

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、

少なくとも 1 つのフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸配列であって、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、表 1 A に列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも 90 % の同一性を有する配列から選択され、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、コドン最適化され、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) 間に位置する、少なくとも 1 つの核酸配列と、

前記少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする最も少ない 1 つのヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、前記プロモーターが、VD プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン (hAAT) プロモーター (hAAT (979) プロモーター及び CpG min_hAAT プロモーターを含む)、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、プロモーターと、を含む、c e DNA ベクター。

10

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする前記少なくとも 1 つの核酸配列が、表 1 A に示される配列のうちのいずれかと少なくとも 95 % の同一性を有する配列から選択される、請求項 1 に記載の c e DNA ベクター。

【請求項 3】

閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、

少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が、表 1 A に列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも 95 % の同一性を有する配列から選択され、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) 間に位置する、核酸配列と、

20

前記少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、前記プロモーターが、VD プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、プロモーターと、を含む、c e DNA ベクター。

【請求項 4】

閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、

少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が、表 1 A に列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも 96 % の同一性を有する配列から選択され、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) 間に位置する、核酸配列と、

30

前記少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、前記プロモーターが、VD プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、プロモーターと、を含む、c e DNA ベクター。

【請求項 5】

閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、

少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が、表 1 A に列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも 97 % の同一性を有する配列から選択され、前記少なくとも 1 つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) 間に位置する、核酸配列と、

40

前記少なくとも 1 つの PAH タンパク質をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、前記プロモーターが、VD プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、プロモーターと、を含む、c e DNA ベクター。

【請求項 6】

閉端 DNA (c e DNA) ベクターであって、

50

少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも98%の同一性を有する配列から選択され、前記少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復（ITR）間に位置する、核酸配列と、

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、前記プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター、及びトランスサイレチン（TTR）肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、プロモーターと、を含む、ceDNAベクター。

【請求項7】

閉端DNA（ceDNA）ベクターであって、

少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも99%の同一性を有する配列から選択され、前記少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復（ITR）間に位置する、核酸配列と、

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、前記プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター、及びトランスサイレチン（TTR）肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される、プロモーターと、を含む、ceDNAベクター。

【請求項8】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号382として示される配列と少なくとも98%の同一性を有する配列である、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項9】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号382として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項10】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号382として示される、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項11】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号425として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項12】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号425として示される、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項13】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号431として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項14】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号431として示される、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

【請求項15】

前記少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする前記少なくとも1つの核酸配列が、配列番号435として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である、請求項1～7のいずれか一項に記載のceDNAベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つの P A H タンパク質をコードする前記少なくとも 1 つの核酸配列が、配列番号 435 として示される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 17】

前記プロモーターが、配列番号 191 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 18】

前記プロモーターが、配列番号 443 と少なくとも 98 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

10

【請求項 19】

前記プロモーターが、配列番号 444 と少なくとも 99 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 20】

前記プロモーターが、配列番号 445 と少なくとも 99 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 21】

前記プロモーターが、配列番号 446 と少なくとも 99 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 22】

前記プロモーターが、配列番号 447 と少なくとも 96 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

20

【請求項 23】

前記 c e D N A ベクターが、エンハンサーを更に含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 24】

前記エンハンサーが、セルピンエンハンサー、3×H N F 1－4 __ P r o E n h __ 10mer、及び 5×H N F 1 __ P r o E n h __ 10mer からなる群から選択される、請求項 23 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 25】

前記エンハンサーが、配列番号 450 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 23 に記載の c e D N A ベクター。

30

【請求項 26】

前記エンハンサーが、配列番号 586 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 23 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 27】

前記エンハンサーが、配列番号 587 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 23 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 28】

前記プロモーターが、配列番号 462 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

40

【請求項 29】

前記プロモーターが、配列番号 467 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 30】

前記プロモーターが、配列番号 470 と少なくとも 85 % の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

50

【請求項 3 1】

前記プロモーターが、配列番号 4 7 0 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 2】

前記プロモーターが、配列番号 4 7 0 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 3】

前記 c e D N A ベクターが、1 つ以上のイントロンを更に含む、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 4】

前記 1 つ以上のイントロンが、マウス微小ウイルス (M V M) である、請求項 3 3 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 5】

前記 c e D N A ベクターが、3' 非翻訳領域 (3' U T R) を含む、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 6】

前記 c e D N A ベクターが、少なくとも 1 つのポリ A 配列を含む、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 7】

前記 V D プロモーターが、S E R P エンハンサーを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 8】

前記 V D プロモーターが、3 × S E R P エンハンサーを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 3 9】

前記プロモーターが、T T R 肝臓プロモーターであり、前記 c e D N A が、M V M イントロンを更に含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 4 0】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 1 9 4、配列番号 1 9 5、配列番号 1 9 6、配列番号 1 9 7、配列番号 1 9 8、配列番号 1 9 9、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 1、配列番号 2 0 2、配列番号 2 0 3、配列番号 2 0 4、配列番号 2 0 5、配列番号 2 0 6、配列番号 2 0 7、配列番号 2 0 8、配列番号 2 0 9、配列番号 2 1 0、配列番号 2 1 1、配列番号 2 1 2、配列番号 2 1 3、配列番号 5 4 1、配列番号 5 4 2、配列番号 5 4 3、配列番号 5 4 4、配列番号 5 4 5、配列番号 5 4 6、配列番号 5 4 7、配列番号 5 4 8、配列番号 5 4 9、配列番号 5 5 0、配列番号 5 5 1、配列番号 5 5 2、配列番号 5 5 3、配列番号 5 5 4、配列番号 5 5 5、配列番号 5 5 6、配列番号 5 5 7、配列番号 5 5 8、配列番号 5 5 9、配列番号 5 6 0、配列番号 5 6 1、配列番号 5 6 2、配列番号 5 6 3、配列番号 5 6 4、配列番号 5 6 5、配列番号 5 6 6、配列番号 5 6 7、配列番号 5 7 0、配列番号 5 7 1、配列番号 5 7 2、配列番号 5 7 3、配列番号 5 7 4、配列番号 5 7 5、配列番号 5 7 6、配列番号 5 7 7、配列番号 5 7 8、配列番号 5 7 9、配列番号 5 8 0、配列番号 5 8 1、配列番号 5 8 2、配列番号 5 8 3、及び配列番号 5 8 4 からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である核酸配列を含む、請求項 1 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 4 1】

少なくとも 1 つの核酸配列が、P A H の c D N A である、請求項 1 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 4 2】

少なくとも 1 つの I T R が、機能的末端分離部位 (T R S) 及び R e p 結合部位を含む

10

20

30

40

50

、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 43】

前記 I T R の一方又は両方が、パルボウイルス、ディペンドウイルス、及びアデノ随伴ウイルス (A A V) から選択されるウイルスに由来する、請求項 1～42 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 44】

前記隣接する I T R が、対称又は非対称である、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 45】

前記隣接する I T R が、対称又は実質的に対称である、請求項 44 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 46】

前記隣接する I T R が、非対称である、請求項 45 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 47】

前記 I T R の一方若しくは両方が野生型であるか、又は前記 I T R の両方が野生型である、請求項 1～46 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 48】

前記 I T R の両方が、同じ A A V の野生型である、請求項 1～47 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 49】

前記 I T R の両方が、A A V 2 の野生型である、請求項 48 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 50】

前記隣接する I T R が、異なるウイルス血清型に由来する、請求項 1～49 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 51】

前記隣接する I T R が、表 2 に示されるウイルス血清型の対に由来する、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 52】

前記 I T R の一方又は両方が、表 3、表 5 A、表 5 B、又は表 6 の配列から選択される配列を含む、請求項 1～51 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 53】

前記 I T R の少なくとも一方が、野生型 A A V I T R 配列から、前記 I T R の全体的な三次元立体構造に影響を与える欠失、付加、又は置換によって変更されている、請求項 1～52 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 54】

前記 I T R の一方又は両方が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、及び A A V 12 から選択される A A V 血清型に由来する、請求項 1～53 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 55】

前記 I T R の一方又は両方が、合成である、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 56】

前記 I T R の一方若しくは両方が野生型 I T R でないか、又は前記 I T R の両方が野生型でない、請求項 1～55 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 57】

前記 I T R の一方又は両方が、A、A'、B、B'、C、C'、D、及び D' から選択される I T R 領域のうちの少なくとも 1 つにおける欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1～56 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 58】

前記欠失、挿入、及び／又は置換が、前記 A、A'、B、B'、C、又は C' 領域によって通常形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、請求項 57 に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 59】

前記 I T R の一方又は両方が、前記 B 及び B' 領域によって通常形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1～58 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 60】

前記 I T R の一方又は両方が、前記 C 及び C' 領域によって通常形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1～59 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

10

【請求項 61】

前記 I T R の一方又は両方が、前記 B 及び B' 領域によって通常形成されるステムループ構造の一部、並びに／又は前記 C 及び C' 領域によって通常形成されるステムループ構造の一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている、請求項 1～60 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 62】

前記 I T R の一方又は両方が、通常、前記 B 及び B' 領域によって形成される第 1 のステムループ構造と、前記 C 及び C' 領域によって形成される第 2 のステムループ構造と、を含む領域に、単一のステムループ構造を含む、請求項 1～61 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

20

【請求項 63】

前記 I T R の一方又は両方が、通常、前記 B 及び B' 領域によって形成される第 1 のステムループ構造と、前記 C 及び C' 領域によって形成される第 2 のステムループ構造と、を含む領域に、単一のステム及び 2 つのループを含む、請求項 1～62 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 64】

前記 I T R の一方又は両方が、通常、前記 B 及び B' 領域によって形成される第 1 のステムループ構造と、前記 C 及び C' 領域によって形成される第 2 のステムループ構造と、を含む領域に、単一のステム及び単一のループを含む、請求項 1～63 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

30

【請求項 65】

両方の I T R が、前記 I T R が互いに対して反転されたときに全体的な三次元対称性をもたらす様式で変更されている、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 66】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、又は配列番号 386 と少なくとも 90% 同一である核酸配列を含む、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

40

【請求項 67】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、又は配列番号 386 と少なくとも 95% 同一である核酸配列を含む、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 68】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、又は配列番号 386 と少なくとも 96% 同一である核酸配列を含む、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 69】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列

50

番号 385、又は配列番号 386 と少なくとも 97% 同一である核酸配列を含む、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 70】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、又は配列番号 386 と少なくとも 98% 同一である核酸配列を含む、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 71】

前記 c e D N A ベクターが、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、又は配列番号 386 と少なくとも 99% 同一である核酸配列を含む、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター。

【請求項 72】

細胞において P A H タンパク質を発現する方法であって、前記細胞を請求項 1～71 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクターと接触させることを含む、方法。

【請求項 73】

前記細胞が、光受容細胞又は網膜色素上皮（R P E）細胞である、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記細胞が、インビトロ又はインビボにある、請求項 72 又は 73 に記載の方法。

【請求項 75】

フェニルケトン尿症（P K U）を有する対象を治療する方法であって、請求項 1～71 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクターを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 76】

少なくとも 1 つの P A H タンパク質をコードする前記最も少ない 1 つの核酸配列が、表 1 A に示される配列のうちのいずれかと少なくとも 90% の同一性を有する配列から選択される、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記対象が、投与前の前記対象における血清フェニルアラニンのレベルと比較して、血清フェニルアラニンのレベルの少なくとも約 50% の減少を呈する、請求項 72～76 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

前記対象が、投与前の P A H 活性のレベルと比較して、投与後の P A H 活性の少なくとも約 10% の増加を呈する、請求項 72～77 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

前記 c e D N A ベクターが、脂質ナノ粒子中に製剤化される、請求項 72～78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

前記 c e D N A ベクターが、静脈内投与される、請求項 72～79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

前記 c e D N A ベクターが、筋肉内投与される、請求項 72～79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

前記 c e D N A ベクターが、注入によって投与される、請求項 72～79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】

請求項 1～71 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクターを含む、医薬組成物。

【請求項 84】

請求項 1～71 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター及び脂質を含む、組成物。

【請求項 85】

前記脂質が、脂質ナノ粒子（L N P）である、請求項 84 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 86】

請求項 1～71 のいずれか一項に記載の c e D N A ベクター、請求項 83 に記載の医薬組成物、又は請求項 84 若しくは 85 に記載の組成物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2020年9月16日に出願された米国仮出願第63／078,954号に対する優先権を主張し、その全体の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

(配列表)

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、配列表を含む。2021年9月16日に作成された当該ASCIIコピーは、131698-08120_SL.txtという名前が付けられ、サイズが633,329バイトである。

【0003】

(発明の分野)

本開示は、対象又は細胞において導入遺伝子又は単離されたポリヌクレオチドを発現させるための非ウイルス性ベクターを含む、遺伝子療法の分野に関する。本開示はまた、ポリヌクレオチドを含む核酸構築物、プロモーター、ベクター、及び宿主細胞、並びに外因性DNA配列を標的細胞、組織、器官、又は生物に送達する方法に関する。例えば、本開示は、治療を必要とする対象の細胞又は組織においてフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)を発現させることによって疾患を治療するために、非ウイルス性閉端DNA(closed-ended DNA、ceDNA)ベクターを使用してPAHを発現させるための方法を提供する。

20

【背景技術】

【0004】

遺伝子療法は、遺伝子発現プロファイルにおける異常によって引き起こされる遺伝子変異又は後天性疾患のいずれかを罹患している患者についての臨床転帰を向上することを目的とする。遺伝子療法は、障害、疾患、悪性腫瘍などをもたらす得る欠陥遺伝子又は異常な調節若しくは発現、例えば、過小発現若しくは過剰発現に起因する医学的状態の治療又は予防を含む。例えば、欠陥遺伝子によって引き起こされる疾患又は障害は、修復遺伝物質の患者への送達によって治療、予防、若しくは改善され得るか、又は患者の中で遺伝物質の治療的発現をもたらす、例えば、患者に対する修復遺伝物質を用いて欠陥遺伝子を改変若しくはサイレンシングすることによって治療、予防、若しくは改善され得る。

30

【0005】

遺伝子療法の基礎は、転写カセットに活性遺伝子産物(導入遺伝子と称される場合がある)を供給することであり、例えば、正の機能獲得効果、負の機能喪失効果、又は別の結果をもたらす得る。そのような結果は、抗体、機能的酵素、又は融合タンパク質などの治療用タンパク質の発現に起因し得る。遺伝子療法を使用して、他の因子によって引き起こされる疾患又は悪性腫瘍を治療することもできる。ヒト単一遺伝障害は、標的細胞への正常遺伝子の送達及び発現によって治療され得る。患者の標的細胞中の修復遺伝子の送達及び発現は、操作されたウイルス及びウイルス遺伝子送達ベクターの使用を含む、多くの方法を介して実行され得る。利用可能な多くのウイルス由来ベクター(例えば、組換えレトロウイルス、組換えレンチウイルス、組換えアデノウイルスなど)の中で、組換えアデノ随伴ウイルス(recombinant adeno-associated virus、rAAV)は、遺伝子療法において多用途ベクターとして人気を集めている。

40

【0006】

アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated viruses、AAV)は、Parvovir

50

i d a e 科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス属を構成する。A A V に由来するベクター（すなわち、組換え A A V (r A V V) 又は A A V ベクター）は、(i) 筋細胞及びニューロンを含む多種多様な非分裂及び分裂細胞型に感染する（形質導入すること）ができるので、遺伝物質を送達するのに魅力的であり、(i i) それらはウイルス構造遺伝子を欠き、それによって、ウイルス感染に対する宿主細胞応答（例えば、インターフェロン媒介応答）を減少させ、(i i i) 野生型ウイルスは、ヒトにおいて非病的であると考えられ、(i v) 宿主細胞ゲノムに組み込むことができる野生型 A A V とは対照的に、複製欠損 A A V ベクターは r e p 遺伝子を欠き、一般にエピソームとして存続するし、したがって、挿入変異誘発又は遺伝毒性のリスクを制限し、及び (v) 他のベクター系と比較して、A A V ベクターは一般に免疫原が比較的弱いと考えられ、したがって、有意な免疫応答を誘発せず (i i を参照)、したがって、ベクター D N A の持続性及び潜在的に治療用導入遺伝子の長期発現を得る。

10

【 0 0 0 7 】

しかしながら、A A V 粒子を遺伝子送達ベクターとして使用することには、いくつかの重大な欠陥が存在する。r A A V に関連する 1 つの重大な欠点は、約 4 . 5 k b の異種 D N A の制限されたウイルスパッケージング能力であり (D o n g e t a l . , 1 9 9 6 , A t h a n a s o p o u l o s e t a l . , 2 0 0 4 , L a i e t a l . , 2 0 1 0) 、結果として、A A V ベクターの使用は、1 5 0 , 0 0 0 D a 未満のタンパク質コード能力に制限されている。第 2 の欠点は、集団における野生型 A A V 感染の流行の結果として、r A A V 遺伝子療法候補が、患者からベクターを排除する中和抗体の存在についてスクリーニングされる必要があることである。第 3 の欠点は、初回治療から除外されなかった患者への再投与を防ぐカプシド免疫原性に関する。患者における免疫系は、「ブースター」ショットとして有効に作用するベクターに応答して、将来の治療を妨げる高力価抗 A A V 抗体を生成する免疫系を刺激し得る。いくつかの最近の報告は、高用量状況における免疫原性との関係を示している。一本鎖 A A V D N A が異種遺伝子発現前に二本鎖 D N A に変換されなければならないことを考えると、別の顕著な欠点は、A A V 媒介性遺伝子発現の始まりが比較的遅いことである。

20

【 0 0 0 8 】

追加的に、カプシドを有する従来の A A V ビリオンは、A A V ゲノム、r e p 遺伝子、及び c a p 遺伝子を含有するプラスミドを導入することによって産生される (G r i m m e t a l . , 1 9 9 8) 。しかしながら、そのようなカプシド化 A A V ウイルスベクターは、ある特定の細胞及び組織型を非効率的に形質導入し、カプシドはまた、免疫反応を誘導することもわかった。

30

【 0 0 0 9 】

したがって、遺伝子療法のためのアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターの使用は、(患者免疫反応に起因する) 患者への単回投与、最小ウイルスパッケージング能力 (約 4 . 5 k b) に起因する A A V ベクター中の送達に好適な導入遺伝子遺伝物質の制限された範囲、及び遅い A A V 媒介性遺伝子発現に起因して制限される。

【 0 0 1 0 】

フェニルケトン尿症 (P K U) は、P A H 遺伝子の変異によって引き起こされる、まれな遺伝性の先天性代謝異常症である。フェニルケトン尿症 (P K U) は、アミノ酸であるフェニルアラニンの代謝の低下をもたらす。未治療の P K U は、知的障害、発作、行動の問題、及び精神的障害につながり得る。また、かび臭い匂い及び肌の色が薄くなる場合がある。P K U の治療が不十分な母親から生まれた乳児は、心臓の問題、小さな頭部、及び低出生体重を有し得る。P K U は、P A H 遺伝子の変異によるものであり、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ (P A H) の低いレベルをもたらす、すなわち、P K U を有する対象は、P A H に変異があり、その酵素活性が不足する。P K U は常染色体劣性であり、状態が発達するためには遺伝子の両方のコピーが変異している必要があることを意味する。任意の酵素機能が残っているかどうかに応じて、古典的 P K U 及びバリエーション P K U の 2 つの主要なタイプがある。変異した P A H 遺伝子のコピーが 1 つある人には、典型的には

40

50

、症状はない。

【0011】

PAHは通常肝臓で発現される酵素であり、食事由来のフェニルアラニン（Phe）を神経伝達物質の産生に関与するアミノ酸であるチロシンに代謝するために必要である。PAHは、フェニルアラニンのチロシンへのヒドロキシ化を触媒する。欠陥PAH酵素は、潜在的に毒性のあるレベルまで食事由来のフェニルアラニンの蓄積をもたらす。

【0012】

PKUは、血清中Pheレベルの上昇をもたらす酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）の単一遺伝子欠損によって引き起こされ得る。PAHは、脊椎動物においてPheをチロシンに変換する。PAHがない場合、Pheを除去する唯一の他の機序は、タンパク質合成と、アラニン側鎖の脱アミノ化及び酸化的脱炭酸を伴うわずかな分解経路であり、これにより、PKU患者の尿に見られる特徴的なフェニルラクテート及びフェニルアセテートが生成される。残念ながら、典型的な食事には、PAHがない場合に除去され得るよりも多くのPheが含まれる。結果として生じるPKU患者のPheの蓄積は、異常な脳の発達及び重度の精神遅滞を含むいくつかの症状につながる。（Kaufman, Proc Nat'l Acad Sci USA 96:3160-3164, 1999）。

【0013】

治療の現在の標準は非常に制限的な食事（フェニルアラニン（Phe）の制限）であるが、そのような食事制限を維持することは困難であり、根本的な欠陥を修正しないため、常に効果的であるとは限らない。PKUの現在の治療法は、フェニルアラニン及び特別なサプリメントを含む食品が少ない食事を伴うものである。厳格な食事は、生後できるだけ早く開始し、生涯にわたらない場合でも、少なくとも10年間継続する必要がある。治療せずにいると、PKUは進行性及び重度の神経障害をもたらす得る。米国に在住する約16,500人がPKUを有し、現在まで、PKUにおける遺伝的欠陥に対処する利用可能な治療はない。

【0014】

PKUの生化学、分子生物学、及び遺伝学の理解におけるとてつもない進歩にもかかわらず、障害の新しい治療法の開発はほとんどなされていない。PKUには、疾患修飾療法に対する満たされていない大きなニーズがある。第一に、現在の治療法は疾患修飾するものではなく、一部の患者にのみ有効であり、依然として厳格な食事制限が必要であり、ノンコンプライアンスは神経損傷につながり得る。第二に、PKUの承認された遺伝子治療はなく、AAVベースの治療は既存の抗体のために患者の25%～40%が使用することはできない。更に、AAVは1回しか投与することができず、結果として得られるPAHレベルは、有効であるのに十分な高さではないか、又は異常であり得、用量レベルは滴定することはできない。

したがって、PKUの治療のために、細胞、組織、又は対象において治療用PAHタンパク質の発現を可能にする技術がこの分野で必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Kaufman, Proc Nat'l Acad Sci USA 96:3160-3164, 1999

【発明の概要】

【0016】

本明細書に記載の技術は、カプシドを含まない（例えば、非ウイルス性の）末端が共有結合で閉じているDNAベクター（本明細書では「閉端DNAベクター」又は「ceDNAベクター」と称される）からフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）を発現させることによるフェニルケトン尿症（PKU）の治療のための方法及び組成物に関し、ceDNAベクターは、コドンが最適化され、特定のシスエレメント（例えば、特定のプロモ

10

20

30

40

50

ーター、特定のエンハンサー、及び特定のプロモーターとエンハンサーとの組み合わせ）と組み合わせられ、PKUのマウスモデルにおいてフェニルアラニンレベルの最適な修正（例えば、発現及び期間）について試験されたPAH核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のコドン最適化PAH核酸配列は、特定のプロモーター配列及び／又は特定のエンハンサー配列と組み合わせられた場合、別のプロモーター配列及び／又は特定のエンハンサー配列と組み合わせられた同じコドン最適化PAH核酸配列と比較して、より良好に機能する。本開示によって記載されるように、コドン最適化配列を含む構築物は、天然hPAH cDNA配列よりもかなり良好に機能し、コドン最適化配列及び特定のシス作用性エレメントを含む特定の構築物は、28日間の研究期間を通して延長された修正を示し、発現の耐久性及び有効性を実証した。驚くべきことに、特定のプロモーター（例えば、hAAT CpG最小化プロモーター）を含む構築物は、PAH^{enu2}マウスモデルにおいてインビボで特定のオープンリーディングフレーム（ORF）（ceDNA412codop2 ORF）とより良好に機能したが、hAATプロモーターは、他のORF（例えば、ルシフェラーゼ）では、一般に、インビトロでVDプロモーター（VD）若しくは3×VDに打ち負かされた。

10

【0017】

これらのceDNAベクターを使用して、治療、モニタリング、及び診断用のPAHタンパク質を産生することができる。PKUの治療のための対象へのPAHを発現するceDNAベクターの適用は、(i) PAH酵素の疾患修飾レベルを提供する、(ii) 送達において低侵襲性である、(iii) 再現性があり、効果を発揮するために投与される、(iv) 治療効果の急速な発生を有する、(v) 肝臓における修正PAH酵素の持続的発現をもたらす、(vi) 尿素回路機能、フェニルアラニン代謝を回復すること、及び／又は(vii) 欠陥酵素の適切な薬理学的レベルを達成するための滴定可能であるのに有用である。

20

【0018】

したがって、本明細書に記載される開示は、コドン最適化され、特定のシス作用性エレメント（例えば、特異的プロモーター、特異的エンハンサー、及び特異的プロモーターとエンハンサーとの組み合わせ）と組み合わせられて、細胞におけるPAH治療用タンパク質の発現を可能にするPAH核酸配列を含む、カプシドを含まない（例えば、非ウイルス性）末端が共有結合で閉じているDNAベクター（本明細書において「閉端DNAベクター」又は「ceDNAベクター」と称される）に関する。

30

【0019】

一態様では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含む閉端DNA（ceDNA）ベクターが本明細書に開示され、少なくとも1つの核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも90%の同一性を有する配列から選択され、少なくとも1つの核酸配列が、コドン最適化され、少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復（inverted terminal repeat、ITR）、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター間に位置し、プロモーターが、VDプロモーター、ヒトα1アンチトリプシン（hAAT）プロモーター（hAAT（979）プロモーター（hAAT__core__C10）と少なくとも96%、97%、98%、99%、若しくは100%の同一性を有する配列、又はhAAT__core__C06、hAAT__core__C07、hAAT__core__C08、及びhAAT__core__C09のような他のCpG最小化（CpGmin）__hAATプロモーターを含む）、並びにトランスサイレチン（TTR）肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

40

【0020】

一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、表1Aに示される配列のうちのいずれか1つと少なくとも95%の同一性を有する配列から選択される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、表1Aに示される配列のうちのいずれか1つと少なく

50

とも96%の同一性を有する配列から選択される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、表1Aに示される配列のうちのいずれか1つと少なくとも97%の同一性を有する配列から選択される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、表1Aに示される配列のうちのいずれか1つと少なくとも98%の同一性を有する配列から選択される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、表1Aに示される配列のうちのいずれか1つと少なくとも99%の同一性を有する配列から選択される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、表1Aに示される配列のうちのいずれか1つを含む配列から選択される。

10

【0021】

別の態様によれば、本開示は、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む閉端DNA (ceDNA) ベクターを提供し、核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも95%の同一性を有する配列から選択され、少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) と少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとの間に位置し、プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

【0022】

別の態様によれば、本開示は、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む閉端DNA (ceDNA) ベクターを提供し、核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも96%の同一性を有する配列から選択され、少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) と少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとの間に位置し、プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

20

【0023】

別の態様によれば、本開示は、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む閉端DNA (ceDNA) ベクターを提供し、核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも97%の同一性を有する配列から選択され、少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) と少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとの間に位置し、プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

30

【0024】

別の態様によれば、本開示は、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む閉端DNA (ceDNA) ベクターを提供し、核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも98%の同一性を有する配列から選択され、少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) と少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとの間に位置し、プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

40

【0025】

別の態様によれば、本開示は、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む閉端DNA (ceDNA) ベクターを提供し、核酸配列が、表1Aに列挙される配列のうちのいずれかと少なくとも99%の同一性を有する配列から選択され、少なくとも1つの核酸配列が、隣接する逆位末端反復 (ITR) と少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとの間に位置し、プロモーターが、VDプロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

50

【0026】

一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号382として示される配列と少なくとも98%の同一性を有する配列である。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号382として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号382を含むか、又は配列番号382からなる。

【0027】

一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号425として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号425として示される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号431として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号431として示される。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号435として示される配列と少なくとも99%の同一性を有する配列である。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、配列番号435として示される。

【0028】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号441～448のうちのいずれか1つ及び／又は表7Aに示される配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるか、それを含むか、又はそれからなる配列を含む。

【0029】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号191と少なくとも85%の同一性、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96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、又は少なくとも99%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0030】

本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号443と少なくとも98%の同一性を有する核酸配列を含む。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号444と少なくとも99%の同一性を有する核酸配列を含む。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号445と少なくとも99%の同一性を有する核酸配列を含む。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号446と少なくとも99%の同一性を有する核酸配列を含む。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号447と少なくとも96%の同一性を有する核酸配列を含む。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号462と少なくとも85%の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号467と少なくとも85%の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号470と少なくとも85%の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号470と少なくとも90%の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである。本明細書の態様及び実施形態の一実施形態では、プロモーターは、配列番号470と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含むプロモーターセットである。

【0031】

一実施形態では、ceDNAベクターは、エンハンサーを更に含む。一実施形態では、エンハンサーは、配列番号449～461のうちのいずれか1つ及び／又は表8Aに示さ

れる配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるか、それを含むか、又はそれからなる配列を含む。一実施形態では、エンハンサーは、セルピンエンハンサー、3×HNF1-4__ProEnh__10mer、及び5×HNF1__ProEnh__10merからなる群から選択される。一実施形態では、エンハンサーは、配列番号450と少なくとも85%の同一性を有する核酸配列を含む。一実施形態では、エンハンサーは、配列番号586と少なくとも85%の同一性を有する核酸配列を含む。一実施形態では、エンハンサーは、配列番号587と少なくとも85%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0032】

一実施形態では、ceDNAベクターは、1つ以上のイントロンを更に含む。一実施形態では、1つ以上のイントロンは、配列番号509～516及び1000のうちのいずれか1つ及び／又は表11Aに示される配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるか、それを含むか、又はそれからなる配列を含む。一実施形態では、1つ以上のイントロンは、マウス微小ウイルス(MVM)である。

【0033】

一実施形態では、ceDNAベクターは、3'非翻訳領域(3'UTR)を含む。一実施形態では、3'UTRは、配列番号517～525のうちのいずれか1つ及び／又は表12に示される配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるか、それを含むか、又はそれからなる配列を含む。

【0034】

一実施形態では、ceDNAベクターは、5'非翻訳領域(5'UTR)を含む。一実施形態では、5'UTRは、配列番号482～508のうちのいずれか1つ及び／又は表10に示される配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であるか、それを含むか、又はそれからなる配列を含む。

【0035】

一実施形態では、ceDNAベクターは、少なくとも1つのポリA配列を含む。

【0036】

一実施形態では、VDプロモーターは、SERPエンハンサーを含む。一実施形態では、VDプロモーターは、3×SERPエンハンサーを含む。

【0037】

一実施形態では、プロモーターは、TTR肝臓プロモーターであり、ceDNAは、MVMイントロンを更に含む。

【0038】

一実施形態では、ceDNAベクターは、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号541、配列番号542、配列番号543、配列番号544、配列番号545、配列番号546、配列番号547、配列番号548、配列番号549、配列番号550、配列番号551、配列番号552、配列番号553、配列番号554、配列番号555、配列番号556、配列番号557、配列番号558、配列番号559、配列番号560、配列番号561、配列番号562、配列番号563、配列番号564、配列番号565、配列番号566、配列番号567、配列番号570、配列番号571、配列番号572、配列番号573、配列番号574、配列番号575、配列番号576、配列番号577、配列番号578、配列番号579、配列番号580、配列番号581、配列番号582、配列番号583、及び配列番号584からなる群から選択される核酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%同一であるか、それを含むか、又はそれからなる核酸配列を含む。

【0039】

一実施形態では、少なくとも1つの核酸配列は、PAHのcDNAである。

【0040】

一実施形態では、少なくとも1つのITRは、機能的末端分離部位(TRS)及びRep結合部位を含む。一実施形態では、ITRの一方又は両方が、パルボウイルス、ディペンドウイルス、及びアデノ随伴ウイルス(AAV)から選択されるウイルスに由来する。一実施形態では、隣接するITRは、対称又は非対称である。一実施形態では、隣接するITRは、対称又は実質的に対称である。一実施形態では、隣接するITRは、非対称である。一実施形態では、ITRの一方若しくは両方が野生型であるか、又はITRの両方が野生型である。一実施形態では、隣接するITRは、異なるウイルス血清型に由来する。一実施形態では、隣接するITRは、表2に示される一対のウイルス血清型に由来する。一実施形態では、ITRの一方又は両方は、表3、表5A、表5B、又は表6の配列から選択される配列を含む。

10

【0041】

一実施形態では、ITRの少なくとも一方が、野生型AAV ITR配列から、ITRの全体的な3次元コンフォメーションに影響を与える欠失、付加、又は置換によって変更されている。一実施形態では、ITRの一方又は両方が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、及びAAV12から選択されるAAV血清型に由来する。

【0042】

一実施形態では、ITRの一方又は両方は、合成である。一実施形態では、ITRの一方若しくは両方が野生型ITRでないか、又はITRの両方が野生型でない。

20

【0043】

一実施形態では、ITRの一方若しくは両方は、A、A'、B、B'、C、C'、D、及びD'から選択されるITR領域のうちの少なくとも1つにおける欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾される。一実施形態では、欠失、挿入、及び／又は置換は、A、A'、B、B'、C、又はC'領域によって通常形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす。

【0044】

一実施形態では、ITRの一方又は両方は、B及びB'領域によって通常形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている。一実施形態では、ITRの一方又は両方は、C及びC'領域によって通常形成されるステムループ構造の全部又は一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている。一実施形態では、ITRの一方又は両方は、B及びB'領域によって通常形成されるステムループ構造の一部、並びに／又は通常はC及びC'領域によって形成されるステムループ構造の一部の欠失をもたらす、欠失、挿入、及び／又は置換によって修飾されている。一実施形態では、ITRの一方又は両方は、B及びB'領域によって通常形成される第1のステムループ構造と、C及びC'領域によって形成される第2のステムループ構造とを含む領域に、単一のステムループ構造を含む。一実施形態では、ITRの一方又は両方は、通常、B及びB'領域によって形成される第1のステムループ構造と、C及びC'領域によって形成される第2のステムループ構造とを含む領域に、単一のステム及び2つのループを含む。

30

40

【0045】

一実施形態では、ITRの一方又は両方は、通常、B及びB'領域によって形成される第1のステムループ構造と、C及びC'領域によって形成される第2のステムループ構造と、を含む領域に単一のステム及び単一のループを含む。

【0046】

一実施形態では、両方のITRは、ITRが互いに対して反転している場合、全体的な三次元対称性をもたらす様式で変更されている。

【0047】

50

一実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 と少なくとも 9 0 % 同一である核酸配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 と少なくとも 9 5 % 同一である核酸配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 と少なくとも 9 6 % 同一である核酸配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 と少なくとも 9 7 % 同一である核酸配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 と少なくとも 9 8 % 同一である核酸配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 と少なくとも 9 9 % 同一である核酸配列を含む。

10

【0048】

別の態様では、細胞において P A H タンパク質を発現させる方法が本明細書に開示され、本方法は、細胞を本明細書に開示される c e D N A ベクターと接触させることを含む。一実施形態では、細胞は、光受容体又は R P E 細胞である。一実施形態では、細胞は、インビトロ又はインビボで接触される。

【0049】

別の態様では、フェニルケトン尿症（P K U）を有する対象を治療する方法が本明細書に開示され、本方法は、本明細書に開示される c e D N A ベクターを対象に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも 1 つの P A H タンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸配列は、表 1 A に示される配列のうちのいずれかと少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列から選択される。一実施形態では、対象は、投与前の対象における血清フェニルアラニンレベルと比較して、血清フェニルアラニンのレベルの少なくとも約 5 0 % の減少を呈する。一実施形態では、対象は、投与前の P A H 活性のレベルと比較して、投与後の P A H 活性の少なくとも約 1 0 % の増加を呈する。

20

【0050】

一実施形態では、c e D N A ベクターは、脂質ナノ粒子中に製剤化される。一実施形態では、c e D N A 組成物は、静脈内投与される。一実施形態では、c e D N A ベクターは、筋肉内投与される。一実施形態では、c e D N A ベクターは、注入によって投与される。

30

【0051】

別の態様では、c e D N A ベクターを含む医薬組成物が本明細書に開示される。

【0052】

別の態様では、c e D N A ベクター及び脂質を含む組成物が本明細書に開示される。一実施形態では、脂質は、脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle、L N P）である。

【0053】

別の態様では、本明細書に開示される c e D N A ベクター、本明細書に開示される医薬組成物、又は本明細書に開示される組成物を含むキットが本明細書に開示される。一実施形態では、キットは、使用説明書を含む。

【0054】

本開示のこれらの及び他の態様は、下記で更に詳述される。

40

【図面の簡単な説明】

【0055】

特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも 1 つ図面を含む。カラー図面を含むこの特許又は特許出願公開のコピーは、請求及び必要な手数料の支払いに応じて特許庁から提供されるであろう。

【0056】

上記に簡単に要約され、以下により詳細に論じられる本開示の実施形態は、添付の図面に描かれた本開示の例示的な実施形態を参照することによって理解することができる。しかしながら、添付の図面は、本開示の典型的な実施形態のみを示し、したがって、本開示

50

は他の等しく有効な実施形態を認めることができるため、範囲を限定するものとみなされるべきではない。

【図 1 A】A-A' アーム、B-B' アーム、C-C' アーム、2つの Rep 結合部位 (RBE 及び RBE') の特定とともに AAV2 (配列番号 52) の野生型左 ITR の T 形システムループ構造を提供し、また、末端分離部位 (TRS) も示す。RBE は、Rep 78 又は Rep 68 のいずれかと相互作用すると考えられる一連の 4 つの二重四量体を含む。加えて、RBE' はまた、構築物中の野生型 ITR 又は変異型 ITR 上で組み立てられた Rep 複合体と相互作用すると考えられる。D 及び D' 領域は、転写因子結合部位及び他の保存構造を含む。

【図 1 B】A-A' アーム、B-B' アーム、C-C' アーム、2つの Rep 結合部位 (RBE 及び RBE') の特定とともに AAV2 の野生型左逆位末端反復 (ITR) (配列番号 53) の T 形システムループ構造を含む、野生型左 ITR における提案された Rep 触媒ニッキング及びライゲーション活性を示し、また、末端分離部位 (TRS)、並びにいくつかの転写因子結合部位を含む D 及び D' 領域並びに他の保存構造も示す。

【図 2 A】野生型左 AAV2 ITR (配列番号 54) の A-A' アーム、並びに C-C' 及び B-B' アームの RBE 含有部分の一次構造 (ポリ核酸配列) (左) 並びに二次構造 (右) を提供する。

【図 2 B】左 ITR についての例示的な変異型 ITR (修飾型 ITR とも称される) 配列を示す。例示的な変異型左 ITR (ITR-1、左) (配列番号 113) の A-A' アーム、C アーム、及び B-B' アームの RBE 部分の一次構造 (左) 及び予測された二次構造 (右) が、示される。

【図 2 C】野生型右 AAV2 ITR (配列番号 55) の A-A' ループ、並びに B-B' 及び C-C' アームの RBE 含有部分の一次構造 (左) 並びに二次構造 (右) を示す。

【図 2 D】例示的な右修飾型 ITR を示す。例示的な変異体左 ITR (ITR-1、右) (配列番号 114) の A-A' アーム、並びに B-B' 及び C アームの RBE 含有部分の一次構造 (左) 及び予測された二次構造 (右) が、示される。左及び右の ITR (例えば、AAV2 ITR 又は他のウイルス血清型又は合成 ITR) の任意の組み合わせを、本明細書で教示されるように使用することができる。図 2 A ~ 2 D のポリヌクレオチド配列の各々は、本明細書に記載される c e DNA を産生するために使用されるプラスミド又はバクミド / バキュロウイルスゲノムで使用される配列を指す。プラスミド又はバクミド / バキュロウイルスゲノムの c e DNA ベクター構成及び予測された Gibbs 自由エネルギー値から推定される対応する c e DNA の二次構造もまた、図 2 A ~ 2 D の各々に含まれる。

【図 3 A】図 3 B の概略図に記載されるプロセスにおける、本明細書に開示される PAH の発現のための c e DNA ベクターの産生に有用である、バキュロウイルス感染昆虫細胞 (B I I C) を作製するための上流プロセスを示す概略図である。

【図 3 B】c e DNA の産生の例示的な方法の概略図である。

【図 3 C】c e DNA ベクターの産生を確認するための生化学的方法及びプロセスを示す。

【図 3 D】図 3 B の c e DNA 産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取された DNA 中の c e DNA の存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。図 3 D は、左が未切断であるか、又は制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲル又は変性ゲルのいずれかで電気泳動に供される例示的な c e DNA の概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖及び未切断形態で、c e DNA が少なくとも単量体及び二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体及び単量体のサイズの 2 倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から 2 番目の概略図は、c e DNA が制限エンドヌクレアーゼで切断された場合、元のバンドが消え、切断後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する (例えば、より小さな) バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖 DNA は一本鎖であり、相補鎖が共有結合されるため、未変性ゲル上で観察されるものより 2 倍大きい

種として移動する。したがって、右から2番目の概略図において、消化されたceDNAは、未変性ゲル上で観察されるものと同様のバンドリング分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの2倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断のceDNAが、一本鎖開環として移動し、したがって観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの2倍であることを示す。この図において、「kb」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ（例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合）又は塩基対の数（例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合）に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。

【図3E】図3BのceDNA産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取されたDNA中のceDNAの存在を特定するためのプロセスを説明する概略図である。図3Eは、非連続的な構造を有するDNAを示す。ceDNAは、ceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件及び変性条件の両方において、異なるサイズ（1kb及び2kb）を有する2つのDNA断片を生成することができる。図3Eはまた、直鎖状かつ連続的な構造を有するceDNAを示す。ceDNAベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件において1kb及び2kbとして移動する2つのDNA断片を生成することができるが、変性条件では、鎖は、接続されたままであり、2kb及び4kbとして移動する一本鎖を産生する。

【図4】エンドヌクレアーゼで消化した（+）又は消化していない（-）ceDNAベクターの変性ゲル泳動例の例示的な写真である（ceDNA構築物1及び2についてはEcoRI、ceDNA構築物3及び4についてはBamHI、ceDNA構築物5及び6についてはSpeI、及びceDNA構築物7及び8についてはXhoI）。構築物1～8は、国際特許出願第US18/49996号の実施例1に記載されている（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。アスタリスクで強調されたバンドのサイズを判定し、図の下に示した。

【図5A】実施例6に記載の実験の結果を示すグラフである。3×HS-CRM8__SERP__エンハンサー、TTR-プロモーター-d5pUTR、及びMVM__イントロンを有するコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412；hPAH__codop__ORF__v2）又はコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1530；hPAH-r5-s29）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM」）の修正に対する効果を、21日間にわたって、0.5 μg及び5 μgの両方の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図5B】実施例6に記載の実験の結果を示すグラフである。3×HS-CRM8__SERP__エンハンサー、TTR-プロモーター-d5pUTR、及びMVM__イントロンを有するコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412；hPAH__codop__ORF__v2）又はコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1530；hPAH-r5-s29）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM」）の修正に対する効果を、21日間にわたって、0.5 μg及び5 μgの両方の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図5C】実施例6に記載の実験の結果を示すグラフである。3×HS-CRM8__SERP__エンハンサー、TTR-プロモーター-d5pUTR、及びMVM__イントロンを有するコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412；hPAH__codop__ORF__v2）又はコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1530；hPAH-r5-s29）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM」）の修正に対する効果を、21日間にわたって、0.5 μg及び5 μgの両方の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図5D】実施例6に記載の実験の結果を示すグラフである。3×HS-CRM8__SERP__エンハンサー、TTR-プロモーター-d5pUTR、及びMVM__イントロンを有するコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412；hPAH__codop__ORF__v2）又はコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1530；hPAH-r5-s29）のフェニルアラニ

10

20

30

40

50

ン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、21日間にわたって、0.5 μg 及び5 μg の両方の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図5E】実施例6に記載の実験の結果を示すグラフである。3×HS-CRM8-SERP-エンハンサー、TTR-プロモーター-d5pUTR、及びMVM-イントロンを有するコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412；hPAH-codop-ORF-v2）又はコドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1530；hPAH-r5-s29）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、21日間にわたって、0.5 μg 及び5 μg の両方の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図6】実施例7に記載の実験の結果を提供する。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA1132、ceDNA1274及びceDNA1527）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、0.5 μg 及び5 μg の流体力学的用量の両方で個々のマウスにおいて評価し、各群の5匹のマウス全てについての平均修正をA～Bのグラフに示す。PHE濃度は、対照動物（PAHenu2：ビヒクル）において減少しなかった。

【図7A】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図7B】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図7C】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図7D】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図7E】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図7F】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図7G】個々のマウスについて実施例7に記載の実験の結果を示すグラフである。

【図8A】実施例8に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1416、ceDNA1428、及びceDNA1528、ceDNA1414）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、7日後に、0.5 μg 及び5 μg の流体力学的用量の両方で個々のマウスにおいて評価し、各群の5匹のマウス全てについての平均修正を図8A～8Bのグラフに示す。対照動物（PAHenu2：ビヒクル）ではPHE濃度は減少しなかった。

【図8B】実施例8に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1416、ceDNA1428、及びceDNA1528、ceDNA1414）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、7日後に、0.5 μg 及び5 μg の流体力学的用量の両方で個々のマウスにおいて評価し、各群の5匹のマウス全てについての平均修正を図8A～8Bのグラフに示す。対照動物（PAHenu2：ビヒクル）ではPHE濃度は減少しなかった。

【図9A】実施例8に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1416、ceDNA1428、ceDNA1414、及びceDNA1528）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、7日後に、0.5 μg の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図9B】実施例8に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1416、ceDNA1428、ceDNA1414、及びceDNA1528）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、7日後に、0.5 μg の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図9C】実施例8に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA1416、ceDNA1428、ceDNA1414、及びceDNA1528）のフェニルアラニン濃度（「PHE μM 」）の修正に対する効果を、7日後に、0.5 μg の流体力学的用量で個々のマウスにおいて

評価した。

【図 9 D】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 9 E】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

10

【図 1 0 A】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 0 B】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

20

【図 1 0 C】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 0 D】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

30

【図 1 0 E】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 1 A】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g 及び 5 μ g の流体力学的用量の両方で個々のマウスにおいて評価し、各群の 5 匹のマウス全てについての平均修正を図 1 1 A ~ 1 1 B のグラフに示す。P H E 濃度は、対照動物 (P A H^{enu2} : ビヒクル) において減少しなかった。

40

【図 1 1 B】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g 及び 5 μ g の流体力学的用量の両方で個々のマウスにおいて評価し、各群の 5 匹のマウス全てについての平均修正を図 1 1 A ~ 1 1 B のグラフに示す。P H E 濃度は、対照動物 (P A H^{enu2} : ビヒクル) において減少しなかった。

50

【図 1 2 A】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 2 B】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 2 C】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 2 D】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 2 E】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、0.5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 3 A】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 3 B】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 3 C】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 3 D】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 3 E】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 1 4 1 6、c e D N A 1 4 2 8、c e D N A 1 4 1 4、及び c e D N A 1 5 2 8) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、28 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

10

20

30

40

50

【図 1 4 A】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 4 B】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

10

【図 1 4 C】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 4 D】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

20

【図 1 4 E】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

30

【図 1 4 F】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 4 G】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

40

【図 1 4 H】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D N A 1 4 3 2、c e D N A 1 4 7 3、c e D N A 1 4 7 4、c e D N A 1 4 3 6、c e D N A 1 4 7 1、c e D N A 1 4 7 2) のフェニルアラニン濃度 (「P H E μ M」) の修正に対する効果を、7 日後に、5 μ g の流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図 1 4 I】実施例 8 に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化された P A H 核酸配列を含む c e D N A ベクター (c e D N A 4 1 2、c e D N A 1 4 3 0、c e D

50

NA1432、ceDNA1473、ceDNA1474、ceDNA1436、ceDNA1471、ceDNA1472)のフェニルアラニン濃度(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、7日後に、5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図15A】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

10

【図15B】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図15C】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

20

【図15D】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図15E】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

30

【図15F】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

40

【図15G】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μ M」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図15H】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944)の血清フェニルアラニンレベ

50

ル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図15I】実施例9に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA1476、ceDNA1479、ceDNA1939、ceDNA1940、ceDNA1941、ceDNA1942、ceDNA1943、ceDNA1944）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図16A】実施例10に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA1939、ceDNA1955、ceDNA62）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図16B】実施例10に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA1939、ceDNA1955、ceDNA62）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図16C】実施例10に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA1939、ceDNA1955、ceDNA62）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図16D】実施例10に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA1939、ceDNA1955、ceDNA62）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17A】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17B】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17C】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17D】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17E】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17F】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17G】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図17H】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、ceDNA2419、ceDNA2420)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図18A】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA2415、ceDNA2418)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.1 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図18B】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA2415、ceDNA2418)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.1 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図18C】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA2415、ceDNA2418)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.1 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図18D】実施例11に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA2415、ceDNA2418)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.1 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図19A】実施例12に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA34、ceDNA36、ceDNA41、ceDNA42、ceDNA43)の血清フェニルアラニンレベル(「PHE μM」)の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μgの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図19B】実施例12に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター(ceDNA412、ceDNA34、ceDNA36、ceDNA41、ceDNA42、ceDNA43)の血清フェニルアラニンレ

10

20

30

40

50

ベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図19C】実施例12に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA34、ceDNA36、ceDNA41、ceDNA42、ceDNA43）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図19D】実施例12に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA34、ceDNA36、ceDNA41、ceDNA42、ceDNA43）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図19E】実施例12に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA34、ceDNA36、ceDNA41、ceDNA42、ceDNA43）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図19F】実施例12に記載の実験の結果を示すグラフである。コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクター（ceDNA412、ceDNA34、ceDNA36、ceDNA41、ceDNA42、ceDNA43）の血清フェニルアラニンレベル（「PHE μ M」）の修正に対する効果を、28日後に、0.5 μ gの流体力学的用量で個々のマウスにおいて評価した。

【図20A】PAH CDSへのイントロンの例示的な挿入についての概略図である。PAH CDSのイントロン1の天然位置で、機能的スプライスドナー及びアクセプター部位を有するキメラPAHイントロンを挿入した。PAH cDNA配列に由来するイントロン隣接領域（33bp）を、PAH CDSのコドン最適化配列と置換した。図は、配列番号1022を開示する。

【図20B】PAH CDSへのイントロンの例示的な挿入についての概略図である。PAH CDSのイントロン1の天然位置で、機能的スプライスドナー及びアクセプター部位を有するキメラPAHイントロンを挿入した。PAH cDNA配列に由来するイントロン隣接領域（33bp）を、PAH CDSのコドン最適化配列と置換した。図は、配列番号1022を開示する。

【図21】PAH CDSへのイントロンの例示的な挿入についての概略図である。PAH CDSのイントロン1の天然位置で、機能的スプライスドナー及びアクセプター部位を有するキメラPAHイントロンを挿入した。イントロンスプライス部位に隣接する領域の配列を、コンセンサス配列により良く適合するように変更した。図は、出現順に、それぞれ配列番号1023及び1024を開示する。

【発明を実施するための形態】

【0057】

PAH治療用タンパク質又はその断片をコードする1つ以上のコドン最適化核酸を含むceDNAベクターを使用してフェニルケトン尿症（PKU）を治療するための方法が本明細書に提供される。PAHタンパク質又はその断片をコードする1つ以上のコドン最適化核酸を含む、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターも本明細書で提供される。PAH治療用タンパク質又はその断片をコードするコドン最適化核酸が、特定のシス作用性エレメント（例えば、特異的プロモーター及び／又は調節エレメント）と組み合わされた場合に、対象におけるフェニルアラニンレベル（例えば、発現及び持続時間）の最適な修正を提供することは、本開示の驚くべき発見である。

【0058】

いくつかの実施形態によれば、フェニルアラニンレベルの最適な修正は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）の欠損に起因する疾患又は障害を治療するのに治療上有

10

20

30

40

50

効なレベルである。本開示によって記載されるように、コドン最適化配列を含む構築物は、天然 h P A H c D N A 配列よりもかなり良好に機能し、コドン最適化配列及び特定のシス作用性エレメントを含む特定の構築物は、フェニルアラニンレベルの拡張された発現及び修正を示した。いくつかの実施形態では、P A H タンパク質の発現は、それが発現される細胞からの治療用タンパク質の分泌を含み得るか、又は代替的に、いくつかの実施形態では、発現された P A H タンパク質は、それが発現される細胞内で作用又は機能することができる（例えば、その効果を発揮する）。いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、肝臓、対象の筋肉（例えば、骨格筋）、又は他の身体部分において P A H タンパク質を発現し、これは、P A H 治療用タンパク質の産生及び多くの全身区画への分泌のためのデポーとして作用し得る。

10

【0059】

I. 定義

本明細書で別途定義されない限り、本出願に関連して使用される科学的及び技術的用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。本開示は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬などに限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、特許請求の範囲によってのみ定義される本開示の範囲を限定することを意図するものではない。免疫学及び分子生物学における一般用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3)、Robert S. Porter et al. (eds.), Fields Virology, 6th Edition, published by Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013)、Knipe, D. M. and Howley, P. M. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)、及び Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006、Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305)、Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055)、Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (2012) (ISBN 1936113414)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X)、Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542)、Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John

20

30

40

50

Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385)、Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005、及び Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strober, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)に見出すことができ、これらの内容は全て、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0060】

本明細書で使用される場合、「投与」、「投与する」という用語及びそれらの変形は、組成物又は薬剤（例えば、本明細書に記載される治療用核酸又は免疫抑制剤）を対象に導入することを指し、1つ以上の組成物又は薬剤の同時及び連続導入を含む。「投与」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究、プラセボ、及び実験方法を指し得る。「投与」は、インビトロ及びエクスピボ治療も包含する。組成物又は薬剤の対象への導入は、経口、肺、鼻腔内、非経口（静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下）、直腸、リンパ管内、腫瘍内、又は局所を含む任意の好適な経路による。組成物又は薬剤の対象への導入は、エレクトロポレーションによる。投与には、自己管理及び他者による投与が含まれる。投与は、任意の好適な経路によって実行され得る。好適な投与経路は、組成物又は薬剤がその意図された機能を遂行することを可能にする。例えば、好適な経路が静脈内である場合、組成物は、組成物又は薬剤を対象の静脈に導入することによって投与される。

20

【0061】

本明細書で使用される場合、「核酸治療」、「治療用核酸」及び「TNA」という語句は、交換可能に使用され、疾患又は障害を治療するための治療剤の活性成分として核酸を使用する治療の任意のモダリティを指す。本明細書で使用される場合、これらの語句は、RNAベースの治療薬及びDNAベースの治療薬を指す。RNAベースの治療薬の非限定的な例としては、mRNA、アンチセンスRNA及びオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー、干渉RNA (RNAi)、ダイサー基質 dsRNA、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)、ガイドRNA (gRNA)、及びマイクロRNA (miRNA)が挙げられる。DNAベースの治療薬の非限定的な例は、ミニサークルDNA、ミニ遺伝子、ウイルス性DNA（例えば、レンチウイルス又はAAVゲノム）若しくは非ウイルス性合成DNAベクター、閉端直鎖状の二重鎖DNA (cdNA/CELID)、プラスミド、バクミド、doggybone (dbDNA (商標)) DNAベクター、最小限度に免疫学的に定義された遺伝子発現 (MIDGE)ベクター、非ウイルス性ミニストリングDNAベクター（直鎖状の共有結合性閉鎖DNAベクター）、又はダンベル形DNAミニマルベクター（「ダンベルDNA」）を含む。

30

【0062】

本明細書で使用される場合、PAH治療用タンパク質又はその断片などの治療剤の「有効量」又は「治療有効量」は、所望の効果を生み出すのに十分な量であり、例えば、PAH酵素の疾患修飾レベルを提供し、肝臓における修復PAH酵素の持続的な発現、尿素回路機能、フェニルアラニン代謝の回復、及び／又は欠陥酵素の適切な薬理学的レベルの達成をもたらされる。標的遺伝子又は標的配列の発現を測定するための好適なアッセイは、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、同様に当業者に既知の表現型アッセイ等の、当業者に既知の技法を使用するタンパク質又はRNAレベルの検査を含む。しかしながら、投与量レベルは、傷害の種類、年齢、体重、性別、患者の病状、病状の重症度、投与経路、及び用いられる特定の活性剤を含む、多様な因子に基づく。したがって、投与計画は、大きく異なる可能性があるが、標準的な方法を使用して医師によって常套的に決定され得る。追加的に、「治療量」、「治療有効量」及び「薬学的有効量」という用語は、記載された本開

40

50

示の組成物の予防的 (prophylactic) 又は予防的 (preventative) 量を含む。記載された本開示の予防的 (prophylactic) 又は予防的 (preventative) 用途において、医薬組成物又は薬剤は、疾患、障害又は状態の生化学的、組織学的及び／又は行動症状、その合併症、並びに疾患、障害又は状態の発症中に現れる中間の病理学的表現型を含む、疾患、障害又は状態に罹患しやすい患者、又はそうでなければそのリスクがある患者に、リスクを排除若しくは低減するか、重症度を減少させるか、又は疾患、障害若しくは状態の発症を遅らせるのに十分な量で投与される。いくつかの医学的判断によれば、最大用量、すなわち最高の安全用量を使用することが一般に好ましい。いくつかの実施形態によれば、疾患、障害、又は状態は、PKUである。「用量」及び「投与量」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

10

【0063】

本明細書で使用される場合、「治療効果」という用語は、治療の結果を指し、その結果は、望ましくかつ有益であると判断される。治療効果としては、直接的又は間接的に、疾患症状の阻止、低減、又は排除を挙げることができる。治療効果としてはまた、直接的又は間接的に、疾患症状の進行の阻止、低減、又は排除を挙げることができる。

【0064】

本明細書に記載される任意の治療剤について、治療有効量は、予備的なインビトロ研究及び／又は動物モデルから最初に決定することができる。治療有効用量はまた、ヒトのデータから決定することができる。適用される用量は、投与される化合物の相対的な生物学的利用能及び効力に基づいて調整することができる。上記の方法及び他の周知の方法に基づいて最大の効力を達成するように用量を調整することは、当業者の能力の範囲内である。参照により本明細書に組み込まれる、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Edition, McGraw-Hill (New York) (2001) の第1章に見出され得る治療有効性を決定するための一般原則を以下に要約する。

20

【0065】

薬物動態学的原理は、許容できない副作用を最小限に抑えながら、望ましい程度の治療効果を得るために投与計画を変更するための基礎を提供する。薬物の血漿濃度を測定でき、治療濃度域に関連している状況では、投与量の変更に關する追加のガイダンスを入手することができる。

30

【0066】

本明細書で使用される場合、「異種ヌクレオチド配列」及び「導入遺伝子」という用語は、交換可能に使用され、本明細書で開示されるcDNAベクターに組み込まれ、それによって送達及び発現され得る、関心対象の(カプシドポリペプチドをコードする核酸以外の)核酸を指す。一実施形態では、少なくとも1つのPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列は、異種核酸配列である。

【0067】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」及び「転写カセット」という用語は、交換可能に使用され、導入遺伝子の転写を配向するのに十分な1つ以上のプロモーター又は他の調節配列に作動可能に連結された導入遺伝子を含むが、カプシドコード配列、他のベクター配列、又は逆位末端反復領域を含まない核酸の直鎖状ストレッチを指す。発現カセットは、追加的に、1つ以上のシス作用性配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、又はリプレッサー)、1つ以上のイントロン、及び1つ以上の転写後調節エレメントを含んでもよい。

40

【0068】

本明細書で交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。したがって、この用語には、一本鎖、二本鎖、又は多重鎖のDNA若しくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、又はプリン及びピリミジン塩基若しくは他の天然、化学的修飾若しくは生化学的修飾、非天然、若し

50

くは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。「オリゴヌクレオチド」は、一般に、一本鎖又は二本鎖DNAの約5～約100ヌクレオチドのポリヌクレオチドを指す。しかしながら、この開示の目的のために、オリゴヌクレオチドの長さに上限はない。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」又は「オリゴ」としても知られており、遺伝子から単離するか、又は当該技術分野で既知である方法によって化学的に合成することができる。「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、記載されている実施形態に適用可能であるように、一本鎖（センス又はアンチセンスなど）及び二本鎖ポリヌクレオチドを含むと理解されるべきである。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、DNA-DNA二重鎖、事前に凝縮されたDNA、PCR産物、ベクター（P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、又はこれらのグループの誘導体及び組み合わせの形態であり得る。DNAは、ミニサークル、プラスミド、バクミド、ミニ遺伝子、ミニストリングDNA（直鎖状の共有結合性閉鎖DNAベクター）、閉端直鎖状の二重鎖DNA（CELID又はceDNA）、doggybone（dbDNA（商標））DNA、ダンベル形DNA、最小限度に免疫学的に定義された遺伝子発現（MIDGE）ベクター、ウイルス性ベクター又は非ウイルス性ベクターの形態にあり得る。RNAは、低分子干渉RNA（siRNA）、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、gRNA、rRNA、tRNA、ウイルスRNA（vRNA）、及びそれらの組み合わせの形態であり得る。核酸としては、既知のヌクレオチド類似体又は修飾型骨格残基若しくは連結を含有する核酸が挙げられ、これらは、合成、天然に存在する、及び天然に存在しないものであり、参照核酸と同様の結合特性を有する。そのような類似体及び／又は修飾残基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（モルホリノ）、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ロックド核酸（LNA（商標））、及びペプチド核酸（PNA）が挙げられる。別途限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する核酸を包含する。別途明記しない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的修飾型バリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補的配列、同様に、明示的に示された配列を暗黙的に包含する。

10

20

30

40

50

【0069】

「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）又はリボース（RNA）、塩基、及びリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介してともに連結している。

【0070】

「塩基」には、プリン及びピリミジンが含まれ、それらには、天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、及び天然類似体、並びにプリン及びピリミジンの合成誘導体が更に含まれ、それらには、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、及びアルキルハライドなどであるがこれらに限定されない新しい反応基を配置する修飾が含まれるが、これらに限定されない。

【0071】

本明細書で使用される場合、「干渉RNA」又は「RNAi」又は「干渉RNA配列」という用語は、一本鎖RNA（例えば、成熟miRNA、ssRNAiオリゴヌクレオチド、ssDNAiオリゴヌクレオチド）、二本鎖RNA（すなわち、siRNAなどの二本鎖RNA、ダイサー基質dsRNA、shRNA、aiRNA、又はプレmiRNA）、DNA-RNAハイブリッド（例えば、国際公開第2004/078941号を参照されたい）、又は干渉RNAが標的遺伝子若しくは配列と同じ細胞に存在する場合、（例えば、分解を媒介するか、又は干渉RNA配列に相補的なmRNAの翻訳を阻害することによって）標的遺伝子若しくは配列の発現を低減若しくは阻害することができるDNA-DNAハイブリッド（例えば、国際公開第2004/104199号を参照されたい）を含む。したがって、干渉RNAは、標的mRNA配列に相補的な一本鎖RNA、又は2つの相補鎖又は単一の自己相補鎖によって形成される二本鎖RNAを指す。干渉RNAは、標

的の遺伝子又は配列に対して実質的な若しくは完全な同一性を有し得るか、又はミスマッチの領域（すなわち、ミスマッチモチーフ）を含み得る。干渉RNAの配列は、全長の標的遺伝子又はその部分配列に対応し得る。好ましくは、干渉RNA分子は化学的に合成される。上記の各特許文書の開示内容は、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0072】

干渉RNAには、「低分子干渉RNA」又は「siRNA」、例えば、長さ約15～60、15～50、又は15～40（二重鎖）ヌクレオチド、より典型的には長さ約15～30、15～25、又は19～25（二重鎖）ヌクレオチドの干渉RNAを含み、好ましくは長さ約20～24、21～22、又は21～23（二重鎖）ヌクレオチドである（例えば、二本鎖siRNAの各相補配列は、長さ15～60、15～50、15～40、15～30、15～25、又は19～25ヌクレオチドであり、好ましくは長さ約20～24、21～22、又は21～23ヌクレオチドであり、二本鎖siRNAは、長さ約15～60、15～50、15～40、15～30、15～25、又は19～25塩基対であり、好ましくは長さ約18～22、19～20、又は19～21塩基対である）。siRNA二重鎖は、約1～約4ヌクレオチド又は約2～約3ヌクレオチドの3'オーバーハング及び5'ホスフェート末端を含み得る。siRNAの例としては、限定されないが、一方の鎖がセンス鎖であり、他方が相補的アンチセンス鎖である2つの別々の鎖分子から組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子、センス領域及びアンチセンス領域が核酸ベース又は非核酸ベースのリンカーによって連結されている一本鎖分子から組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子、自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有する二本鎖ポリヌクレオチド分子、並びに活性二本鎖siRNA分子を生成するためにインビボ又はインビトロでプロセッシングされ得る、自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域を有する2つ以上のループ構造及びシステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチド分子が挙げられる。本明細書で使用される場合、「siRNA」という用語は、RNA-RNA二重鎖並びにDNA-RNAハイブリッドを含む（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第2004/078941号を参照されたい）。

【0073】

本明細書で使用される「核酸構築物」という用語は、天然に存在する遺伝子から単離されるか、又はそうでなければ天然に存在しなであろう様式で核酸のセグメントを含有するように修飾されるか、又は合成である、一本鎖又は二本鎖の核酸分子を指す。核酸構築物という用語は、核酸構築物が本開示のコード配列の発現に必要な制御配列を含有する場合、「発現カセット」という用語と同義である。「発現カセット」は、プロモーターに作動可能に連結されたDNAコード配列を含む。

【0074】

「ハイブリダイズ可能」又は「相補的」若しくは「実質的に相補的」とは、核酸（例えば、RNA）が、非共有結合的に結合する、すなわち、ワトソン・クリック塩基対及び／又はG/U塩基対を形成する、温度及び溶液イオン強度の適切なインビトロ及び／又はインビボ条件下で配列特異的、逆平行様式で別の核酸に「アニール」又は「ハイブリダイズ」する（すなわち、核酸は、相補的核酸に特異的に結合する）のを可能にするヌクレオチドの配列を含むことを意味する。当該技術分野で既知であるように、標準的なワトソン・クリック塩基対合には、チミジン（T）とのアデニン（A）対合、ウラシル（U）とのアデニン（A）対合、及びシトシン（C）とのグアニン（G）対合が含まれる。加えて、2つのRNA分子（例えば、dsRNA）間のハイブリダイゼーションのために、グアニン（G）塩基がウラシル（U）と対合することも、当該技術分野で既知である。例えば、G/U塩基対合は、mRNA中のコドンとのtRNAアンチコドン塩基対合の状況で、遺伝コードの縮重（すなわち、冗長性）を部分的に担っている。この開示の文脈において、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）のグアニン（G）は、ウラシル（U）に相補的であるとみなされ、逆もまた同様である。したがっ

て、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）の所与のヌクレオチド位置でG/U塩基対を作製できる場合、その位置は、非相補的であるとみなされないが、代わりに相補的であるとみなされる。

【0075】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、コード及び非コードアミノ酸、化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸、及び修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。

【0076】

特定のPAHタンパク質を「コードする」DNA配列は、特定のRNA及び／又はタンパク質に転写されるDNA核酸配列である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるRNA（mRNA）をコードし得るか、又はDNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないRNA（例えば、tRNA、rRNA、又はDNA標的化RNA、「非コード」RNA又は「ncRNA」とも呼ばれる）をコードし得る。

【0077】

本明細書で使用される場合、本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、少なくとも2つの異なるタンパク質からのタンパク質ドメインを含むポリペプチドを指す。例えば、融合タンパク質は、(i) PAH又はその断片、及び(ii) 少なくとも1つの非GOIタンパク質を含み得る。本明細書に包含される融合タンパク質は、抗体、又はPAHタンパク質、例えば、受容体、リガンド、酵素、若しくはペプチドの細胞外ドメインに融合した抗体のFc若しくは抗原結合断片を含むが、これらに限定されない。融合タンパク質の一部であるPAHタンパク質又はその断片は、単一特異性抗体又は二重特異性若しくは多重特異的性抗体であり得る。

【0078】

本明細書で使用される場合、「ゲノムセーフハーバー遺伝子」又は「セーフハーバー遺伝子」という用語は、内因性遺伝子活性に重大な悪影響を及ぼすことなく、又はがんを促進することなく、配列が予測可能な様式で統合及び機能し得る（例えば、関心対象のタンパク質を発現する）ように、核酸配列を挿入することができる遺伝子又は遺伝子座を指す。いくつかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子はまた、挿入された核酸配列が非セーフハーバー部位よりも効率的かつ高レベルで発現され得る遺伝子座又は遺伝子である。

【0079】

本明細書で使用される場合、「遺伝子送達」という用語は、外来DNAが遺伝子療法の用途のために宿主細胞に導入されるプロセスを意味する。

【0080】

本明細書で使用される場合、「末端反復」又は「TR」という用語は、少なくとも1つの最小限必要な複製起源、及びパリンドロームヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウイルス末端反復又は合成配列を含む。Rep結合配列（「RBS」）（RBE（Rep結合エレメント）とも称される）及び末端分離部位（「TRS」）は、一緒に「最小限必要な複製起源」を構成し、したがって、TRは、少なくとも1つのRBS及び少なくとも1つのTRSを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内で互いの逆相補体であるTRは、典型的に、各々「逆位末端反復」又は「ITR」と称される。ウイルスの文脈において、ITRは、複製、ウィルスパッケージング、組み込み、及びプロウィルススレスキューを媒介する。本明細書の本開示において予想外に見出されたように、全長にわたって逆相補体でないTRは、依然としてITRの従来の機能を遂行することができ、したがって、ITRという用語は、本明細書において、ceDNAベクターの複製を媒介することができるceDNAゲノム又はceDNAベクター中のTRを指すように使用される。複合ceDNAベクター構成中、3つ以上のITR又は非対称ITR対が存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。ITRは、AAV ITR若しくは非AAV ITRであり得るか、又はAAV ITR若しくは非AAV ITRに由来し得る。例えば、ITRは、パルボウィルス及びディペンドウィルス（例えば、イヌパルボウィルス、ウ

10

20

30

40

50

シパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルス B-19) を包含する *Parvoviridae* 科に由来し得るか、又は SV40 複製の起源として役立つ SV40 ヘアピンは、切断、置換、欠失、挿入、及び／若しくは付加によって更に修飾され得る、ITR として使用され得る。*Parvoviridae* 科ウイルスは、2つの亜科：脊椎動物に感染する *Parvovirinae* 及び無脊椎動物に感染する *Densovirinae* からなる。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、及びヒツジ種を含むが、これらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能である、アデノ随伴ウイルス (AAV) のウイルスファミリーを含む。本明細書では便宜上、ceDNA ベクター中の発現カセットに対して 5' (その上流) に位置する ITR は、「5' ITR」又は「左 ITR」と称され、ceDNA ベクター中の発現カセットに対して 3' (その下流) に位置する ITR は、「3' ITR」又は「右 ITR」と称される。

10

【0081】

「野生型 ITR」又は「WT-ITR」は、例えば、Rep 結合活性及び Rep ニッキング能力を保持する、AAV 又は他のディペンドウイルスにおける天然に存在する ITR 配列の配列を指す。任意の AAV 血清型からの WT-ITR のヌクレオチド配列は、遺伝コード又はドリフトの縮退に起因して天然に存在する正準配列とわずかに異なる場合があり、したがって本明細書における使用のために包含される WT-ITR 配列は、産生プロセス中に発生する天然に存在する変化 (例えば、複製エラー) の結果として WT-ITR 配列を含む。

20

【0082】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称な WT-ITR」又は「実質的に対称な WT-ITR 対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する野生型 ITR である単一の ceDNA ゲノム又は ceDNA ベクター内の WT-ITR の対を指す。例えば、変化が配列の特性及び全体的な三次元構造に影響を及ぼさない限り、天然に存在する正準配列から逸脱する 1 つ以上のヌクレオチドを有する場合でも、ITR が野生型の配列であるとみなすことができる。いくつかの態様では、逸脱するヌクレオチドは、保存的配列変化を表す。非限定的な一例として、配列は、正準配列と少なくとも 95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性 (例えば、デフォルト設定で BLAST を使用して測定される) を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、他の WT-ITR に対して対称な三次元空間構成を有する。実質的に対称な WT-ITR は、三次元空間で同じ A、C-C'、及び B-B' ループを有する。実質的に対称な WT-ITR は、適切な Rep タンパク質と対合する作動可能な Rep 結合部位 (RBE 又は RBE') 及び末端分離部位 (TRS) を有することを決定することによって、WT として機能的に確認することができる。任意選択的に、許容条件下での導入遺伝子発現を含む他の機能を試験することができる。

30

【0083】

本明細書で使用される場合、「修飾型 ITR」又は「mod-ITR」又は「変異体 ITR」の語句は、本明細書で交換可能に使用され、同じ血清型からの WT-ITR と比較して、少なくとも 1 つ以上のヌクレオチドに変異を有する ITR を指す。変異は、同じ血清型の WT-ITR の三次元空間構成と比較して、ITR の A、C、C'、B、B' 領域のうちの 1 つ以上の変化をもたらし得、三次元空間構成 (すなわち、幾何学的空間におけるその三次元構造) の変化をもたらし得る。

40

【0084】

本明細書で使用される場合、「非対称 ITR 対」とも称される「非対称 ITR」という用語は、全長にわたって逆相補体ではない単一の ceDNA ゲノム又は ceDNA ベクター内の ITR の対を指す。非限定的な一例として、非対称 ITR 対は、それらの三次元構造が、幾何学的空間において異なる形状であるように、それらの同族 ITR に対して対称の三次元空間構成を有しない。言い換えると、非対称の ITR 対は、全体的な幾何学的構造が異なり、すなわち、三次元空間でのそれらの A、C-C'、及び B-B' ループの構成

50

が異なる（例えば、同族 I T R と比較して、1 つの I T R は、短い C - C ' アーム及び／又は短い B - B ' アームを有し得る）。2 つの I T R 間の配列の相違は、1 つ以上のヌクレオチド付加、欠失、切断、又は点変異に起因し得る。一実施形態では、非対称 I T R 対の一方の I T R は、野生型 A A V I T R 配列であり得、他方の I T R は、本明細書で定義される修飾型 I T R（例えば、非野生型又は合成 I T R 配列）であり得る。別の実施形態では、非対称 I T R 対のどちらの I T R も野生型 A A V 配列ではなく、2 つの I T R は、幾何学的空間において異なる形状（すなわち、異なる全体的な幾何学的構造）を有する修飾型 I T R である。いくつかの実施形態では、非対称 I T R 対の一方の m o d - I T R は、短い C - C ' アームを有することができ、他方の I T R は、それらが同族の非対称 m o d - I T R と比較して、異なる三次元空間構成を有するように異なる修飾（例えば、単一アーム、又は短い B - B ' アームなど）を有し得る。

10

【0085】

本明細書で使用される場合、「対称 I T R」という用語は、野生型又は変異型（例えば、野生型に対して修飾された）ディペンドウイルス I T R 配列であり、かつそれらの全長にわたって逆相補である、単一の c e D N A ゲノム又は c e D N A ベクター内の一対の I T R を指す。非限定的な一例において、両 I T R は、A A V 2 からの野生型 I T R 配列である。別の例では、いずれの I T R も野生型 I T R A A V 2 配列ではなく（すなわち、それらは、修飾型 I T R であり、変異体 I T R と称される）、ヌクレオチドの付加、欠失、置換、切断、又は点変異に起因して、野生型 I T R とは配列が異なり得る。本明細書では便宜上、c e D N A ベクター中の発現カセットに対して 5 '（その上流）に位置する I T R は、「5 ' I T R」又は「左 I T R」と称され、c e D N A ベクター中の発現カセットに対して 3 '（その下流）に位置する I T R は、「3 ' I T R」又は「右 I T R」と称される。

20

【0086】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称の修飾型 I T R」又は「実質的に対称の m o d - I T R 対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する単一の c e D N A ゲノム又は c e D N A ベクター内の修飾型 I T R の対を指す。例えば、修飾型 I T R は、変化が特性及び全体的な形状に影響を及ぼさない限り、逆相補配列から逸脱するいくつかのヌクレオチド配列がある場合でも、実質的に対称とみなすことができる。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の配列同一性（デフォルト設定で B L A S T を使用して測定される）を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、それらの同族の修飾型 I T R に対して対称な三次元空間構成を有する。言い換えると、実質的に対称な修飾型 I T R 対は、三次元空間に構成された同じ A、C - C '、及び B - B ' ループを有する。いくつかの実施形態では、m o d - I T R 対からの I T R は、異なる逆相補ヌクレオチド配列を有し得るが、依然として同じ対称な三次元空間構成を有し得る。すなわち、両方の I T R は、同じ全体的な三次元形状をもたらす変異を有する。例えば、m o d - I T R 対の 1 つの I T R（例えば、5 ' I T R）は、1 つの血清型に由来し得、他方の I T R（例えば、3 ' I T R）は、異なる血清型に由来し得るが、両方が同じ対応する変異を有し得（例えば、5 ' I T R が C 領域に欠失を有する場合、異なる血清型の同族の修飾型 3 ' I T R は、C ' 領域の対応する位置に欠失を有する）、それにより修飾型 I T R 対が同じ対称な三次元空間構成を有する。そのような実施形態では、修飾型 I T R 対の各 I T R は、A A V 2 及び A A V 6 の組み合わせなどの異なる血清型（例えば、A A V 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び 12）に由来し得、1 つの I T R の修飾は、異なる血清型の同族の I T R の対応する位置に反映される。一実施形態では、実質的に対称な修飾型 I T R 対は、I T R 間のヌクレオチド配列の相違が特性又は全体的な形状に影響を及ぼさず、それらが三次元空間で実質的に同じ形状を有する限り、一対の修飾型 I T R（m o d - I T R）を指す。非限定的な例として、m o d - I T R は、B L A S T（B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l）又はデフォルト設定の B L A S T N などの当該技術分野において周知の標準的な手段

30

40

50

によって決定される、正準 $mod-ITR$ に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、対称な三次元空間構成を有する。実質的に対称な $mod-ITR$ 対は、三次元空間で同じ A 、 $C-C'$ 及び $B-B'$ ループを有する。例えば、実質的に対称な $mod-ITR$ 対の修飾型 ITR が $C-C'$ アームの欠失を有する場合、同族の $mod-ITR$ は、 $C-C'$ ループの対応する欠失を有し、またその同族の $mod-ITR$ の幾何学的空間に同じ形状の残りの A 及び $B-B'$ ループの同様の三次元構造を有する。

【0087】

「隣接する」という用語は、別の核酸配列に関する1つの核酸配列の相対位置を指す。一般に、配列 ABC において、 B は A 及び C に隣接している。配列 $A \times B \times C$ についても同様である。したがって、隣接する配列は、隣接される配列の前又は後に続くが、隣接される配列と連続している、又はすぐ隣である必要はない。一実施形態では、隣接するという用語は、直鎖状二重鎖 $ceDNA$ ベクターの各末端における末端反復を指す。

10

【0088】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、及び／又は「治療」という用語は、状態の進行を抑制する、実質的に阻害する、遅らせる、若しくは逆転させる、状態の臨床症状を実質的に改善する、又は状態の臨床症状の出現を実質的に防ぐ、有益な若しくは望ましい臨床結果を得ることを含む。いくつかの実施形態によれば、状態は、 PKU である。治療することは、以下：(a) 障害の重症度を低減すること、(b) 治療される障害に特徴的な症状の発症を制限すること、(c) 治療される障害に特徴的な症状の悪化を制限すること、(d) 以前に障害を有していた患者において障害の再発を制限すること、及び(e) 以前に障害に対して無症候性であった患者において症状の再発を制限すること、のうちの1つ以上を達成することを更に指す。薬理学的及び／又は生理学的効果等の有益な又は所望の臨床結果は、疾患、障害又は状態の素因を有する可能性があるが、疾患の症状をまだ経験していないか、若しくは呈していない対象において疾患、障害又は状態が発生するのを防ぐこと（予防的治療）、疾患、障害又は状態の症状の緩和、疾患、障害又は状態の程度の減少、疾患、障害又は状態の安定化（すなわち、悪化させない）、疾患、障害又は状態の蔓延を防ぐこと、疾患、障害又は状態の進行を遅らせる又は遅くすること、疾患、障害又は状態の改善又は軽減、及びそれらの組み合わせ、同様に治療を受けていない場合に予想される生存と比較して生存を延長することを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0089】

本明細書で使用される場合、「増加する」、「増強する」、「上昇させる」という用語（及び同様の用語）は、一般に、天然、予測若しくは平均に対して、又は対照条件に対して、直接的又は間接的に、濃度、レベル、機能、活性、又は挙動を増加させる作用を指す。

【0090】

本明細書で使用される場合、「最小化させる」、「低減する」、「低下させる」、及び／又は「阻害する」という用語（並びに同様の用語）は、一般に、天然、予測若しくは平均に対して、又は対照条件に対して、直接的又は間接的にいずれかで、濃度、レベル、機能、活性、又は挙動を低減する作用を指す。

40

【0091】

本明細書で使用される場合、「 $ceDNA$ ゲノム」という用語は、少なくとも1つの逆位末端反復領域を更に組み込む発現カセットを指す。 $ceDNA$ ゲノムは、1つ以上のスペーサー領域を更に含み得る。いくつかの実施形態では、 $ceDNA$ ゲノムは、 DNA の分子間二重鎖ポリヌクレオチドとして、プラスミド又はウイルスゲノムに組み込まれる。

【0092】

本明細書で使用される場合、「 $ceDNA$ スペーサー領域」という用語は、 $ceDNA$ ベクター又は $ceDNA$ ゲノム中の機能的エレメントを分離する介在配列を指す。いくつかの実施形態では、 $ceDNA$ スペーサー領域は、最適機能性のため所望の距離で2つの

50

機能的エレメントを保持する。いくつかの実施形態では、c e D N A スペーサー領域は、例えば、プラスミド又はバキュロウイルス内の c e D N A ゲノムの遺伝的安定性を提供するか又は増大させる。いくつかの実施形態では、c e D N A スペーサー領域は、クローニング部位などに便利な位置を提供することによって、c e D N A ゲノムの容易な遺伝子操作を促進する。例えば、ある特定の態様では、いくつかの制限エンドヌクレアーゼ部位を含有するオリゴヌクレオチド「ポリリンカー」、又は既知のタンパク質（例えば、転写因子）結合部位を有しないように設計された非オープンリーディングフレーム配列を c e D N A ゲノム中に位置付けて、シス作用性因子を分離することができ、例えば、末端分離部位と、上流転写調節エレメントとの間に 2mer、3mer、5mer、6mer、10mer、11mer、12mer、18mer、24mer、30mer、48mer、86mer、176merなどを挿入する。同様に、スペーサーを、ポリアデニル化シグナル配列と 3'末端分離部位との間に組み込むことができる。

10

【0093】

本明細書で使用される場合、「Rep結合部位」、「Rep結合エレメント」、「RBE」、及び「RBS」は、交換可能に使用され、Repタンパク質（例えば、AAV Rep 78又はAAV Rep 68）の結合部位を指し、Repタンパク質による結合時に、Repタンパク質が、RBSを組み込む配列上でその部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を実施することを可能にする。RBS配列及びその逆相補体は、一緒に単一RBSを形成する。RBS配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、AAV2において特定されたRBS配列である 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号 20 60）を含む。任意の既知のRBS配列は、他の既知のAAV RBS配列及び他の天然に既知の又は合成RBS配列を含む、本開示の実施形態において使用され得る。理論に束縛されるものではないが、Repタンパク質のヌクレアーゼドメインは、二重鎖ヌクレオチド配列GCTCに結合し、したがって2つの既知のAAV Repタンパク質は、二重鎖オリゴヌクレオチド、5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3'（配列番号 60）に直接結合し、安定してアセンブリすると考えられる。加えて、可溶性凝集配座異性体（すなわち、不定数の相互関連Repタンパク質）は解離し、Rep結合部位を含有するオリゴヌクレオチドに結合する。各Repタンパク質は、各鎖上の窒素塩基及びホスホジエステル骨格の両方と相互作用する。窒素塩基との相互作用は、配列特異性を提供するが、ホスホジエステル骨格との相互作用は、非配列特異性又は低配列特異性 30 であり、タンパク質-DNA複合体を安定させる。

【0094】

本明細書で使用される場合、「末端分離部位」及び「TRS」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、Repが、細胞DNAポリメラーゼ、例えばDNA polデルタ又はDNA polイプシロンを介してDNA伸長の基質として役立つ3'OHを生成する5'チミジンとのチロシン-ホスホジエステル結合を形成する領域を指す。代替的に、Rep-チミジン複合体は、配位ライゲーション反応に関与し得る。いくつかの実施形態では、TRSは、最小限で非塩基対チミジンを包含する。いくつかの実施形態では、TRSのニッキング効率は、RBSからの同じ分子内のその距離によって少なくとも部分的に制御され得る。受容体基質が相補的ITRである場合、得られる産物は、分子間二重鎖 40 である。TRS配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、AAV2において特定されたヘキサヌクレオチド配列である 5'-GGTTGA-3'（配列番号 61）を含む。他の既知のAAV TRS配列、AGTT（配列番号 62）、GGTTGG（配列番号 63）、AGTTGG（配列番号 64）、AGTTGA（配列番号 65）などの他の天然に既知の又は合成TRS配列、及びRRTTTR（配列番号 66）などの他のモチーフを含む、任意の既知のTRS配列を、本開示の実施形態において使用することができる。

【0095】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-プラスミド」という用語は、分子間二重鎖としてceDNAゲノムを含むプラスミドを指す。

【0096】

50

本明細書で使用される場合、「c e D N A－バクミド」という用語は、E . c o l i iにおいてプラスミドとして伝播することができる分子間二重鎖としてc e D N Aゲノムを含み、それによりバキュロウイルスのシャトルベクターとして作動し得る、感染性バキュロウイルスゲノムを指す。

【0097】

本明細書で使用される場合、「c e D N A－バキュロウイルス」という用語は、バキュロウイルスゲノム内の分子間二重鎖としてc e D N Aゲノムを含むバキュロウイルスを指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、「c e D N A－バキュロウイルス感染昆虫細胞」及び「c e D N A－B I I C」という用語は、交換可能に使用され、c e D N A－バキュロウイルスに感染した無脊椎動物宿主細胞（限定されないが、昆虫細胞（例えば、S f 9細胞）を含む）を指す。

【0099】

本明細書で使用される場合、「c e D N A」という用語は、合成又はその他の非ウイルス遺伝子導入のためのカプシド不含閉端直鎖状二本鎖（double stranded、ds）二重鎖DNAを指す。c e D N Aの詳細な説明は、2017年3月3日出願された国際出願第US2017/020828号に記載されており、その全体の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。細胞ベースの方法を使用して様々な逆位末端反復（ITR）配列及び構成を含むc e D N Aの産生のためのある特定の方法は、2018年9月7日出願された国際特許出願第US18/49996号及び2018年12月6日出願された同第US2018/064242号の実施例1に記載されており、その各々は、その全体の参照により本明細書に組み込まれる。様々なITR配列及び構成を含む合成c e D N Aベクターの産生のためのある特定の方法は、例えば、2019年1月18日出願された国際特許出願第US2019/14122号に記載されており、その全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0100】

本明細書で使用される場合、「閉端DNAベクター」という用語は、少なくとも1つの共有結合性閉端を有し、ベクターの少なくとも一部が分子内二重鎖構造を有する、カプシド不含DNAベクターを指す。

【0101】

本明細書で使用される場合、「c e D N Aベクター」及び「c e D N A」という用語は、交換可能に使用され、少なくとも1つの末端パリンドロームを含む閉端DNAベクターを指す。いくつかの実施形態では、c e D N Aは、2つの共有結合性閉端を含む。

【0102】

本明細書で使用される場合、「neDNA」又は「ニックの入ったc e D N A」という用語は、オープンリーディングフレーム（例えば、発現されるプロモーター及び導入遺伝子）の5'上流のステム領域又はスパーサー領域に1～100塩基対のニック又はギャップを有する閉端DNAを指す。

【0103】

本明細書で使用される場合、「ギャップ」及び「ニック」という用語は交換可能に使用され、本開示の合成DNAベクターの中断された部分を指し、その他の二本鎖c e D N Aには一本鎖DNA部分のストレッチが作成される。ギャップは、二重鎖DNAの一本鎖の長さが1塩基対～100塩基対の長さであり得る。本明細書に記載される方法によって設計及び作成された典型的なギャップ、及び当該方法によって生成された合成ベクターは、長さが、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は60bpの長さであり得る。本開示における例示

的なギャップは、長さが1bp～10bpの長さ、1～20bpの長さ、1～30bpの長さであり得る。

【0104】

本明細書で定義されるように、「レポーター」は、検出可能な読み出しを提供するために使用することができるタンパク質を指す。レポーターは、一般に、蛍光、色、又は発光などの測定可能なシグナルを産生する。レポータータンパク質コード配列は、細胞又は生物中の存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定波長の光で励起された場合に細胞を蛍光させ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生じる反応を触媒させ、β-ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色産物に変換する。実験又は診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ(LacZ)、アルカリホスファターゼ(AP)、チミジンキナーゼ(TK)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、及び他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、並びに当該技術分野において周知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0105】

本明細書で使用される場合、「センス」及び「アンチセンス」という用語は、ポリヌクレオチド上の構造エレメントの配向を指す。エレメントのセンスバージョン及びアンチセンスバージョンは、互いの逆相補体である。

【0106】

本明細書で使用される場合、「合成AAVベクター」及び「AAVベクターの合成産生」という用語は、完全に無細胞環境でのAAVベクター及びその合成産生方法を指す。

20

【0107】

本明細書で使用される場合、「レポーター」は、検出可能な読み出しを提供するために使用することができるタンパク質を指す。レポーターは、一般に、蛍光、色、又は発光などの測定可能なシグナルを産生する。レポータータンパク質コード配列は、細胞又は生物中の存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定波長の光で励起された場合に細胞を蛍光させ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生じる反応を触媒させ、β-ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色産物に変換する。実験又は診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ(LacZ)、アルカリホスファターゼ(AP)、チミジンキナーゼ(TK)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、及び他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、並びに当該技術分野において周知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0108】

本明細書で使用される場合、「エフェクタータンパク質」という用語は、例えば、レポーターポリペプチドとして、あるいはより適切には、細胞を殺傷するポリペプチド、例えば毒素、又は選択された薬剤若しくはその欠失で細胞を殺傷しやすくする薬剤として、検出可能な読み出しを提供するポリペプチドを指す。エフェクタータンパク質は、宿主細胞のDNA及び／又はRNAを直接標的又は損傷する任意のタンパク質又はペプチドを含む。例えば、エフェクタータンパク質としては、宿主細胞DNA配列を標的とする制限エンドヌクレアーゼ(ゲノム因子であるか染色体外因子であるかにかかわらず)、細胞生存に必要なポリペプチドを標的とするプロテアーゼ、DNAギラーゼ阻害剤、及びリボヌクレアーゼ型毒素が挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成生物的回路によって制御されるエフェクタータンパク質の発現は、別の合成生物的回路における因子として関与し得、それによって生物的回路系の応答性の範囲及び複雑性を拡張する。

40

【0109】

転写調節因子は、PAHなどの関心対象の遺伝子の転写を活性化又は抑制する、転写アクチベーター及びリプレッサーを指す。プロモーターは、特定の遺伝子の転写を開始する核酸の領域である。転写アクチベーターは、典型的に、転写プロモーターの近くに結合し

50

、RNAポリメラーゼを動員して転写を直接開始する。リプレッサーは、転写プロモーターに結合し、RNAポリメラーゼによる転写開始を立体的に妨害する。他の転写調節因子は、それらが結合する場所、並びに細胞条件及び環境条件に応じて、アクチベーター又はリプレッサーのいずれかとして役立ち得る。転写調節因子クラスの特例としては、ホメオドメインタンパク質、亜鉛フィンガータンパク質、翼状らせん（フォークヘッド）タンパク質、及びロイシンジッパータンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

本明細書で使用される場合、「リプレッサータンパク質」又は「誘導因子タンパク質」は、調節配列エレメントに結合するタンパク質であり、調節配列エレメントに作動可能に連結した配列の転写をそれぞれ抑制又は活性化する。本明細書に記載される好ましいリプレッサー及び誘導因子タンパク質は、少なくとも1つの入力剤又は環境入力の存在又は不在に敏感である。本明細書に記載される好ましいタンパク質は、例えば、分離可能なDNA結合及び入力剤結合、又は応答性エレメント若しくはドメインを含む形態のモジュールである。

【0111】

本明細書で使用される場合、「担体」としては、任意かつ全ての溶媒、分散媒質、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、懸濁液、コロイドなどが挙げられる。医薬活性物質に対するそのような媒質及び薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補充的活性成分を組成物に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与された場合に、毒性反応、アレルギー性反応、又は同様の不都合な反応を生じない分子実体及び組成物を指す。

【0112】

本明細書で使用される場合、「入力剤反応性ドメイン」は、条件又は入力剤に結合するか、又はそうでなければ連結DNA結合融合ドメインをその条件若しくは入力剤の存在に対して反応性にするように、条件又は入力剤に反応する転写因子のドメインである。一実施形態では、条件又は入力剤の存在は、入力剤反応性ドメイン又はそれが融合するタンパク質の立体構造変化をもたらす、それが転写因子の転写調節活性を修飾する。

【0113】

「インビボ」という用語は、多細胞動物などの生物中又は生物内で起こるアッセイ又はプロセスを指す。本明細書に記載される態様のいくつかでは、方法又は使用は、細菌等の単細胞生物が使用されるときに「インビボで」起こると言われ得る。「エクスピボ」という用語は、多細胞動物又は植物、例えば、とりわけ外植片、培養細胞（一次細胞及び細胞株を含む）、形質転換細胞株、及び抽出組織又は細胞（血液細胞を含む）の体外に無傷膜を有する生細胞を使用して実施される方法及び使用を指す。「インビトロ」という用語は、細胞抽出物などの無傷膜を有する細胞の存在を必要としないアッセイ及び方法を指し、非細胞系、例えば細胞抽出物などの細胞又は細胞系を含まない媒質にプログラム可能な合成生物的回路を導入することを指し得る。

【0114】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、標的遺伝子（例えば、タンパク質又はRNAをコードする異種標的遺伝子）であり得る、核酸配列の転写を駆動することによって、別の核酸配列の発現を調節する任意の核酸配列を指す。プロモーターは、構成的、誘導性、抑制性、組織特異性、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。プロモーターは、核酸配列の残りの転写の開始及び速度が制御される、核酸配列の制御領域である。プロモーターはまた、RNAポリメラーゼ及び他の転写因子等の調節タンパク質及び分子が結合し得る、遺伝子エレメントを含有し得る。本明細書に記載される態様のいくつかの実施形態では、プロモーターは、プロモーター自体の発現を調節する転写因子の発現を駆動することができる。プロモーター配列内では、転写開始部位、同様に、RNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメインが見出されるであろう。真核生物プロモーターは、必ずしもそうではないが、多くの場合、「TATA」ボックス及び「CAT」ボックスを含有する。誘導性プロモーターを含む様々なプロモーターを使用して、

本明細書に開示される c e D N A ベクター中の導入遺伝子の発現を駆動することができる。プロモーター配列は、その 3' 末端で転写開始部位によって結合され得、バックグラウンドより上で検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基又はエレメントを含むように上流 (5' 配向) に伸びる。特定の実施形態によれば、プロモーターは、V D プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン (h A A T) プロモーター (h A A T (9 7 9) プロモーター及び C p G m i n _ _ h A A T プロモーター (例えば、h A A T _ _ c o r e _ _ C 0 6、h A A T _ _ c o r e _ _ C 0 7、h A A T _ _ c o r e _ _ C 0 8、h A A T _ _ c o r e _ _ C 0 9、h A A T _ _ c o r e _ _ C 1 0、又は h A A T _ _ コア切断型) を含む)、並びに最小 T T R (T T R m) を含むトランスサイレチン (T T R) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

10

【0115】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、1つ以上のタンパク質 (例えば、活性因子タンパク質又は転写因子) に結合して、核酸配列の転写活性化を増加させるシス作用性調節配列 (例えば、50~1, 500 塩基対) を指す。エンハンサーは、それらが調節する遺伝子開始部位の上流又は遺伝子開始部位の下流で最大 1, 000, 000 塩基対に位置付けられ得る。エンハンサーは、非関連遺伝子のイントロン領域内又はエキソン領域内に位置付けられ得る。いくつかの実施形態によれば、エンハンサーは、ヒト起源又は他の哺乳動物起源 (例えば、ブッシュベイビー又はチャニーズツパイ) のセルピンエンハンサー (S e r p E n h)、T T R エンハンサー (T T R e)、肝臓核因子 1 結合部位 (H N F 1)、肝臓核因子 4 結合部位 (H N F 4)、ヒトアポリポタンパク質 E / C - I 肝臓特異的エンハンサー (A p o E E n h)、プロアルブミン遺伝子 (P r o E n h) 由来のエンハンサー領域、C p G 最小化 A p o E エンハンサー (例えば、本明細書に記載される A p o E エンハンサー C 0 3、A p o E エンハンサー C 0 4、A p o E エンハンサー C 0 9、又は A p o E エンハンサー C 1 0)、H C R 1 フットプリント 1 2 3 (埋め込まれた H C R 1 フットプリント 1 2 3)、肝臓核内因子エンハンサーアレイ (埋め込まれたエンハンサー H N F アレイ)、及びヒトアポリポタンパク質 E / C - I 肝臓特異的エンハンサーの誘導体 (例えば、A p o E E n h v 2) からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、エンハンサーは、多数 (例えば、タンデム反復) の単一のエンハンサーエレメント、又は 3 x H N F 1 - 4 _ _ プロアルブミンエンハンサー (c e D N A 1 4 7 1 と同様に、エンハンサーが T T R プロモーターに連結されている) 若しくは 5 x H N F 1 _ _ プロアルブミンエンハンサー (c e D N A 1 4 7 3 と同様に、エンハンサーが T T R プロモーターに連結されている) のような異なるタイプのエンハンサーであり得る。いくつかの実施形態によれば、H N F 1 及び / 又は H N F 4 などの多数のエンハンサーは、各 2 つのエンハンサーエレメント間にスパーサー領域 (例えば 1 ~ 20 ヌクレオチド、又は約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは 20 ヌクレオチド) を含有し得る。

20

30

【0116】

プロモーターは、それが調節する核酸配列の発現を駆動する、又は転写を駆動することができる。「操作可能に連結された」、「作動可能に位置付けられた」、「作動可能に連結された」、「制御下」、及び「転写制御下」という語句は、プロモーターが、核酸配列に関して正しい機能的位置及び / 又は配向にあり、その配列の転写開始及び / 又は発現を制御するように調節することを示す。本明細書で使用される場合、「逆位プロモーター」は、核酸配列が逆配向にあるプロモーターを指し、それによりコード鎖であったものは、今は非コード鎖であり、逆も同様である。逆位プロモーター配列を様々な実施形態で使用して、スイッチの状態を調節することができる。加えて、様々な実施形態では、プロモーターをエンハンサーと併せて使用することができる。

40

【0117】

プロモーターは、所与の遺伝子又は配列のコードセグメント及び / 又はエキソンの上流に位置する 5' 非コード配列を単離することによって取得され得る、遺伝子又は配列と天然に関連するものであり得る。このようなプロモーターは、「内因性」と呼ばれ得る。同

50

様に、いくつかの実施形態では、エンハンサーは、その配列の下流又は上流のいずれかに位置する、核酸配列と天然に関連するものであり得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、コード核酸セグメントは、「組換えプロモーター」又は「異種プロモーター」の制御下で位置付けられ、これらの両方は、その自然環境において作動可能に連結されたコードされた核酸配列と通常は関連しないプロモーターを指す。組換え又は異種エンハンサーは、その自然環境において所与の核酸配列と通常は関連しないエンハンサーを指す。そのようなプロモーター又はエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーター又はエンハンサー、任意の他の原核、ウイルス、又は真核細胞から単離されたプロモーター又はエンハンサー、及び「天然に存在」しない合成プロモーター又はエンハンサーを含み得、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、及び／又は当該技術分野において既知である遺伝子操作の方法を通じて発現を変更する変異を含み得る。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、プロモーター配列は、本明細書に開示される合成生物的回路及びモジュールに関して、PCRを含む組換えクローニング及び／又は核酸増幅技術を使用して産生され得る（例えば、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたく、各々は参照により本明細書に組み込まれる）。更に、ミトコンドリア、クロロプラスト等の非核性細胞小器官内の配列の転写及び／又は発現を配向する制御配列が同様に用いられ得ることが企図される。このような組換え又は異種プロモーター／エンハンサーの非限定的な例としては、TTTRプロモーターを有するセルピンエンハンサー（「Vandendriescheプロモーター」（VD）又はVandendriesche（VD）プロモーターセットと称される；例えば、米国特許第10,149,914号（参照により本明細書に組み込まれる）を参照）、又はTTTRプロモーターを有する3×セルピンエンハンサー（「3×VD」プロモーターセットと称される；例えば、米国特許出願公開第2018/0071406（A1）号（参照により本明細書に組み込まれる）を参照）。

10

20

【0119】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、プロモーターセットであり得る。本明細書で使用される「プロモーターセット」という用語は、本明細書で定義される1つ以上のプロモーター（又はプロモーター配列）及び本明細書で定義される1つ以上のエンハンサー（又はエンハンサー配列）を含むシステムを指す。本明細書で使用される「プロモーターセット」という用語は、プロモーター及びエンハンサーエレメント又は配列が、約1～50ヌクレオチド長（例えば約2、5、7、8、10、11、12、13、15、17、18、20、22、23、25、27、28、30、32、33、35、37、38、40、42、43、45、47、48、又は50ヌクレオチド長）であるスペーサー領域又は配列によって分離されている配列を包含する。

30

【0120】

本明細書で交換可能に使用される「DNA調節配列」、「制御エレメント」、及び「調節エレメント」という用語は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナルなどの転写及び翻訳制御配列を指し、これらは非コード配列（例えば、DNA標的化RNA）又はコード配列（例えば、部位特異的修飾ポリペプチド若しくはCas9/Csn1ポリペプチド）の転写を提供及び／若しくは調節し、かつ／又はコードされたポリペプチドの翻訳を調節する。

40

【0121】

「作動可能に連結された」とは、そのように記載された構成成分が、それらが意図された方法で機能することを許可する関係にある並列を指す。例えば、プロモーターがその転写又は発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列に操作可能に連結されている。「発現カセット」は、DNA配列、例えば、ceDNAベクターにおける導入遺伝子の転写を指示するのに十分なプロモーター又は他の調節配列に作動可能に連結されている異種DNA配列を含む。好適なプロモーターには、例えば、組織特異的プロモーターが含まれる。プロモーターは、AAV起源でもあり得る。

50

【0122】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、本開示による c e D N A ベクターでの予防的治療を含む治療が提供される、ヒト又は動物を指す。通常、動物は、限定されないが、霊長類、げっ歯類、飼育動物、又は狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、及びマカク、例えば、アカゲザルが挙げられるが、これらに限定されない。げっ歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、及びハムスターが挙げられる。飼育動物及び狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、飼いネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、トリ種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、並びに魚、例えば、トラウト、ナマズ、及びサケが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される態様のある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類又はヒトである。対象は、男性又は女性であり得る。追加的に、対象は、幼児又は子供であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、新生児又は胎児対象であり得、例えば、対象は、子宮内に存在する。好ましくは、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、又はウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、疾患及び障害の動物モデルを代表する対象として有利に使用され得る。加えて、本明細書に記載される方法及び組成物は、飼育動物及び／又はペットに使用され得る。ヒト対象は、任意の年齢、性別、人種、又は民族グループ、例えば、コーカサス人（白人）、アジア人、アフリカ人、黒人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ系ヨーロッパ人、ラテンアメリカ系、中東系等であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、臨床設定において患者又は他の対象であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、既に治療を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、胚、胎児、新生児、幼児、子供、青年、又は成人である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト胎児、ヒト新生児、ヒト幼児、ヒト子供、ヒト青年、又はヒト成人である。いくつかの実施形態では、対象は、動物胚、又は非ヒト胚若しくは非ヒト霊長類胚である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト胚である。

10

20

【0123】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本開示の核酸構築物又は c e D N A 発現ベクターによる形質転換、トランスフェクション、形質導入などを受けやすい任意の細胞型を含む。非限定的な例として、宿主細胞は、単離された初代細胞、多能性幹細胞、C D 3 4 ⁺細胞）、人工多能性幹細胞、又はいくつかの不死化細胞株（例えば、H e p G 2 細胞）のいずれかであり得る。代替的に、宿主細胞は、組織、器官、又は生物におけるインサイチュ又はインビボの細胞であり得る。

30

【0124】

「外因性」という用語は、その天然源以外の細胞に存在する物質を指す。本明細書で使用する「外因性」という用語は、通常見られず、核酸又はポリペプチドをそのような細胞又は生物に導入することが望まれる、人間の手が関与するプロセスによって細胞又は生物等の生物系に導入された核酸（例えば、ポリペプチドをコードする核酸）又はポリペプチドを指し得る。代替的に、「外因性」とは、それが比較的少量で見られ、細胞又は生物における核酸又はポリペプチドの量を増加させること、例えば、異所性発現又はレベルをもたらすことが望まれる、人間の手が関与するプロセスによって細胞又は生物等の生物系に導入された核酸又はポリペプチドを指し得る。これとは対照的に、「内因性」という用語は、生物系又は細胞に対して天然である物質を指す。

40

【0125】

「配列同一性」という用語は、2つの核酸配列間の関連性を指す。本開示の目的のために、2つのデオキシリボヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、E M B O S S パッケージの N e e d l e プログラム（E M B O S S : T h e E u r o p e a n M o l e c u l a r B i o l o g y O p e n S o f t w a r e S u i t e , R i c e e t a l . , 2 0 0 0 , 上記）、好ましくはバージョン 3 . 0 . 0 以降において実装されるように、N e e d l e m a n - W u n s c h アルゴリズム（N e e d l e m a n a n d

50

Wunsch, 1970, 上記) を使用して決定される。使用される任意のパラメータは、ギャップオープンペナルティ10、ギャップ拡張ペナルティ0.5、及びEDNAFULL (NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン) 置換マトリックスである。「最長同一性」とラベル付けされたNeedleの出力(−nobriefオプションを使用して取得される)は、同一性パーセントとして使用され、次のように計算される：(同一のデオキシリボヌクレオチド×100) / (アラインメントの長さ−アラインメントにおけるギャップの総数)。アラインメントの長さは、好ましくは少なくとも10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも25ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも100ヌクレオチドである。

【0126】

本明細書で使用される「相同性」又は「相同」という用語は、必要に応じて配列を整列させ、ギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、標的染色体上の対応する配列のヌクレオチド残基と同一であるヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。ヌクレオチド配列相同性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2、又はMegaalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当該技術分野の範囲内である様々な方式で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。いくつかの実施形態では、例えば相同性アームの核酸配列(例えば、DNA配列)は、配列が、宿主細胞の対応する未変性又は未編集の核酸配列(例えば、ゲノム配列)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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%以上同一である場合、「相同」とみなされる。

【0127】

本明細書で使用される「異種」という用語は、それぞれ天然の核酸又はタンパク質には見られない核酸又はポリペプチド配列を意味する。異種核酸配列は、天然に存在する核酸配列(又はそのバリエーション)に(例えば、遺伝子操作によって)連結されて、キメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列を生成し得る。異種核酸配列は、バリエーションポリペプチドに(例えば、遺伝子操作によって)連結されて、融合バリエーションポリペプチドをコードする核酸配列を生成し得る。

【0128】

「ベクター」又は「発現ベクター」は、細胞において結合されたセグメントの複製をもたらすために別のDNAセグメント、すなわち「挿入」が結合され得る、プラスミド、バクミド、ファージ、ウイルス、ビリオン、又はコスミドなどのレプリコンである。ベクターは、宿主細胞への送達のために、又は異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸構築物であり得る。本明細書で使用される場合、ベクターは、起源及び／又は最終形態でウイルス性又は非ウイルス性であり得るが、本開示の目的のために、「ベクター」は、その用語が本明細書で使用される場合、一般にceDNAベクターを指す。「ベクター」という用語は、適切な制御エレメントと関連する場合に複製することができ、遺伝子配列を細胞に移すことができる任意の遺伝子エレメントを包含する。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクター又は組換えベクターであり得る。

【0129】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNA又はポリペプチドの発現を指示するベクターを指す。発現される配列は、多くの場合、しかし必ずしもそうではないが、細胞にとって異種である。発現ベクターは、追加のエレメントを含むことができ、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有することができるため、それを2つの生物、例えば発現の場合はヒト細胞、並びにクローニング及び増幅の場合は原核生物宿主で維持することができる。「発現」と

10

20

30

40

50

いう用語は、RNA及びタンパク質、また必要に応じて、例えば、転写、転写処理、翻訳及びタンパク質の折りたたみ、修飾及び処理を含むがこれらに限定されない分泌タンパク質の産生に関与する細胞プロセスを指す。「発現産物」には、遺伝子から転写されたRNA、及び遺伝子から転写されたmRNAの翻訳によって得られたポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に作動可能に連結された場合に、インビトロ又はインビボでRNAに転写される核酸配列(DNA)を意味する。遺伝子には、コード領域の前後の領域、例えば、5'未翻訳(5'UTR)又は「リーダー」配列及び3'UTR又は「トレーラー」配列、同様に、個々のコードセグメント(エキソン)間の介在配列(イントロン)が含まれる場合及び含まれない場合がある。

【0130】

10

「組換えベクター」とは、インビボで発現することができる核酸配列(例えば、異種核酸)又は「導入遺伝子」を含むベクターを意味する。本明細書に記載されるベクターは、いくつかの実施形態では、他の好適な組成物及び療法と組み合わせることができることを理解されたい。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソームである。好適なエピソームベクターの使用は、対象における目的のヌクレオチドを高コピー数の染色体外DNAに維持し、それによって染色体組み込みの潜在的な影響を排除する手段を提供する。

【0131】

本明細書で使用される「遺伝性疾患」という語句は、ゲノムの1つ以上の異常、特に出生時から存在する状態によって部分的又は完全に、直接的又は間接的に引き起こされる疾患を指す。異常は、変異、挿入、又は欠失であり得る。異常は、遺伝子のコード配列又はその調節配列に影響を与える可能性がある。遺伝性疾患は、PKU、DMD、血友病、嚢胞性線維症、ハンチントン舞踏病、家族性高コレステロール血症(LDL受容体欠損)、肝芽腫、ウィルソン病、先天性肝ポルフィリン症、肝代謝の遺伝性障害、レッシュ・ナイハン症候群、鎌状赤血球貧血、サラセミア、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、及びテイ・サックス病であり得るが、これらに限定されない。

20

【0132】

本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」又は「含む(comprises)」という用語は、方法又は組成物に必須であるが、必須であるか否かにかかわらず、不特定エレメントの包含に対して開かれている、その組成物、方法、及びそれぞれの構成成分に関して使用される。

30

【0133】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、所与の実施形態に必要なエレメントを指す。この用語は、その実施形態の基本的かつ新規又は機能的な特徴に物質的に影響を及ぼさないエレメントの存在を許容する。「含む」の使用は、限定ではなく包含を示す。

【0134】

「からなる」という用語は、実施形態の説明において列挙されてない任意のエレメントを除いて、本明細書に記載される組成物、方法、及びそれらのそれぞれの構成成分を指す。

40

【0135】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、所与の実施形態に必要なエレメントを指す。この用語は、本開示のその実施形態の基本的及び新規又は機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない追加の要素の存在を許容する。

【0136】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「方法」に対する言及は、本明細書に記載される、及び／又は本開示などを読むことにより当業者に明らかとなるであろうタイプの1つ以上の方法、及び／又はステップを含む。同様に、「又は」という語は、文脈が別途明らかに示されない限り、「及び」を

50

含むことが意図される。本明細書に記載されるものと同様又は同等の方法及び材料を、本開示の実施又は試験において使用することができるが、好適な方法及び材料は、下記で説明される。省略形「例えば (e. g.)」は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書では非限定例を示すように使用される。したがって、略語「例えば (e.g.)」は、「例えば (for example)」と同義である。

【0137】

本明細書に開示される本開示の代替エレメント又は実施形態のグループ化は、限定として解釈されるべきではない。各郡のメンバーは、個別に、又は群の他のメンバー又は本明細書で見られる他のエレメントとの任意の組み合わせで参照及び主張することができる。群の1つ以上のメンバーは、利便性及び／又は特許性の理由から、群に含まれるか、又は群から削除することができる。そのような任意の包含又は削除が発生した場合、本明細書では、明細書が修正されたグループを含むとみなされ、したがって添付の特許請求の範囲で使用されている全てのマーカッシュグループの記述を満たす。

【0138】

態様のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される開示は、人間のクローン化プロセス、人間の生殖細胞系列の遺伝的同一性を修正するプロセス、産業若しくは商業目的でのヒト胚の使用、又は人間若しくは動物にいかなる実質的な医学的利益ももたらすことなく苦しみを引き起こす可能性が高い動物、及びそのようなプロセスから生じる動物の遺伝的同一性を修正するためのプロセスに関係しない。

【0139】

本明細書では、本開示の様々な態様の説明内で他の用語が定義されている。

【0140】

本出願全体を通して引用される参考文献、発行された特許、公開された特許出願、及び同時係属中の特許出願を含む全ての特許及び他の刊行物は、例えば、本明細書に記載の技術に関連して使用され得るかかると刊行物に記載される方法論を説明及び開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。これらの出版物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供されている。この点に関するいかなるものも、発明者が先行する開示のおかげで、又はいかなる他の理由のためにもそのような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。日付に関する全ての記述又はこれらの文書の内容に関する表現は、出願人が入手できる情報に基づいており、これらの文書の日付又は内容の正確さに関するいかなる承認も構成するものではない。

【0141】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、又は本開示を開示された正確な形態に限定することを意図したものではない。本開示の特定の実施形態及び実施例が、例示の目的で本明細書で説明されているが、当業者が認識するように、本開示の範囲内で様々な同等の修正が可能である。例えば、方法のステップ又は機能は、所与の順序で提示されるが、代替的な実施形態は、異なる順序で機能を実施してもよく、又は機能は実質的に同時に実施されてもよい。本明細書で提供される開示の教示は、必要に応じて他の手順又は方法に適用することができる。本明細書に記載される様々な実施形態は、更なる実施形態を提供するために組み合わせることができる。本開示の態様は、必要に応じて、上記の参考文献及び出願の組成物、機能、及び概念を用いて本開示の更なる実施形態を提供するように修正することができる。更に、生物学的機能の同等性の考慮により、種類又は量の生物学的又は化学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造にいくつかの変更を加えることができる。詳細な説明に照らして、これらの変更及び他の変更を本開示に加えることができる。そのような修正は全て、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

【0142】

前述の実施形態のいずれかの特定のエレメントは、他の実施形態のエレメントと組み合わせるか、又は置き換えることができる。更に、本開示のある特定の実施形態に関連する利点が、これらの実施形態の文脈で説明されたが、他の実施形態もそのような利点を示し

得、全ての実施形態が本開示の範囲内にあるために必ずしもそのような利点を示す必要はない。

【0143】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によって更に説明されており、決してこれらを更に限定するものと解釈されるべきではない。本開示は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬などに限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を限定することを意図されない。

【0144】

II. 閉端DNA (ceDNA) ベクターからのPAHタンパク質の発現

本明細書に記載される技術は、一般に、非ウイルス性DNAベクター、例えば、本明細書に記載されるceDNAベクターからの細胞におけるPAHタンパク質の発現及び／又は産生を対象とする。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書において「ceDNAベクター全般」と題されたセクションに記載されている。特に、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、一対のITR（例えば、本明細書に記載される対称又は非対称）、及びITR対の間にPAHタンパク質をコードする核酸を含み、核酸が、本明細書に記載されるようにコドン最適化され、プロモーター又は調節配列に作動可能に連結される。従来のAAVベクター、更にはレンチウイルスベクターを超える、PAHタンパク質の発現に対するceDNAベクターの明確な利点は、所望のタンパク質をコードする核酸配列にサイズの制約がないことである。したがって、全長6.8 kbのPAHタンパク質でさえ、単一のceDNAベクターから発現することができる。したがって、本明細書に記載されるceDNAベクターを使用して、それを必要とする対象、例えば、PKUを有する対象において治療用PAHタンパク質を発現することができる。

【0145】

理解されるように、本明細書に記載されるceDNAベクター技術は、任意のレベルの複雑さに適合させることができるか、又はPAHタンパク質の異なる構成成分の発現が独立した様式で制御され得るモジュール方式で 사용할ことができる。例えば、本明細書で設計されたceDNAベクター技術は、単一のceDNAベクターを使用して単一の遺伝子配列（例えば、PAHタンパク質）を発現すると同様に簡単であり得るか、又は複数のceDNAベクターを使用する場合と同様に複雑であり得、各ベクターは、異なるプロモーターによって各々独立して制御される複数のPAHタンパク質若しくは関連する補因子又はアクセサリタンパク質を発現する。以下の実施形態は、本明細書で具体的に企図され、必要に応じて当業者が適応させることができる。

【0146】

一実施形態では、単一のceDNAベクターを使用して、PAHタンパク質の単一の構成成分を発現することができる。代替的に、単一のceDNAベクターを使用して、単一のプロモーター（強力なプロモーターなど）の制御下で、PAHタンパク質の複数の構成成分（例えば、少なくとも2つ）を発現することができ、任意選択的にIRES配列を使用して、構成成分の各々、例えば、補因子又はアクセサリタンパク質の適切な発現を確実にする。

【0147】

本開示によれば、ヒトPAHタンパク質をコードする核酸は、コドン最適化されている。

【0148】

ceDNAベクター技術の更なるバリエーションは、当業者によって想定され得るか、又は従来のベクターを使用するタンパク質産生方法から適合され得る。

【0149】

A. 核酸

潜在的な治療用途の核酸分子の特徴付け及び開発が本明細書に提供される。本明細書に記載されるように、治療用途のための核酸はPAHタンパク質をコードし、核酸がコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、必要に応じて、改変及び向上されたインビボ特性（送達、安定性、寿命、フォールディング、標的特異性）を目的としたオリゴヌクレオチドの化学的修飾、同様に、治療用途と直接関連するそれらの生物学的機能及び機序が、記載される。

【0150】

免疫刺激性であり得、かつ本明細書に開示される免疫抑制剤の使用を必要とし得る、本開示の例示的な治療用核酸としては、ミニ遺伝子、プラスミド、ミニサークル、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、リボザイム、閉端二本鎖DNA (例えば、ceDNA、CELiD、直鎖状の共有結合的閉鎖状DNA (「ミニストリング」)、doggybone (dbDNA (商標)) DNA、プロテロメア閉端DNA、又はダンベル直鎖状DNA)、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)、ガイドRNA (gRNA)、マイクロRNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、及びDNAウイルスベクター、ウイルス性RNAベクター、並びにそれらの任意の組み合わせを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0151】

いくつかの実施形態によれば、治療用核酸は、閉端二本鎖DNA、例えば、ceDNAである。いくつかの実施形態によれば、細胞における治療用タンパク質の発現及び／又は産生は、非ウイルス性DNAベクター、例えば、ceDNAベクターに由来する。治療用タンパク質の発現のための、従来のAAVベクター、更にはレンチウイルスベクターに対するceDNAベクターの明確な利点は、所望のタンパク質をコードする核酸配列（例えば、異種核酸配列）にサイズの制約がないことである。したがって、大きな治療用タンパク質でさえ、単一のceDNAベクターから発現することができる。したがって、ceDNAベクターを使用して、それを必要とする対象において治療用タンパク質を発現させることができる。

【0152】

一般に、本明細書に開示される治療用タンパク質の発現のためのceDNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、関心対象の核酸配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、及び第2のAAV ITRを含む。ITR配列は、(i)少なくとも1つのWT ITR及び少なくとも1つの修飾型AAV逆位末端反復(mod-ITR)（例えば、非対称の修飾型ITR）、(ii) mod-ITR対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2つの修飾型ITR（例えば、非対称の修飾型ITR）、又は(iii)各WT-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称のWT-WT ITR対、又は(iv)各mod-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の修飾型ITR対のうちのいずれかから選択される。

【0153】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質をコードする導入遺伝子はまた、分泌配列もコードすることができ、それによりPAHタンパク質は、ゴルジ装置及び小胞体に向けられ、PAHタンパク質がERを通過して細胞から出ると、シャペロン分子によって正しい立体構造に折りたたまれる。例示的な分泌配列には、VH-02（配列番号88）及びVK-A26（配列番号89）及びIgκシグナル配列（配列番号126）、並びにタグ付きタンパク質がサイトゾルから分泌されるのを可能にするGluc分泌シグナル（配列番号188）、タグ付きタンパク質をゴルジ体に向けるTMD-ST分泌配列（配列番号189）が含まれるが、これらに限定されない。

【0154】

調節スイッチを使用して、PAHタンパク質の発現を微調整することもでき、それによりPAHタンパク質は、必要に応じて（所望の発現レベル又は量でのPAHタンパク質の

10

20

30

40

50

発現を含むが、これに限定されない）、又は代替的に細胞シグナル伝達事象を含む特定のシグナルの存在又は不在がある場合に発現される。例えば、本明細書に記載されるように、c e D N AベクターからのP A Hタンパク質の発現は、本明細書において「調節スイッチ」と題されたセクションに記載されるように、特定の状態が発生したときにオン又はオフにすることができる。

【0155】

例えば、また単なる例示の目的のために、P A Hタンパク質を使用して、P A Hタンパク質の高すぎるレベルの産生などの望ましくない反応を止めることができる。P A H遺伝子は、P A Hタンパク質を所望の細胞にもたらしするためにシグナルペプチドマーカ含有し得る。しかしながら、いずれの状況でも、P A Hタンパク質の発現を調節することが望ましい場合がある。c e D N Aベクターは、調節スイッチの使用に容易に対応する。

10

【0156】

従来のA A Vベクター、更にはレンチウイルスベクターよりもc e D N Aベクターの明確な利点は、P A Hタンパク質をコードする核酸配列（例えば、異種核酸配列）にサイズの制約がないことである。したがって、全長P A H、並びに任意選択的にいかなる補因子又は評価タンパク質でさえも、単一のc e D N Aベクターから発現することができる。更に、必要な原子化学に応じて、同じP A Hタンパク質の複数のセグメントを発現させることができ、同じ又は異なるプロモーターを使用することができ、また調節スイッチを使用して各領域の発現を微調整することができる。例えば、実施例に示されるように、デュアルプロモーター系を含むc e D N Aベクターを使用することができ、それによりP A Hタンパク質の各ドメインに異なるプロモーターが使用される。P A Hタンパク質を産生するためのc e D N Aプラスミドの使用は、機能的P A Hタンパク質の形成のための各ドメインの適切な比率をもたらす、P A Hタンパク質のドメインの発現のためのプロモーターの独自の組み合わせを含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターを使用して、P A Hタンパク質の異なる領域を別々に（例えば、異なるプロモーターの制御下で）発現することができる。

20

【0157】

別の実施形態では、c e D N Aベクターから発現されるP A Hタンパク質は、蛍光、酵素活性、分泌シグナル、又は免疫細胞アクチベーターなどの追加の機能を更に含む。

【0158】

30

いくつかの実施形態では、P A Hタンパク質をコードするc e D N Aは、例えば、リンカードメインを更に含むことができる。本明細書で使用される場合、「リンカードメイン」は、本明細書に記載されるP A Hタンパク質のドメイン／領域のうちのいずれかを一緒に連結する、長さが約2～100アミノ酸のオリゴ又はポリペプチド領域を指す。いくつかの実施形態では、リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに対して自由に移動できるように、グリシン及びセリンなどの柔軟な残基を含むか、又はそれらから構成され得る。2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないようにすることが望ましい場合は、より長いリンカーを使用することができる。リンカーは、切断可能であるか、又は切断不可能であり得る。切断可能なリンカーの例には、2 Aリンカー（例えば、T 2 A）、2 A様リンカー又はそれらの機能的同等物、及びそれらの組み合わせが含まれる。リンカーは、T h o s e a a s i g n aウイルスに由来するT 2 Aであるリンカー領域であり得る。

40

【0159】

例えば、P A Hなどの既知の及び／又は公的に利用可能なタンパク質配列を取り、c D N A配列を逆操作して、そのようなタンパク質をコードすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。次いで、意図される宿主細胞と一致するようにc D N Aをコドン最適化し、本明細書に記載されるようにc e D N Aベクターに挿入することができる。

【0160】

B. P A Hタンパク質を発現するc e D N Aベクター

所望のP A Hをコードする1つ以上の配列を有するP A Hタンパク質の発現のためのc

50

eDNAベクターは、プロモーター、分泌シグナル、ポリA領域、及びエンハンサーなどの調節配列を含むことができる。最低でも、ceDNAベクターは、PAHタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列（例えば、異種核酸配列）を含み、核酸配列がコドン最適化されている。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化された核酸は、最適な導入遺伝子の発現及び持続期間を達成するために、特定のシス作用性エレメント（例えば、特異的プロモーター及び／又は特異的エンハンサー）と組み合わせられる。

【0161】

いくつかの実施形態によれば、PAHタンパク質は、タンパク質のフォールディングが起こるERにそれを導く、小胞体ERリーダー配列を含む。例えば、発現されたタンパク質を折りたたむのためにERに向ける配列。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、細胞又は細胞外局在化シグナル（例えば、分泌シグナル、核局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナルなど）は、PAHタンパク質の分泌又は所望の細胞内局在化を指示するために、ceDNAベクターに含まれ、それによりPAHタンパク質は、細胞内標的（例えば、イントラボディ）又は細胞外標的に結合することができる。

【0163】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、モジュール様式で任意の所望のPAHタンパク質のアセンブリ及び発現を可能にする。本明細書で使用される場合、「モジュール」という用語は、構築物から容易に除去され得る、ceDNA発現プラスミドにおけるエレメントを指す。

20

【0164】

いくつかの実施形態では、PAHの発現のためのceDNAベクターは、全長PAHタンパク質をコードする配列を有することができる。いくつかの他の実施形態では、PAHのceDNAベクター発現は、切断型PAHタンパク質をコードする配列を有することができる。例えば、切断型PAHは、PAHの自己調節領域（例えば、全長PAHのアミノ酸1～19）を除去するために、N末端に欠失を有し得る。一実施形態では、PAHの発現のためのceDNAベクターは、アミノ酸1～19のN末端切断を有する。

【0165】

一部の実施形態では、ceDNAベクターは、機能的PAHのオープンリーディングフレームの内側にイントロンを含むPAH配列を有することができる。いくつかの他の実施形態では、ceDNAは、異種シグナル配列（SS）を有するPAH配列を有し得る。更にいくつかの他の実施形態では、ceDNAは、DNA核標的化配列を有するPAH配列を有し得る。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、5'UTR配列を有し得る。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、イントロン配列を有することができる。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、3'UTR配列を有し得る。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、1つ以上のエンハンサー配列を有することができる。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、プロモーター配列を有することができる。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、コザック配列を有することができる。更にいくつかの他の実施形態では、コドン最適化PAHのceDNAベクターは、2つのシス作用性エレメント（例えば、エンハンサーエレメント）間、又はシス作用性エレメントとオープンリーディングフレーム（ORF）との間にリンカー／スペーサー配列を有することができる。

30

40

【0166】

C. ceDNAベクターによって発現される例示的なPAHタンパク質

特に、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、フェニルケトン尿症（PKU）の1つ以上の症状の治療、予防、及び／又は改善における使用のための、例えば、PAHタンパク質、並びにそのバリエーション及び／又は活性断片を

50

コードすることができる。一態様では、フェニルケトン尿症（P K U）は、ヒトフェニルケトン尿症（P K U）である。

【0167】

（i）P A H治療用タンパク質及びその断片

本開示は、コドン最適化された核酸によってコードされ、本明細書に記載される c e D N A ベクターにおいて及び c e D N A ベクターから発現される、P A H治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）を提供する。当業者は、P A H治療用タンパク質が、P A Hタンパク質の全てのスプライスバリエーション及びオルソログを含むことを理解するであろう。P A H治療用タンパク質は、無傷の分子並びにその断片（例えば、機能的）を含む。

10

【0168】

従来の A A V ベクター、更にはレンチウイルスベクターに対する、c e D N A ベクターの明確な利点は、所望のタンパク質をコードする核酸配列（例えば、異種核酸配列）にサイズの制約がないことである。したがって、複数の全長 P A H治療用タンパク質は、単一の c e D N A ベクターから発現することができる。

【0169】

P A Hタンパク質及び遺伝子：P A H遺伝子は12番染色体の12q22-q24.2のバンドに位置される。2000年の時点で、約400の病気の原因となる変異がP A H遺伝子において発見されていた。フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（P A H）はまた、フェニルアラニン4-モノオキシゲナーゼ、フェニルアラニン-4-ヒドロキシラーゼ、P h e - 4 -モノオキシゲナーゼ、E C 1.14.16.1、E C 1.14.16、P K U 1、P K U、又はP Hと称され得る。

20

【0170】

P A Hのタンパク質配列は以下のとおりである：ホモサピエンスP A H酵素翻訳（450アミノ酸）、受託番号NM_000277.3。

M S T A V L E N P G L G R K L S D F G Q E T S Y I E D N C N Q N G A I S L I F
S L K E E V G A L A K V L R L F E E N D V N L T H I E S R P S R L K K D E Y E F
F T H L D K R S L P A L T N I I K I L R H D I G A T V H E L S R D K K K D T V P
W F P R T I Q E L D R F A N Q I L S Y G A E L D A D H P G F K D P V Y R A R R K
Q F A D I A Y N Y R H G Q P I P R V E Y M E E E K K T W G T V F K T L K S L Y K
T H A C Y E Y N H I F P L L E K Y C G F H E D N I P Q L E D V S Q F L Q T C T G
F R L R P V A G L L S S R D F L G G L A F R V F H C T Q Y I R H G S K P M Y T P
E P D I C H E L L G H V P L F S D R S F A Q F S Q E I G L A S L G A P D E Y I E
K L A T I Y W F T V E F G L C K Q G D S I K A Y G A G L L S S F G E L Q Y C L S
E K P K L L P L E L E K T A I Q N Y T V T E F Q P L Y Y V A E S F N D A K E K V
R N F A A T I P R P F S V R Y D P Y T Q R I E V L D N T Q Q L K I L A D S I N S
E I G I L C S A L Q K（配列番号1025）

30

【0171】

P A Hは主に肝臓で発現され、腎臓及び胆嚢で中程度の発現である。低レベルのP A H発現は、前立腺、副腎でも検出され得る。胎児の発達中、P A Hは、副腎、心臓、腸、肺、及び胃で発現され得る。したがって、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎から選択される任意の1つ以上の組織に、P A Hを発現するc e D N Aベクターを投与することができる。いくつかの実施形態では、P A Hを発現するc e D N Aベクターが乳児に投与されるか、又は子宮内の対象に投与される場合、P A Hを発現するc e D N Aベクターを、肝臓、副腎、心臓、腸、肺、及び胃から選択される任意の1つ以上の組織に投与することができる。

40

【0172】

c e D N AベクターからのP A H治療用タンパク質又はその断片の発現は、本明細書に記載されるプロモーターのうちの1つ以上を使用して、空間的及び時間的の両方で達成することができる。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、V Dプロモーター、ヒ

50

ト α 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター (hAAT (979) プロモーター及び CpGmin_hAAT プロモーターを含む) 及びトランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

【0173】

いくつかの実施形態によれば、PAHタンパク質をコードする核酸は、コドン最適化され、本明細書に記載される ceDNA ベクターに挿入される。

【0174】

本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」又は「コドン最適化」という用語は、目的の脊椎動物、例えばマウス又はヒトの細胞中の発現強化のために、少なくとも1つ、2つ以上、又は相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的に、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、Aptagen の GENE FORGE（登録商標）コドン最適化及びカスタム遺伝子合成プラットフォーム（Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd. Suite 300, Herndon, Va. 20171）又は別の公開データベースを使用して決定することができる。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質をコードする核酸は、ヒト発現のために最適化され、かつ／又はヒトPAH若しくはその機能的断片である。様々なシス作用性エレメントと併せて ceDNA 発現のために改変された例示的な PAH 配列が本明細書に開示される。

【0175】

(ii) ceDNA ベクターを発現する PAH 治療用タンパク質

本明細書に記載される ceDNA ベクターは、PAH 治療用タンパク質又はその機能的断片をコードする、1つ以上のコドン最適化核酸配列（例えば、異種核酸配列）を含む。一実施形態では、ceDNA ベクターは、本明細書の表 1A に列挙されるものから選択される PAH 配列をコードするコドン最適化された核酸配列を含む。

【0176】

10

20

30

40

50

【表 1 A - 1】

表 1 A : P K U の治療のための例示的なヒト P A H 配列

説明	配列番号
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2)	382
ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) cDNA (hPAH_cDNA_ORF_v3)。	383
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_デルタ2Kbイントロン_33bp隣接)	384
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_hIVS-イントロン1_33bp隣接)	385
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_mIVS-イントロン1B_1bp隣接)	386
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_mIVS-イントロン1B_33bp隣接)	387
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_Genscript_codop_ORF)	388
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_hIVS-イントロン1_1bp隣接)	389
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_33bp隣接)	390
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_5pSpliceFix)	391
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_修飾型_イントロン1_33bp隣接)	392
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_C237D)	393
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_Δ1-29aa)	394
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2_R68A)	1011
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) hPAH-ORF_v2B)	395
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s7)	396
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s32)	397
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34)	398
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s41)	399
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r4-s21)	400
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r4-s27)	401
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s3)	1012
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s8)	402
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29)	403
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r6-28)	404
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r6-s20)	405
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r7-s1)	406
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r7-s23)	407

10

20

30

40

【0177】

【表 1 A - 2】

(表 1 A の続き)

説明	配列番号
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r8-s1)	408
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r8-s29)	1013
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r9-s20)	409
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r9-s37)	410
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r9-s52)	411
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r10-s18)	412
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r10-s21)	413
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r10-s55)	414
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r11-s6)	415
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r11-s26)	1014
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r11-s27)	416
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::hIVS1B)	417
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::hIVS1B_33bp隣接)	418
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::mIVS)	419
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::mIVS_33bp隣接)	420
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::mod-イントロン)	421
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::mod-イントロン_33bp隣接)	422
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::mod-イントロン_oIVS-v2)	1015
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r3-s34::mod-イントロン_oIVS-v2_33bp隣接)	423
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::hIVS1B)	424
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::hIVS1B_33bp隣接)	425
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::mIVS)	426
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::mIVS_33bp隣接)	427
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::mod-イントロン)	428
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::mod-イントロン_33bp隣接)	429
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::mod-イントロン_oIVS-v2)	430
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-r5-s29::mod-イントロン_oIVS-v2_33bp隣接)	431
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2-mod-イントロン-oIVS-v2)	432

10

20

30

40

【0178】

50

【表 1 A - 3】

(表 1 A の続き)

説明	配列番号
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2-mIVS-CpG 不含 33bp 隣接)	433
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH_codop_ORF_v2::hIVS-1B-Wt 33bp 隣接)	434
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-cDNA_0CpG1_ORF)	435
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-cDNA_0CpG2_ORF)	436
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-cDNA_0CpG3_ORF)	437
コドン最適化されたヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-cDNA_0CpG4_ORF)	438
ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-cDNA_1_ORF)	439
ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) (hPAH-cDNA_2_ORF)	440

10

【0179】

【表 1 B】

表 1 B. 例示的なマウス PAH 配列

20

説明	配列番号
マウスフェニルアラニンヒドロキシラーゼ PAH (マウス PAH_codop_ORF_v2	585

【0180】

一実施形態では、c e D N A ベクターは、本明細書の表 1 A に列挙されるコドン最適化ヒト PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される配列と少なくとも 90% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される配列と少なくとも 91% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 92% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 93% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 94% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 95% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 96% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 97% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 98% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。一実施形態では、c e D N A ベクターは、表 1 A に列挙される PAH 配列と少なくとも 99% の同一性を有するコドン最適化 PAH 配列を含む。

30

40

【0181】

一実施形態では、PAH 配列は、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、配列番号 386、配列番号 387、配列番号 389、配列番号 390、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 394、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 398、配列番号 399、配列番号 400、配列番号 401、配列番号 402、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、

50

配列番号 4 0 6、配列番号 4 0 7、配列番号 4 0 8、配列番号 4 0 9、配列番号 4 1 0、
配列番号 4 1 1、配列番号 4 1 2、配列番号 4 1 3、配列番号 4 1 4、配列番号 4 1 5、
配列番号 4 1 6、配列番号 4 1 7、配列番号 4 1 8、配列番号 4 1 9、配列番号 4 2 0、
配列番号 4 2 1、配列番号 4 2 2、配列番号 4 2 3、配列番号 4 2 4、配列番号 4 2 5、
配列番号 4 2 6、配列番号 4 2 7、配列番号 4 2 8、配列番号 4 2 9、配列番号 4 3 0、
配列番号 4 3 1、配列番号 4 3 2、配列番号 4 3 3、配列番号 4 3 4、配列番号 4 3 5、
配列番号 4 3 6、配列番号 4 3 7、配列番号 4 3 8、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4 0、
配列番号 1 0 1 1、配列番号 1 0 1 2、配列番号 1 0 1 3、配列番号 1 0 1 4、又は配列
番号 1 0 1 5 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する。一実施形態では、P A H 配列は、配
列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくと
も 9 1 % の同一性を有する。一実施形態では、P A H 配列は、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又
は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 2 % の同一性を有す
る。一実施形態では、P A H 配列は、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1
0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 3 % の同一性を有する。一実施形態では、P
A H 配列は、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか
1 つと少なくとも 9 4 % の同一性を有する。一実施形態では、P A H 配列は、配列番号 3
8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 5 %
の同一性を有する。一実施形態では、P A H 配列は、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番
号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 6 % の同一性を有する。一実
施形態では、P A H 配列は、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 の
うちのいずれか 1 つと少なくとも 9 7 % の同一性を有する。一実施形態では、P A H 配列
は、配列番号 3 8 2 ~ 4 4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少
なくとも 9 8 % の同一性を有する。一実施形態では、P A H 配列は、配列番号 3 8 2 ~ 4
4 0 又は配列番号 1 0 1 1 ~ 1 0 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 9 % の同一性
を有する。一実施形態では、P A H 配列は、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 3、配列番号
3 8 4、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 7、番号 3 8 9、配列番号 3 9
0、配列番号 3 9 1、配列番号 3 9 2、配列番号 3 9 3、配列番号 3 9 4、配列番号 3 9
5、配列番号 3 9 6、配列番号 3 9 7、配列番号 3 9 8、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0
0、配列番号 4 0 1、配列番号 4 0 2、配列番号 4 0 3、配列番号 4 0 4、配列番号 4 0
5、配列番号 4 0 6、配列番号 4 0 7、配列番号 4 0 8、配列番号 4 0 9、配列番号 4 1
0、配列番号 4 1 1、配列番号 4 1 2、配列番号 4 1 3、配列番号 4 1 4、配列番号 4 1
5、配列番号 4 1 6、配列番号 4 1 7、配列番号 4 1 8、配列番号 4 1 9、配列番号 4 2
0、配列番号 4 2 1、配列番号 4 2 2、配列番号 4 2 3、配列番号 4 2 4、配列番号 4 2
5、配列番号 4 2 6、配列番号 4 2 7、配列番号 4 2 8、配列番号 4 2 9、配列番号 4 3
0、配列番号 4 3 1、配列番号 4 3 2、配列番号 4 3 3、配列番号 4 3 4、配列番号 4 3
5、配列番号 4 3 6、配列番号 4 3 7、配列番号 4 3 8、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4
0、配列番号 1 0 1 1、配列番号 1 0 1 2、配列番号 1 0 1 3、配列番号 1 0 1 4、及び
配列番号 1 0 1 5 からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、P A H 配列は
、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 3、配列番号 3 8 4、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 6
、配列番号 3 8 7、番号 3 8 9、配列番号 3 9 0、配列番号 3 9 1、配列番号 3 9 2、配
列番号 3 9 3、配列番号 3 9 4、配列番号 3 9 5、配列番号 3 9 6、配列番号 3 9 7、配
列番号 3 9 8、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 1、配列番号 4 0 2、配
列番号 4 0 3、配列番号 4 0 4、配列番号 4 0 5、配列番号 4 0 6、配列番号 4 0 7、配
列番号 4 0 8、配列番号 4 0 9、配列番号 4 1 0、配列番号 4 1 1、配列番号 4 1 2、配
列番号 4 1 3、配列番号 4 1 4、配列番号 4 1 5、配列番号 4 1 6、配列番号 4 1 7、配
列番号 4 1 8、配列番号 4 1 9、配列番号 4 2 0、配列番号 4 2 1、配列番号 4 2 2、配
列番号 4 2 3、配列番号 4 2 4、配列番号 4 2 5、配列番号 4 2 6、配列番号 4 2 7、配
列番号 4 2 8、配列番号 4 2 9、配列番号 4 3 0、配列番号 4 3 1、配列番号 4 3 2、配
列番号 4 3 3、配列番号 4 3 4、配列番号 4 3 5、配列番号 4 3 6、配列番号 4 3 7、配
列番号 4 3 8、配列番号 4 3 9、又は配列番号 4 4 0、配列番号 1 0 1 1、配列番号 1 0

10

20

30

40

50

12、配列番号1013、配列番号1014、又は配列番号1015からなる。

【0182】

(iii) PKUの治療のためのPAH治療用タンパク質及びその使用

本明細書に記載のceDNAベクターを使用して、PAHタンパク質の不適切な発現及び／又はPAHタンパク質内の変異に関連するPKUの治療のための治療用PAHタンパク質を送達することができる。

【0183】

本明細書に記載されるceDNAベクターを使用して、任意の所望のPAH治療用タンパク質を発現することができる。例示的な治療用PAH治療用タンパク質には、本明細書の表1Aに示される配列によって発現される任意のPAHタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0184】

一実施形態では、発現されたPAH治療用タンパク質は、フェニルケトン尿症(PKU)の治療に機能的である。いくつかの実施形態では、PAH治療用タンパク質は、免疫系反応を引き起こさない。

【0185】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、PAHの切断型(断片)をコードするコドン最適化配列を含む。一実施形態では、ceDNAベクターは、N末端自己調節領域(例えば、全長PAHタンパクのアミノ酸1~29)の欠失を有する切断型PAHをコードするコドン最適化配列を含む。一実施形態では、ceDNAベクターは、配列番号394を含む。

20

【0186】

別の実施形態では、PAH治療用タンパク質又はその断片(例えば、機能的断片)をコードするceDNAベクターを使用して、キメラタンパク質を生成することができる。したがって、キメラタンパク質を発現するceDNAベクターを、例えば、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎から選択される任意の1つ以上の組織に投与することができることが本明細書で具体的に企図される。いくつかの実施形態では、PAHを発現するceDNAベクターが乳児に投与されるか、又は子宮内の対象に投与される場合、フェニルケトン尿症(PKU)のインビボ若しくはエクスピボ治療のために、PAHを発現するceDNAベクターを、肝臓、副腎、心臓、腸、肺、及び胃から選択される任意の1つ以上の組織に、又はその肝臓幹細胞前駆体に投与することができる。

30

【0187】

PKU: PKUは、PAH遺伝子の変異によって引き起こされる、まれな遺伝性の先天性代謝異常症である。PAHは通常肝臓で発現される酵素であり、食事由来のフェニルアラニンを神経伝達物質の産生に関与するアミノ酸であるチロシンに代謝するために必要である。PKUは、PAHの変異からもたらされ、その酵素活性が不足する。したがって、PAHタンパク質を発現するceDNAベクターは、肝臓においてPAHを発現することができる。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、肝細胞において少なくとも1つのPAHタンパク質を発現する。

【0188】

PAHは通常、PR細胞型とRPE細胞型の両方で内因的に発現される。RPEにおける低レベルのPAH発現も正常な網膜機能に必要であり得ることも報告されている。したがって、網膜変性を防ぐために、PR及びまた任意選択的にRPE細胞におけるceDNAベクターによるPAHタンパク質の低レベル又は高レベルの発現が時に必要とされ得る。このレベルの発現は、本明細書に記載されるように、プロモーター及び／又は調節スイッチによって微調整することができる。

40

【0189】

したがって、いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、内因性プロモーター(約1kb)からの、6.8kbタンパク質であるPAHタンパク質の発現に使用され、光受容体及びRPEの両方における正常なレチノイド処理を回復する。いくつかの実施形態

50

では、P A Hタンパク質を発現するc e D N Aベクターは、網膜のより広い領域を治療するための脈絡膜上又は硝子体内投与経路を介する。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、網膜下注射、脈絡膜上注射、又は硝子体内注射のうちのいずれか1つ以上によって投与される。

【0190】

本方法は、本明細書に記載されるように、P A H治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）をコードするc e D N Aベクターを含む有効量の組成物を対象に投与することを含む。当業者によって理解されるように、「有効量」という用語は、疾患又は障害の治療のための「治療有効量」でのタンパク質の発現をもたらす、投与されたc e D N A組成物の量を指す。

【0191】

P A H治療用タンパク質又はその断片（例えば、機能的断片）をコードするc e D N Aベクターを含む組成物の投与量範囲は、効力（例えば、プロモーターの効率）に依存し、フェニルケトン尿症（P K U）の治療のために、所望の効果、例えば、所望のP A H治療用タンパク質の発現を生み出すのに十分な量を含む。投与量は、許容できない有害な副作用を引き起こすほど多くあるべきではない。一般に、投与量は、c e D N Aベクターの特定の特性、発現効率、並びに患者の年齢、状態、及び性別によって異なるだろう。投与量は、当業者が決定でき、c e D N Aベクターは反復投薬を防止する免疫活性化カプシドタンパク質を含まないため、従来のA A Vベクターとは異なって、合併症の場合には個々の医師により調整することもできる。

【0192】

本明細書に記載されるc e D N A組成物の投与は、限られた期間繰り返すことができる。いくつかの実施形態では、用量は、定期的に又はパルス投与によって与えられる。好ましい実施形態では、上に列挙された用量は、数ヶ月にわたって投与される。治療の持続期間は、対象の臨床的進歩及び治療への応答性に依存する。経時的なブースター治療が企図されている。更に、発現のレベルは、対象が成長するにつれて滴定することができる。

【0193】

P A H治療用タンパク質は、対象において、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月／1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも15年、少なくとも20年、少なくとも30年、少なくとも40年、少なくとも50年、又はそれ以上発現され得る。長期の発現は、本明細書に記載されるc e D N Aベクターを所定の又は所望の間隔で繰り返し投与することによって達成することができる。

【0194】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、疾患バイオマーカーの発現の統計的に有意な測定可能な変化又は所与の疾患症状の低減をもたらすのに十分である、発現したP A H治療用タンパク質又はその機能的断片の量である（以下の「有効性の測定」を参照されたい）。そのような有効量は、所与のc e D N A組成物についての臨床試験並びに動物実験で評価することができる。

【0195】

投与する必要があるc e D N Aベクターの正確な量は、開業医の判断に依存し、各固体に特有である。投与に好適なレジームも様々であるが、最初の投与とそれに続くその後の注射又は他の投与による1つ以上の間隔での反復用量によって代表される。代替的に、特に急性疾患／障害の治療のために、インビボ治療のために指定された範囲内の血中濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入が企図されている。

【0196】

本明細書に記載される方法及び組成物において有用な薬剤は、局所的、静脈内（ボラス又は連続注入による）、細胞内注射、組織内注射、経口、吸入、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内で投与することができ、必要に応じてぜん動手段によって、又は当業者による他の既知の手段によって送達することができる。薬剤は、必要に応じて、全身投与することが

10

20

30

40

50

できる。子宮内で投与することもできる。

【0197】

フェニルケトン尿症（PKU）の所与の治療法の有効性は、熟練した臨床医によって判定され得る。しかしながら、疾患又は障害の兆候又は症状のいずれか1つ又は全てが有益な方法で変更された場合、又は他の臨床的に許容される疾患の症状若しくはマーカーが、例えば、PAHをコードするceDNAベクター、又はその機能的断片での治療後に少なくとも10%向上又は改善された場合、その用語が本明細書において使用されるように、治療は「有効な治療」とみなされる。有効性はまた、疾患の安定化、又は医療介入の必要性（すなわち、疾患の進行が停止するか、少なくとも遅くなる）によって評価される個人の悪化の失敗によって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に既知であり、かつ／又は本明細書に記載される。治療は、個人又は動物（いくつかの非限定的な例としては、ヒト又は哺乳動物が挙げられる）における疾患の任意の治療を含み、以下：（1）疾患を阻害すること、例えば、疾患若しくは障害の進行の停止若しくは遅延させること、又は（2）疾患を緩和すること、例えば、症状の軽減を引き起こすこと、及び（3）肝臓若しくは腎不全などの疾患の発症の可能性を防止若しくは低減すること、又は疾患に関連する二次的疾患／障害（例えば、関節リウマチによる手の変形、若しくはがん転移）を防止することを含む。疾患の治療のための有効量とは、それを必要とする哺乳動物に投与した場合、その用語が本明細書で定義されているように、その疾患に対して有効な治療をもたらすのに十分である量を意味する。

10

【0198】

薬剤の有効性は、フェニルケトン尿症（PKU）に特有の物理的指標を評価することによって決定することができる。PKU指標の標準的な分析方法は、当該技術分野で既知である。

20

【0199】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターはまた、補因子若しくは他のポリペプチド、センス若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はRNA（コード若しくは非コード；例えば、siRNA、shRNA、gRNA、マイクロRNA、及びそれらのアンチセンス対応物（例えば、antagomir））もコードすることができ、それらは、ceDNAから発現されるPAHタンパク質と併せて使用され得る。追加的に、PAHタンパク質をコードする配列を含む発現カセットはまた、実験又は診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えばβ-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、及び当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

30

【0200】

一実施形態では、ceDNAベクターは、PKUの治療に機能的である治療用PAHタンパク質を発現するための核酸配列を含む。好ましい実施形態では、治療用PAHタンパク質は、それが望まれない限り、免疫系反応を引き起こさない。

【0201】

III. PAH治療用タンパク質の産生に使用するための一般的なceDNAベクター
本開示の実施形態は、PAH導入遺伝子を発現することができる、閉端線形二本鎖（ceDNA）ベクターを含む方法及び組成物に基づく。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、PAHタンパク質をコードするコドン最適化配列である（例えば、配列番号382～440又は配列番号1011～1015を参照されたい）。本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、サイズによって制限されず、それにより、例えば、単一ベクターからの導入遺伝子の発現に必要な全ての構成成分の発現を可能にする。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、好ましくは、発現カセットなどの分子の少なくとも一部分にわたって二重鎖、例えば、自己相補的である（例えば、ceDNAは、二本鎖環状分子ではない）。ceDNAベクターは、共有結合性閉

40

50

端を有し、したがって、例えば、1時間以上37℃でエキソヌクレアーゼ消化（例えば、エキソヌクレアーゼI又はエキソヌクレアーゼIII）に対して耐性である。

【0202】

一般に、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、関心対象の核酸配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、及び第2のAAV ITRを含む。ITR配列は、(i)少なくとも1つのWT ITR及び少なくとも1つの修飾型AAV逆位末端反復(mod-ITR)（例えば、非対称の修飾型ITR）、(ii) mod-ITR対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2つの修飾型ITR（例えば、非対称の修飾型ITR）、又は(iii)各WT-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称のWT-WT ITR対、又は(iv)各mod-ITRが同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の修飾型ITR対のうちのいずれかから選択される。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、細胞ベース（例えば、Sf9又はHEK293）の産生から、又は無細胞環境において複数のオリゴヌクレオチドを使用して合成的に作製することができる。

10

20

30

40

50

【0203】

PAHタンパク質の産生のためのceDNAベクターを含む方法及び組成物が本明細書に包含され、リボソームナノ粒子送達系などの送達系を更に含み得る。非限定的な例示的リボソームナノ粒子系が、本明細書に開示される。いくつかの態様では、本開示は、ceDNA及びイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を提供する。例えば、プロセスにより得られたceDNAを用いて作製及び負荷される脂質ナノ粒子製剤は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018年9月7日出願された国際出願第US2018/050042号及び2020年9月3日出願された国際出願第US2020/049266号に開示されている。

【0204】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、ウイルスカプシド内の限定空間によって課されるパッケージング制約を有しない。ceDNAベクターは、封入されたAAVゲノムとは対照的な原核細胞的に産生されたプラスミドDNAベクターに対する可変の真核細胞的に産生された代替物を表す。これは、制御エレメント、例えば、本明細書に開示される調節スイッチ、大きな導入遺伝子、複数の導入遺伝子などの挿入を許可する。

【0205】

PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、カプシドを含まず、第1のITR、導入遺伝子を含む発現カセット、及び第2のITRをこの順序でコードするプラスミドから得ることができる。発現カセットは、導入遺伝子の発現を可能にする及び／又は制御する1つ以上の調節配列を含み得、例えば、発現カセットは、エンハンサー／プロモーター、ORF（PAHをコードする導入遺伝子）、転写後調節エレメント（例えば、WPRE）、並びにポリアデニル化及び終結シグナル（例えば、BGHポリA）のうちの1つ以上をこの順序で含み得る。

【0206】

発現カセットはまた、内部リボソームエンタリー部位(IRES)及び／又は2Aエレメントを含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、mir調節エレメント、転写後調節エレメント、組織及び細胞型特異的プロモーター、並びにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ITRは、導入遺伝子、例えば、PAHタンパク質のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、本明細書において「調節スイッチ」と題するセクションに記載されている、PAHタンパク質の発現を制御及び調節するための調節スイッチを含み、所望される場合、ceDNAベクターを含む細胞の制御された細胞死を可能にするキルスイッチである調節スイッチを含み得る。

【0207】

発現カセットは、4000ヌクレオチド超、5000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、若しくは20,000ヌクレオチド、若しくは30,000ヌクレオチド、若しくは40,000ヌクレオチド、又は50,000ヌクレオチド、又は約4000~10,000ヌクレオチド、若しくは10,000~50,000ヌクレオチドの任意の範囲、又は50,000ヌクレオチド超を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、500~50,000ヌクレオチド長の範囲の導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、500~75,000ヌクレオチド長の範囲の導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、500~10,000ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1000~10,000ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、500~5,000ヌクレオチド長の範囲である導入遺伝子を含み得る。c e D N Aベクターは、カプシド化A A Vベクターのサイズ制限を有さず、したがって、大サイズの発現カセットの送達が効率的な導入遺伝子の発現をもたらすようにすることができる。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、原核細胞特異的メチル化を欠いている。

10

【0208】

c e D N A発現カセットは、例えば、レシピエント対象において存在しない、不活性、若しくは不十分な活性であるタンパク質をコードする発現可能な外因性配列（例えば、オープンリーディングフレーム）若しくは導入遺伝子、又は所望の生物学的若しくは治療的効果を有するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。導入遺伝子は、欠陥遺伝子又は転写産物の発現を訂正するように機能することができる遺伝子産物をコードすることができる。原則として、発現カセットは、変異のために減少若しくは欠如しているタンパク質、ポリペプチド、若しくはRNAをコードする、又は過剰発現が本開示の範囲内であるとみなされる場合に治療効果をもたらす任意の遺伝子を含み得る。

20

【0209】

発現カセットは、任意の導入遺伝子（例えば、P A Hタンパク質をコードする）、例えば、対象におけるP K Uを治療するのに有用なP A Hタンパク質（すなわち、治療用P A Hタンパク質）を含み得る。本明細書に記載される本開示の態様によれば、発現カセットは、コドン最適化導入遺伝子を含む。更なる実施形態によれば、コドン最適化導入遺伝子は、表1 Aに示される核酸配列から選択される。

30

【0210】

c e D N Aベクターを単独で、又はポリペプチドをコードする核酸若しくは非コード核酸（例えば、R N A i、m i Rなど）、並びに対象のゲノム中のウイルス配列、例えば、H I Vウイルス配列などを含む外因性遺伝子及び核酸配列と組み合わせて使用して、関心対象の任意のP A Hタンパク質を対象に送達し、発現することができる。好ましくは、本明細書に開示されるc e D N Aベクターは、治療目的（例えば、医療、診断、若しくは獣医学的使用）又は免疫原性ポリペプチドに使用される。ある特定の実施形態では、c e D N Aベクターは、1つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、s i R N A、R N A i s、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、又はRNA（コード若しくは非コード；例えば、s i R N A、s h R N A、g R N A、マイクロRNA、及びそれらのアンチセンス対応物（例えば、a n t a g o M i R））、抗体、融合タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせを含む、対象における任意の目的の遺伝子を発現させるのに有用である。

40

【0211】

発現カセットはまた、ポリペプチド、センス若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はRNA（コード若しくは非コード；例えば、s i R N A、s h R N A、g R N A、マイクロRNA、及びそれらのアンチセンス対応物（例えば、a n t a g o M i R））をコードし得る。発現カセットは、実験又は診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えばβ-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ（L a c Z）

50

、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、及び当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

【0212】

本明細書に提供される方法によって産生されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、好ましくは、非連続的な構造ではなく直鎖状で連続的な構造を有し、制限酵素消化アッセイによって決定される（図3D）。直鎖状で連続的な構造は、細胞エンドヌクレアーゼによる攻撃に対してより安定であると同時に、組換えられて変異誘発を引き起こす可能性が低いと考えられる。したがって、直鎖状で連続的な構造のceDNAベクターは、好ましい実施形態である。連続的な直鎖状の一本鎖分子内二重鎖ceDNAベクターは、AAVカプシドタンパク質をコードする配列なしに、終端に共有結合している可能性がある。これらのceDNAベクターは、細菌起源の環状二重鎖核酸分子であるプラスミド（本明細書に記載されるceDNAプラスミドを含む）とは構造的に異なる。プラスミドの相補鎖は、変性に続いて分離されて2つの核酸分子を産生することができるが、反対に、ceDNAベクターは、相補鎖を有するが、単一DNA分子であり、したがって変性された場合でも単一分子のままである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるceDNAベクターは、プラスミドとは異なり、原核細胞タイプのDNA塩基メチル化なしに産生され得る。したがって、ceDNAベクター及びceDNA-プラスミドは、構造（特に、直鎖状対環状）及びこれらの異なる対象物（下記を参照されたい）を産生及び精製するために使用される方法の両方に関して、またceDNA-プラスミドの場合は原核細胞タイプ及びceDNAベクターの場合は真核細胞タイプのものである、それらのDNAメチル化に関して異なる。

【0213】

本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためにceDNAベクターを使用することには、プラスミドベースの発現ベクターよりもいくつかの利点があり、そのような利点としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：1）プラスミドは、細菌DNA配列を含有し、原核生物特異的メチル化（例えば、6-メチルアデノシン及び5-メチルシトシンのメチル化）を受けるが、カプシドを含まないAAVベクター配列は、真核生物起源であり、原核生物特異的メチル化を受けない；結果として、カプシドを含まないAAVベクターは、プラスミドと比較して炎症応答及び免疫応答を誘導する可能性が低い；2）プラスミドは産生プロセス中に耐性遺伝子の存在を必要とするが、ceDNAベクターは必要としない；3）環状プラスミドは、細胞への導入時に核に送達されず、細胞ヌクレアーゼによる分解を回避するために過負荷を必要とするが、ceDNAベクターは、ウイルスシスエレメント（すなわち、ITR）を含有し、これは、ヌクレアーゼに対して耐性を付与し、核に標的化及び送達するように設計され得る。ITR機能に不可欠な最小規定要素は、Rep結合部位（RBS；5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号60）AAV2の場合）及び末端分離部位（TRS；5'-AGTTGG-3'（配列番号64）AAV2の場合）+ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列；及び4）である。ceDNAベクターは、Tox様ファミリーの受容体のメンバーに結合し、T細胞媒介性免疫応答を誘発すると報告されている原核生物由来プラスミドにおいてしばしば見られるCpGジヌクレオチドの過剰提示を有しない。対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含AAVベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来のAAVビリオンで形質導入することが困難である細胞及び組織型を効率的に標的とし得る。

【0214】

IV．逆位末端反復（ITR）

本明細書に開示されているように、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、2つの逆位末端反復（ITR）配列の間に位置付けられた核酸、例えば、導入遺伝子又は異種核酸配列（例えば、コドン最適化異種核酸配列）を含有し、これらの用語が本明細書に定義されるように、ITR配列は、非対称ITR対又は対称若しくは実質的に対

称の I T R 対であり得る。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、(i) 少なくとも 1 つの W T I T R 及び少なくとも 1 つの修飾型 A A V 逆位末端反復 (m o d - I T R) (例えば、非対称の修飾型 I T R)、(i i) m o d - I T R 対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2 つの修飾型 I T R (例えば、非対称の修飾型 I T R)、又は (i i i) 各 W T - I T R が同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の W T - W T I T R 対、又は (i v) 各 m o d - I T R が同じ三次元空間構成を有する、対称若しくは実質的に対称の修飾型 I T R 対のうちのいずれかから選択される I T R 配列を含み得、本開示の方法は、限定されないが、リボソームナノ粒子送達系などの送達系を更に含み得る。

【0215】

いくつかの実施形態では、I T R 配列は、2 つの亜科：脊椎動物に感染する P a r v o v i r i n a e 亜科、及び昆虫に感染する D e n s o v i r i n a e 亜科を含む、パルボウイルス科のウイルスに由来し得る。P a r v o v i r i n a e (パルボウイルスと称される) は、D e p e n d o v i r u s 属を含み、そのメンバーは、ほとんどの条件下で、増殖性感染のためにアデノウイルス又はヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスとの共感染を必要とする。ディペンドウイルス族は、通常はヒト (例えば、血清型 2、3 A、3 B、5、及び 6) 又は霊長類 (例えば、血清型 1 及び 4) に感染するアデノ随伴ウイルス (A A V)、並びに他の温血動物に感染する関連ウイルス (例えば、ウシ、イヌ、ウマ、及びヒツジアデノ随伴ウイルス) を含む。パルボウイルス及び P a r v o v i r i d a e 科の他のメンバーは、K e n n e t h I. B e r n s, 「P a r v o v i r i d a e : T h e V i r u s e s a n d T h e i r R e p l i c a t i o n,」 C h a p t e r 6 9 i n F I E L D S V I R O L O G Y (3 d E d. 1996) に一般に記載されている。

【0216】

I T R は、明細書において例証されており、本明細書における例は、A A V 2 W T - I T R であるが、当業者であれば、上述のように、任意の既知のパルボウイルス、例えば、ディペンドウイルス、例えば A A V (例えば、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 5、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V r h 8、A A V r h 10、A A V - D J、及び A A V - D J 8 ゲノムからの I T R を使用できることを認識する。例えば、N C B I : N C 0 0 2 0 7 7、N C 0 0 1 4 0 1、N C 0 0 1 7 2 9、N C 0 0 1 8 2 9、N C 0 0 6 1 5 2、N C 0 0 6 2 6 0、N C 0 0 6 2 6 1)、キメラ I T R、又は任意の合成 A A V 由来の I T R。いくつかの実施形態では、A A V は、温血動物、例えば、鳥類 (A A A V)、ウシ (B A A V)、イヌ、ウマ、及びヒツジアデノ随伴ウイルスに感染し得る。いくつかの実施形態では、I T R は、B 19 パルボウイルス (G e n B a n k 受託番号 N C 0 0 0 8 8 3)、マウス由来微小ウイルス (M V M) (G e n B a n k 受託番号 N C 0 0 1 5 1 0)、ガチョウパルボウイルス (G e n B a n k 受託番号 N C _ 0 0 1 7 0 1)、ヘビパルボウイルス 1 (G e n B a n k 受託番号 N C 0 0 6 1 4 8) 由来である。いくつかの実施形態では、本明細書で論じられるように、5' W T - I T R は、1 つの血清型に由来し、3' W T - I T R は、異なる血清型に由来し得る。

【0217】

当業者であれば、I T R 配列が、二本鎖ホリデージャンクションの一般構造を有し、典型的には、T 形又は Y 形ヘアピン構造であり、各 W T - I T R が、より大きなパルンドロームアーム (A - A') に埋め込まれた 2 つのパルンドロームアーム又はループ (B - B'、及び C - C')、並びに一本鎖 D 配列によって形成される (これらのパルンドローム配列の順序は、I T R のフリップ又はフロップ配向を定義する) ことを知っている。例えば、異なる A A V 血清型 (A A V 1 ~ A A V 6) 由来の I T R の構造解析及び配列比較を参照されたく、G r i m m e t a l., J. V i r o l o g y, 2006; 80 (1); 426-439、Y a n e t a l., J. V i r o l o g y, 2005; 364-379、D u a n e t a l., V i r o l o g y 1999; 261; 8-14 に記載

10

20

30

40

50

されている。当業者は、本明細書に提供される例示的な AAV2 ITR 配列に基づいて、ceDNA ベクター又は ceDNA プラスミドで使用するための任意の AAV 血清型から WT-ITR 配列を容易に決定することができる。例えば、異なる AAV 血清型 (AAV1~AAV6、並びにトリ AAV (AAA V) 及びウシ AAV (BAA V)) 由来の ITR の配列比較を参照されたく、Grimm et al., J. Virology, 2006; 80 (1); 426-439 に記載されており、他の血清型由来の左 ITR に対する AAV2 の左 ITR の % 同一性: AAV-1 (84%)、AAV-3 (86%)、AAV-4 (79%)、AAV-5 (58%)、AAV-6 (左 ITR) (100%)、及び AAV-6 (右 ITR) (82%) を示す。

【0218】

10

A. 対称 ITR 対

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される PAH タンパク質の発現のための ceDNA ベクターは、5' から 3' 方向に、第 1 のアデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、関心対象の核酸配列 (例えば、本明細書に記載される発現カセット)、及び第 2 の AAV ITR を含み、第 1 の ITR (5' ITR) 及び第 2 の ITR (3' ITR) は、互いに対して対称又は実質的に対称であり、すなわち、ceDNA ベクターは、対称の三次元空間構成を有する ITR 配列を含み得、それによりそれらの構造は、幾何学的空間で同じ形状であるか、又は三次元空間で同じ A、C-C'、B-B' ループを有する。そのような実施形態では、対称の ITR 対、又は実質的に対称の ITR 対は、野生型 ITR ではない修飾型 ITR (例えば、mod-ITR) であり得る。mod-ITR 対は、野生型 ITR からの 1 つ以上の修飾を有し、互いに逆相補 (逆位) である同じ配列を有し得る。代替実施形態では、修飾型 ITR 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型 ITR 対は、異なる配列を有し得るが、対応する又は同じ対称の三次元形状を有し得る。

20

【0219】

(i) 野生型 ITR

いくつかの実施形態では、対称の ITR、又は実質的に対称の ITR は、本明細書に記載されるように野生型 (WT-ITR) である。すなわち、両方の ITR が野生型配列を有するが、必ずしも同じ AAV 血清型の WT-ITR である必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方の WT-ITR は、1 つの AAV 血清型に由来し得、他方の WT-ITR は、異なる AAV 血清型に由来し得る。そのような実施形態では、WT-ITR 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称的な三次元空間構成を維持しながら、1 つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。

30

【0220】

したがって、本明細書で開示されるように、ceDNA ベクターは、2 つの隣接する野生型逆位末端反復 (WT-ITR) 配列の間に位置付けられた核酸配列 (例えば、導入遺伝子又は異種核酸配列) を含有し、互いに逆相補 (逆位) であるか、又は代替的に互いに実質的に対称である。すなわち、WT-ITR 対は、対称の三次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、野生型 ITR 配列 (例えば、AAV WT-ITR) は、機能的 Rep 結合部位 (RBS; 例えば、AAV2 の 5' -GCGCGCTCGCTCGCTC-3'、配列番号 60) 及び機能的末端分離部位 (TRS; 例えば、5' -AGTTT-3'、(配列番号 62) を含む。

40

【0221】

一態様では、PAH タンパク質の発現のための ceDNA ベクターは、2 つの WT 逆位末端反復配列 (WT-ITR) (例えば、AAV WT-ITR) の間に作動可能に位置付けられた核酸 (例えば、異種核酸) をコードするベクターポリヌクレオチドから取得可能である。すなわち、両方の ITR が野生型配列を有するが、必ずしも同じ AAV 血清型の WT-ITR である必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、一方の WT-ITR は、1 つの AAV 血清型に由来し得、他方の WT-ITR は、異なる AAV 血清型に

50

由来し得る。そのような実施形態では、WT-ITR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称の三次元空間構成を維持しながら、1つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。いくつかの実施形態では、5' WT-ITRは、1つのAAV血清型に由来し、3' WT-ITRは、同じ又は異なるAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、5' WT-ITR及び3' WT-ITRは、互いの鏡像であり、すなわち、それらは対称である。いくつかの実施形態では、5' WT-ITR及び3' WT-ITRは、同じAAV血清型に由来する。

【0222】

WT ITRは周知である。一実施形態では、2つのITRは、同じAAV2血清型に由来する。ある特定の実施形態では、他の血清型からのWTを使用することができる。相同であるいくつかの血清型、例えば、AAV2、AAV4、AAV6、AAV8がある。一実施形態では、密接に相同なITR（例えば、類似のループ構造を有するITR）を使用することができる。別の実施形態では、より多様なAAV WT ITR、例えばAAV2及びAAV5を使用することができ、更に別の実施形態では、実質的にWTであるITRを使用することができる、すなわち、それはWTの基本ループ構造を有するが、特性を変更しないか又は影響しないいくつかの保存的ヌクレオチド変化を有する。同じウイルス血清型に由来するWT-ITRを使用する場合、1つ以上の調節配列を更に使用することができる。ある特定の実施形態では、調節配列は、ceDNAの活性、例えば、コードされたPAHタンパク質の発現の調整を可能にする調節スイッチである。

【0223】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される技術の一態様は、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターに関し、ceDNAベクターは、2つの野生型逆位末端反復配列（WT-ITR）の間に作動可能に位置付けられたPAHタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列（例えば、異種核酸配列）を含み、WT-ITRは、同じ血清型、異なる血清型に由来し得るか、又は互いに対して実質的に対称であり得る（すなわち、それらの構造が幾何学的空間で同じ形状であるように対称の三次元空間構成を有するか、又は三次元空間で同じA、C-C'、及びB-B'ループを有する）。いくつかの実施形態では、対称WT-ITRは、機能的末端分離部位及びRep結合部位を含む。いくつかの実施形態では、核酸（例えば、異種核酸）配列は、導入遺伝子をコードし、ベクターは、ウイルスカプシドにはない。

【0224】

いくつかの実施形態では、WT-ITRは同じであるが、互いの逆相補体である。例えば、5' ITRの配列A A C Gは、対応する部位の3' ITRのC G T T（すなわち、逆相補体）であり得る。一実施例では、5' WT-ITRセンス鎖は、A T C G A T C G（配列番号605）の配列を含み、対応する3' WT-ITRセンス鎖は、C G A T C G A T（配列番号606）（すなわち、A T C G A T C G（配列番号607）の逆相補体）を含む。いくつかの実施形態では、WT-ITR ceDNAは、末端分離部位及び複製タンパク質結合部位（replication protein binding site）（RPS）（複製タンパク質結合部位（replicative protein binding site）とも称される）、例えば、Rep結合部位を更に含む。

【0225】

WT-ITRを含むPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターで使用するための例示的なWT-ITR配列は、WT-ITRの対（5' WT-ITR及び3' WT-ITR）を示す本明細書の表3に示されている。

【0226】

いくつかの実施形態では、隣接するWT-ITRは、同一で、互いに対して実質的に対称である。いくつかの他の実施形態では、隣接するWT-ITRは、互いに対して実質的に対称である。この実施形態では、WT-ITRが同一の逆相補体ではないように、5' WT-ITRは、AAVの1つの血清型に由来し、3' WT-ITRは、AAVの異なる血清型に由来し得る。例えば、5' WT-ITRは、AAV2に由来し得、3' WT-ITR

10

20

30

40

50

Rは、異なる血清型（例えば、AAV1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び12）に由来し得る。いくつかの実施形態では、WT-ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、ヘビパルボウイルス（例えば、ロイヤルパイソンパルボウイルス）、ウシパルボウイルス、ヤギパルボウイルス、トリパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ウマパルボウイルス、エビパルボウイルス、ブタパルボウイルス、又は昆虫AAVのうちのいずれかから選択される2つの異なるパルボウイルスから選択され得る。いくつかの実施形態では、WT-ITRのそのような組み合わせは、AAV2及びAAV6からのWT-ITRの組み合わせである。一実施形態では、実質的に対称のWT-ITRは、一方が他方のITRに対して反転されたときに、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%...97%...98%...99%...99.5%、及びその間の全てのポイントであり、同じ対称の三次元空間構成を有する。いくつかの実施形態では、WT-ITR対は、それらが対称の三次元空間構成を有する（例えば、A、C-C'、B-B'、及びDアームの同じ三次元構成を有する）ため、実質的に対称である。一実施形態では、実質的に対称のWT-ITR対は、他方に対して反転され、少なくとも95%同一、少なくとも96%...97%...98%...99%...99.5%、及びその間の全てのポイントであり、一方のWT-ITRは、5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号60）のRep結合部位（RBS）及び末端分離部位（trs）を保持する。いくつかの実施形態では、実質的に対称のWT-ITR対は、互いに対して反転され、少なくとも95%同一、少なくとも96%...97%...98%...99%...99.5%、及びその間の全てのポイントであり、一方のWT-ITRは、ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パリンドローム配列に加えて、5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号60）のRep結合部位（RBS）及び末端分離部位（trs）を保持する。相同性は、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）、デフォルト設定のBLASTNなど、当該技術分野で周知の標準的な手段によって決定することができる。

10

20

30

40

50

【0227】

いくつかの実施形態では、ITRの構造エレメントは、ITRと大きなRepタンパク質（例えば、Rep78又はRep68）との機能的相互作用に参与する任意の構造エレメントであり得る。ある特定の実施形態では、構造エレメントは、ITRと大きなRepタンパク質との相互作用に対する選択性を提供する。すなわち、少なくとも部分的に、どのRepタンパク質がITRと機能的に相互作用するかを判定する。他の実施形態では、構造エレメントは、Repタンパク質がITRに結合されたとき、大きなRepタンパク質と物理的に相互作用する。各構造エレメントは、例えば、ITRの二次構造、ITRの核酸配列、2つ以上のエレメント間の空間、又は上記のうちのいずれかの組み合わせであり得る。一実施形態では、構造エレメントは、A及びA'アーム、B及びB'アーム、C及びC'アーム、Dアーム、Rep結合部位（RBE）及びRBE'（すなわち、相補的RBE配列）、並びに末端分離部位（trs）からなる群から選択される。

【0228】

単なる例として、表2は、WT-ITRの例示的な組み合わせを示す。

【0229】

表2：同じ血清型若しくは異なる血清型、又は異なるパルボウイルスからのWT-ITRの例示的な組み合わせ。示されている順序は、ITR位置を示すものではなく、例えば、「AAV1、AAV2」は、ceDNAが5'位置にWT-AAV1 ITR及び3'位置にWT-AAV2 ITR、又はその逆、5'位置にWT-AAV2 ITR及び3'位置にWT-AAV1 ITRを含み得ることを明示する。略称：AAV血清型1（AAV1）、AAV血清型2（AAV2）、AAV血清型3（AAV3）、AAV血清型4（AAV4）、AAV血清型5（AAV5）、AAV血清型6（AAV6）、AAV血清型7（AAV7）、AAV血清型8（AAV8）、AAV血清型9（AAV9）、AAV血清型10（AAV10）、AAV血清型11（AAV11）、又はAAV血清型12（AAV12）

V12)、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ、及びAAV-DJ8ゲノム（例えば、NCBI：NC002077、NC001401、NC001729、NC001829、NC006152、NC006260、NC006261）、温血動物由来のITR（トリAAV（AAAV）、ウシAAV（BAAV）、イヌ、ウマ、及びヒツジAAV）、B19パルボウイルス由来のITR（GenBank受託番号：NC000883）、マウス由来微小ウイルス（MVM）（GenBank受託番号NC001510）、ガチョウ：ガチョウパルボウイルス（GenBank受託番号NC001701）、ヘビ：ヘビパルボウイルス1（GenBank受託番号NC006148）。

【0230】

【表2-1】

表2

AAV1、AAV1	AAV2、AAV2	AAV3、AAV3	AAV4、AAV4	AAV5、AAV5
AAV1、AAV2	AAV2、AAV3	AAV3、AAV4	AAV4、AAV5	AAV5、AAV6
AAV1、AAV3	AAV2、AAV4	AAV3、AAV5	AAV4、AAV6	AAV5、AAV7
AAV1、AAV4	AAV2、AAV5	AAV3、AAV6	AAV4、AAV7	AAV5、AAV8
AAV1、AAV5	AAV2、AAV6	AAV3、AAV7	AAV4、AAV8	AAV5、AAV9
AAV1、AAV6	AAV2、AAV7	AAV3、AAV8	AAV4、AAV9	AAV5、AAV10
AAV1、AAV7	AAV2、AAV8	AAV3、AAV9	AAV4、AAV10	AAV5、AAV11
AAV1、AAV8	AAV2、AAV9	AAV3、AAV10	AAV4、AAV11	AAV5、AAV12
AAV1、AAV9	AAV2、AAV10	AAV3、AAV11	AAV4、AAV12	AAV5、AAVRH8
AAV1、AAV10	AAV2、AAV11	AAV3、AAV12	AAV4、AAVRH8	AAV5、AAVRH10
AAV1、AAV11	AAV2、AAV12	AAV3、AAVRH8	AAV4、AAVRH10	AAV5、AAV13
AAV1、AAV12	AAV2、AAVRH8	AAV3、AAVRH10	AAV4、AAV13	AAV5、AAVDJ
AAV1、AAVRH8	AAV2、AAVRH10	AAV3、AAV13	AAV4、AAVDJ	AAV5、AAVDJ8
AAV1、AAVRH10	AAV2、AAV13	AAV3、AAVDJ	AAV4、AAVDJ8	AAV5、トリ
AAV1、AAV13	AAV2、AAVDJ	AAV3、AAVDJ8	AAV4、トリ	AAV5、ウシ
AAV1、AAVDJ	AAV2、AAVDJ8	AAV3、トリ	AAV4、ウシ	AAV5、イヌ
AAV1、AAVDJ8	AAV2、トリ	AAV3、ウシ	AAV4、イヌ	AAV5、ウマ
AAV1、トリ	AAV2、ウシ	AAV3、イヌ	AAV4、ウマ	AAV5、ヤギ
AAV1、ウシ	AAV2、イヌ	AAV3、ウマ	AAV4、ヤギ	AAV5、エビ
AAV1、イヌ	AAV2、ウマ	AAV3、ヤギ	AAV4、エビ	AAV5、ブタ
AAV1、ウマ	AAV2、ヤギ	AAV3、エビ	AAV4、ブタ	AAV5、昆虫
AAV1、ヤギ	AAV2、エビ	AAV3、ブタ	AAV4、昆虫	AAV5、ヒツジ
AAV1、エビ	AAV2、ブタ	AAV3、昆虫	AAV4、ヒツジ	AAV5、B19
AAV1、ブタ	AAV2、昆虫	AAV3、ヒツジ	AAV4、B19	AAV5、MVM
AAV1、昆虫	AAV2、ヒツジ	AAV3、B19	AAV4、MVM	AAV5、ガチョウ
AAV1、ヒツジ	AAV2、B19	AAV3、MVM	AAV4、ガチョウ	AAV5、ヘビ
AAV1、B19	AAV2、MVM	AAV3、ガチョウ	AAV4、ヘビ	
AAV1、MVM	AAV2、ガチョウ	AAV3、ヘビ		
AAV1、ガチョウ	AAV2、ヘビ			
AAV1、ヘビ				
AAV6、AAV6	AAV7、AAV7	AAV8、AAV8	AAV9、AAV9	AAV10、AAV10
AAV6、AAV7	AAV7、AAV8	AAV8、AAV9	AAV9、AAV10	AAV10、AAV11
AAV6、AAV8	AAV7、AAV9	AAV8、AAV10	AAV9、AAV11	AAV10、AAV12
AAV6、AAV9	AAV7、AAV10	AAV8、AAV11	AAV9、AAV12	AAV10、AAVRH8
AAV6、AAV10	AAV7、AAV11	AAV8、AAV12	AAV9、AAVRH8	AAV10、AAVRH10
AAV6、AAV11	AAV7、AAV12	AAV8、AAVRH8	AAV9、AAVRH10	AAV10、AAV13
AAV6、AAV12	AAV7、AAVRH8	AAV8、AAVRH10	AAV9、AAV13	AAV10、AAVDJ
AAV6、AAVRH8	AAV7、AAVRH10	AAV8、AAV13	AAV9、AAVDJ	AAV10、AAVDJ8
AAV6、AAVRH10	AAV7、AAV13	AAV8、AAVDJ	AAV9、AAVDJ8	AAV10、トリ
AAV6、AAV13	AAV7、AAVDJ	AAV8、AAVDJ8	AAV9、トリ	AAV10、ウシ
AAV6、AAVDJ	AAV7、AAVDJ8	AAV8、トリ	AAV9、ウシ	AAV10、イヌ
AAV6、AAVDJ8	AAV7、トリ	AAV8、ウシ	AAV9、イヌ	AAV10、ウマ
AAV6、トリ	AAV7、ウシ	AAV8、イヌ	AAV9、ウマ	AAV10、ヤギ
AAV6、ウシ	AAV7、イヌ	AAV8、ウマ	AAV9、ヤギ	AAV10、エビ
AAV6、イヌ	AAV7、ウマ	AAV8、ヤギ	AAV9、エビ	AAV10、ブタ
AAV6、ウマ	AAV7、ヤギ	AAV8、エビ	AAV9、ブタ	AAV10、昆虫
AAV6、ヤギ	AAV7、エビ	AAV8、ブタ	AAV9、昆虫	AAV10、ヒツジ
AAV6、エビ	AAV7、ブタ	AAV8、昆虫	AAV9、ヒツジ	AAV10、B19
AAV6、ブタ	AAV7、昆虫	AAV8、ヒツジ	AAV9、B19	AAV10、MVM
AAV6、昆虫	AAV7、ヒツジ	AAV8、B19	AAV9、MVM	AAV10、ガチョウ
AAV6、ヒツジ	AAV7、B19	AAV8、MVM	AAV9、ガチョウ	AAV10、ヘビ
AAV6、B19	AAV7、MVM	AAV8、ガチョウ	AAV9、ヘビ	
AAV6、MVM	AAV7、ガチョウ	AAV8、ヘビ		
AAV6、ガチョウ	AAV7、ヘビ			
AAV6、ヘビ				

10

20

30

40

50

【 0 2 3 1 】

【表 2 - 2】

(表 2 の続き)

AAV11、AAV11	AAV12、AAV12	AAVRH8、AAVRH8	AAVRH10、AAVRH10	AAV13、AAV13
AAV11、AAV12	AAV12、AAVRH8	AAVRH8、AAVRH10	AAVRH10、AAV13	AAV13、AAVDJ
AAV11、AAVRH8	AAV12、AAVRH10	AAVRH8、AAV13	AAVRH10、AAVDJ	AAV13、AAVDJ8
AAV11、AAVRH10	AAV12、AAV13	AAVRH8、AAVDJ	AAVRH10、AAVDJ8	AAV13、トリ
AAV11、AAV13	AAV12、AAVDJ	AAVRH8、AAVDJ8	AAVRH10、トリ	AAV13、ウシ
AAV11、AAVDJ	AAV12、AAVDJ8	AAVRH8、トリ	AAVRH10、ウシ	AAV13、イヌ
AAV11、AAVDJ8	AAV12、トリ	AAVRH8、ウシ	AAVRH10、イヌ	AAV13、ウマ
AAV11、トリ	AAV12、ウシ	AAVRH8、イヌ	AAVRH10、ウマ	AAV13、ヤギ
AAV11、ウシ	AAV12、イヌ	AAVRH8、ウマ	AAVRH10、ヤギ	AAV13、エビ
AAV11、イヌ	AAV12、ウマ	AAVRH8、ヤギ	AAVRH10、エビ	AAV13、ブタ
AAV11、ウマ	AAV12、ヤギ	AAVRH8、エビ	AAVRH10、ブタ	AAV13、昆虫
AAV11、ヤギ	AAV12、エビ	AAVRH8、ブタ	AAVRH10、昆虫	AAV13、ヒツジ
AAV11、エビ	AAV12、ブタ	AAVRH8、昆虫	AAVRH10、ヒツジ	AAV13、B19
AAV11、ブタ	AAV12、昆虫	AAVRH8、ヒツジ	AAVRH10、B19	AAV13、MVM
AAV11、昆虫	AAV12、ヒツジ	AAVRH8、B19	AAVRH10、MVM	AAV13、ガチョウ
AAV11、ヒツジ	AAV12、B19	AAVRH8、MVM	AAVRH10、ガチョウ	AAV13、ヘビ
AAV11、B19	AAV12、MVM	AAVRH8、ガチョウ	AAVRH10、ヘビ	
AAV11、MVM	AAV12、ガチョウ	AAVRH8、ヘビ		
AAV11、ガチョウ	AAV12、ヘビ			
AAV11、ヘビ				
AAVDJ、AAVDJ	AAVDJ8、AAVDJ8	トリ、トリ	ウシ、ウシ	イヌ、イヌ
AAVDJ、AAVDJ8	AAVDJ8、トリ	トリ、ウシ	ウシ、イヌ	イヌ、ウマ
AAVDJ、トリ	AAVDJ8、ウシ	トリ、イヌ	ウシ、ウマ	イヌ、ヤギ
AAVDJ、ウシ	AAVDJ8、イヌ	トリ、ウマ	ウシ、ヤギ	イヌ、エビ
AAVDJ、イヌ	AAVDJ8、ウマ	トリ、ヤギ	ウシ、エビ	イヌ、ブタ
AAVDJ、ウマ	AAVDJ8、ヤギ	トリ、エビ	ウシ、ブタ	イヌ、昆虫
AAVDJ、ヤギ	AAVDJ8、エビ	トリ、ブタ	ウシ、昆虫	イヌ、ヒツジ
AAVDJ、エビ	AAVDJ8、ブタ	トリ、昆虫	ウシ、ヒツジ	イヌ、B19
AAVDJ、ブタ	AAVDJ8、昆虫	トリ、ヒツジ	ウシ、B19	イヌ、MVM
AAVDJ、昆虫	AAVDJ8、ヒツジ	トリ、B19	ウシ、MVM	イヌ、ガチョウ
AAVDJ、ヒツジ	AAVDJ8、B19	トリ、MVM	ウシ、ガチョウ	イヌ、ヘビ
AAVDJ、B19	AAVDJ8、MVM	トリ、ガチョウ	ウシ、ヘビ	
AAVDJ、MVM	AAVDJ8、ガチョウ	トリ、ヘビ		
AAVDJ、ガチョウ	AAVDJ8、ヘビ			
AAVDJ、ヘビ				
ウマ、ウマ	ヤギ、ヤギ	エビ、エビ	ブタ、ブタ	昆虫、昆虫
ウマ、ヤギ	ヤギ、エビ	エビ、ブタ	ブタ、昆虫	昆虫、ヒツジ
ウマ、エビ	ヤギ、ブタ	エビ、昆虫	ブタ、ヒツジ	昆虫、B19
ウマ、ブタ	ヤギ、昆虫	エビ、ヒツジ	ブタ、B19	昆虫、MVM
ウマ、昆虫	ヤギ、ヒツジ	エビ、B19	ブタ、MVM	昆虫、ガチョウ
ウマ、ヒツジ	ヤギ、B19	エビ、MVM	ブタ、ガチョウ	昆虫、ヘビ
ウマ、B19	ヤギ、MVM	エビ、ガチョウ	ブタ、ヘビ	
ブタ、MVM	ヤギ、ガチョウ	エビ、ヘビ		
ブタ、ガチョウ	ヤギ、ヘビ			
ウマ、ヘビ				
ヒツジ、ヒツジ	B19、B19	MVM、MVM	ガチョウ、ガチョウ	ヘビ、ヘビ
ヒツジ、B19	B19、MVM	MVM、ガチョウ	ガチョウ、ヘビ	
ヒツジ、MVM	B19、ガチョウ	MVM、ヘビ		
ヒツジ、ガチョウ	B19、ヘビ			
ヒツジ、ヘビ				

【 0 2 3 2 】

単なる例として、表 3 は、いくつかの異なる A A V 血清型からの例示的な W T - I T R の配列を示す。

【 0 2 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

AAV 血清型	5' WT-ITR(左)	3' WT-ITR(右)
AAV1	5'-TTGCCCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC GCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAA GGTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTCTG CCGGCCCCACCGAGCGAGCGACGCGCG CAGAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACT AGGGTAA-3'(配列番号5)	5'-TTACCCTAGTGATGGAGTTGCCCACT CCCTCTCTGCGCGCGTCTCGCTCGCTCGGT GGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGTC TGCGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCACC GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGGCAA-3'(配列番号10)
AAV2	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCT CACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCCGCCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTT CCT(配列番号2)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCGA CGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG(配列番号1)
AAV3	5'-TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTC GCTCGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAA GGTCCGCAGACGGACGTGGGTTTCCACG TCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCG CATAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT AGAGGTAT-3'(配列番号6)	5'-ATACCTCTAGTGATGGAGTTGGCCA CTCCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGG TGGGGCCGGACGTGGAAACCCACGTCCG TCTGGCGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCA CCGAGCGAGCGAGTGCGCATAGAGGGA GTGGCCAA-3'(配列番号11)
AAV4	5'-TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTC GCTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAA GGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGG CAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGC ATAGAGGGAGTGGCCAACT-3'(配列番号 7)	5'-AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGC TCGCTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCA AAGGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCC GGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGC GCATAGAGGGAGTGGCCAA-3'(配列番号 12)
AAV5	5'-TCCCCCCTGTGCGGTTGCTCGCTC GCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCA GAGGGCCGTGCTCTGGCAGCTCTTTGAG CTGCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAG CGAGCGAACGCGACAGGGGGGAGAGTG CCACACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTA AG-3'(配列番号8)	5'-CTTACAAAACCCCTTGCTTGAGAGT GTGGCACTCTCCCCCCTGTGCGGTTGCG TCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGTGG CAGCTCAAAGAGCTGCCAGACGACGGCC CTCTGGCCGTGCGCCCCCAAACGAGCC AGCGAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGG A-3'(配列番号13)
AAV6	5'-TTGCCCCACTCCCTCTAATGCGCGCT CGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAA AGGTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTCT GCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGCGCG CATAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACT AGGGGTAT-3'(配列番号9)	5'-ATACCCTAGTGATGGAGTTGCCCA CTCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCGG TGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGT CTGCGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCAC CGAGCGAGCGAGCGCGCATTAGAGGGA GTGGGCAA(配列番号14)

10

20

30

【0234】

いくつかの実施形態では、WT-ITR配列の核酸配列は、（例えば、1、2、3、4若しくは5個以上のヌクレオチド又はその中の任意の範囲を修飾することにより）修飾され得、それにより修飾は、相補的ヌクレオチドの置換、例えば、Cの場合はG、及びその逆、Aの場合はT、及びその逆である。

40

【0235】

本開示のある特定の実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、配列番号1、2、5～14のうちのいずれかから選択される核酸配列からなるWT-ITRを有さない。本開示の代替実施形態では、ceDNAベクターが、配列番号1、2、5～14のうちのいずれかから選択される核酸配列を含むWT-ITRを有する場合、隣接するITRもWTであり、ceDNAは、例えば、本明細書及び国際特許出願第US18/49996号に開示されているように、調節スイッチを含む（例えば、同第US18/49996号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の表11を参照されたい）。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示されるような調節スイッチ、及び配列番号1、2、5～14からな

50

る群のうちのいずれかから選択される核酸配列を有する選択されたWT-ITRを含む。

【0236】

本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、作動可能なRBE、trs、及びRBE'部分を保持するWT-ITR構造を含み得る。例示の目的で野生型ITRを使用する図1A及び図1Bは、ceDNAベクターの野生型ITR構造部分内のTRS部位の作動のための1つの可能な機序を示す。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、Rep結合部位(RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (配列番号60) AAV2の場合)及び末端分離部位(TRS; 5'-AGTT (配列番号62))を含む1つ以上の機能的WT-ITRポリヌクレオチド配列を含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのWT-ITRは、機能的である。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターが互いに実質的に対称である2つのWT-ITRを含む代替実施形態では、少なくとも1つのWT-ITRが機能的であり、少なくとも1つのWT-ITRが非機能的である。

10

【0237】

B. 非対称ITR対又は対称ITR対を含むceDNAベクターの一般的な修飾型ITR(mod-ITR)

本明細書で論じられるように、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、対称ITR対又は非対称ITR対を含み得る。どちらの場合も、一方又は両方のITRは修飾型ITRであり得、その違いは、第1の場合(すなわち、対称mod-ITR)では、mod-ITRは、同じ三次元空間構成を有する(すなわち、同じA-A'、C-C'、及びB-B'アーム構成を有する)が、第2の場合(すなわち、非対称mod-ITR)では、mod-ITRは、異なる三次元空間構成を有する(すなわち、A-A'、C-C'、及びB-B'アームの異なる構成を有する)ことである。

20

【0238】

いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、野生型ITR配列(例えば、AAV ITR)と比較して、欠失、挿入、及び/又は置換によって修飾されるITRである。いくつかの実施形態では、ceDNAベクター中のITRのうちの少なくとも1つは、機能的Rep結合部位(RBS; 例えば、AAV2の5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'、配列番号60)及び機能的末端分離部位(TRS; 例えば、5'-AGTT-3'、配列番号62)を含む。一実施形態では、ITRのうちの少なくとも1つは、非機能的ITRである。一実施形態では、異なる又は修飾型ITRは各々、異なる血清型からの野生型ITRではない。

30

【0239】

ITRの特定の変更及び変異が本明細書において詳細に説明されているが、ITRの文脈では、「変更型」又は「変異型」又は「修飾型」とは、ヌクレオチドが野生型、参照、又は元のITR配列に対して挿入、欠失、及び/又は置換されたことを示す。変更型又は変異型ITRは、操作されたITRであり得る。本明細書で使用される場合、「操作された」とは、人の手によって操作された態様を指す。例えば、ポリペプチドは、ポリペプチドの少なくとも1つの態様、例えば、その配列が、人の手によって操作され、それが天然に存在するときの態様とは異なるとき、「操作された」とみなされる。

40

【0240】

いくつかの実施形態では、mod-ITRは、合成であり得る。一実施形態では、合成ITRは、2つ以上のAAV血清型からのITR配列に基づいている。別の実施形態では、合成ITRは、AAVベース配列を含まない。更に別の実施形態では、合成ITRは、上記のITR構造を保存するが、わずかなAAV源配列を有するか、又は全く有しない。いくつかの態様では、合成ITRは、野生型Rep又は特定血清型のRepと選好的に相互作用し得るか、又は場合によっては、野生型Repによって認識されず、変異型Repによってのみ認識される。

【0241】

当業者であれば、既知の手段によって他の血清型における対応する配列を判定すること

50

ができる。例えば、A、A'、B、B'、C、C'、又はD領域中に変化が存在するかどうかを判定し、別の血清型における対応する領域を判定する。BLAST（登録商標）（Basic Local Alignment Search Tool）又は他の相同性アラインメントプログラムをデフォルト状態で使用して、対応する配列を判定することができる。本開示は、異なるAAV血清型の組み合わせからmod-ITRを含む集団及び複数のceDNAベクターを更に提供する。すなわち、1つのmod-ITRは、1つのAAV血清型に由来し得、他のmod-ITRは、異なる血清型に由来し得る。理論に束縛されるものではないが、一実施形態では、1つのITRは、AAV2 ITR配列に由来し得るか、又はそれに基づき得、ceDNAベクターの他のITRは、AAV血清型1（AAV1）、AAV血清型4（AAV4）、AAV血清型5（AAV5）、AAV血清型6（AAV6）、AAV血清型7（AAV7）、AAV血清型8（AAV8）、AAV血清型9（AAV9）、AAV血清型10（AAV10）、AAV血清型11（AAV11）、又はAAV血清型12（AAV12）の任意の1つ以上のITR配列に由来し得るか、又はそれに基づき得る。

10

【0242】

任意のパルボウイルスITRを、ITRとして、又は塩基ITRとして修飾に使用することができる。好ましくは、パルボウイルスは、ディペンドウイルスである。より好ましくは、AAVである。選択される血清型は、その血清型の組織向性に基づき得る。AAV2は、広い組織向性を有し、AAV1は、ニューロン及び骨格筋を選好的に標的し、AAV5は、ニューロン、網膜色素上皮、及び光受容体を標的とする。AAV6は、骨格筋及び肺を選好的に標的とする。AAV8は、肝臓、骨格筋、心臓、及び脾臓組織を選好的に標的とする。AAV9は、肝臓、骨格、及び肺組織を選好的に標的とする。一実施形態では、修飾型ITRは、AAV2 ITRに基づいている。

20

【0243】

より具体的には、構造エレメントが特定の大きなRepタンパク質と機能的に相互作用する能力は、構造エレメントを修飾することによって変更され得る。例えば、構造エレメントの核酸配列は、ITRの野生型配列と比較して修飾され得る。一実施形態では、ITRの構造エレメント（例えば、Aアーム、A'アーム、Bアーム、B'アーム、Cアーム、C'アーム、Dアーム、RBE、RBE'、及びtrs）を除去し、異なるパルボウイルスからの野生型構造エレメントと置き換えることができる。例えば、置換構造は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、ヘビパルボウイルス（例えば、ロイヤルパイソパルボウイルス）、ウシパルボウイルス、ヤギパルボウイルス、トリパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ウマパルボウイルス、エビパルボウイルス、ブタパルボウイルス、又は昆虫AAVからのものであり得る。例えば、ITRは、AAV2 ITRであり得、A若しくはA'アーム又はRBEは、AAV5からの構造エレメントと置き換えることができる。別の実施例では、ITRは、AAV5 ITRであり得、C又はC'アーム、RBE、及びtrsは、AAV2からの構造エレメントと置き換えることができる。別の実施例では、AAV ITRは、AAV5 ITRであり得、B及びB'アームは、AAV2 ITR B及びB'アームで置き換えられる。

30

40

【0244】

単なる例として、表4は、修飾型ITRの領域中の少なくとも1つのヌクレオチドの例示的な修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を示し、Xは、対応する野生型ITRに対する、そのセクションにおける少なくとも1つの核酸の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を示す。いくつかの実施形態では、C及び／又はC'及び／又はB及び／又はB'の領域のうちのいずれかにおける少なくとも1つのヌクレオチドの任意の修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）は、少なくとも1つの末端ループに3つの連続Tヌクレオチド（すなわち、TTT）を保持する。例えば、修飾が、単一アームITR（例えば、単一C-C'アーム、若しくは単一B-B'アーム）、又は修飾型C-B'アーム若しくはC'-Bアーム、又は少なくとも1つの切断されたアーム（例えば、切断され

50

た C-C' アーム及び／若しくは切断された B-B' アーム) を有する 2 つのアーム ITR のうちのいずれかをもたらず場合、少なくとも単一アーム、又は 2 つのアーム ITR のアーム (1 つのアームは切断され得る) のうちの少なくとも 1 つは、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド (すなわち、TTT) を保持する。いくつかの実施形態では、切断された C-C' アーム及び／又は切断された B-B' アームは、末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド (すなわち、TTT) を有する。

【0245】

表 4: ITR の異なる B-B' 及び C-C' 領域又はアームに対する少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾 (例えば、欠失、挿入、及び／又は置換) の例示的な組み合わせ (X は、ヌクレオチド修飾、例えば、領域中の少なくとも 1 つのヌクレオチドの付加、欠失、又は置換を示す)。

10

【0246】

【表 4】

B 領域	B' 領域	C 領域	C' 領域
X			
	X		
X	X		
		X	
			X
		X	X
X		X	
X			X
	X	X	
	X		X
X	X	X	
X	X		X
X		X	X
	X	X	X
X	X	X	X

20

【0247】

いくつかの実施形態では、PAH タンパク質の発現のための ceDNA ベクターで使用するための mod-ITR は、本明細書に開示される非対称 ITR 対又は対称 mod-ITR 対を含み、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A' と C との間、C と C' との間、C' と B との間、B と B' との間、及び B' と A との間から選択される領域のうちのいずれか 1 つ以上における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、C 若しくは C' 又は B 若しくは B' 領域中の少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾 (例えば、欠失、挿入、及び／又は置換) は、依然としてステムループの末端ループを保存する。いくつかの実施形態では、C と C' との間及び／又は B と B' との間の少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾 (例えば、欠失、挿入、及び／又は置換) は、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 T ヌクレオチド (すなわち、TTT) を保持する。代替実施形態では、C と C' との間及び／又は B と B' との間の少なくとも 1 つのヌクレオチドの任意の修飾 (例えば、欠失、挿入、及び／又は置換) は、少なくとも 1 つの末端ループに 3 つの連続 A ヌクレオチド (すなわち、AAA) を保持する。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 ITR は、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A'、A、及び／又は D から選択される領域のうちのいずれか 1 つ以上における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾 (例えば、欠失、挿入、及び／又は置換) を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 ITR は、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A 領域における少なくとも 1 つの修飾 (例えば、欠失、挿入、及び／又は置換) も含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 ITR は、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか 1 つ、また A' 領域にお

30

40

50

る少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、また A 及び／又は A' 領域における少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のための修飾型 I T R は、表 4 に示される修飾の組み合わせのうちのいずれか1つ、また D 領域における少なくとも1つのヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、及び／又は置換）を含み得る。

【0248】

一実施形態では、構造エレメントのヌクレオチド配列を修飾して（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20以上のヌクレオチド、又はその中の任意の範囲）、修飾型構造エレメントを生成することができる。一実施形態では、I T R に対する特定の修飾が本明細書に例示されているか（例えば、配列番号3、4、15～47、101～116、若しくは165～187）、又は2018年12月6日出願された国際出願第US2018/064242号の図7A～7Bに示されている（例えば、国際出願第US2018/064242号の配列番号97～98、101～103、105～108、111～112、117～134、545～54）。いくつかの実施形態では、I T R は、（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20以上のヌクレオチド、又はその中の任意の範囲を修飾することによって）修飾され得る。他の実施形態では、I T R は、配列番号3、4、15～47、101～116、若しくは165～187の修飾型 I T R のうちの1つ、又は配列番号3、4、15～47、101～116、若しくは165～187、又は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際出願第US18/49996号の表2～9（すなわち、配列番号110～112、115～190、200～468）に示されている、A-A' アーム及びC-C' 及びB-B' アームのRBE含有セクションと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又はそれ以上の配列同一性を有し得る。

【0249】

いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、例えば、特定アームの全部、例えば、A-A' アームの全部若しくは一部、又はB-B' アームの全部若しくは一部、又はC-C' アームの全部若しくは一部の除去又は欠失、又は代替的にステム（例えば、単一アーム）をキャップする最終ループが依然として存在する限り、ループのステムを形成する1、2、3、4、5、6、7、8、9、又はそれ以上の塩基対の除去（例えば、2018年12月6日出願された国際特許出願第US2018/064242号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の図7AのI T R-21を参照されたい）を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、B-B' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9以上の塩基対の除去を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、C-C' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、又はそれ以上の塩基対の除去を含み得る（例えば、2018年12月6日出願された国際特許出願第US2018/064242号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の図3BのI T R-1又は図7AのI T R-45を参照されたい）。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R は、C-C' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9以上の塩基対の除去、及びB-B' アームからの1、2、3、4、5、6、7、8、9以上の塩基対の除去を含み得る。塩基対の除去の任意の組み合わせが想起され、例えば、C-C' アームにおける6つの塩基対、及びB-B' アームにおける2つの塩基対が除去され得る。例示的な実施例として、図3Bは、修飾型 I T R が、少なくとも1つのアーム（例えば、C-C'）が切断される2つのアームを含むように、C部分及びC'部分の各々から欠失された少なくとも7つの塩基対、C領域とC'領域との間のループ中のヌクレオチドの置換、並びにB領域及びB'領域の各々からの少なくとも1つの塩基対の欠失を有する例示的な修飾型 I T R を示す。いくつかの実施形態では、修飾型 I T R はまた、B領域及びB'領域の各々から

の少なくとも1つの塩基対の欠失を含み、それによりB-B'アームもWT ITRに対して切断される。

【0250】

いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、全長野生型ITR配列に対して1~50（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50）ヌクレオチド欠失を有し得る。いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、全長WT ITR配列に対して1~30ヌクレオチド欠失を有し得る。いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、全長野生型ITR配列に対して2~20ヌクレオチド欠失を有する。

10

【0251】

いくつかの実施形態では、修飾型ITRは、DNA複製（例えば、Repタンパク質によるRBEへの結合、若しくは末端分離部位でのニッキング）に干渉しないように、A又はA'領域のRBE含有部分にいかなるヌクレオチド欠失も含まない。いくつかの実施形態では、本明細書における使用のために包含される修飾型ITRは、本明細書に記載されるB、B'、C、及び／又はC領域に1つ以上の欠失を有する。

【0252】

いくつかの実施形態では、対称ITR対又は非対称ITR対を含むPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示される調節スイッチ、及び配列番号3、4、15~47、101~116、又は165~187からなる群のうちのいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する選択された少なくとも1つの修飾型ITRを含む。

20

【0253】

別の実施形態では、構造エレメントの構造は、修飾され得る。例えば、構造エレメントは、ステムの高さ及び／又はループ内のヌクレオチドの数の変化。例えば、ステムの高さは、約2、3、4、5、6、7、8、若しくは9ヌクレオチド以上、又はその中の任意の範囲であり得る。一実施形態では、ステムの高さは、約5ヌクレオチド~約9ヌクレオチドであり得、Repと機能的に相互作用する。別の実施形態では、ステム高さは、約7ヌクレオチドであり得、Repと機能的に相互作用する。別の実施例では、ステムの高さは、約3、4、5、6、7、8、9、若しくは10ヌクレオチド、又はそれ以上、又はその中の任意の範囲を有し得る。

30

【0254】

別の実施形態では、RBE又は伸長RBE内のGAGY結合部位又はGAGY関連結合部位の数は、増加又は減少され得る。一実施例では、RBE又は伸長RBEは、1、2、3、4、5、若しくは6以上のGAGY結合部位、又はその中の任意の範囲を含み得る。各GAGY結合部位は、独立して、配列がRepタンパク質に結合するのに十分である限り、正確なGAGY配列又はGAGYと同様の配列であり得る。

【0255】

別の実施形態では、2つのエレメント（限定されないが、RBE及びヘアピンなど）の間の空間を変更して（例えば、増加又は減少）、大きなRepタンパク質との機能的相互作用を変更することができる。例えば、空間は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、若しくは21ヌクレオチド以上、又はその中の任意の範囲であり得る。

40

【0256】

本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示される野生型AAV2 ITR構造に関して修飾されるITR構造を含み得るが、依然として作動可能なRBE、trs、及びRBE'部分を保持する。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、Rep結合部位（RBS；5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号60）AAV2の場合）

50

及び末端分離部位（TRS；5'－AGTT（配列番号62））を含む1つ以上の機能的ITRポリヌクレオチド配列を含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのITR（野生型又は修飾型ITR）は、機能的である。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターが、互いに異なるか、又は非対称である2つの修飾型ITRを含む代替実施形態では、少なくとも1つの修飾型ITRは、機能的であり、少なくとも1つの修飾型ITRは、非機能的である。

【0257】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの修飾型ITR（例えば、左又は右ITR）は、ループアーム、切断型アーム、又はスパーサー内に修飾を有する。ループアーム、切断型アーム、又はスパーサー内に修飾を有するITRの例示的な配列は、国際出願第US18/49996号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の表2（すなわち、配列番号135～190、200～233）、表3（例えば、配列番号234～263）、表4（例えば、配列番号264～293）、表5（例えば、本明細書の配列番号294～318）、表6（例えば、配列番号319～468）、及び表7～9（例えば、配列番号101～110、111～112、115～134）、又は表10A若しくは10B（例えば、配列番号9、100、469～483、484～499）に列挙されている。

10

【0258】

いくつかの実施形態では、非対称ITR対又は対称mod-ITR対を含むPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターにおける使用のための修飾型ITRは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際出願第US18/49996号の表2、3、4、5、6、7、8、9、及び10A～10Bに示されるもののうちのいずれか、又はそれらの組み合わせから選択される。

20

【0259】

上記のクラスの各々に非対称ITR対又は対称mod-ITR対を含むPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターで使用するための追加の例示的な修飾型ITRを表5A及び5Bに示す。表5Aの右修飾型ITRの予測二次構造は、2018年12月6日に出願された国際出願第US2018/064242号の図7Aに示されており、表5Bの左修飾型ITRの予測二次構造は、2018年12月6日に出願された国際出願第US2018/064242号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の図7Bに示されている。

30

【0260】

表5A及び表5Bは、例示的な右及び左修飾型ITRを示す。

【0261】

表5A：例示的な修飾型右ITR。これらの例示的な修飾型右ITRは、RBEであるGCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号60）、スパーサーであるACTGAGGC（配列番号69）、スパーサー相補体GCCTCAGT（配列番号70）、及びRBE'（すなわち、RBEの相補体）であるGAGCGAGCGAGCGCGC（配列番号71）を含み得る。

【0262】

40

【表 5 A】

表 5A: 例示的な右修飾型 ITR		
ITR 構築物	配列	配列番号
ITR-18 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGCACGCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	15
ITR-19 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGCACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	16
ITR-20 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	17
ITR-21 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG	18
ITR-22 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACAAAGTCGCCGACGCCCGGGGCTTT GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	19
ITR-23 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGAAAAATCGCCCGACGCCCGGGGCTTTGCC CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	20
ITR-24 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGAAACGCCCGACGCCCGGGGCTTTGCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	21
ITR-25 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCAAAGCCCGACGCCCGGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	22
ITR-26 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGTT TCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	23
ITR-27 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGTTT CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	24
ITR-28 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGTTTCG GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	25
ITR-29 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCTTTGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	26
ITR-30 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCTTTGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	27
ITR-31 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCTTTGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	28
ITR-32 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGTTTCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	29
ITR-49 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	30
ITR-50 右	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	31

10

20

30

40

【0263】

表 5 B: 例示的な修飾型左 ITR。これらの例示的な修飾型左 ITR は、RBE である GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (配列番号 60)、スパーサーである ACTGAGGC (配列番号 69)、スパーサー相補体 GCCTCAGT (配列番号 70)、及び RBE 相補体 (RBE') である GAGCGAGCGAGCGCGC (配列番号 71) を含み得る。

【0264】

50

【表 5 B】

表5B: 例示的な修飾型左ITR		
ITR-33左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAA ACCCGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	32
ITR-34左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGTCGGGCGA CCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	33
ITR-35左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	34
ITR-36左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGT CGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	35
ITR-37左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GTTCT	36
ITR-38左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGTGCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	37
ITR-39左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	38
ITR-40左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	39
ITR-41左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	40
ITR-42左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAA ACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	41
ITR-43左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGAAA CCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	42
ITR-44左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGAAAC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	43
ITR-45左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCAAAGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	44
ITR-46左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGC GTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	45
ITR-47左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGCGT CGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	46
ITR-48左	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	47

10

20

30

40

【0265】

一実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのc e DNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ関連ウイルス(AAV)逆位末端反復(ITR)、関心対象の核酸配列(例えば、本明細書に記載されるコドン修飾型核酸を含む発現カセット)、及び第2のAAV ITRを含み、第1のITR(5' ITR)及び第2のITR(3' ITR)は、互いに非対称である、すなわち、それらは互いに異なる三次元空間構成を有する。例示的な実施形態として、第1のITRは、野生型ITRであり得、第2のITRは、変異型又は修飾型ITRであり得るか、又はその逆であり、第1のITRは、変異型又は修飾型ITRであり得、第2のITRは、野生型ITRであり得る。いくつかの実施形態では、

50

第1のITR及び第2のITRは、両方ともmod-ITRであるが、異なる配列を有するか、又は異なる修飾を有し、したがって同じ修飾型ITRではなく、異なる三次元空間構成を有する。言い換えると、非対称ITRを有するceDNAベクターは、WT-ITRに対する1つのITRにおける任意の変化が他のITRに反映されないITRを含むか、あるいは、非対称ITRが修飾された非対称ITR対を有する場合、互いに対して異なる配列及び異なる三次元形状を有し得る。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクター中の、ceDNAプラスミドを生成するために使用するための例示的な非対称ITRは、表5A及び5Bに示されている。

【0266】

代替実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、2つの対称的なmod-ITRを含む。すなわち、両方のITRは、同じ配列を有するが、互いの逆相補体（逆位）である。いくつかの実施形態では、対称mod-ITR対は、同じAAV血清型からの野生型ITR配列と比較して、欠失、挿入、又は置換の少なくとも1つ又は任意の組み合わせを含む。対称ITRの付加、欠失、又は置換は同じであるが、互いの逆相補体である。例えば、5'ITRのC領域への3ヌクレオチドの挿入は、3'ITRのC'領域の対応するセクションへの3つの逆相補ヌクレオチドの挿入に反映される。単に説明の目的でのみ、付加が5'ITRのAACGである場合、付加は、対応する部位における3'ITRのCGTTである。例えば、5'ITRセンス鎖がATCGATCG（配列番号608）であり、GとAとの間にAACGの付加を有する場合、配列ATCGAACGATCG（配列番号51）がもたらされる。対応する3'ITRセンス鎖は、CGATCGAT（配列番号606）（ATCGATCG（配列番号607）の逆相補体）であり、TとCとの間にCGTT（すなわち、AACGの逆相補体）の付加を伴い、配列CGATCGTTTCGAT（配列番号49）（ATCGAACGATCGの逆相補体）（配列番号51）をもたらす。

【0267】

代替実施形態では、修飾型ITR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型ITR対は、異なる配列を有し得るが、対応する又は同じ対称の三次元形状を有し得る。例えば、1つの修飾型ITRは、1つの血清型に由来し得、他の修飾型ITRは、異なる血清型に由来し得るが、それらは同じ領域において同じ変異（例えば、ヌクレオチド挿入、欠失、又は置換）を有する。言い換えると、単なる説明の目的で、5'mod-ITRは、AAV2に由来し得、C領域に欠失を有し、3'mod-ITRは、AAV5に由来し得、C'領域に対応する欠失を有する。5'mod-ITR及び3'mod-ITRが同じ又は対称な三次元空間構成を有することを条件として、それらは本明細書における修飾型ITR対としての使用に包含される。

【0268】

いくつかの実施形態では、実質的に対称のmod-ITR対は、三次元空間で同じA-C-C'及びB-B'ループを有する。例えば、実質的に対称のmod-ITR対の修飾型ITRがC-C'アームの欠失を有する場合、同族のmod-ITRは、C-C'ループの対応する欠失を有し、またその同族のmod-ITRの幾何学的空間に同じ形状の残りのA及びB-B'ループの同様の三次元構造を有する。単なる例として、実質的に対称のITRは、それらの構造が幾何学的空間において同じ形状であるように、対称空間構成を有し得る。これは、例えば、G-C対が、例えばC-G対に、若しくはその逆に修飾されたとき、又はA-T対がT-A対に、若しくはその逆に修飾されたときに起こり得る。したがって、上記の例示的な例であるATCGAACGATCG（配列番号51）としての修飾型5'ITR、及びCGATCGTTTCGAT（配列番号49）としての修飾型3'ITR（すなわち、ATCGAACGATCG（配列番号51）の逆相補体）を使用して、これらの修飾型ITRは、例えば、5'ITRがATCGAACCATCG（配列番号50）の配列を有する場合、依然として対称であろう（ここで、付加におけるGが、Cに修飾され、実質的に対称な3'ITRが、CGATCGTTTCGAT（配列番号49）の配列を有し、aに加えてTの対応する修飾がない）。いくつかの実施形態では、そのような修

飾型 I T R 対は、修飾型 I T R 対が対称な立体化学を有するので、実質的に対称である。

【 0 2 6 9 】

表 6 は、P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターで使用するための、例示的な対称修飾型 I T R 対（すなわち、左修飾型 I T R 及び対称右修飾型 I T R）を示す。配列の太字部分は、部分的な I T R 配列（すなわち、A - A'、C - C'、及び B - B' ループの配列）を識別する。これらの例示的な修飾型 I T R は、R B E である G C G C G C T C G C T C G C T C - 3'（配列番号 6 0）、スパーサーである A C T G A G G C（配列番号 6 9）、スパーサー補体 G C C T C A G T（配列番号 7 0）、及び R B E'（すなわち、R B E の相補体）である G A G C G A G C G A G C G C G C（配列番号 7 1）を含み得る。

10

【 0 2 7 0 】

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表6. PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターにおける例示的な対称修飾型ITR対			
左修飾型ITR (修飾型5' ITR)		対称右修飾型ITR (修飾型3' ITR)	
配列番号32 (ITR-33左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGAACCCGGGCGTGCGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAAC CCATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号15 (ITR-18、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCGCACGC CCGGGTTTCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG
配列番号33 (ITR-34 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号48 (ITR-51、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG
配列番号34 (ITR-35 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号16 (ITR-19、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGACGC CCGGGCTTTGCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG
配列番号35 (ITR-36 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGG TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACCTCCATCACTAGG GGTTTCCT	配列番号17 (ITR-20、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCCCGGGCGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCG CAGCTGCCTGCAGG
配列番号36 (ITR-37 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCAAAG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号18 (ITR-21、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCTTTGCC TCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAG G
配列番号37 (ITR-38 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGACTTTGTGCCCCGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAAC CATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号19 (ITR-22 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGGCG ACAAAGTCGCCCCGACG CCCGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGCTG CCTGCAGG

10

20

30

40

【0271】

【表 6 - 2】

(表 6 の続き)

左修飾型 ITR (修飾型 5' ITR)		対称右修飾型 ITR (修飾型 3' ITR)	
配列番号 38 (ITR-39 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGATTTTCGCCCCGCCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCA TCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 20 (ITR-23、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG AAAATCGCCCCGACGCC CGGGCTTTGCCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGCTGCC TGCAGG
配列番号 39 (ITR-40 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGTTTCGCCCCGCCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACCTCCATC ACTAGGGGTTTCCT	配列番号 21 (ITR-24、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG AAACGCCCCGACGCCCG GGCTTTGCCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGC AGG
配列番号 40 (ITR-41 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCTTTGCCCCGCCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTTCCT	配列番号 22 (ITR-25 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCA AAGCCCCGACGCCCGG CTTTGCCCCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAG G
配列番号 41 (ITR-42 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGAAACCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTC CATCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 23 (ITR-26 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCCCGGTTTCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGCTG CCTGCAGG
配列番号 42 (ITR-43 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGAAACCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGCCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCA TCACTAGGGGTTTCCT	配列番号 24 (ITR-27 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCCCGGTTTCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGCTGCC TGCAGG
配列番号 43 (ITR-44 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGAAACGGGCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCCGCCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGA GAGGGAGTGGCCAACCTCCATC ACTAGGGGTTTCCT	配列番号 25 (ITR-28 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCCCGTTTCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGC AGG

10

20

30

40

【 0 2 7 2 】

50

【表 6 - 3】

(表 6 の続き)

左修飾型 ITR (修飾型 5' ITR)		対称右修飾型 ITR (修飾型 3' ITR)	
配列番号 44 (ITR-45 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC CAAAGGGCGTCGGGCGACCT TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACTCCATCAC TAGGGGTTTCCT	配列番号 26 (ITR-29、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCCTTTGGGCGGCC TCACTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAG G
配列番号 45 (ITR-46 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCC AAAGGCGTCGGGCGACCTTT GGTCGCCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTTCCT	配列番号 27 (ITR-30、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCCTTTGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGCTGCCTGCAGG
配列番号 46 (ITR-47、 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGCA AAGCGTCGGGCGACCTTTGG TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTTCCT	配列番号 28 (ITR-31、 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGCTTTGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCG CAGCTGCCTGCAGG
配列番号 47 (ITR-48、 左)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGAA ACGTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	配列番号 29 (ITR-32 右)	AGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGA CGTTTCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG

10

20

30

【0273】

いくつかの実施形態では、非対称 ITR 対を含む PAH タンパク質の発現のための c e DNA ベクターは、本明細書の表 5 A ~ 5 B のいずれか 1 つ以上に示される ITR 配列若しくは ITR 部分配列、あるいは 2018 年 12 月 6 日に出願された国際出願第 US 2018 / 064242 号 (その全体が本明細書に組み込まれる) の図 7 A ~ 7 B に示されているか、又は 2018 年 9 月 7 日に出願された国際出願第 US 18 / 49996 号 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) の表 2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは 10 A ~ 10 B に開示されている配列における修飾のうちのいずれかに対応する修飾を有する ITR を含み得る。

40

【0274】

V. 例示的な c e DNA ベクター

上記のように、本開示は、組換え c e DNA 発現ベクター、及び上記の非対称の ITR 対、対称の ITR 対、又は実質的に対称の ITR 対のうちのいずれか 1 つを含む PAH タンパク質をコードするコドン修飾型核酸を含む c e DNA ベクターに関する。ある特定の実施形態では、本開示は、隣接する ITR 配列及び導入遺伝子を有する PAH タンパク質の発現のための組換え c e DNA ベクターに関し、ITR 配列は、本明細書で定義されるように、互いに対して非対称、対称、又は実質的に対称であり、c e DNA は、隣接する ITR の間に位置する関心対象の核酸配列 (例えば、導入遺伝子の核酸を含む発現カセッ

50

ト) を更に含み、当該核酸分子は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている。

【0275】

PAHタンパク質の発現のためのceDNA発現ベクターは、少なくとも1つのITRが変更されている場合、本明細書に記載される核酸配列を含む組換えDNA手順に都合よく供することができる任意のceDNAベクターであってもよい。本開示のPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、ceDNAベクターが導入される宿主細胞と適合性がある。ある特定の実施形態では、ceDNAベクターは、直鎖状であってもよい。ある特定の実施形態では、ceDNAベクターは、染色体外実体として存在し得る。ある特定の実施形態では、本開示のceDNAベクターは、宿主細胞のゲノムへのドナー配列の組み込みを可能にするエレメントを含有し得る。本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」及び「異種核酸配列」は同義であり、本明細書に記載されるように、PAHタンパク質をコードし得る。

10

【0276】

A. 調節エレメント。

本明細書で定義される非対称のITR対又は対称のITR対を含む、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、シス調節エレメントの特定の組み合わせを更に含み得る。

【0277】

フェニルアラニンレベル（例えば、発現及び持続時間）の最適な修正について試験された、コドン最適化され、特定のシス作用性エレメント（例えば、例えば、特異的プロモーター、特異的エンハンサー、及び特異的プロモーターとエンハンサーとの組み合わせ）と組み合わせられたPAH核酸配列を含むceDNAベクターが本明細書に記載される。いくつかの実施形態によれば、特定のコドン最適化PAH核酸配列は、特定のプロモーター配列及び／又は特定のエンハンサー配列と組み合わせられた場合、例えば、別のプロモーター配列及び／又は特定のエンハンサー配列と組み合わせられた同じコドン最適化PAH核酸配列と比較して、より良好に機能する。

20

【0278】

ある特定の実施形態では、エンハンサー配列がプロモーターの上流に提供されて、プロモーターの効力を増大させる。

30

【0279】

ある特定の実施形態では、イントロン配列は、コドン最適化核酸配列の上流に提供される。

【0280】

(i) プロモーター：

当業者は、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターで使用されるプロモーターが、それらが促進する特定の配列及び組織又は細胞のタイプに対して適切に調整されるべきであることを理解するであろう。

【0281】

PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの発現力セットは、全体発現レベルとともに細胞特異性に影響を及ぼし得るプロモーターを含み得る。導入遺伝子発現、例えば、PAHタンパク質の発現の場合、それらは、非常に活発なウイルス由来の最初期プロモーターを含み得る。発現力セットは、導入遺伝子発現を特定の細胞型に制限し、無秩序な異所性発現から生じる毒性効果及び免疫反応を低減するために組織特異的真核生物プロモーターを含有し得る。表7A及び7Bは、ceDNA PAH治療薬において実装され得るコアプロモーター配列を列挙する。

40

【0282】

50

【表 7 A】

表 7 A. コアプロモーター

	名称	配列
GE-015	hAAT_core (配列番号 441)	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG AGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGA CTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTT CTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGC TGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCG ACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCG ATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCC GTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGG
GE-1121	TTRm (配列番号 442)	GTCTGTCTGCACATTTCTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAAT CTCCCTAGGCAAGGTTCAATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTT TTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAG CTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAA AAGCCCCCTCACCAGGAGAAGCCGTC
GE-1133	hAAT_core_C06 (配列番号 443)	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG AGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGA CTCATGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACACTGTGGTTTC TGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTGGTAAGTGCAGTGGAAGCT GTACACTGCCCAGGCAAAGTGTCGGGGCAGCGTAGGCGGGCGA CTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGA TAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCG TTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGG
GE-1134	hAAT_core_C07 (配列番号 444)	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG AGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGA CTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTT CTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGC TGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCG ACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCTG ATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCT GTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACAAGGACAGG
GE-1135	hAAT_core_C08 (配列番号 445)	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG AGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGA CTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTT CTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGC TGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCATAGGCAGGCG ACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCG ATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCC GTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGG
GE-1136	hAAT_core_C09 (配列番号 446)	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG AGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGA CTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTT CTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGC TGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCG ACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCTG ATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCC GTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACAGACGAGGACAGG
GE-1137	hAAT_core_C10 (配列番号 447)	GATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG AGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGA CTCATGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACACTGTGGTTTC TGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTGGTAAGTGCAGTGGAAGCT GTACACTGCCCAGGCAAAGTGCTGGGCAGCATAGGCAGGTGA CTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCTGA TAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCTG TTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACAGACGAGGACAGG
GE-1170	hAAT_core_切断型 (配列番号 448)	GATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCC CAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACA GGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCCGGTA AGTGCAAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGC AGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCC CTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCAC CAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATAC GGACGAGGACAGG

10

20

30

40

【0283】

【表 7 B】

表 7 B. コアプロモーターの説明

配列番号／GE#	名称	説明
GE-015	hAAT__core	ヒトA1AT遺伝子からのコアプロモーター配列
GE-1121	TTRm	マウストランスサイレチン遺伝子からのコアプロモーター配列
GE-1133	hAAT__core__C06	CpG最小化バージョンのhAATコアプロモーター (A1AT遺伝子プロモーター)
GE-1134	hAAT__core__C07	CpG最小化バージョンのhAATコアプロモーター (A1AT遺伝子プロモーター)
GE-1135	hAAT__core__C08	CpG最小化バージョンのhAATコアプロモーター (A1AT遺伝子プロモーター)
GE-1136	hAAT__core__C09	CpG最小化バージョンのhAATコアプロモーター (A1AT遺伝子プロモーター)
GE-1137	hAAT__core__C10	CpG最小化バージョンのhAATコアプロモーター (A1AT遺伝子プロモーター)
GE-1170	hAAT__core__切断型	GE-015に由来する5p切断型hAATコアプロモーター

10

【0284】

特定の実施形態によれば、プロモーターは、VD（「V and」とも称される）プロモーター、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン（hAAT）プロモーター（CpG最小化hAAT（979）プロモーター（CpGmin hAAT__core__C10）、並びにhAAT__core__C06、hAAT__core__C07、hAAT__core__C08、及びhAAT__core__C09のような他のCpGmin hAATプロモーターを含む）、並びにトランスサイレチン（TTR）肝臓特異的プロモーターからなる群から選択される。

20

【0285】

いくつかの実施形態では、VDプロモーターは、微小ウイルスマウス（MVM）イントロン、最小トランスサイレチンプロモーター（TTRm）、セルピンエンハンサー（72bp）、及びTTRm 5' UTRを含む。

【0286】

いくつかの実施形態によれば、TTRmは、以下に示される配列番号442を含む：

G T C T G T C T G C A C A T T T C G T A G A G C G A G T G T T C C G A T A C T
C T A A T C T C C C T A G G C A A G G T T C A T A T T T G T G T A G G T T A C T
T A T T C T C C T T T T G T T G A C T A A G T C A A T A A T C A G A A T C A G C
A G G T T T G G A G T C A G C T T G G C A G G G A T C A G C A G C C T G G G T T
G G A A G G A G G G G G T A T A A A A G C C C C T T C A C C A G G A G A A G C C
G T C（配列番号442）。

30

【0287】

いくつかの実施形態によれば、セルピンエンハンサーは、以下に示される配列番号449を含む：

G G G G G A G G C T G C T G G T G A A T A T T A A C C A A G G T C A C C C C A
G T T A T C G G A G G A G C A A A C A G G G G C T A A G T C C A C（配列番号449）。

40

【0288】

いくつかの実施形態によれば、TTRm 5' UTRは、以下に示される配列番号498を含む：

A C A C A G A T C C A C A A G C T C C T G（配列番号498）。

【0289】

更なる実施形態によれば、VDプロモーターは、以下に示される配列番号191を含む：

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

50

CTTATTCTCCTTTTGTGTGACTAAGTCAATAATCAGAAATCA
GCAGGTTTGGAGTCAAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGG
TTGGAAGGAGGGGTATAAAGCCCCCTTCAACAGGAGAAAG
CCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTG (配列番号191)。

【0290】

いくつかの実施形態によれば、hAAT (979) プロモーターは、配列番号447を含む。hAAT (979) を含むプロモーターセットは、配列番号479に例示される。

【0291】

いくつかの実施形態によれば、CpGmin__hAATプロモーターは、配列番号443~447から選択される配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CpGmin__hAATプロモーターセットは、配列番号475である。いくつかの実施形態によれば、CpGmin__hAATプロモーターセットは、配列番号479である。いくつかの実施形態によれば、トランスサイレチン (TTR) 肝臓特異的プロモーターは、表7A (配列番号442) に示される配列を含む。

10

【0292】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号191と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0293】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号443と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号444と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号445と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号446と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号447と少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含む。

20

【0294】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号443と少なくとも96%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号444と少なくとも96%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号445と少なくとも96%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号446と少なくとも96%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号447と少なくとも96%の同一性を有する核酸配列を含む。

30

【0295】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号443と少なくとも97%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号444と少なくとも97%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号445と少なくとも97%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号446と少なくとも97%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号447と少なくとも97%の同一性を有する核酸配列を含む。

40

【0296】

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号443と少なくとも98%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号444と少なくとも98%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号445と少なくとも98%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号446と少なくとも98%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号447と少なくとも98%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0297】

50

いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 4 3 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 4 4 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 4 5 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 4 6 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 4 7 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。

【0 2 9 8】

いくつかの実施形態では、プロモーターセットは、本明細書に記載されるプロモーター配列及びエンハンサー配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターセットは、配列番号 4 7 5 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 5 と少なくとも 9 6 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 5 と少なくとも 9 7 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 5 と少なくとも 9 8 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 5 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。

10

【0 2 9 9】

いくつかの実施形態では、プロモーターセットは、本明細書に記載されるプロモーター配列及びエンハンサー配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 9 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 9 と少なくとも 9 6 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 9 と少なくとも 9 7 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 9 と少なくとも 9 8 % の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、プロモーターは、配列番号 4 7 9 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含む。

20

【0 3 0 0】

(i i) エンハンサー

いくつかの実施形態では、コドン最適化 P A H を発現する c e D N A は、1 つ以上のエンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列は、プロモーター配列の 5 ' に位置する。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列は、プロモーター配列の 3 ' に位置する。いくつかの実施形態によれば、いくつかの態様によれば、エンハンサーは、セルピンエンハンサー、3 × H N F 1 - 4 _ P r o E n h _ 1 0 m e r、5 × H N F 1 _ P r o E n h _ 1 0 m e r からなる群から選択される。

30

【0 3 0 1】

40

50

【表 8 A】

表 8 A. エンハンサー

配列番号 GE-##	名称
配列番号449 GE-1115	ヒトセルピンエンハンサー(hSerpEnh)
配列番号450 GE-1116	TTR _e
配列番号451 GE-1117	HNF1
配列番号452 GE-1118	HNF4
配列番号453 GE-1119	ApoE__Enh
配列番号454 GE-1120	ProEnh
配列番号455 GE-1129	ApoE__Enh__C03
配列番号456 GE-1130	ApoE__Enh__C04
配列番号457 GE-1131	ApoE__Enh__C09
配列番号458 GE-1132	ApoE__Enh__C10
配列番号459 GE-1127	埋め込まれた__HCR1__フットプリント123
配列番号460 GE-1128	埋め込まれた__エンハンサー__HNF__アレイ
配列番号461 GE-1237	ApoE__Enh__v2
配列番号586	HS-CRM__FOXA__HNF4__コンセンサス__v1
配列番号587	3x__HNF4__FOXA__v1
配列番号588	1x__ブッシュベイビー__SerpEnh
配列番号589	3x__ブッシュベイビー__Aspacers
配列番号590	1x__チャイニーズツパイ__SerpEnh
配列番号591	3x__チャイニーズツパイ (反復間に「C」スペーサー)
配列番号592	3x__チャイニーズツパイ__CpGmin
配列番号593	3x__hSerpEnh__Aspacers (「A」スペーサー)
配列番号594	5x__ブッシュベイビー__Aspacers
配列番号595	5x__チャイニーズツパイ
配列番号596	3x__hSerpEnh__11mer__spacers__v3
配列番号597	3x__hSerpEnh__30mer__spacers__v3
配列番号598	3x__hSerpEnh__30mer__spacers__HNF4re vmer__spacers__FOXArev
配列番号599	3x__hSerpEnh__2mer__spacers__v10
配列番号600	3x__hSerpEnh__2mer__spacers__v12
配列番号601	3x__hSerpEnh__2mer__spacers__v9

10

20

30

40

【0302】

50

【表 8 B】

表 8 B. エンハンサーエレメントの説明

GE-##	名称	説明
GE-1115	SerpEnh	Serpin1 遺伝子のエンハンサー領域。 Chuah, M., et al. (2014). Liver-Specific Transcriptional Modules Identified by Genome-Wide In Silico Analysis Enable Efficient Gene Therapy in Mice and Non-Human Primates Molecular Therapy 22(9), 1605-1613 によって報告されている。dx.doi.org/10.1038/mt.2014.114 で入手可能。本明細書の開示はまた、ブッシュベイビー及びチャイニーズツパイに由来する修飾型 SerpEnh 配列も含む。
GE-1116	TTRe	トランスサイレチン遺伝子のエンハンサー領域
GE-1117	HNF1	肝臓核因子1結合部位
GE-1118	HNF4	肝臓核因子4結合部位
GE-1119	ApoE_Enh	ヒトアポリポタンパク質E/C-I 肝臓特異的エンハンサー
GE-1120	ProEnh	プロアルブミン遺伝子からのエンハンサー領域
GE-1129	ApoE_Enh_C03	CpG最小化バージョンのApoE_Enh (ヒトアポリポタンパク質E/C-I 肝臓特異的エンハンサー)
GE-1130	ApoE_Enh_C04	CpG最小化バージョンのApoE_Enh (ヒトアポリポタンパク質E/C-I 肝臓特異的エンハンサー)
GE-1131	ApoE_Enh_C09	CpG最小化バージョンのApoE_Enh (ヒトアポリポタンパク質E/C-I 肝臓特異的エンハンサー)
GE-1132	ApoE_Enh_C10	CpG最小化バージョンのApoE_Enh (ヒトアポリポタンパク質E/C-I 肝臓特異的エンハンサー)
GE-1127	Embedded_HCR1_footprint123	GE-856に埋め込まれたHCR1フットプリント123 (別名GE-859/GE-860間)
GE-1128	Embedded_エンハンサー_HNF_アレイ	GE-856に埋め込まれた肝臓核因子エンハンサーアレイ (別名GE-859/GE-860間)
GE-1237	ApoE_Enh_v2	ヒトアポリポタンパク質E/C-I 肝臓特異的エンハンサー
GE-1402	HS-CRM_FOXA_HNF4_コンセンサス_v1	ヒトSERPINA1エンハンサーバリエント:FOXA_HNF4_コンセンサス_v1
GE-1502	3x_HNF4_FOXA_v1	シトシンによって分離された3×反復のHS-CRM8_FOXA_HNF4_コンセンサス_v1
1x_ブッシュベイビー_SerpEnh		1×反復のブッシュベイビー SERPINA1エンハンサー
3x_ブッシュベイビー_Aspacers		アデニンヌクレオチドスペーサー(「A」スペーサー)を有する3×反復のブッシュベイビー SERPINA1エンハンサー
1x_チャイニーズツパイ_SerpEnh		1×反復のチャイニーズツパイ SERPINA1エンハンサー
3x_チャイニーズツパイ (反復間に「C」スペーサー)		3×反復のチャイニーズツパイ SERPINA1エンハンサー (反復間に「C」スペーサー)
3x_チャイニーズツパイ_CpGmin		CpG最小化を伴う3×反復のチャイニーズツパイ SERPINA1エンハンサー
3x_hSerpEnh_Aspacers (「A」スペーサー)		反復間に1つのアデニン(「A」スペーサー)を有する3×反復のヒトSERPINA1エンハンサー
5x_ブッシュベイビー_Aspacers		アデニンヌクレオチドスペーサー(「A」スペーサー)を有する5×反復のブッシュベイビー SERPINA1エンハンサー
5x_チャイニーズツパイ		5×反復のチャイニーズツパイ SERPINA1エンハンサー
3x_hSerpEnh_11mer_spacers_v3		11merスペーサーv3を有する3×反復のhSerpEnh
3x_hSerpEnh_30mer_spacers_v3		30merスペーサーv3を有する3×反復のhSerpEnh
3x_hSerpEnh_30mer_spacers_HNF4revmer_spacers_FOXArev		方向2のHNF4結合部位及び方向1のFOXA結合部位を有し、30merスペーサーを有する3×反復のhSerpEnh
3x_hSerpEnh_2mer_spacers_v10		2merスペーサーバージョン10を有する3×反復のhSerpEnh
3x_hSerpEnh_2mer_spacers_v12		2merスペーサーバージョン12を有する3×反復のhSerpEnh
3x_hSerpEnh_2mer_spacers_v9		2merスペーサーバージョン9を有する3×反復のhSerpEnh

10

20

30

40

【0303】

いくつかの実施形態によれば、TTRプロモーターに融合された3×HNF1-4_ProEnhエンハンサー(プロアルブミンエンハンサー)は、配列番号462に示される配列を含む。

【0304】

いくつかの実施形態によれば、3×Vand-TTRe及びTTRプロモーターに融合された3×HNF1-4_ProEnhエンハンサー(プロアルブミンエンハンサー)は、配列番号463に示される配列を含む。

【0305】

50

いくつかの実施形態によれば、TTRプロモーターに融合された5×HNF1__ProEnh__エンハンサーは、配列番号464に示される配列を含む。いくつかの実施形態によれば、3×Vand-TTRe及びTTRプロモーターに融合された5×HNF1__ProEnh__エンハンサーは、配列番号465に示される配列を含む。

【0306】

いくつかの実施形態によれば、セルピンエンハンサー (SerpEnh) は、以下として示される配列を含む：

GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAAACCAAGGTCACCCCA
GTTATCGGAGGAGCAAAACAGGGGGCTAAGTCCAC (配列番号449)。

【0307】

いくつかの他の実施形態では、エンハンサーを多数のタンデム配列又は反復配列で使用する事ができる。非限定的な例としては、配列番号587～601に記載のエンハンサー配列が挙げられる。

【0308】

【表9A】

表9A. プロモーターセット (コアプロモーター及びエンハンサーの組み合わせ)

GE	名称 (配列番号)
GE-1223	ceDNA1471のプロモーターセット (配列番号462)
GE-1224	ceDNA1472のプロモーターセット (配列番号463)
GE-1225	ceDNA1473のプロモーターセット (配列番号464)
GE-1226	ceDNA1474のプロモーターセット (配列番号465)
GE-1227	ceDNA1475のプロモーターセット (配列番号466)
GE-1228	ceDNA1476のプロモーターセット (配列番号467)
GE-1229	ceDNA1477のプロモーターセット (配列番号468)
GE-1230	ceDNA1478のプロモーターセット (配列番号469)
GE-1231	ceDNA1479のプロモーターセット (配列番号470)
GE-1232	ceDNA1480のプロモーターセット (配列番号471)
GE-1233	ceDNA1368のプロモーターセット (配列番号472)
GE-1234	ceDNA1648のプロモーターセット (配列番号473)
GE-1235	ceDNA1657のプロモーターセット (配列番号474)
GE-1236	ceDNA1622のプロモーターセット (配列番号475)
GE-1270	ceDNA1664のプロモーターセット (配列番号478)
GE-1271	ceDNA979のプロモーターセット (配列番号479)
GE-576	hPAH-endoプロモーター__v2 (配列番号480)
GE-586	hPAH-endoプロモーター__v2__Δコザック (配列番号481)

【0309】

【表 9 B】

表 9 B. プロモーターセット (コアプロモーター及びエンハンサーの組み合わせ) 注釈

GE-##	名称	説明
GE-1223	ceDNA1471のプロモーターセット (3×HNF1-4 プロアルブミン Enh TTRプロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1224	ceDNA1472のプロモーターセット (3×HNF1-4 プロアルブミン Enh 3×VanD-TTRe TTR プロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1225	ceDNA1473のプロモーターセット (5×HNF1 プロアルブミンEnh TTRプロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1226	ceDNA1474のプロモーターセット (5×HNF1 プロアルブミンEnh 3×VanD-TTRe TTR プロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1227	ceDNA1475のプロモーターセット (3×HNF1-4__プロアルブミンEnh hAATプロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1228	ceDNA1476のプロモーターセット (3×HNF1-4__プロアルブミンEnh hAATプロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1229	ceDNA1477のプロモーターセット (3×HNF1-4__Pro-hAAT- 10mer-ApoE)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1230	プロモーターセット-1478 (5×HNF1-Pro-hAAT)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1231	プロモーターセット-1479 (5×HNF1-プロアルブミンEnh hAATプロモーター)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1232	プロモーターセット-1480 (5×HNF1-Pro-hAAT-10mer- ApoE)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1233	プロモーターセット-1368 (VDプロモーターセット)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1234	プロモーターセット-1648 (3×セルピンエンハンサー+TTRe; 3×VDプロモーターセット)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1235	プロモーターセット-1657	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1236	プロモーターセット-1622(CpG 最小化hAATプロモーターセット)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1270	プロモーターセット-1664	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-1271	プロモーターセット-979 (hAAT979プロモーターセット)	エンハンサー及びコアプロモーターを含む(5pUTRを 含まない)合成肝臓特異的プロモーターセット
GE-576	hPAH-endoプロモーター__v2	ヒトPAH内因性プロモーター
GE-586	hPAH-endoプロモーター__v2__ △コザック	ヒトPAH内因性プロモーター
	3×__ブッシュベイビー SerpEnh- TTRe-TTRプロモーターセット (配列番号602)	
	3×__チャイニーズツパイ SerpEnh-TTRe-TTR プロモーターセット (配列番号603)	

【0310】

10

20

30

40

50

【表 9 C】

表 9 C. プロモーターセット：h A A T C p G 最小化エンハンサーとコアプロモーター C p G 最小化 h A A T c o r e _ C 1 0 (h A A T _ 9 7 9) 又は h A A T c o r e _ C 0 6) との組み合わせ。

名 称	配列番号 CpG最小化hAATプロモーターセット配列
プロモーターセット-970	604
プロモーターセット-971	1001
プロモーターセット-972	1002
プロモーターセット-973	1003
プロモーターセット-974	1004
プロモーターセット-975	1005
プロモーターセット-976	1006
プロモーターセット-977	1007
プロモーターセット-978	1008

10

【 0 3 1 1 】

(i i i) 例示的な 5 ' U T R 配列及びイントロン配列

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターは、5 ' U T R 配列及び／又は 5 ' I T R 配列の 3 ' に位置するイントロン配列を含む。いくつかの実施形態では、5 ' U T R は、導入遺伝子、例えば、P A H タンパク質をコードする配列の 5 ' に位置する。例示的な 5 ' U T R 配列は、以下の表 1 0 又は国際特許出願第 U S 2 0 2 0 / 0 2 1 3 2 8 号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、例えば、表 9 A に列挙されている。

【 0 3 1 2 】

30

40

50

【表 10】

表 10. 5' UTR

GE #	説明	配列番号
GE-1124	TTR-MVM-PmeI-コンセンサス-5pUTR	482
GE-1125	TTR-MVM_v2-PmeI-コンセンサス-5pUTR	483
GE-1126	TTR-MVM-PmeI*-コンセンサス-5pUTR	484
GE-1138	hAAT-5pUTR_v2	485
GE-1167	TTR-MVMspliced-PmeI-コンセンサス-5pUTR	486
GE-772	5pUTR-325243	487
GE-774	5pUTR-定常	489
GE-1208	hAAT-SV40-PmeI-Mod-5pUTR	490
GE-1209	hAAT-SV40-PmeI-Mod2-5pUTR	491
GE-1210	hAAT-SV40-PmeI-Con-5pUTR	492
GE-1211	hAAT-SV40-PmeI-325243-5pUTR	493
GE-1212	hAAT-SV40-PmeI-536-5pUTR	494
GE-1219	TTR-XbaI-MVM-PmeI-コンセンサス-5pUTR	495
GE-1220	TTR-XbaI-MVM_v2-PmeI-コンセンサス-5pUTR	496
GE-1221	TTR-XbaI-MVM-PmeI*-コンセンサス-5pUTR	497
GE-1122	TTR-5pUTR	498
GE-1260	hAAT-PmeI-Mod2-5pUTR	400
GE-1261	TTR-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR	500
GE-1262	TTR-MVM-PmeI-325243-5pUTRコピー	502
GE-1263	TTR-MVM-PmeI*-Mod2-5pUTR	502
GE-1264	TTR-MVM-PmeI-Mod2-5pUTR	503
GE-1265	TTR-MVMspliced-PmeI-Mod2-5pUTR	504
GE-1266	TTR-XbaI-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR	505
GE-1267	TTR-XbaI-MVM-PmeI*-Mod2-5pUTR	506
GE-1268	TTR-XbaI-MVM-PmeI-Mod2-5pUTR	507
GE-1269	hAAT-PmeI-Con-5pUTR	508

【0313】

10

20

30

40

50

【表 10B-1】

表 10B. 5' UTR の説明

GE-##	名称	説明
GE-1124	TTR-MVM-PmeI- コンセンサス-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン、3) PmeI制限部位、及び4)コンセンサスコザック配列
GE-1125	TTR-MVM__v2- PmeI-コンセンサス- 5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン__v2、3) PmeI制限部位、及び4)コンセンサスコザック配列
GE-1126	TTR-MVM-PmeI*- コンセンサス-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン、3) 変異型PmeI制限部位、及び4)コンセンサスコザック配列
GE-1138	hAAT-5pUTR__v2	SERPINA1 (A1AT) 遺伝子に由来する5pUTR領域
GE-1167	TTR-MVMspliced- PmeI-コンセンサス- 5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロンのスプライシングされた形態、3) PmeI制限部位、及び4)コンセンサスコザック配列
GE-772	5pUTR-325243	5pUTR可変領域#325243
GE-774	5pUTR-定常	5pUTR定常領域
GE-1208	hAAT-SV40-PmeI- Mod-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、2)SV40イントロン、3) PmeI制限部位、及び4)修飾型コザック配列
GE-1209	hAAT-SV40-PmeI- Mod2-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、2)SV40イントロン、3) PmeI制限部位、及び4)修飾型コザック配列v2
GE-1210	hAAT-SV40-PmeI- Con-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、2)SV40イントロン、3) PmeI制限部位、及び4)コンセンサスコザック配列
GE-1211	hAAT-SV40-PmeI- 325243-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、2)SV40イントロン、3) PmeI制限部位、及び4)325243-5pUTR
GE-1212	hAAT-SV40-PmeI- 536-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、2)SV40イントロン、3) PmeI制限部位、及び4)536-コザック
GE-1219	TTR-XbaI-MVM- PmeI-コンセンサス- 5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)XbaI制限部位、3)微小ウイルスのマウスイントロン、4) PmeI制限部位、及び5)コンセンサスコザック配列
GE-1220	TTR-XbaI- MVM__v2-PmeI- コンセンサス- 5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)XbaI制限部位、3)微小ウイルスのマウスイントロン__v2、4) PmeI制限部位、及び5)コンセンサスコザック配列

【0314】

10

20

30

40

50

【表 10B-2】

(表 10B の続き)

GE-##	名称	説明
GE-1221	TTR-XbaI-MVM-PmeI*-コンセンサス-5pUTR	以下の連結から形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)XbaI制限部位、3)微小ウイルスのマウスイントロン、4)変異型PmeI制限部位、及び5)コンセンサスコザック配列
GE-1122	TTR-5pUTR	マウストランスサイレチン遺伝子からの5pUTR
GE-1260	hAAT-PmeI-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、3)PmeI制限部位、及び4)修飾型コザック配列v2
GE-1261	TTR-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン_v2、3)PmeI制限部位、及び4)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1262	TTR-MVM-PmeI-325243-5pUTRコピー	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン、3)PmeI制限部位、及び4)325243-5pUTR
GE-1263	TTR-MVM-PmeI*-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン、3)変異型PmeI制限部位、及び4)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1264	TTR-MVM-PmeI-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロン、3)PmeI制限部位、及び4)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1265	TTR-MVMspliced-PmeI-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)微小ウイルスのマウスイントロンのスプライシングされた形態、3)PmeI制限部位、及び4)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1266	TTR-XbaI-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)XbaI制限部位、3)微小ウイルスのマウスイントロン_v2、4)PmeI制限部位、及び5)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1267	TTR-XbaI-MVM-PmeI*-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)XbaI制限部位、3)微小ウイルスのマウスイントロン、4)変異型PmeI制限部位、及び5)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1268	TTR-XbaI-MVM-PmeI-Mod2-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)トランスサイレチンプロモーター5pUTR、2)XbaI制限部位、3)微小ウイルスのマウスイントロン、4)PmeI制限部位、及び5)修飾型__最小__コンセンサス__コザック_v2
GE-1269	hAAT-PmeI-Con-5pUTR	以下の連結によって形成される5pUTR: 1)hAATプロモーター5pUTR、3)PmeI制限部位、及び4)コンセンサスコザック配列

10

20

30

【0315】

いくつかの実施形態では、c e DNAベクターは、O R Fの5'に位置するイントロンを含む。いくつかの他の実施形態では、c e DNAベクターは、O R F配列内にあるイントロンを含む。使用され得る好適なイントロン配列は、以下の表11Aに列挙されている。

40

【0316】

50

【表 1 1 A】

表 1 1 A. キメライントロン配列

GE	名称	配列識別子
GE-1252	hIVS-1Bイントロン	509
GE-1253	hIVS-1B-Wt	510
GE-1254	hPAH__修飾型__イントロン1__CpGfree__v1	511
GE-1255	hPAH-Δ2Kbイントロン	512
GE-1256	mIVS-1Bイントロン	513
GE-1257	mIVS-1B-CpG不含__v1	514
GE-1258	修飾型__イントロン	515
GE-1259	oIVS-v2	516
GE-1260	MVM__イントロン__v2	1000

10

【0 3 1 7】

【表 1 1 B】

表 1 1 B. キメライントロン配列の説明

GE #	名称	説明
GE-1252	hIVS-1Bイントロン	hPAHイントロン1に由来するキメライントロン。CpGモチーフを除去するように操作されている
GE-1253	hIVS-1B-Wt	hPAHイントロン1に由来するキメライントロン。CpGモチーフを有するWt配列
GE-1254	hPAH__修飾型__イントロン1__CpGfree__v1	hPAHイントロン1に由来するキメライントロン。hIVS-1B配列に基づいてCpGが除去されている
GE-1255	hPAH-Δ2Kbイントロン	hPAHイントロン1に由来するキメライントロン。
GE-1256	mIVS-1Bイントロン	mPAHイントロン1に由来するキメライントロン
GE-1257	mIVS-1B-CpG不含__v1	CpGモチーフを除去するように操作された、mPAHイントロン1に由来するキメライントロン
GE-1258	修飾型__イントロン	hPAHイントロン1に由来するキメライントロン。
GE-1259	oIVS-v2	オランウータンPAHイントロン1に由来するキメライントロン。CpG不含イントロン
GE-1260	MVM__イントロン__v2	修飾型マウス微小ウイルス(MVM)イントロン

20

【0 3 1 8】

いくつかの実施形態によれば、MVMイントロンはまた、PAHオープンリーディングフレームの5'に（例えば、5'UTRの一部として）実装され得る。MVMイントロンは、以下に示される配列番号1026を含む：

AAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTTGGTTGGTGGGGGTA
TTAATGTTTAAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTT
TTTTTTCAGGTTTG（配列番号1026）

【0 3 1 9】

(iv) 3'UTR配列

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、3'ITR配列の5'に位置する3'UTR配列を含む。いくつかの実施形態では、3'UTRは、導入遺伝子、例えば、PAHタンパク質をコードする配列の3'に位置する。例示的な3'UTR配列は、以下の表12又は国際出願第US2020/021328号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、例えば、表9Bに列挙されている。

40

【0 3 2 0】

50

【表 12】

表 12. 3' UTR エLEMENT

配列番号	名称	説明
配列番号517 (GE-001)	bGH	ウシ成長ホルモン(bGH)をコードする遺伝子に由来するポリAシグナル
配列番号518 (GE-007)	WPRES_3pUTR	ウッドチャック肝炎ウイルスに由来する転写後調節エレメント
配列番号519 (GE-081)	SV40_polyA	SV40ウイルスからのポリA領域
配列番号520 (GE-080)	HBB_3pUTR	ヒトヘモグロビン β (HBB) 遺伝子3pUTRに由来する
配列番号521 (GE-761)	HBBv3_3pUTR	ヒトヘモグロビン β (HBB) 遺伝子3pUTRに由来する
配列番号522 (GE-720)	HBBv2_3pUTR	ヒトヘモグロビン β (HBB) 遺伝子3pUTRに由来する
配列番号523 (GE-758)	HBBv3_CpGmin	ヒトヘモグロビン β (HBB) 遺伝子3pUTRに由来する
配列番号524 (GE-760)	HBBv2_CpGmin	ヒトヘモグロビン β (HBB) 遺伝子3pUTRに由来する
配列番号525 (GE-582)	HBB-3pUTR-CpGmin_v1	ヒトヘモグロビン β (HBB) 遺伝子3pUTRに由来する

10

20

【0321】

PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、転写後調節エレメント(WPRE)及びBGHPAを更に含むことができる。

30

【0322】

(v) ポリアデニル化配列

ポリアデニル化配列をコードする配列は、ceDNAベクターから発現されたmRNAを安定化するため、及び核輸送及び翻訳を助けるために、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクター中に含まれ得る。一実施形態では、ceDNAベクターは、ポリアデニル化配列を含まない。他の実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、又はそれ以上のアデニンジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、約43ヌクレオチド、約40～50ヌクレオチド、約40～55ヌクレオチド、約45～50ヌクレオチド、約35～50ヌクレオチド、又はその間の任意の範囲を含む。

40

【0323】

発現カセットは、当技術分野で既知の任意のポリアデニル化配列又はその変形を含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化(ポリA)配列は、国際特許出願第US2020/021328号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)、例えば、表10に列挙されているもののうちのいずれかから選択される。当該技術分野で一般的に知られている他のポリA配列も使用することができ、例えば、ウシBGHPA(例えば、配列番号68)又はウイルスSV40pA(例えば、配列番号86)から単離された天然に存在する配列、又は合成配列(例えば、配列番号87)を含むが、これらに限定されない。いくつかの発現カセットはまた、SV40後期ポリAシグナル上流エンハンサ

50

ー (USE) 配列を含み得る。いくつかの実施形態では、USE 配列は、SV40pA又は異種ポリAシグナルと組み合わせて使用され得る。ポリA配列は、PAHタンパク質をコードする導入遺伝子の3'に位置する。

【0324】

発現カセットはまた、導入遺伝子の発現を増加させるために、転写後エレメントを含み得る。いくつかの実施形態では、ウッドチャック肝炎ウイルス (WHP) 転写後調節エレメント (WPRE) (例えば、配列番号67) を使用して、導入遺伝子の発現を増加させる。他の転写後処理エレメント、例えば、単純ヘルペスウイルス又はB型肝炎ウイルス (HBV) のチミジンキナーゼ遺伝子からの転写後エレメントを使用することができる。分泌配列は、導入遺伝子、例えば、VH-02及びVK-A26配列、例えば、配列番号88及び配列番号89に連結され得る。

10

【0325】

(vi) 核局在化配列及びDNA核標的化配列

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、1つ以上の核局在化配列 (NLS)、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のNLSを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のNLSは、アミノ末端又はその近く、カルボキシ末端又はその近く、又はこれらの組み合わせ (例えば、アミノ末端における1つ以上のNLS及び／又はカルボキシ末端における1つ以上のNLS) に位置する。複数のNLSが存在する場合、各々を他のNLSから独立して選択することができ、それにより、単一のNLSが複数のコピーに、及び／又は1つ以上のコピーに存在する1つ以上の他のNLSと組み合わせて存在する。表13Aに、NLSの非限定的な例を示す。

20

【0326】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、ceDNAが標的細胞の核に取り込まれるのを促進するための1つ以上のDNA核標的化配列 (DNA nuclear targeting sequence、DTS) を含む。表13Bは、PAHタンパク質を発現するceDNAベクターに実装され得るDTSの非限定的な例を列挙する。

【0327】

【表13A】

表13A：核局在化シグナル

30

起源	配列番号
SV40ウイルスの大きなT抗原	90
ヌクレオプラスミン	92
c-myc	93
	94
hRNPA1 M9	95
インポーチン- α からのIBBDメイン	96
筋腫Tタンパク質	97
	98
ヒトp53	99
マウスc-abl IV	100
インフルエンザウイルスNS1	117
	118
肝炎ウイルス δ 抗原	119
マウスMx1タンパク質	120
ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ	121
ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド	122

40

【0328】

50

【表 1 3 B】

表 1 3 B. DNA核標的化配列 (D T S)

GE	名称	配列番号
GE-723	3NF_DTS	526
GE-767	3'DTS__プライマー__pad	527
GE-766	5'DTS__プライマー__pad	528
GE-763	5x_kB_mesika_DTS	529
GE-764	2x_GRE_dames_DTS	530
GE-765	CREB_badding_DTS	531
GE-597	SV40DNA_DTS_10mer反復	532
GE-784	2x_Cgt_GRE_meijsing_DTS	533
GE-596	SV40DNA_DTS_72bpSingleRepeat	534
GE-595	SV40DNA_DTS_72bpTandemRepeat	535
GE-1222	10xSV40-DTS-array	536

10

【0 3 2 9】

【表 1 3 C】

表 1 3 C. D T S の説明

GE-##	名称	説明
GE-723	3NF_DTS	核因子カッパB (NFκB) 転写因子結合部位トリプレット、5bp最適化スペーサー (AGCTG) によって分離された3つの10bpκB部位 (GGGACTTTCC (配列番号1018) を含む
GE-767	3'DTS__プライマー__pad	PCRにおけるプライミングのために最適化されたCpG最小化スペーサー
GE-766	5'DTS__プライマー__pad	PCRにおけるプライミングのために最適化されたCpG最小化スペーサー
GE-763	5x_kB_mesika_DTS	5×反復のIgk κBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号1019)、3bpスペーサー、Mesika et al., 2001 Mol Therによって記載されている
GE-764	2x_GRE_dames_DTS	2×反復のグルコルチコイド応答エレメント (GRE; 起源は未記載)、スペーサーとしてのSalI制限部位、Dames et al., 2007 J Gene Medによって記載されている
GE-765	CREB_badding_DTS	単一のCREB結合部位、Badding et al., 2012 Gene Therによって記載されている
GE-597	SV40DNA_DTS_10merRepeat	ランダムCpG不含20mer配列によって分離されたSV40ゲノムからの5×72bpタンデム反復。
GE-784	2x_Cgt_GRE_meijsing_DTS	高活性、高親和性GRE結合部位
GE-596	SV40DNA_DTS_72bpSingleRepeat	SV40ゲノムからの72塩基対の単一反復領域。
GE-595	SV40DNA_DTS_72bpTandemRepeat	SV40ゲノムからの72塩基対のタンデム反復領域。
GE-1222	10xSV40-DTS-array	CpG不含スペーサーエレメントによって分離された5×二重SV40エンハンサーエレメント

20

30

【0 3 3 0】

B. c e DNA ベクターの追加の構成成分

本開示のPAHタンパク質の発現のためのc e DNA ベクターは、限定されないが、コザック配列 (表 1 4 A)、マウス微小ウイルス (MVM) イントロン、スペーサー、CpGモチーフなどの他の構成成分を含有し得る。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのc e DNA ベクターは、免疫応答又は肝臓恒常性 (表 1 4 B) に関与する1つ以上のマイクロRNA (MIR) 配列を含み得る。

【0 3 3 1】

40

50

【表 1 4 A】

表 1 4 A. コザック配列

GE # (配列番号)	名称	説明
GE-031 (配列番号537)	コンセンサス__コザック	コンセンサスコザック配列
GE-366 (配列番号538)	Mod__最小__コンセンサス__コザック__v1	修飾型コンセンサスコザック配列
GE-1206 (配列番号539)	Mod__最小__コンセンサス__コザック__v2	修飾型コンセンサスコザック配列
GE-1207 (配列番号540)	536__コザック	最小コザック配列

10

【0 3 3 2】

【表 1 4 B】

表 1 4 B. M I R 配列

配列番号 GE #	名称	説明
配列番号1009 GE-699	mir122__4x	免疫応答の調節に関与するマイクロRNA
配列番号1010 GE-020	mir-142__3pUTR	肝臓恒常性に関与するマイクロRNA

20

【0 3 3 3】

C. エレメントと O R F との組み合わせ

いくつかの実施形態によれば、特定のコドン最適化核酸配列は、特定のプロモーター、エンハンサー、又は他のシスエレメントの組み合わせのうちの1つ以上と対にされる。

【0 3 3 4】

いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、V D __ プロモーターセットをコードする核酸配列と対にされる。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、V D __ プロモーターセットをコードする配列と対にされ、V D プロモーター（例えば、T T R m）は、S E R P エンハンサーを更に含む。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、V D __ プロモーターセットをコードする核酸配列と対にされ、V D プロモーター（例えば、T T R m）は、3 × S E R P エンハンサーを含む。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、V D __ プロモーターセットをコードする核酸配列と対にされ、V D プロモーターは、3 × S E R P エンハンサーを含み、M V M イントロンを更に含む。

30

【0 3 3 5】

いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、h A A T (9 7 9) __ プロモーターセットをコードする核酸配列と対にされる。一部の実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、T T R 肝臓特異的プロモーターをコードする核酸配列と対にされ、P r o E n h __ 1 0 m e r 及び M V M イントロンを更に含む。

40

【0 3 3 6】

いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように、トランスサイレチン (T T R) 肝臓特異的プロモーターをコードする核酸配列と対にされる。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 を含み、本明細書に記載されるように

50

、トランスサイレチン（TTR）肝臓特異的プロモーターをコードする核酸配列と対にされ、MVMイントロンを更に含む。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、hPAH__codop__ORF__v2を含み、本明細書に記載されるように、最小トランスサイレチン（TTRm）肝臓特異的プロモーターをコードする核酸配列と対にされる。

【0337】

いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、hPAH__codop__ORF__v2 Δ1-29aaを含み、本明細書に記載されるように、VD__プロモーターセット又はCpG最小化hAATをコードする核酸配列と対にされる。

【0338】

いくつかの実施形態によれば、コドン最適化配列は、hPAH-r5-s29を含み、本明細書に記載されるように、VD__プロモーターセットをコードする核酸配列と対にされ、VDプロモーターは、3×SERPエンハンサーを含む。

【0339】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WP RE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WP RE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

【0340】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1：スパーサー__左-ITR__v1：VD__プロモーターセット：PmeI__部位：コンセンサス__コザック：hPAH__cDNA__ORF__v3：PacI__部位：WP RE__3pUTR：bGH：スパーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1：スパーサー__左-ITR__v1：VD__プロモーターセット：PmeI__部位：コンセンサス__コザック：hPAH__cDNA__ORF__v3：PacI__部位：WP RE__3pUTR：bGH：スパーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1からなる。

【0341】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×SerpEnh-TTRe-TTRm、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WP RE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×SerpEnh-TTRe-TTRm、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WP RE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

【0342】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2 Δ1-29aa、PacI__部位、WP RE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2 Δ1-29aa、PacI__部位、WP RE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

10

20

30

40

50

【0343】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

10

【0344】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

20

【0345】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。

30

【0346】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2__mIVS-イントロン1B__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。一部の実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2__mIVS-イントロン1B__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

40

【0347】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2__修飾__イントロン1__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×VanD__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コ

50

ザック、hPAH__codop__ORF__v2__修飾型__イントロン1__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

【0348】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、hAAT(979)__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、hAAT(979)__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

10

【0349】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、HBBv2__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、HBBv2__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

20

【0350】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、HBBv3__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、HBBv3__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

30

【0351】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、HBBv2__3pUTR、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。一部の実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__

40

【0352】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、HBBv2__3pUTR、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。一部の実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__

50

最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、HBBv2__3pUTR、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

【0353】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×HNF1-4__ProEnh__10mer、BamHI__部位、TTR__肝臓__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×HNF1-4__肝臓__10mer、BamHI__部位、TTR__ProEnh__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

10

【0354】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×HNF1-4__ProEnh__10mer、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR__肝臓__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×HNF1-4__ProEnh__10mer、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR__肝臓__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

20

30

【0355】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、CpG不含20mer__1、5×HNF1__肝臓__10mer、BamHI__部位、TTR__ProEnh__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、CpG不含20mer__1、5×HNF1__肝臓__10mer、BamHI__部位、TTR__ProEnh__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

40

【0356】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、CpG不含20mer__1、5×HNF1__ProEnh__10mer、3×VanD__TTRe__プロモーターセット__v2、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。一部の実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、CpG不含20mer__1、5×HNF1__ProEnh__1

50

0mer、3×Vand__TTRe__プロモーターセット__v2、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

【0357】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット__v2、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット__v2、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

10

【0358】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、CpGmin__hAAT__プロモーター__Set、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、CpGmin__hAAT__プロモーター__Set、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

20

【0359】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r3-s34、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r3-s34、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1からなる。

30

【0360】

いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1を含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNA構築物は、左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__

40

50

最小__コンセンサス__コザック、h P A H - r 5 - s 2 9、P a c I __部位、W P R E __ 3 p U T R、b G H、スパーサー__右-I T R__ v 1、右-I T R__ v 1からなる。

【0361】

いくつかの実施形態によれば、c e D N A構築物は、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、及び配列番号213からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一である核酸配列を含む。

【0362】

D. 調節スイッチ

分子調節スイッチは、シグナルに反応して、状態の測定可能な変化を生成するものである。そのような調節スイッチは、本明細書に記載されるP A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターと有用に組み合わせて、c e D N AベクターからのP A Hタンパク質の発現の出力を制御することができる。いくつかの実施形態では、P A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、P A Hタンパク質の発現を微調整するのに役立つ調節スイッチを含む。例えば、c e D N Aベクターの生物学的封じ込め機能として役立ち得る。いくつかの実施形態では、スイッチは、c e D N AベクターにおけるP A Hタンパク質の発現を制御可能かつ調節可能な様式で開始又は停止（すなわち、シャットダウン）するように設計された「オン／オフ」スイッチである。いくつかの実施形態では、スイッチは、一旦スイッチが起動されると、c e D N Aベクターを含む細胞がプログラム細胞死を受けよう指示することができる「キルスイッチ」を含み得る。P A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターでの使用に含まれる例示的な調節スイッチは、導入遺伝子の発現を調節するために使用することができ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際出願第U S 1 8 / 4 9 9 9 6号においてより完全に論じられている。

【0363】

(i) バイナリ調節スイッチ

いくつかの実施形態では、P A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、P A Hタンパク質の発現を制御可能に調整するのに役立ち得る調節スイッチを含む。例えば、c e D N AベクターのI T Rの間に位置する発現カセットは、追加として、P A Hタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節領域、例えば、プロモーター、シスエレメント、リプレッサー、エンハンサーなどを含み得、この調節領域は、1つ以上の共因子又は外因性薬剤によって調節される。単なる例として、調節領域は、小分子スイッチ又は誘導性若しくは抑制性プロモーターによって調節され得る。誘導性プロモーターの非限定的な例は、ホルモン誘導性又は金属誘導性プロモーターである。他の例示的な誘導性プロモーター／エンハンサーエレメントとしては、R U 4 8 6誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、及びメタロチオネインプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0364】

(ii) 小分子調節スイッチ

様々な当該技術分野において既知の小分子ベース調節スイッチは、当該技術分野において既知であり、本明細書に開示されるP A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターと組み合わせて、調節スイッチによって制御されるc e D N Aベクターを形成することができる。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、T a y l o r , e t a l . B M C B i o t e c h n o l o g y 1 0 (2 0 1 0) : 1 5に開示されている作動可能に連結された導入遺伝子の発現を制御する人工プロモーターとともに直交性リガンド／核受容体対、例えば、レチノイド受容体バリエーション／L G 3 3 5及びG R Q C I M F I、操作されたステロイド受容体（例えば、プロゲステロンに結合できないが、R U 4 8 6（ミフェプリストン）に結合するC末端切断を有する修飾プロゲステロン受容体（米国特許第5, 3 6 4, 7 9 1号）、D r o s o p h i l aからのエクジソン受容体及びそれらのエク

ジステロイドリガンド (Saez, et al., PNAS, 97 (26) (2000), 14512-14517、又は Sando R 3rd; Nat Methods. 2013, 10 (11): 1085-8) に開示されている抗生物質トリメトプリム (TMP) によって制御されるスイッチのうちのいずれか1つ又はそれらの組み合わせから選択することができる。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターによって発現される導入遺伝子を制御するための調節スイッチは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,771,679号及び第6,339,070号に開示されるものなどのプロドラッグ活性化スイッチである。

【0365】

(iii) 「パスコード」調節スイッチ

いくつかの実施形態では、調節スイッチは、「パスコードスイッチ」又は「パスコード回路」であり得る。パスコードスイッチは、特定の条件が起こったときに、ceDNAベクターからの導入遺伝子の発現の制御の微調整を可能にする。すなわち、導入遺伝子の発現及び／又は抑制が起こるためには、条件の組み合わせが存在する必要がある。例えば、導入遺伝子の発現が起こるためには、少なくとも条件A及びBが起こらなければならない。パスコード調節スイッチは、任意の数の条件であり得、例えば、導入遺伝子の発現が起こるためには、少なくとも2、又は少なくとも3、又は少なくとも4、又は少なくとも5、又は少なくとも6、又は少なくとも7つ以上の条件が存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも2つの条件（例えば、A、B条件）が起こる必要があり、いくつかの実施形態では、少なくとも3つの条件が起こる必要がある（例えば、A、B、及びC又はA、B、及びD）。単なる例として、パスコード「ABC」調節スイッチを有するceDNAからの遺伝子発現が起こるためには、条件A、B、及びCが存在しなければならない。条件A、B、及びCは、以下のとおりであり得る：条件Aは、病態又は疾患の存在であり、条件Bは、ホルモン反応であり、条件Cは、導入遺伝子の発現に対する反応である。例えば、導入遺伝子が欠陥EPO遺伝子を編集する場合、条件Aは、慢性腎疾患（CKD）の存在であり、条件Bは、対象が腎臓中に低酸素状態を有する場合に起こり、条件Cは、腎臓中のエリスロポエチン産生細胞（EPC）動員が不全であるか、又は代替的に、HIF-2活性化が不全である。一旦酸素レベルが増加するか、又は所望のEPOレベルに達すると、導入遺伝子は、3つの条件が起こるまで再度オフになり、オンに戻る。

【0366】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターにおける使用のために包含されるパスコード調節スイッチ又は「パスコード回路」は、生物学的封じ込め条件を定義するために使用される環境シグナルの範囲及び複雑性を拡張するために、ハイブリッド転写因子（TF）を含む。既定条件の存在下で細胞死を誘起するデッドマンスイッチとは対照的に、「パスコード回路」は、特定の「パスコード」の存在下での細胞生存又は導入遺伝子発現を可能にし、所定の環境条件又はパスコードが存在する場合にのみ導入遺伝子発現及び／又は細胞生存を可能にするように容易に再プログラムされ得る。

【0367】

本明細書に開示される調節スイッチ、例えば、小分子スイッチ、核酸ベーススイッチ、小分子-核酸ハイブリッドスイッチ、転写後導入遺伝子調節スイッチ、翻訳後調節放射線制御スイッチ、低酸素媒介性スイッチ、及び本明細書に開示される当業者に既知の他の調節スイッチのうちのいずれか及び全ての組み合わせを、本明細書に開示されるパスコード調節スイッチにおいて使用することができる。使用のために包含される調節スイッチはまた、レビュー論文Kis et al., J R Soc Interface. 12: 20141000 (2015)に記載されており、Kisの表1にまとめられている。いくつかの実施形態では、パスコード系で使用するための調節スイッチは、国際特許出願第US18/49996号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の表11に開示されるスイッチのうちのいずれか又はそれらの組み合わせから選択することができる。

【0368】

(iv) 導入遺伝子発現を制御するための核酸ベース調節スイッチ

いくつかの実施形態では、*ceDNA*によってPAHタンパク質の発現を制御するための調節スイッチは、核酸ベース制御機序に基づく。例示的な核酸制御機序は、当該技術分野において既知であり、使用が想定される。例えば、そのような機序としては、リボスイッチ、例えば、米国特許出願公開第2009/0305253号、同第2008/0269258号、同第2017/0204477号、国際公開第2018/026762(A1)号、米国特許第9,222,093号、及び欧州特許出願第288071号に開示されるもの、また、Villa JK et al., *Microbiol Spectr*. 2018 May; 6(3)によるレビューに開示されているものなどが挙げられる。国際公開第2018/075486号及び同第2017/147585号に開示されるものなどの、代謝物反応性転写バイオセンサーもまた含まれる。使用が想定される他の当該技術分野において既知の機序としては、*siRNA*又は*RNAi*分子(例えば、*miR*、*shRNA*)による導入遺伝子のサイレンシングが挙げられる。例えば、*ceDNA*ベクターは、*ceDNA*ベクターによって発現される導入遺伝子の一部に対して相補的である*RNAi*分子をコードする調節スイッチを含み得る。導入遺伝子(例えば、PAHタンパク質)は、*ceDNA*ベクターによって発現されたとしてもそのような*RNAi*が発現される場合、相補的*RNAi*分子によってサイレンシングされ、導入遺伝子が*ceDNA*ベクターによって発現されたときに*RNAi*が発現されない場合、導入遺伝子(例えば、PAHタンパク質)は、*RNAi*によってサイレンシングされない。

10

【0369】

いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、米国特許出願公開第2002/0022018号に開示される組織特異的自己不活化調節スイッチであり、これにより調節スイッチは、そうでなければ導入遺伝子発現が不利益となり得る部位において、導入遺伝子(例えば、PAHタンパク質)を意図的にスイッチオフする。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、米国特許出願公開第2014/0127162号及び米国特許第8,324,436号に開示されるリコンビナーゼ可逆的遺伝子発現系である。

20

【0370】

(v) 転写後及び翻訳後調節スイッチ。

いくつかの実施形態では、*ceDNA*ベクターによってPAHタンパク質の発現を制御するための調節スイッチは、転写後修飾系である。例えば、そのような調節スイッチは、米国特許出願公開第2018/0119156号、英国特許第201107768号、国際公開第2001/064956(A3)号、欧州特許第2707487号、及びBeilstein et al., *ACS Synth. Biol.*, 2015, 4(5), pp 526-534; Zhong et al., *Elife*. 2016 Nov 2; 5. pii: e18858に開示されているように、テトラサイクリン又はテオフィリンに感受性のあるアプタザイムリボスイッチであり得る。いくつかの実施形態では、当業者であれば、導入遺伝子、及びリガンド感受性(オフスイッチ)アプタマーを含有し、その最終結果がリガンド感受性オンスイッチである、阻害性*siRNA*の両方をコードすることができると想定される。

30

【0371】

(vi) 他の例示的な調節スイッチ

任意の既知の調節スイッチを*ceDNA*ベクター中で使用して、環境変化によってトリガーされるものを含む、*ceDNA*ベクターによってPAHタンパク質の発現を制御することができる。更なる例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: Suzuki et al., *Scientific Reports* 8; 10051 (2018)のBOC法、遺伝暗号の拡大及び非生理的アミノ酸、放射線制御又は超音波制御オン/オフスイッチ(例えば、Scott S et al., *Gene Ther.* 2000 Jul; 7(13): 1121-5、米国特許第5,612,318号、同第5,571,797号、同第5,770,581号、同第5,817,636号、及び国際公開第1999/025385(A1)号。いくつかの実施形態では、調節スイッチは、例えば、米国特許第7,840,263号、米国特許出願公開第2007/0190028

40

50

(A1)号に開示されている埋め込み型システムによって制御され、遺伝子発現が、ceDNAベクター中の導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを活性化する電磁エネルギーを含む1つ以上の形態のエネルギーによって制御される。

【0372】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターにおける使用が想定される調節スイッチは、低酸素媒介性又はストレス活性化スイッチ、例えば、国際公開第1999/060142(A2)号、米国特許第5,834,306号、同第6,218,179号、同第6,709,858号、米国特許出願公開第2015/0322410号、Greco et al., (2004) Targeted Cancer Therapies 9, S368 (それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)、並びにFROG、TOAD、及びNRSEエレメント、並びに条件的誘導性サイレンシングエレメント(低酸素応答エレメント(HRE)、炎症反応エレメント(IRE)、及び、例えば、米国特許第9,394,526号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる))に開示されている剪断応力活性化エレメント(SSAE)が含まれる)に開示されているものである。そのような実施形態は、虚血後、又は虚血性組織及び/若しくは腫瘍において、ceDNAベクターからの導入遺伝子の発現をオンにするために有用である。

【0373】

(vii)キルスイッチ

本明細書に記載される他の実施形態は、キルスイッチを含む、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターに関する。本明細書に開示されるキルスイッチは、ceDNAベクターを含む細胞が殺滅されるか、又は導入されたceDNAベクターを対象の系から永久に除去する手段としてプログラム細胞死を受けるようにすることができる。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターにおけるキルスイッチの使用が、通常は、対象が許容可能に喪失し得る限定数の細胞、又はアポトーシスが望ましい細胞型(例えば、がん細胞)へのceDNAベクターの標的と結び付けられることは、当業者によって理解されるであろう。全ての態様では、本明細書に開示される「キルスイッチ」は、入力生存シグナル又は他の指定条件の不在下でceDNAベクターを含む細胞の急速かつロバストな細胞殺滅をもたらすように設計される。言い換えれば、本明細書に記載されるようなPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターによりコードされるキルスイッチは、ceDNAベクターを含む細胞の細胞生存を、特定の入力シグナルによって定義される環境に制限し得る。そのようなキルスイッチは、対象におけるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを除去すること、又はコードされたPAHタンパク質を発現しないことを保証することが望ましいときに、生物学的封じ込め機能として役立つ。

【0374】

当業者に既知の他のキルスイッチは、本明細書に開示されるPAHタンパク質、例えば、US2010/0175141、US2013/0009799、US2011/0172826、US2013/0109568に開示されているもの、並びにJusiak et al., Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine; 2014; 1-56、Kobayashi et al., PNAS, 2004; 101; 8419-9、Marchisio et al., Int. Journal of Biochem and Cell Biol., 2011; 43; 310-319、及びReinshagen et al., Science Translational Medicine, 2018, 11 (これらの全ての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されているキルスイッチの発現のためのceDNAベクターで使用するために包含される。

【0375】

したがって、いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、エフェクター毒素又はレポータータンパク質をコードする核酸を含むキルスイッチ核酸構築物を含むことができ、エフェクター毒素(例えば、死タンパク質)又はレポ

ータータンパク質の発現は、所定の条件によって制御される。例えば、所定の条件は、例えば外因性物質などの環境物質の存在であり得、それがなければ、細胞はデフォルトでエフェクター毒素（例えば、死タンパク質）の発現を起こして殺傷される。代替実施形態では、所定の条件は、2つ以上の環境物質の存在であり、例えば、細胞は、2つ以上の必要な外因性物質が供給された場合のみに生き残り、いずれもなければ、ceDNAベクターを含む細胞が殺傷される。

【0376】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、ceDNAベクターを含む細胞を破壊するキルスイッチを組み込むように修飾され、ceDNAベクターによって発現される導入遺伝子のインビボ発現（例えば、PAHタンパク質の発現）を効果的に終了させる。具体的には、ceDNAベクターは、通常の生理学的条件下で哺乳動物細胞では機能しないスイッチタンパク質を発現するように更に遺伝子操作される。このスイッチタンパク質を特異的に標的とする薬物又は環境条件を投与したときのみ、スイッチタンパク質を発現する細胞が破壊され、それにより治療用タンパク質又はペプチドの発現を終了させる。例えば、HSV-チミジンキナーゼを発現する細胞は、ガンシクロビル及びシトシンデアミナーゼなどの薬物を投与すると殺傷される可能性がある」と報告された。例えば、Dey and Evans, Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK), in Targets in Gene Therapy, edited by You (2011)、及びBeltinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8699-8704 (1999)を参照されたい。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、DISE（生存遺伝子排除によって引き起こされる死）と称されるsiRNAキルスイッチを含むことができる（Murmman et al., Oncotarget. 2017; 8: 84643-84658に記載される方法を用いて生成することができる。Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo）。

【0377】

VI. ceDNAベクターの産生の方法

産生の一般的方法

本明細書で定義されるような非対称ITR対又は対称ITR対を含む、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターのある特定の産生方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる2018年9月7日に出願された国際出願第US18/49996号のセクションIVに記載されている。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に記載されるように、昆虫細胞を使用して産生され得る。代替実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる2019年1月18日に出願された国際出願第US19/14122号に開示されるように、合成的に、またいくつかの実施形態では無細胞法で産生することができる。

【0378】

本明細書に記載されるように、一実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、例えば、a) ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、及び／又はceDNA-バキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、Repタンパク質の存在下では、宿主細胞内のceDNAベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、b) ceDNAベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含むプロセスによって取得され得る。Repタンパク質の存在は、修飾型ITRを有するベクターポリヌクレオチドの複製を誘導して、宿主細胞中でceDNAベクターを産

生する。但し、ウイルス粒子（例えば、AAVビリオン）は発現されない。したがって、AAV又は他のウイルスベクターにおいて天然に課されるもの等のサイズ制限はない。

【0379】

宿主細胞から単離されたceDNAベクターの存在は、宿主細胞から単離されたDNAをceDNAベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化し、消化されたDNA材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状かつ非連続的なDNAと比較して特徴的な直鎖状かつ連続的なDNAのバンドの存在を確認することによって確認され得る。

【0380】

更に別の態様では、本開示は、例えば、Lee, L. et al. (2013) PLoS One 8 (8) : e69879に記載されるように、非ウイルス性DNAベクターの産生において、DNAベクターポリヌクレオチド発現テンプレート（ceDNAテンプレート）をそれら自体のゲノムに安定して組み込んでいる宿主細胞株の使用を提供する。好ましくは、Repは、約3のMOIで宿主細胞に付加される。宿主細胞株が哺乳動物細胞株、例えば、HEK293細胞である場合、細胞株は、安定して組み込まれたポリヌクレオチドベクターテンプレートを有し得、ヘルペスウイルス等の第2のベクターを使用して、Repタンパク質を細胞に導入することができ、Rep及びヘルパーウイルスの存在下でのceDNAの切除及び増幅を可能にする。

【0381】

一実施形態では、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを作製するために使用される宿主細胞は、昆虫細胞であり、バキュロウイルスは、Repタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、例えば図3A～3C及び実施例1に記載される、ceDNAの非ウイルス性DNAベクターポリヌクレオチド発現構築物テンプレートとを両方送達するために使用される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Repタンパク質を発現するために操作される。

【0382】

次いで、ceDNAベクターは、宿主細胞から採取され、単離される。本明細書に記載されるceDNAベクターを細胞から採取及び収集するための時間は、ceDNAベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存率、細胞形態論、細胞増殖等を考慮して選択され得る。一実施形態では、細胞は、十分な条件下で増殖し、ceDNAベクターを産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の大部分がバキュロウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取される。DNAベクターは、Qiagen Endo-Freeプラスミドキット等のプラスミド精製キットを使用して単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、DNAベクターに対して適合され得る。一般に、任意の核酸精製方法が採用され得る。

【0383】

DNAベクターは、DNAの精製のための当業者に既知の任意の手段によって精製され得る。一実施形態では、ceDNAベクターは、DNA分子として精製される。別の実施形態では、ceDNAベクターは、エキソソーム又は微粒子として精製される。

【0384】

PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの存在は、細胞から単離されたベクターDNAをDNAベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、並びにゲル電気泳動を使用し、消化されたDNA材料及び未消化のDNA材料の両方を分析して、直鎖状かつ非連続的なDNAと比較して特徴的な直鎖状かつ連続的なDNAの存在を確認することによって確認され得る。図3C及び図3Dは、本明細書におけるプロセスによって産生された閉端ceDNAベクターの存在を特定するための一実施形態を示す。

【0385】

VII. 医薬組成物

別の態様では、医薬組成物が提供される。医薬組成物は、本明細書に記載されるPAH

10

20

30

40

50

タンパク質の発現のための c e D N A ベクター、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む。

【0386】

本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、対象の細胞、組織、又は器官へのインビボ送達のために対象に投与するのに好適な医薬組成物に組み込まれ得る。典型的に、医薬組成物は、本明細書に開示される c e D N A ベクター及び薬学的に許容される担体を含む。例えば、本明細書に記載される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、治療的投与（例えば、非経口投与）の所望の経路に好適な医薬組成物に組み込まれ得る。高圧静脈内又は動脈内注入を介した受動組織形質導入、同様に、核内微量注射若しくは細胞質内注射などの細胞内注射もまた、企図される。治療目的のための医薬組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、又は高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌注射液は、必要に応じて、上記に列挙した成分の1つ又は組み合わせとともに、適切なバッファーに必要な量の c e D N A ベクター化合物を組み込んだ後、c e D N A ベクターを含む濾過滅菌によって調製することができ、核酸中の導入遺伝子をレシピエントの細胞に送達するように製剤化して、その中の導入遺伝子又はドナー配列の治療的発現をもたらし得る。この組成物はまた、薬学的に許容される担体を含み得る。

10

【0387】

P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む薬学的に活性な組成物は、細胞、例えば、対象の細胞に様々な目的のための導入遺伝子を送達するように製剤化することができる。

20

【0388】

治療目的のための医薬組成物は、典型的に、無菌であり、製造及び貯蔵の条件下で安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、又は高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注射可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量の c e D N A ベクター化合物を、必要に応じて、上記で列挙した成分のうちの1つ又は組み合わせと組み込み、濾過滅菌によって調製され得る。

【0389】

本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、局所、全身、羊膜内、くも膜下腔内、頭蓋内、動脈内、静脈内、リンパ内、腹腔内、皮下、気管、組織内（例えば、筋肉内、心臓内）、肝内、腎臓内、脳内）、くも膜下腔内、膀胱内、結膜（例えば、眼窩外、眼窩内、眼窩後、網膜内、網膜下、脈絡膜、脈絡膜下、間質内、房内、及び硝子体内）、蝸牛内、並びに粘膜（例えば、経口、直腸、経鼻）投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。高圧静脈内又は動脈内注入を介した受動組織形質導入、同様に、核内微量注射若しくは細胞質内注射等の細胞内注射もまた、企図される。

30

【0390】

いくつかの態様では、本明細書で提供される方法は、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための1つ以上の c e D N A ベクターを宿主細胞に送達することを含む。本明細書ではまた、そのような方法によって産生される細胞、及びそのような細胞を含むか又はそのような細胞から産生される生物（動物、植物、又は真菌など）も提供される。核酸の送達方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、又は脂質：核酸コンジュゲート、裸の D N A、及び薬剤によって増強された D N A の取り込みが挙げられ得る。リポフェクションは、例えば、米国特許第 5,049,386 号、同第 4,946,787 号、及び同第 4,897,355 号（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、T r a n s f e c t a m（商標）及び L i p o f e c t i n（商標））。送達は、細胞（例えば、インビトロ若しくはエクスピボ投与）又は標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

40

50

【0391】

核酸を細胞に送達するための様々な技法及び方法が、当該技術分野において既知である。例えば、PAHタンパク質の発現のためのceDNAなどの核酸は、脂質ナノ粒子(LNP)、リポドイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、リポプレックス、又はコアシェルナノ粒子中に製剤化され得る。典型的に、LNPは、核酸(例えば、ceDNA)分子、1つ以上のイオン化又はカチオン性脂質(若しくはそれらの塩)、1つ以上の非イオン性又は中性脂質(例えば、リン脂質)、凝集を防ぐ分子(例えば、PEG若しくはPEG-脂質コンジュゲート)、及び任意選択的にステロール(例えば、コレステロール)で構成される。

【0392】

PAHタンパク質の発現のためのceDNAなどの核酸を細胞に送達するための別の方法は、細胞によって内在化されるリガンドと核酸を複合することによるものである。例えば、リガンドは、細胞表面上の受容体に結合し、エンドサイトーシスを介して内在化され得る。リガンドは、核酸中のヌクレオチドに共有結合的に連結され得る。核酸を細胞に送達するための例示的なコンジュゲートは、例えば、国際公開第2015/006740号、同第2014/025805号、同第2012/037254号、同第2009/082606号、同第2009/073809号、同第2009/018332号、同第2006/112872号、同第2004/090108号、同第2004/091515号、及び同第2017/177326号に記載されている(それらの全ての内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0393】

PAHタンパク質の発現のためのceDNAなどの核酸はまた、トランスフェクションによって細胞に送達され得る。有用なトランスフェクション方法としては、脂質媒介性トランスフェクション、カチオン性ポリマー媒介性トランスフェクション、又はリン酸カルシウム沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。トランスフェクション試薬は、当該技術分野において周知であり、TurboFectトランスフェクション試薬(Thermo Fisher Scientific)、Pro-Ject試薬(Thermo Fisher Scientific)、TRANSPASS(商標)Pタンパク質トランスフェクション試薬(New England Biolabs)、CHARIOT(商標)タンパク質送達試薬(Active Motif)、PROTEOJUICE(商標)タンパク質トランスフェクション試薬(EMD Millipore)、293フェクチン、LIPOFECTAMINE(商標)2000、LIPOFECTAMINE(商標)3000(Thermo Fisher Scientific)、LIPOFECTAMINE(商標)(Thermo Fisher Scientific)、LIPOFECTIN(商標)(Thermo Fisher Scientific)、DMRIE-C、CELLFECTIN(商標)(Thermo Fisher Scientific)、OLIGOFECTAMINE(商標)(Thermo Fisher Scientific)、LIPOFECTACE(商標)、FUGENE(商標)(Roche, Basel, Switzerland)、FUGENE(商標)HD(Roche)、TRANSFECTAM(商標)(Transfectam, Promega, Madison, Wis.)、TFX-10(商標)(Promega)、TFX-20(商標)(Promega)、TFX-50(商標)(Promega)、TRANSFECTIN(商標)(BioRad, Hercules, Calif.)、SILENT FECT(商標)(Bio-Rad)、Effectene(商標)(Qiagen, Valencia, Calif.)、DC-chol(Avanti Polar Lipids)、GENEPORTER(商標)(Gene Therapy Systems, San Diego, Calif.)、DHARMAFECT 1(商標)(Dharmacon, Lafayette, Colo.)、DHARMAFECT 2(商標)(Dharmacon)、DHARMAFECT 3(商標)(Dharmacon)、DHARMAFECT 4(商標)(Dharmacon)、ESCORT(商標)III

10

20

30

40

50

(Sigma, St. Louis, Mo.)、及びESCORT (商標) IV (Sigma Chemical Co.) が含まれるが、これらに限定されない。ceDNAなどの核酸もまた、当業者に既知のマイクロフルイディクス方法を介して細胞に送達され得る。

【0394】

本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターはまた、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与され得る。投与は、分子を血液又は組織細胞と最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによるものであり、注射、注入、局所用途、及びエレクトロポレーションが挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する好適な方法は、当業者によって利用可能かつ周知であり、特定の組成物を投与するために2つ以上の経路が使用され得るが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時であり、効果的な反応を提供し得る。

10

【0395】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のための核酸ベクターのceDNAベクター導入方法は、例えば、米国特許第5,928,638号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される方法によって、例えば、造血幹細胞に送達され得る。

【0396】

本開示によるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、対象中の細胞又は標的器官への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも1つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療薬送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物又は活性製剤成分(API)を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。化合物を含有するポリエチレングリコール(PEG)官能基を含むが、これに限定されない例示的なリポソーム及びリポソーム製剤は、2018年9月7日に出願された国際出願第US2018/050042号及び2018年12月6日に出願された国際出願第US2018/064242号(例えば、「薬学的製剤」と題されるセクションを参照されたい)に開示されている(それらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

20

【0397】

当該技術分野において既知の様々な送達方法又はそれらの修正を使用して、ceDNAベクターをインビトロ又はインビボで送達することができる。例えば、いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、機械的、電氣的、超音波、流体力学的、又はレーザーベースエネルギーによって細胞膜に一時的な貫通を作製することによって送達され、それにより標的化された細胞へのDNA進入が促進される。例えば、ceDNAベクターは、サイズ制限されたチャネルを通して細胞を圧搾することによるか、又は当該技術分野において既知の他の手段によって細胞膜を一時的に崩壊させることにより送達され得る。場合によっては、ceDNAベクターのみが、裸のDNAとして、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎、心臓、腸、肺、及び胃、皮膚、甲状腺、心筋、又は骨格筋から選択される任意の1つ以上の組織のうちのいずれか1つに直接注射される。場合によっては、ceDNAベクターは、遺伝子銃によって送達される。カプシド不含AAVベクターでコーティングされた金又はタングステン球状粒子(1~3 µm直径)は、加圧ガスによって高速に加速され、標的組織細胞中に貫通することができる。

30

40

【0398】

本明細書では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクター及び薬学的に許容される担体を含む組成物が具体的に企図されている。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、脂質送達系、例えば、本明細書に記載されるリポソームで製剤化される。いくつかの実施形態では、そのような組成物は、熟練した開業医によって望まれる任意の経路によって投与される。組成物は、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、経粘膜、局所、

50

吸入を介した、口腔内投与を介した、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内、及び関節内、又はそれらの組み合わせを含む異なる経路によって対象に投与され得る。獣医学的使用のために、組成物は、通常の獣医学的慣習に従って好適に許容される製剤として投与され得る。獣医師は、特定の動物に最も適切な投与計画及び投与経路を容易に決定することができる。組成物は、従来のシリンジ、無針注射デバイス、「マイクロプロジェクトイルボンバードメントガン」、又はエレクトロポレーション（「EP」）、「流体力学的方法」、又は超音波などの他の物理的方法によって投与することができる。

【0399】

場合によっては、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、内臓及び肢全体の骨格筋への、任意の水溶性化合物及び粒子の直接細胞内送達のための単純かつ非常に効率的な方法である流体力学的注射によって送達される。

【0400】

場合によっては、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、膜中にナノスコピック孔を作製することにより、超音波によって送達され、内臓又は腫瘍の細胞へのDNA粒子の細胞内送達を促進するため、プラスミドDNAのサイズ及び濃度は、この系の効率性において大きな役割を果たす。場合によっては、ceDNAベクターは、磁場を使用することによってマグネトフェクションにより送達され、核酸を含有する粒子を標的細胞中に濃縮する。

【0401】

場合によっては、化学送達系は、例えば、カチオン性リポソーム／ミセル又はカチオン性ポリマーに属するポリカチオン性ナノマー粒子による負電荷核酸の圧縮を含むナノマー複合体を使用することによって使用され得る。送達方法に使用されるカチオン性脂質としては、一価カチオン性脂質、多価カチオン性脂質、グアニジン含有化合物、コレステロール誘導体化合物、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（エチレンイミン）、ポリーレーリジン、プロタミン、他のカチオン性ポリマー）、及び脂質－ポリマーハイブリッドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0402】

A．エキソソーム：

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、エキソソームにパッケージ化されることによって送達される。エキソソームは、多胞体と形質膜との融合に続いて、細胞外環境中に放出されるエンドサイトーシス起源の小膜小胞である。それらの表面は、ドナー細胞の細胞膜からの脂質二層からなり、それらは、エキソソームを産生した細胞からのサイトゾルを含有し、表面上の親細胞からの膜タンパク質を呈する。エキソソームは、上皮細胞、B及びTリンパ球、マスト細胞（MC）、同様に、樹状細胞（DC）を含む様々な細胞型によって産生される。いくつかの実施形態では、10nm～1μm、20nm～500nm、30nm～250nm、50nm～100nmの直径を有するエキソソームが、使用のために想定される。エキソソームは、それらのドナー細胞を使用するか、又は特定の核酸をそれらに導入するかのいずれかによって、標的細胞への送達のために単離され得る。当該技術分野において既知の様々なアプローチを使用して、本開示のカプシド不含AAVベクターを含有するエキソソームを産生することができる。

【0403】

A．微粒子／ナノ粒子

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、脂質ナノ粒子によって送達される。一般に、脂質ナノ粒子は、例えば、Tam et al. (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery*. *Pharmaceuticals* 5 (3) : 498–507によって開示されるように、イオン化アミノ脂質（例えば、ヘプタトリアコンター6, 9, 28, 31–テトラエン–19–イル4–（ジメ

10

20

30

40

50

チルアミノ) ブタノエート、DLin-MC3-DMA、ホスファチジルコリン(1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DSPC)、コレステロール、及びコート脂質(ポリエチレングリコール-ジミリスツールグリセロール、PEG-DMG)を含む。

【0404】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約10~約1000nmの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、300nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約10~約300nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、200nm未満の直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約25~約200nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子調製物(例えば、複数の脂質ナノ粒子を含む組成物)は、サイズ分布を有し、平均サイズ(例えば、直径)は、約70nm~約200nmであり、より典型的に、平均サイズは、約100nm以下である。

10

【0405】

当該技術分野において既知の様々な脂質ナノ粒子を使用して、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを送達することができる。例えば、脂質ナノ粒子を使用する様々な送達方法は、米国特許第9,404,127号、同第9,006,417号、及び同第9,518,272号に記載されている。

【0406】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、金ナノ粒子によって送達される。一般に、核酸は、金ナノ粒子に共有結合的に結合され得るか、又は金ナノ粒子に非共有結合的に結合され得(例えば、電荷-電荷相互作用によって結合され)、例えば、Ding et al. (2014). Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. Mol. Ther. 22(6); 1075-1083。いくつかの実施形態では、金ナノ粒子-核酸コンジュゲートは、例えば、米国特許第6,812,334号に記載される方法を使用して産生される。

20

【0407】

B. コンジュゲート

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、複合される(例えば、細胞取り込みを増加させる薬剤に共有結合される)。「細胞取り込みを増加させる薬剤」は、脂質膜を通した核酸の輸送を促進する分子である。例えば、核酸は、親油性化合物(例えば、コレステロール、トコフェロールなど)、細胞貫通ペプチド(CPP)(例えば、ペネトラチン、TAT、Syn1Bなど)、及びポリアミン(例えば、スペルミン)にコンジュゲートし得る。細胞取り込みを増加させる薬剤の更なる例は、例えば、Winkler (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Ther. Deliv. 4(7); 791-809。

30

【0408】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、ポリマー(例えば、ポリマー分子)又は葉酸塩分子(例えば、葉酸分子)に複合される。一般に、ポリマーに複合された核酸の送達は、例えば、国際公開第2000/34343号及び国際公開第2008/022309号に記載されるように、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、例えば、米国特許第8,987,377号によって記載されるように、ポリ(アミド)ポリマーに複合される。いくつかの実施形態では、本開示によって記載される核酸は、米国特許第8,507,455号に記載されるように、葉酸分子に複合される。

40

【0409】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのce

50

DNAベクターは、例えば、米国特許第8,450,467号に記載されるように、炭水化物に複合される。

【0410】

C. ナノカプセル

代替的に、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターのナノカプセル製剤が使用され得る。ナノカプセルは、一般に、安定かつ再生可能な方式で物質を捕捉することができる。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を避けるために、そのような微細粒子（およそ0.1 μmのサイズ）は、ポリマーを使用して、インビボで分解され得るように設計されるべきである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子が、使用のために企図される。

10

【0411】

D. リポソーム

本開示によるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、対象中の細胞又は標的器官への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも1つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療薬送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物又は活性製剤成分（API）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

20

【0412】

リポソームの形成及び使用は、一般に、当業者に既知である。向上された血清安定性及び循環半減期を有するリポソームが開発されている（米国特許第5,741,516号）。更に、潜在的な薬物担体としてのリポソーム及びリポソーム様調製物の様々な方法が記載されている（米国特許第5,567,434号、同第5,552,157号、同第5,565,213号、同第5,738,868号、及び同第5,795,587号、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0413】

E. 例示的なリポソーム及び脂質ナノ粒子（LNP）組成物

本開示によるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、細胞、例えば、導入遺伝子の発現を必要とする細胞への送達のためにリポソームに付加され得る。リポソームは、少なくとも1つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療薬送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再配置することによって作用して、薬物又は活性製剤成分（API）を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

30

【0414】

ceDNAベクターを含む脂質ナノ粒子（LNP）は、2018年9月7日に提出された国際出願第US2018/050042号及び2018年12月6日に提出された国際出願第US2018/064242号に開示されており、それらの全体が本明細書に組み込まれ、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターについての方法及び組成物での使用が想定されている。

40

【0415】

いくつかの態様では、本開示は、免疫原性／抗原性を低減し、化合物に対する親水性及び疎水性を提供し、投与頻度を低減することができる、ポリエチレングリコール（PEG）官能基を有する1つ以上の化合物（いわゆる「PEG化化合物」）を含む、リポソーム製剤を提供する。又は、リポソーム製剤は、単にポリエチレングリコール（PEG）ポリマーを追加の構成成分として含む。そのような態様では、PEG又はPEG官能基の分子量は、62 Da～約5,000 Daであり得る。

【0416】

50

いくつかの態様では、本開示は、延長放出又は制御放出プロファイルを有するAPIを、数時間～数週間の期間にわたって送達するであろうリポソーム製剤を提供する。いくつかの関連態様では、リポソーム製剤は、脂質二層によって結合される水性チャンバを含み得る。他の関連態様では、リポソーム製剤は、数時間～数週間の期間にわたってAPIを放出する、高温で物理的移行を経る構成成分を有するAPIを封入する。

【0417】

いくつかの態様では、リポソーム製剤は、スフィンゴミエリン及び本明細書に開示される1つ以上の脂質を含む。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、Optisomeを含む。

【0418】

いくつかの態様では、本開示は、N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、(ジステアロイル-sn-グリセロール-ホスホエタノールアミン)、MPEG(メトキシポリエチレングリコールコンジュゲート脂質、HSPC(水素化ダイズホスファチジルコリン)、PEG(ポリエチレングリコール)、DSPC(ジステアロイル-sn-グリセロール-ホスホエタノールアミン)、DSPC(ジステアロイルホスファチジルコリン)、DOPC(ジオレオイルホスファチジルコリン)、DPPG(ジパルミトイルホスファチジルグリセロール)、EPC(卵ホスファチジルコリン)、DOPS(ジオレオイルホスファチジルセリン)、POPC(パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン)、SM(スフィンゴミエリン)、MPEG(メトキシポリエチレングリコール)、DMPG(ジミリストイルホスファチジルコリン)、DMPG(ジミリストイルホスファチジルグリセロール)、DSPG(ジステアロイルホスファチジルグリセロール)、DEPC(ジエルコイルホスファチジルコリン)、DOPE(ジオレオイル-sn-グリセロール-ホスホエタノールアミン)、硫酸コレステロール(CS)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、DOPC(ジオレオイル-sn-グリセロール-ホスファチジルコリン)、又はそれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上の脂質を含むリポソーム製剤を提供する。

【0419】

いくつかの態様では、本開示は、リン脂質、コレステロール、及びPEG化脂質を56:38:5のモル比で含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤の全体脂質含有量は、2~16mg/mLである。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、及びPEG化脂質を含有するリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、及びPEG化脂質を、それぞれ3:0.015:2のモル比で含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基、コレステロール、及びPEG化脂質を含有する脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基及びコレステロールを含有する脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、PEG化脂質は、PEG-2000-DSPCである。いくつかの態様では、本開示は、DPPG、ダイズPC、MPEG-DSPC脂質コンジュゲート、及びコレステロールを含むリポソーム製剤を提供する。

【0420】

いくつかの態様では、本開示は、ホスファチジルコリン官能基を含有する1つ以上の脂質、及びエタノールアミン官能基を含有する1つ以上の脂質を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、1つ以上のホスファチジルコリン官能基を含有する脂質、エタノールアミン官能基を含有する脂質、及びステロール、例えば、コレステロールを含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、DOPC/DEPC、及びDOPEを含む。

【0421】

いくつかの態様では、本開示は、1つ以上の薬学的賦形剤、例えば、スクロース及び／

10

20

30

40

50

又はグリシンを更に含むリポソーム製剤を提供する。

【0422】

いくつかの態様では、本開示は、本開示は、単一ラメラ構造又は多ラメラ構造のいずれかであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子及び／又は発泡ベース粒子を含むリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、本開示は、一般的なナノ粒子に対する相対サイズでより大きく、約150～250nmのサイズであるリポソーム製剤を提供する。いくつかの態様では、リポソーム製剤は、凍結乾燥粉末である。

【0423】

いくつかの態様では、本開示は、リポソームの外側に単離されたceDNAを有する混合物に弱塩基を添加することにより、本明細書に開示又は記載されるceDNAベクターで作製及び充填されたリポソーム製剤を提供する。この付加は、リポソームの外側のpHをおよそ7.3まで増加させ、APIをリポソーム中に送る。いくつかの態様では、本開示は、リポソームの内側で酸性であるpHを有するリポソーム製剤を提供する。そのような場合、リポソームの内側は、pH4～6.9、より好ましくはpH6.5であり得る。他の態様では、本開示は、リポソーム内薬物安定化技術を使用することにより作製されたリポソーム製剤を提供する。そのような場合、ポリマー又は非ポリマー高電荷アニオン及びリポソーム内捕捉剤、例えば、ポリリン酸塩又はオクタ硫酸スクロースが利用される。

【0424】

いくつかの態様では、本開示は、ceDNA及びイオン化脂質を含む脂質ナノ粒子を提供する。例えば、プロセスにより得られたceDNAを用いて作製及び負荷される脂質ナノ粒子製剤は、2018年9月7日に提出された国際出願第US2018/050042号に開示されており、本明細書に組み込まれる。これは、イオン化脂質をプロトン化し、粒子のceDNA／脂質会合及び核形成に好ましいエネルギー論を提供する、低pHでのエタノール脂質と水性ceDNAとの高エネルギー混合によって達成され得る。粒子は、水性希釈及び有機溶媒の除去によって更に安定化され得る。粒子は、所望のレベルに濃縮され得る。

【0425】

一般に、脂質粒子は、約10:1～30:1の全脂質対ceDNA（質量又は重量）比で調製される。いくつかの実施形態では、脂質対ceDNA比（質量／質量比、w/w比）は、約1:1～約25:1、約10:1～約14:1、約3:1～約15:1、約4:1～約10:1、約5:1～約9:1、又は約6:1～約9:1の範囲内であり得る。脂質及びceDNAの量を調整して、所望のN/P比、例えば3、4、5、6、7、8、9、10以上のN/P比を提供し得る。一般に、脂質粒子製剤の全体脂質含有量は、約5mg/ml～約30mg/mlの範囲であり得る。

【0426】

イオン化脂質は、典型的に、核酸カーゴ、例えばceDNAを低pHで凝縮させるため、及び膜会合及び膜融合性を駆動するために用いられる。一般に、イオン化脂質は、正に電荷される、又は例えばpH6.5以下の酸性条件下でプロトン化される少なくとも1つのアミノ基を含む脂質である。イオン化脂質はまた、本明細書ではカチオン性脂質と称される。

【0427】

例示的なイオン化脂質は、国際公開第2015/095340号、同第2015/199952号、同第2018/011633号、同第2017/049245号、同第2015/061467号、同第2012/040184号、同第2012/000104号、同第2015/074085号、同第2016/081029号、同第2017/004143号、同第2017/075531号、同第2017/117528号、同第2011/022460号、同第2013/148541号、同第2013/116126号、同第2011/153120号、同第2012/044638号、同第2012/054365号、同第2011/090965号、同第2013/016058号、同第20

10

20

30

40

50

12/162210号、同第2008/042973号、同第2010/129709号、同第2010/144740号、同第2012/099755号、同第2013/049328号、同第2013/086322号、同第2013/086373号、同第2011/071860号、同第2009/132131号、同第2010/048536号、同第2010/088537号、同第2010/054401号、同第2010/054406号、同第2010/054405号、同第2010/054384号、同第2012/016184号、同第2009/086558号、同第2010/042877号、同第2011/000106号、同第2011/000107号、同第2005/120152号、同第2011/141705号、同第2013/126803号、同第2006/007712号、同第2011/038160号、同第2005/121348号、同第2011/066651号、同第2009/127060号、同第2011/141704号、同第2006/069782号、同第2012/031043号、同第2013/006825号、同第2013/033563号、同第2013/089151号、同第2017/099823号、同第2015/095346号、及び同第2013/086354号、並びに米国特許公開第2016/0311759号、同第2015/0376115号、同第2016/0151284号、同第2017/0210697号、同第2015/0140070号、同第2013/0178541号、同第2013/0303587号、同第2015/0141678号、同第2015/0239926号、同第2016/0376224号、同第2017/0119904号、同第2012/0149894号、同第2015/0057373号、同第2013/0090372号、同第2013/0274523号、同第2013/0274504号、同第2013/0274504号、同第2009/0023673号、同第2012/0128760号、同第2010/0324120号、同第2014/0200257号、同第2015/0203446号、同第2018/0005363号、同第2014/0308304号、同第2013/0338210号、同第2012/0101148号、同第2012/0027796号、同第2012/0058144号、同第2013/0323269号、同第2011/0117125号、同第2011/0256175号、同第2012/0202871号、同第2011/0076335号、同第2006/0083780号、同第2013/0123338号、同第2015/0064242号、同第2006/0051405号、同第2013/0065939号、同第2006/0008910号、同第2003/0022649号、同第2010/0130588号、同第2013/0116307号、同第2010/0062967号、同第2013/0202684号、同第2014/0141070号、同第2014/0255472号、同第2014/0039032号、同第2018/0028664号、同第2016/0317458号、及び同第2013/0195920号に記載されており、これら全ての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

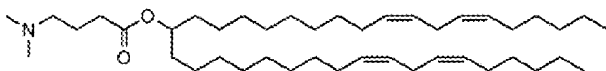
40

【0428】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、以下の構造を有するMC3（6Z，9Z，28Z，31Z）-ヘプタトリアコンター6，9，28，31-テトラエン-19-イル-4-（ジメチルアミノ）ブタン酸（DLin-MC3-DMA又はMC3）である：

【0429】

【化1】



DLin-MC3-DMA ("MC3")

。

【0430】

脂質DLin-MC3-DMAは、Jayaraman et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. (2012), 51(34):8529-8533

50

（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される。

【0431】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、国際公開第2015/074085号（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される、脂質ATX-002である。

【0432】

いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、国際公開第2012/040184号（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている（13Z, 16Z）-N, N-ジメチル-3-ノニルドコサ-13, 16-ジエン-1-アミン（化合物32）である。

【0433】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、国際公開第2015/199952号（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている化合物6又は化合物22である。

【0434】

限定なく、イオン化脂質は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の20~90%（mol）を含み得る。例えば、イオン化脂質モル含有量は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の20~70%（mol）、30~60%（mol）、又は40~50%（mol）であり得る。いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の約50mol%~約90mol%を含む。

【0435】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、非カチオン性脂質を更に含み得る。非イオン性脂質としては、両親媒性脂質、中性脂質、及びアニオン性脂質が挙げられる。したがって、非カチオン性脂質は、中性の非電荷、双性イオン性、又はアニオン性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、典型的に、膜融合性を増強するために用いられる。

【0436】

本明細書に開示される方法及び組成物での使用が想定される例示的な非カチオン性脂質は、2018年9月7日に出願された国際出願第US2018/050042号、及び2018年12月6日に出願された同第US2018/064242号に記載されている。例示的な非カチオン性脂質は、国際公開第2017/099823号及び米国特許公開第2018/0028664号に記載されており、これら両方の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0437】

非カチオン性脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の0~30%（mol）を構成し得る。例えば、非カチオン性脂質含有量は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の5~20%（mol）又は10~15%（mol）である。様々な実施形態では、イオン化脂質対中性脂質のモル比は、約2:1~約8:1の範囲である。

【0438】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、リン脂質を全く含まない。いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、膜統合性を提供するために、ステロールなどの構成成分を更に含み得る。

【0439】

脂質ナノ粒子中で使用され得る1つの例示的なステロールは、コレステロール及びその誘導体である。例示的なコレステロール誘導体は、国際公開第2009/127060号及び米国特許出願公開第2010/0130588号に記載されており、これら両方の内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0440】

ステロールなどの膜統合性を提供する構成成分は、脂質ナノ粒子に存在する全脂質の0~50%（mol）を構成し得る。いくつかの実施形態では、そのような構成成分は、脂質ナノ粒子の全脂質含有量の20~50%（mol）、30~40%（mol）である。

10

20

30

40

50

【0441】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（PEG）又はコンジュゲートした脂質分子を更に含み得る。一般に、これらを使用して、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、かつ／又は立体安定化を提供する。例示的な複合脂質としては、PEG-脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート、ポリアミド-脂質コンジュゲート（ATTA-脂質コンジュゲートなど）、カチオン性-ポリマー脂質（CPL）コンジュゲート、及びそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、複合脂質分子は、PEG-脂質コンジュゲート、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）-複合脂質である。例示的なPEG-脂質コンジュゲートとしては、PEG-ジアシルグリセロール（DAG）（1-（モノメトキシ-ポリエチレングリコール）-2, 3-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）など）、PEG-ジアルキルオキシプロピル（DAA）、PEG-リン脂質、PEG-セラミド（Cer）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）、PEGコハク酸ジアシルグリセロール（PEG-S-DAG）（4-O-（2', 3'-ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル-1-O-（w-メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（PEG-S-DMG））、PEGジアルコキシプロピルカルバム、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000）-1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、又はそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。追加の例示的なPEG-脂質コンジュゲートは、例えば、米国特許第5, 885, 613号、同第6, 287, 591号、特許出願公開第2003/0077829号、同第2003/0077829号、同第2005/0175682号、同第2008/0020058号、同第2011/0117125号、同第2010/0130588号、同第2016/0376224号、及び同第2017/0119904号に記載されており、それら全ての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

【0442】

いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、特許出願公開第US2018/0028664号に定義されている化合物であり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、特許出願公開第US2015/0376115号又は同第2016/0376224号に開示されており、これら両方の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0443】

PEG-DAAコンジュゲートは、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル、PEG-ジミリスチルオキシプロピル、PEG-ジパルミチルオキシプロピル、又はPEG-ジステアリルオキシプロピルであり得る。PEG-脂質は、PEG-DMG、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステリルグリカミド、PEG-コレステロール（1-〔8'-（コレスト-5-エン-3〔ベータ〕-オキシ）カルボキシアミド-3', 6'-ジオキサオクタニル〕カルバモイル-〔オメガ〕-メチル-ポリ（エチレングリコール）、PEG-DMB（3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-〔オメガ〕-メチル-ポリ（エチレングリコール）エーテル）、及び1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-〔メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000〕のうちの1つ以上であり得る。いくつかの実施例では、PEG-脂質は、PEG-DMG、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-〔メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000〕からなる群から選択され得る。

40

【0444】

PEG以外の分子と複合した脂質は、PEG-脂質の代わりに使用することもできる。例えば、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート、ポリアミド-脂質コンジュゲート（ATTA-脂質コンジュゲート等）、及びカチオン性-ポリマー脂質（CPL）コンジュゲートを、PEG-脂質の代わりに、又はそれに加えて使用することができる。

50

例示的な複合脂質、すなわち、PEG-脂質、(POZ)-脂質コンジュゲート、ATT A-脂質コンジュゲート、及びカチオン性ポリマー-脂質は、国際特許出願公開第1996/010392号、同第1998/051278号、同第2002/087541号、同第2005/026372号、同第2008/147438号、同第2009/086558号、同第2012/000104号、同第2017/117528号、同第2017/099823号、同第2015/199952号、同第2017/004143号、同第2015/095346号、同第2012/000104号、同第2012/000104号、及び第2010/006282号、米国特許出願公開第2003/0077829号、同第2005/0175682号、同第2008/0020058号、同第2011/0117125号、同第2013/0303587号、同第2018/0028664号、同第2015/0376115号、同第2016/0376224号、同第2016/0317458号、同第2013/0303587号、同第2013/0303587号、及び同第2011/0123453号、並びに米国特許第5,885,613号、同第6,287,591号、同第6,320,017号、及び同第6,586,559号に記載されており、これら全ての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0445】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の化合物は、治療剤であり得る。治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。言い換えれば、治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。言い換えれば、治療剤は、所望の治療目的及び生物作用に従って選択され得る。例えば、LNP内のceDNAが、PKUを治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗PKU剤（例えば、化学療法剤、又は他のPKU療法（小分子又は抗体を含むが、これらに限定されない）であり得る。別の実施例では、ceDNAを含有するLNPが、感染症を治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗微生物剤（例えば、抗生物質又は抗ウイルス化合物）であり得る。更に別の実施例では、ceDNAを含有するLNPが、免疫疾患又は障害を治療するために有用である場合、追加の化合物は、免疫応答を調節する化合物（例えば、免疫抑制剤、免疫刺激性化合物、又は1つ以上の特定の免疫経路を調節する化合物）であり得る。いくつかの実施形態では、異なるタンパク質又は異なる化合物（治療薬など）をコードするceDNAなどの、異なる化合物を含有する異なる脂質ナノ粒子の異なるカクテルを、本開示の組成物及び方法で使用する事ができる。

20

30

【0446】

いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫調節剤である。例えば、追加の化合物は、免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫刺激剤である。本明細書では、産生された脂質ナノ粒子に封入された昆虫細胞、又は本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のための合成的に産生されたceDNAベクター、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物もまた提供される。

【0447】

いくつかの態様では、本開示は、1つ以上の薬学的賦形剤を更に含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、スクロース、トリス、トレハロース、及び／又はグリシンを更に含む。

40

【0448】

ceDNAベクターは、粒子の脂質部分と複合され得るか、又は脂質ナノ粒子の脂質位置に封入され得る。いくつかの実施形態では、ceDNAは、脂質ナノ粒子の脂質位置に完全に封入され得、それによって例えば水溶液中のヌクレアーゼによる分解からそれを保護する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のceDNAは、37℃で少なくとも約20、30、45、又は60分間のヌクレアーゼへの脂質ナノ粒子の曝露後に実質的に分解されない。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のceDNAは、37℃で少なくとも約30、45、若しくは60分、又は少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34

50

、若しくは36時間の血清中の粒子のインキュベーション後に実質的に分解されない。

【0449】

特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、対象、例えばヒトなどの哺乳動物に対して実質的に非毒性である。いくつかの態様では、脂質ナノ粒子製剤は、凍結乾燥粉末である。

【0450】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、少なくとも1つの脂質二層を有する固体コア粒子である。他の実施形態では、脂質ナノ粒子は、非二層構造、すなわち非ラメラ（すなわち、非二層）形態を有する。限定なく、非二層の形態には、例えば、三次元の管、ロッド、立方対称などが含まれ得る。例えば、脂質ナノ粒子の形態（ラメラ対非ラメラ）は、US 2010/0130588（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるCryo-TEM分析を使用して容易に評価され、特徴付けられ得る。

10

【0451】

いくつかの更なる実施形態では、非ラメラ形態を有する脂質ナノ粒子は、高電子密度である。いくつかの態様では、本開示は、単一ラメラ構造又は多ラメラ構造のいずれかである脂質ナノ粒子を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子及び／又は発泡ベース粒子を含む脂質ナノ粒子を提供する。

【0452】

脂質構成成分の組成物及び濃度を制御することによって、脂質コンジュゲートが脂質粒子外で交換する速度、順に脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御することができる。加えて、例えば、pH、温度、又はイオン強度を含む他の変数を使用して、脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を変化及び／又は制御することができる。脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御するために使用され得る他の方法は、本開示に基づいて当業者に明らかとなるであろう。脂質コンジュゲートの組成物及び濃度を制御することによって、脂質粒径を制御することも明らかとなるであろう。

20

【0453】

製剤化されたカチオン性脂質のpKaは、核酸の送達のためのLNPの有効性と関連させることができる（Jayaraman et al., Angewandte Chemie, International Edition (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al., Nature Biotechnology 28, 172-176 (2010)を参照されたい（これらはいずれも、参照によりその全体が組み込まれる）。pKaの好ましい範囲は、約5～約7である。カチオン性脂質のpKaは、2-(p-トルイジノ)-6-ナフタレンスルホン酸(TNS)の蛍光に基づくアッセイを使用し、脂質ナノ粒子中で決定され得る。

30

【0454】

VI.II. 使用の方法

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターはまた、関心対象の核酸配列（例えば、PAHタンパク質をコードする）を標的細胞（例えば、宿主細胞）に送達するための方法において使用され得る。この方法は、特にPAHタンパク質を、それを必要とする対象の細胞に送達するため、及びPKUを治療するための方法であり得る。本開示は、PAHタンパク質の発現の治療効果が生じるように、対象の細胞内のceDNAベクターにコードされるPAHタンパク質のインビボ発現を可能にする。これらの結果は、ceDNAベクター送達のインビボ及びインビトロ両方の形態で見られる。

40

【0455】

加えて、本開示は、当該PAHタンパク質をコードする本開示のceDNAベクターの複数回投与を含む、それを必要とする対象の細胞中のPAHタンパク質の送達のための方法を提供する。本開示のceDNAベクターは、カプシド化ウイルスベクターに対して典型的に観察されるような免疫応答を誘導しないため、そのような複数回投与戦略は、ceDNAベースの系においてより大きな成功を収めるであろう。ceDNAベクターは、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の副作用なしに、PAHタンパク質の十分な

50

レベルの遺伝子導入及び発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路には、網膜投与（例えば、網膜下注射、脈絡膜上注射又は硝子体内注射）、静脈内（例えば、リボソーム製剤で）、選択された器官への直接送達（例えば、肝臓、腎臓、胆嚢、前立腺、副腎、心臓、腸、肺、及び胃から選択されるいずれか1つ以上の組織）、筋肉内、及び他の親投与経路が含まれるが、これらに限定されない。所望される場合、投与経路を組み合わせることができる。

【0456】

本明細書に記載されるようなPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの送達は、発現されたPAHタンパク質の送達に限定されない。例えば、従来の方法で產生される（例えば、細胞ベースの產生方法（例えば、昆虫細胞產生方法）を使用して）又は合成的に產生された本明細書に記載されるceDNAベクターは、遺伝子療法の一部を提供するために提供される他の送達系とともに使用され得る。本開示に従ってceDNAベクターと組み合わせることができる系の1つの非限定的な例は、PAHタンパク質を発現するceDNAベクターの効果的な遺伝子発現のために1つ以上の補因子又は免疫抑制因子を別々に送達する系を含む。

【0457】

本開示はまた、治療有効量のceDNAベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、それを必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞又は組織）に導入することを含む、対象におけるPKUを治療する方法を提供する。ceDNAベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。選択されるceDNAベクターは、PKUを治療するために有用なPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む。特に、ceDNAベクターは、対象に導入されたときに、外因性DNA配列によってコードされる所望のPAHタンパク質の転写を指示することができる制御エレメントに作動可能に連結された所望のPAHタンパク質配列を含み得る。ceDNAベクターは、上記及び本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【0458】

本明細書に提供される組成物及びベクターを使用して、様々な目的のためにPAHタンパク質を送達することができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、研究目的のため、例えば、導入遺伝子を内包する体細胞トランスジェニック動物モデルを作成するため、例えば、PAHタンパク質産物の機能を研究するために使用されることが意図されるPAHタンパク質をコードする。別の実施例では、導入遺伝子は、PKUの動物モデルを作成するために使用されることが意図されるPAHタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、コードされるPAHタンパク質は、哺乳動物対象におけるPKU状態の治療又は予防に有用である。PAHタンパク質は、遺伝子の発現の低減、発現の欠失、又は機能不全に関連したPKUを治療するのに十分な量で患者に導入され得る（例えば、発現され得る）。

【0459】

原則として、発現カセットは、変異によって減少若しくは欠如しているPAHタンパク質をコードする、又は過剰発現が本開示の範囲内であるとみなされる場合に、治療効果をもたらす核酸又は任意の導入遺伝子を含み得る。好ましくは、挿入されていない細菌DNAは存在せず、好ましくは、本明細書に提供されるceDNA組成物中に細菌DNAは存在しない。

【0460】

ceDNAベクターは、1種のceDNAベクターに限定されない。そのようなものとして、別の態様では、異なるタンパク質、又は異なるプロモーター若しくはシス調節エレメントに作動可能に連結されるが同じPAHタンパク質を発現する複数のceDNAベクターは、標的細胞、組織、器官、又は対象に同時に又は順次に送達され得る。したがって、この戦略では、複数のタンパク質の遺伝子療法又は遺伝子送達を同時に行うことができる。PAHタンパク質の異なる部分を別々のceDNAベクターに分離することも可能であり（例えば、PAHタンパク質の機能に必要な異なるドメイン及び／又は補因子）、同

10

20

30

40

50

時に又は異なる時間に投与することができ、別々に調節可能であり得、それによって追加レベルのPAHタンパク質の発現の制御を付加する。送達はまだ、複数回、及び重要なことに、ウイルスカプシドの不在に起因する抗カプシド宿主免疫反応の欠失を仮定して、後に増加又は減少する用量で臨床状況において遺伝子療法のために実施され得る。カプシドが存在しないため、抗カプシド反応は起こらないと予想される。

【0461】

本開示はまた、治療有効量の本明細書に開示されるceDNAベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞又は組織）に導入することを含む、対象におけるPKUを治療する方法を提供する。ceDNAベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実装されるceDNAベクターは、PKUを治療するために有用な関心対象の核酸配列を含む。特に、ceDNAベクターは、対象に導入されたときに、外因性DNA配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、又はオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに作動可能に連結された所望の外因性DNA配列を含み得る。ceDNAベクターは、上記及び本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

10

【0462】

IX. PAHタンパク質産生のためのceDNAベクターの送達方法

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、様々な好適な方法によってインビトロ又はインビボで標的細胞に送達され得る。ceDNAベクターは、単独で適用又は注射され得る。ceDNAベクターは、トランスフェクション試薬又は他の物理的手段の助けなく細胞に送達され得る。代替的に、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、細胞へのDNAの進入を促進する任意の当該技術分野において既知のトランスフェクション試薬又は他の当該技術分野において既知の物理的手段、例えば、リボソーム、アルコール、高ポリリジン化合物、高アルギニン化合物、リン酸カルシウム、微小胞、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを使用して送達され得る。

20

【0463】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、様々な送達試薬を使用し、従来のAAVビリオンで形質導入することが通常は困難である細胞及び組織型を効率的に標的とし得る。

30

【0464】

本明細書に記載される技術の一態様は、PAHタンパク質を細胞に送達する方法に関する。典型的には、インビボ及びインビトロ方法では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書に開示される方法、並びに当該技術分野で既知の他の方法を使用して細胞に導入されてもよい。本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、好ましくは、生物学的に有効な量で細胞に投与される。ceDNAベクターがインビボで細胞に（例えば、対象に）投与される場合、ceDNAベクターの生物学的有効量は、標的細胞におけるPAHタンパク質の形質導入及び発現をもたらすのに十分な量である。

40

【0465】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの例示的な投与形態としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルを介した）、頬側（例えば、舌下）、膣、髄腔内、眼内、経皮、内皮内、子宮内（又は卵内）、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内〔骨格、横隔膜、及び／又は心筋への投与を含む〕、胸膜内、脳内、及び動脈内）が挙げられる。投与は、肝臓又は他の部位（例えば、いずれかの腎臓、胆嚢、前立腺、副腎、心臓、腸、肺、及び胃）への全身的又は直接的な送達であり得る。

【0466】

投与は、局所（例えば、気道表面を含む皮膚及び粘膜表面への、並びに経皮投与）、リ

50

ンパ内など、並びに直接組織又は器官注射（例えば、限定されないが、肝臓、また眼、骨格筋、心筋、横隔膜を含む筋肉、若しくは脳への）であり得る。

【0467】

c e D N A ベクターの投与は、肝臓及び／又はまた眼、脳、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。

【0468】

任意の所与の症例における最も好適な経路は、治療、改善、及び／又は予防される病態の性質及び重症度、並びに使用されている特定の c e D N A ベクターの性質に依存するであろう。追加的に、c e D N A は、単一のベクター又は複数の c e D N A ベクター（例えば、c e D N A カクテル）中に2つ以上の P A H タンパク質を投与することを可能にする。

10

【0469】

A. c e D N A ベクターの筋肉内投与

いくつかの実施形態では、対象における疾患を治療する方法は、治療有効量の P A H タンパク質をコードする c e D N A ベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（特に筋細胞又は組織）に導入することを含む。いくつかの実施形態では、P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、対象の筋組織に投与される。

【0470】

いくつかの実施形態では、c e D N A ベクターの投与は、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、又は眼の筋肉からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。

20

【0471】

本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの、本発明に従う骨格筋への投与としては、肢（例えば、上腕、下腕、上肢、及び／又は下肢）、腰、首、頭（例えば、舌）、咽頭、腹部、骨盤／会陰、及び／又は指の骨格筋への投与が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示される c e D N A ベクターは、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内、四肢灌流（任意選択的に、脚及び／若しくは腕の単離された四肢灌流、例えば、Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464 を参照）並びに／又は直接筋肉内注入によって骨格筋に送達され得る。特定の実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、対象（例えば、D M D などの筋ジストロフィーを有する対象）の肝臓、眼、四肢灌流、任意選択的に単離された四肢灌流（例えば、静脈内又は動脈内投与による）によって四肢（腕及び／又は脚）に投与される。実施形態では、本明細書に開示される c e D N A ベクターは、「流体力学的」技法を用いることなく投与され得る。

30

【0472】

例えば、従来のウイルスベクターの（例えば、網膜への）組織送達、血管系内の圧力を増加させ、ウイルスベクターが内皮細胞バリアと交差する能力を促進する流体力学的技法（例えば、大容量での静脈内／静脈内投与）によってしばしば強化される。特定の実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターは、大量注入及び／又は血管内圧の上昇（例えば、通常の収縮期圧よりも高い、例えば通常の収縮期血圧よりも血管内圧力の5%、10%、15%、20%、25%以下の増加）などの流体力学的技法の不在下で投与することができる。そのような方法は、浮腫、神経損傷、及び／又は区画症候群などの流体力学的技法に関連する副作用を低減又は回避することができる。

40

【0473】

更に、骨格筋に投与される、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む組成物は、四肢（例えば、上腕、下腕、上脚、及び／若しくは下肢）の骨格筋、背中、首、頭（例えば、舌）、胸部、腹部、骨盤／会陰、及び／又は指に投与することができる。好適な骨格筋には、小指外転筋（手の）、小趾外転筋（足の）、

50

母趾外転筋、第五中足骨外転筋 (abductor ossis metatarsi quinti)、短母指外転筋、長母指外転筋、短内転筋、母趾内転筋、長内転筋、大内転筋、母指内転筋、肘筋、前斜角筋、膝関節筋、上腕二頭筋、大腿二頭筋、上腕筋、腕橈骨筋、頰筋、烏口腕筋、皺眉筋、三角筋、口角下制筋、下唇下制筋、顎二腹筋、背側骨間筋 (手の)、背側骨間筋 (足の)、短橈側手根伸筋、長橈側手根伸筋、尺側手根伸筋、小指伸筋、指伸筋、短趾伸筋、長趾伸筋、短母趾伸筋、長母趾伸筋、示指伸筋、短母指伸筋、長母指伸筋、橈側手根屈筋、尺側手根屈筋、短小指屈筋 (手の)、短小趾屈筋 (足の)、短趾屈筋、長趾屈筋、深指屈筋、浅指屈筋、短母趾屈筋、長母趾屈筋、短母指屈筋、長母指屈筋、前頭筋、腓腹筋、オトガイ舌骨筋、大臀筋、中臀筋、小臀筋、薄筋、頸腸肋筋、腰腸肋筋、胸腸肋筋、腸骨筋 (iliacus)、下双子筋、下斜筋、下直筋、棘下筋、棘間筋、横突間筋 (intertransversi)、外側翼突筋、外直筋、広背筋、口角挙筋、上唇挙筋、上唇鼻翼挙筋、上眼瞼挙筋、肩甲挙筋、長回旋筋 (long rotators)、頭最長筋、頸最長筋、胸最長筋、頭長筋、頸長筋、虫様筋 (手の)、虫様筋 (足の)、咬筋、内側翼突筋、内直筋、中斜角筋、多裂筋、顎舌骨筋、下頭斜筋、上頭斜筋、外閉鎖筋、内閉鎖筋、後頭筋、肩甲舌骨筋、小指対立筋、母指対立筋、眼輪筋、口輪筋、掌側骨間筋、短掌筋、長掌筋、恥骨筋、大胸筋、小胸筋、短腓骨筋、長腓骨筋、第三腓骨筋、梨状筋、底側骨間筋、足底筋、広頸筋、膝窩筋、後斜角筋、方形回内筋、円回内筋、大腰筋、大腿方形筋、足底方形筋、前頭直筋、外側頭直筋、大後頭直筋、小後頭直筋、大腿直筋、大菱形筋、小菱形筋、笑筋、縫工筋、最小斜角筋、半膜様筋、頭半棘筋、頸半棘筋、胸半棘筋、半腱様筋、前鋸筋、短回旋筋 (short rotators)、ヒラメ筋、頭棘筋、頸棘筋、胸棘筋、頭板状筋、頸板状筋、胸鎖乳突筋、胸骨舌骨筋、胸骨甲状筋、茎突舌骨筋、鎖骨下筋、肩甲下筋、上双子筋、上斜筋、上直筋、回外筋、棘上筋、側頭筋、大腿筋膜張筋、大円筋、小円筋、胸部の筋、甲状舌骨筋、前脛骨筋、後脛骨筋、僧帽筋、上腕三頭筋、中間広筋、外側広筋、内側広筋、大頰骨筋及び小頰骨筋、並びに当該技術分野において既知の任意の他の好適な骨格筋が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0474】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの、横隔膜筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、及び／又は腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。いくつかの実施形態では、発現した導入遺伝子のceDNAベクターから標的組織への送達は、ceDNAベクターを含む合成デポーを送達することによって達成することもでき、ceDNAベクターを含むデポーは、骨格、平滑、心臓及び／若しくは横隔膜に移植されるか、又は筋肉組織は、本明細書に記載されるようなceDNAベクターを含むフィルム若しくは他のマトリックスと接触させることができる。そのような移植可能なマトリックス又は基質は、米国特許第7,201,898号 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0475】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの、心筋への投与には、左心房、右心房、左心室、右心室、及び／又は中隔への投与が含まれる。本明細書に記載されるceDNAベクターは、静脈内投与、大動脈内投与などの動脈内投与、直接心臓注射 (例えば、左心房、右心房、左心室、右心室への)、及び／又は冠動脈灌流によって心筋に送達され得る。

【0476】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの、平滑筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、及び／又は腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。一実施形態では、投与は、平滑筋内、その付近、及び／又はその上に存在する内皮細胞に対して行われ得る。平滑筋の非限定的な例には、眼の虹彩、肺の細気管支、喉頭筋 (声帯)、胃、食道、小腸及び大腸の筋肉層、胃腸管、尿管、膀胱の排尿筋、子宮筋層、陰茎、又は前立腺が含まれる。

【0477】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのce

DNAベクターは、骨格筋、横隔膜筋、及び／又は心筋に投与される。代表的な実施形態では、本開示によるceDNAベクターは、骨格筋、心臓筋及び／又は横隔膜筋の障害を治療及び／又は予防するために使用される。

【0478】

具体的には、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む組成物は、眼（例えば、外直筋、内直筋、上直筋、下直筋、上斜筋、下斜筋）、顔面筋（例えば、後頭前頭筋、側頭頭頂筋、鼻根筋、鼻筋、鼻中隔下制筋、眼輪筋、皺眉筋、眉毛下制筋、耳介筋、口輪筋、口角下制筋、笑筋、大頬骨筋、小頬骨筋、上唇挙筋、上唇鼻翼挙筋、下唇下制筋、口角挙筋、頬筋、オトガイ筋）又は舌筋（例えば、オトガイ舌筋、舌骨舌筋、小角舌筋、茎突舌筋、口蓋舌筋、上縦舌筋、下縦舌筋、垂直舌筋、及び横舌筋）の1つ以上の筋肉に送達され得ることが企図される。

10

【0479】

（i）筋肉内注射：

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む組成物は、対象における所定の筋肉、例えば、骨格筋（例えば、三角筋、外側広筋、背腹筋の腹側腹筋、又は幼児の場合は前外側大腿）の1つ以上の部位に針を使用して注射され得る。ceDNAを含む組成物は、筋細胞の他のサブタイプに導入することができる。筋細胞サブタイプの非限定的な例には、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、及び／又は横隔膜筋細胞が含まれる。

【0480】

筋肉内注射のための方法は当業者に知られており、したがって、本明細書では詳細に説明しない。

20

【0481】

いくつかの実施形態では、筋肉内注射を、エレクトロポレーション、送達圧力、又はトランスフェクション試薬の使用と組み合わせて、ceDNAベクターの細胞取り込みを増強することができる。

【0482】

（ii）トランスフェクション試薬

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、筋管又は筋肉組織へのベクターの取り込みを促進するための1つ以上のトランスフェクション試薬を含む組成物中で製剤化される。したがって、一実施形態では、本明細書に記載されている核酸は、本明細書の他の場所に記載されている方法を使用したトランスフェクションにより、筋細胞、筋管、又は筋組織に投与される。

30

【0483】

（iii）エレクトロポレーション

ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、ceDNAの細胞への侵入を促進するための担体の非存在下、又は生理学的に不活性な薬学的に許容される担体（すなわち、カプシド不含非ウイルス性ベクターの筋管への取り込みを改善又は増強しない担体）中で投与される。そのような実施形態では、カプシド不含非ウイルス性ベクターの取り込みは、細胞又は組織のエレクトロポレーションによって促進することができる。

40

【0484】

細胞膜は、細胞外への細胞質への通過に自然に抵抗する。この抵抗を一時的に低減するための1つの方法は「エレクトロポレーション」であり、電界を使用して、細胞に永続的な損傷を与えることなく、細胞に細孔を作成する。これらの細孔は、DNAベクター、医薬品、DNA、及び他の極性化合物が細胞の内部にアクセスできるように十分な大きさである。時間の経過とともに、細胞膜の孔が閉じ、細胞が再び不透過性になる。

【0485】

エレクトロポレーションは、例えば、外因性DNAを生細胞に導入するために、インビトロ及びインビボの両方の適用で使用する可以使用。インビトロ適用は、典型的には

50

、生細胞の試料を、例えば、DNAを含む組成物と混合する。次いで、細胞を平行板などの電極間に配置し、細胞／組成物混合物に電界を印加する。

【0486】

インビボエレクトロポレーションにはいくつかの方法があり、電極は、例えば、治療される細胞の領域の上にある表皮を把持するキャリパーなどの様々な構成で提供することができる。代替的に、針状電極を組織に挿入して、より深部に位置する細胞にアクセスすることもできる。いずれの場合でも、例えば、核酸を含む組成物が治療領域に注射された後、電極は、領域に電界を印加する。いくつかのエレクトロポレーション適用では、この電界は、約10～60ms持続期間の100～500V/cm程度の単一の方形波パルスを含む。そのようなパルスは、例えば、Genetronics, Inc. のBTX Divisionによって作製されたElectro Square Porator T820の既知のアプリケーションで生成されてもよい。

10

【0487】

典型的には、例えば、核酸の取り込みの成功は、筋肉が速やかに電氣的に刺激された場合、又は例えば筋肉への注射による組成物の投与直後にのみ起こる。

【0488】

ある特定の実施形態では、エレクトロポレーションは、電界のパルスを使用して、又は低電圧／長パルス治療計画を使用して（例えば、方形波パルスエレクトロポレーション系を使用して）達成される。パルス電界を生成することができる例示的なパルス発生器は、例えば、指数波形を生成することができるECM600、及び矩形波形を生成することができるElectro Square Porator (T820)を含み、いずれもGenetronics, Inc. (San Diego, Calif.)の部門であるBTXから入手可能である。方形波エレクトロポレーション系は、設定された電圧まで急速に上昇し、設定された時間（パルス長）にわたってそのレベルに留まり、その後すぐにゼロまで低下する制御された電気パルスを送達する。

20

【0489】

いくつかの実施形態では、局所麻酔剤は、例えば、本明細書に記載されるカプシド不含非ウイルス性ベクターを含む組成物の存在下で組織のエレクトロポレーションに関連し得る疼痛を軽減するために、治療部位への注射によって投与される。更に、当業者は、筋肉の線維症、壊死、又は炎症をもたらす過剰な組織損傷を最小化及び／又は防止する組成物の用量が選択されるべきであることを理解するであろう。

30

【0490】

(iv) 送達圧力

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの筋肉組織への送達は、大容量と四肢（例えば、腸骨動脈）に供給する動脈への迅速な注射との組み合わせを使用する送達圧力によって促進される。この投与方法は、典型的に筋肉が血管クランプの止血帯を使用して体循環から隔離されている間に、ceDNAベクターを含む組成物を肢血管系に注入することを含む様々な方法によって達成され得る。1つの方法において、組成物は、四肢の脈管構造を通して循環されて、細胞への管外遊出を可能にする。別の方法では、血管内流体力学的圧力を増加させて血管床を拡張し、筋肉細胞又は組織へのceDNAベクターの取り込みを増加させる。一実施形態では、ceDNA組成物は、動脈に投与される。

40

【0491】

(v) 脂質ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態では、筋肉内送達のために本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、本明細書の他の場所に記載されるリポソームを含む組成物中で製剤化される。

【0492】

(vi) 筋肉組織を標的とするceDNAベクターの全身投与

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのce

50

DNAベクターは、間接的送達投与を介して筋肉を標的とするように製剤化され、ceDNAは、肝臓とは対照的に筋肉に輸送される。したがって、本明細書に記載される技術は、例えば、全身投与による、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む組成物の筋肉組織への間接投与を包含する。そのような組成物は、局所的、静脈内（ボラス又は連続注入による）、細胞内注射、組織内注射、経口、吸入、腹腔内、皮下、腔内で投与することができ、必要に応じてぜん動手段によって、又は当業者による他の既知の手段によって送達することができる。薬剤は、必要に応じて、例えば静脈内注入によって全身投与することができる。

【0493】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの筋肉細胞／組織への取り込みは、ベクターを筋肉組織に優先的に向ける標的化剤又は部分を使用することによって増加する。したがって、いくつかの実施形態では、カプシド不含ceDNAベクターは、身体の他の細胞又は組織に存在するカプシド不含ceDNAベクターの量と比較して、筋肉組織に濃縮することができる。

【0494】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む組成物は、筋細胞への標的化部分を更に含む。他の実施形態では、発現された遺伝子産物は、作用が望まれる組織に特異的な標的化部分を含む。標的化部分は、細胞又は組織の細胞内、細胞表面、又は細胞外バイオマーカーを標的化、相互作用、連結、及び／又は結合することができる任意の分子又は分子の複合体を含み得る。バイオマーカーは、例えば、細胞プロテアーゼ、キナーゼ、タンパク質、細胞表面受容体、脂質、及び／又は脂肪酸を含み得る。標的化部分が、標的、相互作用、連結、及び／又は結合して、特定の疾患に関連する分子を含むことができるバイオマーカーの他の例。例えば、バイオマーカーは、上皮成長因子受容体及びトランスフェリン受容体などの、がん発生に関係する細胞表面受容体を含み得る。標的化部分には、合成化合物、天然化合物又は産物、高分子実体、生体工学分子（例えば、ポリペプチド、脂質、ポリヌクレオチド、抗体、抗体断片）、及び標的筋組織で発現する分子に結合する小実体（例えば、小分子、神経伝達物質、基質、リガンド、ホルモン、元素化合物）が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0495】

ある特定の実施形態では、標的化部分は、例えば、標的細胞の特定の所望の分子を自然に認識する受容体を含む、受容体分子を更に含み得る。そのような受容体分子には、標的分子との相互作用の特異性を高めるために修飾された受容体、受容体によって自然に認識されない所望の標的分子と相互作用するように修飾された受容体、及びそのような受容体の断片が含まれる（例えば、Skerra, 2000, J. Molecular Recognition, 13:167-187を参照されたい）。好ましい受容体は、ケモカイン受容体である。例示的なケモカイン受容体は、例えば、Lapidot et al, 2002, Exp Hematol, 30:973-81及びOnuffer et al, 2002, Trends Pharmacol Sci, 23:459-67に記載されている。

【0496】

他の実施形態では、追加の標的化部分は、例えば、トランスフェリン（Tf）リガンドなどの、標的細胞の特定の所望の受容体を自然に認識するリガンドを含むリガンド分子を含み得る。そのようなリガンド分子には、標的受容体との相互作用の特異性を高めるために修飾されたリガンド、リガンドによって自然に認識されない所望の受容体と相互作用するように修飾されたリガンド、及びそのようなリガンドの断片が含まれる。

【0497】

更に他の実施形態では、標的化部分は、アプタマーを含み得る。アプタマーは、標的細胞の所望の分子構造に特異的に結合するように選択されるオリゴヌクレオチドである。アプタマーは、典型的には、ファージディスプレイの親和性選択（インビトロ分子進化とし

10

20

30

40

50

ても知られている)と同様の親和性選択プロセスの産物である。このプロセスは、例えば、罹患した免疫原が結合している固体支持体を使用して親和性分離のいくつかのタンデム反復を実施し、続いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行って免疫原に結合した核酸を増幅することを含む。したがって、親和性分離の各ラウンドは、所望の免疫原に首尾よく結合する分子の核酸集団を濃縮する。このようにして、核酸のランダムなプールを「教育」して、標的分子に特異的に結合するアプタマーを得ることができる。アプタマーは、典型的にはRNAであるが、限定されないが、ペプチド核酸(PNA)及びホスホロチオエート核酸などのDNA又はその類似体又は誘導体であり得る。

【0498】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、カプシド不含非ウイルス性ベクター又は遺伝子産物が特定の組織に標的化されるように、例えば、集光ビームから放出される光分解性リガンド(すなわち、「ケージ化」リガンド)を含み得る。

【0499】

本明細書では、組成物が対象の1つ以上の筋肉の複数の部位に送達されることも企図される。すなわち、注入は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100の注射部位において行われ得る。そのような部位は、単一の筋肉の領域に広がることができるか、又は複数の筋肉に分散することができる。

【0500】

B. 非筋肉部位へのPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの投与

別の実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターが肝臓に投与される。ceDNAベクターはまた、角膜及び／又は視神経などの眼の異なる領域に投与されてもよい。ceDNAベクターはまた、脊髄、脳幹(延髄、脳橋)、中脳(視床下部、視床、視床上部、脳下垂体、黒質、松果体)、小脳、終脳(線条体、後頭葉、側頭葉、頭頂葉、及び前頭葉、皮質、基底核、海馬、及び扁桃体(portaamygdala)を含む大脳)、辺縁系、新皮質、線条体、大脳、並びに下丘中に導入されてもよい。ceDNAベクターは、脳脊髄液中に(例えば、腰椎穿刺によって)送達されてもよい。PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、更に、血液脳関門が攪乱された状況(例えば、脳腫瘍又は脳梗塞)において、CNSに血管内投与されてもよい。

【0501】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、当該技術分野において既知の任意の経路によって眼の所望の領域に投与され得、髄腔内、眼内、脳内、脳室内、静脈内(例えば、マンニトールなどの糖の存在下)、鼻腔内、耳内、眼内(例えば、硝子体内、網膜下、前房)、及び眼周囲(例えば、テノン下領域)送達、並びに運動ニューロンへの逆行性送達を伴う筋肉内送達を含むが、これらに限定されない。

【0502】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、CNS中の所望の領域又は区画への直接注射(例えば、定位的注射)によって、液体製剤中で投与される。他の実施形態では、ceDNAベクターは、所望の領域への局所適用によって、又はエアロゾル製剤の鼻腔内投与によって提供され得る。眼への投与は、液滴の局所適用によって行われてもよい。更なる代替として、ceDNAベクターは、固体の徐放性製剤として投与され得る(例えば、米国特許第7,201,898号を参照されたい)。更に追加の実施形態では、ceDNAベクターを、逆行性輸送に使用して、運動ニューロンが関与する疾患及び障害(例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄性筋萎縮症(SMA)など)を治療、改善、及び／又は予防することができる。例えば、ceDNA

10

20

30

40

50

ベクターは、筋組織に送達され得、そこからニューロン中に移動し得る。

【0503】

C. エクスビボ治療

いくつかの実施形態では、細胞を対象から除去し、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターをその中に導入した後、細胞を対象に戻す。エクスビボの治療のために対象から細胞を取り出し、続いて対象に戻す方法は、当該技術分野で既知である（例えば、米国特許第 5, 399, 346 号を参照、その開示は、その全体が本明細書に組み込まれる）。代替的に、c e D N A ベクターは、別の対象からの細胞中に、培養細胞中に、又は任意の他の好適な源からの細胞中に導入され、これらの細胞は、それを必要とする対象に投与される。

10

【0504】

本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターで形質導入された細胞は、好ましくは、薬学的担体と組み合わせて「治療有効量」で対象に投与される。当業者であれば、いくらかの利益が対象にもたらされる限り、治療効果が完全又は治療的である必要はないことを理解するであろう。

【0505】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、インビトロ、エクスビボ、又はインビボで細胞内で産生される、本明細書に記載される P A H タンパク質（導入遺伝子又は異種ヌクレオチド配列と呼ばれることもある）をコードすることができる。例えば、本明細書で論じられる治療方法における本明細書に記載される c e D N A ベクターの使用とは対照的に、いくつかの実施形態では、P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを培養した細胞に導入し、発現した P A H タンパク質を、例えば、抗体及び融合タンパク質の産生のために細胞から単離することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを含む培養細胞は、抗体又は融合タンパク質の商業的産生に使用することができ、例えば、抗体又は融合タンパク質の小規模又は大規模バイオ製造の細胞源として役立つ。代替実施形態では、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、小規模な産生を含む抗体又は融合タンパク質のインビボ産生並びに商業的な大規模 P A H タンパク質産生のために、宿主非ヒト対象の細胞に導入される。

20

30

【0506】

本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、獣医学及び医学の両方の用途で 사용할 ことができる。上記のエクスビボ遺伝子送達方法に好適な対象としては、鳥類（例えば、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、七面鳥、及びキジ）及び哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、及びウサギ類）が挙げられ、哺乳動物が好ましい。ヒト対象が最も好ましい。ヒト対象は、新生児、幼児、年少者、及び成人を含む。

【0507】

D. 用量範囲

本明細書では、本明細書に記載される P A H タンパク質をコードする c e D N A ベクターを含む有効量の組成物を対象に投与することを含む治療方法が提供される。当業者によって理解されるように、「有効量」という用語は、P K U の治療のための「治療有効量」での P A H タンパク質の発現をもたらす、投与された c e D N A 組成物の量を指す。

40

【0508】

インビボ及び／又はインビトロアッセイを任意選択的に用いて、使用のための最適投与量範囲を特定するのに助けることができる。製剤に用いられる正確な用量はまた、投与経路及び病態の重症度に依存し、当業者の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、例えば、インビトロ又は動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から推定され得る。

【0509】

50

本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の副作用なしに十分なレベルの遺伝子導入及び発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、「投与」セクションで上述されたもの、例えば選択された器官への直接送達（例えば、肝臓への門脈内送達）、経口、吸入（鼻腔内及び気管内送達を含む）、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、及び他の非経口投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与経路は、所望の場合、組み合わせることができる。

【0510】

特定の「治療効果」を達成するために必要な、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの量の用量は、核酸投与の経路、治療効果を達成するために必要な遺伝子又は R N A 発現のレベル、治療される特定の疾患又は障害、及び遺伝子、R N A 産物、又は得られる発現タンパク質の安定性を含むが、これらに限定されないいくつかの因子に基づいて変化するであろう。当業者は、前述の因子並びに当該技術分野において周知の他の因子に基づいて、特定疾患又は障害を有する患者を治療するための c e D N A ベクター用量範囲を容易に判定することができる。

【0511】

最適な治療反応を提供するように、投与量レジームを調整することができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、繰り返し投与することができ、例えば、数回用量が毎日投与され得るか、又は治療状況の急迫によって示されるように、用量を比例的に低減することができる。当業者は、オリゴヌクレオチドが細胞に投与されるか、又は対象に投与されるかにかかわらず、対象オリゴヌクレオチドの投与の適切な用量及びスケジュールを容易に判定することができるであろう。

【0512】

「治療有効量」は、臨床試験を通じて判定され得る比較的広い範囲内に含まれ、特定の用途に依存する（神経細胞は、極少量を必要とするが、全身注射は、多量を必要とする）であろう。例えば、ヒト対象の骨格筋又は心筋への直接インビボ注射の場合、治療有効量は、およそ約 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{g}$ の c e D N A ベクターとなるであろう。c e D N A ベクターを送達するためにエキソソーム又は微粒子が使用される場合、治療有効量は、経験的に判定され得るが、 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{g}$ のベクターを送達することが予想される。更に、治療有効量とは、疾患の1つ以上の症状の低減をもたらすが、著しいオフターゲット又は著しい有害副作用には至らない、対象に影響を与えるのに十分な量の導入遺伝子を発現する c e D N A ベクターの量である。一実施形態では、「治療有効量」は、P K U バイオマーカーの発現の統計的に有意な測定可能な変化又は所与の疾患症状の低減をもたらすのに十分である、発現した P A H タンパク質の量である。そのような有効量は、所与の c e D N A ベクター組成物についての臨床試験及び動物実験で評価することができる。

【0513】

薬学的に許容される賦形剤及び担体溶液の配合は、様々な治療計画において本明細書に記載される特定の組成物を使用するための好適な投与及び治療計画の開発と同様に、当業者に周知である。

【0514】

インビトロトランスフェクションの場合、細胞（ 1×10^6 細胞）に送達される本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの有効量は、およそ $0.1 \sim 100 \mu\text{g}$ の c e D N A ベクター、好ましくは $1 \sim 20 \mu\text{g}$ 、より好ましくは $1 \sim 15 \mu\text{g}$ 又は $8 \sim 10 \mu\text{g}$ となる。より大きな c e D N A ベクターは、より多い用量を必要とするであろう。エキソソーム又は微粒子が使用される場合、有効なインビトロ用量は、経験的に判定され得るが、一般に同量の c e D N A ベクターを送達することが意図される。

【0515】

P K U の治療のために、本明細書に開示される P A H タンパク質を発現する c e D N A ベクターの適切な投与量は、治療される特定のタイプの疾患、P A H タンパク質のタイプ

10

20

30

40

50

、P K U疾患の重症度及び経過、患者の病歴及び抗体に対する応答、並びに主治医の裁量に依存する。P A Hタンパク質をコードするc e D N Aベクターは、一度に又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。本明細書では、様々な時点にわたる単回投与又は複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない、様々な投与スケジュールが企図される。

【0516】

疾患のタイプ及び重症度に応じて、c e D N Aベクターは、コードされたP A Hタンパク質が、約0.3mg/kg～100mg/kg（例えば、15mg/kg～100mg/kg、又はその範囲内の任意の投与量）で発現される量で、1回以上の別々の投与、又は持続注入によって投与される。c e D N Aベクターの1つの典型的な1日用量は、上述の要因に応じて、約15mg/kg～100mg/kg以上の範囲でコードされたP A Hタンパク質の発現をもたらすのに十分である。c e D N Aベクターの1つの例示的な用量は、約10mg/kg～約50mg/kgの範囲の、本明細書に開示されるコードされたP A Hタンパク質の発現をもたらすのに十分な量である。したがって、約0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、3mg/kg、4.0mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、又は100mg/kg（又はそれらの任意の組み合わせ）でコードされたP A Hタンパク質の発現をもたらすのに十分な量のc e D N Aベクターの1回以上の用量を患者に投与することができる。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、50mg～2500mgの範囲の総用量について、コードされたP A Hタンパク質の発現をもたらすのに十分な量である。c e D N Aベクターの例示的な用量は、約50mg、約100mg、200mg、300mg、400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約720mg、約1000mg、約1050mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、約1400mg、約1500mg、約1600mg、約1700mg、約1800mg、約1900mg、約2000mg、約2050mg、約2100mg、約2200mg、約2300mg、約2400mg、又は約2500mg（又はそれらの任意の組み合わせ）でコードされたP A Hタンパク質の総発現をもたらすのに十分な量である。c e D N AベクターからのP A Hタンパク質の発現は、本明細書の調節スイッチによって、又は代替的に対象に投与される複数回用量のc e D N Aベクターによって慎重に制御され得るため、c e D N AベクターからのP A Hタンパク質の発現は、発現された抗体又は融合タンパク質の用量が断続的に、例えば、毎週、2週間毎、3週間毎、4週間毎、毎月、2ヶ月毎、3ヶ月毎、又は6ヶ月毎に投与され得るような方法で制御され得る。この治療法の進行は、従来の技法及びアッセイによってモニタリングされ得る。

【0517】

ある特定の実施形態では、c e D N Aベクターは、15mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kgの用量で、又は一定用量、例えば300mg、500mg、700mg、800mg以上で、コードされたP A Hタンパク質の発現をもたらすのに十分な量で投与される。いくつかの実施形態では、c e D N AベクターからのP A Hタンパク質の発現は、P A Hタンパク質が一定期間にわたって毎日、隔日、毎週、2週間毎、又は4週間毎に発現されるように制御される。いくつかの実施形態では、c e D N AベクターからのP A Hタンパク質の発現は、P A Hタンパク質が一定期間にわたって2週間毎又は4週間毎に発現されるように制御される。ある特定の実施形態では、期間は、6ヶ月、1年、18ヶ月、2年、5年、10年、15年、20年、又は患者の生涯である。

【0518】

治療は、単一用量又は複数用量の投与を必要とし得る。いくつかの実施形態では、2回以上の用量が対象に投与され得る。実際、c e D N Aベクターは、ウイルス性カプシドの不在に起因して、抗カプシド宿主免疫応答を誘起しないため、複数回用量が、必要に応じ

て投与され得る。そのようなものとして、当業者は、適切な用量数を判定することができる。投与される用量数は、例えば、およそ1～100、好ましくは2～20用量であり得る。

【0519】

任意の特定の理論に束縛されるものではないが、本開示によって記載されるceDNAベクターの投与によって誘起される典型的な抗ウイルス免疫反応の欠失（すなわち、カプシド構成成分の不在）は、複数の場合にPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを宿主に投与することが可能になる。いくつかの実施形態では、核酸（例えば、異種核酸）が対象に送達される場合の数は、2～10回の範囲内（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回）である。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、11回以上対象に送達される。

10

【0520】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの用量は、1暦日（例えば、24時間）当たり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターの用量は、2、3、4、5、6、又は7暦日当たり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの用量は、歴週（例えば、7暦日）当たり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターの用量は、2週間に1回（例えば、2暦週期間に1回）だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターの用量は、1暦月当たり1回（例えば、30暦日に1回）だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターの用量は、6暦月当たり1回だけ対象に投与される。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターの用量は、歴年（例えば、365日又は閏年では366日）当たり1回だけ対象に投与される。

20

【0521】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターの2回以上の投与（例えば、2、3、4回又はそれ以上の投与）を用いて、様々な間隔の期間にわたって（例えば、毎日、毎週、毎月、毎年など）、所望のレベルの遺伝子発現を達成することができる。

【0522】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターによってコードされる治療用PAHタンパク質は、それが対象において少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも5時間、少なくとも10時間、少なくとも12時間、少なくとも18時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月／1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも15年、少なくとも20年、少なくとも30年、少なくとも40年、少なくとも50年以上にわたって発現されるように、調節スイッチ、誘導性又は抑制性プロモーターによって調節され得る。一実施形態では、発現は、本明細書に記載されるceDNAベクターを所定の又は所望の間隔で繰り返し投与することによって達成することができる。代替的に、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、遺伝子編集系（例えば、CRISPR/Cas、TALEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼなど）の構成成分を更に含み、実質的に永久的な治療又は疾患の「治療」のためのPAHタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列の挿入を可能にし得る。遺伝子編集構成成分を含むそのようなceDNAベクターは、国際出願第US18/64242号に開示されており、限定されないが、PAHタンパク質をコードする核酸をアルブミン遺伝子又はCCR5遺伝子などのセーフハーバー領域に挿入するために、5'及び3'相同性アーム（例えば、配列番号151～154、又はそれに対して少なくとも40%、50%、60%、70%、又は80%の相同性を有する配列）を含み得る。例として、PAHタンパク質を発現するceDNAベクターは、PAH導入遺伝子をゲノムセーフハーバーに挿入するための少なくとも1つのゲノムセーフハーバー（GSH）特異的相

30

40

50

同性アームを含むことができ、2019年3月1日に出願された国際特許出願第US2019/020225号に開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0523】

治療の持続期間は、対象の臨床的進歩及び治療への応答性に依存する。継続的で比較的低い維持用量は、初回のより高い治療用量の後に企図される。

【0524】

E. 単位剤形

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む医薬組成物は、単位剤形で都合よく提示され得る。単位剤形は、典型的に、医薬組成物の1つ以上の投与経路に適合されるであろう。いくつかの実施形態では、単位剤形は、液滴が眼に直接投与されるように適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、噴霧器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、エアロゾル化器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、経口投与のため、頬側投与のため、又は舌下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内、又は皮下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、網膜下注射、脈絡膜上注射、又は硝子体内注射に適合される。

【0525】

いくつかの実施形態では、単位剤形は、髄腔内又は脳室内投与のために適合される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与のために製剤化される。単一剤形を産生するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量となるであろう。

【0526】

X. 治療方法

本明細書に記載される技術はまた、PAHタンパク質の発現のための開示されるceDNAベクターを作製するための方法、並びにそれを様々な方法（例えば、エクスピボ、エクサイチュ、インビトロ、及びインビボ適用、方法論、診断手順、並びに／又は遺伝子療法計画）で使用方法を実証する。

【0527】

一実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターから発現される発現された治療用PAHタンパク質は、疾患の治療に機能的である。好ましい実施形態では、治療用PAHタンパク質は、それが望まれない限り、免疫系反応を引き起こさない。

【0528】

治療有効量の、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞（例えば、筋細胞若しくは組織、又は他の罹患した細胞型）に導入することを含む、対象におけるPKUを治療する方法が、本明細書に提供される。ceDNAベクターは、担体の存在下で導入され得るが、そのような担体は必要とされない。実施されるceDNAベクターは、疾患を治療するために有用な、本明細書に記載されるPAHタンパク質をコードする核酸配列を含む。特に、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、対象に導入されたときに、外因性DNA配列によってコードされる所望のPAHタンパク質の転写を指示することができる制御エレメントに作動可能に連結された所望のPAHタンパク質DNA配列を含み得る。本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、上記及び本明細書の別の場所に提供される任意の好適な経路を介して投与され得る。

【0529】

本開示のceDNAベクターのうちの1つ以上を、1種以上の薬学的に許容される緩衝剤、希釈剤、又は賦形剤と一緒に含む、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現の

ための c e D N A ベクター組成物及び製剤が、本明細書に開示される。そのような組成物は、P K U の 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、又は改善するための、1 つ以上の診断的又は治療的キットに含まれ得る。一態様では、疾患、傷害、障害、外傷、又は機能不全は、ヒト疾患、傷害、障害、外傷、又は機能不全である。

【0530】

本明細書に記載される技術の別の態様は、診断的又は治療的に有効な量の本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを、それを必要とする対象に提供するための方法を提供し、この方法は、本明細書に開示されるある量の c e D N A ベクターを、それを必要とする対象の細胞、組織、又は器官に、c e D N A ベクターからの P A H タンパク質の発現を可能にするのに有効な時間にわたって提供し、それによって診断的又は治療的に有効な量の c e D N A ベクターによって発現された P A H タンパク質を対象に提供することを含む。更なる態様では、対象は、ヒトである。

10

【0531】

本明細書に記載される技術の別の態様は、対象における P K U、障害、機能不全、傷害、異常状態、又は外傷のうちの少なくとも 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、又は改善するための方法を提供する。全体的かつ一般的な意味において、この方法は、少なくとも P A H タンパク質の産生のための開示される c e D N A ベクターのうちの 1 つ以上を、それを必要とする対象に、対象の疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、又は外傷の 1 つ以上の症状を診断、予防、治療、又は改善するための量及び時間にわたって投与するステップを含む。そのような実施形態では、対象は、P A H タンパク質の有効性、又は代替的に、対象における P A H タンパク質若しくは P A H タンパク質の組織位置（細胞及び細胞内位置を含む）の検出について評価され得る。したがって、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、例えば、がん又は他の適応症の検出のためのインビボ診断ツールとして使用することができる。更なる態様では、対象は、ヒトである。

20

【0532】

別の態様は、P K U 又は疾患状態の 1 つ以上の症状を治療又は低減するためのツールとしての、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターの使用である。欠陥遺伝子が知られているいくつかの遺伝性疾患が存在し、典型的に、通常は一般に劣性的に遺伝される酵素の欠乏状態と、調節又は構造タンパク質に関与し得るが、典型的に常に優性的に遺伝されるとは限らない不均衡状態との 2 つのクラスに分類される。不均衡疾患状態の場合、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターを使用して、モデル系において P K U 状態を創り出すことができ、次いでこれを使用して、その疾患状態に対処する試みに使用することができる。したがって、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、遺伝子疾患の治療を可能にする。本明細書で使用される場合、P K U 状態は、疾患を引き起こす、又はそれをより重篤にする欠乏又は不均衡を部分的又は全体的に修繕することによって治療される。

30

【0533】

A. 宿主細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される P A H タンパク質の発現のための c e D N A ベクターは、P A H タンパク質導入遺伝子を対象の宿主細胞に送達する。いくつかの実施形態では、細胞は、光受容細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、R P E 細胞である。いくつかの実施形態では、対象の宿主細胞は、ヒト宿主細胞であり、例えば、血液細胞、幹細胞、造血細胞、C D 3 4 + 細胞、肝細胞、がん細胞、血管細胞、筋細胞、膵臓細胞、神経細胞、眼若しくは網膜細胞、上皮若しくは内皮細胞、樹状細胞、線維芽細胞、又は哺乳類起源の任意の他の細胞（無制限に、肝（すなわち、肝臓）細胞、肺細胞、心臓細胞、膵臓細胞、腸細胞、横隔膜細胞、腎（すなわち、腎臓）細胞、ニューロン細胞、血液細胞、骨髄細胞、若しくは遺伝子療法が企図される対象のいずれか 1 つ以上の選択された組織を含む）が挙げられる。一態様では、対象宿主細胞は、ヒト宿主細胞である

40

50

。

【0534】

本開示はまた、本明細書に記載されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを含む、上述のような組換え宿主細胞に関する。したがって、当業者には明らかであるように、目的に応じて複数の宿主細胞を使用することができる。構築物、又はドナー配列を含む本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを宿主細胞に導入して、ドナー配列が、前述のように染色体組み込み体として維持されるようにする。宿主細胞という用語は、複製中に生じる変異のために親細胞と同一ではない親細胞の任意の子孫を包含する。宿主細胞の選択は、ドナー配列及びその供給源に大きく依存する。

10

【0535】

宿主細胞はまた、哺乳類、昆虫、植物、又は真菌細胞などの真核生物であってもよい。一実施形態では、宿主細胞は、ヒト細胞（例えば、初代細胞、幹細胞、又は不死化細胞株）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターをエクスピボで投与され、次いで遺伝子療法事象の後に対象に送達され得る。宿主細胞は、任意の細胞型、例えば、体細胞又は幹細胞、人工多能性幹細胞、又は血液細胞、例えば、T細胞若しくはB細胞、又は骨髄細胞であり得る。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、同種細胞である。例えば、T細胞ゲノム操作は、がん免疫療法、HIV療法（例えば、CXCR4及びCCR5などの受容体ノックアウト）などの疾患調整、及び免疫不全療法に有用である。B細胞上のMHC受容体は、免疫療法の標的となり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾型宿主細胞、例えば、骨髄幹細胞、例えば、CD34⁺細胞、又は人工多能性幹細胞を、治療用タンパク質の発現のために患者に移植して戻すことができる。

20

【0536】

B. 遺伝子療法のための追加の疾患

一般に、上記の説明に従って本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを使用して、任意のPAHタンパク質を送達して、対象における異常なタンパク質発現又は遺伝子発現に関するPKUに関連する症状を治療、予防、又は改善することができる。

【0537】

いくつかの実施形態では、血液中の分泌及び循環のためのPAHタンパク質の産生のため、あるいはPKUを治療、改善、及び／又は予防するための他の組織への全身送達のために、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを使用して、PAHタンパク質を骨格筋、心筋、又は横隔膜筋に送達することができる。

30

【0538】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターを、任意の好適な手段によって、任意選択的に、ceDNAベクターを含む呼吸域粒子のエアロゾル懸濁液を投与する（これを対象が吸入する）ことによって、対象の肺に投与することができる。呼吸域粒子は、液体又は固体であり得る。ceDNAベクターを含む液体粒子のエアロゾルは、当業者に既知であるように、圧力駆動型エアロゾル噴霧器又は超音波噴霧器を用いるなど、任意の好適な手段によって産生され得る。例えば、米国特許第4,501,729号を参照されたい。ceDNAベクターを含む固体粒子のエアロゾルは、薬学分野において既知の技法によって、任意の固体粒子薬剤エアロゾル生成器を用いて同様に産生され得る。

40

【0539】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターは、CNS（例えば、脳、眼）の組織に投与することができる。

【0540】

本明細書に開示されるPAHタンパク質の発現のためのceDNAベクターで治療、改善、又は予防され得る眼障害としては、網膜、後視床路、及び視神経に關与する眼科障害

50

(例えば、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、及び他の網膜変性疾患、ブドウ膜炎、加齢性黄斑変性、緑内障)が挙げられる。多くの眼科疾患及び障害は、(1)血管新生、(2)炎症、及び(3)変性の3タイプの適応症の1つ以上に関連している。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるc e D N Aベクターは、抗血管新生因子、抗炎症因子、細胞の変性をせるか、細胞温存を促進するか、又は細胞増殖を促進する因子、及び前述のものの組み合わせを送達するために用いることができる。糖尿病性網膜症は、例えば、血管新生によって特徴付けられる。糖尿病性網膜症は、眼内(例えば、硝子体内)又は眼周囲(例えば、テノン嚢下領域内)のいずれかで1つ以上の抗血管新生抗体又は融合タンパク質を送達することによって治療され得る。本開示のc e D N Aベクターで治療、改善、又は予防され得る追加の眼疾患としては、地図状萎縮、血管性又は「滲出型」黄斑変性、P K U、レーバー先天黒内障(L C A)、アッシャー症候群、弾性線維性偽性黄色腫(P X E)、X連鎖性網膜色素変性(X L R P)、X連鎖性網膜分離症(X L R S)、全脈絡膜萎縮、レーバー遺伝性視神経萎縮症(L H O N)、色盲、錐体杆体変性、フックス角膜内皮変性症、糖尿病黄斑浮腫、並びに眼のがん及び腫瘍が挙げられる。

10

【0541】

いくつかの実施形態では、炎症性眼疾患又は障害(例えば、ブドウ膜炎)は、本明細書に開示されるP A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターによって治療、改善、又は予防され得る。1つ以上の抗炎症性抗体又は融合タンパク質は、本明細書に開示されるc e D N Aベクターの眼内(例えば、硝子体又は前眼房)投与によって発現され得る。

20

【0542】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるP A Hタンパク質の発現のためのc e D N Aベクターは、レポーターポリペプチドをコードする導入遺伝子(例えば、緑色蛍光タンパク質又はアルカリホスファターゼなどの酵素)に関連するP A Hタンパク質をコードすることができる。いくつかの実施形態では、実験又は診断の目的で有用なレポータータンパク質をコードする導入遺伝子は、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ(L a c Z)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質(G F P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(C A T)、ルシフェラーゼ、及び当該技術分野において周知の他のもののうちのいずれかから選択される。いくつかの態様では、レポーターポリペプチドに連結されたP A Hタンパク質を発現するc e D N Aベクターを、診断目的のために、並びに有効性を決定するため、又はそれらが投与される対象におけるc e D N Aベクターの活性のマーカーとして使用することができる。

30

【0543】

C. c e D N Aベクターを使用した良好な遺伝子発現の試験

当該技術分野で周知のアッセイを使用して、c e D N AベクターによるP A Hタンパク質の遺伝子送達の効率を試験することができ、インビトロ及びインビボの両方のモデルで実施され得る。c e D N AによるP A Hタンパク質の発現のレベルは、P A Hタンパク質のm R N A及びタンパク質レベルを測定することによって(例えば、逆転写P C R、ウェスタンブロット分析、及び酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A))当業者により評価され得る。一実施形態では、c e D N Aは、例えば、蛍光顕微鏡法又は発光プレートリーダーによりレポータータンパク質の発現を調べることによって、P A Hタンパク質の発現を評価するために使用できるレポータータンパク質を含む。インビボ適用の場合、タンパク質機能アッセイを使用して、所与のP A Hタンパク質の機能を試験して、遺伝子発現が成功したかどうかを判断することができる。当業者は、インビトロ又はインビボでc e D N Aベクターによって発現されたP A Hタンパク質の機能を測定するための最良の試験を決定することができるであろう。

40

【0544】

本明細書では、細胞又は対象におけるc e D N AベクターからのP A Hタンパク質の遺伝子発現の効果は、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも10ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも18ヶ月、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少な

50

くとも20年にわたって継続し得るか、又は永続的であり得ることが企図される。

【0545】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセット、発現構築物、又はceDNAベクター中のPAHタンパク質は、宿主細胞に対して最適化されたコドンであり得る。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」又は「コドン最適化」という用語は、関心対象の脊椎動物、例えばマウス又はヒト（例えば、ヒト化された）の細胞中の発現強化のために、少なくとも1つ、2つ以上、又は相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。典型的に、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、AptagenのGene Forge（登録商標）コドン最適化及びカスタム遺伝子合成プラットフォーム（Aptagen, Inc.）又は別の公的に入手可能なデータベースを使用して判定され得る。

10

【0546】

D. ceDNAベクターからのPAHタンパク質発現を評価することによる有効性の決定

本質的に、タンパク質発現を決定するための当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、ceDNAベクターからのPAHタンパク質の発現を分析することができる。そのような方法／アッセイの非限定的な例には、酵素結合免疫測定法（ELISA）、親和性ELISA、ELISPOT、連続希釈、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴分析、速度論的排除アッセイ、質量分析、ウェスタンブロット、免疫沈降、及びPCRが含まれる。

20

【0547】

インビボでのPAHタンパク質発現を評価する場合、分析のために生物学的試料を対象から取得することができる。例示的な生体試料には、生体液試料、体液試料、血液（全血を含む）、血清、血漿、尿、唾液、生検及び／又は組織試料などが含まれる。生体試料又は組織試料はまた、腫瘍生検、便、脊髄液、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、皮膚の外切片、呼吸器、腸管、尿生殖路、涙、唾液、母乳、細胞（血液細胞を含むがこれに限定されない）、腫瘍、臓器、及びインビトロ細胞培養成分の試料を含むがこれらに限定されない、個人から分離された組織又は体液の試料も指し得る。この用語はまた、上述の試料の混合物も含む。「試料」という用語は、未治療又は前治療済み（又は前処理済み）の生体試料も含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるアッセイ及び方法に使用される試料は、試験される対象から収集された血清試料を含む。

30

【0548】

E. 臨床パラメータによる発現されたPAHタンパク質の有効性の決定

PKUのためのceDNAベクターによって発現される所与のPAHタンパク質の有効性（すなわち、機能的発現）は、熟練した臨床医によって決定され得る。しかしながら、PKUの兆候又は症状のいずれか1つ又は全てが有益な方法で変更された場合、又は他の臨床的に許容される疾患の症状又はマーカーが、例えば、本明細書に記載される治療用PAHタンパク質をコードするceDNAベクターでの治療後に少なくとも10%向上又は改善された場合、その用語が本明細書において使用されるように、治療は「有効な治療」とみなされる。有効性はまた、PKUの安定化、又は医療介入の必要性（すなわち、疾患の進行が停止するか、少なくとも遅くなる）によって評価される個人の悪化の失敗によって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に既知であり、かつ／又は本明細書に記載される。治療は、個人又は動物（いくつかの非限定的な例としては、ヒト又は哺乳動物が挙げられる）における疾患の任意の治療を含み、以下：（1）PKUを阻害すること、例えば、PKUの進行の停止若しくは遅延させること、又は（2）PKUを緩和すること、例えば、PKU症状の軽減を引き起こすこと、及び（3）PKU疾患の発症の可能性を防止若しくは低減すること、又はPKUに関連する二次的疾患／障害（

40

50

例えば、関節リウマチによる手の変形、若しくはがん転移)を防止することを含む。疾患の治療のための有効量とは、それを必要とする哺乳動物に投与した場合、その用語が本明細書で定義されているように、その疾患に対して有効な治療をもたらすのに十分である量を意味する。薬剤の有効性は、PKU疾患に特有の物理的指標を評価することによって決定することができる。医師は、以下を含むPKUの臨床症状のうちのいずれか1つ以上を評価することができる。*(i) 通常の食事での血清フェニルアラニン(Ph e)レベルの低下。(Ph eの低下は、PKUの治療の開発における重要なバイオマーカーである)、(ii) 正常食でのPh e対チロシン代謝比の回復。(この経路は、神経伝達物質の産生に関与する)、及び／又は(iii) 血清中Ph eレベルの低下の評価。

【実施例】

【0549】

以下の実施例は、限定ではない例証によって提供される。本明細書に記載される野生型又は修飾型ITRのうちのいずれかからceDNAベクターを構築できること、及び以下の例示的な方法を使用して、そのようなceDNAベクターの活性を構築し、評価できることを当業者は理解するであろう。これらの方法は、ある特定のceDNAベクターを用いて例示されているが、それらは、説明に沿って任意のceDNAベクターに適用可能である。

【0550】

実施例1：昆虫細胞ベースの方法を使用してceDNAベクターを構築する

ポリヌクレオチド構築物テンプレートをを使用したceDNAベクターの産生は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際出願第US18/49996号の実施例1に記載される。例えば、本開示のceDNAベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、及び／又はceDNA-バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、Repの存在下、2つの対称ITR(ITRのうちの少なくとも1つが、野生型ITR配列に対して修飾されている)及び発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNAベクターを産生するように複合する。ceDNAベクター産生は、第1の、テンプレート骨格(例えば、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、ceDNA-バキュロウイルスゲノムなど)からのテンプレートの切除(「レスキュー」)、及び第2の、切除したceDNAベクターのRep媒介型複製の2つのステップを経る。

【0551】

ceDNA-バクミドの産生：

DH10Bacコンピテント細胞(MAX EFFICIENCY(登録商標)DH10Bac(商標)コンピテント細胞、Thermo Fisher)を、製造元の指示によるプロトコルに従って、試験プラスミド又は制御プラスミドのいずれかで形質転換した。DH10Bac細胞中のプラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えceDNA-バクミドを生成した。バクミド及びトランスポサゼプラスミドの形質転換体及び維持のために選択する抗生物質とともに、X-gal及びIPTGを含有する細菌寒天平板上のE. coli中の青白スクリーニングに基づいて(Φ80dlacZΔM15マーカーは、バクミドベクターからのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα-相補性を提供する)正の選択をスクリーニングすることによって、組換えバクミドを選択した。β-ガラクトシダーゼ指標遺伝子を妨害する転位によって引き起こされる白色コロニーを採取し、10mLの培地中で培養した。

【0552】

組換えceDNA-バクミドを、E. coliから単離し、FugeneHDを使用してSf9又はSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したSf9又はSf21昆虫細胞を、25℃のT25フラスコ中の50mLの培地で培養した。4日後、培養培地(P0ウイルスを含有する)を細胞から取り除き、0.45μmフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞又は細胞残屑

10

20

30

40

50

から分離した。

【0553】

任意選択的に、第1世代のバキュロウイルス(P0)を、ナイーブ Sf9 又は Sf21 昆虫細胞を感染させることによって50~500 mLの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、130 rpm、25℃で維持し、細胞が(14~15 nmのナイーブ直径から)18~19 nmの直径に到達するまで、細胞直径及び生存率、並びに約4.0E+6細胞/mLの密度をモニタリングした。感染3日後~8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に採取し、細胞及び残屑を除去した後、0.45 µmフィルターで濾過した。

【0554】

試験構築物を含むceDNA-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性又は力価を決定した。具体的には、2.5E+6細胞/mLの4×20 mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、25~27℃でインキュベートした。感染性は、細胞直径増加の速度及び細胞周期停止、並びに細胞生存率の変化によって4~5日間にわたって毎日決定した。

【0555】

国際出願第US18/49996号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の図8Aに開示されている「Rep-プラスミド」を、Rep78(配列番号131又は133)及びRep52(配列番号132)又はRep68(配列番号130)及びRep40(配列番号129)の両方を含むpFASTBAC(商標)二重発現ベクター(ThermoFisher)において産生した。Rep-プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、DH10Bacコンピテント細胞(MAX EFFICIENCY(登録商標)DH10Bac(商標)コンピテント細胞(ThermoFisher)中に形質転換した。DH10Bac細胞中のRep-プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えバクミド(「Rep-バクミド」)を生成した。X-gal及びIPTGを含有する細菌寒天平板上のE.coli中の青白スクリーニング(Φ80dlacZΔM15マーカーは、バクミドベクターからのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα-相補性を提供する)を含む正の選択によって、組換えバクミドを選択した。単離された白色コロニーを採取し、10 mLの選択培地(LBブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン)中に播種した。組換えバクミド(Rep-バクミド)をE.coliから単離し、Rep-バクミドをSf9又はSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。

【0556】

Sf9又はSf21昆虫細胞を、50 mLの培地中で4日間培養し、感染性組換えバキュロウイルス(「Rep-バキュロウイルス」)を、培養物から単離した。任意選択的に、第1世代のRep-バキュロウイルス(P0)を、ナイーブ Sf9 又は Sf21 昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、50~500 mLの培地中で培養した。感染3日後~8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、又は濾過若しくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Rep-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を決定した。具体的には、2.5×10⁶細胞/mLの4×20 mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、インキュベーションした。感染性は、細胞直径増加の速度及び細胞周期停止、並びに細胞生存率の変化によって4~5日間にわたって毎日決定した。

【0557】

ceDNAベクター生成及び特徴付け

図3Bを参照して、次いで、(1)ceDNA-バクミドを含有する試料又はceDNA-バキュロウイルス、及び(2)上記のRep-バキュロウイルスのいずれかを含有するSf9昆虫細胞培養培地を、Sf9細胞(2.5E+6細胞/mL、20 mL)の新鮮

10

20

30

40

50

な培養物に、それぞれ1：1000及び1：10,000の比で添加した。次いで、細胞を25℃、130rpmで培養した。同時感染の4～5日後に、細胞の直径及び生存率が検出される。生存率が約70～80%で細胞直径が18～20nmに到達した場合、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地（水又は緩衝液のいずれか）に再懸濁する。ceDNAベクターを単離し、Qiagen MID I PLUS（商標）精製プロトコル（Qiagen、カラム当たり0.2mgの処理された細胞ペレット質量）を使用して、細胞から精製した。

【0558】

Sf9昆虫細胞から産生及び精製されるceDNAベクターの収率は、最初に、260nmでのUV吸光度に基づいて判定された。

【0559】

ceDNAベクターは、図3Dに例示されるような未変性条件又は変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって同定することによって評価することができ、(a)制限エンドヌクレアーゼ切断及びゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で2倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、並びに(b)未切断材料の変性ゲル上の単量体及び二量体(2×)バンドの存在は、ceDNAベクターの存在に特有である。

【0560】

単離されたceDNAベクターの構造を、共感染Sf9細胞から得られたDNA（本明細書に記載されるように）を、制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a) ceDNAベクター内の単一切断部位のみの存在、及びb) 0.8%変性アガロースゲル(>800bp)上で分画したときに明らかに見えるほど十分に大きい、得られる断片について更に分析した。図3D及び3Eに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状DNAベクター及び直鎖状で連続的な構造を有するceDNAベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するDNAベクターは、1kb及び2kb断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有する非カプシド化ベクターは、2kb及び4kb断片を産生することが期待される。

【0561】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたceDNAベクターが共有結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のDNAベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると同定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ（例えば、1000bp及び2000bp）の2つの切断産物をもたらす。変性ゲル（2つの相補的DNA鎖を分離する）上の消化及び電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的閉鎖状DNAは、2つのDNA鎖が連結され、展開されて2倍の長さである場合（但し、一本鎖である）、1000bp及び2000bpのサイズで溶解するが、共有結合的閉鎖状DNA（すなわち、ceDNAベクター）は、2倍サイズ（2000bp及び4000bp）で溶解するであろう。更に、DNAベクターの単量体、二量体、及びn量体形態の消化は、多量体DNAベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片として全て溶解する（図3Dを参照されたい）。図4は、エンドヌクレアーゼで消化した(+)又は消化していない(-) ceDNAベクターの変性ゲル泳動例の例示的な写真である（ceDNA構築物1及び2についてはEcoRI、ceDNA構築物3及び4についてはBamHI、ceDNA構築物5及び6についてはSpeI、及びceDNA構築物7及び8についてはXhoI）構築物1～8は、国際出願第US18/49996号の実施例1に記載されている（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。アスタリスクで強調されたバンドのサイズを判定し、図の下に示した。

【0562】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲル及び変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるDNAベクターの特定のためのアッセイ」という語句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、ceDNAの閉端性を評価するためのアッセイを指す。1つのそのような例示的なアッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能である

10

20

30

40

50

ことを理解するであろう。およそ 1 / 3 倍及び 2 / 3 倍の DNA ベクター長の産物を生成するであろう目的の c e DNA ベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲル及び変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Q i a g e n P C R クリーンアップキット又は脱塩「スピンカラム」、例えば、G E H E A L T H C A R E I L U S T R A (商標) M I C R O S P I N (商標) G - 2 5 カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、i) DNA を適切な制限エンドヌクレアーゼで消化すること、2) 例えば、Q i a g e n P C R クリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、i i i) 10 倍変性溶液 (10 倍 = 0.5 M N a O H、10 m M E D T A) を添加し、10 倍色素を添加し、緩衝せず、10 倍変性溶液を、1 m M E D T A 及び 200 m M N a O H で以前にインキュベーションされた 0.8 ~ 1.0 % ゲル上で 4 倍に添加することによって調製された DNA ラダーと一緒に分析して、N a O H 濃度が、ゲル及びゲルボックス中で均一であり、1 倍変性溶液 (50 m M N a O H、1 m M E D T A) の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズ及び所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解するであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、1 倍 T B E 又は T A E 中で中和し、蒸留水又は 1 倍 S Y B R G o l d を含む 1 倍 T B E / T A E に移す。次いで、例えば、T h e r m o F i s h e r の S Y B R (登録商標) G o l d 核酸ゲル染料 (DMSO 中 10,000 倍濃縮物) 及び落射蛍光灯 (青色) 又は UV (312 nm) を用いてバンドを可視化することができる。

10

20

【0563】

生成された c e DNA ベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1 つの例示的な非限定的方法として、試料の全体 UV 吸光度に対する c e DNA プラスミドの寄与は、c e DNA ベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、UV 吸光度に基づいて、4 μ g の c e DNA ベクターをゲル上に充填し、c e DNA ベクター蛍光強度が、1 μ g であることが知られている 2 k b バンドに相当する場合、1 μ g の c e DNA ベクターが存在し、c e DNA ベクターは、全 UV 吸光材料の 25 % である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全 c e DNA ベクターが 8 k b であり、切除された比較バンドが 2 k b である場合、バンド強度は、全インプットの 25 % としてプロットされ、この場合、1.0 μ g のインプットに対して 0.25 μ g となる。c e DNA ベクタープラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、c e DNA ベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、c e DNA ベクターにより表される全インプットのパーセント、又は純度パーセントを決定することができる。

30

【0564】

比較目的のため、実施例 1 は、昆虫細胞ベースの方法及びポリヌクレオチド構築物テンプレートを使用する c e DNA ベクターの産生を記載し、また国際特許出願第 U S 18 / 49996 号 (参照により全体が本明細書に組み込まれる) の実施例 1 にも記載される。例えば、実施例 1 に従って本開示の c e DNA ベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、c e DNA プラスミド、c e DNA バクミド、及び / 又は c e DNA バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、R e p の存在下、2 つの対称 I T R (I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 I T R 配列に対して修飾されている) 及び発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、c e DNA ベクターを産生するように複合する。c e DNA ベクター産生は、第 1 の、テンプレート骨格 (例えば、c e DNA プラスミド、c e DNA バクミド、c e DNA バキュロウイルスゲノムなど) からのテンプレートの切除 (「レスキュー」)、及び第 2 の、切除した c e DNA ベクターの R e p 媒介型複製の 2 つのステップを経る。

40

【0565】

50

実施例 2：二本鎖 DNA 分子からの切除による合成 c e DNA 産生

c e DNA ベクターの合成産生は、2019 年 1 月 18 日に出願された国際出願第 US 19 / 14122 号（参照により全体が本明細書に組み込まれる）の実施例 2～6 に記載される。二本鎖 DNA 分子の切除を伴う合成方法を使用して c e DNA ベクターを産生する 1 つの例示的な方法。簡潔には、c e DNA ベクターは、二本鎖 DNA 構築物を使用して生成され得る。例えば、国際出願第 US 19 / 14122 号の図 7 A～8 E を参照されたい。いくつかの実施形態では、二本鎖 DNA 構築物は c e DNA プラスミドであり、例えば、2018 年 12 月 6 日に出願された国際特許出願第 US 2018 / 064242 号の図 6 を参照されたい）。

【0566】

いくつかの実施形態では、c e DNA ベクターを作製するための構築物は、本明細書に記載される調節スイッチを含む。

【0567】

例示の目的のため、実施例 2 は、この方法を使用して生成された例示的な閉端 DNA ベクターとして、c e DNA ベクターを産生することを説明する。しかしながら、この実施例では、ITR 及び発現カセット（例えば、異種核酸配列）を含む二本鎖ポリヌクレオチドの切除に続いて、本明細書に記載される遊離 3' 及び 5' 末端のライゲーションによって閉端 DNA ベクターを生成するインビトロ合成産生方法を例証するために c e DNA ベクターが例示されているが、当業者は、上で例証されるように、ドギーボーン DNA、ダンベル DNA などを含むが、これらに限定されない任意の所望の閉端 DNA ベクターが生成されるように、二本鎖 DNA ポリヌクレオチド分子を修飾できることを認識する。実施例 2 に記載される合成産生方法により産生され得る抗体又は融合タンパク質の産生のための例示的な c e DNA ベクターは、「III c e DNA ベクター全般」と題されたセクションで論じられている。c e DNA ベクターによって発現される例示的な抗体及び融合タンパク質は、「IIC c e DNA ベクターによって発現される例示的な抗体及び融合タンパク質」と題されたセクションに記載される。

【0568】

本方法は、(i) 二本鎖 DNA 構築物から発現カセットをコードする配列を切除することと、(ii) ITR のうちの 1 つ以上でヘアピン構造を形成することと、(iii) ライゲーションによって、例えば、T4 DNA リガーゼによって遊離 5' 及び 3' 末端を結合することと、を伴う。

【0569】

二本鎖 DNA 構築物は、5' から 3' への順に、第 1 の制限エンドヌクレアーゼ部位、上流 ITR、発現カセットと、下流 ITR、及び第 2 の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。次いで、二本鎖 DNA 構築物を 1 つ以上の制限エンドヌクレアーゼと接触させて、制限エンドヌクレアーゼ部位の両方で二本鎖切断を生成する。1 つのエンドヌクレアーゼが両方の部位を標的とすることも、制限部位が c e DNA ベクターテンプレート内に存在しない限り、各部位を異なるエンドヌクレアーゼによって標的とすることもできる。これにより、制限エンドヌクレアーゼ部位の間の配列が、残りの二本鎖 DNA 構築物から切除される（国際出願第 US 19 / 14122 号の図 9 を参照されたい）。ライゲーションすると、閉端 DNA ベクターが形成される。

【0570】

この方法で使用される ITR の一方又は両方は、野生型 ITR であり得る。修飾型 ITR が使用されてもよく、ここで修飾は、B 及び B' アーム並びに / 又は C 及び C' アームを形成する配列における野生型 ITR からの 1 つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、又は置換を含み得（例えば、国際出願第 US 19 / 14122 号の図 6～8 及び 10、図 11 B を参照されたい）、2 つ以上のヘアピンループ（例えば、国際出願第 US 19 / 14122 号の図 6～8、図 11 B を参照されたい）又は単一のヘアピンループ（例えば、国際出願第 US 19 / 14122 号の図 10 A～10 B、図 11 B を参照されたい）を有し得る。ヘアピンループ修飾型 ITR は、既存のオリゴの遺伝子修飾によって、又は新規の生物

学的合成及び／若しくは化学的合成によって生成され得る。

非限定的な例では、ITR-6左及び右（配列番号111及び112）は、AAV2の野生型ITRからのB-B'及びC-C'アームに40ヌクレオチドの欠失を含む。修飾型ITRに残っているヌクレオチドは、単一のヘアピン構造を形成すると予測される。構造を展開するGibbs自由エネルギーは、約-54.4 kcal/molである。機能的Rep結合部位又はTrs部位の任意の欠失を含む、ITRへの他の修飾を行うこともできる。

【0571】

実施例3：オリゴヌクレオチドの構築によるceDNAの産生

様々なオリゴヌクレオチドの集成を伴う合成方法を使用してceDNAベクターを産生する別の例示的な方法は、国際出願第US19/14122号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の実施例3に提供されており、ceDNAベクターは、5'オリゴヌクレオチド及び3'ITRオリゴヌクレオチドを合成し、ITRオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションすることによって産生される。国際出願第US19/14122号の図11Bは、5'ITRオリゴヌクレオチド及び3'ITRオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションする例示的な方法を示す。

10

【0572】

本明細書に開示されるように、ITRオリゴヌクレオチドは、WT-ITR（例えば、図2A、図2Cを参照されたい）、又は修飾型ITR（例えば、図2B及び図2Dを参照されたい）を含み得る。（例えば、国際出願第US19/14122号（その全体が本明細書に組み込まれる）の図6A、6B、7A、及び7Bも参照されたい）。例示的なITRオリゴヌクレオチドには、限定されないが、配列番号134～145が含まれる（例えば、国際出願第US19/14122号の表7を参照）。修飾型ITRは、B及びB'アーム並びに／又はC及びC'アームを形成する配列における野生型ITRからの1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、又は置換を含み得る。無細胞合成で使用される、本明細書に記載されるWT-ITR又はmod-ITRを含むITRオリゴヌクレオチドは、遺伝子修飾又は生物学的及び／若しくは化学的合成によって生成することができる。ITRオリゴヌクレオチドは、本明細書で論じられるように、対称又は非対称構成のWT-ITR又は修飾型ITR（mod-ITR）を含み得る。

20

【0573】

実施例4：一本鎖DNA分子によるceDNA産生

合成方法を使用してceDNAベクターを産生する別の例示的な方法は、全体の参照により本明細書に組み込まれる国際出願第US19/14122号の実施例4において提供され、センス発現カセット配列に隣接しアンチセンス発現カセットに隣接する2つのアンチセンスITRに共有結合的に結合される2つのセンスITRを含む一本鎖の直鎖状DNAを使用し、次いで、この一本鎖の直鎖状DNAの末端をライゲーションして、閉端一本鎖分子を形成する。非限定的な一例は、一本鎖DNA分子を合成及び／又は産生し、分子の一部をアニーリングして、二次構造の1つ以上の塩基対合領域を有する単一の直鎖状DNA分子を形成し、次いで遊離5'及び3'末端を互いにライゲーションして、閉鎖状一本鎖分子を形成する。

30

40

【0574】

ceDNAベクターの産生のための例示的な一本鎖DNA分子は、5'から3'に、センス第1のITR、センス発現カセット配列、センス第2のITR、アンチセンス第2のITR、アンチセンス発現カセット配列、及びアンチセンス第1のITRを含む。

【0575】

実施例4の例示的な方法で使用するための一本鎖DNA分子は、本明細書に記載される任意のDNA合成方法論、例えば、インビトロDNA合成によって形成され得るか、又はヌクレアーゼでDNA構築物（例えば、プラスミド）を切断し、得られたdsDNA断片を融解して、ssDNA断片を提供することによって提供され得る。

50

【0576】

アニーリングは、センス配列及びアンチセンス配列の対の計算された融解温度を下回って温度を下げることによって達成され得る。融解温度は、特定のヌクレオチド塩基含有量、及び使用している溶液の特性、例えば、塩濃度に依存する。任意の所与の配列及び溶液の組み合わせの融解温度は、当業者によって容易に計算される。

【0577】

アニーリングされた分子の遊離5'及び3'末端は、互いにライゲーションされるか、又はヘアピン分子にライゲーションされてceDNAベクターを形成することができる。好適な例示的ライゲーション方法論及びヘアピン分子は、実施例2及び3に記載される。

【0578】

実施例5：ceDNAの精製及び／又は産生の確認

例えば、実施例1に記載される昆虫細胞ベースの産生方法、又は実施例2～4に記載される合成産生方法を含む、本明細書に記載される方法によって産生されたDNAベクター産物のいずれも、例えば、熟練者に一般に知られている方法を使用して、不純物、未使用の構成成分、又は副産物を除去するために精製することができ、かつ／又は分析して、産生されたDNAベクター（この例では、ceDNAベクター）が所望の分子であることを確認することができる。DNAベクター、例えばceDNAの精製のための例示的な方法は、Qiagen Midi Plus精製プロトコル（Qiagen）を使用すること及び／又はゲル精製によるものである。

【0579】

以下は、ceDNAベクターの同一性を確認するための例示的な方法である。

【0580】

ceDNAベクターは、図3Dに例示されるような未変性条件又は変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって同定することによって評価することができ、（a）制限エンドヌクレアーゼ切断及びゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で2倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、並びに（b）未切断材料の変性ゲル上の単量体及び二量体（2x）バンドの存在は、ceDNAベクターの存在に特有である。

【0581】

単離されたceDNAベクターの構造を、精製されたDNAを、選択された制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a）ceDNAベクター内の単一切断部位のみの存在、及びb）0.8%変性アガロースゲル（>800bp）上で分画した場合に明らかに見えるほど十分に大きな、得られる断片について更に分析した。図3C及び3Dに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状DNAベクター及び直鎖状かつ連続的な構造を有するceDNAベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するDNAベクターは、1kb及び2kb断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有するceDNAベクターは、2kb及び4kb断片を産生することが期待される。

【0582】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたceDNAベクターが共有結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のDNAベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると同定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ（例えば、1000bp及び2000bp）の2つの切断産物をもたらす。変性ゲル（2つの相補的DNA鎖を分離する）上の消化及び電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的閉鎖状DNAは、2つのDNA鎖が連結され、展開されて2倍の長さである場合（但し、一本鎖である）、1000bp及び2000bpのサイズで溶解するが、共有結合的閉鎖状DNA（すなわち、ceDNAベクター）は、2倍サイズ（2000bp及び4000bp）で溶解するであろう。更に、DNAベクターの単量体、二量体、及びn量体形態の消化は、多量体DNAベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片として全て溶解する（図3Eを参照されたい）。

【0583】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲル及び変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるDNAベクターの特定のためのアッセイ」という語句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、ceDNAの閉端性を評価するためのアッセイを指す。1つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ1/3倍及び2/3倍のDNAベクター長の産物を生成するであろう目的のceDNAベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲル及び変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Qiagen PCRクリーンアップキット又は脱塩「スピンカラム」、例えば、GE HEALTHCARE ILUSTRA (商標) MICROSPIN (商標) G-25カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のための当該技術分野において既知のいくつかのオプションである。アッセイは、例えば、i) DNAを適切な制限エンドヌクレアーゼで消化すること、2) 例えば、Qiagen PCRクリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、iii) 10倍変性溶液(10倍=0.5M NaOH、10mM EDTA)を添加し、10倍色素を添加し、緩衝せず、10倍変性溶液を、1mM EDTA及び200mM NaOHで以前にインキュベーションされた0.8~1.0%ゲル上で4倍に添加することによって調製されたDNAラダーと一緒に分析して、NaOH濃度が、ゲル及びゲルボックス中で均一であり、1倍変性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズ及び所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解するであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、1倍TBE又はTAE中で中和し、蒸留水又は1倍SYBR Goldを含む1倍TBE/TAEに移す。次いで、例えば、Thermo FisherのSYBR (登録商標) Gold核酸ゲル染料(DMSO中10,000倍濃縮物)及び落射蛍光灯(青色)又はUV(312nm)を用いてバンドを可視化することができる。前述のゲルベースの方法は、ceDNAベクターをゲルバンドから単離し、それを復元できるようにすることによって、精製目的に適合させることができる。

10

20

生成されたceDNAベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1つの例示的な非限定的方法として、試料の全体UV吸光度に対するceDNA-プラスミドの寄与は、ceDNAベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、UV吸光度に基づいて、4µgのceDNAベクターをゲル上に充填し、ceDNAベクター蛍光強度が、1µgであることが知られている2kbバンドに相当する場合、1µgのceDNAベクターが存在し、ceDNAベクターは、全UV吸光材料の25%である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全ceDNAベクターが8kbであり、切除された比較バンドが2kbである場合、バンド強度は、全インプットの25%としてプロットされ、この場合、1.0µgのインプットに対して0.25µgとなる。ceDNAベクター-プラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ceDNAベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ceDNAベクターにより表される全インプットのパーセント、又は純度パーセントを決定することができる。

30

40

【0584】

実施例6：ceDNAのIV投与及び水力学的投与によるPAHeⁿu²マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学的修正を評価するための薬理試験

国際出願第US2020/022595号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)において、PAH欠損のマウスモデルであるPAHeⁿu²マウスを使用して、各々が野生型左ITR及び切断変異体右ITRを有し、ヒトPAHをコードする導入遺伝子領域を有する2つの異なるceDNAベクターが、流体力学的注射によって投与された場合、フェニルアラニンレベルを全身的に低下させることができる活性PAHを発現したことが以前に示されている。更に、国際出願第US2020/022595号は、ヒトPA

50

Hコドン最適化バージョン2（「Codop2」）に連結されたVDプロモーターを含有するceDNAの投与が、マウスPKUにおいて、早くも3日目に、血清中PHEレベルの低下をもたらし、血中フェニルアラニンレベルを修正するのに十分なPAH活性を示すことを実証した。

【0585】

ceDNAベクターを、実施例1及び5において上述したように調製及び精製した。

【0586】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH Codop2」）の核酸配列は、本明細書において配列番号192として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1：スパーサー__左-ITR__v2.1：VD__プロモーターセット（VD）：PmeI__部位：修飾型__最小__コンセンサス__コザック：hPAH__codop__ORF__v2：PacI__部位：WPRE__3pUTR：bGH／スパーサー：スパーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1（ceDNA412）。 10

【0587】

ヒトPAH cDNAを含むceDNA（コドン最適化なしでhPAH cDNAに連結されたceDNA VDプロモーター）の核酸配列は、本明細書において配列番号193として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1：スパーサー__左-ITR__v1：VD__プロモーターセット（VD）：PmeI__部位：コンセンサス__コザック：hPAH__cDNA__ORF__v3：PacI__部位：WPRE__3pUTR：bGH：スパーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1（ceDNA802）。 20

【0588】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA（ceDNA「hPAH-r5-s29」）の核酸配列は、本明細書において配列番号213として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1（ceDNA1530）。 30

【0589】

ceDNA PAHベクター（単独、いかなるLNP封入も含まない）の各々及び対照を、およそ4～6週齢の性別混合の年齢が一致したPAH^{enu2}マウスに投与した。裸のceDNAベクターを、0日目に、90～100ml/kgの用量体積で、外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射によって、ceDNA412及びceDNA802については動物1匹当たり0.5μg又は5μg（1群当たり5匹の動物）、ceDNA1530については動物1匹当たり0.5μg又は1μg（1群当たり5匹の動物）で投与した。21日目は最終時点であった。

【0590】

げっ歯類の肝臓に核酸を導入する周知の方法は、流体力学的尾静脈注射によるものである。この系では、封入されていない核酸を大量に加圧注射すると、細胞透過性が一過性に増加し、組織及び細胞に直接送達される。これは、マクロファージ送達など、宿主の免疫系の多くを迂回する実験的な機序を提供し、そのような活性の不在下で送達及び発現を観察する機会を提供する。 40

【0591】

研究設計を以下の表15に示す。

【0592】

【表 1 5】

表 1 5

群番号	群当たりの動物	遺伝子型	治療	用量レベル	投与量	治療レジメン、IV	終末時点
1	5	WT同腹仔	PBS	該当せず	90～100ml/kg (設定用量)	流体力学的IVにより 0日目に1回	21日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412 (TR)	0.5 μg			
4	5		ceDNA412 (TR)	5.0 μg			
5	5		ceDNA802 (BIIC)	5.0 μg			
6	5		ceDNA1530 (TR)	0.5 μg			
7	5		ceDNA1530 (TR)	1.0 μg			
8	5	WT同腹仔	ceDNA1274 LNP製剤1	5mg/kg	5ml/kg	IVにより 0日目に1回	21日目
9	5		ceDNA274 LNP製剤2				

N o . = 番号 I V = 静脈内、W T = 野生型、M U T = 変異体。

10

【0 5 9 3】

試験物品は、濃縮ストックで供給され、表示上 4℃で保管された。製剤はボルテックス又は遠心分離されなかった。群を、処置室の換気されたラックに接触床敷を備えた透明なポリカーボネートケージに収容した。餌、及び 2.5～3.0 の目標 pH に 1 N H C l で酸性化された濾過水道水が、動物に自由に提供された。

【0 5 9 4】

それぞれ表 1 6 A 及び 1 6 B のとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

【0 5 9 5】

【表 1 6 A】

表 1 6 A. 採血 (中間)

20

群 番号	全血試料採取時間	
	伏在静脈のみ (獣医スタッフの許可により眼窩)	
	血清 ^a	
1～9		絶食 －3、4、7、14日目
1、2、8、及び9	0日目 試験材料投与の6時間後(±5%)	
容量/分量	約150 μLの全血	約50 μLの全血
処理	1つのアリコート (Charles River)	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上－70℃で凍結	表示上－70℃で凍結

30

^a凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取した、MOV = 取得可能な最大容量

【0 5 9 6】

【表 1 6 B】

表 1 6 B. 終末血液及び組織の採取

群番号	試料採取時間	
	血清 ^a	肝臓
1～9	絶食: 21日目	
1、2、8、及び9		絶食: 21日目
容量/分量	MOV	臓器全体、分割
処理	2つのアリコート (Pure Honey)	組織片 2 × = 約50mg、計量せず個別に 瞬間凍結する (Pure Honey)
保存	表示上－70℃で凍結	表示上－70℃で凍結

40

^a凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取した、MOV = 取得可能な最大容量

【0 5 9 7】

研究の詳細を以下のとおりに提供する。

種 (数、性別、年齢) : 40 匹 + 予備 2 匹 P A H^{enu2} 変異体 (M U T) マウス性別混合、約 5～10 週齢、到着時同齢)、5 匹野生型 (W T)、性別混合、同腹仔、同齢。

50

動物は、投与開始時に約10～14週であった。

【0598】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0599】

化合物のクラス：組換えDNAベクター、ceDNA

【0600】

体重：全ての動物の体重を、該当する場合、-3、0、1、2、4、7、14、及び21日目（安楽死前）に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。

【0601】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給される。ストックは使用直前にPBSで希釈される。投与がすぐに行われない場合は、調製された材料は約4℃（又は湿った氷上）で保存される。

【0602】

用量投与：群1～7の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100ml/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。群8及び群9は、0日目に、流体力学的IV投与によって、動物1匹当たり5ml/kgの設定体積で投与した。

【0603】

採血及び剖検前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての採血及び剖検の前：-3、4、7、14、21、及び21日目に最低4時間絶食した。動物は、0日目に絶食させない。

【0604】

中間採血：群1、2、8、及び9のみの全ての動物が、0日目に中間採血される。試験材料投与の6時間後（±5%）。

【0605】

群1～9の全ての動物は、-3、-4、0、1、2、4、3、及び7、14、及び21日目に採血される。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取される。

【0606】

安楽死及び終末採血：21日目に、4時間の絶食後、動物をCO₂窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

【0607】

フェニルアラニン（PHE）レベル：血清試料をPure HoneyによってPHEレベルについて分析した。

【0608】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料をPure Honeyによって活性レベルについて分析した。

【0609】

結果

図5A～5Cに示されるように、コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクターceDNA412；hPAH__codop__ORF__v2）は、0.5μg及び5μgの流体力学的用量の両方で、ceDNA802（hPAH天然cDNA配列）よりも高い割合でフェニルアラニンレベル（「PHE μM」）を標的濃度未満に修正したが、ceDNA802は、PHE濃度を修正しなかった。21日間にわたる個々のマウスについての結果を示す。ceDNA1530は、コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNAベクターであり（ceDNA1530；hPAH-r5-s29）、3×HS-CRM8__SERP__エンハンサー、TTR-プロモーター-d5pUTR、及びMV M__イントロンを有する。図5D及び5Eに示されるように、ceDNA1530は、0.5μg用量でPHE濃度を修正するのに有効ではなかったが、1μg用量で標的PHEレベルに達した。

【0610】

実施例 7：自己調節性変異体 *ceDNA* 1274 の *ceDNA* 試験の流体力学的投与による *PAH^{enu2}* マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学修正を評価するための薬理試験

ceDNA ベクターを、実施例 1 及び 5 において上述したように調製及び精製した。

【0611】

コドン最適化ヒト *PAH* バージョン 2 を含む *ceDNA* (*ceDNA*「*hPAH Codop2*」) の核酸配列は、本明細書において配列番号 192 として示され、以下のエレメントを含む：左-*ITR*__*v1*：スパーサー__左-*ITR*__*v2*. 1：*VD*__プロモーターセット (*VD*)：*PmeI*__部位：修飾型__最小__コンセンサス__コザック：*hPAH Codop ORF v2*：*PacI*__部位：*WPRE*__3*pUTR*：*bGH*/スパーサー：スパーサー__右-*ITR*__*v1*：右-*ITR*__*v1* (*ceDNA* 412)。

10

【0612】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト *PAH* バージョン 2 を含む *ceDNA* (*ceDNA*「*hPAH Codop2*」) の核酸配列は、本明細書において配列番号 194 として示され、以下のエレメントを含む：左-*ITR*__*v1*、スパーサー__左-*ITR*__*v2*. 1、3×*SerpEnh-TTRe-TTRm*、*MVM*__イントロン、*PmeI*__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、*hPAH Codop ORF v2*、*PacI*__部位、*WPRE*__3*pUTR*、*bGH*、スパーサー__右-*ITR*__*v1*、右-*ITR*__*v1* (*ceDNA* 1132)。

20

【0613】

29 アミノ酸欠失を有し、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト *PAH* バージョン 2 を含む *ceDNA* (*ceDNA*「*hPAH Codop2*」) の核酸配列は、本明細書において配列番号 195 として示され、以下のエレメントを含む：左-*ITR*__*v1*、スパーサー__左-*ITR*__*v2*. 1、*VD*__プロモーターセット、*PmeI*__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、*hPAH Codop ORF v2 Δ1-29aa*、*PacI*__部位、*WPRE*__3*pUTR*、*bGH*、スパーサー__右-*ITR*__*v1*、右-*ITR*__*v1* (*ceDNA* 1274)。

【0614】

特定のシス調節エレメントを有する *ceDNA* コドン最適化ヒト *PAH* バージョン 2 (*ceDNA*「*hPAH Codop ORF v2*」) の核酸配列は、本明細書において配列番号 210 として示され、以下のエレメントを含む：左-*ITR*__*v1*、スパーサー__左-*ITR*__*v2*. 1、3×*VanD-TTRe*__プロモーターセット__*v2*、*PmeI*__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、*hPAH Codop ORF v2*、*PacI*__部位、*WPRE*__3*pUTR*、*bGH*、スパーサー__右-*ITR*__*v1*、右-*ITR*__*v1* (*ceDNA* 1527)。

30

【0615】

ceDNA PAH ベクター (単独、いかなる *LNP* 封入も含まない) の各々及び対照を、およそ 4～6 週齢の性別混合の年齢が一致した *PAH^{enu2}* マウスに投与した。裸の *ceDNA* ベクターを、0 日目に、90～100 ml/kg の用量体積で、外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射によって、*ceDNA* 412、*ceDNA* 1132、及び *ceDNA* 1527 については動物 1 匹当たり 0.5 μg 又は 5 μg (1 群当たり 5 匹の動物)、*ceDNA* 1527 については動物 1 匹当たり 5 μg (1 群当たり 5 匹の動物) で投与した。28 日目は最終時点であった。研究設計を以下の表 17 に示す。

40

【0616】

【表 1 7】

表 1 7

群番号	動物数	遺伝子型	試験材料	用量レベル (μg)	投与量	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	WT	PBS	該当せず	90～100ml/kg (設定用量)	流体力学的 IVにより 0日目に1回	28日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412	0.5			
4	5		ceDNA412	5.0			
5	5		ceDNA1132	0.5			
6	5		ceDNA1132	5.0			
7	5		ceDNA1274	5.0			
8	5		ceDNA1527	0.5			
9	5		ceDNA1527	5.0			

10

N o . = 番号 I V = 静脈内、R O A = 投与経路、W T = 野生型、M U T = ホモ接合変異体、m i n = 分、h r = 時間

20

【0 6 1 7】

試験物品は、濃縮ストックで供給され、表示上4℃で保管された。製剤はボルテックス又は遠心分離されなかった。群を、処置室の換気されたラックに接触床敷を備えた透明なポリカーボネートケージに収容した。動物に、Mouse Diet 5058、及び2.5～3.0の目標pHに1N HClで酸性化された濾過水道水が、自由に提供された。

【0 6 1 8】

それぞれ表18A及び18Bのとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

【0 6 1 9】

【表 1 8 A】

30

表 1 8 A. 採血 (中間)

群 番号	全血試料採取時間
	伏在
	血清 ^a
1～9	絶食 －5、3、7、14、及び21日目
容量／分量	約50 μL の全血
処理	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上－70℃で凍結

40

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取する

【0 6 2 0】

50

【表 18 B】

表 18 B. 終末血液及び組織の採取

群 番号	試料採取時間
	終末全血 (心臓)
	血清 ^a
1～9	絶食 29日目
部分	MOV
処理／保存	1つのアリコートの処理された血漿 表示上－70℃で凍結

10

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取する

MOV = 取得可能な最大容量

【0621】

研究の詳細を以下のとおりに提供する。

種（数、性別、年齢）：40匹＋予備2匹PAHen u2変異体（MUT）マウス（性別混合、約5～10週齢、到着時同齢）、5匹野生型（WT）、性別混合、同腹仔、同齢。動物は、投与開始時に約10～14週であった。

【0622】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0623】

臨床観察：臨床観察は、0日目の試験材料投与の約1時間、約5～6時間、及び約24時間後に実施した。

【0624】

化合物のクラス：組換えDNAベクター：ceDNA。

【0625】

体重：全ての動物の体重を、－5、0、1、2、3、7、14、21、及び28日目（安楽死前）に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録することができる。

【0626】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属のPBSで希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料は、約4℃で保存され得る。

【0627】

用量投与：群1～9の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100mL/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。

【0628】

採血前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての中間及び終末採血の前：－5、3、7、14、21、及び28日目に最低4時間絶食した。

【0629】

餌を取り除き、床敷を交換した。8時間以下の絶食の間、各中間採血の終了時に餌を戻した。

【0630】

採血：群1～9の全ての動物を、－5、3、7、14、21日目に中間採血した。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取された。採取後、動物は、0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下投与された。

【0631】

採血：血清用の全血を伏在静脈から採取した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOP毎に1つの血清アリコートに処理された。全ての試料

50

を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上 -70°C で保存した。

【0632】

組織採取：終末組織を、瀕死の動物から採取し、予定された時点より前に安楽死させた。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を採取して保存した。

【0633】

安楽死：28日目に、最低4時間の絶食後、動物をCO₂窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

【0634】

終末血液：全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に採取され、施設のSOPに従って、2つのアリコートに血清に処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上 -70°C で保存した。

【0635】

フェニルアラニン (PHE) レベル：血清試料を Pure Honey によって PHE レベルについて分析した。

【0636】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料を Pure Honey によって活性レベルについて分析した。

【0637】

結果

図6の右パネルに示されるように、 $5\mu\text{g}$ で流体力学的に投与された場合、本研究において試験された全ての構築物 (ceDNA412、ceDNA1132、ceDNA1274、及びceDNA1527) は、研究の7日目まで、平均PHEレベル (PHE μM) を標的濃度未満 ($350\mu\text{M}$ 未満) に修正した。PHEレベルは、研究の14日目頃に再び上昇し始める。図6Aは、野生型マウス対照が、予想通り正常なPHEレベル (標的濃度未満) を有し、ビヒクルを投与されたPAHeⁿu² マウスが、やはり予想通り高レベルのPHEを有したことを示す。コドン最適化ヒトPAHバージョン2を有するceDNAベクターは、 $0.5\mu\text{g}$ の用量で標的修正に近いPHEレベルを修正したが、修正レベルは標的未満に達することはなかった。

【0638】

ceDNA1132は、インビボ研究において以前に調べられており、 $n=2/3$ の動物がPHE修正をもたらした (データは示さず)。ceDNA1132は、インビトロで良好に発現したので、 n を増やすために再度インビボで試験した。図7D及び7Eに示されるように、 $5\mu\text{g}$ の用量で、ceDNA1132及びceDNA1274群の5匹の動物全てが、7日目に標的濃度未満 ($350\mu\text{M}$ 未満) への修正されたPHEレベル (PHE μM) を示した。ceDNA412群及びceDNA1527群において、非応答者は1匹のみであった。図7A、7C、及び7Fにも示されるように、 $0.5\mu\text{g}$ の用量では、試験した構築物の間でPHE修正に識別可能な差はなかった。しかしながら、ceDNA1527は、一匹の非応答者を除外する場合、より強力であり得ると考えられる。まとめると、データは、本研究において試験した構築物の全てが、 $5\mu\text{g}$ で流体力学的に投与した場合、少なくとも7日目まで、平均PHEレベルを標的濃度未満に修正したことを示す。いくつかの群において、標的レベル未満の修正は、 $5\mu\text{g}$ で流体力学的に投与された場合、個々のマウスにおいて20日以上もの間維持された。

【0639】

実施例8：ceDNAの流体力学的投与によるPAHeⁿu² マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学的修正を評価するための薬理試験—PHE修正に対する異なるプロモーターの効果

ceDNAベクターを、実施例1及び5において上述したように調製及び精製した。

【0640】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH Codop2」) の核酸配列は、本明細書において配列番号192として示され、以下のエレ

10

20

30

40

50

メントを含む：左-ITR__v1：スペーサー__左-ITR__v2.1：VD__プロモーターセット（VD）：PmeI__部位：修飾型__最小__コンセンサス__コザック：hPAH__codop__ORF__v2：PacI__部位：WPRE__3pUTR：bGH／スペーサー：スペーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1（ceDNA412）。

【0641】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA（ceDNA「hPAH-r5-s29」）の核酸配列は、本明細書において配列番号196として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1（ceDNA1414）。

10

【0642】

特定のシス調節エレメントを有する、コドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA（ceDNA「hPAH-r5-s29」）の核酸配列は、本明細書において配列番号197として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1（ceDNA1416）。

20

【0643】

特定のシス調節エレメントを有するceDNAコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29（ceDNA「hPAH-r5-s29」）の核酸配列は、本明細書において配列番号198として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1（ceDNA1428）。

【0644】

特定のシス調節エレメントを有するceDNAコドン最適化ヒトPAHバージョン2（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、本明細書において配列番号211として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、CpGmin__hAAT__プロモーター__Set、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1 1（ceDNA1528）。

30

【0645】

ceDNA PAHベクター（単独、いかなるLNP封入も含まない）の各々及び対照を、およそ4～6週齢の性別混合の年齢が一致したPAHenu2マウスに投与した。裸のceDNAベクターを、0日目に、90～100ml/kgの用量体積で外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射により、動物1匹当たり0.5μg又は5μg（1群当たり5匹の動物）で投与した。28日目は最終時点であった。研究設計を以下の表19に示す。

40

【0646】

【表 19】

表 19

群番号	動物数	遺伝子型	試験材料	用量レベル (μg)	投与量	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	WT	PBS	該当せず	90~100ml/kg (設定用量)	流体力学的 IVにより 0日目に1回	28日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412	0.5			
4	5		ceDNA412	5.0			
5	5		ceDNA1414	0.5			
6	5		ceDNA1414	5.0			
7	5		ceDNA1416	0.5			
8	5		ceDNA1416	5.0			
9	5		ceDNA1428	0.5			
10	5		ceDNA1428	5.0			
11	5		ceDNA1528	0.5			
12	5		ceDNA1528	5.0			

10

20

N o . = 番号 I V = 静脈内、R O A = 投与経路、W T = 野生型、M U T = ホモ接合変異体、m i n = 分、h r = 時間

【0647】

それぞれ表 20A 及び 20B のとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

【0648】

【表 20A】

表 20A. 採血 (中間)

30

群 番号	全血試料採取時間
	伏在静脈のみ (獣医スタッフの許可により眼窩)
	血清 ^a
1~12	絶食 -3、4、7、14、及び21日目
容量/分量	約50 μL の全血
処理	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上 -70°C で凍結

40

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取する

表 20B. 終末血液及び組織の採取

【0649】

50

【表 20 B】

群 番号	試料採取時間
	終末全血 (心臓)
	血清 ^a
1～12	絶食 28日目
部分	MOV
処理／保存	1つのアリコートの処理された血漿 表示上－70℃で凍結

10

^a凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取する、MOV＝取得可能な最大容量
【0650】

研究の詳細を以下のとおりに提供する。

種（数、性別、年齢）：55匹＋予備2匹PAH^{enu2}変異体（MUT）マウス性別混合、約5～10週齢、到着時同齢）、5匹野生型（WT）、性別混合、同腹仔、同齢。動物は、投与開始時に約10～14週であった。

20

【0651】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0652】

臨床観察：臨床観察は、0日目の試験材料投与の約1時間、約5～6時間、及び約24時間後に実施した。

【0653】

化合物のクラス：組換えDNAベクター、ceDNA。

【0654】

体重：全ての動物の体重を、－5、0、1、2、3、7、14、21、及び29日目（安楽死前）に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録することができる。

30

【0655】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属のPBSで希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料は、約4℃で保存され得る。

【0656】

用量投与：群1～12の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100ml/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。

【0657】

採血前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての中間及び終末採血の前：－5、3、7、14、21、及び29日目に最低4時間絶食した。

40

【0658】

餌を取り除き、床敷を交換した。8時間以下の絶食の間、各中間採血の終了時に餌が戻される。

【0659】

採血：群1～12の全ての動物を、－5、3、7、14、21日目に中間採血する。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取される。採取後、動物は、0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下投与される。

【0660】

採血：血清用の全血を伏在静脈より採取した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血

50

清分離器に収集され、施設のSOP毎に1つの血清アリコートに処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上-70℃で保存する。

【0661】

組織採取：終末組織を、瀕死の動物から採取し、予定された時点より前に安楽死させた。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を採取して保存した。

【0662】

安楽死：29日目に、最低4時間の絶食後、動物をCO₂窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

【0663】

終末血液：全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に採取され、施設のSOPに従って、2つのアリコートの血清に処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上-70℃で保存した。

【0664】

フェニルアラニン（PHE）レベル：血清試料をPure HoneyによってPHEレベルについて分析した。

【0665】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料をPure Honeyによって活性レベルについて分析した。

【0666】

結果

本研究では、2つのコドン最適化ヒトPAH配列（コドン最適化ヒトPAHバージョン2及びコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29）を、異なるプロモーター又はシス調節エレメントの組み合わせと組み合わせて試験した。具体的には、以下の構築物を試験し、それらの各々は、プロモーター、コドン最適化配列、CpG含量（例えば、CpGmin）、イントロンなどの異なる組み合わせを有した。

【0667】

【表21】

表21.

ceDNA	構築物の特徴
ceDNA412	1×hSerpEnh(VD)_プロモーターセット hPAH_codop_ORF_v2
ceDNA1414	3×hSerpEnh(VanD)_TTRe_プロモーターセット hPAH-r5-s29::hIVS1B WPRE_3pUTR
ceDNA1416	3×hSerpEnh(VanD)_TTRe_プロモーターセット hPAH-r5-s29::hIVS1B_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA1428	3×hSerpEnh(VanD)_TTRe_プロモーターセット hPAH-r5-s29::mod-イントロン_oIVS-v2_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA1528	CpGmin_hAAT_プロモーター_セット hPAH_codop_ORF_v2

【0668】

図8A～8B、9A～9E、及び10A～10E、11A～11B、12A～12E、13A～13E、及び14A～14Eに示されるように、5μg用量で、ceDNA1416、ceDNA1428、及びceDNA1528群は、7日以内に、5匹中5匹のマウスにおいてPHEレベル（PHE μM）の標的濃度未満（350μM未満）への急性の修正を示したが、ceDNA1414群は示さなかった。図8A～8B及び9A～9Eに示されるように、0.5μg用量でのデータは、ceDNA1416及びceDNA1528がceDNA412よりも強力であり得ることを示唆する（7日後にceDNA412の場合の5匹中2匹マウスと比較して、5匹中4匹のマウスがPHEレベル（PHE μM）の標的濃度未満（350μM未満）への修正を示した）。このデータに基づいて、

C p G m i n __ h A A T __ プロモーター __ セットが、標準的な V D プロモーターよりも改善を示し得ると結論付けることが可能である。3 × V a n D __ T T R e も強力なプロモーターであるが、このデータセットにおける V a n D (V D) プロモーターとの比較には更なる実験が必要とされるであろう。

【 0 6 6 9 】

図 1 1 A ~ 1 1 B、1 2 A ~ 1 2 E、及び 1 3 A ~ 1 3 E に示されるように、c e D N A 4 1 2 群 (5 μ g 用量) におけるマウスの全て (5 匹中 5 匹) が、2 8 日間の試験期間全体にわたって、P H E レベル (P H E μ M) の標的濃度未満 (3 5 0 μ M 未満) への修正を示した。この結果は以前には見られておらず、遺伝子発現及び効力の驚くべき耐久性を示唆する。試験した他のコドン最適化構築物は、(5 μ g 用量で) 1 4 日後に予想された P h e 増加を示した。

10

【 0 6 7 0 】

最後に、コドン最適化ヒト P A H 配列を異なるプロモーター又はシス調節エレメントの組み合わせと組み合わせで試験する更なる研究を行った。具体的には、以下の構築物を試験し、それらの各々は、プロモーター、コドン最適化配列、C p G 含量 (例えば、C p G m i n)、イントロンなどの異なる組み合わせを有した。

【 0 6 7 1 】

【表 2 2】

表 2 2

ceDNA	構築物の特徴
ceDNA412	1 × V D __ プロモーターセット h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2
ceDNA1430	3 × h S e r p E n h (V a n D) __ T T R e __ プロモーターセット h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ m I V S - イントロン 1 B __ 33bp 隣接 W P R E __ 3pUTR
ceDNA1432	3 × h S e r p E n h (V a n D) __ T T R e __ プロモーターセット h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ 修飾 __ イントロン 1 __ 33bp 隣接 W P R E __ 3pUTR
ceDNA1473	5 × H N F 1 プロアルブミン Enh T T R プロモーター h P A H __ O R F __ c o d o p __ v 2
ceDNA1474	5 × H N F 1 プロアルブミン Enh 3 × V a n D - T T R e T T R プロモーター h P A H __ O R F __ c o d o p __ v 2
ceDNA1436	h A A T (979) __ プロモーターセット h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 W P R E __ 3pUTR
ceDNA1471	3 × H N F 1 - 4 プロアルブミン Enh T T R プロモーター h P A H __ O R F __ c o d o p __ v 2
ceDNA1472	3 × H N F 1 - 4 プロアルブミン Enh 3 × V a n D - T T R e T T R プロモーター h P A H __ O R F __ c o d o p __ v 2

20

30

【 0 6 7 2 】

全てのマウスに、5 μ g 用量を流体力学的に投与した。驚くべきことに、図 1 4 A ~ 1 4 I に示されるように、シス調節エレメントとコドン最適化配列との特定の組み合わせは、P H E レベル (P H E μ M) の標的濃度未満 (3 5 0 μ M 未満) への修正を示した。特に、プロモーターの組み合わせ 3 × H N F 1 - 4 | | プロアルブミン Enh | | T T R プロモーターを有する c e D N A 1 4 7 1 は、5 μ g 用量で P H E 濃度を目標値未満に低下させ、この研究において c e D N A 4 1 2 (V D __ プロモーターセット | | h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2) よりも高い効力を示す。

40

【 0 6 7 3 】

実施例 9 : c e D N A の流体力学的投与による P A H e ^{n u 2} マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学的修正を評価するための薬理試験 - P H E 修正に対する異なるプロモーター又はプロモーターセット及び異なる O R F の効果

c e D N A 構築物

この研究は、異なるプロモーター又はプロモーターセット (すなわち、h A A T プロモーター及び V D プロモーターセット) 及びコドン最適化 P A H 配列又は O R F (すなわち

50

、CpG最小化の有無でのヒトPAH cDNA及びヒトPAHバージョン2)を有するceDNAベクターを試験した。ceDNAベクターを、実施例1及び5において上述したように調製及び精製した。

【0674】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH Codop2」)の核酸配列は、本明細書において配列番号192として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1：スペーサー__左-ITR__v2.1：VD__プロモーターセット：PmeI__部位：修飾型__最小__コンセンサス__コザック：hPAH__codop__ORF__v2：PacI__部位：WPRE__3pUTR：bGH／スペーサー：スペーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1 (ceDNA412)。ceDNA412は、実施例9に記載される本研究において対照として機能した。

10

【0675】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2 ORF (hPAH__codop__ORF__v2)を、特定のキメライントロン (mIVS-イントロン1B)及びイントロン隣接領域 (33bp隣接)とともに含有するceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号546として示され、hAATプロモーターを、プロアルブミンエンハンサー並びに6コピーの肝臓核因子1及び4結合部位 (3×HNF1-4)と組み合わせて含む (ceDNA1476)。

【0676】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2 ORF (hPAH__codop__ORF__v2)を、特定のキメライントロン (mIVS-イントロン1B)及びイントロン隣接領域 (33bp隣接)とともに含有するceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号549として示され、hAATプロモーターを、プロアルブミンエンハンサー及び5コピーの肝臓核因子1結合部位HNF1 (5×HNF1)と組み合わせて含む (ceDNA1479)。

20

【0677】

コドン最適化ヒトPAH CpG最小化cDNAバージョン1 ORF (hPAH-cDNA__0CpG1__ORF)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号562として示され、VD__プロモーターセットを含む (ceDNA1939)。

【0678】

コドン最適化ヒトPAH CpG最小化cDNAバージョン2 ORF (hPAH-cDNA__0CpG2__ORF)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号563として示され、VD__プロモーターセットを含む (ceDNA1940)。

30

【0679】

コドン最適化ヒトPAH CpG最小化cDNAバージョン3 ORF (hPAH-cDNA__0CpG3__ORF)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号564として示され、VD__プロモーターセットを含む (ceDNA1941)。

【0680】

コドン最適化ヒトPAH CpG最小化cDNAバージョン4 ORF (hPAH-cDNA__0CpG4__ORF)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号565として示され、VD__プロモーターセットを含む (ceDNA1942)。

40

【0681】

CpG最小化を伴わないコドン最適化ヒトPAH cDNAバージョン1 ORF (hPAH-cDNA__1__ORF)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号566として示され、VD__プロモーターセットを含む (ceDNA1943)。

【0682】

CpG最小化を伴わない (CpG=99)コドン最適化ヒトPAH cDNAバージョン2 ORFを含むceDNA (hPAH-cDNA__2__ORF)の核酸配列は、本明細書において配列番号567として示され、VD__プロモーターセットを含む (ceDNA1944)。

50

【0683】

この研究で使用した、上述した c e D N A ベクターの特徴を、以下の表 2 3 に要約する。

【0684】

【表 2 3】

表 2 3．実施例 9 の研究における c e D N A ベクターの構築物の特徴

ceDNA	構築物の特徴
ceDNA412	1 × VD_プロモーターセット hPAH_codop_ORF_v2
ceDNA1476	3 × HNF1-4 プロアルブミンEnh hAATプロモーター hPAH_codop_ORF_v2_mIVS-イントロン1B_33bp隣接
ceDNA1479	5 × HNF1 プロアルブミンEnh hAATプロモーター hPAH_codop_ORF_v2_mIVS-イントロン1B_33bp隣接
ceDNA1939	1 × VD_プロモーターセット hPAH-cDNA_0CpG1_ORF
ceDNA1940	1 × VD_プロモーターセット hPAH-cDNA_0CpG2_ORF
ceDNA1941	1 × VD_プロモーターセット hPAH-cDNA_0CpG3_ORF
ceDNA1942	1 × VD_プロモーターセット hPAH-cDNA_0CpG4_ORF
ceDNA1943	1 × VD_プロモーターセット hPAH-cDNA_1_ORF
ceDNA1944	1 × VD_プロモーターセット hPAH-cDNA_2_ORF (CpG=99)

【0685】

研究設計

c e D N A P A H ベクター（単独、いかなる L N P 封入も含まない）の各々及び対照を、およそ 4 ～ 6 週齢の性別混合の年齢が一致した P A H e n u 2 マウスに投与した。裸の c e D N A ベクターを、0 日目に、90 ～ 100 m g / m L の用量体積で外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射により、動物 1 匹当たり 0 . 5 μ g （1 群当たり 5 匹の動物）で投与した。28 日目は最終時点であった。研究設計を以下の表 2 4 に示す。

【0686】

【表 2 4】

表 2 4．実施例 9 の研究における試験材料の投与

群番号	動物数	遺伝子型	試験材料	用量レベル (μg)	投与量	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	WT	PBS	該当せず	90～100ml/kg (設定用量)	流体力学的 IVにより 0日目に1回	28日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412	0.5			
4	5		ceDNA1476	0.5			
5	5		ceDNA1479	0.5			
6	5		ceDNA1939	0.5			
7	5		ceDNA1940	0.5			
8	5		ceDNA1941	0.5			
9	5		ceDNA1942	0.5			
10	5		ceDNA1943	0.5			
11	5		ceDNA1944	0.5			

N o . = 番号 I V = 静脈内、R O A = 投与経路、W T = 野生型、M U T = ホモ接合変異体、m i n = 分、h r = 時間

【0687】

それぞれ表25A及び25Bのとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

【0688】

【表25A】

表25A. (中間) 採血の実施例9研究

群 番号	全血試料採取時間
	伏在静脈のみ (獣医スタッフの許可により眼窩)
	血清 ^a
1～11	絶食 -3、4、7、14、及び21日目
容量/分量	約50 μ Lの全血
処理	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上-70°Cで凍結

10

20

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取した。

【0689】

【表25B】

表25B. 終末血液及び組織の採取

群 番号	試料採取時間
	終末全血 (心臓)
	血清 ^a
1～11	絶食 28日目
部分	MOV
処理/保存	1つのアリコートの処理された血漿 表示上-70°Cで凍結

30

^a 血餅アクチベーターを含む血清分離管に全血を収集した；MOV = 取得可能な最大容量

【0690】

研究の詳細

種(数、性別、年齢)：55匹+予備4匹PAHen^{u2}変異体(MUT)マウス性別混合、約6～8週齢、到着時同齢)、5匹野生型(WT)、性別混合、同腹仔、同齢。動物は、投与開始時に約7～9週であった。

【0691】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0692】

臨床観察：臨床観察は、0日目の試験材料投与の約1時間、約5～6時間、及び約24時間後に実施した。

【0693】

化合物のクラス：組換えDNAベクター、ceDNA。

40

50

【0694】

体重：全ての動物の体重を、－4、0、1、2、3、7、14、21、及び28日目（安楽死前）に記録した。

【0695】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属のPBSで希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料は、約4℃で保存され得る。

【0696】

用量投与：群1～12の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100ml/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。

10

【0697】

採血前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての中間及び終末採血の前：－4、3、7、14、21、及び28日目に最低4時間絶食した。

【0698】

餌を取り除き、床敷を交換した。8時間以下の絶食の間、各中間採血の終了時に餌を戻した。

【0699】

中間採血：群1～11の全ての動物を、－4、3、7、14、21日目に中間採血した。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取された。採取後、動物は0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下投与される。

20

【0700】

採血：血清用の全血を伏在静脈より採取した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOP毎に1つの血清アリコートに処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上－70℃で保存した。

【0701】

予定外の安楽死：終末組織を、瀕死の動物から採取し、予定された時点より前に安楽死させた。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を収集して保存した。

【0702】

安楽死：28日目に、4時間の絶食後、動物をCO₂窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

30

【0703】

終末血液：全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に採取され、施設のSOPに従って、2つのアリコートの血清に処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上－70℃で保存した。

【0704】

フェニルアラニン（PHE）レベル：血清試料をPure HoneyによってPHEレベルについて分析した。

【0705】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料をPure Honeyによって活性レベルについて分析した。

40

【0706】

結果

本研究は、2つのコドン最適化ヒトPAH配列（コドン最適化ヒトPAHバージョン2及びコドン最適化ヒトPAH cDNA（CpG最小化の有無で））を、異なるプロモーター又はシス調節エレメントの組み合わせと組み合わせて試験した。試験した各ceDNA構築物に含まれる特定のエレメントを表23に要約する。

【0707】

図15A～15Iに示されるように、0.5µg用量で、この研究で試験した全てのceDNAベクター（すなわち、ceDNA1476、ceDNA1939、及びceDNA

50

A 1 9 4 1) は、7日以内に、合計5匹のマウスのうち少なくとも1匹においてPHEレベル(PHE μ M)の標的濃度未満(350 μ M未満)への急性の修正を示したが、残りのceDNAベクターは示さなかった。注目すべきことに、ceDNA 1 4 7 6及びceDNA 1 9 3 9は、各々、合計5匹のマウスのうちの4匹が、標的濃度未満のPHEレベルの急性の修正を示した。ceDNA 1 4 7 9、ceDNA 1 9 4 0、及びceDNA 1 9 4 2は、各々、350 μ Mの閾値であったがそれ未満ではない単一のマウスに関連する単一の時点を有し、一方、ceDNA 1 4 7 9、ceDNA 1 9 4 2、ceDNA 1 9 4 3、及びceDNA 1 9 4 4は、350 μ M閾値に近い時点を有さなかった。

【0708】

ceDNA 1 4 7 6とceDNA 1 4 7 9との間の唯一の構造的差異は、後者が5コピーのHNF1結合部位(HNF1の各2コピー間に10merのスペーサーを有する)を含んでいるのに対して、ceDNA 1 4 7 6は、6コピーのHNF1とHNF4との組み合わせ(HNF1及びHNF4が交互に並んでいる)のみを含んでいることである。本発明者らは、HNF1とHNF4との組み合わせが、改善されたPHEレベル修正をもたらすことを見出した(図15Cと図15Bを比較されたい)。

【0709】

ceDNA 1 9 4 3、ceDNA 1 9 4 4及びceDNA 1 9 3 9、ceDNA 1 9 4 0、ceDNA 1 9 4 1、及びceDNA 1 9 4 2との間の差異は、ceDNA 1 9 4 3のオープンリーディングフレームであり、ceDNA 1 9 4 4は、CpG最小化に供されていない。ceDNA 1 9 4 3及びceDNA 1 9 4 4(図15H及び15I)と比較して、ceDNA 1 9 3 9、ceDNA 1 9 4 0、ceDNA 1 9 4 1、及びceDNA 1 9 4 2における改善されたPHEレベルの修正(図15D~15G)は、PAH発現に対するCpG最小化の重要性、したがって、PHEレベルの修正を示す。

【0710】

実施例8においてceDNA 1 4 7 1を用いて示された観察と同様に、ここで、実施例9において、プロモーターの組み合わせ3×HNF1-4||プロアルブミンEnh||TTRプロモーターを有するceDNA 1 4 7 6は、0.5 μ g用量で、PHE濃度を目標値未満に低下させ、この研究において対照ceDNA 4 1 2(1×VD__プロモーターセット||hPAH__codop__ORF__v2)よりも高い効力を示すことが示された。

【0711】

実施例10: ceDNAの流体力学的投与によるPAHe^{nu2}マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学的修正を評価するための薬理試験-PHE修正に対する異なるプロモーター又はプロモーターセット及びマウス又はヒト由来のPAHの効果

ceDNA構築物

この研究は、異なるプロモーター又はプロモーターセット(すなわち、hAATプロモーター及びVDプロモーターセット)及びマウス又はヒト由来のコドン最適化PAH配列又はORF(すなわち、マウスPAH__codop__ORF__v2又はhPAH__codop__ORF__v2)を有するceDNAベクターを試験した。ceDNAベクターを、実施例1及び5において上述したように調製及び精製した。

【0712】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA(ceDNA「hPAH Codop2」)の核酸配列は、本明細書において配列番号192として示され、以下のエレメントを含む: 左-ITR__v1: スペーサー__左-ITR__v2. 1: VD__プロモーターセット: PmeI__部位: 修飾型__最小__コンセンサス__コザック: hPAH__codop__ORF__v2: PacI__部位: WPRE__3pUTR: bGH/スペーサー: スペーサー__右-ITR__v1: 右-ITR__v1(ceDNA 4 1 2)。ceDNA 4 1 2は、実施例10に記載される本研究において対照として機能した。

【0713】

コドン最適化ヒトPAH CpG最小化cDNAバージョン1 ORF(hPAH-c

DNA__0CpG1__ORF)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号562として示され、VD__プロモーターセットを含む(ceDNA1939)。実施例9において先に研究されたceDNA1939もまた、実施例10に記載される本研究において対照として機能した。

【0714】

コドン最適化マウスPAHバージョン2 ORF (マウスPAH__codop__ORF__v2)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号568として示され、VD__プロモーターセットを含む(ceDNA1955)。

【0715】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2 ORF (hPAH__codop__ORF__v2)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号569として示され、ceDNA1476及びceDNA1479中に存在するエンハンサーを有するヒトAATプロモーターを含む(ceDNA62)。

【0716】

この研究で使用した、上述したceDNAベクターの特徴を、以下の表26に要約する。

【0717】

【表26】

表26. 実施例10の研究におけるceDNAベクターの構築物の特徴。

ceDNA	構築物の特徴
ceDNA412	VD__プロモーターセット hPAH__codop__ORF__v2
ceDNA1939	VD__プロモーターセット hPAH-cDNA__0CpG1__ORF
ceDNA1955	VD__プロモーターセット マウスPAH__codop__ORF__v2
ceDNA62	hAAT マウスPAH__codop__ORF__v2

【0718】

研究設計

ceDNA PAHベクター(単独、いかなるLNP封入も含まない)の各々及び対照を、およそ7~9週齢の性別混合の年齢が一致したPAHenu2マウスに投与した。裸のceDNAベクターを、0日目に、90~100mL/kgの用量体積で外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射により、動物1匹当たり0.5μg(1群当たり5匹の動物)で投与した。28日目は最終時点であった。研究設計を以下の表27に示す。

【0719】

【表27】

表27. 実施例10の研究における試験材料の投与

群番号	動物数	遺伝子型	試験材料	用量レベル(μg)	投与量	投薬レジメンROA	終末時点
1	5	WT	PBS	該当せず	90~100ml/kg (設定用量)	流体力学的IVにより 0日目に1回	28日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412	0.5			
4	5		ceDNA1939	0.5			
5	5		ceDNA1955	0.5			
6	5		ceDNA62	0.5			

No. = 番号 IV = 静脈内、ROA = 投与経路、WT = 野生型、MUT = ホモ接合変異

体、min = 分、hr = 時間

【0720】

それぞれ表28A及び28Bのとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

【0721】

【表28A】

表28A. (中間) 採血の実施例10研究

群 番号	全血試料採取時間
	伏在静脈のみ (獣医スタッフの許可により眼窩)
	血清 ^a
1～6	絶食 -1、3、7、14、及び21日目
容量/分量	約50 μ Lの全血
処理	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上-70°Cで凍結

10

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取した。

20

【0722】

【表28B】

表28B. 終末血液及び組織の採取

群 番号	試料採取時間
	終末全血 (心臓)
	血清 ^a
1～6	絶食 28日目
部分	MOV
処理/保存	1つのアリコートの処理された血漿 表示上-70°Cで凍結

30

^a 血餅アクチベーターを含む血清分離管に全血を収集した；MOV = 取得可能な最大容量

【0723】

研究の詳細

種(数、性別、年齢)：30匹+予備3匹PAHen^{u2}変異体(MUT)マウス性別混合、約6～8週齢、到着時同齢)、5匹野生型(WT)、性別混合、同腹仔、同齢。動物は、投与開始時に約7～9週であった。

40

【0724】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0725】

臨床観察：臨床観察は、0日目の試験材料投与の約1時間、約5～6時間、及び約24時間後に実施した。

【0726】

化合物のクラス：組換えDNAベクター、ceDNA。

【0727】

50

体重：全ての動物の体重を、－1、0、1、2、3、7、14、21、及び28日目（安楽死前）に記録した。

【0728】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属のPBSで希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料は、約4℃で保存され得る。

【0729】

用量投与：群1～5の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100ml/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。

【0730】

採血前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての中間及び終末採血の前：－4、3、7、14、21、及び28日目に最低4時間絶食した。

【0731】

餌を取り除き、床敷を交換した。8時間以下の絶食の間、各中間採血の終了時に餌を戻した。

【0732】

中間採血：群1～6の全ての動物を、－1、3、7、14、21日目に中間採血した。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取された。採取後、動物は0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下投与される。

【0733】

採血：血清用の全血を伏在静脈より採取した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOP毎に1つの血清アリコートに処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上－70℃で保存する。

【0734】

組織採取：終末組織を、瀕死の動物から採取し、予定された時点より前に安楽死させた。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を採取して保存した。

【0735】

安楽死：28日目に、4時間の絶食後、動物をCO₂窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

【0736】

終末血液：全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に採取され、施設のSOPに従って、2つのアリコートの血清に処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上－70℃で保存した。

【0737】

フェニルアラニン（PHE）レベル：血清試料をPure HoneyによってPHEレベルについて分析した。

【0738】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料をPure Honeyによって活性レベルについて分析した。

【0739】

結果

本研究は、2つのコドン最適化PAH配列（すなわち、マウス又はヒトコドン最適化PAHバージョン2）を、異なるプロモーター（すなわち、VDプロモーターセット又はヒトAATプロモーター）と組み合わせて試験した。試験した各ceDNA構築物に含まれる特定のエレメントを表26に要約する。

【0740】

図16A～16Dに示されるように、0.5μg用量で、及び少なくとも実施例9で実証されるように、両方ともコドン最適化ヒトPAH ORFバージョン2を発現するceDNA 412及びceDNA 1939は、7日以内に、合計5匹のマウスのうちの少なく

10

20

30

40

50

とも1匹でPHEレベル(PHE μ M)の標的濃度未満(350 μ M未満)への急性の修正を示した。実施例9において観察されたように、ceDNA1939は、7日以内に、合計5匹のマウスのうちの4匹で急性のPHE修正を再び示した。

【0741】

驚くべきことに、両方ともコドン最適化マウスPAH ORFバージョン2を発現したceDNA1955及びceDNA62は、マウスのPHE修正をもたらさなかった(ceDNA412及びceDNA1939よりも優れていた)。ceDNA1955は、せいぜい、ceDNA1939の修正と同等又はそれよりわずかに劣ったPHE修正をもたらすと言える。ceDNA62は、PHE修正を全く示さなかった。ceDNA62は、hAATプロモーターを有するが、ceDNA1476及びceDNA1479のようなエンハンサーは有さず(実施例8において研究)、ceDNA1528のようなCpG最小化は有さない(実施例7において研究)。ceDNA62におけるPHE修正の欠如は、hAATプロモーターの改善におけるエンハンサー及びCpG最小化の重要性を示す。

【0742】

実施例11: ceDNAの流体力学的投与によるPAHe^{nu2}マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学的修正を評価するための薬理試験—PHE修正に対する異なるプロモーター並びにそれらのシス調節エレメント、イントロン、及びUTRの効果

ceDNA構築物

この研究は、異なるプロモーターセット(すなわち、hAATプロモーターセット及びTTRプロモーターセット)、並びにそれらのそれぞれのシス調節エレメント、転写後調節エレメント、イントロン、及びUTR、並びにコドン最適化ヒトPAH配列又はORF(すなわち、hPAH-r5-s29、hPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接、又はhPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接)を有するceDNAベクターを試験した。ceDNAベクターを、実施例1及び5において上述したように調製及び精製した。

【0743】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA(ceDNA「hPAH Codop2」)の核酸配列は、本明細書において配列番号192として示され、以下のエレメントを含む: 左-ITR__v1: スペーサー__左-ITR__v2.1: VD__プロモーターセット(VD): PmeI__部位: 修飾型__最小__コンセンサス__コザック: hPAH__codop__ORF__v2: PacI__部位: WPRE__3pUTR: bGH/スペーサー: スペーサー__右-ITR__v1: 右-ITR__v1(ceDNA412)。ceDNA412は、本研究において、実施例11に記載される対照として機能した。

【0744】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29(hPAH-r5-s29::oIVS1B__33bp隣接)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号570として示され、TTRプロモーター及び他のエンハンサー(すなわち、プロモーターセット-1471)、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む(ceDNA2409)。

【0745】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29(hPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接)を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号571として示され、TTRプロモーター、並びにceDNA2409と同様に、同じエンハンサー(すなわち、プロモーターセット-1471)、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む(ceDNA2410)。

【0746】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29(hPAH-r5-s29::oIVS1B__33bp隣接)を含むceDNA

10

20

30

40

50

Aの核酸配列は、本明細書において配列番号572として示され、hAATプロモーター及び他のエンハンサー（すなわち、プロモーターセット-1476）、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（ceDNA2415）。

【0747】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29（hPAH-r5-s29::oIVS1B__33bp隣接）を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号573として示され、hAATプロモーター及び他のエンハンサー（すなわち、プロモーターセット-1479）、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（ceDNA2418）。ceDNA2418は、HNF結合部位のコピー数及びタイプに関してceDNA2415とは異なる。

10

【0748】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29（hPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接）を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号574として示され、hAATプロモーター、並びにceDNA2415と同様に、同じエンハンサー（すなわち、プロモーターセット-1476）、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（ceDNA2416）。

20

【0749】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29（hPAH-r5-s29::修飾型-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接）を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号575として示され、hAATプロモーター、並びにceDNA2418と同様に、同じエンハンサー（プロモーターセット-1479）、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（ceDNA2419）。ceDNA2419は、HNF結合部位のコピー数及びタイプに関してceDNA2416とは異なる。

【0750】

イントロン及びイントロン隣接領域を有しないコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29（hPAH-r5-s29）を含むceDNAの核酸配列は、本明細書において配列番号576として示され、TTRプロモーター、並びにceDNA2409と同様に、同じエンハンサー（すなわち、プロモーターセット-1471）、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（ceDNA2420）。

30

【0751】

この研究で使用した、上述したceDNAベクターの特徴を、以下の表29に要約する。

【0752】

40

50

【表 2 9】

表 2 9. 実施例 1 1 の研究における c e D N A ベクターの構築物の特徴

ceDNA	構築物の特徴
ceDNA412	1 × VD_プロモーターセット hPAH_codop_ORF_v2
ceDNA2409	プロモーターセット-1471 TTR-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29::hIVS1B_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA2410	プロモーターセット-1471 TTR-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29::mod-イントロン_oIVS-v2_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA2415	プロモーターセット-1476 hAAT-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29::hIVS1B_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA2418	プロモーターセット-1479 hAAT-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29::hIVS1B_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA2416	プロモーターセット-1476 hAAT-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29::mod-イントロン_oIVS-v2_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA2419	プロモーターセット-1479 hAAT-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29::mod-イントロン_oIVS-v2_33bp隣接 WPRE_3pUTR
ceDNA2420	プロモーターセット-1471 TTR-MVM_v2-PmeI-Mod2-5pUTR hPAH-r5-s29 WPRE_3pUTR

10

【0 7 5 3】

研究設計

c e D N A P A H ベクター（単独、いかなる L N P 封入も含まない）の各々及び対照を、およそ 6 ～ 1 1 週齢の性別混合の年齢が一致した P A H e n u 2 マウスに投与した。裸の c e D N A ベクターを、0 日目に、9 0 ～ 1 0 0 m g / m L の用量体積で外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射により、動物 1 匹当たり 0 . 1 μ g （選択されたものだけ）又は 0 . 5 μ g （1 群当たり 5 匹の動物）で投与した。2 8 日目は最終時点であった。研究設計を以下の表 3 0 に示す。

【0 7 5 4】

20

30

40

50

【表 3 0】

表 3 0. 実施例 1 1 の研究における試験材料の投与

群番号	動物数	遺伝子型	試験材料	用量レベル (μg)	投与量	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	WT	PBS	該当せず	90~100ml/kg (設定用量)	流体力学的 IVにより 0日目に1回	28日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412	0.5			
4	5		ceDNA412	0.1			
5	5		ceDNA2409	0.5			
6	5		ceDNA2410	0.5			
7	5		ceDNA2410	0.1			
8	5		ceDNA2415	0.5			
9	5		ceDNA2415	0.1			
10	5		ceDNA2418	0.5			
11	5		ceDNA2418	0.1			20
12	5		ceDNA2416	0.5			
13	5		ceDNA2419	0.5			
14	5		ceDNA2420	0.5			

10

20

No. = 番号 IV = 静脈内、ROA = 投与経路、WT = 野生型、MUT = ホモ接合変異体、min = 分、hr = 時間

【0755】

それぞれ表 3 1 A 及び 3 1 B のとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

30

【0756】

【表 3 1 A】

表 3 1 A. (中間) 採血の実施例 1 1 研究

群 番号	全血試料採取時間
	伏在静脈のみ (獣医スタッフの許可により眼窩)
	血清 ^a
1~14	絶食 - 6、3、7、14、及び21日目
容量/分量	約50 μL の全血
処理	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上-70°Cで凍結

40

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取した。

【0757】

50

【表 3 1 B】

表 3 1 B. 終末血液及び組織の採取

群 番号	試料採取時間
	終末全血 (心臓)
	血清 ^a
1～14	絶食 28日目
部分	MOV
処理／保存	1つのアリコート処理された血漿 表示上-70℃で凍結

10

^a 血餅アクチベーターを含む血清分離管に全血を収集した；MOV＝取得可能な最大容量【0758】

研究の詳細

種（数、性別、年齢）：70匹＋予備3匹PAHen^{u2}変異体（MUT）マウス性別混合、約6～8週齢、到着時同齢）、5匹野生型（WT）、性別混合、同腹仔、同齢。動物は、投与開始時に約6～11週であった。

20

【0759】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0760】

臨床観察：臨床観察は、0日目の試験材料投与の約1時間、約5～6時間、及び約24時間後に実施した。

【0761】

化合物のクラス：組換えDNAベクター、ceDNA。

【0762】

体重：全ての動物の体重を、-6、0、1、2、3、7、14、21、及び28日目（安楽死前）に記録した。

30

【0763】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属のPBSで希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料は、約4℃で保存され得る。

【0764】

用量投与：群1～14の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100ml/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。

【0765】

採血前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての中間及び終末採血の前：-6、3、7、14、21、及び28日目に最低4時間絶食した。

40

【0766】

餌を取り除き、床敷を交換した。8時間以下の絶食の間、各中間採血の終了時に餌を戻した。

【0767】

中間採血：群1～10の全ての動物を、-6、3、7、14、21日目に中間採血した。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取された。採取後、動物は0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下投与される。

【0768】

50

採血：血清用の全血を伏在静脈より採取した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOP毎に1つの血清アリコートに処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上 -70°C で保存する。

【0769】

組織採取：終末組織を、瀕死の動物から採取し、予定された時点より前に安楽死させた。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を採取して保存した。

【0770】

安楽死：28日目に、4時間の絶食後、動物を CO_2 窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

【0771】

終末血液：全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に採取され、施設のSOPに従って、2つのアリコートの血清に処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上 -70°C で保存した。

【0772】

フェニルアラニン（PHE）レベル：血清試料をPure HoneyによってPHEレベルについて分析した。

【0773】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料をPure Honeyによって活性レベルについて分析した。

【0774】

結果

本研究は、2つのコドン最適化PAH配列（すなわち、マウス又はヒトコドン最適化PAHバージョン2）を、異なるプロモーター（すなわち、VDプロモーターセット又はヒトAATプロモーター）と組み合わせて試験した。試験した各ceDNA構築物に含まれる特定のエレメントを表26に要約する。

【0775】

図17A～17Iは、この研究からの結果を示す。図17Aに示されるように、 $0.5\mu\text{g}$ 用量で、ceDNA412は、合計5匹のマウスのうちの5匹全てにおいて、7日以内に、PHEレベル（PHE μM ）の標的濃度未満（ $350\mu\text{M}$ 未満）への急性の修正を示した。注目すべきことに、マウスのうちの1匹では、PHE修正が28日目まで持続した。比較すると、実施例8及び9では、ceDNA412について、合計5匹のマウスのうちの4匹でPHE修正が観察された。

【0776】

ceDNA2409、ceDNA2410、ceDNA2415、ceDNA2418、ceDNA2416、及びceDNA2420は、各々、7日以内に、合計5匹のマウスのうちの少なくとも1匹において、PHEレベル（PHE μM ）の標的濃度未満（ $350\mu\text{M}$ 未満）への急性の修正を示した。注目すべきことに、ceDNA2409、ceDNA2410、及びceDNA2415は、各々、7日以内に、合計5匹のマウスのうちの4匹において、及び3日以内に合計5匹のマウスのうち少なくとも1匹において、PHEレベル（PHE μM ）の標的濃度未満（ $350\mu\text{M}$ 未満）への急性の修正を示した。重要なことに、ceDNA2415を投与したマウスのうちの1匹では、PHE修正が28日目まで持続した。言い換えれば、この研究は、少なくともhPAH-r5-s29::mod-イントロン__oIVS-v2__33bp隣接ORFを発現するceDNA2415（TTRプロモーター、それとともにエンハンサー、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメント）が、VDプロモーターセット及びコドン最適化ヒトPAHバージョン2ORFを有するceDNA412よりも優れていないとしても同等であることを示す。図18A～18Eに示されるように、 $0.1\mu\text{g}$ のより低い用量で試験を繰り返した場合、注目すべきことに、ceDNA2415は、14日以内に合計5匹のマウスのうちの2匹において、及び7日以内に合計5匹のマウスのうちの1匹において、PHEレベル（PHE μM ）の標的濃度未満（ $350\mu\text{M}$ 未満

10

20

30

40

50

）への急性の修正を示した。

【0777】

c e D N A 2 4 1 8 (5 × H N F 1) 対 c e D N A 2 4 1 5 (3 × H N F 1 - 4) 及び c e D N A 2 4 1 9 (5 × H N F 1) 対 c e D N A 2 4 1 6 (3 × H N F 1 - 4) のように、HNF結合部位の数及び種類を変化させるが、プロモーター自体を含む他の全ての構造エレメントを同じに保った場合、PHEレベルの修正が損なわれるようであった。同様の観察が、マウスに0.1 μgのc e D N A 2 4 1 5 (図 1 8 C) に対して0.1 μgのc e D N A 2 4 1 8 (図 1 8 D) を投与した場合に認められた。実施例11におけるこれらの観察は、c e D N A 1 4 7 6 及びc e D N A 1 4 7 9 について実施例8において認められた観察と一致する。

10

【0778】

c e D N A 2 4 0 9、c e D N A 2 4 1 0、c e D N A 2 4 1 5、及びc e D N A 2 4 1 6と比較して、c e D N A 2 4 2 0のPHE修正レベルは劣っており、3匹のマウスはいずれの時点でも標的レベルを達成しなかった。c e D N A 2 4 0 9、c e D N A 2 4 1 0、c e D N A 2 4 1 5、及びc e D N A 2 4 1 6と比較して、c e D N A 2 4 2 0は、h P A H - r 5 - s 2 9 O R Fを発現するが、いかなるイントロン及びイントロン隣接領域も有しない。この観察は、h P A H - r 5 - s 2 9 O R Fを改善する際のイントロン及びイントロン隣接領域の重要性を強調する。

【0779】

実施例12：c e D N Aの流体力学的投与によるP A H e n u 2 マウスにおけるフェニルアラニンレベルの生化学的修正を評価するための薬理試験－PHE修正に対する異なるプロモーター及びc e D N A 産生方法の効果

20

c e D N A 構築物

この研究は、異なるプロモーターセット及びそれらのそれぞれのシス調節エレメント、転写後調節エレメント、イントロン及びUTR、並びにコドン最適化ヒトPAH配列又はORFを有するc e D N A ベクターを試験した。対照として機能するc e D N A 4 1 2を除いて、この研究におけるc e D N A ベクターは、国際特許出願第US 2 0 1 9 / 1 4 1 2 2 号において上述したように調製及び精製された。

【0780】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むc e D N A (c e D N A 「 h P A H C o d o p 2 」) の核酸配列は、本明細書において配列番号192として示され、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1：スペーサー__左-ITR__v2.1：VD__プロモーターセット(VD)：PmeI__部位：修飾型__最小__コンセンサス__コザック：h P A H __c o d o p __O R F __v 2：P a c I __部位：W P R E __3 p U T R：b G H / スペーサー：スペーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1 (c e D N A 4 1 2) 。 c e D N A 4 1 2 は、本研究において、実施例12に記載される対照として機能した。

30

【0781】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2 (h P A H __c o d o p __O R F __v 2) を含むc e D N A の核酸配列は、本明細書において配列番号577として示され、VDプロモーターセット、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む (c e D N A 3 4) 。

40

【0782】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r 5 - s 2 9 (h P A H - r 5 - s 2 9 :: m o d - イントロン__o I V S - v 2 __33bp隣接)を含むc e D N A の核酸配列は、本明細書において配列番号581として示され、h A A Tプロモーター及び他のエンハンサー (すなわち、プロモーターセット-1476)、イントロン、UTR、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む (c e D N A 4 1) 。

【0783】

コドン最適化ヒトPAHバージョン2 (h P A H __c o d o p __O R F __v 2) を含む

50

c e D N A の核酸配列は、本明細書において配列番号 5 7 9 として示され、T T R プロモーター及び他のエンハンサー（すなわち、H S - C R M 8 _ F O X A _ H N F 4 _ コンセンサス _ v 1）、イントロン、U T R、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（c e D N A 3 6）。

【0784】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9（h P A H - r 5 - s 2 9：：o I V S 1 B _ 3 3 b p 隣接）を含む c e D N A の核酸配列は、本明細書において配列番号 5 8 3 として示され、T T R プロモーター及び他のエンハンサー（すなわち、H S - C R M 8 _ F O X A _ H N F 4 _ コンセンサス _ v 1）、イントロン、U T R、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（c e D N A 4 3）。

10

【0785】

イントロン及びイントロン隣接領域を有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9（h P A H - r 5 - s 2 9：：o I V S 1 B _ 3 3 b p 隣接）を含む c e D N A の核酸配列は、本明細書において配列番号 5 8 2 として示され、T T R プロモーター及び他のエンハンサー（すなわち、3 × _ H N F _ F O X A _ v 1）、イントロン、U T R、制限エンドヌクレアーゼ部位、シス及び転写後調節エレメントを含む（c e D N A 4 2）。

【0786】

この研究で使用した、上述した c e D N A ベクターの特徴を、以下の表 3 2 に要約する。

20

【0787】

【表 3 2】

表 3 2 . 実施例 1 2 の研究における c e D N A ベクターの構築物の特徴

ceDNA	構築物の特徴
ceDNA412	1 × V D _ プロモーターセット h P A H _ codop _ ORF _ v2
ceDNA34	1 × V D _ プロモーターセット P m e I - M o d 2 h P A H _ codop _ ORF _ v2 W P R E _ 3 p U T R
ceDNA41	プロモーターセット - 1476 h A A T - P m e I - M o d 2 - 5 p U T R h P A H - r 5 - s 2 9 : : h I V S 1 B _ 3 3 b p 隣接 W P R E _ 3 p U T R
ceDNA36	H S - C R M _ F O X A _ H N F 4 _ コンセンサス _ v1 T T R e - T T R m - M V M _ v2 - M o d 2 h P A H _ codop _ ORF _ v2 W P R E _ 3 p U T R
ceDNA43	H S - C R M _ F O X A _ H N F 4 _ コンセンサス _ v1 T T R e - T T R m - M V M _ v2 - M o d 2 h P A H - r 5 - s 2 9 : : h I V S 1 B _ 3 3 b p 隣接 W P R E _ 3 p U T R
ceDNA42	3 × _ H N F 4 _ F O X A _ v1 T T R e - T T R m - M V M _ v2 - M o d 2 h P A H - r 5 - s 2 9 : : h I V S 1 B _ 3 3 b p 隣接 W P R E _ 3 p U T R

30

【0788】

研究設計

c e D N A P A H ベクター（単独、いかなる L N P 封入も含まない）の各々及び対照を、およそ 7 ~ 1 0 週齢の性別混合の年齢が一致した P A H e n u 2 マウスに投与した。裸の c e D N A ベクターを、0 日目に、9 0 ~ 1 0 0 m L / k g の用量体積で外側尾静脈を介した流体力学的静脈内注射により、動物 1 匹当たり 0 . 1 μ g（選択されたものだけ）又は 0 . 5 μ g（1 群当たり 5 匹の動物）で投与した。2 8 日目は最終時点であった。研究設計を以下の表 3 3 に示す。

40

【0789】

50

【表 3 3】

表 3 3. 実施例 1 2 の研究における試験材料の投与

群番号	動物数	遺伝子型	試験材料	用量レベル (μg)	投与量	投薬レジメン ROA	終末時点
1	5	WT	PBS	該当せず	90~100ml/kg (設定用量)	流体力学的 IVにより 0日目に1回	28日目
2	5	PAH ^{enu2} MUT	PBS	該当せず			
3	5		ceDNA412	0.5			
4	5		ceDNA34	0.5			
5	5		ceDNA34	0.1			
6	5		ceDNA41	0.5			
7	5		ceDNA36	0.5			
8	5		ceDNA36	0.1			
9	5		ceDNA43	0.5			
10	5		ceDNA43	0.1			
11	5		ceDNA42	0.5			20
12	5		ceDNA42	0.1			

10

20

No. = 番号 IV = 静脈内、ROA = 投与経路、WT = 野生型、MUT = ホモ接合変異体、min = 分、hr = 時間

【0790】

それぞれ表 3 4 A 及び 3 4 B のとおりに、中間及び終末時点で血液を採取した。

【0791】

【表 3 4 A】

表 3 4 A. (中間) 採血の実施例 1 2 研究

30

群 番号	全血試料採取時間
	伏在静脈のみ (獣医スタッフの許可により眼窩)
	血清 ^a
1~12	絶食 - 4、3、7、14、21、及び28日目
容量/分量	約50 μL の全血
処理	1つのアリコート (Pure Honey)
保存	表示上 - 70°C で凍結

40

^a 凝固活性剤を含む血清分離チューブに全血を採取した。

【0792】

50

【表 3 4 B】

表 3 4 B. 終末血液及び組織の採取

群 番号	試料採取時間
	終末全血 (心臓)
	血清 ^a
1～12	絶食 28日目
部分	MOV
処理／保存	1つのアリコート処理された血漿 表示上－70℃で凍結

10

^a 血餅アクチベーターを含む血清分離管に全血を収集した；MOV＝取得可能な最大容量
【0793】

研究の詳細

種（数、性別、年齢）：60匹＋予備5匹PAHenu²変異体（MUT）マウス性別混合、約6～8週齢、到着時同齢）、5匹野生型（WT）、性別混合、同腹仔、同齢。動物は、投与開始時に約7～10週であった。

20

【0794】

ケージサイドでの観察：ケージサイドでの観察を毎日行った。

【0795】

臨床観察：臨床観察は、0日目の試験材料投与の約1時間、約5～6時間、及び約24時間後に実施した。

【0796】

化合物のクラス：組換えDNAベクター、ceDNA。

【0797】

体重：全ての動物の体重を、－4、0、1、2、3、7、14、21、及び28日目（安楽死前）に記録した。

30

【0798】

用量処方：試験物品は濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属のPBSで希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料は、約4℃で保存され得る。

【0799】

用量投与：群1～12の試験材料を、0日目に流体力学的IV投与により、外側尾静脈を介して、動物1匹当たり90～100ml/kg（群内で最も軽い動物に応じる）の設定体積で投与した。

【0800】

採血前の絶食：全ての動物（全ての群）は、全ての中間及び終末採血の前：－4、0、1、2、3、7、14、21、及び28日目に最低4時間絶食した。

40

【0801】

餌を取り除き、床敷を交換した。8時間以下の絶食の間、各中間採血の終了時に餌を戻した。

【0802】

中間採血：群1～12の全ての動物を、－4、3、7、14、21日目に中間採血した。全ての動物は、絶食時の血清用に全血を採取された。採取後、動物は0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下投与される。

【0803】

50

採血：血清用の全血を伏在静脈より採取した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOP毎に1つの血清アリコートに処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上 -70°C で保存する。

【0804】

組織採取：終末組織を、瀕死の動物から採取し、予定された時点より前に安楽死させた。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を採取して保存した。

【0805】

安楽死：28日目に、4時間の絶食後、動物を CO_2 窒息によって安楽死させ、続いて開胸及び失血を行った。

【0806】

終末血液：全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に採取され、施設のSOPに従って、2つのアリコートの血清に処理された。全ての試料を、ドライアイス上で、輸送されるまで、表示上 -70°C で保存した。

【0807】

フェニルアラニン(PHE)レベル：血清試料をPure HoneyによってPHEレベルについて分析した。

【0808】

活性レベル：2つの凍結肝臓試料をPure Honeyによって活性レベルについて分析した。

【0809】

結果

本研究では、2つのコドン最適化PAH配列（すなわち、hPAH__codop__ORF__v2及びhPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接）を、少なくともエンハンサーを伴うプロモーターを有する異なるプロモーター又はプロモーターセット（すなわち、VDプロモーターセット、プロモーターセット-1476、及びエンハンサーの1つとしてHS-CRM__FOXA__HNF4__コンセンサス__v1又は3x__HNF4__FOXA__v1のいずれかを有するTTRプロモーター）と組み合わせて試験した。試験した各ceDNA構築物に含まれる特定のエレメントを表32に要約する。

【0810】

図19A及び図19Bに示されるように、 $0.5\mu\text{g}$ 用量で、ceDNA412及びその対応する合成的に産生された対応ベクターであるceDNA34は、同等のPAH活性及びPHE修正を示した。 $0.5\mu\text{g}$ の投薬で、他の合成的に産生されたベクター（すなわちceDNA36、ceDNA41、及びceDNA43）は、3日以内に、合計5匹のマウスのうちの少なくとも1匹において、PHEレベル（PHE μM ）の標的濃度未満（ $350\mu\text{M}$ 未満）への急性の修正を示した。注目すべきことに、ceDNA41及びceDNA43は、合計5匹のマウスのうちの最大4匹が、投薬の3日以内に、標的濃度未満であるPHEレベルを達成したという点で、対照ceDNA412よりも優れていた。

【0811】

ceDNA36及びceDNA43は、各々、TTRプロモーターをHS-CRM__FOXA__HNF4__コンセンサス__v1エンハンサーと組み合わせて有していたが、ceDNA43が、CpG含有量=0を有するhPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接PAH配列を含んでいたのに対して、ceDNA41が、hPAH__codop__ORF__v2 PAH配列（CpG含有量=77）を含んでいた点でPAH配列が異なる。ceDNA36と比較して、ceDNA43における優れたPHE修正は、PAH配列におけるCpG最小化の重要性を例証する（図19C及び19Eを参照されたい）。同様に、産生方法が異なっているほか、ceDNA41及びceDNA412はまた、ceDNA41が、hPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接 PAH配列を含んでいたのに対して、ceDNA412が、hPAH__codop__ORF__v2 PAH配列を含んでいたという点でPAH配列が異なる。ceDNA41は、ceDNA

10

20

30

40

50

412と比較して、優れたPHE修正を示した（図19D及び19Aを参照されたい）。

【0812】

エンハンサーとしてHS-CRM-FOXA-HNF4-コンセンサス-v1と組み合わせてTTRプロモーターを含むベクター、すなわちceDNA43とceDNA36の両方は、投与後3日以内に、合計5匹のマウスのうちの少なくとも1匹でPHE修正を示し、ceDNA43は、合計5匹のマウスのうちの4匹でPHE修正を達成した（図19B及び19Eを参照されたい）。驚くべきことに、ceDNA42は、同じTTRプロモーターと組み合わせて使用される3×-HNF4-FOXA-v1が3コピーのHNF4結合部位を含むという点でceDNA43とは異なり、いずれのマウスにおいてもPHE修正を達成しなかった（図19Dを参照されたい）。

10

【0813】

0.5 µgの投薬試験からわかるように、合成的に産生されたceDNA43は、hPAH-r5-s29::hIVS1B-33bp隣接PAH配列を発現した。これは、CpG含量=0を有し、エンハンサーとしてHS-CRM-FOXA-HNF4-コンセンサス-v1と組み合わせてTTRプロモーターを含み、試験した全てのベクターの中で最も強力なベクターであった。

【0814】

したがって、実施例6～12における研究は、コドン最適化されたPAH核酸配列を含むceDNA構築物（例えば、ceDNAベクター）が、フェニルアラニンレベル（例えば、発現及び持続時間）の最適な修正について試験された特定のシス作用性エレメント（例えば、特異的プロモーター、特異的エンハンサー、並びに特異的プロモーターとエンハンサーとの組み合わせ）と思慮深く組み合わせることができることを示した。更に、実施例12の研究は、合成的に産生されたceDNA構築物が、PAH欠損PAH^{enu2}マウスにおいて同等又はより強力なPHE修正を有することを実証する。

20

【0815】

核酸配列：

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH Codop2」）の核酸配列を以下に示す（ceDNA412）。プロモーターを下線で示し（配列番号191）、コドン最適化PAHバージョン2オープンリーディングフレーム（ORF）を二重下線で示す（配列番号382）。

30

【0816】

【化2】

AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATT
AAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGCGGACAAAATAGTTGGGAACTG
GGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGG
AACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATACGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAAC
TAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCT
CACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAG
TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCTTGTAG
TTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCGCGGCCGCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATAT
TAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGT
ACCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAG
GTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAG
CAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAA

40

【0817】

50

【化 3】

AGCCCCTTACCAGGGAGAAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGT
TTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGTATTAATGTTTAATTACCTGAGCACCTGCCTGAAA
TCACTTTTTTTCAGGTTGGTTTAAACCGCAGCCACCATGAGCACCGCCGTGCTGGAAAAAT
CCTGGCCTGGGCAGAAAGCTGAGCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACAA
CTGCAACCAGAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGCGCCC
TGGCCAAGGTGCTGAGACTGTTCGAAGAGAACGACGTGAACCTGACACACATCGAGAGC
AGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGTACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAAGCGGAG
CCTGCCTGCTCTGACCAACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCA
CGAACTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCCAGAACCATCCAAG
AGCTGGACAGATTCGCAACCAGATCCTGAGCTATGGCGCCGAGCTGGACGCTGATCAC
CCTGGCTTTAAGGACCCCCGTGTACCGGGCCCAGAAGAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTAC
AACTACCGGCACGGCCAGCCTATTCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAAGAAAAC
CTGGGGCACCGTGTTCAAGACCCCTGAAGTCCCTGTACAAGACCCACGCCTGCTACGAGTA
CAACCACATCTTCCCACTGCTCGAAAAGTACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCA
GCTTGAGGACGTGTCCCAGTTCCTGCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGC
CGGACTGCTGAGCAGCAGAGTTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGTTCCACTGTAC
CCAGTACATCAGACACGGCAGCAAGCCCATGTACACCCCTGAGCCTGATATCTGCCACG
AGCTGCTGGGACATGTGCCCCTGTTCAGCGATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAG
ATCGGACTGGCTTCTCTGGGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCTAC
TGGTTCACCGTGGAATTTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGACAGCATCAAAAGCTTATGGCGC
TGGCCTGCTGTCTAGCTTCGGCGAGCTGCAGTACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCT
GCCCCTGGAACTGGAAAAGACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTC
TGTACTACGTGGCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAGAAAAAGTGCGGAACTTCGCCGCC
ACCATTCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACACACAGCGGATCGAGGTGCTG
GACAACACACAGCAGCTGAAAATTCTGGCCGACTCCATCAACAGCGAGATCGGGCATCCT
GTGCAGCGCCCTGCAGAAAATCAAGTGATAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTAT
TCCCATATTTGTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAAT
GGTGGGGCAATCATTTACTTTTTAGGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCAC
AAGACAAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCT
GGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTG
TGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCGTACGGCTTTCGTTTT
CTCCTCTTGTATAAATCCTGGTGCTGTCTTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGT
CAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCC
ACCACCTGTCAACTCTTTCTGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCGATCGCCACGGCAGAAC
TCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTGCTGGGCACTGATAATT
CCGTGGTGTTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCC
TTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGC

10

20

30

40

【0818】

50

【化 4】

ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCT
CTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAG
GAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG
GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
AGCTGCCTGCAGGGGCGCGCTCGAGCCATGGTGCTAGCAGCTGATGCATAGCATGCGG
TACCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACC
CGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTTC
ATAAACGCGGGGTTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCAT
GGGACCAATACGCCCGCGTTTCTTCTTTTCCCCACCCCAACCCCAAGTTCGGGTGAAG
GCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAAGCCCTGCCATAGCCACTACGGGTACG
TAGGCCAACCACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAACGATGCTCGCCTTCC
AGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACCAACCGCAAGCGCCGCGA
CGGCCGAGGTCTACCGATCTCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGT
AGAAGAACAGCAAGGCCGCAATGCCTGACGATGCGTGAGACCGAAACCTTGCGCTCG
TTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCCAAGGTTGCCGGGTGACGC
ACACCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAA
ACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCA
GCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTGTACAGTC
TATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTGATGTTTGATGTTATG
GAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAA
ACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTGCGACATGTAGGCTCGGCCCTGACCA
AGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTTCGTGAGTTCGGAGACGTAGCCAC
CTACTCCCAACATCAGCCGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATT
CATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCT
GCCCAGGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGA
GCACCGGAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACG
CGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTC
TCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCACCTTGATATCGACCCAAGTACC
GCCACCTAACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGGAGTTGTTTCGGTAAA
TTGTCACAACGCCGGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGCCACGCCCCCTCTTTAATACG
ACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGT
ATGCTTTTTACAGCATAACTGGACTGATTTTCAGTTTACAACCTATTCTGTCTAGTTTAAGA
CTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTGTTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCACACCC
GCTTACGCAGGGCATCCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCT
GGTCTGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC

10

20

30

40

【0819】

50

【化 5】

AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA
 ACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC
 GTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
 GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
 TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCGTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGG
 AAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCG
 CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCAAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
 TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
 TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
 GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG
 TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGC
 GGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
 TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGAT
 TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAG
 TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT
 CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
 GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
 GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
 CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
 TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAA
 CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGT
 CCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
 CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACT
 CAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA
 TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGT
 TCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCC
 ACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT
 ACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC
 GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC
 CGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTT
 TGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCA
 AAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATT
 AAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCAC
 TACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATC
 GGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCG

10

20

30

40

【0 8 2 0】

【化 6】

AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG
 TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCC
 ATTCGCCATTACAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACG
 AAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAA (配列番号192)

【0 8 2 1】

50

上記の c e D N A 構築物には、左-I T R__v 1、スペーサー__左-I T R__v 2. 1、V D__プロモーターセット、P m e I__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、h P A H__c o d o p__O R F__v 2、P a c I__部位、W P R E__3 p U T R、b G H、スペーサー__右-I T R__v 1、右-I T R__v 1が含まれる
【0822】

いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 を含む。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 85 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 90 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 91 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 92 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 93 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 94 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 95 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 96 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 97 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 98 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 と少なくとも 99 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、コドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H C o d o p 2」) の核酸配列は、配列番号 192 からなる。

【0823】

ヒト P A H c D N A (コドン最適化を伴わない h P A H c D N A に連結された c e D N A V D プロモーター) を含む c e D N A の核酸配列を以下に示す。プロモーターを下線で示し (配列番号 191)、P A H オープンリーディングフレーム (O R F) を二重下線で示す (配列番号 394 ; c e D N A 802) 。

【0824】

【化 7】

GGCCGGCCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGG
GCAAAGCCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAAGTTAATGATTAACCCGCC
ATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGACGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCA
AGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTC
TGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCGGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCAT
ATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTT
TGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCC
TTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGG
GATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTT
TTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGCCACCATGTCCACTGCGGTCCTGGAAAACCCAGGCT
TGGGCAGGAACTCTCTGACTTTGGACAGGAAACAAGCTATATTGAAGACAACCTGCAAT
CAAAATGGTGCCATATCACTGATCTTCTCACTCAAGAAGAAGTTGGTGCATTGGCCAAA
GTATTGCGCTTATTGAGGAGAATGATGTAAACCTGACCCACATTGAATCTAGACCTTCT
CGTTTAAAGAAAGATGAGTATGAATTTTTACCCATTTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCT
CTGACAAACATCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACTGTCCATGAGCTTTCA
CGAGATAAGAAGAAAGACACAGTGCCCTGGTTCCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAG
ATTTGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCGGAACCTGGATGCTGACCACCCTGGTTTTAA
AGATCCTGTGTACCGTGCAAGACGGAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTACAACCTACCGCCA
TGGGCAGCCCATCCCTCGAGTGGAATACATGGAGGAAGAAAAGAAAACATGGGGCACA
GTGTTCAAGACTCTGAAGTCCTTGTATAAAACCCATGCTTGCTATGAGTACAATCACATT
TTTCCACTTCTTGAAAAGTACTGTGGCTTCCATGAAGATAACATTCCCCAGCTGGAAGAC
GTTTCTCAGTTTCTGCAGACTTGCACTGGTTTCCGCCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTT
CCTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCTTCCACTGCACACAGTACATCA
GACATGGATCCAAGCCCATGTATACCCCCGAACCTGACATCTGCCATGAGCTGTTGGGAC
ATGTGCCCTTGTTTTCAGATCGCAGCTTTGCCAGTTTTCCAGGAAATTGGCCTTGCCTC
TCTGGGTGCACCTGATGAATACATTGAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTTACTGTGGA
GTTTGGGCTCTGCAAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATATGGTGCTGGGCTCCTGTCATC
CTTTGGTGAATTACAGTACTGCTTATCAGAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGGA
GAAGACAGCCATCCAAAATTACACTGTCACGGAGTTCCAGCCCCCTCTATTACGTGGCAGA
GAGTTTTAATGATGCCAAGGAGAAAGTAAGGAACCTTTGCTGCCACAATACCTCGGCCCTT
CTCAGTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATTGAGGTCTTGGACAATACCCAGCAGCT
TAAGATTTTGGCTGATTCCATTAACAGTGAAATTGGAATCCTTTGCAGTGCCCTCCAGAA
AATAAAGTAATTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTT
TTGATTTGGGTATACATTTAAATGTAAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATT

10

20

30

40

【0 8 2 5】

50

【化 8】

TTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAAC
TTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAAG
ATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAG
CCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTG
GTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCT
GTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCT
GGGACTTTTCGTTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCC
CGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTCTGTGCCT
TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCCTCCTTGACCCTGGAAGGTG
CCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT
GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC
AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGA
TAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGA
GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
CCGACGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCC
TCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACC
ACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAA
CATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAT
AAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTG
GTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAG
GAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCAATTTTAATTTTCGT
ATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTCCCTAAATAATCCT
TAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCA
TTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCAT
CTTCGGCTACTTTTTCTCTGTACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATG
TTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCC
TGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT
TGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCC
GGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTAC
GGCACCTCGACCCCCAAAAAATTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCT
GATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTT
CCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTG
CCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT
AACAAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCT
GATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCG
CCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTG

10

20

30

40

【0 8 2 6】

50

【化 9】

AAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC
TTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACT
CGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG
ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCT
TTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAAT
GAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTT
GCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG
GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTT
TATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG
GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
GGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAA
AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT
TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTG
TTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCA
GATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGA
TAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAA
CTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCA
GGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
CTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCC
CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCC
GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTA
TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAA
AATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAAT
AAAGTCTTAACTGAACAAAATAGATCTAACTATGACAATAAAGTCTTAACTAGACA
GAATAGTTGTAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGT
TATGGCTAAAGCAAACCTTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAGAGGG
GCGTGGCCAAGGGCATGGTAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAA
CTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTC
GATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGG

10

20

30

40

【0 8 2 7】

50

【化 1 0】

ATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATG
CTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTG
CGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCC
GCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCTGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACT
ACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGT
CTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGG
CCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGA
CTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAA
ACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAA
AAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCG
GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACC
GAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCG
GCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAA
GGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGT
GCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTGCGGGCGCTT
GCCGTTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCA
TCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAAT
ATTAATAGATCATGGAGATAATTAATAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTA
CTGTTTTCTGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGT
CCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACCAT
CACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC

(配列番号193)

【0 8 2 8】

配列番号193は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1：スペーサー__左-ITR__v1：VD__プロモーターセット：PmeI__部位：コンセンサス__コザック：hPAH__cDNA__ORF__v3：PacI__部位：WPRE__3pUTR：bGH：スペーサー__右-ITR__v1：右-ITR__v1。

【0 8 2 9】

いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH cDNA（コドン最適化を伴わないhPAH cDNAに連結されたceDNA VDプロモーター）を含むceDNAの核酸配列は、配列番号193を含む。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH cDNA（コドン最適化を伴わないhPAH cDNAに連結されたceDNA VDプロモーター）を含むceDNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH cDNA（コドン最適化を伴わないhPAH cDNAに連結されたceDNA VDプロモーター）を含むceDNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH cDNA（コドン最適化を伴わないhPAH cDNAに連結されたceDNA VDプロモーター）を含むceDNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH cDNA（コドン最適化を伴わないhPAH cDNAに連結されたceDNA VDプロモーター）を含むceDNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH cDNA（コドン最適化を伴わないhPAH cDNAに連結されたceDNA

A V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、ヒトPAH c DNA (コドン最適化を伴わないh PAH c DNAに連結されたc e DNA V Dプロモーター)を含むc e DNAの核酸配列は、配列番号193からなる。

10

20

30

40

50

【0830】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むc e DNA (c e DNA「h PAH Codop2」)の核酸配列を以下に示す(c e DNA 1132)。

【0831】

【化11】

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC
CGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG
GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT
TATCGCGGCCGCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAAGTTATCGG
AGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTC
ACCCCAAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGTGAA
TATTAACCAAGGTCACCCCAAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGGCTAAGTCCACGGTACC
CACTGGGAGGATGTTGAGTAAGATGGAAAACACTACTGATGACCCCTTGCAGAGACAGAGTA
TTAGGACATGTTTGAACAGGGGCCGGGCGATCAGCAGGTAGCTCTAGAGGATCCCCGTC
TGTCTGCACATTTCTAGAGCGAGTGTTCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCA
ATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTT
TGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCC
TTACCAAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGG
GATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTT
TTTTTCAGGTTGGGTTTAAACCGCAGCCACCATGAGCACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGG
CCTGGGCAGAAAGCTGAGCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACAACCTGCA
ACCAGAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGCGCCCTGGCC
AAGGTGCTGAGACTGTTTGAAGAGAACGACGTGAACCTGACACACATCGAGAGCAGACC

【0832】

【化 1 2】

CAGCAGACTGAAGAAGGACGAGTACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGCGGAGCCTGC
 CTGCTCTGACCAACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCACGAA
 CTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCAGAACCATCCAAGAGCT
 GGACAGATTTCGCAACCAGATCCTGAGCTATGGCGCCGAGCTGGACGCTGATCACCTG
 GCTTTAAGGACCCCGTGTACCGGGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTACAAC
 TACCGGCACGGCCAGCCTATTCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAAGAAAACCTG
 GGGCACCGTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGTACAAGACCCACGCCTGCTACGAGTACA
 ACCACATCTTCCCACTGCTCGAAAAGTACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGC
 TTGAGGACGTGTCCAGTTCTGTCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGCCG
 GACTGCTGAGCAGCAGAGATTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGTCCACTGTACCC
 AGTACATCAGACACGGCAGCAAGCCCATGTACACCCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAG
 CTGCTGGGACATGTGCCCCTGTTTCAGCGATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAGATC
 GGACTGGCTTCTCTGGGAGCCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCTACTGG
 TTCACCGTGGAATTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGACAGCATCAAAGCTTATGGCGCTGG
 CCTGCTGTCTAGCTTCGGCGAGCTGCAGTACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCC
 CCTGGAAGTGGAAAAGACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGT
 ACTACGTGGCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAAGTGCGGAATTCGCCGCCACC
 ATTCCTCGGCCTTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACACACAGCGGATCGAGGTGCTGGAC
 AACACACAGCAGCTGAAAATTCTGGCCGACTCCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTG
 CAGCGCCCTGCAGAAAATCAAGTGATAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCC
 CATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAAACAAAATGGT
 GGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAG
 ACAAACATGTTAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGGA
 TTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAAGTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGT
 GGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTC
 CTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAA
 CGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACC
 ACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCA
 TCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTGCTGGGCACTGATAATTCCG
 TGGTGTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCC
 TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
 CATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG
 GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAG
 AGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGG
 AACCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
 GGCGACCAAAGTTCGCCCCGACGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTG
 CCTGCAGG (配列番号194)

10

20

30

40

【0 8 3 3】

配列番号194は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、1、3×Serpenh-TTRe-TTRm、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0 8 3 4】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2

50

」)の核酸配列は、配列番号194を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号194からなる。

10

20

30

40

50

【0835】

29アミノ酸の欠失を有し、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__Codop2」)の核酸配列を、配列番号195として示す (ceDNA1274)。

【0836】

配列番号195は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2__Δ1-29aa、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0837】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 Δ1-29aaを含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2__Δ1-29aa」)の核酸配列は、配列番号195を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 Δ1-29aaを含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__

v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 8 5 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 0 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 1 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 2 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 3 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 4 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 5 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 6 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 7 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 8 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 と少なくとも 9 9 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 Δ 1 - 2 9 a a を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H __ c o d o p __ O R F __ v 2 __ Δ 1 - 2 9 a a 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 5 からなる。

10

20

30

40

50

【 0 8 3 8 】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H - r 5 - s 2 9 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 6 として示される (c e D N A 1 4 1 4) 。

【 0 8 3 9 】

配列番号 1 9 6 は、以下のエレメントを含む。左 __ I T R __ v 1、スペーサー __ 左 __ I T R __ v 2 . 1、3 × V a n D __ T T R e __ プロモーターセット、P m e I __ 部位、修飾型 __ 最小 __ コンセンサス __ コザック、h P A H - r 5 - s 2 9 : : h I V S 1 B、P a c I __ 部位、W P R E __ 3 p U T R、b G H、スペーサー __ 右 - I T R __ v 1、右 - I T R __ v 1 を含む。

【 0 8 4 0 】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H - r 5 - s 2 9 」) の核酸配列は、配列番号 1 9 6 を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス

調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号196からなる。

10

20

30

40

50

【0841】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号197として示される (ceDNA1416)。

【0842】

配列番号197は、以下のエレメントを含む。左__ITR__v1、スペーサー__左__ITR__v2、1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29::hIVS1B__33bp隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右__ITR__v1、右__ITR__v1を含む。

【0843】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号197を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号197と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有

s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 1 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 2 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 3 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 4 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 5 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 6 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 7 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 8 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 と少なくとも 9 9 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H - r 5 - s 2 9」) の核酸配列は、配列番号 1 9 8 からなる。

10

20

30

40

50

【0 8 4 6】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2」) の核酸配列は、配列番号 1 9 9 として示される (c e D N A 1 4 3 0) 。

【0 8 4 7】

配列番号 1 9 9 は、以下のエレメントを含む。左 - I T R _ v 1、スペーサー _ 左 - I T R _ v 2、1、3 × V a n D _ T T R e _ プロモーターセット、P m e I _ 部位、修飾型 _ 最小 _ コンセンサス _ コンセンサス _ コザック、h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2 _ m I V S - イントロン 1 B _ 3 3 b p 隣接、P a c I _ 部位、W P R E _ 3 p U T R、b G H、スペーサー _ 右 - I T R _ v 1、右 - I T R _ v 1。

【0 8 4 8】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2」) の核酸配列は、配列番号 1 9 9 を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2」) の核酸配列は、配列番号 1 9 9 と少なくとも 8 5 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2」) の核酸配列は、配列番号 1 9 9 と少なくとも 9 0 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2」) の核酸配列は、配列番号 1 9 9 と少なくとも 9 1 % 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト P A H バージョン 2 を含む c e D N A (c e D N A 「h P A H _ c o d o p _ O R F _ v 2」) の核酸配列は、配列

番号199と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号199からなる。

10

20

【0849】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号200として示される (ceDNA1432)。

【0850】

30

40

50

【化 1 3】

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
GCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG
AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAAACCCGCCATGCT
ACTTATCGCGGCCGCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATC
GGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAG
GTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGGAGGCTGCTGGT
GAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACGGT
ACCCACTGGGAGGATGTTGAGTAAGATGGAAACTACTGATGACCCTTGACAGAGACAGA
GTATTAGGACATGTTTGAACAGGGGCCGGGCGATCAGCAGGTAGCTCTAGAGGATCCCC
GTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTT
CATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAG
GTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGC
CCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTA
AGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCA
CTTTTTTTCAGGTTGGGTTTAAACCGCAGCCACCATGAGCACCGCCGTGCTGGAAAATCC
TGGCTTGGGCAGGAACTCTCTGACTTTGGACAGGTGAGCCACGGCAGCCTGAGCTGCTC
AGTTAGGGGAATTTGGGCCTCCAGAGAAAGAGATCCGAAGACTGCTGGTGCTTCCTGGT
TTCATAAGCTCAGTAAGAAGTCTGAATTTCGTTGGAAGCTGATGATAGAAGAAAGAGTTC

10

20

30

40

50

【 0 8 5 1】

【化 1 4】

ATGCTTGCTTTGTCCATGGAGGTTTAACAGGAATGAATTGCTAAACTGTGAAAAATGTTT
 TAAACAAATGCATCTTATCCTGTAGGAAACAAGCTATATTGAAGACAACCTGCAATCAAA
 ACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGCGCCCTGGCCAAGGTG
 CTGAGACTGTTTGAAGAGAACGACGTGAACCTGACACACATCGAGAGCAGACCCAGCAG
 ACTGAAGAAGGACGAGTACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGCGGAGCCTGCCTGCTC
 TGACCAACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCACGAACTGAGC
 CGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCAGAACCATCCAAGAGCTGGACAG
 ATTCGCCAACCAGATCCTGAGCTATGGCGCCGAGCTGGACGCTGATCACCTGGCTTTAA
 GGACCCCGTGTACCGGGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTACAACCTACCGGC
 ACGGCCAGCCTATTCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAGAAAACCTGGGGCACC
 GTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGTACAAGACCCACGCCTGCTACGAGTACAACCACATC
 TTCCCACTGCTCGAAAAGTACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGCTTGAGGAC
 GTGTCCAGTTTCTGCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCAGTTGCCGGACTGCTG
 AGCAGCAGAGATTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGTTCCTACTGTACCCAGTACATC
 AGACACGGCAGCAAGCCCATGTACACCCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAGCTGCTGGG
 ACATGTGCCCCTGTTTACGCGATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAGATCGGACTGGC
 TTCTCTGGGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCTACTGGTTCACCGT
 GGAATTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGACAGCATCAAAGCTTATGGCGCTGGCCTGCTGT
 CTAGCTTCGGCGAGCTGCAGTACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCCCCTGGAAC
 TGGAAAAGACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGTACTACGTG
 GCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAAGTGCGGAACTTCGCCGCCACCATTCTCTCG
 GCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACACACAGCGGATCGAGGTGCTGGACAACACAC
 AGCAGCTGAAAATTCTGGCCGACTCCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTGCAGCGCC
 CTGCAGAAAATCAAGTGAtagTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGT
 TCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAAT
 CATTTACATTTTATAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACAT
 GTTAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCGTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAA
 TTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTACGCTGTGTGGATATGC
 TGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTGT
 ATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGT
 GGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCA
 ACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCC
 TGCCTTGCCCCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTG
 TCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT
 GGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT
 GAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT
 GGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGC

10

20

30

40

【0 8 5 2】

【化 1 5】

TACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACACCTGCAGGAGGAACCCCTA
 GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA
 AAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
 (配列番号200)

【0 8 5 3】

50

配列番号 200 は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、1、3×Vand__TTRe__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2__修飾型__イントロン1__33bp 隣接、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0854】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 85% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 90% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 91% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 92% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 93% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 94% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 95% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 96% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 97% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 98% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 と少なくとも 99% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 200 からなる。

【0855】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 201 として示される (ceDNA 1436)。

【0856】

配列番号 202 は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、1、hAAT (979) __プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位

、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。
【0857】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号201からなる。

【0858】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号202として示される（ceDNA1458）。

【0859】

配列番号202は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、HBBv2__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0860】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2

」)の核酸配列は、配列番号202を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号202からなる。

10

20

30

40

50

【0861】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203として示される (ceDNA1459)。

【0862】

配列番号203は、以下のエレメントを含む。l左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、HBBv3__3pUTR、SV40__ポリA、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0863】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有する

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号203からなる。

10

20

30

【0864】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号204として示される (ceDNA1464)。

【0865】

配列番号204は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、SV40__ポリA、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0866】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号204を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号204と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号204と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」

40

50

）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号204からなる。

10

20

30

40

50

【0867】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号205として示される（ceDNA1466）。

【0868】

配列番号205は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、1、VD__プロモーターセット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、HBBv2__3pUTR、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0869】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号205を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号205と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号205と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号205と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列

番号205と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号205からなる。

10

20

30

40

50

【0870】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206として示される (ceDNA1471)。

【0871】

配列番号206は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、1、3×HNF1-4__ProEnh__10mer、BamHI__部位、TTR__肝臓__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0872】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号206と少なくと

も 93% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 と少なくとも 94% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 と少なくとも 95% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 と少なくとも 96% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 と少なくとも 97% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 と少なくとも 98% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 と少なくとも 99% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 206 からなる。

10

20

30

40

50

【0873】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 として示される (ceDNA 1472)。

【0874】

配列番号 207 は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スパーサー__左-ITR__v2.1、3×HNF1-4__ProEnh__10mer、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スパーサーなし、BamHI__部位、TTR__肝臓__特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スパーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0875】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 と少なくとも 85% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 と少なくとも 90% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 と少なくとも 91% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 と少なくとも 92% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 を含む ceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」) の核酸配列は、配列番号 207 と少なくとも 93% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有する

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号207からなる。

10

20

30

40

50

【0876】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208として示される (ceDNA1473)。

【0877】

配列番号208は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、CpG不含20mer__1、5×HNF1__肝臓__10mer、BamHI__部位、TTR__ProEnh特異的__プロモーター、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0878】

いくつかの実施形態によれば、特定のシスエレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号2082と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも94%同一である。い

くつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号208からなる。

10

【0879】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209として示される (ceDNA1474)。

20

【0880】

配列番号209は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、1、CpG不含20mer__1、5×HNF1__ProEnh__10mer、3×Vand__TTRe__プロモーターセット__v2、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0881】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号209と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態に

30

40

50

よれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号209と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号209と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号209と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号209と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号209からなる。

10

【0882】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210として示される（ceDNA1527）。

【0883】

配列番号210は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、1、3×VandTTRe__プロモーターセット__v2、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

20

【0884】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA（ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」）の核酸配列は、配列番号210と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調

30

40

50

節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号210と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号210と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号210と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号210からなる。

10

【0885】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211として示される (ceDNA1528)。

【0886】

配列番号211は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2.1、CpGmin__hAAT__プロモーター__プロモーター__セット、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH__codop__ORF__v2、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

20

【0887】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有する

30

40

50

コドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2を含むceDNA (ceDNA「hPAH__codop__ORF__v2」)の核酸配列は、配列番号211からなる。

【0888】

特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212として示される。(ceDNA1529)。

【0889】

配列番号212は、以下のエレメントを含む。左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スペーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スペーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スペーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r3-s34、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

【0890】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceD

10

20

30

40

50

NA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r3-s34を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r3-s34」)の核酸配列は、配列番号212からなる。

【0891】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213として示される (ceDNA1530)。

10

【0892】

配列番号213は、以下のエレメントを含む：左-ITR__v1、スペーサー__左-ITR__v2、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スペーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スペーサーなし、HS-CRM8__SERP__エンハンサー__スペーサーなし、BamHI__部位、TTR-プロモーター-d5pUTR、MVM__イントロン、PmeI__部位、修飾型__最小__コンセンサス__コザック、hPAH-r5-s29、PacI__部位、WPRE__3pUTR、bGH、スペーサー__右-ITR__v1、右-ITR__v1。

20

【0893】

いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213を含む。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも85%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも91%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも92%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも93%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも94%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも96%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒトPAHバージョン2 r5-s29を含むceDNA (ceDNA「hPAH-r5-s29」)の核酸配列は、配列番号213と少なく

30

40

50

とも 98% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H - r 5 - s 2 9 」) の核酸配列は、配列番号 2 1 3 と少なくとも 99% 同一である。いくつかの実施形態によれば、特定のシス調節エレメントを有するコドン最適化ヒト PAH バージョン 2 r 5 - s 2 9 を含む c e D N A (c e D N A 「 h P A H - r 5 - s 2 9 」) の核酸配列は、配列番号 2 1 3 からなる。

【 0 8 9 4 】

更なる全長 c e D N A P A H 構築物の配列が、表 3 5 に示される。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列と少なくとも 90% 同一である。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列と少なくとも 95% 同一である。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列と少なくとも 96% 同一である。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列と少なくとも 97% 同一である。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列と少なくとも 98% 同一である。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列と少なくとも 99% 同一である。いくつかの実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列を含む。一部の実施形態では、全長 c e D N A P A H 構築物配列の核酸配列は、表 3 5 に示される任意の配列からなる。

【 0 8 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 3 5. 更なる全長 c e D N A P A H 構築物の配列

登録ID	配列識別子
ceDNA1137	541
ceDNA1146	542
ceDNA1279	543
ceDNA1285	544
ceDNA1475	545
ceDNA1476	546
ceDNA1477	547
ceDNA1478	548
ceDNA1479	549
ceDNA1480	550
ceDNA1497	551
ceDNA1498	552
ceDNA1499	553
ceDNA1500	554
ceDNA1501	555
ceDNA1502	556
ceDNA1503	557
ceDNA1504	558
ceDNA1505	559
ceDNA1531	560
ceDNA1532	561
ceDNA1939	562
ceDNA1940	563
ceDNA1941	564
ceDNA1942	565
ceDNA1943	566
ceDNA1945	567
ceDNA1955	568
ceDNA62	569
ceDNA2409	570
ceDNA2410	571
ceDNA2415	572
ceDNA2418	573
ceDNA2416	574
ceDNA2419	575
ceDNA2420	576
ceDNA34	577
ceDNA35	578
ceDNA36	579
ceDNA37	580
ceDNA41	581
ceDNA42	582
ceDNA43	583
ceDNA44	584

10

20

30

40

【 0 8 9 6 】

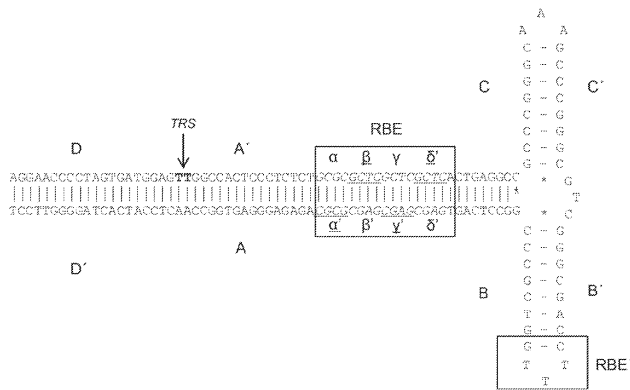
参考文献

特許及び特許出願を含むがこれらに限定されない、本明細書及び本明細書の実施例で引用される全ての刊行物及び参考文献は、あたかも個々の刊行物又は参考文献が、完全に記載されるように参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、それらの全体が参照により組み込まれる。この出願が優先権を主張する任意の特許出願もまた、刊行物及び参考文献について上述した方法で、参照により本明細書に組み込まれる。

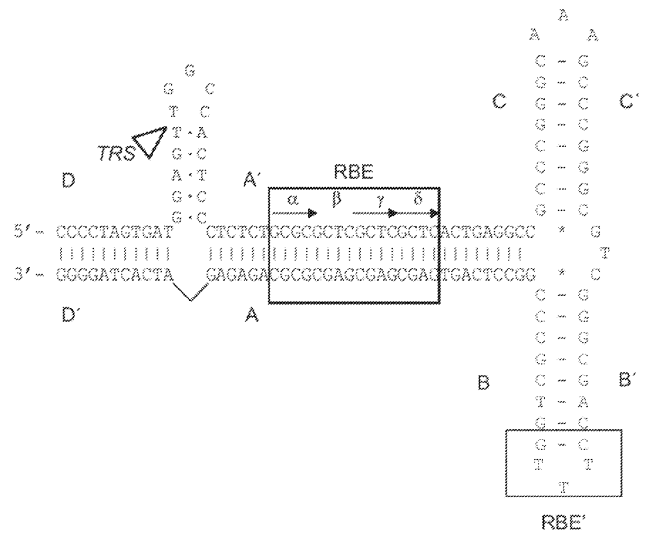
50

【図面】

【図 1 A】

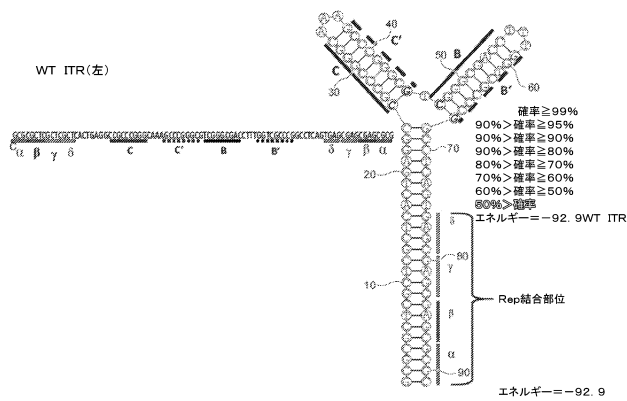


【図 1 B】

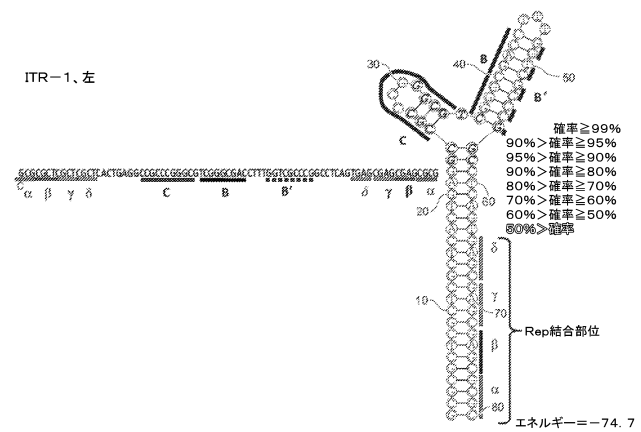


10

【図 2 A】



【図 2 B】



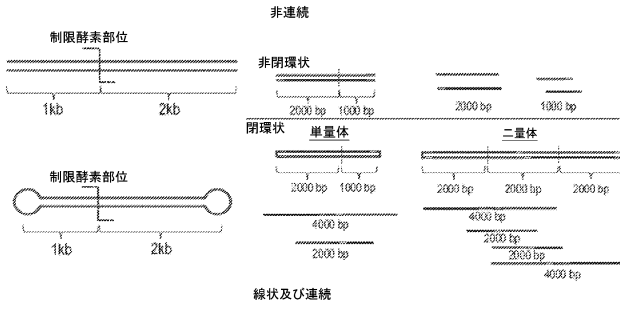
20

30

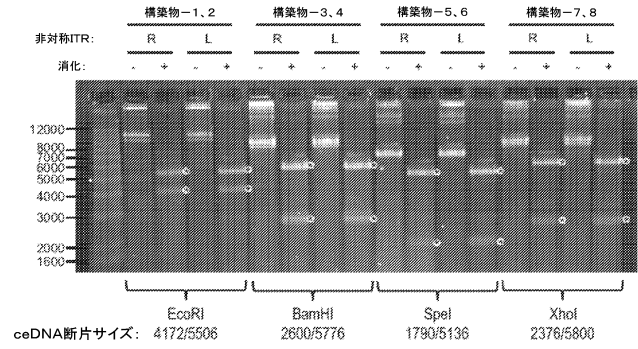
40

50

【図 3 E】

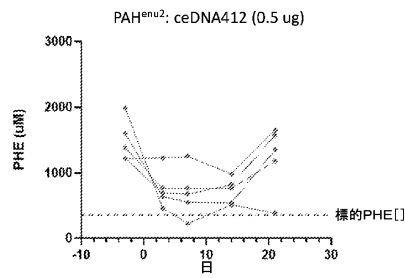


【図 4】

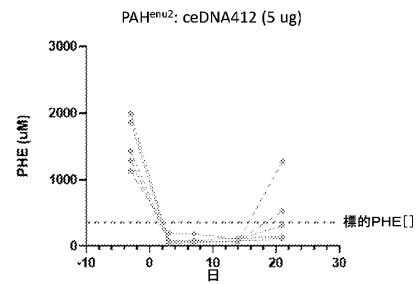


10

【図 5 A】

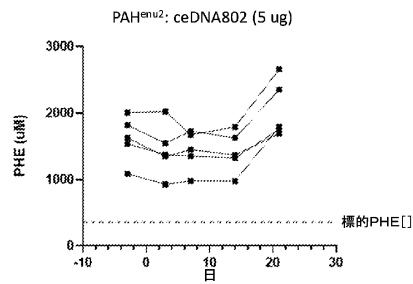


【図 5 B】

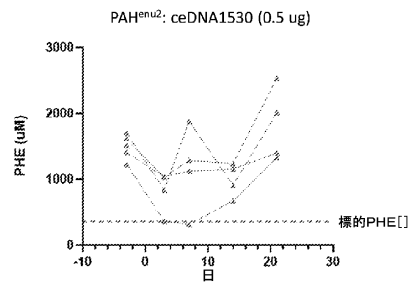


20

【図 5 C】



【図 5 D】

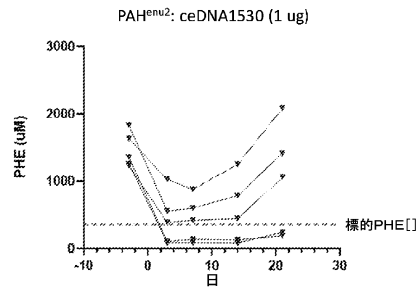


30

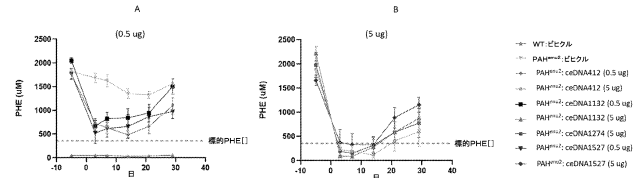
40

50

【図 5 E】

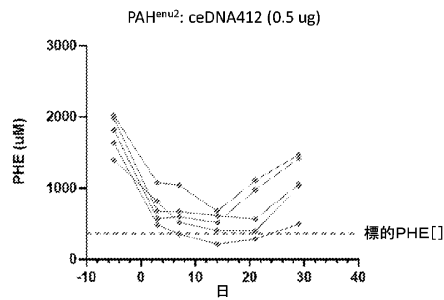


【図 6】

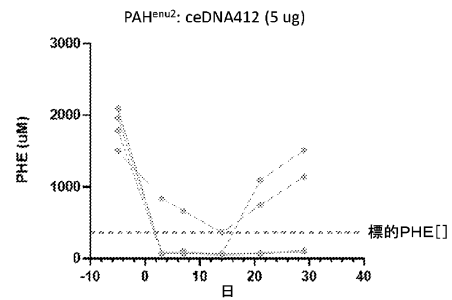


10

【図 7 A】

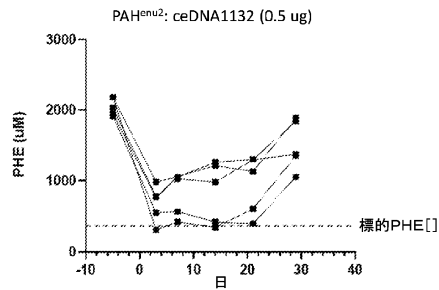


【図 7 B】

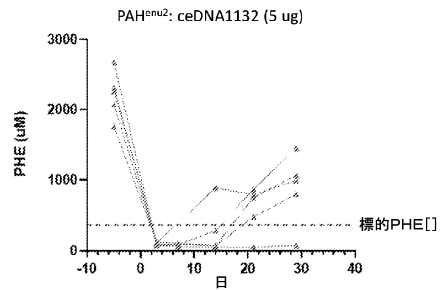


20

【図 7 C】



【図 7 D】

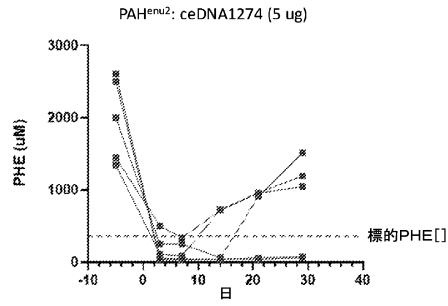


30

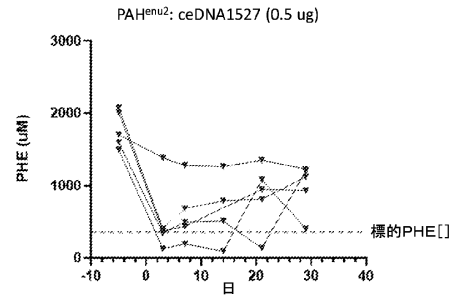
40

50

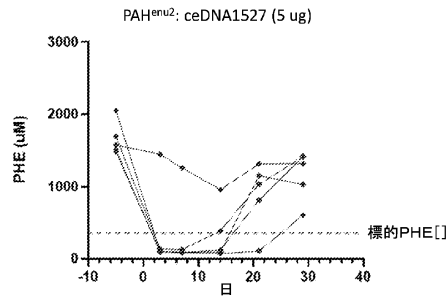
【図 7 E】



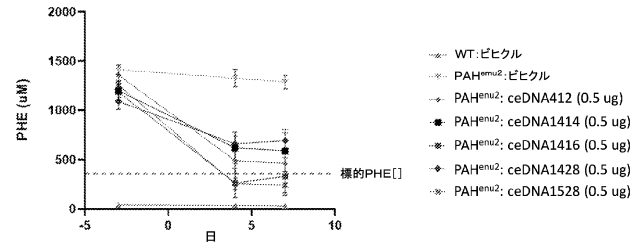
【図 7 F】



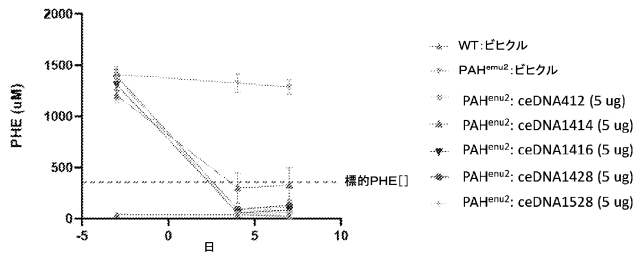
【図 7 G】



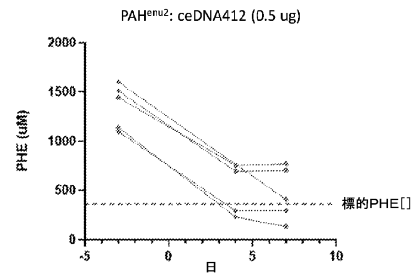
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9 A】



10

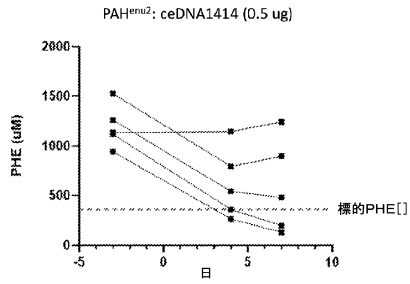
20

30

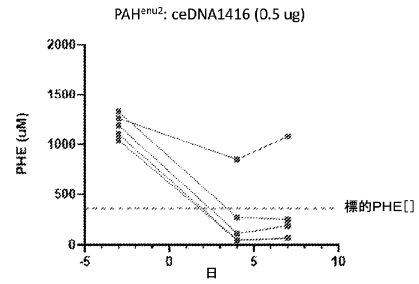
40

50

【図 9 B】

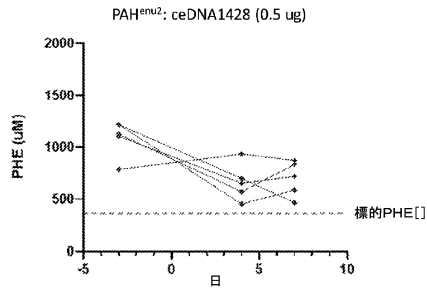


【図 9 C】

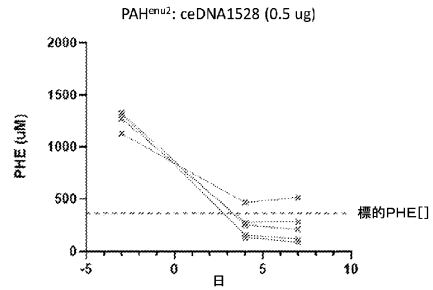


10

【図 9 D】

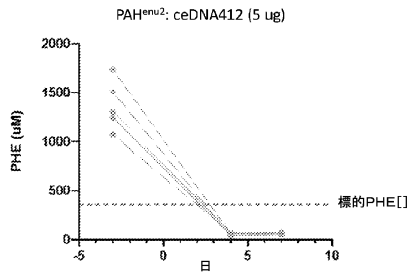


【図 9 E】

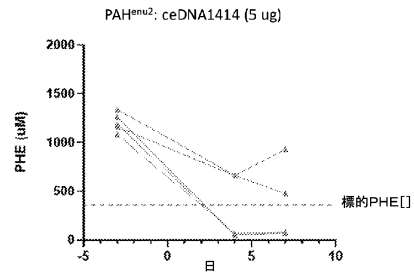


20

【図 1 0 A】



【図 1 0 B】

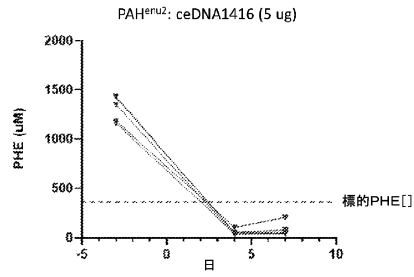


30

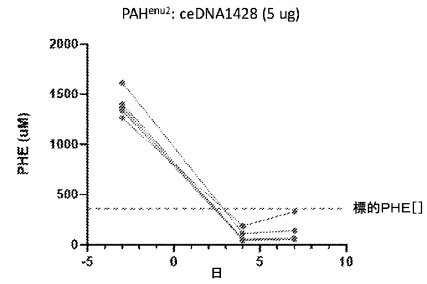
40

50

【図 10 C】

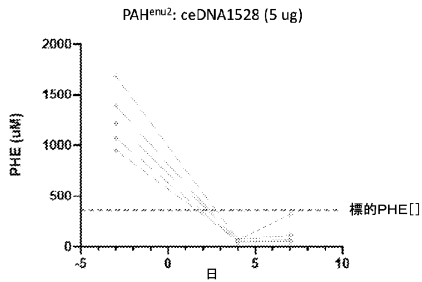


【図 10 D】

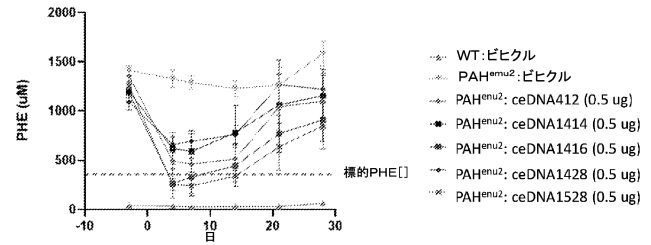


10

【図 10 E】

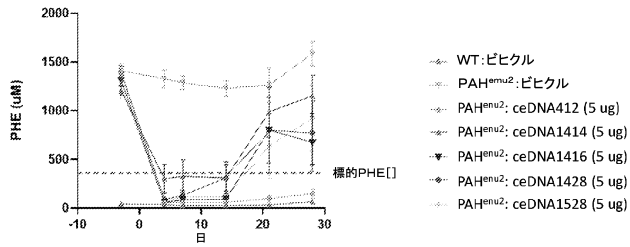


【図 11 A】

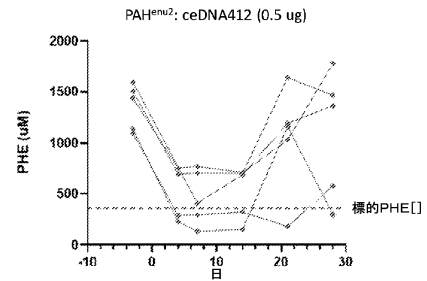


20

【図 11 B】



【図 12 A】

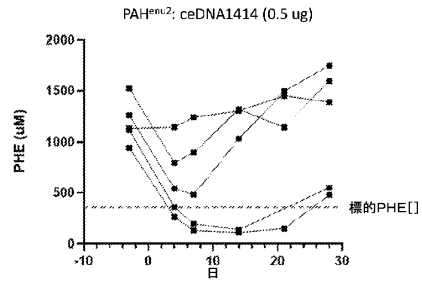


30

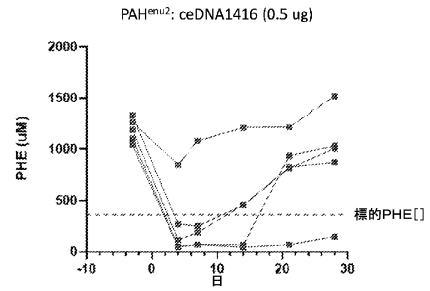
40

50

【図 1 2 B】

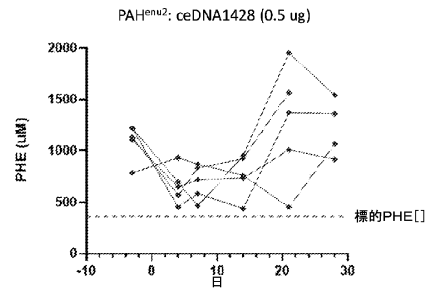


【図 1 2 C】

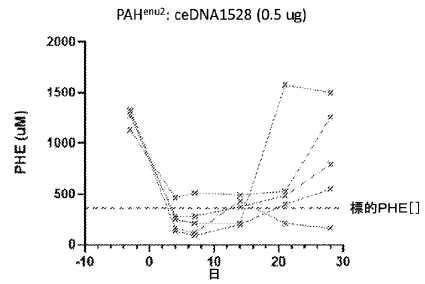


10

【図 1 2 D】

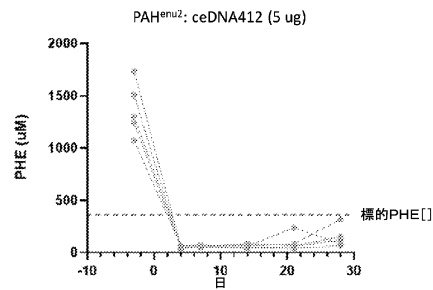


【図 1 2 E】

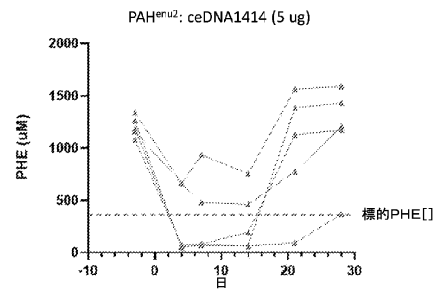


20

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

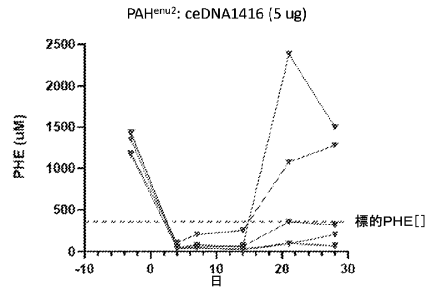


30

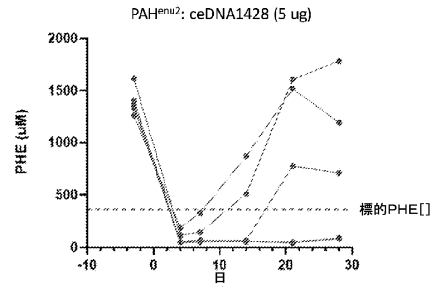
40

50

【図 1 3 C】

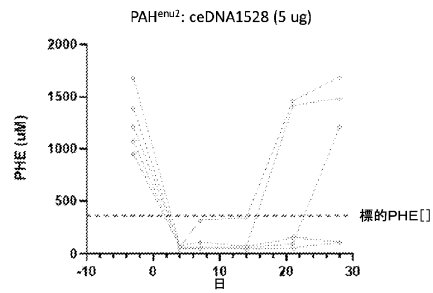


【図 1 3 D】

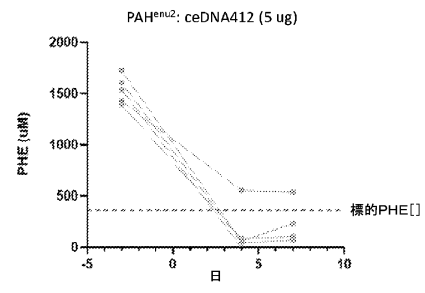


10

【図 1 3 E】

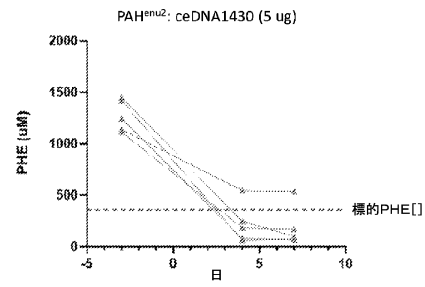


【図 1 4 A】

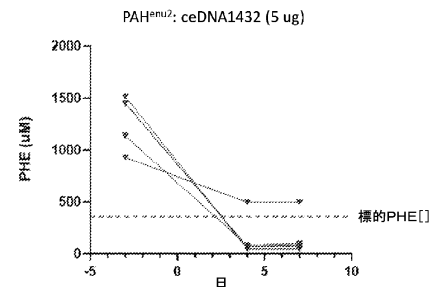


20

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】

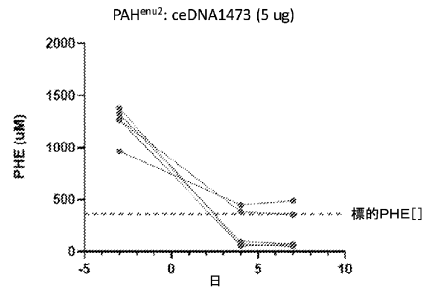


30

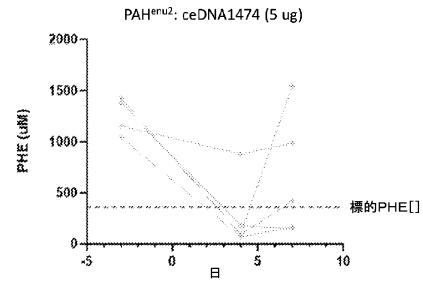
40

50

【図 1 4 D】

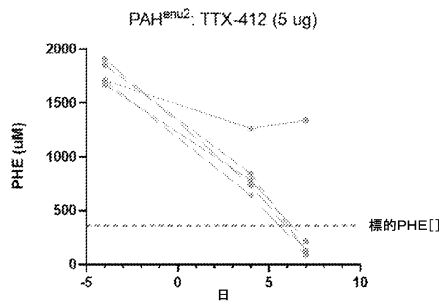


【図 1 4 E】

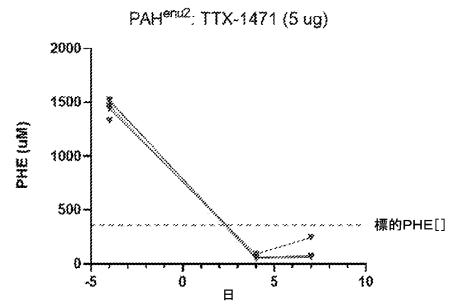


10

【図 1 4 F】

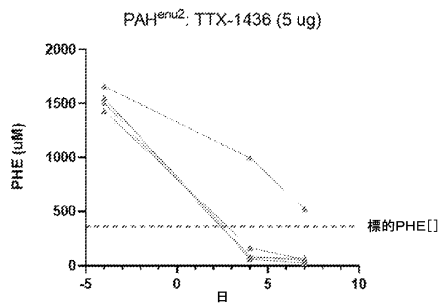


【図 1 4 G】

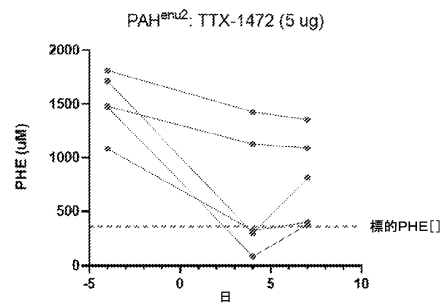


20

【図 1 4 H】



【図 1 4 I】

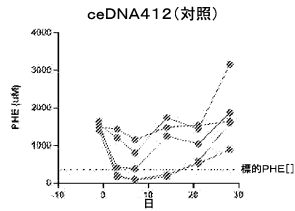


30

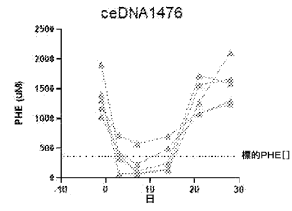
40

50

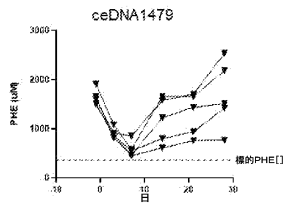
【図 1 5 A】



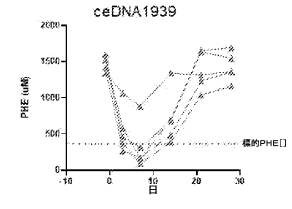
【図 1 5 B】



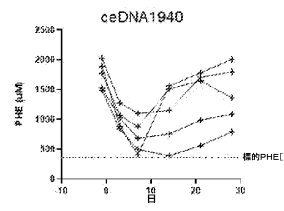
【図 1 5 C】



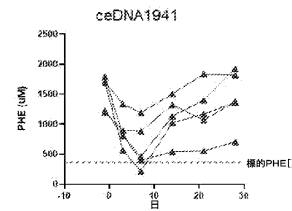
【図 1 5 D】



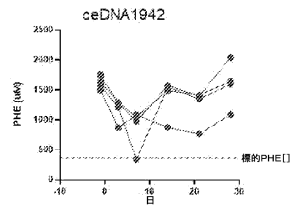
【図 1 5 E】



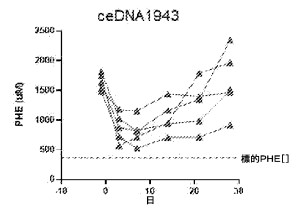
【図 1 5 F】



【図 1 5 G】



【図 1 5 H】



10

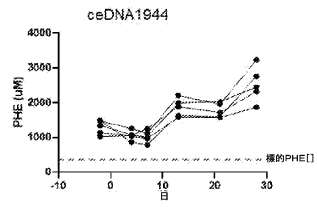
20

30

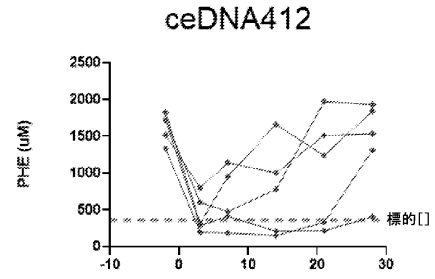
40

50

【図 1 5 I】

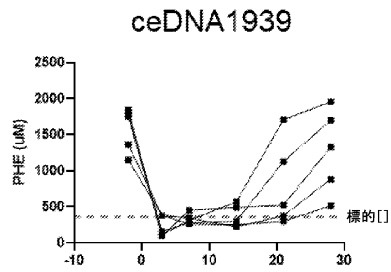


【図 1 6 A】

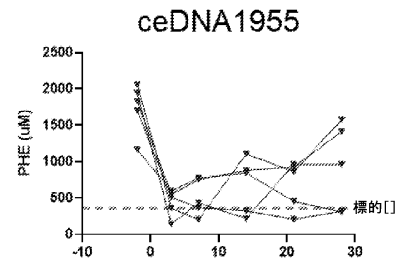


10

【図 1 6 B】

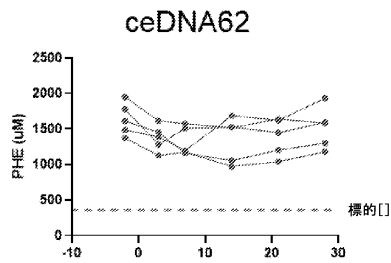


【図 1 6 C】

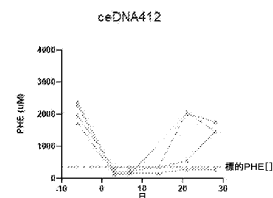


20

【図 1 6 D】



【図 1 7 A】

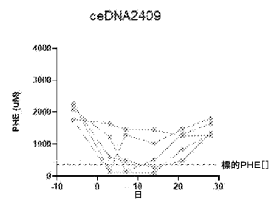


30

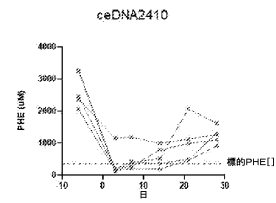
40

50

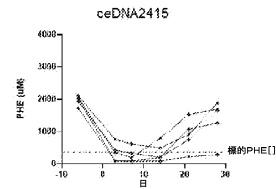
【図 17 B】



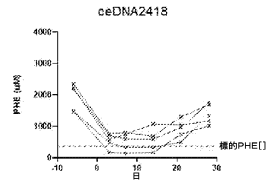
【図 17 C】



【図 17 D】

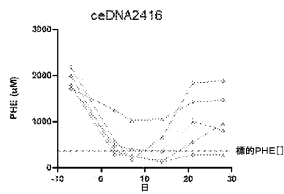


【図 17 E】

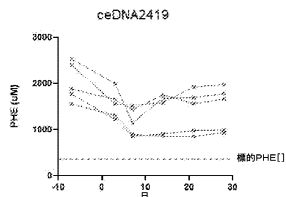


10

【図 17 F】

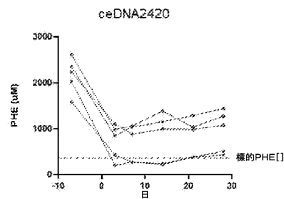


【図 17 G】

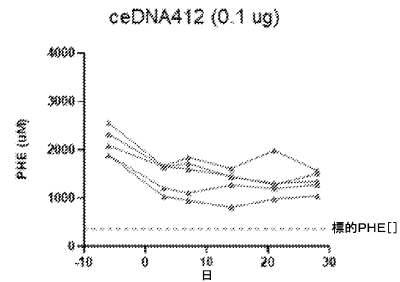


20

【図 17 H】



【図 18 A】

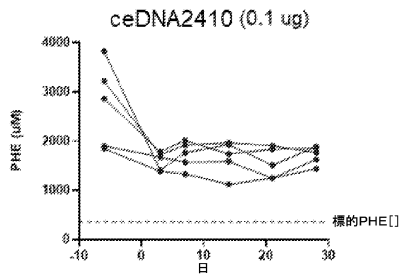


30

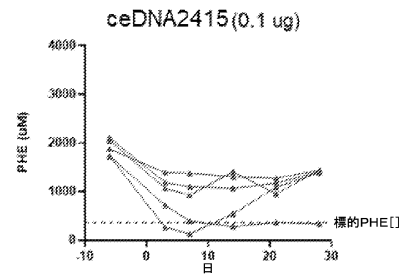
40

50

【図 18 B】

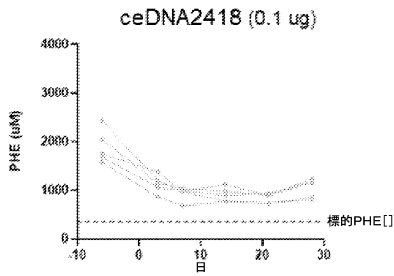


【図 18 C】

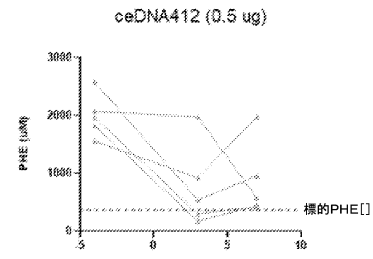


10

【図 18 D】

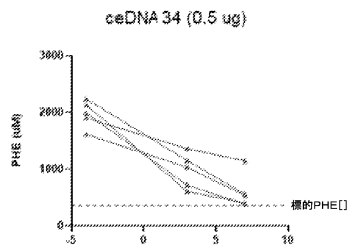


【図 19 A】

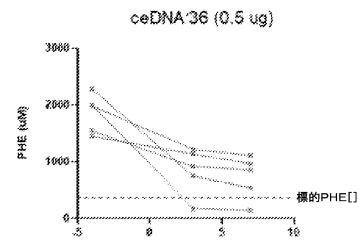


20

【図 19 B】



【図 19 C】

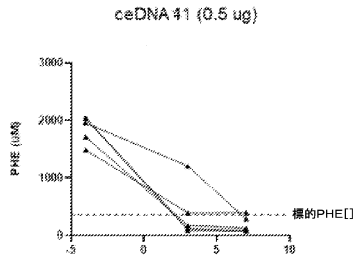


30

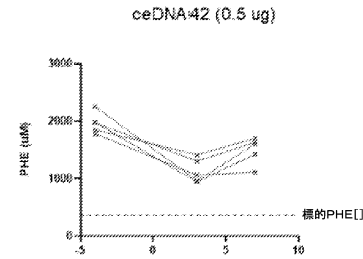
40

50

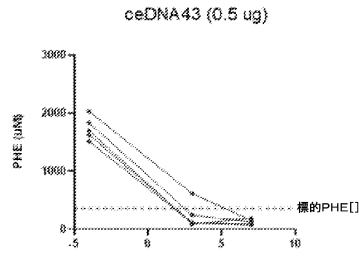
【図 19 D】



【図 19 E】



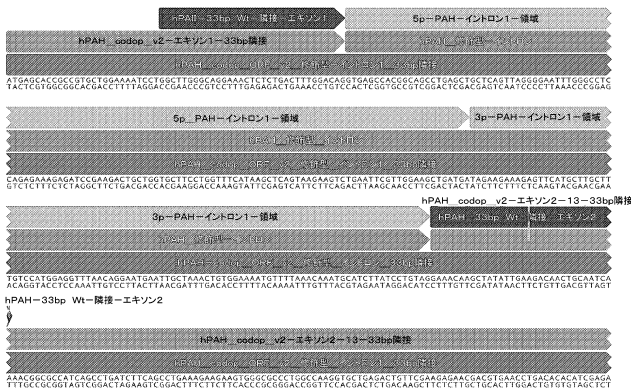
【図 19 F】



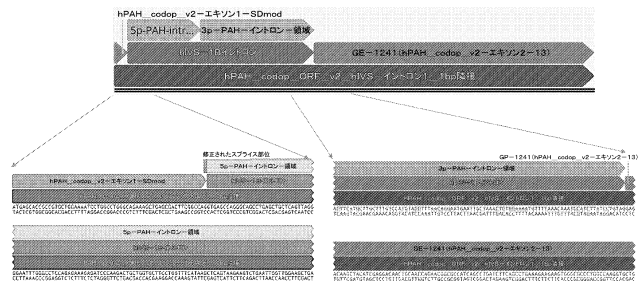
【図 20 A】



【図 20 B】



【図 21】



【配列表】

2023542131000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US21/50695
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12N 9/02; C12N 15/85; A61K 48/00 (2021.01) CPC - C12N 9/0071; C12N 15/85; A61K 48/0066; A61K 48/0058; A61K 48/005; C12Y 114/16001; C12N 2310/532; C12N 2800/107; C12N 2800/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2020/0283794 A1 (GENERATION BIO CO.) 10 September 2020; paragraphs [0014], [0412], [0421]; Claim 1	1-3, 17/1-3, 37/1-3, 38/1-3 — 4-7, 8/1-7, 9/1-7, 10/1-7, 17/4-7, 37/4-7, 38/4-7
Y — A	US 2019/0336550 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 07 November 2019; claims 1-2	1-3, 17/1-3, 37/1-3, 38/1-3 — 4-7, 8/1-7, 9/1-7, 10/1-7, 17/4-7, 37/4-7, 38/4-7
Y — A	US 2018/0071406 A1 (VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL) 15 March 2018; paragraphs [0076], [0104]	1-3, 17/1-3, 37/1-3, 38/1-3 — 4-7, 8/1-7, 9/1-7, 10/1-7, 17/4-7, 37/4-7, 38/4-7
A —	(NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) PREDICTED: Cavia porcellus phenylalanine hydroxylase (Pah), mRNA. Genbank entry (online). 19 January 2018 [retrieved on 14 January 2022]. Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_003476068.3]; pages 1-2	4-7, 8/1-7, 9/1-7, 10/1-7, 17/4-7, 37/4-7, 38/4-7
P,X	WO 2020/186150 A2 (GENERATION BIO CO.) 17 September 2020; entire document	1-10, 17, 37-38
☒ 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 15 January 2022 (15.01.2022)		Date of mailing of the international search report FEB 07 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/50695

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	WO 2020/243717 A1 (AMERICAN GENE TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 03 December 2020; entire document	1-10, 17, 37-38

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/50695

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

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

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

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/50695

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.: 23-27, 33-36, 40-86
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:
-Please See 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.:
Group I+, Claims 1-7, 8-22, 28-32, and 37-39; SEQ ID NO: 382 (nucleic acid sequence encoding PAH), VD promoter comprising SEQ ID NO: 191 (promoter sequence)

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/US21/50695

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

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 examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-7, 8-22, 28-32, and 37-39; SEQ ID NO: 382 (nucleic acid sequence encoding PAH), VD promoter comprising SEQ ID NO: 191 (promoter sequence) are directed to closed-ended DNA vectors.

The closed-ended DNA vectors of Claims 1-7 (each in-part), 8-10, 17, and 37-38 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise a nucleic acid sequence encoding PAH and a promoter sequence encompassing SEQ ID NO: 382 (first exemplary nucleic acid sequence encoding PAH) and a VD promoter comprising SEQ ID NO: 191 (first exemplary promoter sequence).

Applicant is invited to elect additional PAH-encoding nucleic acid sequences or promoter sequences, with specified SEQ ID NO for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). 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/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 383 (nucleic acid sequence encoding PAH).

The inventions listed as Groups I+ 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:

No technical features are shared between the nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a closed-ended DNA (cdDNA) vector comprising: at least one nucleic acid sequence that encodes at least one phenylalanine hydroxylase (PAH) protein, wherein the at least one nucleic acid sequence is codon optimized, and wherein the at least one nucleic acid sequence is located between flanking inverted terminal repeats (ITRs); and a promoter operatively linked to the least one nucleotide sequence that encodes the at least one PAH protein; these shared technical features are previously disclosed by US 2020/0283794 A1 to GENERATION BIO CO. (hereinafter "Generation").

Generation discloses a closed-ended DNA, cdDNA, vector (a non-viral capsid-free DNA vector with covalently-closed ends; Claim 1) comprising: at least one nucleic acid sequence that encodes at least one phenylalanine hydroxylase, PAH, protein (the cdDNA vector comprises a transgene that can be used to produce a protein to treat a disease or disorder, including a phenylalanine hydroxylase enzyme to treat PKU; paragraphs [0014], [0421]), wherein the at least one nucleic acid sequence is codon optimized (paragraph [0412]), and wherein the at least one nucleic acid sequence is located between flanking inverted terminal repeats, ITRs (wherein the cdDNA vector comprises at least one heterologous nucleotide sequence operably positioned between asymmetric inverted terminal repeat sequences; Claim 1); and a promoter operatively linked to the least one nucleotide sequence that encodes the at least one PAH protein (promoter region operably linked to the transgene, which can be a phenylalanine hydroxylase gene; paragraphs [0014], [0421]). Generation does not disclose specifically disclose, in a discrete, preferred embodiment, that the vector comprises a nucleic acid sequence encoding a phenylalanine hydroxylase protein. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have selected phenylalanine hydroxylase from the list of therapeutic proteins that can be encoded by the vectors in order to treat PKU disease (PKU disease treatment with phenylalanine hydroxylase gene therapy is disclosed in a list of 8 different diseases; paragraph [0014]), as this disease is fairly common and significantly deleterious to those suffering from it, and as an enzyme deficiency is a potential candidate for gene therapy treatment.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Generation reference, unity of invention is lacking.

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 15/88 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/711 (2006.01)
A 6 1 P 3/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/88 Z
A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/711
A 6 1 P 3/00

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,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

(72)発明者 リウ, リア ユー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 モンズ, ラッセル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 チオッコ, マシュー ジェイムズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 シルバー, ナサニエル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 サマヨア, フィリップ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 カー, ダグラス アンソニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 キーナン, ジェシカ リン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 0 1,
 4 ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

F ターム (参考)

4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01

4C084 AA13 MA24 MA55 MA66 NA05 ZC54

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA24 MA55 MA66 NA05 ZC54

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA24 MA55 MA66 NA05 ZC54