単一の組成物又は複数の組成物で送達され得る。任意選択的に、2 つ以上の異なる A A V、又は複数のウイルスが送達され得る [例えば、W O 2 0 1 1 / 1 2 6 8 0 8 及び W O 2 0 1 3 / 0 4 9 4 9 3 を参照されたい]。別の実施形態では、複数のウイルスは、異なる複製欠損ウイルス (例えば、A A V 及びアデノウイルス) を含み得る。一実施形態では、投与は、筋肉内である。別の実施形態では、投与は、静脈内である。

【0106】

複製欠損ウイルスは、遺伝子導入及び遺伝子療法用途で使用するための生理学的に許容される担体とともに製剤化することができる。A A V ウイルスベクターの場合、ゲノムコピー (「G C」) の定量化を、製剤中に含有される用量の尺度として使用し得る。当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、本発明の複製欠損ウイルス組成物のゲノムコピー (G C) 数を決定することができる。A A V の G C 数滴定を行うための 1 つの方法は、以下の通りである。精製された A A V ベクター試料は、まず D N A s e で処理され、非カプシド化 A A V ゲノム D N A 又は産生プロセスからの汚染プラスミド D N A を排除する。次いで、ヌクレアーゼ耐性粒子を熱処理に供して、カプシドからゲノムを放出させる。次に、ウイルスゲノムの特定の領域 (通常はポリ A シグナル) を標的とするプライマー / プロンプセットを使用したリアルタイム P C R によって、放出されたゲノムを定量化する。ゲノムコピーを決定するための別の好適な方法は、定量的 P C R (q P C R)、特に最適化

10

20

30

40

50

された qPCR 又はデジタル液滴 PCR である [Lock Martin, et al, Human Gene Therapy Methods. April 2014, 25 (2): 115-125. doi: 10.1089/hgtb.2013.131, 2013 年 12 月 13 日に編集する前にオンラインで公開]。

【0107】

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

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

任意選択的に、本発明の組成物は、rAAV 並びに／又はバリエーション及び担体（複数可）に加えて、防腐剤又は化学的安定剤などの他の従来の薬学的成分を含有し得る。好適な例示的な防腐剤には、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄

、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、及びパラクロロフェノールが含まれる。好適な化学的安定剤には、ゼラチン及びアルブミンが含まれる。

【0111】

本明細書で使用される場合、「担体」は、任意及び全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁物、コロイドなどを含む。薬学的活性物質に対するかかる媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補足活性成分を組成物中に組み込むこともできる。

「薬学的に許容される」という句は、宿主に投与されるときにアレルギー又は類似の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。リポソーム、ナノカプセル、ミクロ粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などのような送達ビヒクルが、本発明の組成物を好適な宿主細胞に導入するために使用され得る。特に、rAAVベクター送達導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、又はナノ粒子などに封入化された送達のいずれかのために製剤化され得る。

10

【0112】

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

20

【0113】

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

30

【0114】

ウイルスベクターの投与量は、主に、治療される状態、患者の年齢、体重、及び健康状態などの要因に依存し、したがって、患者間で異なり得る。例えば、ウイルスベクターの治療上有効なヒト投与量は、概して、約25～約1000マイクロリットル～約100mLの範囲の、（体重が70kgの平均的な対象を治療するために）約 1×10^9 ～ 1×10^{16} ゲノムウイルスベクターの濃度（その範囲内の全ての整数又は分数量を含み、好ましくは、ヒト患者に対して、 1.0×10^{12} GC～ 1.0×10^{13} GC）を含む溶液である。本発明の組成物は、治療される領域のサイズ、使用されるウイルス力価、投与経路、及び本方法の所望の効果に応じて、範囲内の全ての数値を含めて、約0.1μL～約10mLの容量で送達され得る。一実施形態では、容量は、約50μLである。別の実施形態では、容量は、約70μLである。別の実施形態では、容量は、約100μLである。別の実施形態では、容量は、約125μLである。別の実施形態では、容量は、約150μLである。別の実施形態では、容量は、約175μLである。更に別の実施形態では

40

50

、容量は、約 $200\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $250\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $300\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $450\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $500\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $600\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $750\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $850\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $1000\ \mu\text{L}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $1.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $2\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $2.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $3\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $3.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $4\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $5.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $6\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $6.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $7\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $8\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $8.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $9\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $9.5\ \text{mL}$ である。別の実施形態では、容量は、約 $10\ \text{mL}$ である。

10

【0115】

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

【0116】

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

20

【0117】

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

30

【0118】

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

【0119】

ある特定の実施形態では、組成物は、誘導性 GLP-2 アゴニスト構築物を含む rAAV を含む。ある特定の実施形態では、誘導剤又は分子は、ラパマイシン又はラパログである。ある特定の実施形態では、誘導剤は、ラパマイシンであり、rAAV を含む組成物の後に少なくとも1回以上、少なくとも2回以上、少なくとも3回以上投与される。いくつかの実施形態では、ラパマイシンは、少なくとも約 $4 \sim$ 少なくとも約 $40\ \text{nM}$ の用量で投与される。ある特定の実施形態では、誘導剤（すなわち、ラパマイシン）は、少なくとも約 $0.1\ \text{mg}/\text{kg} \sim$ 少なくとも約 $3.0\ \text{mg}/\text{kg}$ の用量で投与される。ある特定の実施形態では、誘導剤（すなわち、ラパマイシン）は、少なくとも約 $0.5\ \text{mg}/\text{kg} \sim$ 少なくとも約 $2.0\ \text{mg}/\text{kg}$ の用量で投与される。

40

【0120】

本明細書に記載のウイルスベクター及び他の構築物は、GLP-2 融合タンパク質構築

50

物を、それを必要とする対象に送達するための、半減期が増加した G L P - 2 を対象に供給するための、及び／又は対象における S B S を治療するための医薬を調製するために使用され得る。したがって、別の態様では、S B S を治療する方法が、提供される。本方法は、本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。一実施形態では、本組成物は、本明細書に記載の G L P - 2 融合タンパク質発現カセットを含むウイルスベクターを含む。

【0121】

本明細書で使用される場合、「治療」又は「治療すること」という用語は、短腸症候群の1つ以上の症状を軽減する目的で、本明細書に記載の1つ以上の化合物又は組成物を対象に投与することを包含すると定義される。したがって、「治療」は、所与の対象において、S B S の進行を低減すること、症状の重症度を低減すること、疾患の症状を除去すること、疾患の進行を遅延させること、又は療法の有効性を増加させること、のうちの1つ以上を含み得る。

【0122】

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

【0123】

治療の経過は、任意選択的に、同じウイルスベクター（例えば、A A V r h 9 1 ベクター）又は異なるウイルスベクター（例えば、A A V r h 9 1 及び A A V 3 B . A R 2 . 1 2）の反復投与を含み得る。本明細書に記載のウイルスベクターを使用して、更に他の組み合わせが選択され得る。任意選択的に、本明細書に記載の組成物は、栄養療法（経腸又は非経口栄養）、薬物、例えば、胃酸を制御するために使用される薬物、下痢を低減させる、又は腸吸収を改善するために使用される薬物、又は G L P - 2 類似体、又は手術を伴うレジメンにおいて組み合わせられ得る。ある特定の実施形態では、A A V ベクター及び併用療法は、本質的に同時に投与される。他の実施形態では、A A V ベクターが、初めに投与される。他の実施形態では、併用療法が、初めに投与される。

【0124】

一実施形態では、組成物は、有効量の G L P - 2 類似体と組み合わせて投与される。テデュグルチド、グレパグルチド、及びアプラグルチドを含むが、これらに限定されない、様々な市販の G L P - 2 製品が、当該技術分野で既知である。

【0125】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の r A A V と G L P - 2 類似体との組み合わせは、ウイルスベクターでの治療前と比較して、対象における G L P - 2 類似体の用量要件を減少させる。かかる用量要件は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、又は90%以上低減され得る。治療する医師は、対象が必要とする G L P - 2 類似体の正しい投与量を決定することができる。例えば、対象は、G L P - 2 類似体又は他の療法を使用して治療され得、治療する医師は、A A V ベクターの投与時に継続し得る。かかる G L P - 2 類似体又は他の併用療法は、その後、必要に応じて、継続、低減、又は中止され得る。

【0126】

一実施形態では、遺伝子療法のための本明細書に記載の発現カセット、ベクターゲノム、r A A V を含む組成物、又は他の組成物は、患者当たり単回用量として送達される。一実施形態では、対象は、治療有効量の本明細書に記載の組成物を送達される。本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、治療目標を達成するために十分な G L P - 2 - F c の量を標的細胞に送達して発現する、発現カセット若しくはベクター、又はその組み合わせの量を指す。治療有効量は、治療する医師によって選択され得るか、又は以前に決定されたガイドラインに基づいて導かれ得る。例えば、テデュグルチドは、1日当たり0.05 mg / kg の初期用量で、皮下で提供され得る。用量は、中等度から重度の腎機能障害を有する対象について、0.025 mg / kg の増分で増加され得る。r A A V は、対象

10

20

30

40

50

に送達され、その後、経口若しくは皮下のテデュグルチド、又は必要に応じて他の薬物を補充して、1日当たり0.05mg/kgの所望の投与量の当量に到達させ得る。

【0127】

ある特定の実施形態では、治療目標は、SBSの症状のうちの1つ以上を緩和又は治療することである。治療有効量は、ヒト患者ではなく、むしろ動物モデルに基づいて決定され得る。

【0128】

本明細書で使用される場合、vpカプシドタンパク質を指すために使用される場合、「異種」という用語又はその任意の文法的な変形は、例えば、異なる修飾アミノ酸配列を有するvp1モノマー（タンパク質）、vp2モノマー（タンパク質）、又はvp3モノマー（タンパク質）を有する、同じではない要素からなる集団を指す。配列番号32は、AAVrh91 vp1タンパク質のコードされたアミノ酸配列を提供する。vp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質（代替的にアイソフォームと称される）に関連して使用される「異種」という用語は、カプシド内のvp1タンパク質、vp2タンパク質、及びvp3タンパク質のアミノ酸配列の違いを指す。AAVカプシドは、予測されたアミノ酸残基の修飾を有する、vp1タンパク質内、vp2タンパク質内、及びvp3タンパク質内に亜集団を含む。これらの亜集団は、最低限、特定の脱アミド化アスパラギン（N又はAsn）残基を含む。例えば、ある特定の亜集団は、アスパラギン-グリシン対に少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの高度に脱アミド化されたアスパラギン（N）位置を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸を更に含み、脱アミド化が、アミノ酸変化及び他の任意選択的な修飾を生じる。

【0129】

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

【0130】

本明細書で使用される場合、rAAVの「ストック」は、rAAVの集団を指す。脱アミド化に起因するカプシドタンパク質の不均一性にもかかわらず、ストック内のrAAVは、同一のベクターゲノムを5つ共有することが予想される。ストックは、例えば、選択されたAAVカプシドタンパク質及び選択された産生系に特徴的な不均一な脱アミド化パターンを有するカプシドを有するrAAVを含み得る。ストックは、単一の産生系から産生され得るか、又は産生系の複数の実行からプールされ得る。本明細書に記載されるものを含むが、これらに限定されない、様々な産生系が選択され得る。本明細書で使用される場合、「GLP-2構築物」、「GLP-2発現構築物」という用語及び同義語は、リーダー及び融合ドメインと組み合わせて本明細書に記載のGLP-2配列を含む。「GLP-2構築物」、「GLP-2発現構築物」という用語及び同義語は、GLP-2融合タンパク質をコードする核酸配列又はその発現産物を指すために使用され得る。

【0131】

核酸配列の文脈における「同一性パーセント（％）」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、又は「同一なパーセント」という用語は、対応するようにアラインメント

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

10

20

【0132】

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

【0133】

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

30

【0134】

アミノ酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、又は「同一なパーセント」という用語は、対応するようにアラインメントさせたときに同じである2つの配列中の残基を指す。同一性パーセントは、タンパク質の全長ポリペプチド、ポリペプチド、約70個のアミノ酸～約100個のアミノ酸、若しくはそのペプチドフラグメント又はシーケンスをコードする対応する核酸配列について容易に決定することができる。好適なアミノ酸フラグメントは、長さが少なくとも約8個のアミノ酸であり得、最大で約150個のアミノ酸であり得る。一般に、2つの異なる配列間の「同一性」、「相同性」、又は「類似性」について言及する場合、「同一性」、「相同性」、又は「類似性」は、「アラインメントされた」配列を参照して決定される。「アラインメントされた」配列又は「アラインメント」とは、複数の核酸配列又はタンパク質（アミノ酸）配列を指し、参照配列と比較して、多くの場合、欠損又は追加塩基又はアミノ酸についての補正を含む。アラインメントは、公的又は商業的に利用可能な様々な多重配列アラインメントプログラムのいずれかを使用して行われる。配列アラインメントプログラムは、アミノ酸配列について利用可能であり、例えば、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及び「Match-Box」プログラムが挙げられる。一般的に、これらのプログラムのい

40

50

ずれかをデフォルト設定で使用するが、当業者は、これらの設定を必要に応じて変更し得る。代替的に、当業者は、参照のアルゴリズム及びプログラムによって提供されるものと少なくとも同じレベルの同一性又はアラインメントを提供する、別のアルゴリズム又はコンピュータプログラムを利用することができる。例えば、J. D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27 (13) : 2682–2690 (1999) を参照されたい。

【0135】

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

10

【0136】

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

20

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

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

30

【0140】

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

【0141】

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

【0142】

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

40

【0143】

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

【実施例】

【0144】

50

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

【0145】

実施例1－GLP－2ペクターの構築

GLP－2アゴニストは、アデノ随伴ウイルス（AAV）を介して発現することが困難である。GLP－2は、通常、グルカゴン前駆体タンパク質から発現され、それは、組織特異的プロテアーゼを必要とし、望まれないタンパク質を産生する。従来の異種シグナルペプチドを使用する発現系は、低発現をもたらす。ユニバーサルプロテアーゼ切断部位を有する異種プロペプチドを使用する発現系は、T細胞の標的となり得る外来タンパク質配列をもたらす。

10

【0146】

より具体的には、いくつかのGLP－2受容体アゴニストアミノ酸配列の1つの上流にリーダー配列を配置し、続いて融合ドメインを配置して、ペクターを構築した。例えば、図3を参照されたい。得られたタンパク質配列を逆翻訳し、続いて、コザックコンセンサス配列、終止コドン、及びクローニング部位を追加した。配列を生成し、誘導性発現系の制御下で、CMVプロモーターを含む発現ペクターにクローニングした。発現構築物は、AAV2 ITRに隣接させた。得られたプラスミドは、pAAV.Z12I.hGLP2.G2.Fc.rBGと呼ばれる。

【0147】

第2の構築物では、配列を生成し、CB7構成的プロモーターを含む発現ペクターにクローニングした。

20

【0148】

実施例2－インビトロでの発現

以下の構築物を、前述のように、トリプルトランスフェクションにより、AAVrh91ペクター中にパッケージングした。

AAVrh91.CB7.CI.hGLP－2－Fc.rBG

AAVrh91.CB7.CI.hGLP－2－SA.rBG

GLP－2－SA融合物を、ペクターでトランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清中で、ヒトトロピンシグナル配列を有する誘導性ヒトGLP－2－SAについて測定した。GLP2－SAは、spyroRuby染色を使用したゲル電気泳動によって特定した。図4A及び図4B。

30

【0149】

実施例3－Rag1KOマウスにおけるパイロット発現

Rag1KO雌マウスを、IM投与経路を介して、ペクターAAVrh91.CB7.CI.hGLP－2－SA.rBG（ 1×10^{11} GC／マウス）又はAAVrh91.CB7.CI.hGLP－2－Fc.rBG（ 1×10^{11} GC／マウス）の注射で処置した。血清を、5マイクロリットルのDPP－IV阻害剤（Millipore）を含む血清分離管中で全血を分離することによって連続的に収集し、上記の活性GLP－2発現及び活性についてアッセイした。0日目にペクターを注射し、56日目にマウスを剖検した。血清GLP－2濃度（nM）を図5Aに示し、Fc融合標準に基づく推定値である。血清発現レベルは、投与後14日目まで増加した。

40

【0150】

小腸の重量を量り、剖検で測定した。小腸の長さ及び重量は、対照動物と比較して有意に増加した（図5B）。加えて、ペクターで処置した腸は、ビヒクルで処置した動物と比較して健全な腸細胞の成長を示す。（図5C）。腸表面積のバイオマーカーである血清シトルリンレベル（uM）を測定した。（図5D）。

【0151】

GLP－2の発現を、アルブミン融合構築物と比較した。Fc融合構築物は、より大きなGLP－2発現を示した（図6A）。GLP.G2.Fc融合物は、hGLP（EC50 = 0.4 nM）と比較して、有意に低い効力（EC50 = 13.6 nM）を示す（図6

50

B)。これらのデータは、GLP-2アゴニストのAAV媒介発現が、短腸症候群において治療的であるべきである腸表面積の実質的かつ持続的な増加を実証することを示す。

【0152】

実施例4-NHPにおける投与量研究

この研究では、非ヒト霊長類（NHP；すなわち、アカゲザル）におけるヒトGLP-2の発現を調査する。図7は、研究の概要を示す。簡潔に、2つのNHPを、 1×10^{13} (1e13) GC/kg (E185NG)の用量及び 5×10^{10} (1e10) GC/kg (BM239H)の用量で筋肉内注射（IM）によってAAVrh91.CB7.CI.hGLP-2-Fc.rBGを投与した。

【0153】

GLP-2の発現及び効力、肝臓酵素、及びシトルリンレベルを測定した。剖検は、60日目に行う。図8Aは、GLP-2-Fc融合タンパク質の血漿レベルを示す。図8Bは、腸表面積のバイオマーカーである血清シトルリンを示す。図8Cは、NHP血清中の抗GLP-2-Fc抗体の1:100の希釈での検出を示す。GLP-2-Fc融合のAAV媒介発現は、抗GLP-2-Fc抗体がその発現を低減させ、短腸症候群に対するその治療有効性を実証するまで、高用量での腸表面積の実質的な増加を実証する。

【0154】

実施例5-Rag1KOマウスにおける長期有効性及び安全性研究

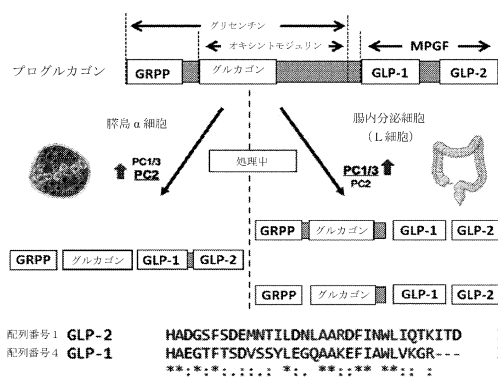
Rag1KO雌マウスを、IM投与経路を介して、 1×10^{10} GC/マウス、 3×10^{10} GC/マウス、又は 1×10^{11} GC/マウスの投与量でベクターAAVrh91.CB7.CI.hGLP-2-Fc.rBGの注射で処置した。研究設計を図9Aに示す。hGLP2-Fcレベル及び体重を、研究を通して測定した。最も高いベクター投与量は、最も高い血清GLP2レベルを示した（図9B）が、体重は全ての群の間で相対的に一貫しており、ビヒクルは最も低い傾向を示した（図9C、D）。28日目の剖検では、小腸の長さ及び重量を測定した。SI長は、ビヒクルと比較して投与量増加とともにわずかに増加したが（図9E）、SI重量は、2つの最高投与量群で有意に増加した（図9F）。

【0155】

本明細書で引用される全ての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。2022年3月3日に出願された米国仮特許出願第63/316,219号は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、特定の実施形態を参照して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができることが理解されよう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲の範囲に収まることが意図される。

【図面】

【図1】



【図2】

表1
hGLP-2及びGLP-2類似体のアミノ酸配列及び分子量
天然hGLP-2に対するアミノ酸置換を、太字の文字で示す

ベクター	Mol. wt.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
配列番号1 hGLP-2	3766	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L
配列番号2 グルカゴン	4316	H	G	E	G	I	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L
配列番号3 テデュグルチド	3752	H	G	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L
配列番号1 hGLP-2	3766	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	
配列番号2 グルカゴン	4316	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	OH
配列番号3 テデュグルチド	3752	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	OH

1、ローファンネルアミン。

10

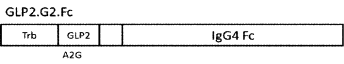
20

30

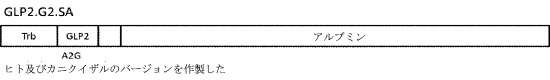
40

50

【図 3 A】



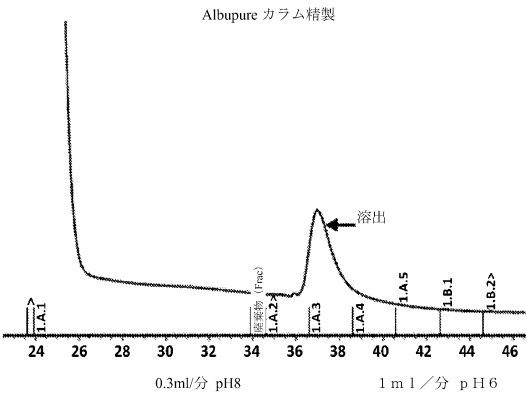
【図 3 B】



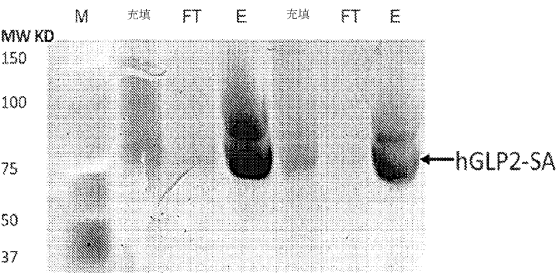
【図 3 C】

G L P 2 は、種間で同一ではない			
ヒト	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	33	配列番号 1
カニクイザル	HADGSFSDEMNTVLDNLAARDFINWLIQTKITD	33	配列番号 5
マウス	HADGSFSDEMSTILDNLAARDFINWLIQTKITD	33	配列番号 6
*****.*:*****:*****			

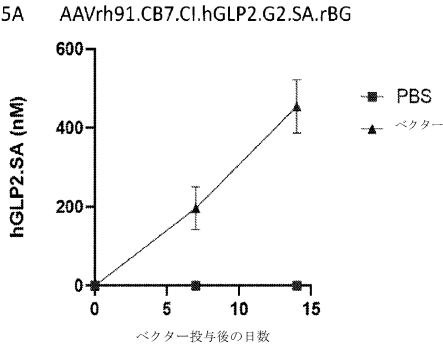
【図 4 A】



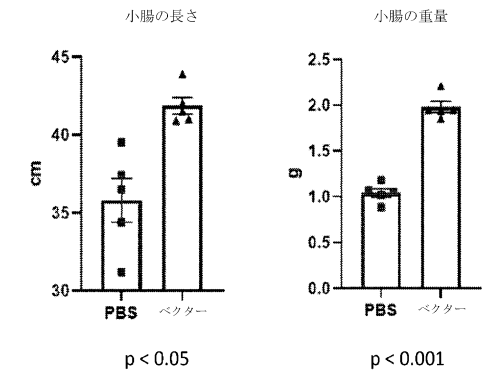
【図 4 B】



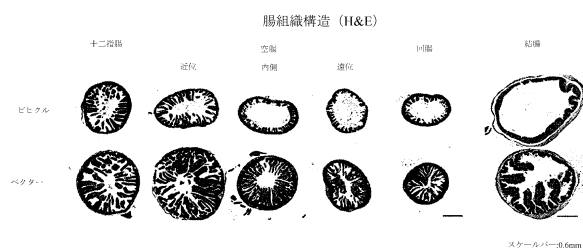
【図 5 A】



【図 5 B】

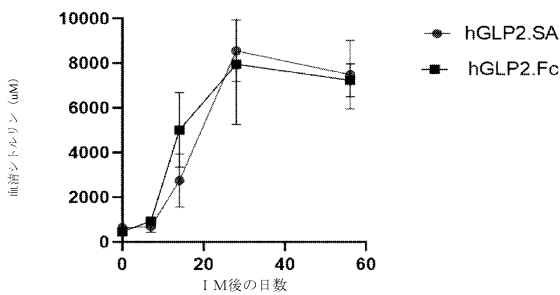


【図 5 C】

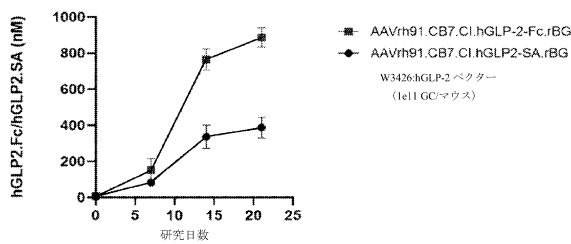


10

【図 5 D】



【図 6 A】



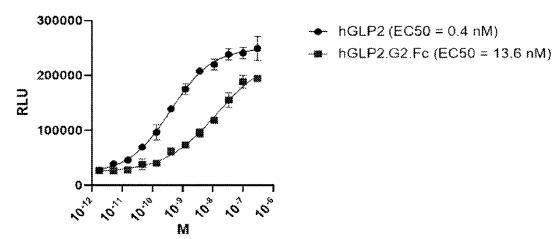
20

30

40

50

【図 6 B】



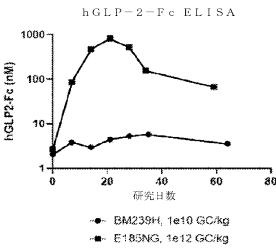
【図 7】

NHP 研究設計		
NHP	1	2
ベクター	AAVrh91.CB7.Cl.hGLP-2-Fc.rBG	
ROA	IM	
用量 (GC/kg)	1.00E+12	1.00E+10
出血	0、7、14、21、28、60 日目	
読み出し	TG 発現及び効力、ADA、バイオマーカー (シトルリン*)	
剖検	60 日目 (腸組織構造**)	

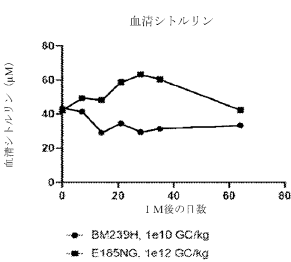
*:血漿／血清シトルリンは、腸細胞質量と相関する

**:.絨毛の長さのH&E染色 (GLP-1-Fc 研究からのNHPを対照として使用する)

【図 8 A】



【図 8 B】



10

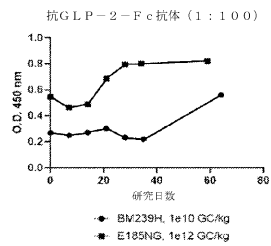
20

30

40

50

【図 8 C】

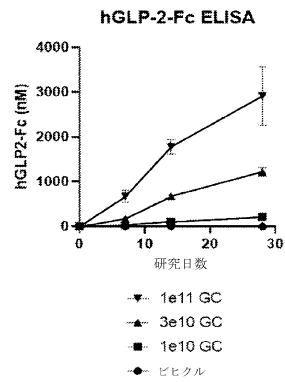


【図 9 A】

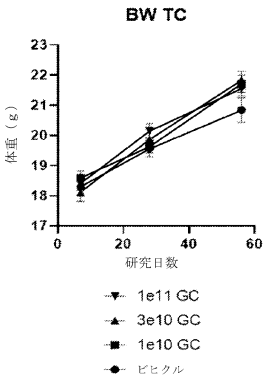
群	用量 (G C / 動物)	剖検日数			
		1 カ月	3 カ月	6 カ月	12 カ月
1	0	5	5	10	10
2	1e10	5	5	10	10
3	3e10	5	5	10	10
4	1e11	5	5	10	10

10

【図 9 B】

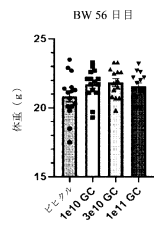


【図 9 C】

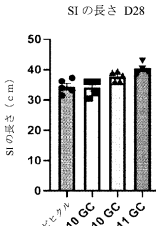


20

【図 9 D】



【図 9 E】

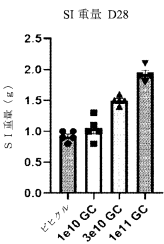


30

40

50

【図 9 F】



【配列表】

2025509193000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/63681

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C07K 14/605, C07K 19/00, A61K 38/26, A61K 35/761 (2023.01) ADD. CPC - INV. C07K 14/605, C07K 19/00, A61K 38/26, A61K 35/761 ADD. C07K 2319/30, C07K 2319/70 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.
A	US 2020/0199192 A1 (SUN et al.) 25 June 2020 (25.06.2020) para [0011], [0041]	1, 3
A	US 2019/0241839 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORPORATION) 8 August 2019 (08.08.2019) para [0034], [0036]-[0037]; Table 3; SEQ ID NO: 15	1, 3
A	US 2007/0212355 A1 (BAKER et al.) 13 September 2007 (13.09.2007) abstract; para [0026]; SEQ ID NO: 5	1, 3
A	US 2014/0199272 A1 (CHIORINI et al.) 17 July 2014 (17.07.2014) para [0066], [0069]-[0070], [0075]	3
☐ 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 19 July 2023		Date of mailing of the international search report AUG 04 2023
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 Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/83681

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/63681

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.: 2, 4-23, 25-28
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Continued on Supplemental Page

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.:
1, 3, limited to fusion protein comprising a GLP-2 protein and IgG4 Fc, encoded by SEQ ID NO: 13

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/63681

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group I+: Claims 1 and 3, directed to a composition comprising a nucleic acid encoding a fusion protein. The composition will be searched to the extent that the fusion protein encompasses a GLP-2 protein and an IgG4 Fc fusion encoded by SEQ ID NO: 13. The first named invention was determined based on the first SEQ ID NO listed in claim 1 and the instant specification pg 11, ln 9-13. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1 and 3 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a fusion protein comprising a GLP-2 protein and a IgG4 Fc encoded by SEQ ID NO: 13. Additional fusion proteins and associated SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected fusion proteins and associated SEQ ID NOs. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be where the fusion protein encompasses a GLP-2 protein and albumin encoded by SEQ ID NO: 15 (claims 1, 3).

Group II: Claim 24, directed to a method of treating a subject having a metabolic disease.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I+ requires a composition comprising a nucleic acid encoding a fusion protein according to a specific sequence, not required by Groups II.

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific fusion protein member and nucleotide sequence recited therein. Each invention requires a polynucleotide sequence not required by any of the other inventions.

Group II requires a method of treating a subject having a metabolic disease, comprising delivering to the subject a recombinant adeno-associated virus (rAAV) having an AAV capsid from adeno-associated virus rh91 or hu68, not required by Groups I+.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I+ and II is a recombinant adeno-associated virus (rAAV) having an AAV capsid from adeno-associated virus rh91 or hu68, and a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats (ITRs), a sequence encoding a fusion protein comprising a GLP-2 analog and a human IgG4 Fc, and regulatory sequences which direct expression of the fusion protein.

Additionally, the features shared by Groups I+ are:

a composition comprising a nucleic acid comprising a sequence encoding a fusion protein comprising a GLP-2 protein.

a composition comprising a viral vector comprising: (a) an adeno-associated virus (AAV) capsid, and (b) a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats (ITRs), the coding sequence for comprising a GLP-2 protein, and regulatory sequences which direct expression of the fusion protein.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2019/0241639 A1 to Zhejiang Doer Biologics Corporation (hereinafter "ZDBC") in view of US 2014/0198272 A1 to Chlorini et al. (hereinafter "Chlorini").

Continued on Next Supplemental Page

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/63681

Continued from Previous Supplemental Page

ZDBC discloses a composition comprising a vector comprising a nucleic acid comprising a sequence encoding a fusion protein comprising a GLP-2 protein and IgG4-Fc fragment, and a regulatory sequence directing expression (para [0034] - "In GLP-2 MIMETIBODY, there is also a flexible G/S peptide linker between an IgG4-Fc fragment and GLP-2 analog moiety."; para [0036]-[0037] - "In one aspect of the invention, there is provided a nucleotide sequence encoding the said fusion protein. In one aspect of the present invention, there is provided a recombinant expression vector carrying a gene coding for the fusion protein according to the invention. At present, the commonly used recombinant expression vectors include, but are not limited to, eukaryotic expression vectors, such as pPIC9, pPIC9K, pPICZalpha A and pcDNA3.1, prokaryotic expression vectors, such as pET41a and pET32a, and other self-constructed plasmids having components required for expressing desired exogenous recombinant proteins, all of which can be used for the expression of the GLP-2 mutants according to the invention."; Note, the eukaryotic expression vectors listed comprise regulatory elements used for expression of an Insert).

ZDBC does not disclose a viral vector comprising: (a) an adeno-associated virus (AAV) capsid, and (b) a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats (ITRs). Chlorini discloses GLP1 fusion proteins (para [0066] - "One embodiment is a nucleic acid molecule that encodes a GLP-1 analog fusion protein that comprises a fusion segment joined to a GLP-1 analog protein domain"), and a viral vector comprising: (a) an adeno-associated virus (AAV) capsid, and (b) a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats (ITRs), the coding sequence for a fusion protein, and regulatory sequences which direct expression of the fusion protein (para [0068]-[0070] - "In An AAV vector is a recombinant nucleic acid molecule in which at least a portion of the AAV genome is replaced by a heterologous nucleic acid molecule. It is possible to replace about 4.7 kilobases (kb) of AAV genome DNA, e.g., by removing the viral replication and capsid genes. Often the heterologous nucleic acid molecule is simply flanked by AAV inverted terminal repeats (ITRs) on each terminus. The ITRs serve as origins of replication and contain cis acting elements required for rescue, integration, excision from cloning vectors, and packaging. Such vectors typically also include a promoter operatively linked to the heterologous nucleic acid molecule to control expression."; para [0075] - "One embodiment is an AAV vector that comprises AAV ITRs and a CMV promoter operatively linked to a nucleic acid molecule encoding an extendin-4 protein of the embodiments. One embodiment is an AAV vector that comprises AAV ITRs and a CMV promoter operatively linked to a nucleic acid molecule encoding an extendin-4 fusion protein of the embodiments.").

Since ZDBC discloses a vector encoding a fusion protein comprising a GLP-2 protein and IgG4-Fc fragment, and Chlorini discloses a GLP-1 fusion protein and where an AAV viral vector may comprise an AAV capsid comprising a vector genome encoding a fusion protein, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to modify the composition, as disclosed by ZDBC, to include or instead use a vector genome packaged in an AAV capsid, said vector genome comprising AAV ITRs, the coding sequence for comprising a GLP-2-IgG4Fc fusion protein, and regulatory sequences which direct expression of the fusion protein, since this would simply allow packaging the fusion protein of ZDBC into a particular viral vector, such as an AAV for use in gene therapy, thereby providing any improved performance or utility and therefore any improved value of the vector composition of ZDBC.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)

Claims 2, 4-23, 25-28 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note:

Claim 3 is objected to for lack of antecedent basis. As drafted, claim 3 is an independent claim yet recites "The composition comprising". For the purposes of this application, claim 3 is construed as instead reciting "A composition comprising".

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/16 (2006.01)	C 1 2 N	15/16	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. L A B R A S O L

2. T W E E N

7 ボルチモア・ウェストラファイエットアヴェニュー 2 0 0

(72)発明者 堀内 真

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

F ターム (参考)

4C076 AA12 BB13 BB15 CC16 CC21 FF70
4C084 AA13 MA17 MA66 NA14 ZA66 ZC21 ZC35
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA17 MA66 NA14 ZA66 ZC21
ZC35
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA17 MA66 NA14 ZA66 ZC21 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA30 DA70 DA75
EA20 FA74