

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552443

(P2023-552443A)

(43)公表日 令和5年12月15日(2023.12.15)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/706 (2006.01)	A 6 1 K 31/706	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/57 (2006.01)	A 6 1 K 31/57	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全84頁) 最終頁に続く		

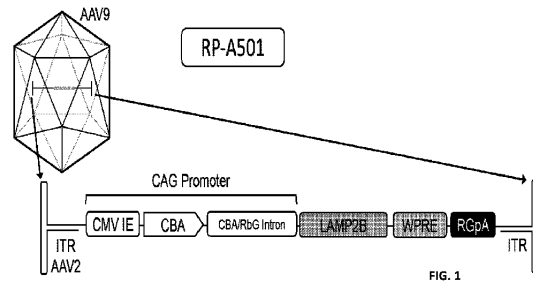
(21)出願番号	特願2023-534292(P2023-534292)	(71)出願人	521067485
(86)(22)出願日	令和3年12月7日(2021.12.7)		スペースクラフト セブン リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年8月1日(2023.8.1)		ライアビリティ カンパニー
(86)国際出願番号	PCT/US2021/062112		アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャ
(87)国際公開番号	WO2022/125489		ージョ州 クランベリー シダー ブルック
(87)国際公開日	令和4年6月16日(2022.6.16)		ドライブ 9
(31)優先権主張番号	63/122,249	(74)代理人	100102978
(32)優先日	令和2年12月7日(2020.12.7)		弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100205707
			弁理士 小寺 秀紀
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ダノン病の治療

(57)【要約】

ダノン病に罹患している若しくはダノン病のリスクがあると特定された、及びノ又はLAMP-2遺伝子の1つ以上のアイソフォームに不活性化変異を有すると特定された対象におけるダノン病を治療するための方法が提供される。本方法は、治療有効量の、カプシド及びベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ピリオンを対象に投与することを含んでもよく、当該ベクターゲノムが、LAMP-2タンパク質、好ましくはLAMP-2Bタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ダノン病に罹患している若しくはダノン病のリスクがあると特定された、及び/又は LAMP - 2 遺伝子の 1 つ以上のアイソフォームに不活性化変異を有すると特定された対象におけるダノン病を治療するための方法であって、

治療有効量の、カプシド及びベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンを、前記対象に投与することを含み、

前記ベクターゲノムが、LAMP - 2 タンパク質、好ましくは LAMP - 2 B タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む、

前記方法。

10

【請求項 2】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 キログラム (k g) あたり約 2×10^{14} ベクターゲノム (v g) 未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり約 1.5×10^{14} v g 未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり約 1×10^{14} v g 未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり少なくとも約 1×10^{12} v g である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり少なくとも約 1×10^{13} v g である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり約 6.7×10^{13} v g である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり約 1.1×10^{14} v g である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 k g あたり約 2.0×10^{14} v g である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

有効量のタクロリムスを前記対象に投与することを更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

有効量のリツキシマブを前記対象に投与することを更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

有効量のタクロリムスを前記対象に投与することと、有効量のリツキシマブを前記対象に投与することと、を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

有効量のエクリズマブを前記対象に投与することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

有効量のリツキシマブを前記対象に投与すること、有効量のタクロリムスを前記対象に投与すること、及び/又は有効量のエクリズマブを前記対象に投与することを更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記対象は、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）、任意選択的に、可逆性血小板減少症及び／又は急性腎障害（AKI）をもたらすaHUSのリスクがある、請求項13に記載の方法。

【請求項 16】

有効量のコルチコステロイドを前記対象に投与することを更に含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

有効量のタクロリムスを投与する前に、有効量のコルチコステロイドを前記対象に投与することを含む、請求項16に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記対象が、任意選択的に8～14歳及び／又は15～17歳の若年対象である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記対象が、任意選択的に0～8歳の小児対象である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が、任意選択的に18歳以上の成人対象である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記治療有効量の前記AAVが静脈内投与される、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記治療有効量の前記AAVが直接心臓注射により投与される、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記治療有効量の前記AAVが腹腔内注射により投与される、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

a) 前記AAVによる心筋細胞及び／若しくは骨格筋の形質導入、
 b) 任意選択的に心筋細胞及び／若しくは骨格筋における、LAMP-2Bをコードする外因性リボ核酸ポリヌクレオチドの発現及び／若しくは外因性LAMP-2Bタンパク質の発現、
 c) 1つ以上のダノン病関連組織学的異常、任意選択的に自己貪食空胞若しくは筋原線維錯綜配列の補正若しくは改善、
 d) 心筋細胞分子マーカー発現の補正若しくは改善、並びに／又は
 e) 心筋細胞組織学の補正若しくは改善
 のうちの1つ以上をもたらす、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

a) 心血管病態生理学、X線評価、及び／若しくは、心肺運動／生理学的パラメータの持続的改善若しくは安定化、
 b) LAMP2B遺伝子及び／若しくはタンパク質発現の補正、
 c) ダノン病関連組織学的異常の改善、並びに／又は
 d) AAVに対する耐容免疫応答
 のうちの1つ以上をもたらす、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 26】

a) 心血管病態生理学、X線評価、及び／若しくは、心肺運動／生理学的パラメータの持続的改善若しくは安定化、
 b) LAMP2B遺伝子及び／若しくはタンパク質発現の補正、
 c) ダノン病関連組織学的異常の改善、並びに／又は

50

d) AAVに対する耐容免疫応答

のうちの1つ以上をもたらす、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

a) 治療下で発現した有害事象 (TEAE) 及びSAEの低い発生率及び/又は強度、

b) 心臓移植、植込み型除細動器若しくはペースメーカー留置、心臓伝導異常に対する電気生理学的切除術、又は、心不全によるその後の入院を含む、心臓インターベンションの低い発生率、

c) AAV、任意選択的にAAV及び/又はLAMP-2Bタンパク質に反応性の抗体又はTリンパ球に対する低い免疫応答、

d) 肝毒性の低い発生率及び/又は強度、任意選択的に肝トランスアミナーゼ (AST及びALT)、GGT、ビリルビン、及びALPの小さな変化、並びに/あるいは

e) 血小板数、プロトロンビン時間 (PT、若しくは国際標準化比 (INR))、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)、フィブリノゲン、D-ダイマー、トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT)、及び補体成分 (補体3 (C3)、補体4 (C4))、及び血清膜侵襲複合体 (sC5b-9) のベースラインからの変化に基づく、h凝固障害の低い発生率及び/又は強度

のうちの1つ以上をもたらす、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記AAVが、プロモーターに作動可能に連結された前記LAMP-2Bタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列を含む発現カセットを含み、かつ、

前記ポリヌクレオチド配列が配列番号2に対する少なくとも95%の同一性を共有する、及び/又は前記LAMP-2Bタンパク質が配列番号1に対する少なくとも95%の同一性を共有する、

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

前記ポリヌクレオチド配列が配列番号2を含む若しくはそれからなる、及び/又は前記LAMP-2Bタンパク質が配列番号1を含む若しくはそれからなる、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記プロモーターがCAGプロモーターである、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記プロモーターが、配列番号22に対する少なくとも95%の同一性を共有するエンハンサー/プロモーター領域を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記エンハンサー/プロモーター領域が配列番号22を含む又はそれからなる、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記発現カセットが、5 から3 の順に、

(a) 配列番号22を含むエンハンサー/プロモーター領域、

(b) 配列番号3を含み、前記LAMP-2Bタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列、

(c) 配列番号27を含む3' UTR配列、及び/又は

(d) 配列番号7を含むポリアデニル化配列

を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項34】

前記発現カセットが、(i) 配列番号11を含む5' ITRと、(ii) 配列番号12を含む3' ITRとに隣接している、請求項28に記載の方法。

【請求項35】

前記発現カセットが配列番号8を含む、請求項28に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

前記カプシドが AAV9 カプシドである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 AAV9 カプシドが、配列番号 28 のアミノ酸 1 ~ 736、配列番号 28 のアミノ酸 138 ~ 736、又は配列番号 28 のアミノ酸 203 ~ 736 を含む 1 つ以上のカプシドタンパク質を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

治療有効量の、LAMP-2 タンパク質、好ましくは LAMP-2 B タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) を含む、ダノン病の治療における使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

10

【請求項 39】

前記治療有効量が、前記対象の体重 1 キログラム (kg) あたり約 2×10^{14} ベクターゲノム (vg) 未満である、請求項 38 に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 40】

前記治療有効量が、約 1.5×10^{14} vg / kg 未満である、請求項 38 に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 41】

前記治療有効量が、約 1×10^{14} vg / kg 未満である、請求項 38 に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

20

【請求項 42】

前記治療有効量が、少なくとも約 1×10^{12} vg / kg である、請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 43】

前記治療有効量が、少なくとも約 1×10^{13} vg / kg である、請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 44】

前記治療有効量が、約 6.7×10^{13} vg / kg である、請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 45】

前記治療有効量が、約 1.1×10^{14} vg / kg である、請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

30

【請求項 46】

前記治療有効量が、約 2.0×10^{14} vg / kg である、請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 47】

前記 AAV が、プロモーターに作動可能に連結された前記 LAMP-2 B タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列を含む発現カセットを含み、かつ、

前記ポリヌクレオチド配列が配列番号 2 に対する少なくとも 95% の同一性を共有する、及び / 又は前記 LAMP-2 B タンパク質が配列番号 1 に対する少なくとも 95% の同一性を共有する、

請求項 38 ~ 46 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

40

【請求項 48】

前記ポリヌクレオチド配列が配列番号 2 を含む若しくはそれからなる、及び / 又は前記 LAMP-2 B タンパク質が配列番号 1 を含む若しくはそれからなる、請求項 38 ~ 47 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 49】

前記プロモーターが CAG プロモーターである、請求項 38 ~ 48 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

50

【請求項 5 0】

前記プロモーターが、配列番号 2 2 に対する少なくとも 9 5 % の同一性を共有するエンハンサー/プロモーター領域を含む、請求項 3 8 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 1】

前記エンハンサー/プロモーター領域が配列番号 2 2 を含む又はそれからなる、請求項 3 8 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 2】

前記発現カセットが、5 から 3 の順に、

(a) 配列番号 2 2 を含むエンハンサー/プロモーター領域、

(b) 配列番号 3 を含み、前記 L A M P - 2 B タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド配列、

(c) 配列番号 2 7 を含む 3' U T R 配列、及び/又は

(d) 配列番号 7 を含むポリアデニル化配列

を含む、請求項 3 8 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 3】

前記発現カセットが、(i) 配列番号 1 1 を含む 5' I T R と、(i i) 配列番号 1 2 を含む 3' I T R とに隣接している、請求項 3 8 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 4】

前記発現カセットが配列番号 8 を含む、請求項 3 8 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 5】

前記カプシドが A A V 9 カプシドである、請求項 3 8 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 6】

前記 A A V 9 カプシドが、配列番号 2 8 のアミノ酸 1 ~ 7 3 6、配列番号 2 8 のアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6、又は配列番号 2 8 のアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 を含む 1 つ以上のカプシドタンパク質を含む、請求項 5 5 に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物。

【請求項 5 7】

請求項 3 8 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物と、ダノン病の治療における使用のための説明書と、を含む、キット。

【請求項 5 8】

前記キットが、リツキシマブ、タクロリムス、エクリズマブ、及びコルチコステロイドのうちの 1 つ以上を含む 1 つ以上の単位用量、医薬組成物、又は組成物を更に含む、請求項 5 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 0 年 1 2 月 7 日に提出された米国仮特許出願第 6 3 / 1 2 2 , 2 4 9 号、表題「Treatment of Danon Disease」に対する優先権を主張し、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、E F S - W e b を介して電子出願されており、. t x t 形式の電子的に提出された配列表を含む。この . t x t ファイルには、2 0 2 1 年 1 2 月 7 日に作成され、約 6 2 キロバイトのサイズを有する「R O P A _ 0 2 3 _ 0 1 W O _ S e q L i s t _ S T

10

20

30

40

50

25 . t x t 」と題される配列表が含まれている。この . t x t ファイルに含まれている配列表は、本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

発明の分野

本発明は、概して、ダノン病におけるアデノ関連ウイルス (A A V) 遺伝子療法の臨床使用に関する。

【背景技術】

【0004】

リソソーム関連膜タンパク質 2 (L A M P - 2、別名、C D 1 0 7 b) は、リソソーム関連膜糖タンパク質をコードする遺伝子である。この遺伝子の選択的スプライシングにより、3つのアイソフォーム、L A M P - 2 A、L A M P - 2 B、及び L A M P - 2 C が生成される。L A M P - 2 の機能喪失型変異は、オートファジー障害に関連する家族性筋症であるダノン病を含むヒト疾患と関連している。

10

【0005】

国際特許出願公開第 2 0 1 7 / 1 2 7 5 6 5 A 1 号 (特許文献 1) は、H a s h e m , e t a l . , S t e m C e l l s . 2 0 1 5 J u l ; 3 3 (7) : 2 3 4 3 - 5 0 (非特許文献 1) に記載されるように、L A M P - 2 変異を有する患者に由来するヒト人工多能性幹細胞 (h i P S C) における L A M P - 2 の過剰発現により、酸化ストレスレベルの低下及びアポトーシス細胞死がもたらされることを開示しており、疾患病態生理学における L A M P - 2 B の重要性を確認している。

20

【0006】

ヒト対象におけるダノン病の治療に関連する方法及び組成物の必要性が当該技術分野に依然として存在する。本開示は、組成物のかかる方法を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】国際特許出願公開第 2 0 1 7 / 1 2 7 5 6 5 A 1 号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】H a s h e m , e t a l . , S t e m C e l l s . 2 0 1 5 J u l ; 3 3 (7) : 2 3 4 3 - 5 0

30

【発明の概要】

【0009】

一態様では、本開示は、ダノン病に罹患している若しくはダノン病のリスクがあると特定された、及び/又は L A M P - 2 遺伝子の 1 つ以上のアイソフォームに不活性化変異を有すると特定された対象におけるダノン病を治療するための方法であって、治療有効量の、カプシド及びベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンを対象に投与することを含み、ベクターゲノムが L A M P - 2 タンパク質、好ましくは L A M P - 2 B タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む、方法を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、対象の体重 1 キログラム (k g) あたり約 2×10^{14} ベクターゲノム (v g) 未満である。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 k g あたり約 1.5×10^{14} v g 未満である。

【0012】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 k g あたり約 1×10^{14} v g 未満である。

【0013】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 k g あたり少なくとも約 1

50

$\times 10^{12}$ v g である。

【0014】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 kg あたり少なくとも約 1×10^{13} v g である。

【0015】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 kg あたり約 6.7×10^{13} v g である。

【0016】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 kg あたり約 1.1×10^{14} v g である。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、前記対象の体重 1 kg あたり約 2.0×10^{14} v g である。

【0018】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のタクロリムスを対象に投与することを更に含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のリツキシマブを対象に投与することを更に含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のタクロリムスを対象に投与することと、有効量のリツキシマブを対象に投与することと、を含む。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のエクリズマブを対象に投与することを含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のリツキシマブを対象に投与すること、有効量のタクロリムスを対象に投与すること、及び/又は有効量のエクリズマブを対象に投与することを更に含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、対象は、非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)、任意選択的に、可逆性血小板減少症及び/又は急性腎障害 (AKI) をもたらす aHUS などの補体活性化の続発症のリスクがある。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のコルチコステロイドを対象に投与することを更に含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のタクロリムスを投与する前に、有効量のコルチコステロイドを対象に投与することを更に含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、対象は、任意選択的に 8 ~ 14 歳及び/又は 15 ~ 17 歳の若年対象である。

40

【0027】

いくつかの実施形態では、対象は、任意選択的に 0 ~ 8 歳の小児対象である。

【0028】

いくつかの実施形態では、対象は、任意選択的に 18 歳以上の成人対象である。

【0029】

いくつかの実施形態では、治療有効量の AAV は、静脈内投与される。

【0030】

いくつかの実施形態では、治療有効量の AAV は、直接心臓注射、任意選択的に頸静脈

50

内カテーテル又はスワン・ガンツカテーテルにより投与される。

【0031】

いくつかの実施形態では、治療有効量のAAVは、腹腔内注射により投与される。

【0032】

いくつかの実施形態では、本方法により、a) AAVによる心筋細胞及び/若しくは骨格筋の形質導入、b) 任意選択的に心筋細胞及び/若しくは骨格筋における、LAMP-2Bをコードする外因性リボ核酸ポリヌクレオチドの発現及び/若しくは外因性LAMP-2Bタンパク質の発現、c) 1つ以上のダノン病関連組織学的異常、任意選択的に自己貪食空胞若しくは筋原線維錯綜配列の補正若しくは改善、d) 心筋細胞分子マーカー発現の補正若しくは改善、並びに/又はe) 心筋細胞組織学の補正若しくは改善のうちの1つ以上がもたらされる。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、AAVは、プロモーターに作動可能に連結されたLAMP-2Bタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットを含み、ならびに、ポリヌクレオチド配列が配列番号2に対する少なくとも95%の同一性を共有する、及び/又はLAMP-2Bタンパク質が配列番号1に対する少なくとも95%の同一性を共有する。

【0034】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号2を含む若しくはそれからなる、及び/又はLAMP-2Bタンパク質は、配列番号1を含む若しくはそれからなる。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターである。

【0036】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号22に対する少なくとも95%の同一性を共有するエンハンサー/プロモーター領域を含む。

【0037】

いくつかの実施形態では、エンハンサー/プロモーター領域は、配列番号22を含む又はそれからなる。

【0038】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、5 から3 の順に、
 (a) 配列番号22を含むエンハンサー/プロモーター領域、
 (b) 配列番号3を含み、当該LAMP-2Bタンパク質をコードする当該ポリヌクレオチド配列、
 (c) 配列番号27を含む3' UTR配列、及び/又は
 (d) 配列番号7を含むポリアデニル化配列
 を含む。

30

【0039】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、(i) 配列番号11を含む5' ITRと、(ii) 配列番号12を含む3' ITRとに隣接している。

40

【0040】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号8を含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、カプシドは、AAV9カプシドである。

【0042】

いくつかの実施形態では、AAV9カプシドは、配列番号28のアミノ酸1~736、配列番号28のアミノ酸138~736、又は配列番号28のアミノ酸203~736を含む1つ以上のカプシドタンパク質を含む。

【0043】

他の態様では、本開示は、ダノン病の治療における使用のための単位用量、医薬組成物

50

、又は組成物を提供する。使用のための単位用量、医薬組成物、又は使用組成物は、治療有効量の、カプシド及びベクターゲノムを含む組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ビリオンを含み、ここで、ベクターゲノムが、LAMP-2タンパク質、好ましくはLAMP-2Bタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0044】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、対象の体重1キログラム（kg）あたり約 2×10^{14} ベクターゲノム（vg）未満である。

【0045】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 1.5×10^{14} vg/kg 未満である。

【0046】

別の態様では、本開示は、本開示の使用のための単位用量、医薬組成物、又は組成物と、ダノン病の治療における使用のための説明書と、を含むキットを提供する。

【0047】

本キットは、リツキシマブ、タクロリムス、エクリズマブ、及びコルチコステロイドのうちの一つ以上を含む一つ以上の単位用量、医薬組成物、又は組成物を更に含んでもよい。

【0048】

本発明の更なる態様及び実施形態は、以下の発明を実施するための形態に開示されている。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】本開示におけるアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子を生成するために使用した pAAV-LAMP2Bトランスファープラスミドの図を示す。AAV粒子は、AAV2に由来する逆位末端反復配列（ITR）エレメントに隣接する発現カセットと、最初期サイトメガロウイルス（CMV IE）エンハンサー、ニワトリベータ-アクチン（CBA）プロモーター、ニワトリベータ-アクチン、及びウサギグロビンイントロン（CBA/RbGイントロン）で構成されるCAGプロモーターと、LAMP2B導入遺伝子と、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）と、ウサギグロビンポリアダニル化シグナル（RGA）とを含む。

【図2】図2A~2Bは、PBS又は様々な用量のAAV9-LAMP2B（ 1×10^{13} 、 5×10^{13} 、及び 1×10^{14} vg/kg）を注射したWT又はLAMP2 KOマウスにおける心臓組織分析のグラフを示す。図2Aは、qPCRを使用して決定した核あたりのベクターコピー数（VCN/核）を示す。図2Bは、LAMP2B mRNAレベルの定量的RT-PCRを示す（PBSと比較した倍率変化、GAPDHにより正規化）。プライマーは、ヒト及びマウスLAMP2B mRNAの両方を検出する。値は、平均±標準誤差である。PBSを注射したKOマウスに対して、##が $p < 0.01$ であり、###が $p < 0.0001$ である。

【図3A】図3A~3Cは、心臓組織におけるヒトLAMP2及びLC3-IIタンパク質発現のグラフを示す。図3Aは、PBS又は増加用量のAAV9-LAMP2B（ 1×10^{13} 、 5×10^{13} 、及び 1×10^{14} vg/kg）を注射したLamp2 KOマウス、並びにローディング対照として使用したマウス（mLAMP2）及びヒトLAMP2（hLAMP2）、LC3-II（オートファジーのマーカー）、GAPDHに対するウェスタンプロットにより評価した未処理対照WTマウスの心臓由来のタンパク質ライゼートを示す。図3Bは、GAPDHに正規化したhLAMP2タンパク質の定量化（ImageJを使用した密度測定）を示す。図3Cは、GAPDHに正規化したLC3-IIの定量化（ImageJを使用した密度測定）を示す。値は、平均±標準誤差である。WTに対して、**が $p < 0.01$ であり、PBSを注射したKOマウスに対して、#が $p < 0.05$ であり、##が $p < 0.01$ である。

【図3B】図3Aの説明を参照されたい。

【図3C】図3Aの説明を参照されたい。

10

20

30

40

50

【図4】液胞（黄色の矢印で示すオートファジー構造）を示す心臓組織の透過電子顕微鏡画像を示す。PBS又は 5×10^{13} 若しくは 1×10^{14} vg/kgのAAV9・LAMP2Bを注射したWT型又はLamp2 KOマウス由来の代表的な画像。スケールバーは、上パネルでは $2 \mu\text{m}$ であり、下パネルでは $0.54 \mu\text{m}$ である。

【図5】 6.7×10^{13} GC/kgのAAV9・LAMP2Bで治療した患者における二倍体ゲノムあたりのベクターDNAコピーのグラフを示す。患者1001、1002、及び1005を、ベースライン時点、治療後8週時点、6ヶ月時点、及び12ヶ月時点で分析した。

【図6】心臓LAMP2B発現を示す患者1002由来の心臓組織の免疫組織化学画像を示す。投与前、陽性対照、又は治療後8週時点、6ヶ月時点、及び12ヶ月時点での 6.7×10^{13} GC/kgのAAV9・LAMP2Bで治療した患者由来の代表的な画像。スケールバーは、 $100 \mu\text{m}$ である。

【図7】図7A~7Cは、患者1001（図7A）、患者1002（図7B）、及び患者1005（図7C）のベースラインと比較した脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）の倍率変化のグラフを示す。患者を 6.7×10^{13} GC/kgのAAV9・LAMP2Bで治療し、BNP倍率変化を、治療後8週目、6ヶ月目、及び12ヶ月目に分析した。

【図8】DLTが特定されないシナリオにおける、研究コホートの登録順序の図を示す。

【図9】所与のコHORT内での単一DLTの状況下での任意のコHORTの登録順序の図を示す。コHORT内の登録を、第2の患者がDLTを経験した場合に停止する。三角形/感嘆符は、患者2のDLT発生を示す。

【図10A】図10A~10Dは、AAV9・LAMP2B研究評価及び治療事象表を示すチャートである。略語：AAV9：アデノ随伴ウイルス血清型9、ADA：抗薬物抗体、aPTT：活性化部分トロンボプラスチン時間、BNP：脳性ナトリウム利尿ペプチド、C3：補体3、C4：補体4、CBC：全血球数、CK-MB：クレアチニンキナーゼ-MB、D：日、d/c：中止、ECG：心電図、HBV：B型肝炎ウイルス、HCV：C型肝炎ウイルス、HIV：ヒト免疫不全ウイルス、IgG：免疫グロブリンG、IgM：免疫グロブリンM、IP：治験薬、IV：静脈内注入、LFT：肝機能検査、M：月、MRI：磁気共鳴画像法、PMBC：末梢血単核細胞、PRO：患者報告アウトカム、PT：プロトロンビン時間、QOL：生活の質、sC5b-9：血清膜侵襲複合体、TAT：トロンビン-アンチトロンビン複合体、VO2：最大酸素消費量、W：週。

【図10B】図10Aの説明を参照されたい。

【図10C】図10Aの説明を参照されたい。

【図10D】図10Aの説明を参照されたい。

【図11】図11A~11Bは、PBS若しくは増加用量のAAV9・LAMP2B（ 1×10^{13} 、 5×10^{13} 、及び 1×10^{14} vg/kg）を注射したLamp2 KOマウス又は未処理対照WTマウスにおける侵襲的左室内圧（それぞれ、dP/dt最大値及びdP/dt最小値）によって分析した心臓収縮性（図11A）及び心臓弛緩（図11B）のグラフを示す。

【図12】液胞（黄色の矢印で示すオートファジー構造）を示す心臓組織の透過電子顕微鏡画像を示す。PBS又は 5×10^{13} 、 1×10^{14} vg/kg、若しくは 2×10^{14} vg/kgのAAV9・LAMP2Bを注射したWT型又はLamp2 KOマウス由来の代表的な画像。スケールバーは、上パネルでは $2 \mu\text{m}$ であり、下パネルでは $0.6 \mu\text{m}$ である。

【図13】図13A~13Bは、PBS若しくは増加用量のAAV9・LAMP2B（ 1×10^{13} 、 5×10^{13} 、 1×10^{14} 、及び 2×10^{14} vg/kg）を注射したLamp2 KOマウス又は未処理対照WTマウスにおける侵襲的左室血行動態（それぞれ、dP/dt最大値及びdP/dt最小値）によって分析した心臓収縮性（図13A）及び心臓弛緩（図13B）のグラフを示す。

【図14A】図14A~14Bは、低用量のRP-A501で治療した後の免疫組織化学（図14A）によるLAMP2タンパク質の発現及び電子顕微鏡による細胞形態（図14

10

20

30

40

50

B)を示す。心室中隔の生検からの患者1005由来の代表的な画像を示す。

【図14B】図14Aの説明を参照されたい。

【図15A】低用量患者及び高用量患者の両方における壁厚の減少又は安定化を伴う心エコー検査での心室肥大のリモデリングを示す。全ての心エコー検査パラメータは、単一の読み取り機によって行われる現地の臨床検査評価によるものである。

【図15B】低線量患者及び高用量患者の両方における左室(LV)駆出率(EF)及び壁厚の安定化又は改善を示す。全ての心エコー検査パラメータは、単一の読み取り機によって行われる現地の臨床検査評価によるものである。

【図15C】侵襲的血行動態が低線量患者及び高用量患者における肺毛細血管楔入圧によって測定した拡張機能障害(LV充満圧)の長期安定化又は改善を示したことを示す。

10

【図15D】高用量患者及び低用量患者の両方における血行動態の安定化又は収縮機能の改善を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

発明の詳細な説明

本開示は、ヒト対象におけるダノン病の治療に関する方法及び組成物を提供する。本発明者らは、LAMP-2のLAMP-2Bアイソフォームを発現するように設計されたアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてヒト対象におけるダノン病の治療に成功したことを実証した。このAAVは、コルチコステロイド、タクロリムス、リツキシマブ、及び/又はエクリズマブでの治療と併せて投与されてもよく、このAAVは、様々な用量で投与されてもよい。本明細書に開示されるように、およそ 6.7×10^{13} vg/kg以下~およそ 2.0×10^{14} vg/kg以上の範囲の用量がダノン病対象において安全かつ有効であり得る。

20

【0051】

ベクター配列

ヒトLAMP-2Bの野生型ポリペプチド配列(配列番号1)及びヒトLAMP-2Bをコードする野生型ポリヌクレオチド配列(配列番号2)は、それぞれ、

1 MVCFRLFPVP GSGLVLVCLV LGAVRSYALE LNLTDSENAT CLYAKWQMNF TVRYETTNKT
61 YKTVTISDHG TVTYNGSICG DDQNGPKIAV QFGPGFSWIA NFKKAASYD IDSVSFSYNT
121 GDNTTFPDAE DKGILLVDEL LAIRIPLNDL FRCNSLSTLE KNDVVQHYWD VLVQAFVQNG
181 TVSTNEFLCD KDKTSTVAPT IHTTVPSPTT TPTPKKPEA GTYSVNNGND TLLLATMGLQ
241 LNITQDKVAS VININPNTTH STGSCRSHTA LLRLNSSTIK YLDFVFAVKN ENRFYLKEVN
301 ISMYLVNGSV FSIANNLSY WDAPLGSSYM CNKEQTVSVS GAFQINTFDL RVQPFNVTQG
361 KYSTAQECSL DDDTILIPPII VGAGLSGLII VIVIAYVIGR RKS YAGYQT

30

(配列番号1)及び

40

50

```

1 ATGGTGTGCT TCCGCCTCTT CCCGGTTCGG GGCTCAGGGC TCGTTCTGGT CTGCCTAGTC
61 CTGGGAGCTG TCGGGTCTTA TGCATTGGAA CTTAATTTGA CAGATTCAGA AAATGCCACT
121 TGCCTTTATG CAAAATGGCA GATGAATTTT ACAGTTCGCT ATGAAACTAC AAATAAACT
181 TATAAACTG TAACCATTTT AGACCATGGC ACTGTGACAT ATAATGGAAG CATTTGTGGG
241 GATGATCAGA ATGGTCCCAA AATAGCAGTG CAGTTCGGAC CTGGCTTTTC CTGGATTGCG
301 AATTTTACCA AGGCAGCATC TACTTATTCA ATTGACAGCG TCTCATTTTC CTACAACACT
361 GGTGATAACA CAACATTTCC TGATGCTGAA GATAAAGGAA TTCTTACTGT TGATGAACTT
421 TTGGCCATCA GAATTCCATT GAATGACCTT TTTAGATGCA ATAGTTTATC AACTTTGGAA
481 AAGAATGATG TTGTCCAACA CTACTGGGAT GTTCTTGTAC AAGCTTTTGT CCAAAATGGC
541 ACAGTGAGCA CAAATGAGTT CCTGTGTGAT AAAGACAAAA CTTCAACAGT GGCACCCACC
601 ATACACACCA CTGTGCCATC TCCTACTACA ACACCTACTC CAAAGGAAAA ACCAGAAGCT
661 GGAACCTATT CAGTTAATAA TGGCAATGAT ACTTGTCTGC TGGCTACCAT GGGGCTGCAG
721 CTGAACATCA CTCAGGATAA GGTGCTTCA GTTATTAACA TCAACCCCAA TACAACCTAC
781 TCCACAGGCA GCTGCCGTTT TCACACTGCT CTACTTAGAC TCAATAGCAG CACCATTAAG
841 TATCTAGACT TTGTCTTTGC TGTGAAAAAT GAAAACCGAT TTTATCTGAA GGAAGTGAAC
901 ATCAGCATGT ATTTGGTTAA TGGCTCCGTT TTCAGCATTG CAAATAACAA TCTCAGCTAC
961 TGGGATGCCC CCCTGGGAAG TTCTTATATG TGCAACAAAG AGCAGACTGT TTCAGTGTCT
1021 GGAGCATTTT AGATAAATAC CTTTGTATCA AGGGTTCAGC CTTTCAATGT GACACAAGGA
1081 AAGTATTCTA CAGCCCAAGA GTGTTGCTG GATGATGACA CCATTCTAAT CCCAATTATA
1141 GTTGGTGTG GTCTTTCAGG CTTGATTATC GTTATAGTGA TTGCTTACGT AATTGGCAGA
1201 AGAAAAAGTT ATGCTGGATA TCAGACTCTG TAA

```

10

(配列番号 2) である。

【 0 0 5 2 】

20

リソソーム関連膜タンパク質 2 (LAMP - 2) のアイソフォーム又はその機能的バリエーションをコードする修飾されたポリヌクレオチド配列が本明細書に開示される。ある特定の実施形態では、修飾されたポリヌクレオチド配列は、LAMP - 2 のアイソフォームをコードする野生型ポリヌクレオチドと比較して、コドン最適化、CpG 枯渇、隠れたスプライス部位の除去、又は減少した数の代替オープンリーディングフレーム (ORF) のうちの 1 つ以上を含む。いくつかの実施形態では、修飾されたポリヌクレオチドは、LAMP - 2 A、LAMP - 2 B、LAMP - 2 C、又はそれらのアイソフォームのうちのいずれかの機能的バリエーションをコードする。実施形態では、本開示は、配列番号 2 と比較して 1 つ以上のヌクレオチド置換を含む LAMP - 2 B 又はその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチド配列若しくは導入遺伝子を提供する。実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 3 ~ 5 から選択される配列に対する少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は完全な同一性を共有する。本開示は、LAMP - 2 B をコードする少なくとも 3 つの例証的なバリエーション導入遺伝子配列 (配列番号 3 ~ 5) :

30

40

50

1 ATGGTCTGCT TCAGACTGTT CCCTGTCCCT GGATCTGGTC TGGTGCTTGT GTGCTTGGTG
61 CTGGGTGCTG TGAGATCCTA TGCCCTTGAG CTGAACCTGA CTGACTCAGA AAATGCCACT
121 TGCCTGTATG CCAAGTGGCA GATGAACTTC ACTGTGAGAT ATGAGACTAC CAACAAGACC
181 TACAAGACTG TGACCATCTC AGACCATGGC ACTGTCACCT ACAATGGATC AATCTGTGGT
241 GATGATCAGA ATGGCCCCAA GATAGCAGTG CAGTTTGGGC CCGGTTTTTC CTGGATTGCT
301 AACTTCACCA AGGCAGCCTC CACCTACAGC ATTGACTCAG TCAGCTTCAG CTACAACACT
361 GGGGATAACA CCACCTTCCC TGACGCAGAG GACAAGGGAA TCCTTACTGT GGACGAACTC
421 CTGGCAATCA GAATCCCCCT TAACGACCTG TTCAGATGCA ACTCCCTTTC AACCTTGAA
481 AAGAATGATG TGGTGCAACA CTATTGGGAC GTCTTGGTGC AAGCCTTTGT GCAGAATGGG
541 ACAGTAGTA CCAACGAGTT CCTCTGTGAC AAGGACAAGA CCAGCACTGT GGCCCCACT
601 ATCCACACCA CTGTGCCAG CCTACCCT ACCCCCACCC CTAAGAGAA GCGAGAAGCT
661 GGAACCTACT CAGTCAACAA TGGAAATGAC ACATGCCCTCC TTGCCACCAT GGGACTGCAG
721 CTGAACATCA CTCAGGACAA GGTGGCCTCA GTGATTAACA TCAACCCTAA CACCCTCAT
781 AGCACTGGGA GCTGCAGATC ACATACAGCT CTGCTGAGGC TCAACTCCTC CACCATCAAG
841 TACCTGGACT TTGTGTTTGC TGTGAAGAAT GAGAACAGGT TCTACCTCAA GGAAGTGAAC
901 ATTTCCATGT ACCTGGTCAA TGGTTCAGTG TTCTCTATTG CCAACAACAA TCTGAGCTAC
961 TGGGATGCAC CCCTGGGATC CTCTACATG TGCAACAAGG AGCAGACTGT GAGTGTGTCA
1021 GGTGCTTTTC AGATCAACAC TTTTGACCTG AGGGTGCAGC CCTTCAATGT GACTCAGGGA
1081 AAGTACTCCA CTGCACAAGA GTGTTCCCTG GATGATGACA CTATCCTCAT CCCATTATT
1141 GTGGGAGCTG GACTGTCAGG ATTGATTATA GTGATTGTGA TTGCTTATGT GATTGGAAGG
1201 AGAAAGAGCT ATGCTGGCTA CCAGACCCTG TAA

10

(配列番号 3)、

1 ATGGTGTGCT TTAGACTGTT TCCTGTGCCT GGTTTCAGGGC TGGTCCTGGT CTGTCTGGTG
61 CTGGGGGCTG TCAGAAGCTA TGCCCTTGAG CTGAACCTCA CTGATAGTGA AAATGCCACT
121 TGTCTGTATG CTAAGTGGCA GATGAACTTC ACTGTGAGAT ATGAAACCAC CAACAAGACT
181 TACAAAACAG TGACCATCTC AGATCATGGA ACTGTGACCT ACAACGGCAG CATTTGTGGA
241 GACGACCAGA ACGGACCAAA AATCGCTGTC CAATTTGGGC CTGGATTCTC CTGGATTGCC
301 AATTTACTA AAGCTGCCTC CACATATTCA ATTGACTCAG TGTCCTTCTC CTACAACACT
361 GGGGACAACA CTACTTTCCC TGATGCTGAA GATAAGGGAA TCTTGACAGT GGATGAGCTG
421 CTGGCTATCA GGATCCCTTT GAATGACCTG TTTAGGTGTA ATTCACTGAG CACTCTGGAG
481 AAGAACGACG TGGTGCAGCA CTACTGGGAC GTGCTGGTGC AAGCCTTTGT GCAGAACGGC
541 ACTGTGTCCA CCAACGAATT CCTGTGTGAT AAGGACAAAA CTTCCTACTGT GGCACCTACA
601 ATTACACTA CTGTGCCCTT ACCTACCACC ACTCCAACTC CAAAGGAAAA GCCTGAAGCA
661 GGAACCTACT CTGTGAACAA TGGCAATGAT ACCTGTCTGT TGGCCACCAT GGGCCTCCAA
721 CTGAACATTA CTCAGGACAA GGTGGCCTCA GTGATTAACA TTAACCCCAA CACTACCCAC
781 TCCACTGGCA GCTGTAGATC ACACACAGCC TTGCTCAGAC TGAATAGCAG CACCATCAAG
841 TATTTGGATT TTGTGTTTGC AGTGAAGAAT GAAAACAGGT TCTACCTGAA GGAAGTCAAC
901 ATCTCAATGT ACCTGGTGAA CGGCTCAGTG TTCAGCATTG CCAACAACAA CCTCTCCTAT
961 TGGGACGCTC CACTGGGGAG CAGCTACATG TGTAACAAGG AACAGACTGT GTCAGTGTCA
1021 GGAGCCTTCC AGATTAACAC CTTTGATCTG AGGGTCCAAC CCTTAAATGT CACTCAAGGA
1081 AAGTATAGCA CTGCCAGGA GTGCTCCCTG GATGATGACA CCATTCTGAT TCCAATCATT
1141 GTGGGTGCAG GACTTTCTGG GCTTATTATT GTGATTGTGA TTGCCATATGT GATTGGCAGA
1201 AGGAAATCCT ATGCAGGGTA CCAAACCTCTG TAA

20

30

(配列番号 4)、及び

40

50

```

1 ATGGTCTGTT TTAGGCTGTT CCCTGTCCCT GGTTCAGGAC TGGTCTTAGT GTGTCTGGTG
61 CTTGGAGCTG TCAGAAGCTA TGCCCTGGAG CTGAACCTGA CTGACTCAGA AAATGCCACT
121 TGCCTGTATG CCAAGTGGCA GATGAACTTC ACTGTCAGAT ATGAAACCAC CAACAAGACC
181 TATAAGACTG TGACCATCTC AGACCATGGC ACTGTGACTT ACAATGGGTC AATTTGTGGA
241 GATGACCAGA ATGGCCCTAA GATAGCTGTC CAGTTTGGTC CAGGATTCAG CTGGATTGCC
301 AACTTCACCA AGGCAGCCAG CACCTACAGC ATTGACTCTG TGTCCTTCTC CTACAACACA
361 GGAGACAACA CCACTTTCCC TGATGCAGAG GACAAAAGGTA TCCTGACTGT GGATGAGTTG
421 CTGGCAATCA GGATCCCCTT GAACGATCTG TTCAGGTGCA ACTCACTGTC CACTCTGGAA
481 AAGAATGATG TGGTGCAGCA CTATTGGGAT GTGCTAGTCC AGGCCTTTGT CCAGAATGGG
541 ACTGTGTCAA CTAATGAGTT CCTGTGTGAC AAGGACAAGA CAAGCACTGT AGCCCCACT
601 ATCCATACCA CAGTACCTAG CCCACCCT ACTCCAACCC CCAAGGAGAA GCCTGAGGCT
661 GGCACCTACT CAGTGAACAA TGGGAATGAC ACCTGTTTGC TGGCCACTAT GGGACTCCAA
721 CTGAACATCA CCCAGGACAA AGTGGCCTCT GTGATCAATA TCAATCCCAA CACCACCAC
781 AGCACTGGGT CCTGCAGAAG CCACACTGCC CTCCTGAGGC TCAACTCATC AACTATCAAG
841 TACTTGGATT TTGTGTTTGC AGTGAAGAAT GAGAACAGAT TCTACCTCAA AGAGGTCAAC
901 ATTTCAATGT ACCTGGTGAA TGGGAGTGTG TTCTCCATTG CTAACAACAA CCTGAGCTAC
961 TGGGATGCCC CTCTGGGCTC CTCATACATG TGCAACAAGG AACAGACTGT GAGTGTGTCA
1021 GGGGCCCTTCC AGATCAACAC TTTTGACCTG AGAGTGCAGC CCTTTAATGT GACACAGGGA
1081 AAGTACAGCA CTGCTCAGGA GTGCAGCCTG GATGATGACA CTATCCTGAT CCCTATCATT
1141 GTGGGGGACG GCCTGTCTGG ACTCATTATT GTGATTGTGA TTGCCTATGT GATAGGGAGA
1201 AGGAAGTCTT ATGCTGGATA CCAGACCCTG TAA

```

10

(配列番号 5) を提供する。

【 0 0 5 3 】

20

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 から選択される配列に対する少なくとも 95% の同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 から選択される配列に対する少なくとも 99% の同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 から選択される配列を含む。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 3 に対する少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は完全な同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 4 に対する少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は完全な同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 5 に対する少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%

30

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれか 1 つの部分配列と類似している又は同一である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれか 1 つの部分配列を含む。様々な実施形態では、部分配列は、少なくとも約 50 ヌクレオチド (nt)、少なくとも約 100 nt、少なくとも約 150 nt、少なくとも約 250 nt、少なくとも約 200 nt、少なくとも約 350 nt、少なくとも約 450 nt、少なくとも約 400 nt、少なくとも約 450 nt、少なくとも約 550 nt、少なくとも約 600 nt、少なくとも約 650 nt、少なくとも約 600 nt、

40

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 3 ~ 5 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 500、250 ~ 750、500 ~ 1000、又は 750 ~ 1240 を含む部分配列に対する少なくとも 95% の同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 3 ~ 5 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 500、250 ~ 750、500 ~ 1000、又は 750 ~ 1240 を含む部分配列に対する少なくとも 99% の同一

50

性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 5 0 0、2 5 0 ~ 7 5 0、5 0 0 ~ 1 0 0 0、又は 7 5 0 ~ 1 2 4 0 を含む配列を含む。実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 5 0 0、2 5 0 ~ 7 5 0、5 0 0 ~ 1 0 0 0、又は 7 5 0 ~ 1 2 4 0 を含む部分配列に対する少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は完全な同一性を共有する。実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 3 のヌクレオチド 1 ~ 5 0 0、2 5 0 ~ 7 5 0、5 0 0 ~ 1 0 0 0、又は 7 5 0 ~ 1 2 4 0 を含む部分配列に対する少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は完全な同一性を共有する。実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 3 のヌクレオチド 1 ~ 5 0 0、2 5 0 ~ 7 5 0、5 0 0 ~ 1 0 0 0、又は 7 5 0 ~ 1 2 4 0 を含む部分配列に対する少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は完全な同一性を共有する。

10

【0056】

ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、LAMP-2A、LAMP-2B、若しくはLAMP-2C、又はそれらのアイソフォームのいずれの機能的断片若しくはバリエーションのいずれも含む、LAMP-2の様々なアイソフォームのうちいずれかをコードする。したがって、特定の実施形態では、発現カセットは、LAMP-2A、LAMP-2B、若しくはLAMP-2Cをコードする導入遺伝子配列のコード最適化、発現カセット若しくは導入遺伝子配列がその対応する野生型配列よりも少ないCpG部位を含むこと、発現カセット若しくは導入遺伝子配列がその対応する野生型配列よりも少ない隠れたスプライス部位を含むこと、及び/又は発現カセット若しくは導入遺伝子配列がその対応する野生型配列よりも少ないオープンリーディングフレームを含むことから選択される1つ以上の修飾を含む、対応する野生型ポリヌクレオチド配列と比較して1つ以上の修飾を含むLAMP-2A、LAMP-2B、若しくはLAMP-2C、又はそれらの機能的断片若しくはバリエーションのうちいずれかをコードする最適化ポリヌクレオチド配列である。特定の実施形態では、最適化配列は、ヒト細胞における発現の増加に対して最適化される。LAMP-2Aアイソフォーム及びLAMP-2Cアイソフォームをコードする野生型ヒトポリヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号29及び配列番号30に記載される。ヒトLAMP-2Aタンパク質及びヒトLAMP-2Cタンパク質の野生型配列は、それぞれ、配列番号34及び配列番号35に記載される。野生型LAMP-2アイソフォームの配列及びコード配列も公的に入手可能である。LAMP-2Bに関する具体的な実施形態が本明細書に記載されているが、各実施形態においてLAMP-2A又はLAMP-2Cを代わりに使用することができることが理解される。

20

30

【0057】

野生型LAMP-2Aのコード配列(配列番号29)及び野生型LAMP-2Cのコード配列(配列番号30)は、少なくともヌクレオチド1~1080にわたって野生型LAMP-2Bのコード配列(配列番号2)と100%同一である。したがって、当業者であれば、本明細書に開示される導入遺伝子、発現カセット、及びベクターが、LAMP-2B(例えば、配列番号3~5のうちのいずれかの最適化LAMP-2B)のヌクレオチド1081~1233の代わりにLAMP-2A(配列番号29)又は野生型LAMP-2C(配列番号30)のいずれかの3'末端(ヌクレオチド1081~末端)を置換することにより、LAMP-2のこれらのアイソフォームの発現のために適合され得ることを容易に認識するであろう。例えば、本発明の実施形態は、それぞれ、配列番号31~33である、最適化LAMP-2B遺伝子配列、配列番号3~5のヌクレオチド1~1080を利用する。

40

【0058】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号31~33から選択される配列に対する少な

50

くとも95%の同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号31~33から選択される配列に対する少なくとも99%の同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号31~33から選択される配列を含む。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号31に対する少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は完全な同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号32に対する少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は完全な同一性を共有する。一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号33に対する少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は完全な同一性を共有する。いくつかの事例では、導入遺伝子は、参照配列、例えば、「天然型」又は「野生型」LAMP-2B配列のポリヌクレオチド配列とは異なるポリヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、参照配列に対する最大70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%の同一性を共有する。いくつかの実施形態では、参照配列は、配列番号2である。例えば、配列番号3は、配列番号2に対する78.5%の同一性を共有する。

10

【0059】

いくつかの事例では、導入遺伝子は、参照配列、例えば、「天然型」又は「野生型」LAMP-2A配列のポリヌクレオチド配列とは異なるポリヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、参照配列に対する最大70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%の同一性を共有する。いくつかの実施形態では、参照配列は、配列番号29に記載される野生型ヒトLAMP-2A配列である。

20

【0060】

いくつかの事例では、導入遺伝子は、参照配列、例えば、「天然型」又は「野生型」LAMP-2C配列のポリヌクレオチド配列とは異なるポリヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、参照配列に対する最大70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%の同一性を共有する。いくつかの実施形態では、参照配列は、配列番号30に記載される野生型ヒトLAMP-2C配列である。

30

【0061】

一実施形態では、導入遺伝子は、ヒト宿主細胞における発現のためにコドン最適化される。一実施形態では、導入遺伝子コード配列は、まれにしか提示されないコドンをより頻繁に提示されるコドンに置き換えることによって発現を増強するように修飾される又は「コドン最適化」される。このコード配列は、翻訳のためにアミノ酸をコードするmRNA配列の部分である。翻訳中、61個のトリヌクレオチドコドンの各々が20個のアミノ酸のうちの一つに翻訳され、遺伝コードに縮重性又は冗長性をもたらす。しかしながら、異なる細胞型及び異なる動物種は、異なる頻度で同じアミノ酸をコードするtRNA（各々アンチコドンを含む）を利用する。遺伝子配列が対応するtRNAによってまれにしか提示されないコドンを含む場合、リボソーム翻訳機構は速度を緩め、効率的な翻訳を妨げる場合がある。特定の種について「コドン最適化」により発現を改善することができ、ここで、コード配列が同じタンパク質配列をコードするように改変されるが、高度に発現されたヒトタンパク質によって高度に提示される及び/又は利用されるコドンを利用する（Cid-Arregui et al., 2003; J. Virol. 77: 4928）。

40

【0062】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子のコード配列は、哺乳動物又は霊長類においてま

50

れにしか発現されないコドンを、霊長類において頻繁に発現されるコドンに置き換えるように修飾される。例えば、いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、参照ポリペプチド（例えば、野生型 LAMP-2B、配列番号 3）に対する少なくとも 85% の配列同一性、例えば、参照ポリペプチドに対する少なくとも 90% の配列同一性、少なくとも 95% の配列同一性、少なくとも 98% の同一性、又は少なくとも 99% の同一性を有するポリペプチドをコードし、ここで、コード配列の少なくとも 1 つのコドンが、ヒトにおいて、上記又は本明細書に開示される配列における対応するコドンよりも高い tRNA 頻度を有する。

【0063】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 よりも少ない代替オープンリーディングフレームを含む。一実施形態では、導入遺伝子は、所望の導入遺伝子をコードしないオープンリーディングフレーム（ORF）の終結又は除去によって発現を増強するように修飾される。オープンリーディングフレーム（ORF）は、開始コドンに続き、終止コドンを含まない核酸配列である。ORF は、順方向であっても逆方向であってもよく、目的とする遺伝子と比較して「インフレーム」であっても「アウトオブフレーム」であってもよい。かかるオープンリーディングフレームは、目的とする遺伝子とともに発現カセットで発現される可能性があり、望ましくない有害作用をもたらす可能性がある。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、コドン使用を更に改変することによってオープンリーディングフレームを除去するように修飾されている。これは、目的とする遺伝子にコードされたアミノ酸配列を保存し、かつ任意選択的に高度に利用されるコドンを維持しながら（すなわち、頻度 20% 未満のコドンを回避しながら）、1 つ以上の開始コドン（ATG）を除去することによって、及び / 又は 1 つ以上の終止コドン（TAG、TAA、若しくは TGA）を所望の ORF に対して逆方向に若しくはアウトオブフレームで導入することによって行われ得る。

【0064】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の開始コドンの 5' 側に最大 1 つ、最大 2 つ、最大 3 つ、最大 4 つ、又は最大 5 つの開始コドンを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の開始コドンの 5' 側に開始コドンを含まない。いくつかの実施形態では、導入遺伝子の開始コドンの 5' 側の 5' UTR、プロモーター、エンハンス、プロモーター / エンハンサーエレメント、又は他の配列における 1 つ以上の ATG コドンは、1 つ以上の隠れた開始部位が除去された後に残る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、誤った mRNA を生成しないように導入遺伝子の 5' 側に隠れた開始部位を含まない。

【0065】

本開示の変形例では、導入遺伝子コード配列は、コドン最適化若しくは非導入遺伝子 ORF の除去のいずれかによって、又はそれらの両方の技法を使用して最適化され得る。いくつかの事例では、コドン最適化中に導入された ORF を除去するために、コドン最適化後に非導入遺伝子 ORF を除去する又は最小限に抑える。

【0066】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 よりも少ない CpG 部位を含む。理論に拘束されるものではないが、ポリヌクレオチド配列中の CpG 部位の存在が、そのポリヌクレオチド配列を含むウイルスベクターに対する宿主の望ましくない免疫応答と関連していると考えられる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、CpG 部位の数を減少させるように設計される。例示的な方法は、米国特許出願公開第 2002 / 0065236 A 1 号に提供されている。

【0067】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 2 よりも少ない隠れたスプライス部位を含む。最適化のために、GeneArt（登録商標）ソフトウェアを使用して、例えば、転写サイレンシングを回避するために GC 含量を増加させる及び / 又は隠れたスプライス部位を除去し、それ故に、導入遺伝子の発現を増加させることができる。あるいは、当該技術

10

20

30

40

50

分野で既知の任意の最適化方法を使用してもよい。隠れたスプライス部位の除去は、例えば、国際特許出願公開第2004/015106A1号に記載されている。

【0068】

LAMP-2Bをコードする発現カセット及び遺伝子療法ベクターも本明細書に開示される。ある特定の実施形態では、発現カセット及び遺伝子療法ベクターは、本明細書に開示されるコドン最適化又はバリエーションLAMP-2Bポリヌクレオチド配列又は導入遺伝子配列を含む。

【0069】

特定の実施形態では、LAMP-2Bをコードする発現カセット及び遺伝子療法ベクターは、コンセンサス最適コザック配列及び全長ポリAデニル化(ポリA)配列(又は全長ポリAの切断されたポリAによる置換)を含み、最小限の上流(すなわち、5側)又は隠れた開始コドン(すなわち、ATG部位)を含むか、又はそれを含まない。いくつかの実施形態では、発現カセットは、代替mRNAを生成することができる導入遺伝子の5側に開始部位を含まない。ある特定の実施形態では、発現カセット又は遺伝子療法ベクターは、LAMP-2Bをコードする配列、例えば、本明細書に開示されるコドン最適化又はバリエーションLAMP-2Bポリヌクレオチド配列又は導入遺伝子配列を含む。

10

【0070】

いくつかの事例では、発現カセットは、第1の逆位末端反復配列、エンハンサー/プロモーター領域、コンセンサス最適コザック配列、導入遺伝子(例えば、本明細書に開示されるLAMP-2Bをコードする導入遺伝子)、全長ポリA配列を含む3非翻訳領域、及び第2の逆位末端反復配列のうち2つ以上を含む。いくつかの実施形態では、逆位末端反復配列(ITR)の一方又は両方が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、若しくはAAV9 ITR、又は当該技術分野で既知のいずれか1つのITRである。いくつかの実施形態では、発現カセットは、正確に2つのITRを含む。いくつかの実施形態では、両方のITRが、AAV2、AAV5、又はAAV9 ITRである。いくつかの実施形態では、両方のITRが、AAV2 ITRである。

20

【0071】

一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結されたコザック配列を含む。一実施形態では、コザック配列は、配列番号6：
GCCGCCACCATGG(配列番号6)
を含む又はそれからなるコンセンサス最適コザック配列である。

30

【0072】

様々な実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結された代替コザック配列を含む。一実施形態では、コザック配列は、配列番号14~18：
(gcc)gccRccAUGG(配列番号14)、
AGNNAUGN(配列番号15)、
ANNAUGG(配列番号16)、
ACCAUGG(配列番号17)、
GACACCAUGG(配列番号18)
のうちのいずれか1つを含む又はそれからなる代替コザック配列である。

40

【0073】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、コザック配列を含む。

【0074】

配列番号14において、小文字は、塩基がそれでもなお変化し得る位置で最も一般的な塩基を示し、大文字は、高度に保存された塩基を示し、Rは、アデニン又はグアニンを示す。配列番号14において、括弧内の配列(GCC)は任意選択的である。配列番号15~17において、「N」は、任意の塩基を示す。

【0075】

翻訳開始部位としてこのコンセンサス最適コザック配列の代わりに様々な配列を使用す

50

ることができ、他の配列を特定及び試験することは当業者の技能の範囲内である。Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. J. Cell Biol. 115 (4) : 887 - 903 (1991) を参照されたい。

【0076】

一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結された全長ポリA配列を含む。一実施形態では、全長ポリA配列は、配列番号7：

```

1 TGGCTAATAA AGGAAATTTA TTTTCATTGC AATAGTGTGT TGGAAATTTT TGTGTCTCTC
61 ACTCGGAAAG ACATATGGGA GGGCAAATCA TTTAAAACAT CAGAATGAGT ATTTGGTTTA
121 GAGTTTGGCA ACATATGCCC ATATGCTGGC TGCCATGAAC AAAGGTTGGC TATAAAGAGG
181 TCATCAGTAT ATGAAACAGC CCCCTGCTGT CCATTCCTTA TTCCATAGAA AAGCCTTGAC
241 TTGAGGTTAG ATTTTTTTTTA TATTTTGTTF TGTGTTATTT TTTTCTTTAA CATCCCTAAA
301 ATTTTCTTTA CATGTTTTAC TAGCCAGATT TTTCTCTCTC TCCTGACTAC TCCCAGTCAT
361 AGCTGTCCCT CTTCTCTTAT GGAGATC

```

10

(配列番号7)を含む。

【0077】

ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル (bGHPA) (配列番号19)、SV40初期/後期ポリアデニル化シグナル (配列番号20)、及びヒト成長ホルモン (HGH) ポリアデニル化シグナル (配列番号21) を含むが、これらに限定されない、様々な代替のポリA配列が、本開示の発現カセットに使用されてもよい：

20

```

1 TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTGTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG
61 ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT
121 TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG
181 GATTGGGAGG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGC TTCTG

```

(配列番号19)、

```

1 CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTTG GACAAACCAC AACTAGAATG CAGTGAAAAA
61 AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA TTGCTTTATT TGTAACCATT ATAAGCTGCA
121 ATAAACAAGT TAACAACAAC AATTGCATTC ATTTTATGTT TCAGGTTTCCAG GGGGAGATGT
181 GGGAGGTTTT TTAAAGCAAG TAAACCTCT ACAAATGTGG TA

```

30

(配列番号20)、

```

1 CTGCCCCGGT GGCATCCCTG TGACCCCTCC CCAGTGCCTC TCCTGGCCCT GGAAGTTGCC
61 ACTCCAGTGC CCACCAGCCT TGTCCTAATA AAATTAAGTT GCATCATTTT GTCTGACTAG
121 GTGTCCTTCT ATAATATTAT GGGGTGGAGG GGGGTGGTAT GGAGCAAGGG GCCCAAGTTG
181 GGAAGAAACC TGTAGGGCCT GC

```

(配列番号21)。

【0078】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、ポリA配列の活性断片を含む。特定の実施形態では、ポリA配列の活性断片は、例えば、本明細書に開示されるポリA配列のうちのいずれかの20塩基対 (bp) 未満、50bp未満、100bp未満、又は150bp未満を含む又はそれからなる。

40

【0079】

いくつかの事例では、発現カセットが確実に競合するORFを含まないようにすることにより、導入遺伝子の発現が増加する。一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の開始コドンの5'側の20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、又は500塩基対以内に開始コドンを含まない。いくつかの実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の開始コドンの5'側に開始コドンを含まない。いくつかの実施形態では、発現カセットは、代替mRNAを生成することができる導入遺伝子の5'側に開始部位を含まない。

【0080】

50

一実施形態では、発現カセットは、5 から 3 の方向に、作動可能に連結された第 1 の逆位末端反復配列、エンハンサー/プロモーター領域、イントロン、コンセンサス最適コザック配列、導入遺伝子、全長ポリ A 配列を含む 3 非翻訳領域、及び第 2 の逆位末端反復配列を含み、発現カセットは、代替 mRNA を生成することができる導入遺伝子の 5 側に開始コドンを含まない。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、エンハンサー/プロモーター領域は、5 から 3 の方向に、CMV IE エンハンサー及びニワトリベータ - アクチンプロモーターを含む。一実施形態では、エンハンサー/プロモーター領域は、CAG プロモーター (配列番号 22) を含む。本明細書で使用される場合、「CAG プロモーター」とは、CMV 初期エンハンサー - エレメント、ニワトリベータ - アクチンプロモーター、ニワトリベータ - アクチン遺伝子の第 1 のエクソン及び第 1 のイントロン、並びにウサギベータ - グロビン遺伝子由来のスプライスアクセプターを含むポリヌクレオチド配列を指す。

10

```

1 CTAGTCGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC
61 ATAGCCCATATA TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC
121 CGCCCAACGA CCCCCGCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATA GTAACGCCAA
181 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG
241 TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC
301 CCGCCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT
361 ACGTATTAGT CATCGCTATT ACCATGGTCG AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC
421 CCATCTCCCC CCCCTCCCCA CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTTGTG
481 CAGCGATGGG GCGGGGGGG GGGGGGGGG GCGCGCCAGG CGGGGCGGG CGGGGCGAGG
541 GCGGGGCGG GCGGAGCGG AGAGGTGCG GCGCAGCAA TCAGAGCGGC GCGCTCCGAA
601 AGTTTCCTTT TATGGCGAG CGGCGGCGG GCGGCGCCTA TAAAAAGCGA AGCGCGCGG
661 GGGCGGGAGT CGCTGCGCGC TGCCTTCGCC CCGTGCCCG CTCCGCGCC GCCTCGCGCC
721 GCCCGCCCG GCTCTGACTG ACCGCGTTAC TCCCACAGGT GAGCGGGCG GACGGCCCTT
781 CTCTCCGGG CTGTAATTAG CGCTTGGTTT AATGACGGCT TGTTCCTTT CTGTGGCTGC
841 GTGAAAGCCT TGAGGGGCTC CGGGAGGGCC CTTTGTGCG GGGGAGCGG TCGGGGGGTG
901 CGTGCGTGTG TGTGTGCGTG GGGAGCGCG CGTGCGGCTC CGCGCTGCC GCGGCTGTG
961 AGCGCTGCG GCGCGGCGG GGGCTTTGTG CGTCCGCGAG TGTGCGCGAG GGGAGCGCGG
1021 CCGGGGCGG TGCCCCGCG TGCGGGGGG GCTGCGAGG GAACAAAGG TCGTGCAGG
1081 GTGTGTGCGT GGGGGGTGA GCAGGGGTG TGGGCGGTC GGTGCGGG CAACCCCCC
1141 TGCACGCCCT TCCCAGATT GCTGAGCAC GCCCGCTTC GGGTGCGGG CTCCGACGG
1201 GCGGTGGCGC GGGGCTCGCC GGGCGGGCG GGGGTGGCG GCAGGTGGG GTGCCGGCG
1261 GGGCGGGGCC GCCTCGGGCC GGGGAGGGCT CGGGGAGGG GCGCGGCGG CCCCAGAGC
1321 CCGGCGGCTG TCGAGGCGG GCGAGCCGA GCCATTGCCT TTTATGGTAA TCGTGCAGA
1381 GGGCGCAGG ACTTCCTTTG TCCCAAATCT GTGCGGAGC GAAATCTGG AGGCGCCGCC
1441 GCACCCCTC TAGCGGGCG GGGGCGAAG GGTGCGGCG CGGCAGGAAG GAAATGGGCG
1501 GGGAGGGCCT TCGTGCCTG CCGCGCCGC GTCCCTTCT CCCTCTCCAG CCTCGGGGCT
1561 GTCCGCGGG GACAGGCTG CTTCGGGGG GACGGGGCAG GCGGGGTTT GGCTTCTGGC
1621 GTGTGACCG CGGCTCTAGA GCCTCTGTA ACCATGTTCA TGCCTTCTT TTTTCTCTAC
1681 AGCTCCTGG CAACGTGCTG GTTATTGTG TGTCTCATCA TTTTGGCAA

```

20

30

(配列番号 22)。

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、エンハンサー/プロモーター領域は、ユビキタスプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、エンハンサー/プロモーター領域は、CMV プロモーター (配列番号 23)、SV40 プロモーター (配列番号 24)、PGK プロモーター (配列番号 25)、及び/又はヒトベータ - アクチンプロモーター (配列番号 26) を含む。いくつかの実施形態では、エンハンサー/プロモーター領域は、配列番号 23 ~ 26 のうちのいずれか 1 つに対する少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を共有するポリヌクレオチドを含む：

40

```

1 GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CATCAATGGG CGTGGATAGC GGTTTACTC ACGGGGATTT
61 CCAAGTCTCC ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGTTTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC
121 TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG
181 TGGGAGGTCT ATATAAGCAG AGCT

```

50

(配列番号 2 3)、

1 GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT
 61 AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA
 121 TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC CGCCCCTAAC TCCGCCCATC CCGCCCCTAA
 181 CTCCGCCAG TTCCGCCCAT TCTCCGCCCC ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG
 241 AGGCCGAGGC CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTTGGAG
 301 GCCTAGGCTT TTGCAAA

(配列番号 2 4)、

1 GGGTAGGGGA GGGCTTTTTC CCAAGGCAGT CTGGAGCATG CGCTTTAGCA GCCCCGCTGG
 61 GCACTTGGCG CTACACAAGT GGCCTCTGGC CTCGCACACA TTCCACATCC ACCGGTAGGC
 121 GCCAACCGGC TCCGTTCTTT GGTGGCCCT TCGCGCCACC TTCTACTCCT CCCCTAGTCA
 181 GGAAGTTCCC CCCC GCCCCG CAGCTCGCGT CGTGCAAGAC GTGACAAATG GAAGTAGCAC
 241 GTCTCACTAG TCTCGTGCAG ATGGACAGCA CCGCTGAGCA ATGGAAGCGG GTAGGCCTTT
 301 GGGCAGCGG CCAATAGCAG CTTTGCTCCT TCGCTTTCTG GGCTCAGAGG CTGGGAAGGG
 361 GTGGGTCCGG GGGCGGGCTC AGGGGCGGGC TCAGGGGCGG GGGGGGCGCC CGAAGGTCCT
 421 CCGGAGGCC GGCATTCTGC ACGCTTCAA AGCGCACGTC TGCCGCGCTG TTCTCCTCTT
 481 CCTCATCTCC GGGCCTTTTC

10

(配列番号 2 5)、

1 CCTGCAGGGC CCACTAGTTC CATGTCCTTA TATGGACTCA TCTTTGCCTA TTGCGACACA
 61 CACTCAATGA ACACCTACTA CGCGCTGCAA AGAGCCCCGC AGGCCTGAGG TGCCCCACC
 121 TCACCCTCT TCCTATTTTT GTGTAAAAAT CCAGCTTCTT GTCACCACCT CCAAGGAGGG
 181 GGAGGAGGAG GAAGGCAGGT TCCTCTAGGC TGAGCCGAAT GCCCTCTGT GGTCCCACGC
 241 CACTGATCGC TGCATGCCCA CCACCTGGGT ACACACAGTC TGTGATTCCC GGAGCAGAAC
 301 GGACCTGCC CACCCGGTCT TGTGTGCTAC TCAGTGGACA GACCCAAGGC AAGAAAGGGT
 361 GACAAGGACA GGGTCTTCCC AGGCTGGCTT TGAGTTCCTA GCACCGCCCC GCCCCCAATC
 421 CTCTGTGGCA CATGGAGTCT TGGTCCCCAG AGTCCCCCAG CGGCCTCCAG ATGGTCTGGG
 481 AGGGCAGTTC AGCTGTGGCT GCGCATAGCA GACATAACA GGACGGTGGG CCCAGACCCA
 541 GGCTGTGTAG ACCCAGCCCC CCGCCCCGC AGTGCCTAGG TCACCCACTA ACGCCCCAGG
 601 CCTGGTCTTG GCTGGGCGTG ACTGTTACCC TCAAAAGCAG GCAGCTCCAG GGTAAAAGGT
 661 GCCCTGCCCT GTAGAGCCCA CCTTCCTTCC CAGGGCTGCG GCTGGGTAGG TTTGTAGCCT
 721 TCATCACGGG CCACCTCCAG CCACTGGACC GCTGGCCCCT GCCCTGTCTT GGGGAGTGTG
 781 GTCCTGCGAC TTCTAAGTGG CCGCAAGCCA CCTGACTCCC CCAACACCAC ACTCTACCTC
 841 TCAAGCCCAG GTCTCTCCCT AGTGACCCAC CCAGCACATT TAGCTAGCTG AGCCCCACAG
 901 CCAGAGGTTC TCAGGCCCTG CTTTCAGGGC AGTTGCTCTG AAGTCGGCAA GGGGAGTGA
 961 CTGCCTGGCC ACTCCATGCC CTCCAAGAGC TCCTTCTGCA GGAGCGTACA GAAGCCAGGG
 1021 CCTGGCACC CGTGCAGACC CTGGCCCACC CCACCTGGGC GCTCAGTGCC CAAGAGATGT
 1081 CCACACCTAG GATGTCCCGC GGTGGGTGGG GGGCCCAGA GACGGGCAGG CCGGGGCAG
 1141 GCCTGGCCAT GCGGGGCCGA ACCGGGCACT GCCCAGCGTG GGGCGCGGGG GCCACGGCGC
 1201 GCGCCCCCAG CCCCCGGGCC CAGCACCCCA AGGCGGCCAA CGCCAAACT CTCCCTCCTC
 1261 CTCTTCTTCA ATCTCGCTCT CGCTCTTTTT TTTTTTCGCA AAAGGAGGGG AGAGGGGTA
 1321 AAAAAATGCT GCACTGTGCG GCGAAGCCGG TGAGTGAGCG GCGCGGGGCC AATCAGCGTG
 1381 CGCCGTTCCG AAAGTTGCCT TTTATGGCTC GAGCGGCCGC GGGCGGCCCC TATAAAACCC
 1441 AGCGGCGCGA CGCGCCACCA CCGCCGAGAC CGCGTCCGCC CCGCGAGCAC AGAGCCTCGC
 1501 CTTTGCCGAT CCGCCGCCCG TCCACACCCG CCGCCAGGTA AGCCCGGCCA GCCGACCGGG
 1561 GCAGGCGGCT CACGGCCCGG CCGCAGGCGG CCGCGGCCCC TTCGCCCGTG CAGAGCCGCC
 1621 GTCTGGGCCG CAGCGGGGGG CGCATGGGGG GGAACCGGA CCGCCGTGGG GGGCGCGGGA
 1681 GAAGCCCCTG GGCCTCCGGA GATGGGGGAC ACCCCACGCC AGTTCGGAGG CGCGAGGCCG
 1741 CGCTCGGGAG GCGCGCTCCG GGGGTGCCGC TCTCGGGGCG GGGGCAACCG GCGGGTCTT
 1801 TGTCTGAGCC GGGCTCTTGC CAATGGGGAT CGCAGGGTGG GCGCGCGGGA GCCCCGCCA
 1861 GGCCCGGTGG GGGCTGGGGC GCCATTGCGC GTGCGCGCTG GTCCTTTGGG CGCTAACTGC
 1921 GTGCGCGCTG GGAATTGGCG CTAATTGCGC GTGCGCGCTG GACTCAAGG CGCTAACTGC
 1981 GCGTGCGTTC TGGGGCCCG GGTGCCCGG CTTGGGCTGG GCGAAGGCG GGCTCGGCCG
 2041 GAAGGGGTGG GGTGCGCCGC GCTCCCGGGC CTTGCGCGC ACTTCCTGCC CGAGCCGCTG
 2101 GCGGCCGAG GGTGTGGCCG CTGCGTGC GC GCGCGCCGAC CCGCGCTGT TTGAACCGGG
 2161 CGGAGGCGGG GCTGGCGCCC GGTGGGAGG GGGTTGGGGC CTGGCTTCCT GCCGCGGCC
 2221 GCGGGGACGC CTCCGACCAG TGTTTGCCTT TTATGGTAAT AACGCGGCCG GCCCGGCTTC
 2281 CTTTGTCCCC AATCTGGGCG CGCGCCGGCG CCCCCTGGCG GCCTAAGGAC TCGGCGGCC
 2341 GGAAGTGGCC AGGGCGGGGG CGACCTCGGC TCACAGCGCG CCCGGCTATT CTCGAGCTC
 2401 ACC

20

30

40

50

(配列番号 26)。

【0083】

更なる例示的なプロモーターとしては、ヒト伸長因子1アルファプロモーター (EFS)、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスロング逆位末端反復配列 (LTR)プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP)、単純ヘルペスウイルス (HSV)プロモーター、目的とする遺伝子に対して異種の内因性細胞プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV)プロモーター、例えば、CMV最初期プロモーター領域 (CMVIE)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

いくつかの実施形態では、3' UTRは、配列番号27に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を共有するポリヌクレオチド (WPREエレメント) を含む：

```

1 ATTCGAGCAT CTTACCGCCA TTTATTCCCA TATTTGTTCT GTTTTTCTTG ATTTGGGTAT
61 ACATTTAAAT GTTAATAAAA CAAAATGGTG GGGCAATCAT TTACATTTTT AGGGATATGT
121 AATTACTAGT TCAGGTGTAT TGCCACAAGA CAAACATGTT AAGAAACTTT CCCGTTATTT
181 ACGCTCTGTT CCTGTTAATC AACCTCTGGA TTACAAAATT TGTGAAAGAT TGACTGATAT
241 TCTTAACTAT GTTGCTCCTT TTACGCTGTG TGGATATGCT GCTTTAATGC CTCTGTATCA
301 TGCTATTGCT TCCCGTACGG CTTTCGTTTT CTCCTCCTTG TATAAATCCT GGTTGCTGTC
361 TCTTTATGAG GAGTTGTGGC CCGTTGTCCG TCAACGTGGC GTGGTGTGCT CTGTGTTTGC
421 TGACGCAACC CCCACTGGCT GGGGCATTGC CACCACCTGT CAACTCCTTT CTGGGACTTT
481 CGCTTTCCCC CTCCCATCG CCACGGCAGA ACTCATCGCC GCCTGCCTTG CCCGCTGCTG
541 GACAGGGGCT AGGTTGCTGG GCACTGATAA TTCCGTGGTG TTGTCGGGGA AGGGCC

```

(配列番号 27)。

【0085】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号8~10から選択される配列に対する少なくとも95%の同一性を共有する。一実施形態では、発現カセットは、配列番号8~10から選択される配列に対する完全な同一性を共有するか、又は配列番号8~10から選択される配列に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を共有する：

30

40

50

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GCGGACCTTT
 61 GGTGCCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCCATCACT
 121 AGGGGTTCCT TGTAGTTAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACCAG GGTAATGGGG
 181 ATCCTCTAGA ACTATAGCTA GTCGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT
 241 TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCGCG GTTACATAAC TTACGGTAAA
 301 TGGCCCCGCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA TGACGTATGT
 361 TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA
 421 AACTGCCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTACGCCCC CTATTGACGT
 481 CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGCCAGTAC ATGACCTTAT GGGACTTTCC
 541 TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTCGAGG TGAGCCCCAC
 601 GTTCTGCTTC ACTCTCCCCA TCTCCCCCCC CTCCCCACCC CCAATTTTGT ATTTATTTAT
 661 TTTTAAATTA TTTTGTGCAG CGATGGGGGC GGGGGGGGGG GGGGGGGCGG CGCCAGGCGG
 721 GCGGGGGCCT GGCGAGGGGC GGGGCGGGGC GAGGCGGAGA GGTGCGGCGG CAGCCAATCA
 781 GAGCGGCGCG CTCCGAAAGT TTCCTTTTTAT GCGGAGGCGG CGGCGGCGGC GGCCCTATAA
 841 AAAGCGAAGC GCGCGGCGGG CGGGAGTCGC TCGCGGCTGC CTTGCGCCCC TGCCCCGCTC
 901 CGCCGCCGCC TCGCGCCGCC CGCCCCGGCT CTGACTGACC GCGTTACTCC CACAGGTGAG
 961 CGGGCGGGAC GGCCCTTCTC CTCCGGGCTG TAATTAGCGC TTGGTTTTAAT GACGGCTTGT
 1021 TTCTTTTCTG TGGCTGCGTG AAAGCCTTGA GGGGCTCCGG GAGGGCCCTT TGTGCGGGGG
 1081 GAGCGGCTCG GGGGGTGCCT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG AGCGCCGCGT GCGGCTCCGC
 1141 GCTGCCCGGC GGCTGTGAGC GCTGCGGGCG CGGCGCGGGG CTTTGTGCGC TCCGAGTGT
 1201 GCGGAGGGG AGCGCGGCCG GGGGCGGTGC CCCGCGGTGC GGGGGGGGCT GCGAGGGGAA
 1261 CAAAGGCTGC GTGCGGGGTG TGTGCGTGGG GGGGTGAGCA GGGGTGTGG GCGCGTCCGT
 1321 CGGGCTGCAA CCCCCCTGC ACCCCCCTCC CCGAGTTGCT GAGCACGGCC CGGCTTCGGG
 1381 TGCGGGGCTC CGTACGGGGC GTGGCGCGGG GCTCGCCGTG CCGGGCGGGG GGTGGCGGCA
 1441 GGTGGGGGTG CCGGGCGGGG CGGGGCCGCC TCGGGCCGGG GAGGGCTCGG GGGAGGGGCG
 1501 CGGCGGCCCC CGGAGCGCCG GCGGCTGTGC AGGCGCGGGC AGCCGCAGCC ATTGCCTTTT
 1561 ATGGTAATCG TGCGAGAGGG CGCAGGGACT TCCTTTGTCC CAAATCTGTG CGGAGCCGAA
 1621 ATCTGGGAGG CGCCGCCGCA CCCCCTCTAG CGGGCGCGGG GCGAAGCGGT CGGGCGCCGG
 1681 CAGGAAGGAA ATGGGCGGGG AGGGCCTTTCG TGCGTGCCTT CGCCGCCGTC CCCTTCTCCC
 1741 TCTCCAGCCT CGGGGCTGTC CGCGGGGGA CGGCTGCCTT CGGGGGGGAC GGGGACGGGC
 1801 GGGGTTCGGC TTCTGGCGTG TGACCGGCGG CTCTAGAGCC TCTGCTAACC ATGTTTCATGC
 1861 CTCTTCTTTT TTCCTACAGC TCCTGGGCAA CGTGCTGGTT ATTGTGCTGT CTCATCATTT
 1921 TGGCAAAGAA TTCGAGCGGC CGCCAGCCGC CACCATGGTC TGCTTCAGAC TGTTCCCTGT
 1981 CCCTGGATCT GGTCTGGTGC TTGTGTGCTT GGTGCTGGGT GCTGTGAGAT CCTATGCCCT
 2041 TGAGCTGAAC CTGACTGACT CAGAAAATGC CACTTGCCCTG TATGCCAAGT GGCAGATGAA
 2101 CTTCACTGTG AGATATGAGA CTACCAACAA GACCTACAAG ACTGTGACCA TCTCAGACCA
 2161 TGGCACTGTC ACCTACAATG GATCAATCTG TGGTGTGATG CAGAATGGCC CAAAGATAGC
 2221 AGTGCAGTTT GGGCCCGGTT TTTCCTGGAT TGCTAACTTC ACCAAGGCAG CCTCCACCTA
 2281 CAGCATGAC TCAGTCAGCT TCAGCTACAA CACTGGGGAT AACACCACCT TCCCTGACGC
 2341 AGAGGACAAG GGAATCCTTA CTGTGGACGA ACTCCTGGCA ATCAGAATCC CCCTAACGA
 2401 CCTGTTTCTG TGCAACTCCC TTTCACCCCT TGAAGAAGAT GATGTGGTGC AACACTATTG
 2461 GGACGTCTCT GTGCAAGCCT TTGTGCAGAA TGGGACAGTG AGTACCAACG AGTTCTCTCTG
 2521 TGACAAGGAC AAGACCAGCA CTGTGGCCCC CACTATCCAC ACCACTGTGC CCAGCCCTAC
 2581 CACTACCCCC ACCCCTAAAG AGAAGCCAGA AGCTGGAACC TACTCAGTCA ACAATGGAAA
 2641 TGACACATGC CTCTTGCCA CCATGGGACT GCAGCTGAAC ATCACTCAGG ACAAGGTGGC

10

20

30

40

50

2701 CTCAGTGATT AACATCAACC CTAACACCAC TCATAGCACT GGGAGCTGCA GATCACATAC
 2761 AGCTCTGCTG AGGCTCAACT CCTCCACCAT CAAGTACCTG GACTTTGTGT TTGCTGTGAA
 2821 GAATGAGAAC AGGTTCTACC TCAAGGAAGT GAACATTTCC ATGTACCTGG TCAATGGTTC
 2881 AGTGTCTCTCT ATTGCCAACA ACAATCTGAG CTACTGGGAT GCACCCCTGG GATCCTCCTA
 2941 CATGTGCAAC AAGGAGCAGA CTGTGAGTGT GTCAGGTGCT TTTCAGATCA ACACTTTTGA
 3001 CCTGAGGGTG CAGCCCTTCA ATGTGACTCA GGGAAAGTAC TCCACTGCAC AAGAGTGTTC
 3061 CTTGGATGAT GACACTATCC TCATCCCCAT TATTGTGGGA GCTGGACTGT CAGGATTGAT
 3121 TATAGTGATT GTGATTGCTT ATGTGATTGG AAGGAGAAAAG AGCTATGCTG GCTACCAGAC
 3181 CCTGTAAAAG GGCGAATTCC AGCACACGCG TCCTAGGAGC TCGAGTACTA CTGGCGGCCG
 3241 TTACTAGTGG ATCCGCGGTA CAAGTAAGCA TGCAAGCTTC GAGGACGGGG TGAACACGC
 3301 CTGAATCAAG CTTATCGATA AATTGAGCA TCTTACCGCC ATTTATTCCC ATATTTGTTC
 3361 TGTTTTTCTT GATTTGGGTA TACATTTAAA TGTTAATAAA ACAAATGGT GGGGCAATCA
 3421 TTTACATTTT TAGGGATATG TAATTACTAG TTCAGGTGTA TTGCCACAAG ACAAACATGT
 3481 TAAGAACTT TCCCGTTATT TACGCTCTGT TCCTGTTAAT CAACCTCTGG ATTACAAAAT
 3541 TTGTGAAAAG TTGACTGATA TTCTTAACTA TGTTGCTCCT TTTACGCTGT GTGGATATGC
 3601 TGCTTTAATG CCTCTGTATC ATGCTATTGC TTCCCGTACG GCTTTCGTTT TCTCCTCCTT
 3661 GTATAAATCC TGGTTGCTGT CTCTTTATGA GGAGTTGTGG CCCGTTGTCC GTCAACGTGG
 3721 CGTGGTGTGC TCTGTGTTTG CTGACGCAAC CCCCACTGGC TGGGGCATTG CCACCACCTG
 3781 TCAACTCCTT TCTGGGACTT TCGCTTTCCC CCTCCCATC GCCACGGCAG AACTCATCGC
 3841 CGCTGCCTT GCCCGCTGCT GGACAGGGGC TAGGTTGCTG GGCCTGATA ATTCCGTGGT
 3901 GTTGTGCGGG AAGGGCCTCG ATACCGTCGA TATCGATCCT GGCTAATAAA GGAATTTTAT
 3961 TTTCAATTGCA ATAGTGTGTT GGAATTTTTT GTGTCTCTCA CTCGGAAGGA CATATGGGAG
 4021 GGCAAAATCAT TTA AACATC AGAATGAGTA TTTGGTTTTAG AGTTTGGCAA CATATGCCCA
 4081 TATGCTGGCT GCCATGAACA AAGGTTGGCT ATAAAGAGGT CATCAGTATA TGAACAGCC
 4141 CCCTGCTGTC CATTCCTTAT TCCATAGAAA AGCCTTGACT TGAGGTTAGA TTTTTTTTAT
 4201 ATTTTGTTTT GTGTTATTTT TTTCTTTAAC ATCCCTAAAA TTTTCTTAC ATGTTTTACT
 4261 AGCCAGATTT TTCTCCTCT CCTGACTACT CCCAGTCATA GCTGTCCCTC TTCTCTTATG
 4321 GAGATCGAAG CAATTCGTTT ATCTGAATTT CGACCACCCA TAATAGATCT CCCATTACC
 4381 TGGTAGATAA GTAGCATGGC GGGTTAATCA TTAAC TACAA GGAACCCCTA GTGATGGAGT
 4441 TGCCCACTCC CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC TCACTGAGGC CGGGCGACCA AAGGTCGCC
 4501 GACGCCCGGG CTTTGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAG

10

20

(配列番号 8)、

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GCGGACCTTT
 61 GGTGCGCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCCATCACT
 121 AGGGGTTCCCT TCTAGTTAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACCAG GGTAATGGGG
 181 ATCCTCTAGA ACTATAGCTA GTCGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT
 241 TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCGCG GTTACATAAC TTACGGTAAA
 301 TGGCCCCGCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA TGACGTATGT
 361 TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA
 421 AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTACGCCCC CTATTGACGT
 481 CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCCAGTAC ATGACCTTAT GGGACTTTCC
 541 TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTCGAGG TGAGCCCCAC
 601 GTTCTGCTTC ACTCTCCCCA TCTCCCCCCC CTCCCCACCC CCAATTTTGT ATTTATTTAT
 661 TTTTTAATTA TTTTGTGCAG CGATGGGGGC GGGGGGGGGG GGGGGGCGCG CGCCAGGCGG
 721 GCGGGGGCGG GGCGAGGGGC GGGGCGGGGC GAGGCGGAGA GGTGCGGCGG CAGCCAATCA
 781 GAGCGGCGCG CTCCGAAAGT TTCTTTTAT GCGGAGGCGG CGGCGGCGGC GGCCCTATAA
 841 AAAGCGAAGC GCGCGGCGGG CGGGAGTCGC TGCGCGCTGC CTTCGCCCCG TGCCCCGCTC
 901 CGCCGCCGCC TCGCGCCGCC CGCCCCGGCT CTGACTGACC GCGTTACTCC CACAGGTGAG
 961 CGGGCGGGAC GGCCCTTCTC CTCCGGGCTG TAATTAGCGC TTGGTTTAAAT GACGGCTTGT
 1021 TTCTTTTCTG TGGCTGCGTG AAAGCCTTGA GGGGCTCCGG GAGGGCCCTT TGTGCGGGGG
 1081 GAGCGGCTCG GGGGTTGCGT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG AGCGCCGCGT GCGGCTCCGC
 1141 GCTGCCCGGC GGCTGTGAGC GCTGCGGGCG CGGCGCGGGG CTTTGTGCGC TCCGAGTGT
 1201 GCGCGAGGGG AGCGCGGCCG GGGGCGGTGC CCGCGGTGC GGGGGGGGCT CCGAGGGGAA
 1261 CAAAGGCTGC GTGCGGGGTG TGTGCGTGGG GGGGTGAGCA GGGGTGTGG GCGGCTCGGT
 1321 CGGGCTGCAA CCCCCCTGC ACCCCCCCTCC CCGAGTTGCT GAGCACGGCC CGGCTTCGGG
 1381 TGCGGGGCTC CGTACGGGGC GTGGCGCGGG GCTCGCCGTG CCGGGCGGGG GGTGGCGGCA
 1441 GGTGGGGGTG CCGGGCGGGG CGGGGCCGCC TCGGGCCGGG GAGGGCTCGG GGGAGGGGCG
 1501 CGGCGGCCCC CGGAGCGGCC GCGGCTGTCG AGGCGGCGCG AGCCGAGCC ATTGCCTTTT

30

40

50

1561 ATGGTAATCG TCGAGAGGG CGCAGGGACT TCCTTTGTCC CAAATCTGTG CGGAGCCGAA
1621 ATCTGGGAGG CGCCGCCGCA CCCCTCTAG CGGGCGCGGG GCGAAGCGGT GCGGCGCCGG
1681 CAGGAAGGAA ATGGGCGGGG AGGGCCTTCG TGCGTCGCCG CGCCGCCGTC CCCTTCTCCC
1741 TCTCCAGCCT CGGGGCTGTC CGCGGGGGGA CGGCTGCCTT CGGGGGGGAC GGGGCAGGGC
1801 GGGGTTCCGG TTCTGGCGTG TGACCGGCGG CTCTAGAGCC TCTGCTAACC ATGTTTCATGC
1861 CTTCTTCTTT TTCCTACAGC TCCTGGGCAA CGTGCTGGTT ATTGTGCTGT CTCATCATTT
1921 TGGCAAAGAA TTCGAGCGGC CGCCAGCCGC CACCATGGTG TGCTTTAGAC TGTTCCTGT
1981 GCCTGGTTCA GGGCTGGTCC TGGTCTGTCT GGTGCTGGGG GCTGTCAGAA GCTATGCCTT
2041 GGAGCTGAAC CTCACTGATA GTGAAAATGC CACTTGTCTG TATGCTAAGT GGCAGATGAA
2101 CTTCACTGTG AGATATGAAA CCACCAACAA GACTTACAAA ACAGTGACCA TCTCAGATCA
2161 TGGAACTGTG ACCTACAACG GCAGCATTTG TGGAGACGAC CAGAACGGAC CAAAAATCGC
2221 TGTCCAATTT GGGCTGGAT TCTCCTGGAT TGCCAATTTT ACTAAAGCTG CCTCCACATA
2281 TTCAATTGAC TCAGTGTCCCT TCTCCTACAA CACTGGGGAC AACACTACTT TCCCTGATGC
2341 TGAAGATAAG GGAATCTTGA CAGTGGATGA GCTGCTGGCT ATCAGGATCC CTTTGAATGA
2401 CCTGTTTAGG TGTAATTCAC TGAGCACTCT GGAGAAGAAC GACGTGGTGC AGCACTACTG
2461 GGACGTGCTG GTGCAGGCCT TTGTGCAGAA CGGCACTGTG TCCACCAACG AATTCCTGTG
2521 TGATAAGGAC AAAACTTCCA CTGTGGCACC TACAATTCAC ACTACTGTGC CTTACCTAC
2581 CACCACTCCA ACTCCAAAGG AAAAGCCTGA AGCAGGAACC TACTCTGTGA ACAATGGCAA
2641 TGATACCTGT CTGTTGGCCA CCATGGGCCCT CCAACTGAAC ATTACTCAGG ACAAGGTGGC
2701 CTCAGTGATT AACATTAACC CCAACTACT CCACTCCACT GGCAGCTGTA GATCACACAC
2761 AGCCTTGCTC AGACTGAATA GCAGCACCAT CAAGTATTTG GATTTTGTGT TTGCAGTGAA
2821 GAATGAAAAC AGGTTCTACC TGAAGGAAGT CAACATCTCA ATGTACCTGG TGAACGGCTC
2881 AGTGTTACGC ATTGCCAACA ACAACCTCTC CTATTGGGAC GCTCCACTGG GGAGCAGCTA
2941 CATGTGTAAC AAGGAACAGA CTGTGTCAGT GTCAGGAGCC TTCCAGATTA ACACCTTTGA
3001 TCTGAGGGTC CAACCCTTTA ATGTCACTCA AGGAAAGTAT AGCACTGCCC AGGAGTGCTC
3061 CCTGGATGAT GACACCATT C GATTCCAAT CATTTGTGGT GCAGGACTTT CTGGGCTTAT
3121 TATTGTGATT GTGATTGCC T ATGTGATTGG CAGAAGGAAA TCCTATGCAG GGTACCAAC
3181 TCTGTAAAAA GGCGAATTC AGCACACGCG TCCTAGGAGC TCGAGTACTA CTGGCGGCCG
3241 TTACTATGG ATCCGCGGTA CAAGTAAAGCA TGCAAGCTTC GAGGACGGGG TGAACACGC
3301 CTGAATCAAG CTTATCGATA AATTTCAGCA TCTTACCGCC ATTTATTCCC ATATTTGTTT
3361 TGTTTTTCTT GATTTGGGTA TACATTTAAA TGTTAATAAA ACAAATGGT GGGGCAATCA
3421 TTTACATTTT TAGGGATATG TAATTACTAG TTCAGGTGTA TTGCCACAAG ACAAACATGT
3481 TAAGAACTT TCCCGTTATT TACGCTCTGT TCCTGTTAAT CAACCTCTGG ATTACAAAAT
3541 TTGTGAAAAG TTGACTGATA TTCTTAACTA TGTGCTCCT TTTACGCTGT GTGGATATGC
3601 TGCTTTAATG CCTCTGTATC ATGCTATTGC TTCCCGTACG GCTTTCGTTT TCTCCTCCTT
3661 GTATAAATCC TGGTTGCTGT CTCTTTATGA GGAGTTGTGG CCCGTTGTCC GTCAACGTGG
3721 CGTGGTGTGC TCTGTGTTT CTGACGCAAC CCCCACTGGC TGGGGCATTG CCACCACCTG
3781 TCAACTCCTT TCTGGGACTT TCGCTTTCCC CCTCCCATC GCCACGGCAG AACTCATCGC
3841 CGCCTGCCTT GCCCGCTGCT GGACAGGGGC TAGGTTGCTG GGCCTGATA ATTCCGTGGT
3901 GTTGTCCGGG AAGGGCCTCG ATACCGTCGA TATCGATCCT GGCTAATAAA GGAATTTTAT
3961 TTTCAATTGCA ATAGTGTGTT GGAATTTTTT GTGTCTCTCA CTCGGAAGGA CATATGGGAG
4021 GGCAAAATCAT TTA AACATC AGAATGAGTA TTTGGTTT TAG AGTTTGGCAA CATATGCCCA
4081 TATGCTGGCT GCCATGAACA AAGGTTGGCT ATAAAGAGGT CATCAGTATA TGAACAGCC
4141 CCCTGCTGTC CATTCCTTAT TCCATAGAAA AGCCTTGACT TGAGGTTAGA TTTTTTTTAT
4201 ATTTTGTTTT GTGTTATTTT TTTCTTTAAC ATCCCTAAAA TTTTCTTAC ATGTTTTACT
4261 AGCCAGATT T TCTCCTCT C CTGACTACT CCCAGTCATA GCTGTCCCTC TTCTTTATG
4321 GAGATCGAAG CAATTCGTTG ATCTGAATTT CGACCACCCA TAATAGATCT CCCATTACCC
4381 TGGTAGATAA GTAGCATGGC GGGTTAATCA TTA ACTACAA GGAACCCCTA GTGATGGAGT
4441 TGGCCACTCC CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC TCACTGAGGC CGGGCGACCA AAGGTCGCC
4501 GACGCCCGGG CTTTGCCCCG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAG

(配列番号 9)、及び

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GGCGACCTTT
61 GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCCATCACT
121 AGGGGTTCC TGTAGTTAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACCAG GGTAATGGGG
181 ATCCTCTAGA ACTATAGCTA GTCGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT
241 TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCGC GTTACATAAC TTACGGTAAA
301 TGGCCCCGCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCATTG ACGTCAATAA TGACGTATGT

361 TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA
421 AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTG TCATATGCCA AGTACGCCCC CTATTGACGT
481 CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGCCAGTAC ATGACCTTAT GGGACTTTCC
541 TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGTATTACC ATGGTFCGAGG TGAGCCCCAC
601 GTTCTGCTTC ACTCTCCCCA TCTCCCCCCC CTCCCCACCC CCAATTTTGT ATTTATTTAT
661 TTTTTAATTA TTTTGTGACG CGATGGGGGC GGGGGGGGGG GGGGGGGCGG CGCCAGGCGG
721 GGCGGGGGCG GGCGAGGGGC GGGCGGGGGC GAGGCGGAGA GGTGCGGGCG CAGCCAATCA
781 GAGCGGGCGG CTCCGAAAGT TTCCTTTTAT GGGGAGGCGG CGGCGGGCGG GGCCCTATAA
841 AAAGCGAAGC GCGCGGGGGG CGGGAGTCGC TGCGCGCTGC CTTGCCCCCG TGCCCCGCTC
901 CGCCGCGGCC TCGCGCCGCC CGCCCCGGCT CTGACTGACC GCGTACTCC CACAGGTGAG
961 CGGGCGGGAC GGCCCTTCTC CTCGGGGCTG TAATTAGCGC TTGGTTAAT GACGGCTTGT
1021 TTCTTTTCTG TGGCTGCGTG AAAGCCTTGA GGGGCTCCGG GAGGGCCCTT TGTGCGGGG
1081 GAGCGGCTCG GGGGGTGCCT GCGCCGCGCA CCGTGTGTGT GTGCGTGGG AGCGCCGCGT GCGGCTCCCG
1141 GCTGCCCGGC GGCTGTGAGC GCTGCGGGCG CGGCGGGGG CTTTGTGCGC TCCGCAGTGT
1201 GCGCGAGGGG AGCGCGGGCG GGGCGGTGC CCGCGGTGC GGGGGGGGCT GCGAGGGGAA
1261 CAAAGGCTGC GTGCGGGGTG TGTGCGTGGG GGGGTGAGCA GGGGTGTGG GCGCGTGGT
1321 CGGCGTCAA CCCCCCTGC ACCCCCTCC CCGAGTTGCT GAGCACGGCC CGGCTCGGG
1381 TGCGGGGCTC GTCAGGGGC GTGGCGGGG GCTCGCCGTG CCGGGCGGGG GGTGCGGCA
1441 GGTGGGGGTG CCGGGCGGGG CGGGGCCGCC TCGGGCCGGG GAGGGCTCGG GGGAGGGCG
1501 CGCGGGCCCC CGGAGCGCCG GCGGCTGTCG AGCGCGGGC AGCCGAGCC ATTGCTTTT
1561 ATGGTAATCG TCGGAGAGGG CGCAGGGACT TCCTTTGTCC CAAATCTGTG CCGAGCCGAA
1621 ATCTGGGAGG CCGCCGCGCA CCCCCTTAG CCGGCGGGG GCGAAGCGGT GCGGCGCCCG
1681 CAGGAAGGAA ATGGGCGGGG AGGGCCTTCG TCGTGCCTG CGCCGCGCTC CCCTTCTCCC
1741 TCTCCAGCCT CGGGGCTGTC CCGGGGGGGA CGGCTGCCCT CCGGGGGGAC GGGGCGAGGC
1801 GGGGTTCCGG TTCTGGCGTG TGACCGGGCG CTCTAGAGCC TCTGCTAACC ATGTTTCATG
1861 CTTCTTCTTT TTCCTACAGC TCCTGGGCAA CGTGCTGGT ATTGTGCTGT TCTATCATTT
1921 TGGCAAAGAA TTCGAGCGGC GTCAGCGGC CACCATGGT TGTTTTAGG TGTTCCTGT
1981 CCCTGGTTCA GGACTGGTCT TAGTGTGTCT GGTGCTTGA GCTGTGAGAA GCTATGCCCT
2041 GGAGCTGAAC CTGACTGACT CAGAAAATGC CACTGCGCTG TATGCCAAGT GGCAGATGAA
2101 CTTCACTGTC AGATATGAAA CCACCAACAA GACCTATAAG ACTGTGACCA TCTCAGACCA
2161 TGGCACTGTG ACTTACAATG GGTCAATTG TGAGAGTGAC CAGAATGGCC CTAAGATAGC
2221 TGTCCAGTTT GGTCCAGGAT TCAGCTGGAT TGCCAACTTC ACCAAGGCAG CCAGCACCTA
2281 CAGATTGAC TCTGTGTCT TCTCCTACAA CACAGGAGAC AACACCCTT TCCCTGATGC
2341 AGAGGACAAA GGTATCCTGA CTGTGGATGA GTTGTGGCA ATCAGGATCC CACTGAACGA
2401 TCTGTTCCAG TGCAACTCAC TGTCCACTCT GAAAAGAAAT GATGTGGTGC AGCACTATTG
2461 GGATGTGCTA TTCAGGCCT TTGTCCAGAA TGGGACTGTG TCAACTAATG AGTTCCTGTG
2521 TGACAAGGAC AAGACAAGCA CTGTAGCCCC CACTATCCAT ACCACAGTAC CTAGCCCCAC
2581 CACTACTCCA ACCCCCAAGG AGAAGCCTGA GGCTGGCACC TACTCAGTGA ACAATGGGAA
2641 TGACACCTGT TTGTGGCCA CTATGGGACT CCAACTGAAC ATCACCAGG ACAAGTGGC
2701 CTTGTGATC AATATCAATC CCAACACCAC CCACAGCACT GGGTCTGCA GAAGCCACAC
2761 TGCCCTCCTG AGGCTCAACT CATCAACTAT CAAGTACTTG GATTTTGTGT TTGCAGTGAA
2821 GAATGAGAAC AGATTCTACC TCAAAGAGGT CAACATTTCA ATGTACTTGG TGAATGGGAG
2881 TGTGTTCTCC ATTGCTAACA ACAACCTGAG CTAAGGGAT GCCCTCTGG GCTCCTCATA
2941 CATGTGCAAC AAGGAACAGA CTGTGAGTGT GTCAGGGGCC TTCCAGATCA ACACTTTGA
3001 CCTGAGAGTG CAGCCCTTTA ATGTGACACA GGGAAAGTAC AGCACTGCTC AGGAGTGCAG
3061 CCTGGATGAT GACACTATCC TGATCCCTAT CATTGTGGGG GCAGGCCTGT CTGGACTCAT
3121 TATTGTGATT GTGATTGCCT ATGTGATAGG GAGAAGGAAG TCTTATGCTG GATACCAGAC
3181 CCTGTAAAAG GGCGAATTC AGCACACGGC TCCTAGGAGC TCGAGTACTA CTGGCGGGCG
3241 TFACTAGTGG ATCCGCGGTA CAAGTAAGCA TGCAAGCTTC GAGGACGGGG TGAACACTCGC
3301 CTGAATCAAG CTTATCGATA AATTGAGCA TCTTACCGCC ATTTATTCCC ATATTTGTTC
3361 TGTTTTTCTT GATTTGGGTA TACATTTAAA TGTTAATAAA ACAAATGGT GGGGCAATCA
3421 TTTACATTTT TAGGGATATG TAATTACTAG TTCAGGTGTA TTGCCACAAG ACAACATGT
3481 TAAGAACTT TCCCGTTAT TACGCTCTGT TCCTGTTAAT CAACCTCTGG ATTACAAAAT
3541 TTGTGAAAGA TTGACTGATA TTCTTAACTA TGTGCTCCT TTTACGCTGT GTGGATATGC
3601 TGCTTTAATG CCTCTGTATC ATGCTATTGC TTCCCGTACG GCTTTCGTTT TCTCCTCCTT
3661 GTATAAATCC TGGTTGCTGT CTCTTTATGA GGAGTTGTGG CCCGTGTGCC GTCACCGTGG
3721 CGTGGTGTGC TCTGTGTTG CTGACGCAAC CCCACTGGC TGGGGCATG CCACCACCTG
3781 TCAACTCCTT TCTGGGACTT TCGCTTTCCC CCTCCGATC GCCACGGCAG AACTCATCGC
3841 CGCCTGCCTT GCCCCTGCT GGACAGGGGC TAGGTTGCTG GGCAGTATA ATTCCTGGT
3901 GTTGTGCGGG AAGGGCCTCG ATACCGTCA TATCGATCCT GGCTAATAAA GGAAATTTAT
3961 TTTCATGCA ATAGTGTGTT GGAATTTTTT GTGTCTCTCA CTCGGAAGGA CATATGGGAG

10

20

30

40

4021 GGCAAATCAT TTA AAAACATC AGAATGAGTA TTTGGTTTAG AGTTTGGCAA CATATGCCCA
4081 TATGCTGGCT GCCATGAACA AAGGTTGGCT ATAAAGAGGT CATCAGTATA TGAAACAGCC
4141 CCCTGCTGTC CATTCCCTTAT TCCATAGAAA AGCCTTGACT TGAGGTTAGA TTTTTTTTAT
4201 ATTTTGTTTT GTGTTATTTT TTTCTTTAAT ATCCCTAAAA TTTTCTTAC ATGTTTACT
4261 AGCCAGATT TCCCTCCTCT CCTGACTACT CCCAGTATA GCTGTCCCTC TTCTTATG
4321 GAGATCGAAG CAATTCGTTG ATCTGAATTT CGACCACCA TAATAGATCT CCCATTACC
4381 TGGTAGATAA GTAGCATGGC GGGTTAATCA TTAAC TACAA GGAACCCCTA GTGATGGAGT
4441 TGGCCACTCC CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC TCACTGAGGC CGGGCGACCA AAGGTCGCCC
4501 GACGCCCGGG CTTTGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAG

(配列番号 10) 。

50

【 0 0 8 6 】

ある特定の実施形態では、発現カセットは、配列番号 8 ~ 10 から選択される配列と比較して、本明細書に開示される修飾のうちのいずれかを含むが、これらに限定されない 1 つ以上の修飾を含む。特定の実施形態では、1 つ以上の修飾は、1 つ以上（例えば、全て）の上流 A T G 配列の除去、コザック配列の最適化コンセンサスコザック配列若しくは別のコザック配列（本明細書に開示されるもののうちのいずれかを含むが、これらに限定されない）での置換、及び / 又はポリアデニル化配列の全長ポリアデニル化配列又は別のポリアデニル化配列（本明細書に開示されるもののうちのいずれかを含むが、これらに限定されない）での置換のうちの 1 つ以上を含む。これらの例示的な発現カセット内の遺伝要素の例証的な構成が図 1 に示される。

10

【 0 0 8 7 】

一実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターである。一実施形態では、発現カセットは、配列番号 11 及び 12 から選択される逆位末端反復配列（I T R）を含む：

```
1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GGCGACCTTT
61 GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCCATCACT
121 AGGGGTTCTT
```

（配列番号 11）、

```
1 AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCACTGAGG
61 CCGGGCGACC AAAGTTCGCC CGACGCCCGG GCTTTGCCCG GCGGCCTCA GTGAGCGAGC
121 GAGCGCGCAG
```

20

（配列番号 12）。

【 0 0 8 8 】

関連実施形態では、本開示は、本明細書に開示される発現カセットを含む遺伝子療法ベクターを提供する。概して、本明細書に記載の遺伝子療法ベクターは、リソソーム関連膜タンパク質 2（L A M P - 2）の 1 つ以上のアイソフォームをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含み、L A M P - 2 を発現して、不十分な L A M P - 2 タンパク質発現レベル及び / 又はオートファジーフラックスの部分的又は完全な調整を、それを必要とする対象（例えば、ダノン病又は不十分な L A M P - 2 発現に少なくとも部分的に起因する不十分なオートファジーフラックスを特徴とする別の障害を有する対象）に行うことを可能にする。特定の実施形態では、発現カセットは、本明細書に開示される L A M P - 2 をコードするポリヌクレオチド配列、例えば、配列番号 2 ~ 5、又はその機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、バリエーション配列は、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれかに対する少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の同一性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションは、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれかの断片、例えば、配列番号 2 ~ 5 のうちのいずれかの配列の少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% を有する断片である。

30

【 0 0 8 9 】

遺伝子療法ベクター

遺伝子療法ベクターは、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターとすることができる。例証的な非ウイルスベクターとしては、例えば、ネイキッド DNA、カチオン性リポソーム複合体、カチオン性ポリマー複合体、カチオン性リポソーム - ポリマー複合体、及びエクソソームが挙げられる。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 9 0 】

本開示による組成物及び方法では、ウイルスベクターは、概して、A A V ベクターである。A A V は、4 . 7 k b の一本鎖 DNA ウイルスである。野生型 A A V が非病原性であり、かついずれの既知の疾患とも因果関係がないため、A A V に基づく組換えベクターは

50

優れた臨床安全性に関連している。加えて、AAVは、多数の組織において非常に効率的な遺伝子送達能力及び持続的導入遺伝子発現能力を提供する。「AAVベクター」とは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAVrh.74などを含むが、これらに限定されないアデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクターを意味する。AAVベクターは、全体的又は部分的に欠失されたAAV野生型遺伝子のうちの1つ以上、例えば、rep遺伝子及び/又はcap遺伝子を有することができるが、隣接する機能的逆位末端反復配列(ITR)を保持することができる。機能的ITR配列は、AAVビリオンの救出、複製、及びパッケージングに必要である。したがって、AAVベクターは、ウイルスの複製及びパッケージング(例えば、機能的ITR)のためにシスで必要とされる配列を少なくとも含むように本明細書で定義される。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、それらの配列が機能的救済、複製、及びパッケージングを提供する限り、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換によって改変されてもよい。AAVベクターは、1つ以上の修飾されたカプシドタンパク質(例えば、VP1、VP2、及び/又はVP3)を含むが、これらに限定されない他の修飾を含んでもよい。例えば、カプシドタンパク質は、指向性を変化させる及び/又は免疫原性を減少させるように修飾されてもよい。

10

【0091】

AAVに対する免疫原性が期待される。AAV療法の投与後、ウイルスカプシド及び/又は導入遺伝子に対する抗体の発現が文献で報告されている(Mendell et al. *New Engl. J. Med.* 377:1713-1722 (2017)、Rangarajan et al. *New Engl. J. Med.* 377:2519-2530 (2017))。公開されている文献と一致して、本開示で行った研究は、投与後30日目及び91日目にAAV9に対する血清中和抗体の増加を同様に示した。ベクター送達により、AAV9カプシドに対して特徴的な結合抗体応答がもたらされたが、LAMP2Bに対して有意な抗薬物抗体(ADA)応答は認められず、標的組織における形質導入媒介性LAMP2B機能に関して検出可能な結果はなかった。

20

【0092】

野生型AAVが非病原性であり、かついずれの既知の疾患とも因果関係がないため、AAVに基づく組換えベクターは優れた臨床安全性に関連している。加えて、AAVは、多数の組織において非常に効率的な遺伝子送達能力及び持続的導入遺伝子発現能力を提供する。AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAVrh.74などを含むAAVの様々な血清型が知られている。AAVベクターは、全体的又は部分的に欠失されたAAV野生型遺伝子のうちの1つ以上、例えば、rep遺伝子及び/又はcap遺伝子を有することができるが、隣接する機能的逆位末端反復配列(ITR)を保持することができる。組換えAAVベクターの血清型は、そのカプシドによって決定される。国際特許公開第2003/042397A2号は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV8、AAV9、及びrh10のカプシド配列を含む様々なカプシド配列を開示している。国際特許公開第2013/078316A1号は、AAVrh74由来のVP1のポリペプチド配列を開示している。多数の多様な天然に存在する又は遺伝子修飾されたAAVカプシド配列は、当該技術分野で既知である。

30

40

【0093】

例証的かつ非限定的なカプシドは、配列番号28の配列を有するAAV9カプシド(又はそのVP1、VP2、若しくはVP3断片)である。いくつかの実施形態では、本開示のAAVベクターは、配列番号28の全配列、配列番号28のアミノ酸138~736、又は配列番号28のアミノ酸203~736に対する少なくとも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%、又は少なくとも100%の同一性を共有するカプシドタンパク質を含む。

50

1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD
 61 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ
 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKRR LNFGQTGDTE
 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI
 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDENRFH CHFSPRDWQR
 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSDY QLPYVLGSAH
 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSOAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV
 421 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGGQNNQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP
 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS
 541 LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ
 601 ILPGMVWQDR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT
 661 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSN N VEFAVNTEGV
 721 YSEPRPIGTR YLTRNL

10

(配列番号 28)。

【0094】

AAV 発現ベクターは、転写方向に作動可能に連結された構成要素として、転写開始領域、目的とする DNA (すなわち、LAMP-2 遺伝子)、及び転写終結領域を含む制御エレメントを少なくとも提供するように、既知の技術を使用して構築される。

【0095】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、AAV9 ベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの発現カセットは、AAV2 逆位末端反復配列 (ITR) に隣接している。本開示のベクターの代替実施形態で使用される ITR には、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、及び AAV9 が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、AAV2/9 ベクターである。AAV2/9 という表記は、AAV ベクターが AAV2 の ITR 及び AAV9 のカプシドを有することを意味する。本開示の他の実施形態には、AAV2/9、AAV5/9、AAVrh74、AAV2/rh74、AAV5/9、及び AAV5/rh74 ベクターが含まれるが、これらに限定されない。当該技術分野で既知の他の ITR が使用されてもよい。本開示のベクターに有用な例示的な ITR (及び他の AAV 構成要素) としては、各々参照により全体が本明細書に組み込まれる、US6936466B2、US9169494B2、US2005/0220766A1、US2019/0022249A1、及び US7282199B2 に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0096】

本発明の実施に有用な遺伝子送達ウイルスベクターは、分子生物学の技術分野で周知の方法論を利用して構築することができる。典型的には、導入遺伝子を担持するウイルスベクターは、細胞形質導入を媒介する、導入遺伝子、好適な調節エレメント、及びウイルスタンパク質の産生に必要なエレメントをコードするポリヌクレオチドから構築される。かかる組換えウイルスは、当該技術分野で既知の技法によって、例えば、パッケージング細胞をヘルパープラスミド若しくはウイルスでトランスフェクトする又は一過性にトランスフェクトすることによって生成され得る。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例としては、HeLa 細胞、SF9 細胞 (任意選択的にバキュロウイルスヘルパーベクターを有する)、293 細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。US2017/0218395A1 に記載されているように、ヘルペスウイルスベースの系を使用して AAV ベクターを産生することができる。かかる複製欠損組換えウイルスを産生するための詳細なプロトコルは、例えば、各々の完全な内容が参照により本明細書に組み込まれる、W095/14785、W096/22378、米国特許第 5,882,877 号、米国特許第 6,013,516 号、米国特許第 4,861,719 号、米国特許第 5,278,056 号、及び W094/19478 に記載されている。

40

【0097】

本開示は、本明細書に開示される発現カセット又はベクター (例えば、遺伝子療法ベクター) と、1 つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤とを含む医薬組成物

50

も提供する。特定の実施形態では、本医薬組成物は、本明細書に開示される発現カセットを含む AAVベクターを含み、例えば、発現カセットは、LAMP-2Bをコードするコドン最適化導入遺伝子、例えば、配列番号3~5のうちのいずれか、及びそれらのバリエーションを含む。治療有効量の、LAMP-2の1つ以上のアイソフォームをコードするポリヌクレオチドの核酸配列を含むベクターを含む本明細書に開始される発現カセット又はベクターを含む、例えば、不十分なオートファジーフラックスを特徴とする障害（例えば、ダノン病）の予防又は治療における使用のための医薬組成物が提供される。

【0098】

本発明の実施に有用な AAVベクターは、アデノウイルススペースの系及びヘルパーを含まない系を含む様々な系を使用して、AAVピリオン（ウイルス粒子）にパッケージングすることができる。AAV生物学における標準方法には、Kwon and Schaffer, Pharm Res. (2008) 25(3): 489-99、Wu et al. Mol. Ther. (2006) 14(3): 316-27、Burger et al. Mol. Ther. (2004) 10(2): 302-17、Grimm et al. Curr Gene Ther. (2003) 3(4): 281-304、Deyle DR, Russell DW. Curr Opin Mol Ther. (2009) 11(4): 442-447、McCarty et al. Gene Ther. (2001) 8(16): 1248-54、及び Duan et al. Mol Ther. (2001) 4(4): 383-91に記載のものが含まれる。ヘルパーを含まない系には、US 6,004,797、US 7,588,772、及び US 7,094,604に記載のものが含まれていた。

10

20

【0099】

発現カセット又はベクターを含む医薬組成物は、選択された投与様式、例えば、脳室内、心筋内、冠動脈内、静脈内、動脈内、腎内、尿道内、硬膜外、又は筋肉内投与に好適な任意の形態であってもよい。1つ以上のLAMP-2アイソフォームをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子療法ベクターは、動物及びヒトに、唯一の活性剤として、又は他の活性薬剤と組み合わせて、単位投与形態で、従来の医薬支持体との混合物として投与することができる。いくつかの実施形態では、本医薬組成物は、本開示の遺伝子療法ベクターのうちのいずれかがエキスピボで形質導入された細胞を含む。

【0100】

ダノン病の治療

リソソーム障害及び/又はダノン病を治療する例示的な方法は、全体が本明細書に組み込まれる、WO 2018/170239 A1に提供されている。

【0101】

別の態様では、本開示は、ダノン病又は別のオートファジー障害の1つ以上の症状の予防、緩和、改善、軽減、抑制、排除、及び/又は逆転を必要とする対象におけるダノン病又は別のオートファジー障害の1つ以上の症状を予防する、緩和する、改善する、軽減する、抑制する、排除する、及び/又は逆転させる方法を提供し、本方法は、本開示の遺伝子療法ベクターを対象に投与することを含む。「ダノン病」という用語は、多系統臨床症状を伴うX連鎖優性骨格筋及び心筋障害を指す。ダノン病変異により、リソソーム関連膜タンパク質2(LAMP-2)タンパク質発現の不在がもたらされる。主な臨床的特徴には、骨格筋症及び心筋症、心臓伝導異常、認知障害、並びに網膜疾患が含まれる。男性は、典型的には、女性よりも早期に、より重度に罹患する。

30

40

【0102】

心臓注射は、例えば、頸静脈内などの中心静脈へのアクセスによって行われ得る。スワン・ガンツ肺動脈カテーテル(PAC)又は他のPACを使用して、AAVを心臓に送達することができる。

【0103】

一実施形態では、ベクターは、非経口、静脈内、動脈内、心臓内、冠動脈内、心筋内、腎内、尿道内、硬膜外、及び筋肉内からなる群から選択される経路を介して投与される。

50

一実施形態では、ベクターは、複数回投与される。一実施形態では、ベクターは、ベクターの筋肉内注射により投与される。一実施形態では、ベクターは、ベクターの骨格筋への注射により投与される。一実施形態では、発現カセットは、Takeishi et al. Muscle creatine kinase / SV40 hybrid promoter for muscle-targeted long-term transgene expression. Int J Mol Med. 2007 Feb; 19(2): 309-15に記載されるように、筋肉特異的プロモーター、任意選択的に筋クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーター又はMCK/SV40ハイブリッドプロモーターを含む。一実施形態では、ベクターは、心臓内注射により投与される。

【0104】

一実施形態では、ベクター、例えば、AAVベクターは、全身投与される、より具体的には、静脈内投与される。有利なことに、ベクターは、本来のLAMP-2B配列又は野生型LAMP-2B配列を使用したときに同じ応答を観察するのに必要な用量未満の用量(vg/mL、vg/kg体重、又はvg/分/kg)で投与される。特定の実施形態では、ベクターは、本明細書に開示されるLAMP-2Bをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含むAAV2/9ベクターである。

【0105】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象におけるLAMP-2Bを発現する方法であって、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを対象に全身投与することを含み、AAVベクターが、配列番号2に対する少なくとも95%の同一性を共有するか、又は配列番号2と同一である導入遺伝子を含む発現カセットを含み、導入遺伝子がエンハンサー/プロモーター領域に作動可能に連結され、対象へのAAVベクターの全身投与により、AAVベクターの投与前のLAMP-2Bの発現又は未処理対照対象におけるLAMP-2Bの発現と比較して増加したLAMP-2Bの発現がもたらされる、方法を提供する。いくつかの実施形態では、AAVビリオンは、ベクターゲノム中にAAV9カプシド及びAAV2 ITRを有するベクターであるAAV2/9ベクターである。特定の実施形態では、発現カセットは、本明細書に開示されるエレメントのうちのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、全身投与は、静脈内投与を含む。いくつかの実施形態では、対象は、ダノン病の症状を呈している。いくつかの実施形態では、対象は、ダノン病に罹患しているか、又はダノン病のリスクがある。

【0106】

いくつかの実施形態における全身(又はより具体的には静脈内)投与により、対象の1つ以上の組織(例えば、心臓、筋肉、及び/又は肝臓)に、導入遺伝子から発現されたmRNAの形態で、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現がもたらされる。いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、心臓において、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍、少なくとも約2.0倍、少なくとも約2.2倍、少なくとも約2.3倍、少なくとも約2.4倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、又は少なくとも約4倍増加する。いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、心臓において、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、又は少なくとも4倍増加する。いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、心臓において、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、3倍、又は4倍増加する。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、筋肉において、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍、少なくとも約2.0倍、少なくとも約2.2倍、少なくとも約2.3倍、少なくとも約2.4倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、又は少なくとも約4倍増加する。いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、筋肉において、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、又は少なくとも4倍増加する。

10

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、LAMP-2B導入遺伝子は心臓で発現され、対象の肝臓では発現されない。いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、肝臓と比較して、心臓において、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍、少なくとも約2.0倍、少なくとも約2.2倍、少なくとも約2.3倍、少なくとも約2.4倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、又は少なくとも約4倍であると観察される。いくつかの実施形態では、mRNAとしてのLAMP-2Bポリヌクレオチドの発現は、肝臓と比較して、心臓において、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、又は少なくとも4倍であると観察される。

20

30

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態では、野生型又は機能的LAMP-2Bタンパク質の発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、心臓において、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍、少なくとも約2.0倍、少なくとも約2.2倍、少なくとも約2.3倍、少なくとも約2.4倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、又は少なくとも約4倍増加する。いくつかの実施形態では、野生型又は機能的LAMP-2Bタンパク質の発現は、未処理の対象又は対照ベクターで処理された対象における発現と比較して、心臓において、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2.0倍、2

40

50

． 2 倍、 2 . 3 倍、 2 . 4 倍、 2 . 5 倍、 3 倍、 又は 4 倍 増加する。

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態では、野生型又は機能的 LAMP-2B タンパク質の発現は、肝臓と比較して、心臓において、少なくとも約 1 . 2 倍、少なくとも約 1 . 3 倍、少なくとも約 1 . 4 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 1 . 6 倍、少なくとも約 1 . 7 倍、少なくとも約 1 . 8 倍、少なくとも約 1 . 9 倍、少なくとも約 2 . 0 倍、少なくとも約 2 . 2 倍、少なくとも約 2 . 3 倍、又は少なくとも約 5 倍であると観察される。いくつかの実施形態では、野生型又は機能的 LAMP-2B タンパク質の発現は、肝臓と比較して、心臓において、少なくとも 1 . 2 倍、少なくとも 1 . 3 倍、少なくとも 1 . 4 倍、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 1 . 6 倍、少なくとも 1 . 7 倍、少なくとも 1 . 8 倍、少なくとも 1 . 9 倍、少なくとも 2 . 0 倍、少なくとも 2 . 2 倍、少なくとも 2 . 3 倍、少なくとも 2 . 4 倍、少なくとも 2 . 5 倍、少なくとも 3 倍、又は少なくとも 4 倍であると観察される。いくつかの実施形態では、野生型又は機能的 LAMP-2B タンパク質の発現は、肝臓と比較して、心臓において、1 . 2 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、1 . 6 倍、1 . 7 倍、1 . 8 倍、1 . 9 倍、2 . 0 倍、2 . 2 倍、2 . 3 倍、2 . 4 倍、2 . 5 倍、3 倍、又は 4 倍であると観察される。

10

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態では、遺伝子療法ベクターの投与により、未処理の対象の肝臓における発現と比較して、肝臓において、最大約 1 . 1 倍、最大約 1 . 2 倍、最大約 1 . 3 倍、最大約 1 . 4 倍、最大約 1 . 5 倍、最大約 1 . 6 倍、最大約 1 . 7 倍、最大約 1 . 8 倍、最大約 1 . 9 倍、又は最大約 2 倍増加した野生型又は機能的 LAMP-2B タンパク質の発現がもたらされる。いくつかの実施形態では、遺伝子療法ベクターの投与により、未処理の対象の肝臓における発現と比較して、肝臓において、最大 1 . 1 倍、最大 1 . 2 倍、最大 1 . 3 倍、最大 1 . 4 倍、最大 1 . 5 倍、最大 1 . 6 倍、最大 1 . 7 倍、最大 1 . 8 倍、最大 1 . 9 倍、又は最大 2 倍増加した野生型又は機能的 LAMP-2B タンパク質の発現がもたらされる。いくつかの実施形態では、遺伝子療法ベクターの投与により、未処理の対象の肝臓における発現と比較して、肝臓において、1 . 1 倍、1 . 2 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、1 . 6 倍、1 . 7 倍、1 . 8 倍、1 . 9 倍、又は 2 倍増加した野生型又は機能的 LAMP-2B タンパク質の発現がもたらされる。

20

【 0 1 1 2 】

一実施形態では、本開示は、疾患又は障害、任意選択的にダノン病の治療を必要とする対象における疾患又は障害、任意選択的にダノン病を治療する方法であって、細胞を、本開示による遺伝子療法ベクターと接触させることと、対象に細胞を投与することと、を含む、方法を提供する。一実施形態では、細胞は、幹細胞、任意選択的に多能性幹細胞である。一実施形態では、幹細胞は、心臓組織に分化することができる。一実施形態では、幹細胞は、筋肉組織、例えば、心筋組織及び/又は骨格筋組織に分化することができる。一実施形態では、幹細胞は、自家性である。一実施形態では、幹細胞は、人工多能性幹細胞 (iPSC) である。

30

【 0 1 1 3 】

一実施形態では、疾患又は障害は、オートファジー障害である。いくつかの実施形態では、オートファジー障害は、末期心不全、心筋梗塞、薬物毒性、糖尿病、末期腎不全、及び加齢からなる群から選択される。一実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、ヒトである。一実施形態では、対象は、ダノン病又は別のオートファジー障害の症状を呈している。一実施形態では、対象は、減少した又は検出不能な LAMP-2 発現を有すると特定されている。一実施形態では、対象は、変異型 LAMP-2 遺伝子を有すると特定されている。

40

【 0 1 1 4 】

本明細書に記載の方法を使用した治療に適した対象/患者には、不十分なオートファジーフラックス (例えば、ダノン病、並びに収縮期及び拡張期心不全、心筋梗塞、薬物毒性 (例えば、アントラサイクリン、クロロキン、及びそれらの誘導体)、糖尿病、末期腎疾

50

患、及び加齢を含むが、これらに限定されない他の既知の障害)を特徴とする疾患又は障害のリスクがあるが、症状を呈していない個体、並びに現在症状を呈している対象が含まれるが、これらに限定されない。かかる対象は、変異型 LAMP-2 遺伝子を有するか、又は減少した若しくは検出不能な LAMP-2 発現レベルを有すると特定された可能性がある。

【0115】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、患者は、小児、青年、又は成人ヒトである。いくつかの実施形態では、患者は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20歳、又は20歳以上である。いくつかの実施形態では、患者は、20～50歳 10
 である。いくつかの実施形態では、患者は、50～65歳である。いくつかの実施形態では、患者は、1～5歳、2～6歳、3～7歳、4～8歳、5～9歳、6～10歳、7～11歳、8～12歳、9～13歳、10～14歳、11～15歳、12～16歳、13～17歳、14～18歳、15～19歳、又は16～20歳である。いくつかの実施形態では、患者は、5～6歳、6～7歳、7～8歳、8～9歳、9～10歳、10～11歳、11～12歳、12～13歳、13～14歳、14～15歳、15～16歳、16～17歳、17～18歳、18～19歳、19～20歳、又は20～21歳である。特定の実施形態では、患者は、15～16歳である。

【0116】

いくつかの実施形態では、患者は、ヒト男性である。いくつかの実施形態では、患者は 20
 、小児、青年、又は成人ヒト男性である。いくつかの実施形態では、患者は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20歳の男性、又は20歳以上の男性である。いくつかの実施形態では、患者は、20～50歳の男性である。いくつかの実施形態では、患者は、50～65歳の男性である。いくつかの実施形態では、患者は、1～5歳、2～6歳、3～7歳、4～8歳、5～9歳、6～10歳、7～11歳、8～12歳、9～13歳、10～14歳、11～15歳、12～16歳、13～17歳、14～18歳、15～19歳、又は16～20歳の男性である。いくつかの実施形態では、患者は、5～6歳、6～7歳、7～8歳、8～9歳、9～10歳、10～11歳、11～12歳、12～13歳、13～14歳、14～15歳、15～16歳、16～17歳、17～18歳、18～19歳、19～20歳、 30
 又は20～21歳の男性である。特定の実施形態では、患者は、15～16歳である。

【0117】

いくつかの実施形態では、患者は、ヒト女性である。いくつかの実施形態では、患者は、小児、青年、又は成人ヒト女性である。いくつかの実施形態では、患者は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20歳の女性、又は20歳以上の女性である。いくつかの実施形態では、患者は、20～50歳の女性である。いくつかの実施形態では、患者は、50～65歳の女性である。

【0118】

いくつかの実施形態では、対象は、不十分なオートファジーフラックス(例えば、ダン 40
 ン病、並びに収縮期及び拡張期心不全、心筋梗塞、薬物毒性、糖尿病、末期腎疾患、及び加齢を含むが、これらに限定されない他の既知のオートファジー障害)を特徴とする疾患又は障害の症状を呈している。これらの症状は、能動的に現れていてもよく、又は(例えば、薬剤によって)抑制若しくは制御されていてもよく、又は寛解期にあってもよい。対象は、例えば、資格を有する医師によってその障害であると診断されていても診断されていなくてもよい。

【0119】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクター(例えば、AAVベクター)、又はそのベ 50
 クターを含む医薬組成物は、全身投与されたときに有効である。例えば、本開示のウイルスベクターは、いくつかの事例では、対象(例えば、非ヒト霊長類などの霊長類又はヒト

）に静脈内投与されたときに有効性を示す。いくつかの実施形態では、本開示のウイルスベクターは、全身投与（例えば、心臓、筋肉、及び／又は肺に投与）されたときに様々な組織に LAMP-2B の発現を誘導することができる。特定の実施形態では、配列番号 2 と実質的に同一の導入遺伝子又はそれと同一の導入遺伝子を含む AAV9 ベクターの対象への投与により、心臓組織における LAMP-2B の検出可能な発現がもたらされる。いくつかの実施形態では、LAMP-2B の発現は、対象の心臓の左室、右室、左房、及び右房のうちの一つ以上又は全てにおいて検出可能である。いくつかの実施形態では、LAMP-2B の発現は、対象の心臓の左室の部分領域 1 及び／又は部分領域 2 において検出可能である。

【0120】

「検出可能な発現」とは、典型的には、ウイルスベクターで処理されていない対照対象又は組織と比較して少なくとも 5%、10%、15%、20%、又はそれ以上の導入遺伝子の発現を指す。いくつかの実施形態では、検出可能な発現は、ベクターなし対照よりも少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 2.5 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 50 倍、又は少なくとも 100 倍高い発現を意味する。導入遺伝子の発現は、細胞内の野生型又は内因性遺伝子の発現に対する増加として決定することができる（導入遺伝子の発現が内因性遺伝子の発現に影響を及ぼし得る可能性を考慮する）。導入遺伝子の発現は、導入遺伝子の mRNA 転写物上に存在するが、内因性遺伝子の mRNA 転写物上には存在しない配列の RT-PCR 検出によって決定することもできる。例えば、転写物の 3' UTR を使用して、（異なる 3' UTR を有し得る）内因性遺伝子の発現とは無関係の導入遺伝子の発現を決定することができる。導入遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現は、以下の実施例に記載されるように、又は当該技術分野で既知の他の方法に記載されるように、ウェスタンブロット又は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって評価することができる。タンパク質の野生型外因性コピーに対して交差反応性の抗体を使用してもよい。いくつかの事例では、外因性タンパク質に特異的な抗体を特定し、それを使用して、導入遺伝子の発現を決定することができる。当業者であれば、標的細胞又は組織を考慮して適切な検出方法論を設計することができる。いくつかの事例では、発現は、標準曲線を使用して定量的に測定される。標準曲線は、実施例に記載される方法又は当該技術分野で既知の方法によって、精製された LAMP-2 タンパク質を使用して生成することができる。あるいは、導入遺伝子の発現は、対応する mRNA の定量化によって評価することができる。

【0121】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」及び「ゲノムコピー」という用語は、互換的に、試料中の一本鎖 AAV ゲノムポリヌクレオチドの数を指す。ベクターゲノムコピーは、ゲノムの WPRE 配列に隣接するプライマーなどの組換え AAV ゲノムに特異的なプライマーを使用した定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）又はデジタル液滴ポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）を使用して測定することができる。定量化は、使用されるプライマーの標的アンプリコンを有するプラスミド DNA を含む試料などの参照試料を用いて生成された標準曲線に対して行われてもよい。ddPCR 法及び qPCR 法は、当該技術分野で周知である。前臨床研究の用量単位は、体重 1 kg あたりのベクターゲノム（vg）で表される。臨床用量は、1 kg あたりのベクターゲノムコピー（GC）で表される。いずれの単位用語（GC/kg 及び vg/kg）も同じ実体を説明するよう意図されており、本開示において互換的に使用される。

【0122】

いくつかの実施形態では、心臓組織における LAMP-2B の検出可能な発現は、対象の体重 1 キログラム（kg）あたりのベクターゲノム（vg）で、 5×10^{14} vg/kg 以下、 3×10^{14} vg/kg 以下、 2×10^{14} vg/kg 以下、 1×10^{14} vg/kg 以下、 9×10^{13} vg/kg 以下、 8×10^{13} vg/kg 以下、 7×10^{13} vg/kg 以下、 6×10^{13} vg/kg 以下、 5×10^{13} vg/kg 以下、 4×10^{13} vg/kg 以下、 3×10^{13} vg/kg 以下、 2×10^{13} vg/kg 以下、又は

$1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 以下の用量で生じる。

【0123】

いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $2 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $2 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $3 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $3 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $4 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $4 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $6 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $6 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $7 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $7 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $8 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $8 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $2 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $2 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $3 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、又は $3 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。

【0124】

いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $3 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $3 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $7 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $7 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $2 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、又は $2 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 又は $9 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。

【0125】

いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、 $5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ 、又は $1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。

【0126】

いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。いくつかの実施形態では、心臓組織におけるLAMP-2Bの検出可能な発現は、対象の体重1キログラム(kg)あたりのベクターゲノム(vg)で、 $1 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$ ~ $1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で生じる。

【0127】

同時投与

安全性及び/又は有効性は、いくつかの事例では、免疫調節剤を含むが、これに限定されない1つ以上の二次薬剤の同時投与によって増加し得る。

【0128】

いくつかの実施形態では、本方法は、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、又はプレドニゾンを含むが、これらに限定されない、有効量のコルチコステロイドを対象に投与することを含む。AAV療法の投与に適切なコルチコステロイドの用量及び投与レジメンは、当該技術分野で既知である。Diehl et al. Cell. & Mol. Immunol. 14, 146 - 179 (2017)を参照されたい。

【0129】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のタクロリムス、シクロスポリン、ラパマ

イシン、シロリムス、又はそれらの誘導体を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のタクロリムスを投与する前に、有効量のコルチコステロイドを対象に投与することを更に含む。本明細書に開示されるように、タクロリムスは、いくつかの事例では、対象へのAAVの投与後のコルチコステロイドレベルのより急速な漸減を可能にし得る。タクロリムスは、AAV投与の7～21日前に投与されてもよく、例えば、AAV投与の21日前、14日前、10日前、7日前、5日前、2日前、又は1日前、好ましくは1日前に投与されてもよい。タクロリムスの投与は、AAVの投与後に継続されてもよい。タクロリムスは、AAVの投与後120日間、例えば、AAVの投与後1日間、5日間、10日間、20日間、30日間、40日間、50日間、60日間、70日間、80日間、90日間、100日間、110日間、又は120日間、好ましくは90日間 10
にわたって投与されてもよい。Tardieu et al. Hum. Gen. Ther. 25 (6) : 506 - 516 (2014) を参照されたい。

【0130】

タクロリムスは、0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、又は0.6 mg/kgの用量で投与されてもよい。タクロリムスは、700 mg/m²、800 mg/m²、900 mg/m²、1000 mg/m²、1100 mg/m²、1200 mg/m²、1300 mg/m²、1400 mg/m²、1500 mg/m²、1600 mg/m²、又は1700 mg/m²のミコフェノール酸モフェチルと同時に投与されてもよい。

【0131】

いくつかの実施形態では、本方法は、0.2 mg/kgのタクロリムスを1200 mg/m²のミコフェノール酸モフェチルと同時に対象に投与することを含む。

【0132】

タクロリムスは、2分割用量で1日1回経口投与されてもよい。タクロリムスは、2 ng/mL、2.5 ng/mL、3 ng/mL、3.5 ng/mL、4 ng/mL、4.5 ng/mL、又は5 ng/mLのトラフ血清レベルを維持するのに有効な量で投与されてもよい。タクロリムスの代替物には、ミコフェノール酸、シクロスポリン、シクロスポリン修飾物、シロリムス、エベロリムス、又はベラタセプトが挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のリツキシマブを対象に投与することを含む。本明細書に開示されるように、リツキシマブは、いくつかの事例では、AAVに対する免疫応答を軽減する及び/又は予防することができる。リツキシマブは、AAV投与の7～21日前に投与されてもよく、例えば、AAV投与の21日前、14日前、10日前、7日前、5日前、2日前、又は1日前、好ましくは1日前に投与されてもよい。リツキシマブは、AAV投与の7～21日後に投与されてもよく、例えば、AAV投与の21日後、14日後、10日後、7日後、5日後、2日後、又は1日後、好ましくは1日後に投与されてもよい。リツキシマブは、対象に、1、2、3回、又はそれ以上の回数投与されてもよい。Corti et al. Hum. Gene Ther. Clin. Dev. 28 (4) : 208 - 218 (2017) 及びCorti et al. Mol. Ther. Meth. Clin. Dev. 1, 14033 (2014) を参照されたい。

【0134】

リツキシマブは、300 mg/m²、400 mg/m²、500 mg/m²、600 mg/m²、700 mg/m²、750 mg/m²、800 mg/m²、900 mg/m²、1000 mg/m²、1100 mg/m²、又は1200 mg/m²、好ましくは750 mg/m²の用量で投与されてもよい。リツキシマブの代替物には、オビヌツズマブ、キシマ(リツキシマブ-abs)、又はレナリドミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0135】

タクロリムスは、リツキシマブの前に投与されてもよい。タクロリムスは、リツキシマ 50

ブと同時に投与されてもよい。タクロリムスは、リツキシマブの後に投与されてもよい。リツキシマブの投与は、タクロリムスの投与が継続している間、中止されてもよい。

【0136】

いくつかの実施形態では、リツキシマブは、AAV投与の-14日前及び-7日前に投与され、タクロリムスは、AAV投与の-7日前からAVVの投与の3ヶ月後まで投与される。

【0137】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のエクリズマブ、ラブリズマブ、又は別の補体阻害剤を対象に投与することを含む。補体阻害剤で治療する方法は、当該技術分野で既知である。Zipfel et al. Front. Immunol. (2019)を参照されたい。エクリズマブは、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の治療に承認されている。

10

【0138】

いくつかの実施形態では、対象は、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、任意選択的に、可逆性血小板減少症及び/又は急性腎障害(AKI)をもたらすaHUSなどの補体活性化の続発症のリスクがある。

【0139】

いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のリツキシマブを対象に投与すること、有効量のタクロリムスを対象に投与すること、及び/又は、有効量のエクリズマブを対象に投与することを更に含む。

20

【0140】

当該技術分野で既知の様々なコルチコステロイドが使用されてもよい。いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のデキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、ベタメサゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、ヒドロコルチゾン、コルチゾン、フルドロコルチゾン、又はそれらの組み合わせを対象に投与することを含む。

【0141】

医薬組成物及び投薬量

別の態様では、本開示は、医薬組成物を提供する。様々な実施形態では、本医薬組成物は、注射することができる製剤に薬学的に許容されるビヒクル(例えば、担体、希釈剤、及び賦形剤)を含む。例示的な賦形剤としては、ポロキサマーが挙げられる。ウイルスベクター(AAVを含む)の製剤緩衝液は、ベクターの凝集を防止するための塩と、ベクターの粘着性を減少させるための他の賦形剤(例えば、ポロキサマー)とを含む。これらは、具体的には、等張性の滅菌生理食塩水溶液(リン酸一ナトリウム若しくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、若しくは塩化マグネシウムなど、又はかかる塩の混合物)であってもよく、又は場合により、滅菌水若しくは生理食塩水の添加時に注射用溶液の構成を可能にする乾燥組成物、特に、凍結乾燥組成物であってもよい。有利なことに、この製剤は、凍結時(例えば、0未満、約-60、又は約-72)の保存及び使用に安定している。

30

【0142】

いくつかの実施形態では、本医薬組成物は、対象への投与に好適な濃度(例えば、200 mM)及びpH(例えば、pH 7.2 ± 0.1)の緩衝液(例えば、リン酸緩衝液)を含む。本医薬組成物は、好適な濃度(例えば、0.01%)のポロキサマーを含んでもよい。本医薬組成物は、凍結製品として治療部位に提供されてもよい。AAVの単位用量の最終体積は、患者の体重、例えば、キログラム(kg)、及び体積、例えば、1ミリリットル(mL)あたりの、又は本医薬組成物のAAVのベクターゲノム(vg)コピーの計算された若しくは実験的に決定されたレベルに基づいて全体的又は部分的に決定されてもよい。本医薬組成物は、注射に望ましい濃度又は体積を得るために必要に応じて希釈されてもよい。

40

【0143】

いくつかの実施形態では、本医薬組成物は、200 mMのNaCl、10 mMのNaH

50

2 P O 4、1% (w/v) のスクロース、0.01% のポロキサマー 188、pH 7.2 ± 0.1 を含む。

【0144】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、対象の総体重の1キログラム(vg)あたりのAAVベクターの約 1×10^{12} ~ 約 5×10^{14} ベクターゲノム(vg)(vg/kg)の用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} ~ 約 5×10^{14} vg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 5×10^{13} ~ 約 3×10^{14} vg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 5×10^{13} ~ 約 1×10^{14} vg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{12} vg/kg未満、約 3×10^{12} vg/kg未満、約 5×10^{12} vg/kg未満、約 7×10^{12} vg/kg未満、約 1×10^{13} vg/kg未満、約 3×10^{13} vg/kg未満、約 5×10^{13} vg/kg未満、約 7×10^{13} vg/kg未満、約 1×10^{14} vg/kg未満、約 3×10^{14} vg/kg未満、又は約 5×10^{14} vg/kgの用量で投与される。

【0145】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} ~ 2×10^{14} vg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} ~ 約 1.1×10^{14} vg/kgの用量で投与される。

【0146】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} vg/kg、約 3×10^{13} vg/kg、約 5×10^{13} vg/kg、約 7×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg、約 3×10^{14} vg/kg、又は約 5×10^{14} vg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} vg/kg、約 1.1×10^{13} vg/kg、又は約 2.0×10^{13} vg/kgの用量で投与される。

【0147】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、 1×10^{12} vg/kg、 3×10^{12} vg/kg、 5×10^{12} vg/kg、 7×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 3×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 7×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 3×10^{14} vg/kg、 5×10^{14} vg/kg、 7×10^{14} vg/kg、 1×10^{15} vg/kg、 3×10^{15} vg/kg、 5×10^{15} vg/kg、又は 7×10^{15} vg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、 6.7×10^{13} vg/kg、 1.1×10^{13} vg/kg、又は 2.0×10^{13} vg/kgの用量で投与される。

【0148】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、対象の総体重の1キログラム(vg)あたりのAAVベクターの約 1×10^{13} ~ 5×10^{14} ベクターゲノム(vg)(vg/kg)の用量で全身投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} ~ 5×10^{14} vg/kgの用量で全身投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 5×10^{13} ~ 3×10^{14} vg/kgの用量で全身投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 5×10^{13} ~ 1×10^{14} vg/kgの用量で全身的に投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} vg/kg未満未満、約 3×10^{13} vg/kg未満、約 5×10^{13} vg/kg未満、約 7×10^{13} vg/kg未満、約 1×10^{14} vg/kg未満、約 3×10^{14} vg/kg未満、又は約 5×10^{14} vg/kg未満の用量で全身投与される。

【0149】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} ~ 2×10^{14} vg/kgの用量で全身的に投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} ~ 約 1.1×10^{14} vg/kgの用量で投与される。

【0150】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} vg/kg、約 3×10^{13} vg/kg、約 5×10^{13} vg/kg、約 7×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg、約 3×10^{14} vg/kg、又は約 5×10^{14} vg/kgの用量で全身投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} vg/kg、約 1.1×10^{13} vg/kg、又は約 2.0×10^{13} vg/kgの用量で全身投与される。

【0151】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、 1×10^{13} vg/kg、 3×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 7×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 3×10^{14} vg/kg、又は 5×10^{14} vg/kgの用量で全身投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、 6.7×10^{13} vg/kg、 1.1×10^{13} vg/kg、又は 2.0×10^{13} vg/kgの用量で全身投与される。

10

【0152】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、対象の総体重の1キログラム(vg)あたりのAAVベクターの約 1×10^{13} ~ 5×10^{14} ベクターゲノム(vg)(vg/kg)の用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} ~ 5×10^{14} vg/kgの用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 5×10^{13} ~ 3×10^{14} vg/kgの用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} ~ 1×10^{14} vg/kgの用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約約 1×10^{13} vg/kg未満未満、約 3×10^{13} vg/kg未満、約 5×10^{13} vg/kg未満、約 7×10^{13} vg/kg未満、約 1×10^{14} vg/kg未満、約 3×10^{14} vg/kg未満、又は約 5×10^{14} vg/kg未満の用量で静脈内投与される。

20

【0153】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} ~ 2×10^{14} vg/kgの用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} ~ 約 1.1×10^{14} vg/kgの用量で投与される。

【0154】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 1×10^{13} vg/kg、約 3×10^{13} vg/kg、約 5×10^{13} vg/kg、約 7×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg、約 3×10^{14} vg/kg、又は約 5×10^{14} vg/kgの用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約 6.7×10^{13} vg/kg、約 1.1×10^{13} vg/kg、又は約 2.0×10^{13} vg/kgの用量で静脈内投与される。

30

【0155】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、 1×10^{13} vg/kg、 3×10^{13} vg/kg、 5×10^{13} vg/kg、 7×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg、 3×10^{14} vg/kg、又は 5×10^{14} vg/kgの用量で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、 6.7×10^{13} vg/kg、 1.1×10^{13} vg/kg、又は 2.0×10^{13} vg/kgの用量で静脈内投与される。

40

【0156】

いくつかの実施形態では、AAVビリオンの治療有効量は、対象の総体重の1キログラム(vg)あたりのAAVビリオンの約 1×10^{12} ~ 約 5×10^{14} ベクターゲノム(vg)(vg/kg)である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 1×10^{13} ~ 約 5×10^{14} vg/kgである。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 5×10^{13} ~ 約 3×10^{14} vg/kgである。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 5×10^{13} ~ 約 1×10^{14} vg/kgである。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 1×10^{12} vg/kg未満、約 3×10^{12} vg/kg未満、約 5×10^{12} vg/kg未満、約 7×10^{12} vg/kg未満、約 1×10^{13} vg/kg未満、約 3×10^{13} vg/kg未満、約 5×10^{13} vg/kg未満、約 7×10^{13} vg/kg未

50

満、約 1×10^{14} v g / k g 未満、約 3×10^{14} v g / k g 未満、又は約 5×10^{14} v g / k g である。

【0157】

いくつかの実施形態では、AAVビリオンの治療有効量は、約 $6.7 \times 10^{13} \sim 2 \times 10^{14}$ v g / k g である。いくつかの実施形態では、AAVビリオンは、約 $6.7 \times 10^{13} \sim 約 1.1 \times 10^{14}$ v g / k g の用量で投与される。

【0158】

いくつかの実施形態では、AAVビリオンの治療有効量は、約 1×10^{13} v g / k g、約 3×10^{13} v g / k g、約 5×10^{13} v g / k g、約 7×10^{13} v g / k g、約 1×10^{14} v g / k g、約 3×10^{14} v g / k g、又は約 5×10^{14} v g / k g である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 6.7×10^{13} v g / k g、約 1.1×10^{13} v g / k g、又は約 2.0×10^{13} v g / k g である。

10

【0159】

いくつかの実施形態では、AAVビリオンの治療有効量は、 1×10^{12} v g / k g、 3×10^{12} v g / k g、 5×10^{12} v g / k g、 7×10^{12} v g / k g、 1×10^{13} v g / k g、 3×10^{13} v g / k g、 5×10^{13} v g / k g、 7×10^{13} v g / k g、 1×10^{14} v g / k g、 3×10^{14} v g / k g、 5×10^{14} v g / k g、 7×10^{14} v g / k g、 1×10^{15} v g / k g、 3×10^{15} v g / k g、 5×10^{15} v g / k g、又は 7×10^{15} v g / k g である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、 6.7×10^{13} v g / k g、 1.1×10^{13} v g / k g、又は 2.0×10^{13} v g / k g である。

20

【0160】

定義

「リソソーム関連膜タンパク質2」及び「LAMP-2」という用語は、互換的に、(1) LAMP-2 核酸 (例えば、GenBank 受入番号 NM_002294.2 (アイソフォーム A)、NM_013995.2 (アイソフォーム B)、NM_001122606.1 (アイソフォーム C) を参照されたい) によってコードされるアミノ酸配列に対する、又は LAMP-2 ポリペプチド (例えば、GenBank 受入番号 NP_002285.1 (アイソフォーム A)、NP_054701.1 (アイソフォーム B)、NP_001116078.1 (アイソフォーム C) を参照されたい) のアミノ酸配列に対する、好ましくは、少なくとも約 25、50、100、200、300、400 個、若しくはそれ以上のアミノ酸の領域にわたって、又は全長にわたって、約 90% 超のアミノ酸配列同一性、例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99%、又はそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、(2) LAMP-2 ポリペプチド (例えば、本明細書に記載の LAMP-2 ポリペプチド) のアミノ酸配列、又は LAMP-2 核酸 (例えば、本明細書に記載の LAMP-2 ポリヌクレオチド) によってコードされるアミノ酸配列を含む免疫原に対して産生された抗体、例えば、ポリクローナル抗体、及びその保存的に修飾されたバリエーションに結合する、(3) LAMP-2 タンパク質をコードする核酸配列に対応するアンチセンス鎖、及びその保存的に修飾されたバリエーションにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で特異的にハイブリダイズする、(4) LAMP-2 核酸 (例えば、本明細書に記載の LAMP-2 ポリヌクレオチド、及び本明細書に記載の LAMP-2 ポリペプチドをコードする LAMP-2 ポリヌクレオチド) に対する、好ましくは、少なくとも約 25、50、100、200、500、1000、2000 個、若しくはそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって、又は全長にわたって、約 90% 超、好ましくは、約 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 超、若しくはそれ以上のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列を有する、核酸及びポリペプチド多型バリエーション、対立遺伝子、変異体、並びに種間相同体を指す。

30

40

【0161】

「リソソーム関連膜タンパク質2B」及び「LAMP-2B」という用語は、互換的に

50

、(1) LAMP-2B 核酸(例えば、NM__013995.2)によってコードされるアミノ酸配列に対する、又は LAMP-2B ポリペプチド(例えば、NP__054701.1)のアミノ酸配列に対する、好ましくは、少なくとも約 25、50、100、200、300、400 個、若しくはそれ以上のアミノ酸の領域にわたって、又は全長にわたって、約 90% 超のアミノ酸配列同一性、例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99%、又はそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、(2) LAMP-2B ポリペプチド(例えば、本明細書に記載の LAMP-2B ポリペプチド)のアミノ酸配列、又は LAMP-2B 核酸(例えば、本明細書に記載の LAMP-2B ポリヌクレオチド)によってコードされるアミノ酸配列を含む免疫原に対して産生された抗体、例えば、ポリクローナル抗体、及びその保存的に修飾されたバリエーションに結合する、(3) LAMP-2B タンパク質をコードする核酸配列に対応するアンチセンス鎖、及びその保存的に修飾されたバリエーションにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で特異的にハイブリダイズする、(4) LAMP-2B 核酸(例えば、本明細書に記載の LAMP-2B ポリヌクレオチド、及び本明細書に記載の LAMP-2B ポリペプチドをコードする LAMP-2B ポリヌクレオチド)に対する、好ましくは、少なくとも約 25、50、100、200、500、1000、2000 個、若しくはそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって、又は全長にわたって、約 90% 超、好ましくは、約 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 超、若しくはそれ以上のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列を有する、核酸及びポリペプチド多型バリエーション、対立遺伝子、変異体、並びに種間相同体を指す。

10

20

【0162】

タンパク質(例えば、LAMP-2B)に関して「機能的バリエーション」という用語は、タンパク質の 1 つ以上の機能的特性を保持する、少なくとも約 30、少なくとも約 40、少なくとも約 50、少なくとも約 60、少なくとも約 70、又は少なくとも約 80 個のアミノ酸が存在するポリペプチド配列、又はポリペプチド配列の断片を指す。例えば、LAMP-2B の機能的バリエーションは、(1) ヒト心筋細胞機能の調節(Chiet al. (2019) PNAS USA 116 (2) 556-565)、(2) ダノン病における代謝機能及び生理学的機能の改善(Adler et al. (2019) J. Am. College Cardiology S0735-1097 (19) 31295-1)、及び/又は(3) オートファジー(Rowland et al. (2016) J. Cell Sci. (2016) 129, 2135-2143)などの 1 つ以上の機能を保持する LAMP-2B (本明細書に定義されるとおりである)である。

30

【0163】

LAMP-2B は、内腔ドメイン(残基 29~375)、膜貫通ドメイン(残基 376~399)、及び細胞質ドメイン(残基 400~410)を有する。UniProt 受入番号 P13473 を参照されたい。LAMP-2B の機能には、様々なストレスに応答し、かつ長い生物学的半減期を有するタンパク質の正常な代謝回転の一環として、タンパク質のリソソーム分解を媒介するプロセスである、シャペロン媒介性オートファジーが含まれる(Cuervo et al. Science 273: 501-503 (1996))、Cuervo et al. J. Cell Sci. 113: 4441-4450 (2000)、Bandyopadhyay et al. Mol. Cell. Biol. 28: 5747-5763 (2008)、Li et al. Exp. Cell Res. 327: 48-56 (2014)、Hubert et al. Biol. Open 5: 1516-1529 (2016)。LAMP-2B は、リソソーム分解のために GAPPDH 及び MLLT11 を標的とし得る。LAMP-2B は、オートファジー中のオートファゴソームとリソソームの融合に必要とされる場合がある。LAMP2 を欠く細胞が正常なレベルの VAMP8 を発現するが、オートファゴソーム上に STX17 を蓄積することができないことが示唆されており、これは、オートファゴソームとリソソームとの間の融合が欠如しているという最も説得力のある説明である。LAMP-2B は、オートファゴソームの内容物の正常な分解に必要とされる場合がある。LAMP-2B は、リソソ-

40

50

ムタンパク質分解におけるその機能による外因性抗原の効率的なMHC II 媒介性提示に必要とされる場合があり、エンドソーム/リソソーム区画内のプロテアーゼによって生成された抗原性ペプチドは、新生MHC II サブユニットによって捕捉される (Crotzer et al. Immunology 131: 318 - 330 (2010))。

【0164】

したがって、LAMP - 2 Bの機能的バリエーションには、前述の機能のうちのいずれかを媒介することができるLAMP - 2 Bの断片が含まれる。いくつかの実施形態では、LAMP - 2 Bの機能断片は、ルーメンドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、LAMP - 2 Bの機能的バリエーションは、天然LAMP - 2 Bに対する1つ以上のC末端又はN末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、LAMP - 2 Bの機能的バリエーションは、天然LAMP - 2 Bに対する1つ以上の内部欠失を含む。

10

【0165】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列との関連での「同一の」又は「同一性」パーセントという用語は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用して又は手作業でのアライメント及び目視検査によって測定される、比較ウィンドウ又は指定された領域にわたって最大一致について比較及びアライメントを行った場合、同じであるか、又は同じアミノ酸残基若しくはヌクレオチドの特定のパーセンテージを有する (すなわち、参照配列、例えば、本明細書に記載のLAMP - 2 ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列に対する、特定の領域にわたって、少なくとも約80%の同一性、例えば、少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を共有する)、2つ以上の配列又は部分配列を指す。その場合、かかる配列は、「実質的に同一」であると考えられる。この定義は、試験配列の補完も指す。好ましくは、同一性は、参照配列の少なくとも約25アミノ酸長又はヌクレオチド長の領域、例えば、50、100、200、300、400アミノ酸長又はヌクレオチド長の領域、又は全長にわたって存在する。

20

【0166】

配列比較の場合、典型的には、1つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列がコンピューターに入力され、必要に応じて部分配列の座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。デフォルトプログラムパラメータを使用することができ、又は代替パラメータを指定することができる。その後、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。核酸及びタンパク質のLAMP - 2核酸及びタンパク質に対する配列比較の場合、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズム及びデフォルトパラメータが使用される。

30

【0167】

本明細書で使用される「比較ウィンドウ」は、20~600、通常では約50~約200、より通常では約100~約150からなる群から選択される連続位置数のうちのいずれか1つのセグメントへの参照を含み、ここで、ある配列と同じ連続位置数の参照配列を最適に整列させた後に、これらの2つの配列が比較されてもよい。比較のための配列アライメント法は、当該技術分野で周知である。比較のための最適な配列アライメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化実装 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)によって、又は手作業でのアライメント及び目視検査 (例えば、Ausubel et

40

50

al., eds., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement) を参照されたい) によって行うことができる。配列同一性パーセント及び配列類似性パーセントの決定に好適なアルゴリズムの例は、BLAST及びBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990) 及び Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1977) に記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (ワールドワイドウェブ ncbi.nlm.nih.gov/) から公的に入手可能である。

10

【0168】

2つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であるという指示は、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に記載されるように、第2の核酸によってコードされるポリペプチドに対して産生される抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、ポリペプチドは、典型的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換のみ異なる場合、第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指示は、2つの分子又はそれらの相補体がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であるという更に別の指示は、同じプライマーを使用して配列を増幅することができることである。

【0169】

20

本明細書で使用される場合、「投与」とは、例えば、経腸投与、非経口投与、肺投与、及び局所/経皮投与を含む、局所投与及び全身投与を指す。本明細書に記載の方法に利用される化合物(例えば、1つ以上のLAMP-2アイソフォームをコードするポリヌクレオチド)の投与経路には、対象に対する、例えば、経口(per os (P.O.))投与、経鼻若しくは吸入投与、坐薬としての投与、局所接触、経皮送達(例えば、経皮パッチを介して)、くも膜下腔内(IT)投与、静脈内(「iv」)投与、腹腔内(「ip」)投与、筋肉内(「im」)投与、病巣内投与、又は皮下(「sc」)投与、あるいは徐放デバイス、例えば、小型浸透圧ポンプの植込み、デポ製剤の投与などが含まれる。投与は、非経口及び経粘膜(例えば、経口、経鼻、腔内、直腸、又は経皮)を含む任意の経路によるものとすることができる。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腎内、尿道内、心臓内、冠動脈内、心筋内、皮内、硬膜外、皮下、腹腔内、脳室内、イオン泳動、及び頭蓋内が含まれる。他の送達様式には、リポソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチなどの使用が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0170】

「補正」という用語は、対象のベースラインレベルに対する臨床パラメータの変化であって、そのパラメータを、ダノン病を有しない者において観察されたパラメータレベルに等しい又はほぼ等しいレベルに正規化させる変化を指す。

【0171】

「改善」という用語は、対象のベースラインレベルに対する臨床パラメータの変化であって、そのパラメータを、治療投与前の対象において観察されたパラメータレベルよりも実質的に高い(又は低い)レベルまで増加(又は減少)させる変化を指す。例えば、改善には、対象の心臓における自己貪食空胞のサイズの縮小又は数の減少が含まれてもよい。

40

【0172】

「全身投与」及び「全身投与される」という用語は、化合物又は組成物が循環系を介して医薬作用の標的部位を含む体内の部位に送達されるように、化合物又は組成物を哺乳動物に投与する方法を指す。全身投与には、経口投与、鼻腔内投与、直腸投与、及び非経口投与(例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、経皮、及び皮下などの消化管以外)が含まれるが、これらに限定されない。

【0173】

「同時投与する」又は「同時投与」という用語は、例えば、化合物(例えば、LAMP

50

- 2 ポリヌクレオチド) 及び / 又はその類似体並びに別の活性剤に関して使用される場合、化合物及び / 又は類似体と活性剤が生理学的効果を同時に達成できるように、それらの両方の投与を指す。しかしながら、これらの2つの薬剤と一緒に投与される必要はない。ある特定の実施形態では、1つの薬剤の投与は、他方の投与に先行することができる。同時生理学的効果は、必ずしも循環中に両方の薬剤が同時に存在することを必要としない。しかしながら、ある特定の実施形態では、同時投与により、典型的には、任意の所与の用量についてそれらの最大血清濃度のかなりの割合(例えば、20%以上、例えば、30%若しくは40%以上、例えば、50%若しくは60%以上、例えば、70%若しくは80%若しくは90%以上)で両方の薬剤が体内(例えば、血漿中)に同時に存在する結果になる。

10

【0174】

「治療有効量」という用語は、オートファジー障害又は欠損を特徴とする疾患(例えば、ダンオン病)の最終重症度を軽減するのに十分な量で、所望の結果、例えば、1つ以上のLAMP-2アイソフォームの発現の増加をもたらすのに必要な遺伝子療法ベクターの量及び / 若しくは投薬量、並びに / 又は投薬レジメンを指す。

【0175】

「有効量」という用語は、所望の結果、例えば、免疫抑制剤の免疫抑制効果をもたらすのに必要な遺伝子療法ベクターの量及び / 若しくは投薬量、並びに / 又は投薬レジメンを指す。

【0176】

「投与させる」という語句は、医療専門家(例えば、医師)又は対象の医療を管理する者によって行われる、問題となっている薬剤 / 化合物の対象への投与を管理及び / 又は許可する行為を指す。投与させることには、対象に適切な治療レジメン若しくは予防レジメンの診断及び / 若しくは決定、並びに / 又は特定の薬剤 / 化合物の処方を含み得る。かかる処方には、例えば、処方箋書式の草案、医療記録の注釈付けなどが含まれ得る。

20

【0177】

本明細書で使用される場合、「治療する」及び「治療」という用語は、これらの用語が適用される疾患若しくは状態、又はかかる疾患若しくは状態の1つ以上の症状のいずれかの発症を遅延させること、その進行を遅らせる若しくは逆転させること、その重症度を軽減すること、又はそれを緩和する若しくは予防することを指す。「治療する」及び「治療」という用語は、疾患又は状態の1つ以上の症状を予防すること、緩和すること、改善すること、軽減すること、抑制すること、排除すること、及び / 又は逆転させることも含む。

30

【0178】

「緩和する」という用語は、その病理若しくは疾患の1つ以上の症状の軽減若しくは排除、及び / 又はその病理若しくは疾患の1つ以上の症状の発症速度の減少若しくは発症の遅延又はその重症度の軽減、及び / 又はその病理若しくは疾患の予防を指す。ある特定の実施形態では、病理又は疾患の1つ以上の症状の軽減又は排除は、例えば、LAMP-2の1つ以上のアイソフォームの発現レベルの測定可能な持続的増加を含み得る。

【0179】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という語句は、方法又は組成物に列挙された活性医薬品の属又は種を指し、更に、単独では列挙された兆候又は目的に対して実質的な活性を有しない他の薬剤を含み得る。

40

【0180】

「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、互換的にヒト対象を指す。

【0181】

「遺伝子導入」又は「遺伝子送達」という用語は、外来DNAを宿主細胞に確実に挿入するための方法又はシステムを指す。かかる方法により、組み込まれていない導入されたDNAの一過性発現、導入されたレプリコン(例えば、エピソーム)の染色体外複製及び発現、又は導入された遺伝物質の宿主細胞のゲノムDNAへの組み込みがもたらされ得る

50

【0182】

「ベクター」という用語は、(単独で出現する場合)本明細書において、別の核酸分子を導入又は輸送することができる核酸分子を指すために使用される。導入された核酸は、概して、ベクター核酸分子に連結される、例えば、挿入される。ベクターは、細胞内の自己複製又は逆転写を指示する配列を含んでもよく、又は宿主細胞DNAへの組み込みを可能にするのに十分な配列を含んでもよい。「ベクター」には、遺伝子療法ベクターが含まれる。本明細書で使用される場合、「遺伝子療法ベクター」という用語は、遺伝子療法の行う際に使用することができる、例えば、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を対象に送達することができるベクター(AAVビリオンなど)を指す。遺伝子療法ベクターは、治療的に活性なポリペプチド、例えば、LAMP-2B、又は対象に導入されたときに置換遺伝子療法に有用な他の遺伝子をコードする核酸分子(「導入遺伝子」)を含み得る。有用なベクターには、ウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。「AAVベクター」及び「AAVビリオン」という用語は、本明細書において、AAVカプシドにパッケージングされたベクターゲノムを指すために互換的に使用される。

10

【0183】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」という用語は、その発現カセットに組み込まれる治療的に活性なポリペプチド(例えば、LAMP-2B)をコードするポリヌクレオチド(導入遺伝子)の発現を適切な状況下で駆動することができるDNAセグメントを指す。宿主細胞に導入されると、発現カセットは、とりわけ、導入遺伝子をRNAに転写するように細胞の機構に指示することができ、その後、通常、更にプロセッシングされ、最終的に治療的に活性なポリペプチドに翻訳される。発現カセットは、遺伝子療法ベクターに含めることができる。概して、発現カセットという用語は、5' ITRに対して5'側及び3' ITRに対して3'側のポリヌクレオチド配列を除外する。

20

【0184】

本明細書において参照及び特定される全ての特許、特許刊行物、及び他の刊行物は、参照によりそれらの全体が全ての目的のために個別にかつ明示的に本明細書に組み込まれる。

【実施例】

30

【0185】

実施例1：LAMP2Bを発現する組換えAAV9ベクター

LAMP2Bを発現する組換えAAV9ベクターを、3プラスミド、ヘルパーウイルスフリー系により生成した。pAAV-LAMP2Bトランスファープラスミド、pAAV-2/9パッケージングプラスミド、及びpAd-HelperアデノウイルスヘルパープラスミドのHEK293T産生細胞への一過性トランスフェクションにより、血清型9カプシドタンパク質及びヒトLAMP2B発現カセット(AAV9-LAMP2B)に隣接するAAV2 ITRを含む組換えAAV粒子を生成した。

【0186】

AAVシストランスファープラスミド(pAAV-LAMP2B)の構造は、図1に示すように、AAV2に由来するウイルスITR領域に隣接する導入遺伝子発現カセットを含む。発現カセットは、CMV IEエンハンサー(CMV IEE)、ニワトリ-アクチン(CBA)プロモーター、キメラニワトリ-アクチン、及びウサギグロビンイントロンを含むキメラプロモーターによって駆動されるヒトLAMP2Bコード配列を含む。発現カセットは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)も含み、ウサギグロビンポリAシグナル(RGpA)によって終結される。

40

【0187】

実施例2：前臨床インビトロ及びインビボ有効性研究

インビトロ研究を、ダノン病(DD)を有する患者由来のiPSC由来心筋細胞に行い、LAMP2B発現の用量依存的増加及びDDにおける心筋細胞の重要な細胞特徴である

50

ミトコンドリア膜電位に対する有益な効果を示した。インビトロ表現型補正の実証後に、LAMP-2B遺伝子療法の実証研究を、臨床的に意義のあるカロリー制限されたLAMP2ノックアウト(KO)マウスモデルに行った。

【0188】

Lamp2 KOマウスに、2ヶ月齢時点で、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)又は 1×10^{13} 、 5×10^{13} 、及び 1×10^{14} v g / k gの用量のAAV9-LAMP2Bを静脈内注射し、6週交互絶食(6-weeks alternate fasting)させた後、処理後3ヶ月時点で評価した。図2及び図3に示すように、ヒトLAMP2Bの用量依存的増加及びLC3-II(オートファジーフラックスのマーカー)の減少が、AAV9で処理したKOマウスの心臓、肝臓、及び骨格筋を含むDDに特に冒されている臓器で観察された。

10

【0189】

図4に示すように、AAV9-LAMP2B投与により、処理の3ヶ月後に 5×10^{13} v g / k g及び 1×10^{14} v g / k gの用量で処理したLamp2 KOマウスにおいて、より少ない数の目に見える自己貪食空胞を含む、心臓超微細構造の改善がもたらされた。 1×10^{14} v g / k gで投与したLamp2 KOマウスコホート由来の心臓超微細構造が有意に改善し、対照WT動物と類似していた。逆に、PBSのみを投与したKOマウスは、心臓組織内に増加した数の液胞を示した。心機能を調べるために、研究終了前に侵襲的血行動態を行った。図11に示すように、収縮性を侵襲的左心室内圧(dP/dt最大値及びdP/dt最小値)により評価し、WT対照と比較して未処理のPBS対照Lamp2 KOマウスにおいて有意に減少することが分かった。WTマウスの平均dP/dt最大値及びdP/dt最小値は、それぞれ、7050 mmHg / s及び-5550 mmHg / sであった。LAMP2 KOマウスでは、平均dP/dt最大値及びdP/dt最小値は、PBS(n=7)で処理した群の場合、3656 mmHg / s及び-3265 mmHg / sであり、 1×10^{13} v g / k g(n=7)のAAV9-LAMP2Bで処理した群の場合、4197 mmHg / s及び-3542 mmHg / sであり、 5×10^{13} v g / k g(n=12)の場合、5073 mmHg / s及び-3905 mmHg / sであり、 1×10^{14} v g / k g(n=11)の場合、4729 mmHg / s及び-3765 mmHg / sであった。

20

【0190】

図12に示すように、AAV9-LAMP2Bは、成体Lamp2 KOマウスの心臓の超微細構造を有意に改善した。図13に示すように、心機能の有意な改善は、3ヶ月時点での侵襲的血行動態によって実証され、改善は、試験した最大用量 2×10^{14} v g / k gを通して用量依存的であった。この最高用量で、心臓血行動態は野生型表現型と同等であり、それ故に、最大限の有効性及び恐らく最適な有効量を示唆した。肝酵素の有意な減少は、肝臓異常の改善がAAV9-dose動物でも観察されたことを示唆した。この研究の結果は、AAV9-LAMP2B媒介性遺伝子療法が安全であり、 2×10^{14} v g / k gの有効用量で高齢マウスの心臓生理学、オートファジーフラックス、及び肝臓異常を改善することによって確立された疾患表現型を逆転させることに成功したことを示した。

30

40

【0191】

実施例3：前臨床薬理学

臨床病理学、組織病理学、及びLAMP-2B遺伝子療法に対する免疫応答を含む安全性測定を、Lamp2 KOマウスに行った。血清化学パネルは、PBS対照であるマウス又はAAV9-LAMP2Bベクターを投与したマウスのいずれにも有害転帰を示さなかった。WT動物と比較して血清カリウム(K⁺)レベルの有意な増加が未処理のPBS対照KOマウスで認められた。PBSを注射したLamp2 KO対照マウスと比較して、 5×10^{13} v g / k g、 1×10^{14} v g / k g、及び 2×10^{14} v g / k gのAAV9-LAMP2Bで処理したマウスにおいて、これらのK⁺レベルは有意に減少し、予想範囲に戻った。血清クレアチンレベル及び血中尿素窒素レベルが正常である場合の血

50

清カリウムの上昇は、過剰な筋肉破壊から生じる可能性がある (Lehnhardt 2011)。したがって、AAV9・LAMP2B投与による血清カリウムの観察された減少は、DDの重要な特徴であるLAMP-2B遺伝子療法で処理したマウスにおけるミオパチーの軽減を示す。心臓、肝臓、及び骨格筋組織の組織病理学は、AAV9・LAMP2Bで処理した試料に特記すべき変化を示さなかった。ベクターの生体内分布をqPCRで調べた結果、全身の臓器にわたって有意な分布が確認され、最も高いレベルのベクターゲノム(vg)が肝臓で認められ、肝臓と比較して心臓及び骨格筋ではvgが10倍低く、脳では100倍低かった。脾臓及び生殖腺は、最小量のベクターゲノム分布を呈した。mRNA推定による導入遺伝子発現の定量化を、 1×10^{14} vg/kg及び 2×10^{14} vg/kgのAAV9・LAMP2Bを投与したマウスに、RT-qPCRを使用して、組織のサブセットで検証した。平均して、心臓が最も高いレベルのヒトLAMP2B mRNAを有し、肝臓及び骨格筋におけるレベルが密接に続いた。脳、肺、腎臓、及び生殖腺も、中程度のレベルのヒトLAMP2B mRNAを示し、投与後6ヶ月時点で非常に低いレベルが脾臓で検出された。

【0192】

本明細書に記載の前臨床研究を、グッド・ラボラトリー・プラクティス(Good Laboratory Practice, GLP)に従って行い、最大 3×10^{14} vg/kgの用量に関連した予想外の死亡率、身体異常、行動異常、形態学的異常、血液学的異常、又は生化学的異常は示されなかった。この研究の結果は、AAV9・LAMP2B媒介性遺伝子療法が、Lamp2 KOマウスにおけるDD表現型において安全性及び持続的な利益を実証したことを示した。この研究は、LAMP-2B遺伝子療法のIV(静脈内)投与に対して安全かつ有効なプロファイルを示し、AAV9・LAMP2Bの最小限の有効用量が 5×10^{13} ~ 1×10^{14} vg/kgの範囲内であることを示し、ヒトにおけるダノン病の治療に対するLAMP-2B遺伝子療法の臨床的可能性を示している。

【0193】

実施例4：前臨床毒性学

加えて、102日間の非GLP研究を、GLPマウス毒性研究で試験した最大用量(3×10^{14} vg/kg)の治療用ベクターで処理した2歳の非ヒト霊長類(NHP)(カニクイザル)に行った。発送前に動物をAAV9中和抗体についてプレスクリーニングした。処理群及びビヒクル対照群に割り当てた全ての動物が完全な血清動態を示した(1:5、1:20、1:80希釈ではウイルスの中和を示さなかった)。2匹のサルを治療用ベクター群(3×10^{14} vg/kg)に割り当て、2匹のサルをビヒクル対照群に割り当てた。投与(伏在静脈への静脈内注射)後、動物を、ベースライン時点、並びに3、7、15、21、30、42、50、60、91、及び102日目に評価した。予想外の死亡率又は有意な体重の変化はなかった。臨床病理学のために、血液試料を複数の時点で両方のコホートから得た。7日目に軽度の一過性トランスアミナーゼ増加及び7日目に血小板の同時一過性減少(正常範囲内)がAAV9・LAMP2B注射群で観察され、いずれの病理学的続発症もなかった。試験50日目のクレアチニンキナーゼ及び乳酸脱水素酵素の軽度の上昇(正常範囲内)も認められ、毒付随して起こる性の臨床徴候はなかった。実施した他の血液学的評価又は生化学的評価のいずれにも、他の有意な処理関連効果は認められなかった。

【0194】

実施例5：LAMP-2B遺伝子療法臨床研究

6.7×10^{13} GC/kgの初回用量を臨床研究に選択した。用量漸増のアプローチは、 6.7×10^{13} GC/kg ~ 2.0×10^{14} GC/kgの中間用量の評価を伴う。

【0195】

AAV9・LAMP2Bを評価する前臨床研究の用量単位を、体重1kgあたりのベクターゲノム(vg)で表す。本研究で投与したAAV9・LAMP2Bの臨床用量を、ベ

クターゲノムコピー (GC) / kg として表し、この命名法が製造プロセスで定量化された治験物質の最適な説明とみなされるためである。これらの単位用語 (GC / kg 及び v g / kg) はいずれも、導入遺伝子量に関して同じ実体を説明するよう意図されている。

【0196】

本研究は、高い既存の抗AAV9血清中和抗体価(抗AAV9中和抗体価1:40超)を有する対象を除外する。合成又は胆汁うっ滞性肝機能障害(PT/INR1.5xULN超、ビリルビン1.5xULN超)の所見を有する患者も除外する(最大10xULNまでのトランスアミナーゼ上昇又は最大2xULNまでのGGT上昇を許容し、これがDDの顕著な成分であり、主に筋異常を反映すると考えられるためである)。全身コルチコステロイド療法をAAV注入の1日前に投与し、投与後の数週間継続し、注入の8~12週間後に漸減して中止する。

10

【0197】

安全性モニタリングには、肝酵素(トランスアミナーゼ、ビリルビン、ALP、及び凝固パラメータを含む)の頻繁な検査を含めた。血小板及び包括的凝固プロファイル(PT/aPTT/フィブリノゲン/D-ダイマーを含む)も評価し、経路成分を補完する。ウイルスカプシド成分及びLAMP-2Bの両方に対する液性及び細胞性免疫応答の可能性を評価するために、血清及び全血も得る。

【0198】

目的及び評価項目

主要目的

20

・ヒトLAMP2B導入遺伝子(治験薬)を含むrAAV9カプシドの注入に関連する安全性及び毒性を特徴付けること。

・安全性、毒性、及び予備的有効性に関して治験薬の単回IV投与の範囲を評価すること。

・心内膜心筋生検を用いて、治験薬の注入により、心筋(及び骨格筋)の形質導入及び遺伝子発現(心筋LAMP2B DNA、RNA、及びタンパク質の評価によって決定される)がもたらされるかを決定し、疾患関連組織学的異常(自己貪食空胞、筋原線維錯綜配列)の補正があるかを決定し、心筋細胞分子及び組織学的補正の程度の予備的特徴付けを可能にすること。

・治験薬注入のおよそ8~12週後に、医学的パラメータ、X線パラメータ、及び心肺運動/生理学的パラメータによって決定される、臨床的安定化の予備的評価を可能にすること(後に記載するように、その後の時点で同様の評価を行い、副次的目的を評価する)。

30

【0199】

副次的目的

・医学的評価、心臓構造及び機能のX線評価、並びに心肺運動/生理学的パラメータによって決定される、治験薬の注入により、心血管病態生理学における持続的(治験薬の注入後6ヶ月~3年にわたる)改善、安定化(又は歴史的対照と比較して低下した悪化率)がもたらされた患者のパーセンテージを決定すること。

・心筋細胞が補正されたLAMP2B遺伝子及び/又はタンパク質を含み、DD関連組織学的異常が改善した患者のパーセンテージを決定し、可能な場合、心筋における遺伝的及び組織学的補正の程度を定量化すること。

40

・液性(抗体)及び細胞性(Tリンパ球)抗AAV9及び抗LAMP-2Bタンパク質活性の評価を含む、治験薬(免疫原性)に対する免疫応答を決定し、特徴付けること。

・その後の心臓移植、LVAD、植込み型除細動器若しくはペースメーカー留置、心臓伝導異常に対する電気生理学的切除術、又は、心不全によるその後の入院を必要とする及び/又はそれを受ける、治験薬を投与した患者のパーセンテージを評価すること。

・全患者、特にその後の評価のために選択された用量で治験薬を投与した患者の1年及び3年の全生存評価を含む、治験薬を投与した患者の全生存を評価すること。

【0200】

50

探索的目的

・臨床的安定化又は改善のパラメータを用いて心筋細胞における分子補正の証拠と組織学的補正の証拠との間の潜在的相関を評価し、心筋細胞における分子/組織学的補正と骨格筋及び血液におけるLAMP2B遺伝子/タンパク質の証拠との間の潜在的相関を評価すること。

・筋肉損傷の血清学的マーカー（CPK及びトランスアミナーゼを含む）及びうっ血性心不全の血清学的マーカー（BNP、高感度トロポニンを含む）を評価し、これらの血液マーカーの早期（すなわち、8～12週間）の改善が、DDの臨床的、構造的、及び組織学的修正の潜在的な代用になる可能性があるかを確認すること。

・カンザシティ心筋症質問票（KCCQ-12）及びPedS QLを用いて評価される、試験薬を投与した患者における患者報告アウトカム/生活の質（PRO/QOL）を評価すること。

・神経筋機能及び眼機能の評価を含む、DDの非心血管側面における改善、安定化（又は歴史的対照と比較して低下した悪化率）の有無及び程度を評価する。

【0201】

評価項目

安全性評価項目

安全性及び忍容性評価項目は以下のとおりである。

・治療下で発現した有害事象（TEAE）及びSAEの全体的及び強度別の発生率。
・試験責任医師により少なくともAAV9、LAMP2Bと関連する可能性があると思われる、全体的及び強度別のTEAE及びSAEの発生率。

・心臓移植、植込み型除細動器若しくはペースメーカー留置、心臓伝導異常に対する電気生理学的切除術、又は、心不全によるその後の入院を含む、心臓インターベンションを必要とする患者の割合。

・AAV-9又はLAMP-2Bタンパク質に反応する抗体又はTリンパ球によって証明される、AAV9、LAMP2Bに対する免疫応答の特徴付け。

・肝トランスアミナーゼ（AST及びALT）、GGT、ビリルビン、及びALPのベースラインからの変化に基づき、肝毒性の所見。

・血小板数、プロトロンビン時間（PT、又は国際標準化比（INR））、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）、フィブリノゲン、D-ダイマー、トロンビン-アンチトロンビン複合体（TAT）、及び補体成分（補体3（C3）、補体4（C4）、及び血清膜侵襲複合体（sC5b-9））のベースラインからの変化に基づき、凝固障害の所見。

・以下の項目のベースラインからの変化：

- バイタルサイン測定値。
- 安全性臨床検査結果。
- 身体検査所見。

【0202】

有効性評価項目

有効性評価項目には、医学的評価、心臓構造及び機能のX線評価、並びに心肺運動/生理学的パラメータによって決定される、心血管病態生理学における臨床的改善の評価、安定化（又は歴史的対照と比較して低下した悪化率）の評価が含まれる。有効性評価項目の予備的評価は、最初の安全性に焦点を当てたフォローアップ期間中（試験薬投与後の最初の8～12週間）に、かつより持続的なフォローアップ期間中（6ヶ月～3年）に行われる。

【0203】

研究デザイン

これは、DDを有する患者における非無作為化、非盲検、第I相試験である。

【0204】

この第I相試験中、およそ11～23名の患者に試験薬（IP）の単回IV投与を行い

10

20

30

40

50

、患者のコホートに以下に詳述するガイドラインに従って順次より高い用量レベルでAAV9・LAMP2Bの投与を行う。IPを投与していない治験実施施設は本治験に参加してもよい。これらの治験実施施設は、IP投与後に初期スクリーニング及び来院を行う。IP投与及びその直後の治験来院を、IP投与を行う治験実施施設で行う。これは、患者及び彼らの家族が広範囲にわたって移動する負担を軽減することを目的とする。

【0205】

6つの異なるコホートにおいて、3つの用量レベルを調査する予定である。小児集団(8~14歳)における所与の用量を評価するコホートの投与は、同等用量の成人コホート内の患者の33%未満が用量制限毒性(DLT)を経験したと決定された場合にのみ実行可能である。成人患者又は小児患者により高い用量を投与するコホートの投与は、以前の低用量コホート内の患者の33%未満がDLTを経験したと決定された場合にのみ実行可能である。DLT評価を評価することができるように、患者は、意図される用量のIPが投与され、IP注入後8週間にわたってフォローアップ可能な状態のままでなければならない(注入後最初の8週間の間に治験薬に関連するとみなされる致死性AEを有する患者を除く)。

10

【0206】

小児患者(8~14歳)の所与の用量レベルでの投与は、高齢(成人及び15~17歳)コホートにおける用量レベルの安全性の決定を待っている間にのみ開始する。図8は、DLTが特定されていないシナリオによる、コホートにおける計画登録の全順序を示す。図9は、任意の所与のコホート内の登録順序を示す。コホートの拡大、後続コホートの開放(治験薬用量の増加又は変更を含む)、及びその後の臨床開発で評価される用量の推奨に関する決定は、先行コホートで特定された安全性プロファイル及び直接的な利益の可能性に基づいて、IDSMCによって行われる。IDSMCによる治験薬安全性の追加の定期的にスケジュールされている審査は、各試験コホートの患者について、最初の8週間のDLT評価期間後に行う。

20

【0207】

治験薬

治験薬(AAV9・LAMP2B)は、図1に示すように、かつ実施例1に記載するように、ヒトLAMP2B導入遺伝子と、ITRエレメント、CMVIEE、CBAプロモーター、CBA、及びウサギグロビンイントロンを含むCAGプロモーター、WPRE、並びにRgpAとを含むAAV9カプシドからなる遺伝子療法産物である。

30

【0208】

剤形

AAV9・LAMP2Bの組成は、注入に好適な緩衝液(200mM NaCl、10mM NaH₂PO₄、1%(w/v)スクロース、0.01%ポロキサマー188、pH7.2±0.1)中で製剤化された有効成分([3.0~6.0×10¹³vg/mL]の濃度であり、かつ標的細胞を形質導入して治療用タンパク質LAMP2Bを発現することができる組換えAAV9・LAMP2Bウイルス粒子)からなる。AAV9・LAMP2Bは、凍結製品として臨床現場に提供され、AAV9・LAMP2Bの用量の最終体積は、患者の体重キログラム(kg)及び1ミリリットル(mL)あたりのAAV9の計算されたベクターゲノム(vg)コピーに基づく。

40

【0209】

調査される用量

この第I相試験中、11~23名の患者に治験薬の単回IV投与を行い、以下のガイドラインに従う用量レベルで成人患者及び小児患者の最大3つの特定のコホートにAAV9・LAMP2Bの投与を行う。小児集団(8~14歳)における所与の用量を評価するコホートの始動は、同等用量の成人コホート内の患者の33%未満が用量制限毒性(DLT)を経験したと決定された場合にのみ実行可能である。3つのAAV9・LAMP2B用量レベルを、以下のように、用量漸増設計に従って調査する。

- ・コホート1：成人及び15~17歳：6.7×10¹³GC/kg(n=3)*

50

- ・コホート2：成人及び15～17歳： 1.1×10^{14} GC/kg (n = 2～4)
- ・コホート3：成人及び15～17歳： 2.0×10^{14} GC/kg (n = 2～4)
- ・コホート1A：小児8～14歳： 6.7×10^{13} GC/kg (n = 2～4)
- ・コホート2A：小児8～14歳： 1.1×10^{14} GC/kg (n = 2～4)
- ・コホート3A：小児8～14歳： 2.0×10^{14} GC/kg (n = 2～4)
- ・コホート1は、以前のプロトコルバージョンに従って3名の患者を登録した。

【0210】

所定の用量レベルでの小児患者（8～14歳）におけるAAV9・LAMP2Bの評価は、高齢（成人及び15～17歳であり、一般的に同意書を提出する能力を有する者）集団における用量レベルの安全性の決定を待っている間のみ開始する。AAV9・LAMP2Bを総体重に基づく用量で投与する。患者が肥満（ボディマス指数（BMI）85%超）である場合、疾病予防管理センター（Centers for Disease Control and Prevention、CDC）の成長チャートに従って、IPを、以下のヒューム式を使用して除脂肪体重（LBM）に基づく用量で投与してもよい。
 $LBM = (0.32810 \times W) + (0.33929 \times H) - 29.5336$

10

【0211】

この試験は、既存の抗AAV9血清中和抗体価（1：40超）を有する患者を除外した。患者に、リツキシマブ、タクロリムス、及びコルチコステロイドとともに抗AAV免疫原性反応に対する予防薬を投与した。リツキシマブをIP注入前に投与した。タクロリムスを3ヶ月間投与し、IP投与前に開始した。コルチコステロイドは、治療用ベクター投与前日に開始し、その後、治療後8週目まで毎日投与し、その後、中止前に4週間にわたって漸減した。免疫抑制レジメンの一環としてタクロリムスとリツキシマブを組み込むことにより、全体的なコルチコステロイド投与の減少が可能になる。

20

【0212】

コホート1の臨床安全性プロファイル

15歳以上の3名の患者のコホート（コホート1）に、プロトコルに従ってコルチコステロイドを併用して 6.7×10^{13} GC/kgの用量でLAMP-2B遺伝子療法を行った。被験者特性を表1に示す。第2の患者及び第3の患者にタクロリムスも投与した。治療レジメン及びLAMP2B相対発現を表2に示す。LAMP2Bに対して有意な抗薬物抗体（ADA）応答は認められなかった。

30

【0213】

患者は、IP投与の数日後にいくつかの全身症状（嘔気、嘔吐、腹痛、及び微熱など）を呈した。予想どおり、患者は、IP投与後に免疫応答を発症した。この免疫応答は、血球数の減少（血小板、白血球）、トランスアミナーゼの上昇、骨格筋及び心臓関連酵素及びペプチドレベルの上昇と関連していた。治療のおよそ1～2週間後に生じた血小板数の減少は、対応するD-ダイマーの増加並びにC3及びC4（補体部分）の減少と関連していた。他のAAV遺伝子療法プログラムでは血小板数の減少が観察されており、AAV9カプシドに対する急性補体媒介性免疫反応と一致している。これまでLAMP-2B遺伝子療法で治療した患者にコルチコステロイド投与を続け、エクリズマブで治療しなかった。血小板、D-ダイマー、及びC3/C4レベルの観察された変化は、数日後に改善した。

40

【0214】

アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加は、他のAAV遺伝子療法プログラムで実証されている。観察されたAST/ALTの増加は、正常範囲を超えるビリルビンの増加及び肝胆道疾患の臨床徴候/症状と関連しなかった。GGT（AST/ALTとは異なり、骨格筋の損傷によって影響されない肝酵素）の上昇はより軽度であり、ベースラインの5倍超のレベルを超えなかった。ELISPOTアッセイは、コホート1における最初の3名の患者のAAV9カプシド及びLAMP2B導入遺伝子の両方に対して陰性であった。ベースラインからのGGTの増加がベースラインからのASTの増加及びALTの増加よりも相対的に低いため、こ

50

これらのASTの増加及びALTの増加は主に骨格筋に由来する。これは、関連するCPKの上昇にも見られる。コホート1における3名の患者のうちの2名が、ステロイド誘発性ミオパチーと一致する骨格筋の筋力低下を発症した。コルチコステロイドを漸減して中止した際に、骨格筋力の筋力低下は回復した。投与後6ヶ月、9ヶ月、及び12ヶ月時点で、患者は自宅で安定している。

【0215】

(表1)

患者ID	治療時の年齢	投与時の体重	コホート用量	総用量
A501-005-1001	17歳	52.2kg	6.7×10 ¹³ GC/kg	3.25×10 ¹⁵ GC
A501-005-1002	20歳	89.1kg	6.7×10 ¹³ GC/kg	5.97×10 ¹⁵ GC
A501-005-1005	18歳	97.8kg	6.7×10 ¹³ GC/kg	6.08×10 ¹⁵ GC

10

【0216】

(表2)

被験者	レジメン	正常レベルと比較したLAMP2Bの相対的発現*			
		ベースライン	8週目	6ヶ月目	12ヶ月目
被験者 1001	ステロイドのみ(コンプライアンス制限あり)	1.0%	7.8%	9.4%	2.6%
被験者 1002	ステロイドのみ(局所モニタリング)	8.9%	36.9%	不検出	67.8%
被験者 1005	ステロイド→タクロリムス	3.3%	17.6%	92.4%**	2021年1月

20

30

*細胞染色の面積パーセントを、ソフトウェアを使用して盲検化様式及び発現で正常心臓組織と比較して定量化した。値は、3～14個の切片の平均を表す。

40

**9ヶ月時点で採取した試料

【0217】

コホート1の遺伝子発現及び有効性評価項目

15歳以上の3名の患者のコホート(コホート1)に、プロトコルに従ってコルチコステロイドを併用して6.7×10¹³GC/kgの用量でLAMP-2B遺伝子療法を行った。LAMP-2B遺伝子療法で治療した後、図5に示すように、ベクターDNAコピー数を分析した。表2に示すように、免疫抑制レジメンへのコンプライアンスが制限され

50

た第1の患者を含む、3名全ての患者が、ウェスタンブロット及び免疫組織化学による心臓LAMP2B発現の証拠を示した。免疫抑制レジメンに良好なコンプライアンスを示した患者1002及び患者1005は、高レベルの心臓LAMP2B発現とともに、臨床バイオマーカーの改善を示した。6.7 × 10¹³ gc/kgの全身用量で治療した患者の心臓生検では、LAMP2B遺伝子発現が、1名の患者において、9ヶ月及び12ヶ月時点で免疫組織化学(IHC)によって決定された正常と比較して細胞の68~92%に存在し、かつウェスタンブロット評価によって測定された正常なLAMP2Bタンパク質発現の最大61%で存在することが示された。図6に示すように、患者1002は、LAMP-2B遺伝子療法で治療した後にLAMP2の頑強な心臓発現を示した。患者1002及び患者1005は、後の時点でIHC染色のパーセンテージ及びレベルの一貫した増加を示した。 10

【0218】

図7に示すように、3名の患者のうちの2名が、心臓機能の改善と一致する主要な臨床バイオマーカーの改善を示した。心不全の重要なマーカーである脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は、患者1002及び患者1005における50%超を含む、3名全ての患者で改善し(すなわち、減少し)(図7B及び図7C)、免疫抑制レジメンコンプライアンスが確認された。クレアチンキナーゼ心筋バンド(CPK-MB)は、患者1002及び患者1005で改善したか、又は安定化したかのいずれかであった。注目すべきことに、電子顕微鏡で評価した際に、ダノン病理の特徴である自己貪食空胞に目に見える改善が確認された。表3に示すように、9ヶ月及び12ヶ月時点で免疫抑制レジメンのコンプライアンス及びフォローアップが確認された患者1002及び患者1005は、侵襲的行動態によって測定された心拍出量の改善を示した。ダノン病を有する患者は独力では改善しないため、本試験において3名全ての患者で観察された利益は臨床的に意義があり、このさもなければ壊滅的な疾患に対する変革的な遺伝子療法アプローチを提供する。 20

【0219】

(表3)

心拍出量 (L/分)a	ベースライン	8週目	6ヶ月目	12ヶ月目
被験者 1001	5.2	6.2	6.1	4.12
被験者 1002	3.58	5	不検出	5.8 (1.62倍の増加)
被験者 1005	4.5	3.7	6.08* (1.35倍の増加)	不検出

*9ヶ月目

【0220】

用量制限毒性の定義

用量制限毒性(DLT)を、以下のように、治験薬投与後8週間以内に生じたAEの任意の発生として定義する:

- ・National Cancer Institute Common Terminology Criteria for AEs (NCI CTCAE)、第5.0版、グレード3以上の注入関連反応。

- ・支持療法にもかかわらず、肝臓損傷に関連して2週間超持続する、グレード4のトランスアミナーゼ上昇。

- ・支持レジメンでは改善も回復もしない、グレード3のトランスアミナーゼ上昇。

- ・72時間以内にグレード3未満に回復するグレード3の嘔気/嘔吐、下痢、便秘、発熱、疲労、若しくは発疹、又は2週間以内にグレード3未満に回復する臨床症状に関連し 50

ないグレード3の臨床所見異常を除く、他のグレード3以上のA E。

【0221】

D L Tを、治験責任医師に帰属する因果関係とは無関係に決定する。治験薬に関連しない可能性のある病因（例えば、自動車事故に続発するグレード3の疼痛）がある場合、事象がD L Tを表さないという決定を下してもよいが、I D S M Cによる評価を必要とする。各患者のベースライン値は、I P投与前の6ヶ月以内に得られた利用可能な臨床データに基づく。

【0222】

用量漸増手順

コホート内の後続の患者がI Pを受け得る前に、最初の患者を少なくとも8週間フォローアップしなければならないように、コホート内の登録をずらす。リツキシマブ及びタクロリムスの追加により、I P投与後の免疫応答が軽減されることが期待される。免疫応答の抑制が実証された後、コホート内の後続の患者間の8週間の期間は、I D S M Cの同意により減少されてもよい。各コホートは、少なくとも2名の患者からなる。コホートの最初の2名の患者のうちの1名がD L Tを経験した場合、追加の2名の患者をそのコホートに登録する。後続（高用量又は小児）コホートの始動を開始するために、先行コホートの全ての患者をI P注入後少なくとも8週間フォローアップしたはずであり、D L Tの回復又は安定化の証拠が存在していた。所与の用量レベルの小児患者（8～14歳）は、コホート1、コホート2、及びコホート3（成人及び15～17歳）コホートにおける用量レベルの安全性の決定を待っている間のみ開始する。

10

20

【0223】

コホート1の最初の2名又は3名の患者において、 6.7×10^{13} GC / kg（低用量）の投与により、許容可能な安全性で治療効果以下のL A M P - 2 B発現がもたらされると決定された場合、コホート2を 1.1×10^{14} GC / kgの中間用量で始動する。 6.7×10^{13} GC / kgが治療量以下とみなされる場合、 6.7×10^{13} GC / kg用量のコホート1 A（小児8～14歳）を始動しない。 1.1×10^{14} GC / kgの中間用量のコホート2（成人及び15～17歳）を完了した後であり、かつI D S M Cによる安全性の審査を待っている間のみ、 1.1×10^{14} GC / kgの中間用量のコホート2 A（小児8～14歳）の登録を開始する。図8を参照されたい。

30

【0224】

治験薬の投与

患者に、A A V 9 . L A M P 2 B 遺伝子療法薬をI V注入により0日目に投与し、I Pが単回投与として患者に注入されることを意図する。患者に、心血管障害用の治験薬の経験のある施設で、入院（inpatient）（入院（hospitalized））状況下で治験薬を投与する。患者は48～72時間入院し、治験薬注入後最長14日間入院してもよく、その後、治療を担当する治験責任医師の裁量により退院してもよい。毎日の評価を7日目まで続け、治験責任医師の裁量により延長されてもよい。

【0225】

治療前薬剤及び併用療法

抗A A V免疫原性反応に対する予防薬を、治験薬の注入前及び注入後に投与する。コルチコステロイドに加えて、リツキシマブ及びタクロリムスを投与して、I Pに対する免疫応答を抑制する。

40

【0226】

治療前薬剤

リツキシマブ注入前の前投薬：

- ・アセトアミノフェン - 15 mg / kg P O（最大1 g）
- ・ジフェンヒドラミン - $12.5 \sim 50 \text{ mg}$ P O、又は製品添付文書に従う
- ・リツキシマブ：患者に、I P注入前の - 14日目及び - 7日目に 750 mg / m^2 の用量でリツキシマブを投与する。
- ・コルチコステロイド：患者に、治験薬注入の前日（ - 1日目）に 1 mg / kg 体重の

50

用量でプレドニゾン（経口又はIV）を投与し始め、その後、治療後8週間目まで毎日投与し、その後、4週間にわたって漸減して3ヶ月目までに中止し、増強された免疫抑制療法（すなわち、リツキシマブ、タクロリムス）を予防薬として投与する場合、治験依頼者の医療モニターを用いて、治験責任医師の裁量により、コルチコステロイドの漸減を早い段階で（IP投与後最初の4週間以内を含む）開始してもよい。

- プレドニゾンにより許容できないAEがもたらされるか、又はプレドニゾンが利用可能ではない場合、代わりにメチルプレドニゾン又はデキサメタゾンを等価用量で用いてもよい（メチルプレドニゾンの場合0.8mg/kg、デキサメタゾンの場合0.15mg/kg）。

- コルチコステロイドの漸減は、ベースラインを超える肝酵素（ビリルビン又はトランスアミナーゼ）の増加又は治験薬に起因する他のAEの場合、4週間よりも長い期間にわたって延長されてもよい。

- コルチコステロイドの漸減は、治験依頼者の医療モニターを用いて、治験責任医師の裁量により、上記のように、耐えられないコルチコステロイド関連AEの場合又は増強された予防的免疫抑制の場合、8週目よりも前に開始してもよい。

- コルチコステロイド合併症を予防するために同時投与する薬剤を治験実施施設の基準に従って投与してもよく、ニューモシスティスジロベシ肺炎（PCP）、胃腸潰瘍、及び便秘に対する予防薬を含むべきである。治験実施施設のガイドラインが存在しない場合、これらには、週3回のアトパコン又はトリメトプリム/スルファメトキサゾール、H₂-アンタゴニスト（すなわち、ラニチジン）又はプロトンポンプ阻害剤（すなわち、オメプラゾール）のいずれか、及び下剤の有無にかかわらず便軟化剤（すなわち、ドクサート）が含まれるが、これらに限定されない。

・タクロリムス：患者に、2分割用量でタクロリムスを1日1回経口投与する。投薬量を、タクロリムストラフ血清レベルに基づいて必要に応じて調整して2~5ng/mLのレベルを維持し、投与を-7日目に開始し、3ヶ月まで続ける。タクロリムスを治験責任医師の裁量により中止してもよい。

・コルチコステロイド投与過程中的支持薬：治験実施施設の慣行に従って、患者に、ニューモシスティスジロベシ肺炎（PJ/P/PCP）予防薬、胃腸潰瘍、及び便秘の予防薬を投与する。

・追加の治療前薬：治験薬の注入前には必要ではないが、AAV治験薬の注入についての治験実施施設のガイドラインにより必要とされる場合には考慮してもよく、かかる薬剤には、アセトアミノフェン（パラセタモール）及び/又はヒスタミン作動性H₁又はH₂アンタゴニストが含まれてもよい。

【0227】

併用（支持療法）薬：

追加の支持療法を、治験責任医師の裁量により、IP投与前又は投与後に投与して、有害作用を予防又は治療することができる。これらには、以下のものが含まれるが、これらに限定されない。

・コルチコステロイド

・補体活性化の場合、エクリズマブ。エクリズマブの投与前に、患者は、年齢及び健康状態に応じて疾患管理センターが適宜推奨する髄膜炎菌ワクチンを受けていなければならない。髄膜炎菌ワクチンは、治験薬の投与前に、治験実施施設で投与されてもよい。

・凝固異常の場合、血小板又は血漿産物の輸血

・制吐薬（オンダンセトロンなど）

・好中球減少症の場合、成長因子（G-CSF [Neupogen（登録商標）] など）

・注入関連反応の場合、鎮痛剤及び抗炎症剤

【0228】

患者の組み入れ基準

患者は、治験参加の資格を得るために、以下の基準を全て満たさなければならない（か

10

20

30

40

50

つ除外基準のいずれも満たしてはならない)。

1. 確定されたLAMP2変異を有するDD診断。
2. ECG、心エコー図、ガドリニウム増強心臓MRI、又は電気生理検査において少なくとも1つの異常所見によって実証された心臓障害。
3. コホート1、2、及び3の場合、15歳以上、コホート1A、2A、及び3Aの場合、8～14歳。
4. 男性。
5. NYHAクラスII又はIII。NYHAクラスIの患者は、6MWT中に450メートル以上歩くことができない場合、適格である。
6. 以下によって定義される適切な血液学的機能：
 - a. ヘモグロビン10g/dL以上(6.2mmol/L、NCICTCAE第5.0版によるグレード1の貧血)。
 - b. 絶対好中球数1,500/mm³以上(1.5×10⁹/L、グレード1以下の好中球減少症)。
 - c. 血小板数75,000/mm³以上(75×10⁹/L、グレード1以下の血小板減少症)。
7. 以下によって定義される肝機能：
 - a. AST及びALT10.0×ULN以下、又はGGT2×ULN以下(DDにおけるトランスアミナーゼ上昇は、広範に筋肉損傷に起因すると考えられており、それ故に、これらのトランスアミナーゼに対する比較的高い上限値、及びGGTレベルの考慮、並びにビリルビン及びPT/INRの追加の肝適格性マーカーの存在)。
 - b. 血清ビリルビン1.5×ULN以下(すなわち、グレードのビリルビン増加)。
 - c. PT/INR1.5×ULN以下(抗凝固剤の不在下)。
 - d. 肝超音波検査における肝硬変の不在。
8. 以下の腎機能：クレアチニン1.5×ULN以下(クレアチニンが1.5ULN超である場合、修正版シュワルツ式(18歳未満の患者)(Schwartz2009)である、腎疾患における食事療法の修正(MDRD)式(Stevens2006)によって計算される、50mL/分/1.73m²以上のクレアチニンクリアランス、又は24時間採尿が必要である)。
9. インフォームドコンセント(成人患者及び小児患者の親/法的後見人の場合)及び同意書(15～17歳の患者の場合)を提出する能力。
10. 治験療法及びフォローアップ評価を含む治験手順を順守する能力。
11. 6MWT中に補助なしで150メートル超歩くことができる。
12. 患者は、年齢及び健康状態に応じて疾患管理センターが適宜推奨する髄膜炎菌ワクチンを受けている。

【0229】

患者の除外基準

以下の基準のうちのいずれかを満たす患者を治験参加から除外する。

1. 登録前30日以内の陽性変力薬、血管拡張薬、又は利尿薬のIV療法(すなわち、患者は経口医療療法に安定していなければならない)。
2. 心臓移植歴、又は他の臓器(肺、肝臓など)の移植歴。
3. 登録前30日以内の心臓手術、経皮的な心臓インターベンション、又は弁形成術。
4. LVAADの存在又は必要性。
5. 登録前90日以内の心筋梗塞、不安定性狭窄、脳卒中、又はTIA。
6. 心エコー図上での有意な(中等度よりも高い)弁狭窄又は逆流。
7. 機械的換気を必要とする。
8. 抗AAV9中和抗体価1:40超。
9. CHF又は心筋症の治療用の治験薬の使用を伴う任意の他の臨床試験への同時登録。
10. 活動性B型又はC型肝炎感染(陽性HBsAg、HBeAg、又は検出可能なH

。

B V若しくはH C Vウイルス量を有する患者を含む)。十分に回復したH B V又はH C Vの既往歴を有する患者は適格である。

1 1 . 実証されたH I V感染、活動性ウイルス性若しくは他の肝炎、コントロール不良の高血圧若しくは糖尿病、コントロール不良の心不整脈、又はコントロール不良のウイルス性、細菌性、若しくは真菌性感染症を含む、重大な医学的状態。

1 2 . 治験責任医師の意見により、患者が治験参加に適さない状態にするか、又は治験参加の許容されるリスクよりも高い状態にする、あらゆる随伴性医学的又は精神学的状態。

1 3 . 非黒色腫皮膚がん又は上皮組織に侵入していない他のがんを含まない、活動性血液学的又は固形臓器悪性腫瘍。過去3年間に活動性悪性腫瘍の所見がない場合、以前に固形臓器悪性腫瘍を切除された患者又は根本的に血液悪性腫瘍を治療された患者が適格である場合がある。

1 4 . タクロリムス又はH C - 6 0 (ポリオキシル6 0水素化ヒマシ油)に対する過敏症を含む、タクロリムスの使用の禁忌。

【0 2 3 0】

試験期間

患者を0日目の治験薬投与前のおよそ約6 0日以内にスクリーニングし、スクリーニング評価を行う。全ての患者を、このプロトコルの援助下で、治験薬投与後3 6ヶ月間フォローアップする予定である。全生存を評価し、フォローアップの他の構成要素を中止することを選択した患者(健康状態が禁忌とされるほどに重度に悪化していない限り、強く阻止される)、かかる患者には、全体的な健康状態及び生存の評価のために治験職員と連絡を取り続ける選択肢が提供される。フォローアップ期間の終了後、患者は、長期フォローアップ(L T F U)試験に入り、I P投与後更に2 ~ 5年間にわたるフォローアップを可能にする。

【0 2 3 1】

長期フォローアップ

第I相安全性評価項目評価(注入後の最初の8 ~ 1 2週間)及びその後のフォローアップ(注入後の最初の3年間)後、安全性及び毒性(すなわち、A E)、全生存、心臓移植の必要性を含む全体的な健康状態、並びに他の有害な健康転帰についての継続的なフォローアップを、更に2 ~ 5年間(合計5 ~ 8年間、本試験に規定された3年間のフォローアップを含む)定期的に行う。長期フォローアップを5年間計画しているが、最初の2年間の間に治験薬に起因する重篤なA Eが特定されない場合、再評価する。

【0 2 3 2】

本試験中に重篤な治験薬副作用が特定されないと決定した場合、長期フォローアップを、治験薬に関連するA Eの程度、重症度、及び回復に応じて、更に2年間(最長5年間)計画する。

【0 2 3 3】

イベントスケジュール及び治験手順

イベントスケジュール

治験薬を0日目にI V注入により投与する。治験薬注入後、患者は、治験責任医師の臨床的判断により、注入後少なくとも4 8 ~ 7 2時間及び最長1 4日間入院(h o s p i t a l i z e d)又は入院(i n - p a t i e n t)し続ける。I P注入後、患者は、図1 0 A ~ 1 0 Dに概説する頻度で治験来院に出席しなければならない。評価を治験薬注入後7日間にわたって毎日行う。毎日の評価を7日目以降も継続してもよい。

【0 2 3 4】

フォローアップ来院は、治験薬の注入の数日後、数週間後、数ヶ月後、数年後に行われる、一連の臨床評価、臨床検査室評価、細胞及び遺伝子評価、心臓撮像評価、並びに心臓生理学的評価を伴う。心内膜心筋生検(右室の中央静脈アクセスカテーテル挿入により行われる)及び骨格筋生検も、治験薬注入前に、かつ治験薬注入後の選択された時点で必要である。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 5 】

心筋細胞における証拠 LAMP2B 遺伝子及びタンパク質に関するフォローアップ（及び自己貪食空胞の定量化を含む DD 組織学の組織学的評価）を、心内膜心筋生検により、注入後 8 週目、並びに 6 ヶ月目、12 ヶ月目、及び 36 ヶ月目に行う。以下に詳述するように、骨格筋生検、LAMP2B 血液レベル（血漿（LAMP-2B タンパク質）及び単核細胞（LAMP2B DNA）、並びに心筋症及び CHF の他の血清学的パラメータ及び X 線パラメータの評価を含む、追加の低侵襲評価を、心筋における分子的及び組織学的改善の潜在的な代理マーカーを特定する探索的意図と併せて評価する。詳細なイベントスケジュールを図 10A ~ 図 10D に提示し、脚注は以下のとおりである。

1. スクリーニング来院評価を 60 日間にわたって行う。登録前に標準治療の一環として行った評価をスクリーニング評価として本試験に使用してもよく、（治験依頼者と協議した上で治験責任医師の判断に基づいて）評価を再び行う必要はない。

2. 患者がスクリーニング来院を完了し、かつ全ての組み入れ基準及び除外基準を満たした後に、ベースライン来院評価を行ってもよい。全ての評価を - 1 日目及び治験薬の投与前に完了しなければならない。ベースライン来院評価をリツキシマブ及びタクロリムスでの治療の開始前に行う必要はない。

3. スクリーニング来院中、包括的既往歴には、関連する心血管系既往歴及び他の潜在的な疾患関連既往歴、例えば、入院及び心臓インターベンションが含まれ、疾患の家族歴も記録される。

4. スクリーニング来院中及び - 1 日目の併用薬及び処置には、過去 30 日間の薬剤及び処置が含まれるものとする。フォローアップ来院中、これには、最新の事前評価後のあらゆる薬剤及び処置が含まれるべきである。

5. 身長を、スクリーニング来院時に 1 回測定し、その後は年 1 回測定する。

6. 生活の質 / 患者報告アウトカム質問票には、KCCQ - 12 及び PedsQL が含まれる。

7. 1 日目から 7 日目までの毎日の臨床検査評価。8. 臨床検査評価を最大週 3 回行う。

9. 血清膜侵襲複合体（sC5b-9）は、治験薬投与後のプロトコルで規定された時点で必要である。この検査を、患者の臨床状態に応じて、かつ治験責任医師の裁量により、追加の時点で、又はより頻繁に行ってもよい。

10. スクリーニング来院中のウイルス血清学には、HIV、HBV、HCV ウイルス量、並びに HBsAg、HBeAg、及び HBsAb を含む包括的 HBV 抗原 / 抗体パネルが含まれるべきである。

11. 心臓血清学には、BNP、CK-MB、及びトロポニン - I レベルを含む CHF の潜在的マーカーが含まれる。

12. 治験薬（AAV9 及び LAMP-2B）に対する免疫応答には、血清（抗薬物抗体（ADA）、IgG、IgM）及び末梢血 T リンパ球（ELISpot）における評価が含まれる。

13. 全血を採取し、血清、血漿、及び PBMC（スクリーニング評価の場合のみ）に処理し、血清及び血液細胞における LAMP2 レベルの評価を含む、潜在的な探索的アッセイのために保管する。治験 ICF は、プロトコルに規定されていない潜在的な追加の将来の研究のために保管した試料が利用されてもよいという同意を提出する又は保留する機会を患者に提供する。

14. スクリーニング用の唾液、尿、便、及び血液（血漿）試料を治験薬の投与後に採取して、ベクター粒子の脱落を評価する。各体液 / 物質の評価を、所与の体液 / 物質について 2 つの陰性評価が得られるまで（又はベクターレベルが低レベル又は無視できるレベルで水平状態に達したときに）指示どおりに続け、その時点で、その後の評価は必要ない。

15. LAMP2 変異を確認及び定義するための遺伝子シーケンシングを、唾液又は血液（単核細胞）のいずれかによる不整脈及び心筋症パネルを用いて行う。LAMP2 遺伝

10

20

30

40

50

子型が病原性と定義されない場合、LAMP2欠損症を確認するために、LAMP2のタンパク質評価を単離された末梢血単核細胞又は生検組織を用いて行う。

16. 植込み型ペースメーカー、除細動器、他の留置デバイス、又は医学的状態（すなわち、治験実施施設のガイドラインに従って、ガドリニウム造影剤の使用を妨げる腎機能障害）の存在によって禁忌を示さない場合、ガドリニウムを用いたMRIを行う。腎機能障害の場合、顧問放射線科医の裁量により、又は治験実施施設のガイドラインに従って、非ガドリニウム造影剤を利用してもよい。MRIが禁忌である場合、CTスキャンを使用してもよい。

17. 可能な場合、最初の評価及びその後の評価のために、6分間の歩行を日中のほぼ同じ時間に行わなければならない。フォローアップ評価中、6分間歩行試験と心肺運動試験は、可能な限り、同じ日に行ってはならない。

18. リツキシマブ前投薬、アセトアミノフェン、及びジフェンヒドラミンを、リツキシマブ注入の30～60分前に投与する。詳細については、薬局マニュアルを参照されたい。

19. コルチコステロイドを、プレドニゾン（IV又はPO）1mg/kg（又はメチルプレドニゾン又はデキサメタゾン等価物）の用量で、-1日目から8週目まで毎日投与する。コルチコステロイド漸減を治験薬投与後8週目（56日目）に開始し、治験薬投与後3ヶ月目までに中止（d/c）する予定である。56日目よりも前の時点又はその後の時点で、より長期間の漸減又は漸減開始は、治験医療モニターを用いて治療を担当する治験責任医師の裁量により許可される。コルチコステロイド投与のための支持薬を、治験実施施設の基準に従って提供してもよい。

【0236】

血清中の抗AAV9中和抗体価

血清中の抗AAV9中和抗体価を決定するために、血液試料を、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時、-1日目、2週目、4週目、8週目、3ヶ月目、6ヶ月目、12ヶ月目、24ヶ月目、36ヶ月目に採取する。抗AAV9中和抗体価1：40超の患者は、治験参加の資格はない。

【0237】

肝超音波

ビリルビン、PT/INR、及びトランスアミナーゼレベルの臨床検査評価に加えて、肝臓の超音波をスクリーニング時に行い、肝硬変又は他の肝不全と一致する所見を評価する。臨床的に必要であれば、その後の（注入後の）超音波を行ってもよい。

【0238】

安全性評価

バイタルサイン

測定されるバイタルサインには、収縮期/拡張期血圧、脈拍、呼吸数、パルスオキシメトリー、及び体温が含まれ、治験実施施設の基準に従って行う。バイタルサインを全ての治験来院時にイベントスケジュール（図10A～図10D）に従って測定する。

【0239】

身長及び体重

身長（cm）を、スクリーニング時に測定し、その後は年1回測定する。体重（kg）を、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時、-1日目、1週目から8週目まで週1回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）測定する。-1日目に測定した体重測定値を患者の用量の計算に使用する。

【0240】

臨床検査及び身体検査

完全な身体検査（全身状態、全身外観；頭、眼、耳、鼻、及び喉；心血管；皮膚、腹部；尿生殖器；リンパ節；肝臓；筋骨格；呼吸；並びに神経）を、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時、-14日目及び-7日目、-1日目

10

20

30

40

50

、0日目、1日目から7日目まで1日1回、2週目から8週目まで週1回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）に行う。

【0241】

血液学、凝固試験、及び化学

CBC及び分画、凝固試験、並びに化学を含む臨床検査用の血液試料を、以下及びイベントスケジュール（図10A～図10D）規定されるように行う。臨床検査は、治験責任医師又は資格を有する委任された者（例えば、医師助手、診療看護師）によって行われ、審査される。以下の臨床検査パラメータを決定する。

・血液学：ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球（RBC）数、平均細胞容積（MCV）、平均細胞ヘモグロビン濃度（MCHC）、血小板、白血球（WBC）数、並びに好中球、リンパ球、単球、好酸球、及び好塩基球を含む分画。 10

- 化学：ナトリウム、カリウム、塩化物、二酸化炭素（又は重炭酸塩）、血中尿素窒素（BUN）、クレアチニン、グルコース、ALP、ALT、AST、ビリルビン、GGT、カルシウム、マグネシウム、及びリン。

【0242】

血液学評価及び化学評価を、スクリーニング時、- 1日目、1日目から7日目まで1日1回、2週目から4週目（血液学）又は8週目（化学）まで週に最大3回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）行う。スクリーニング時に血清クレアチニンが $1.5 \times \text{ULN}$ 超の場合、クレアチンクリアランス（CrCl）を計算してもよく、CrClが、MDRD式によって計算される、 $50 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ 超の場合、患者を適格であるとみなす。 20

- 凝固試験：PT（及び/又はINR）、aPTT、D-ダイマー、トロンビン-アンチトロンビン複合体（TAT）、及びフィブリノゲン。評価を、スクリーニング時、- 1日目、2日目、4日目、7日目、2週目から8週目まで週1回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）行う。

- 補体：C3、C4、及びsC5b-9膜侵襲複合体。

【0243】

C3評価及びC4評価を、スクリーニング時、- 1日目、1日目、3日目、5日目、7日目、2週目から8週目まで週に最大3回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）行う。sC5b-9評価を、スクリーニング時、- 1日目、1日目から7日目まで1日1回、2週目の間に週に最大3回、3週目から8ヶ月目まで1日1回、3ヶ月目、及び6ヶ月目に行う。追加の臨床検査を治験責任医師の裁量により行ってもよい。 30

【0244】

心臓血清学

心臓血清学的検査用の血液試料をイベントスケジュール（図10A～図10D）に従って採取する。測定されるパラメータには、以下が含まれる。

・スクリーニング時；- 1日目；2週目、4週目、6週目、8週目の間に1回；3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目）；及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目）に採取したBNP。 40

・スクリーニング時、- 1日目、7日目、2週目から8週目まで週1回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）に採取したCK-MB。

・スクリーニング時、- 1日目、2日目、4日目、7日目、2週目から8週目まで週1回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）に採取した高感度トロポニンレベル。

【0245】

尿検査

比重、pH、タンパク質、グルコース、ケトン、血液、尿白血球エステラーゼの尿試料 50

を、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時；7日目、4週目、8週目；12ヶ月目、24ヶ月目、及び36ヶ月目の間に1回採取する。

【0246】

免疫原性

免疫原性検査用の血液試料を、全血及び血清中の液性（抗体）及び細胞性（Tリンパ球）抗AAV9及び抗LAMP-2Bタンパク質活性を決定するために採取し、IgG及びIgMもイベントスケジュール（図10A～図10D）に従って採取する。抗体評価用の血液試料を、スクリーニング時；7日目；2週目、4週目、8週目、3ヶ月目、6ヶ月目、12ヶ月目、24ヶ月目、及び36ヶ月目の間に1回採取する。細胞評価用の血液試料を、スクリーニング時；4週目、8週目、3ヶ月目、6ヶ月目、12ヶ月目、24ヶ月目、及び36ヶ月目の間に1回採取する。IgG及びIgM評価用の血液試料を、スクリーニング時；-1日目、2日目、4日目、7日目；4週目、8週目、3ヶ月目、及び6ヶ月目の間に1回採取する。

10

【0247】

ベクター脱落

ベクター粒子脱落の評価用の血液（血漿）、唾液、尿、及び糞便試料を、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時；3日目；2週目、4週目、8週目、3ヶ月目、及び9ヶ月目の間に1回採取する。各体液/物質の評価を、所与の体液/物質について2つの陰性評価が得られるまで、又はベクターレベルが低レベル又は無視できるレベルで水平状態に達したときに、指示どおりに続け、その時点で、その後の評価は必要ない。

20

【0248】

有害事象

インフォームドコンセント、及び該当する場合、同意書の提出から生じた全てのAEを記録する。これには、患者が自発的に報告するAE、治験責任医師が観察したAE、及び予定された治験実施施設来院中に自由回答形式の質問に応じて治験責任医師が導き出したAEが含まれる。体系的に記録される情報には、AEのタイプ、発症日及び回復日、重症度、及び実験的療法との認知された関係が含まれる。各AEの重症度を、NCICTCAE第5.0版に基づいて評定する。

30

【0249】

有効性評価

心電図検査

12誘導ECGを、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時、-1日目、1日目、2週目から8週目まで週1回、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）行う。

【0250】

心エコー図

心エコー図を、イベントスケジュール（図10A～図10D）に従って、スクリーニング時、4週目、8週目、3ヶ月に1回（3ヶ月目から12ヶ月目まで）、及び6ヶ月に1回（12ヶ月目から36ヶ月目まで）行う。心エコー図の構成要素には、左室駆出率（LVEF）の評価、左室及び右室の寸法（例えば、LV収縮末期及び拡張末期寸法、容積、及び指数、隔壁及び後壁の厚さ、並びにLV流出路の寸法）、同心性肥大及び拡張期パターンの評価、弁狭窄及び逆流の評価、壁運動異常の評価、肺動脈圧、呼吸に伴うIVCのサイズ及び変化、心膜、LV質量、左心房（LA）直径及び容積、等容弛緩時間、ドップラー速度測定値、長軸方向グローバルストレイン、並びに左室流出路（LVOT）の類別が含まれる。

40

【0251】

ニューヨーク心臓協会（NYHA）分類

NYHA分類は、表4に示すように、症状の重症度に従って心不全の程度を分類する簡単な方法を提供する。身体活動中の制限に基づいて、患者を4つのカテゴリーのうちの

50

1つに分類する。NYHA評価を、イベントスケジュール(図10A~図10D)に従って、ベースライン来院を除く全ての治験来院時に行う。

【0252】

(表4)

分類	患者の症状
I	身体活動の制限なし。通常の身体活動により、過度の疲労、動悸、呼吸困難(息切れ)が引き起こされない。
II	身体活動のわずかな制限。安静時に快適である。通常の身体活動により、疲労、動悸、呼吸困難(息切れ)がもたらされる。
III	身体活動の顕著な制限。安静時に快適である。通常に満たない活動により、疲労、動悸、又は呼吸困難が引き起こされる。
IV	不快感なしではいずれの身体活動も続けることができない。安静時に心不全の症状。何らかの身体活動を開始すると、不快感が増す。

10

【0253】

心臓磁気共鳴画像法

植込み型ペースメーカー、除細動器、他の留置デバイス、又は医学的状態(すなわち、治験実施施設のガイドラインに従って、ガドリニウム造影剤の使用を妨げる腎機能障害)の存在によって禁忌を示さない場合、ガドリニウムを用いたMRIを行う。腎機能障害の場合、顧問放射線科医の裁量により、又は治験実施施設のガイドラインに従って、非ガドリニウム造影剤(すなわち、フェルモキシトール)を利用してもよい。評価を、イベントスケジュール(図10A~図10D)に従って、スクリーニング中、8週目、6ヶ月目、12ヶ月目、18ヶ月目、24ヶ月目、30ヶ月目、及び36ヶ月目に行う。

20

【0254】

心臓MRIは、推定30~40分の合計スキャン時間にわたるガドリニウムのIV注射及び複数のシーケンスの取得を伴う。評価には、LVEF、体表面積(BSA)に対して指数化されたLV質量、最大LV壁厚、最大壁厚に対するzスコア、LV拡張末期及び収縮末期容積、LA直径、容積、及び容積指数、後期ガドリニウム増強(LGE)の評価、並びにLGEパターンが含まれる(Raja2018)。追加の評価には、安静時灌流心筋血流(MBF)、細胞外容積(ガドリニウム注射前及び注射後のT1マップ)、及び右室駆出率(RVEF)が含まれる。MRIが禁忌である場合、MRIの代わりに静脈造影剤を用いた心臓CTスキャンを使用してもよい。

30

【0255】

6分間歩行試験

6MWTは、100フィートの廊下を必要とし、技術者向けの運動機器も高度なトレーニングも必要としない実用的で簡単な試験である。この試験は、患者が6分間で平坦な硬い表面を速く歩くことができる距離を測定するものであり、それ故に、DD患者において徐々に損なわれている重要な日々の活動の定量的評価である。スクリーニング来院中、患者は、治験参加の資格を得るために、6MWT中に補助なしで150メートル超歩くことができないなければならない。加えて、ロスクラスIの患者は、6MWT中に補助なしで少なくとも450メートル歩くことができない場合、適格であるとみなされる。

40

【0256】

6MWTを、イベントスケジュール(図10A~図10D)に従って、スクリーニング時、8週目、3ヶ月目、6ヶ月目、12ヶ月目、18ヶ月目、24ヶ月目、30ヶ月目、及び36ヶ月目に完了する。可能な限り、試験フォローアップ中、評価した各々の時点で、1日の同じ時間に行うべきである。評価を行う各々の時点で、同一の指示を6MWT中

50

に指定した間隔で各々の患者に与える。両方の評価を規定する時点で、6 MWTをCPEETとは異なる日に行うべきである。この評価を、各治験来院時におよそ24時間間隔で2回行う。

【0257】

心肺運動試験

酸素消費量 (VO_2) の評価を含む心肺運動試験 (CPEET) を、イベントスケジュール (図10A~図10D) に従って、ベースライン時、8週目、6ヶ月目、12ヶ月目、18ヶ月目、24ヶ月目、30ヶ月目、及び36ヶ月目に行う。CPEETは、呼気を測定して酸素消費量及び二酸化炭素生成を決定する、8~12分の合計運動時間をもたらすように設計された安静時無負荷運動及び増分傾斜運動を含む、サイクルエルゴメーター又はトレッドミルでの評価を伴う。測定には、バイタルサイン、肺指数 (最大努力呼吸を含む)、換気閾値測定 (呼吸交換比及び分時換気量の二酸化炭素生成に対する比率を含む)、ピーク運動測定 (ピークバイタルサイン及びピーク VO_2 を含む)、嫌気閾値測定 (VO_2 を含む)、及び回復評価が含まれる。両方の評価を規定する各々の時点で、CPEETを6MWTとは異なる日に行うべきである。

10

【0258】

肺機能検査

肺機能検査 (PFT) を、イベントスケジュール (図10A~図10D) に従って、ベースライン時、12ヶ月目、24ヶ月目、36ヶ月目に評価して、肺及び横隔膜の両方の筋能力の評価を可能にする。PFT評価には、フローボリューム (FVC 、 FEV_1 を含む)、肺活量、及び拡散能 ($DLCO_2$ を含む) の測定が含まれる。最大吸気圧及び呼気圧も評価する。

20

【0259】

右心カテーテル法及び心内膜心筋生検

右心カテーテル法及び心内膜心筋生検を、イベントスケジュール (図10A~図10D) に従って、ベースライン時、8週目、6週目、12ヶ月目、及び36ヶ月目に行う。カテーテル法及び生検は、この手技の専門知識を有するインターベンショナル心臓学チームにより行われる。右心カテーテル法及び心内膜心筋生検手技中の麻酔の使用は、治験実施施設のガイドライン及び治験責任医師の臨床的判断に基づく。麻酔に関連するリスクは、製品添付文書に記載されている。

30

【0260】

血行動態評価による右心カテーテル法

右心カテーテル法を行い、心肺血行動態パラメータの評価を可能にする。評価する血行動態パラメータには、右心房圧及び肺動脈圧、肺動脈楔入圧、混合静脈酸素飽和、並びに心拍出量及び心係数 (フィック式)、肺毛細血管楔入圧、肺血管抵抗、並びに肺高血圧が含まれる。

【0261】

心内膜心筋生検

心内膜心筋生検を右室の中央静脈アクセスカテーテル挿入及び心室中隔のカテーテル媒介性生検により行い、1回の手技あたりおよそ3~5個の試料を必要とする。

40

【0262】

生検により、LAMP2B遺伝子/タンパク質発現におけるあらゆる療法関連変化、及びDD関連心筋組織学 (すなわち、自己貪食空胞、筋原線維錯綜配列) 変化の評価が可能になる。その後の調査中の右心カテーテル法及び心内膜心筋生検に関する推奨事項を、観察された組織学的変化の程度及び第I相中のLAMP-2B発現に基づいて、かつ骨格筋生検からのLAMP-2B発現、血中LAMP-2Bレベル、並びに心筋症及びCHFの他の血清学的パラメータ及びX線パラメータを含む、低侵襲評価からのパラメータの改善を伴う心筋分子と組織学的変化との潜在的な相関を含めることにより評価する。

【0263】

骨格筋生検

50

治験薬がDDの筋骨格成分を予防する又は逆転させる可能性を確認することと、LAMP2骨格筋がLAMP2心筋遺伝子補正及びタンパク質発現の潜在的な実行可能な代用になるかの評価を可能にすることとの両方を行うために、骨格筋生検を行い、LAMP2B遺伝子/タンパク質発現を評価する。外側広筋の切開生検を、ベースライン時、8週目、6ヶ月目、12ヶ月目、及び36ヶ月目に行い、上で詳述したパラメータの評価を可能にする。連続的評価時(すなわち、ベースライン時及び治療後8週時)での生検を対側筋で交互に行い(すなわち、ベースライン時では右脚、治療後評価時では左脚)、潜在的な手技関連副作用を最小限に抑える。その後の(第II相)試験では、筋生検の必要性を、第I相試験中に観察された組織学的変化及びLAMP-2B発現の程度、並びに心内膜心筋と骨格筋との間の遺伝子/タンパク質発現の相関に基づいて評価する。その後の試験中に針生検を利用することも検討する。骨格筋生検手技中の麻酔の使用は、治験実施施設のガイドライン及び治験責任医師の臨床的判断に基づく。麻酔に関連するリスクは、製品添付文書に記載されている。必要に応じて、骨格筋生検を心内膜心筋生検と併せて行い、麻酔又は鎮静を制限することができる。

10

【0264】

神経認知評価

16歳以上であり、かつ正常又はほぼ正常な(軽度に制限された)認知機能を有するとみなされる患者の場合、神経認知評価には、以下の構成要素が含まれる。

- ・ウェクスラー成人知能尺度(WAIS-IV)。
- ・バイランド適応行動尺度、第3版(バイランド-3)。

20

【0265】

認知機能がより制限された16歳以上の患者をWAIS-IVによって評価しない。これらの患者を以下の構成要素によって評価する。

- ・バイランド適応行動尺度、第3版(バイランド-3)。
- ・差動能力尺度(Differential Ability Scales)(DAS-II)。

【0266】

最も適切な評価の決定は、治験責任医師とともに心理学者/神経認知評価専門家の評価により行われる。

【0267】

30

18歳未満の患者の場合、神経認知評価には、以下の要素が含まれる。

- ・WAIS-IV(16歳又は17歳であり、正常又はほぼ正常な認知機能とみなされる場合)。
- ・バイランド-3親/介護者評価。
- ・差動能力尺度(DAS-II)。

【0268】

神経認知評価を、イベントスケジュール(図10A~図10D)に従って、ベースライン時、12ヶ月目、24ヶ月目、及び36ヶ月目に評価する。これらは、可能な限り、各評価時に同じ順序で行われるべきである。各手段の簡単な説明を以下に提供する。

【0269】

40

ウェクスラー成人知能尺度(WAIS-IV)

WAIS-IVは、認知能力の簡潔で信頼性の高い尺度を提供する。個人の目的行動及び有用な行動に対する潜在能力を評価するための一連の標準化された質問及びタスクが含まれる。主要な知能を測定するために設計されたものである。この試験により、全般的認知能力、言語理解、及び非言語能力の全推定値の標準化されたスコアがもたらされる。

【0270】

バイランド適応行動尺度、第3版(バイランド-3)

バイランド-3は、適応行動の標準化された尺度であり、人々が日常生活で機能するために行うものである。能力測定は、試験状況下で被験者ができることに焦点を当てており、その一方で、バイランド-3は、日常生活で実際に何をやるかに焦点を当てている

50

。これが標準に基づく手段であるため、被験者の適応機能を同年齢の他者と比較する。これは、知的障害及び発達障害の診断を支援する有力な手段である。バイナランド - 3 親 / 介護者インタビューフォームは、個人のコミュニケーション、日常生活、社交性、及び運動機能の 4 つのドメインにわたる適応行動機能を測定する（出生から 90 歳まで）。

【0271】

差動能力尺度 (DAS - II)

DAS - II は、学習に重要な認知能力を評価するための包括的で個別に行われる臨床手段である。この試験は、2 歳 6 ヶ月 (2 : 6) から 17 歳 11 ヶ月 (17 : 11) までの小児に広範な発達レベルにわたって行う。この試験により、全体的な全般的概念理解能力、言語能力 (言語概念及び知識)、非言語能力 (精神的処理を必要とする複雑な非言語的帰納的推論)、及び空間認識能力 (複雑な視覚的処理) に関する標準化されたスコア

10

【0272】

神経筋評価

神経筋評価を、ベースライン時、8 週目、6 ヶ月目、12 ヶ月目、24 ヶ月目、及び 36 ヶ月目に行う。これには、以下を含む必須の神経筋活動の時限試験が含まれる。

- ・床からの起き上がり、
- ・4 段階昇降、
- ・10 メートル歩行 / 走行、
- ・時限アップアンドゴー (TUG)、及び
- ・ノースター歩行能力評価試験。

20

【0273】

眼科検査

眼科検査を、イベントスケジュール (図 10 A ~ 図 10 D) に従って、ベースライン時、12 ヶ月目、24 ヶ月目、及び 36 ヶ月目に評価する。これには、直接検眼鏡検査 / 眼底検査、眼底撮影、光干渉、断層撮影、自己蛍光検査、及び網膜電図検査による網膜評価が含まれる。

【0274】

患者報告アウトカム / 生活の質 (PRO / QOL)

本試験に用いられる PRO / QOL 尺度には、KCCQ - 12 及び PedsQL が含まれる。評価を、イベントスケジュール (図 10 A ~ 図 10 D) に従って、ベースライン時、8 週目、3 ヶ月に 1 回 (3 ヶ月目から 12 ヶ月目まで)、及び 6 ヶ月に 1 回 (12 ヶ月目から 36 ヶ月目まで) 収集する。

30

【0275】

有効性評価

臨床的有效性評価項目の評価には、治験薬投与後の最初の月及び年の間にイベントスケジュール (図 10 A ~ 図 10 D) に従って行う以下の評価が含まれる。

- ・VO2 の評価を含む CPET。
- ・6 MWT (距離) 評価。
- ・DD 関連組織学的異常及び心筋細胞における LAMP2B 遺伝子 / RNA / タンパク質の存在の評価のための (右室の中央静脈アクセスカテーテル挿入により行われる) 心内膜心筋生検。
- ・ガドリニウム増強心臓 MRI (植込み型ペースメーカー、除細動器、他の留置デバイス、又は医学的状態の存在によって禁忌を示さない場合)。
- ・心エコー図。
- ・全生存を評価し、フォローアップの他の構成要素を中止することを選択した患者 (健康状態が禁忌とされるほどに重度に悪化していない限り、強く阻止される)、かかる患者には、全体的な健康状態及び生存の評価のために治験職員と連絡を取り続ける選択肢が提供される。

40

- ・その後の心臓移植、LVAD、植込み型除細動器若しくはペースメーカー留置、心臓

50

伝導異常に対する電気生理学的切除術、又はCHFによる入院の必要性の評価。

【0276】

統計的手法

投与コホートに対して最大3名の患者の試料サイズ及び最大6名の患者への拡大(DLTの場合、3名の患者のうち1名)を、新規試験薬に対する用量評価に関する標準の安全なアプローチとみなす。真のDLT率が5%以下であると仮定して、所与のコホートに基づいて用量増加が止まる可能性は3%である(すなわち、2名以上のDLT患者に観察される)。真のDLT率が50%であると仮定して、所与のコホートに基づいて用量増加が止まる可能性は83%である。

【0277】

登録予定の患者数

11~23名(コホート1は、以前のプロトコルバージョンに従って3名の患者を登録した)

【0278】

試験集団

評価対象試験集団には全試験集団が含まれ、試験集団にある範囲の試験薬を投与する。追加の評価対象集団は、成人患者(18歳以上及び15~17歳の両方を含む)及び8~14歳の集団を含む小児集団である。

【0279】

実施例6：第I相試験の結果

第I相試験の結果は、多くの主要な臨床バイオマーカー及び評価項目において強い傾向を示した。

【0280】

DDは、遺伝的に受け継がれた心筋症であり、疾患の特徴及び進行は、典型的な成人心筋症の特徴及び進行とは異なる。患者の大半は、疾患経過の後期まで機能障害に関して十分に補償されており、LVEF及び6MWTなどの測定値は、心筋症が進行するまで正常であるか、又は軽度に異常であり得る。疾患関連異常の軽度の改善又は安定化は、この患者集団において望ましく、新興の自然経過に対する改善を表す可能性が高く、これらは、自然経過研究において進行と相関することが示された臨床バイオマーカーの安定化及び/又は改善を伴う可能性がある。

【0281】

低用量及び高用量の成人及び15歳超の青年コホート(6.7×10^{13} GC/kg及び 1.1×10^{14} GC/kg)の臨床データは、治療の有効性を実証した。データには、以下が含まれる。

1. 一次標的臓器におけるLAMP2の持続的なタンパク質発現の確認。
2. 形態的DD特徴の改善の細胞レベルでの実証。
3. BNPを含む主要な心臓パラメータの改善及び/又は安定化(免疫抑制レジメンコンプライアンスが確認された2名の低用量患者において、ベースラインから75%~79%の減少を含む、長期フォローアップを伴う4名の患者の各々で減少)。
4. 4名の成人のうち3名におけるNYHAクラスの改善(低用量コホート及び高用量コホートにおける免疫抑制及び他の低用量患者における安定化が確認され、4名の患者の各々で6MWTの安定化から軽度の改善が確認された)。
5. 低用量で治療した全ての被験者における生活の質及び機能の自己報告による改善。

【0282】

安定したLAMP2B発現データ(図14)は、治療前の時点及び治療後の時点での心内膜心筋生検試料の電子顕微鏡によって評価されるように、心筋構造の実証的かつ好ましい変化及び病理学的DD特徴の回復を伴っている。これらは、被験者1005由来の心筋組織を示す図14で説明されている。マウスノックアウトモデルにおけるこれらの所見と類似して、治療前の生検は、多数の広範な自己貪食空胞及び顕著な心筋原線維の乱れを示し、これにより、別個の筋肉要素が最小限に識別可能である。治療後8週間時点の同様の

10

20

30

40

50

心内膜心筋生検は、自己貪食空胞の顕著な減退及び広範な明らかな条線を有する筋原線維構造の回復を示す。これらの所見は、後期の9ヶ月時点で確認され、分子的及び組織学的回復が維持されることを示唆している。

【0283】

低用量コホートにおける関連する心臨床マーカーに関する更なるデータも、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)を含む重要な心機能マーカー(表5)、クレアチンキナーゼ心筋バンド(MB)、及び侵襲的血行動態によって測定される心拍出量の改善又は安定化のいずれかを示す。重要なことに、ベースラインからのBNPの観察された改善(それぞれ、18ヶ月時点及び15ヶ月時点で、1002の場合に79%及び1005の場合に75%)は、ナトリウム利尿ペプチドが心不全の予後と強く相関するため、当該技術分野の

10

【0284】

臨床的利益の最も有意義なパラメータのうちの1つは、患者の機能レベルであり、特に心不全との関連で、日常生活の一部としての身体活動に耐える能力である。したがって、ニューヨーク心臓協会(NYHA)分類などの評価項目は、全体的なグローバル患者機能状態に関連する臨床的改善の強力な尺度とみなされている(Russell et al. Am Heart J. 2009 Oct; 158(4 Suppl): S24-S30)。低用量コホート及び高用量コホートにおける長期フォローアップを伴う4名の被験者のうち3名がNYHA分類のIIからIへの改善(表5)を示し、残りの1名がIIの安定したレベルを維持したことは、有意であり、かつDDの自然経過と非常に矛盾している。

20

【0285】

2021年11月の最新の長期評価時点で、3名全ての患者が6MWTの結果において安定化及び/又はわずかな改善を示した(表5)。加えて、最新の来院時のPIのインタビューから報告されたように、全ての被験者は、全般的に具合が良いと報告しており、自身の活動に制限があるとは報告していない。被験者1002及び被験者1005は、RP-A501の投与を受けてから植込み型心臓除細動器の作動は全くないことも報告している。

【0286】

(表5)

30

40

50

低用量コホート及び高用量コホートにおける第 I 相臨床評価項目

コホート	患者 ID	変数	ベースライン	最新のフォローアップ	フォローアップ期間
成人-低用量	1001*	NYHA クラス	II	II	24 ヶ月
		BNP(pg/mL)	70	30	
		6MWT(メートル)	443	467	
	1002	NYHA クラス	II	I	18 ヶ月
		BNP(pg/mL)	942	200	
		6MWT(メートル)	405	410	
1005	NYHA クラス	II	I	15 ヶ月	
	BNP(pg/mL)	176	44		
	6MWT(メートル)	427	435		
成人-高用量	1006	NYHA クラス	II	I	12 ヶ月
		BNP(pg/mL)	123	41	
		6MWT(メートル)	436	492	

10

20

30

40

50

【 0 2 8 7 】

男性におけるダノン心筋症の特徴は、特に、肥大及びそれに伴う拡張機能障害に起因する壁厚の増加である。図 1 5 A ~ 図 1 5 B に示すように、高用量及び低用量で評価可能な 5 名の患者のうち 4 名が、連続心エコー検査によって測定される壁厚の安定性又は減少のいずれかを示した。一部の被験者では、壁厚の減少は、駆出率の軽度の改善又は安定性を伴っており、これはダノン病の後期徴候である (図 1 5 B)。エコーベースのパラメータに加えて、侵襲的血行動態により、拡張機能障害及び左室充満圧の尺度である肺毛細血管楔入圧の測定が可能になる。他の心臓パラメータと一致して、治療した患者の連続楔入圧及び心拍出量 / 1 回拍出量は、改善又は安定化のいずれかを示した (図 1 5 C ~ 図 1 5 D)。この疾患の自然経過を考慮すると、これは、これらの患者の正常な進行とは対照的である。

【 0 2 8 8 】

表 6 は、R P - A 5 0 1 が安定した心臓ベクターコピー数 (V C N) を示したことを示す。

【 0 2 8 9 】

(表 6)

コホート	患者ID	心臓 VCN	
		8週目	12ヶ月目
成人-低用量	1001*	0.5	0.6
	1002	6.5	1.5
	1005	2.5	1.9 ¹
成人-高用量	1006	3.9	1.1
	1007	5.9	6.8(RV) ² 9.2(LV) ²

*患者1001を2週間のみコンプライアンスについて局所的にモニタリングし、1001以降はより長いコンプライアンスモニタリングを開始した。VCN=二倍体核あたりのコピー数。¹9ヶ月時点のデータ。²5ヶ月時点での外植心臓試料。

【0290】

表7は、免疫組織化学(IHC)による心内膜心筋LAMP2Bタンパク質発現を示す。

【0291】

(表7)

コホート	患者ID	LAMP2B タンパク質発現(IHCによる)**	
		8週目	12ヶ月目
成人-低用量	1001*	7.3%	2.5% (以前は15%未満) ¹
	1002	36.9%	67.8%
	1005	17.6%	92.4% ²
成人-高用量	1006	5.0%	100%
	1007	6.9%	100% ³

*患者1001を2週間のみコンプライアンスについて局所的にモニタリングし、1001以降はより長いコンプライアンスモニタリングを開始した。

**正常な対照試料と比較したLAMP2について染色された心内膜心筋生検。細胞染色の面積パーセントを、ソフトウェアを使用して、2~14個の切片で盲検により定量化した。高い分散を有する試料についての定性評価を報告した。

¹高い分散による範囲として以前に開示されたが、ここで明らかになった。²9ヶ月時点のデータ。³5ヶ月時点での外植片試料。

【0292】

表8は、心内膜心筋LAMP2Bウェスタンブロットタンパク質発現を示す。

【0293】

(表8)

10

20

30

40

50

コホート	患者 ID	LAMP2B タンパク質発現 (ウェスタンブロットによる)	
		8 週目	5~18 ヶ月目
成人-低用量	1001	20.7%	17.9% ¹
	1002	27.3%	21.2% ²
	1005	42.8%	61.1% ³
成人-高用量	1006	14.6%	18.2% ¹
	1007	25.0%	RV:45.1% ⁴ LV:44.0% ⁴

¹ 6ヶ月時点のデータ、² 12ヶ月時点で不適切な試料。³ 18ヶ月時点のデータ、⁴ 12ヶ月時点で不適切な試料。⁵ 9ヶ月時点のデータ。⁶ 外植心臓、5ヶ月時点のデータ。

【 0 2 9 4 】

第 I 相試験の低用量コホート及び高用量コホートについて上で詳述したように、血清心不全マーカー、侵襲的血行動態拍出量測定、心エコー評価、及び全体的な機能評価を含む関連する心臓評価は全て、19年の死亡率中央値を有する進行性及び致死性心筋症の自然経過と比較して、安定化でさえも陽性転帰を表す疾患の改善を示す。これらの臨床評価は、心筋における LAMP2 発現の証拠、並びに DD の特徴である液胞病理及び筋原線維錯綜配列の組織学的改善を伴う。これらの理由から、非臨床データ及び特に臨床データの両方を含む証拠の全体性は、RP-A501の直接的な利益の可能性を圧倒的に示す。

【 0 2 9 5 】

RP-A501は、概して、低用量レベル及び高用量レベルで忍容性良好であった。全ての観察された有害作用は可逆的であり、続発症は持続しなかった。トランスアミナーゼ及びクレアチニンキナーゼの早期上昇、並びに血小板及びヘモグロビンの減少は、ベースラインに戻るか、又は最終的に改善した。RP-A501 r-AAV用量依存的毒性は、高用量レベルで治療した2名の患者のうち1名で見られた。最も高い総用量を投与した罹患患者は、血栓性微小血管症 (TMA) を発症し、一過性血液透析を含む支持療法により完全に消失した。両方の用量レベルにわたって、有害事象は可逆的であり、調整した免疫抑制レジメンでの治療後3ヶ月時点でほぼ消失した。

【 0 2 9 6 】

本明細書に引用される全ての参考文献、論文、公報、特許、特許公報、及び特許出願は、全ての目的のために参照によりそれらの全体が組み込まれる。しかしながら、本明細書に引用されるいずれの参照文献、論文、公報、特許、特許公報、及び特許出願の言及も、有効な先行技術を構成するか、又は世界中のあらゆる国で共通の一般知識の一部を形成するという承認でもいかなる形態の提案でもなく、そのようなものとしてみなされるべきではない。

10

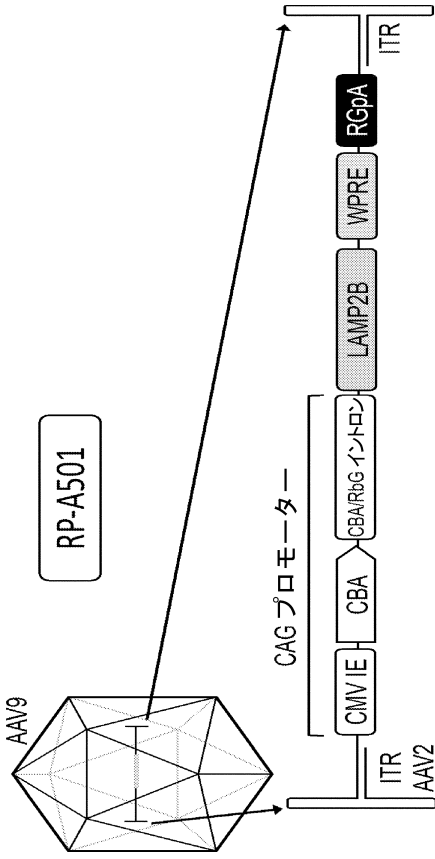
20

30

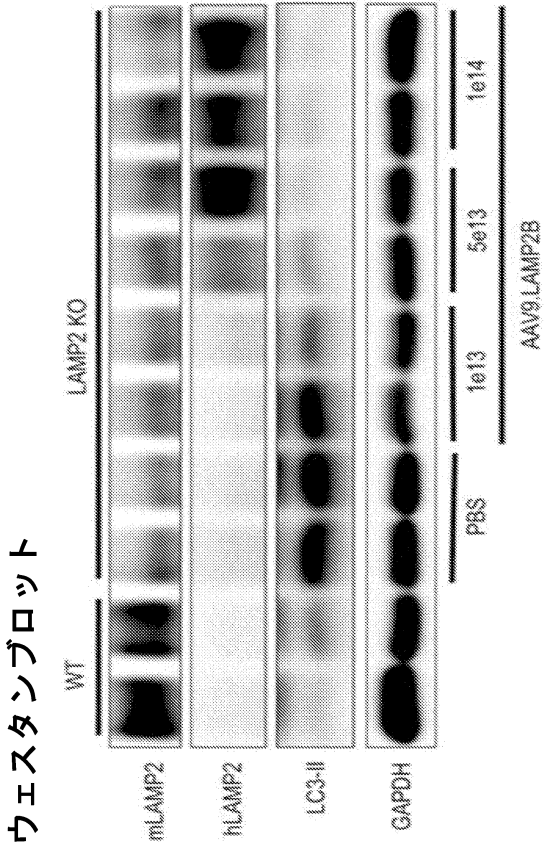
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】

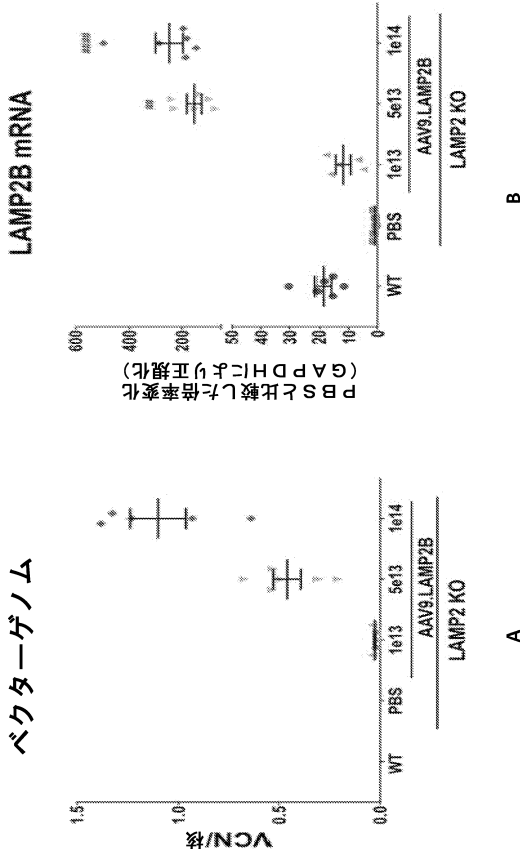


【 図 3 A 】



ウェスタンブロット

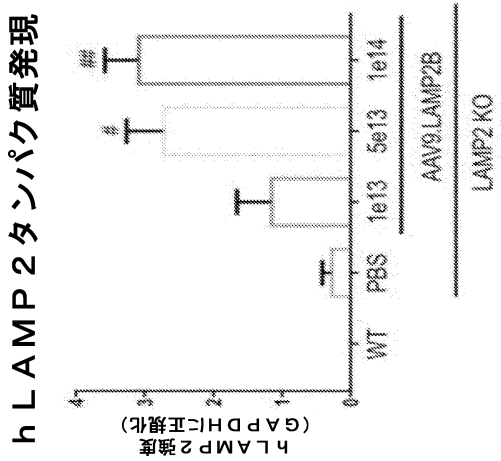
【 図 2 】



ベクターゲノム

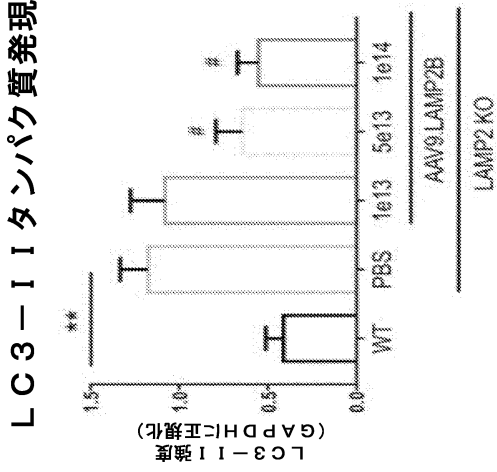
LAMP2B mRNA

【 図 3 B 】

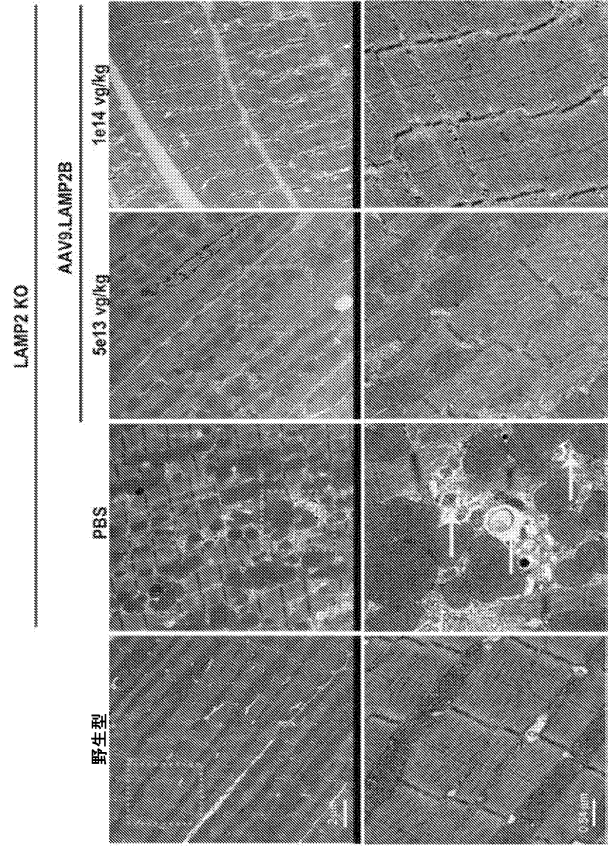


h LAMP 2 タンパク質発現

【 図 3 C 】



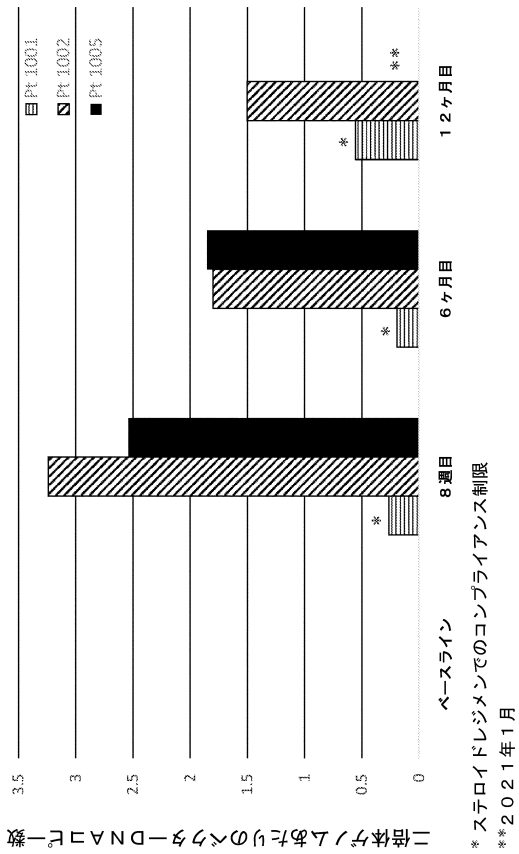
【 図 4 】



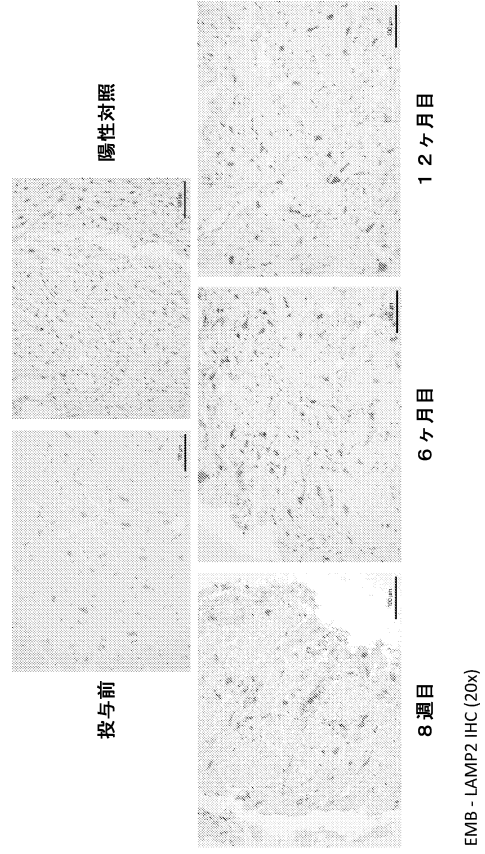
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

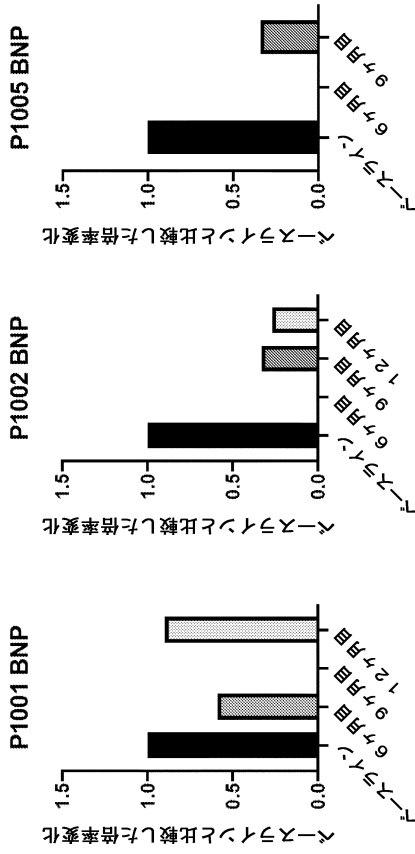


30

40

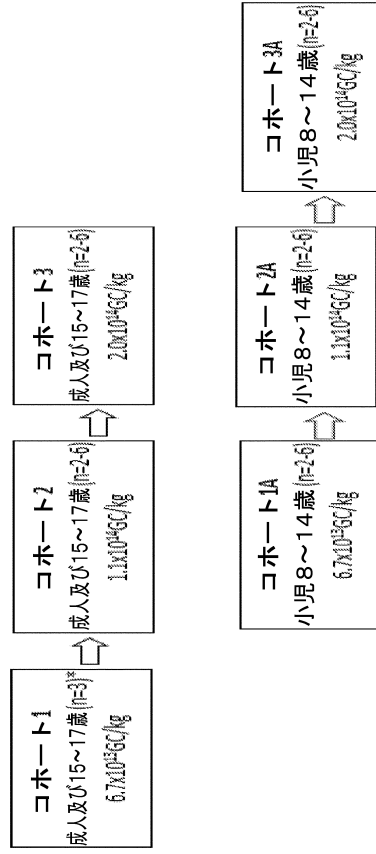
50

【 図 7 】



A B C

【 図 8 】



*コホート1は、以前のプロトコルバージョンに従って3名の患者を登録した。

10

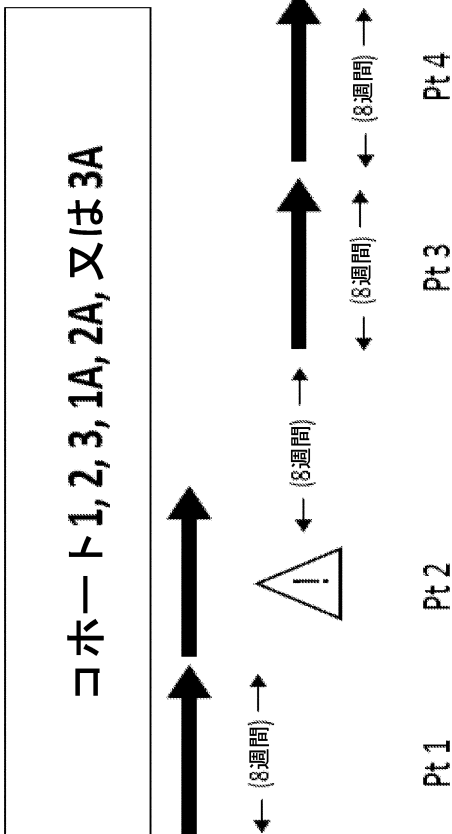
20

30

40

50

【 図 9 】



【 図 10 A 】

	I P治療前の期間		I P治療中の期間															
	8 D-7	D-1	D0	D1~D7*	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
来院ウィンドウ	X																	
一般的评价:																		
病歴3																		
併用薬及び処置4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
有害事象の評価																		
インフォアームドコンセント及び人口動態	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
組み入れ基準及び除外基準	X																	
バイタルサイン	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
身長及び体重	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
身体検査	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OO/PRO質問票6	X																	
血液ベースの評価:																		
外周を伴うCBC	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
電解質、LFTを含む	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
血清化学																		
来院ウィンドウ																		

50

【 図 1 0 B 】

	I P 治療前の期間							I P 治療後の期間																	
	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D0	D1~D7*	W2	W3	W4	W5	W6	W7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	
I g G, I g M抗体	X							X																	
抗体: P T / a, P, I T / ファイブリノゲンD-ダイマー / I A T抗体	X							X																	
尿検査																									
補体: C 3及びC 4								X																	
補体: s C 5b-9								X																	
ウルクス血清学 (H B V, H C V, H I V) t o																									
心臓血清学: トロポニン-T 11								X																	
心臓血清学: B N P 11								X																	
心臓血清学: C K-M B 1 1								X																	
抗 A A V 9 中和抗体 (血清)								X																	
免疫活性: A D A (血清) 1 2								X																	
免疫活性: E L I S p o t (P B M C) 1 3								X																	
末梢ウィンドウ																									

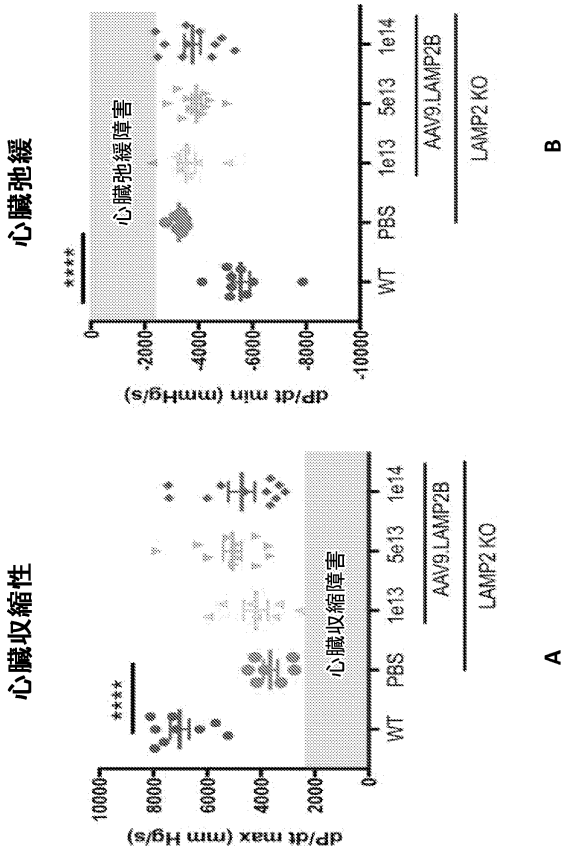
【 図 1 0 D 】

	I P 治療後の期間													
	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7
眼科評価														
治療薬及び併用薬:														
リツキシマブ														
リツキシマブ前投薬 ¹⁹⁾														
治療薬投与 (I V)														
コルチコステロイド 予防薬 ¹⁹⁾														
タクロリムス														

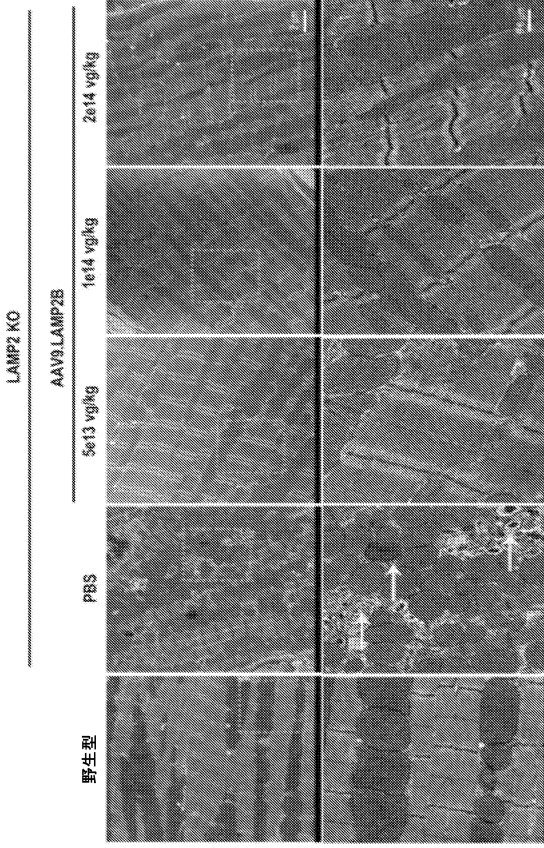
【 図 1 0 C 】

	I P 治療前の期間							I P 治療後の期間																	
	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D-14 & D-7	D0	D1~D7*	W2	W3	W4	W5	W6	W7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	
探索的アッセイ (血清、 血漿、及び血液細胞) 1 3	X							X																	
ペクター形質のための血液、 唾液、尿、及び糞便 1 4																									
遺伝子シーケンシング ^{1 5}	X																								
心臓及び眼底に焦点を当てた評価:																									
E C G																									
心エコー図																									
N V H A 評価																									
ガドリニウムを用いた 心臓MRI ^{1 6}																									
肝臓検査																									
6分間歩行試験 ^{1 7}																									
V O 2を用いた 心肺運動試験																									
肺機能検査																									
右心カテーテル法及び 心的臓心筋生検																									
骨格筋生検																									
神経認知評価																									
末梢ウィンドウ																									
神経評価																									

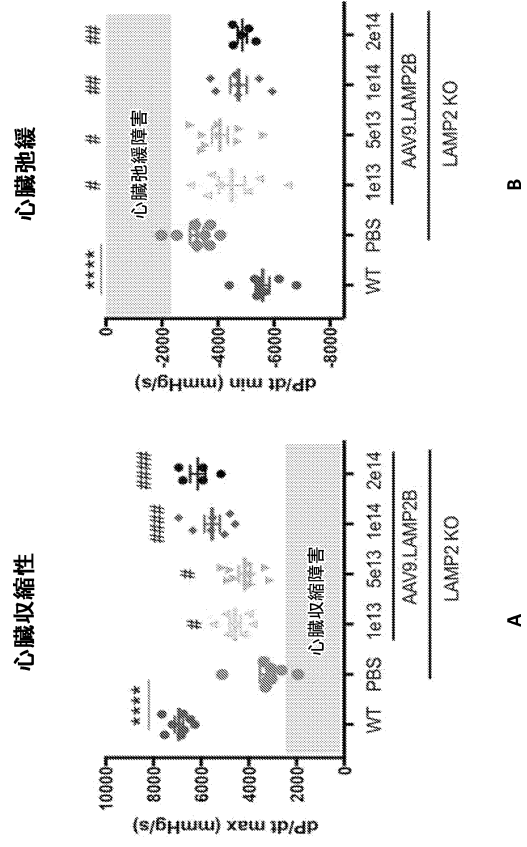
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



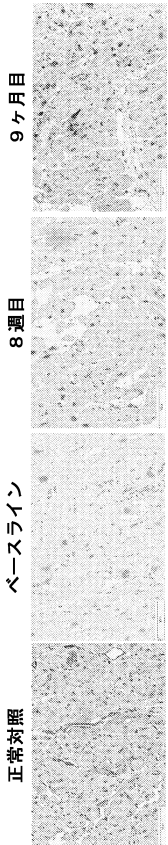
【 図 1 3 】



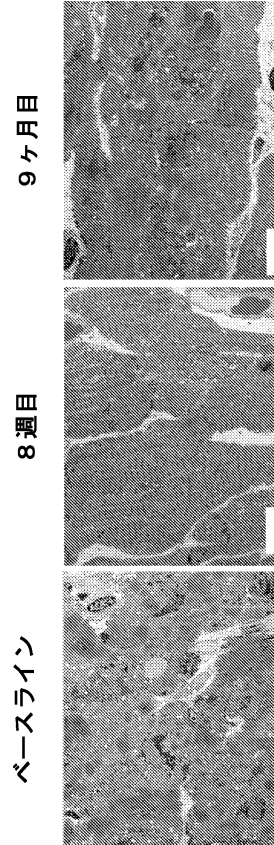
10

20

【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】

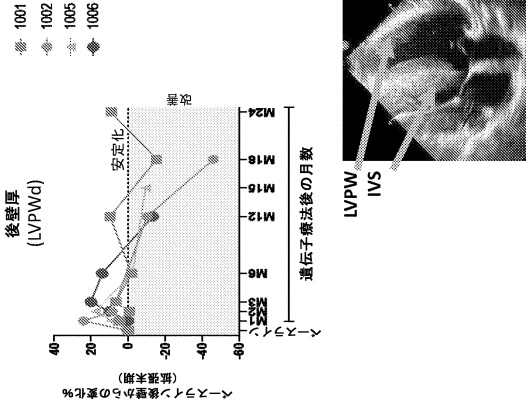
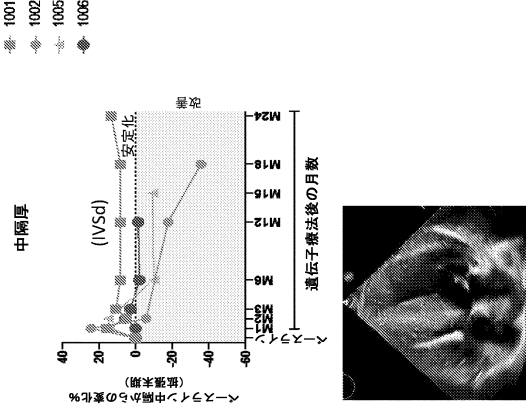


30

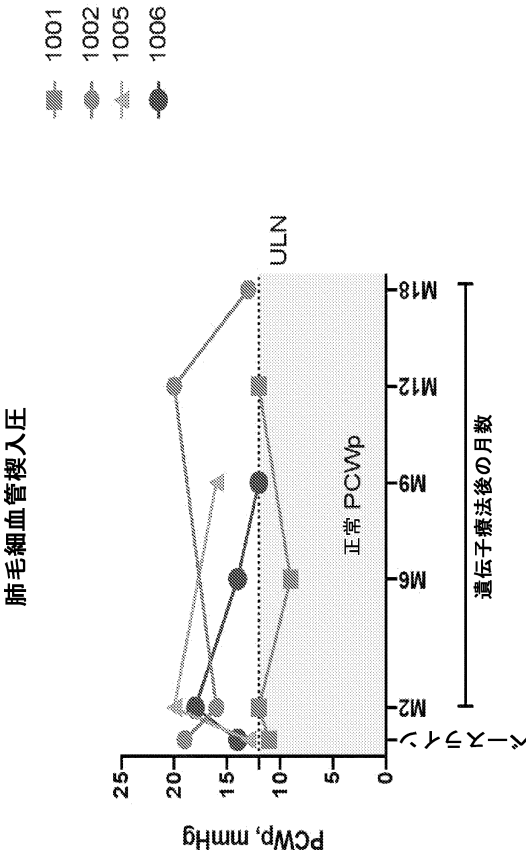
40

50

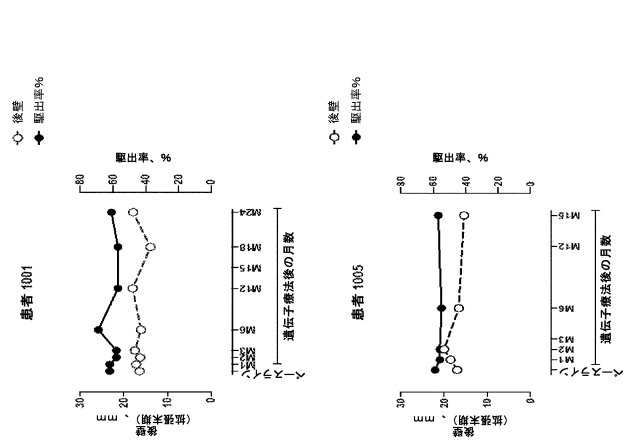
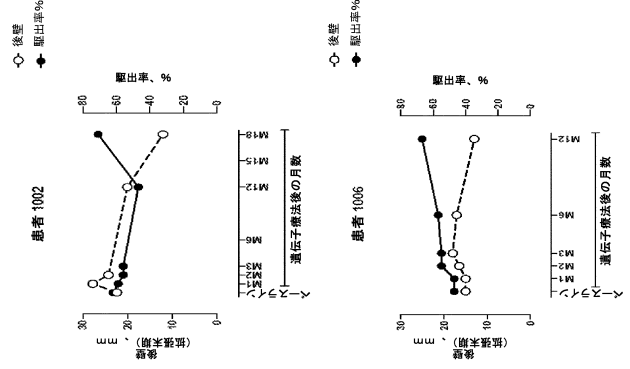
【図 15 A】



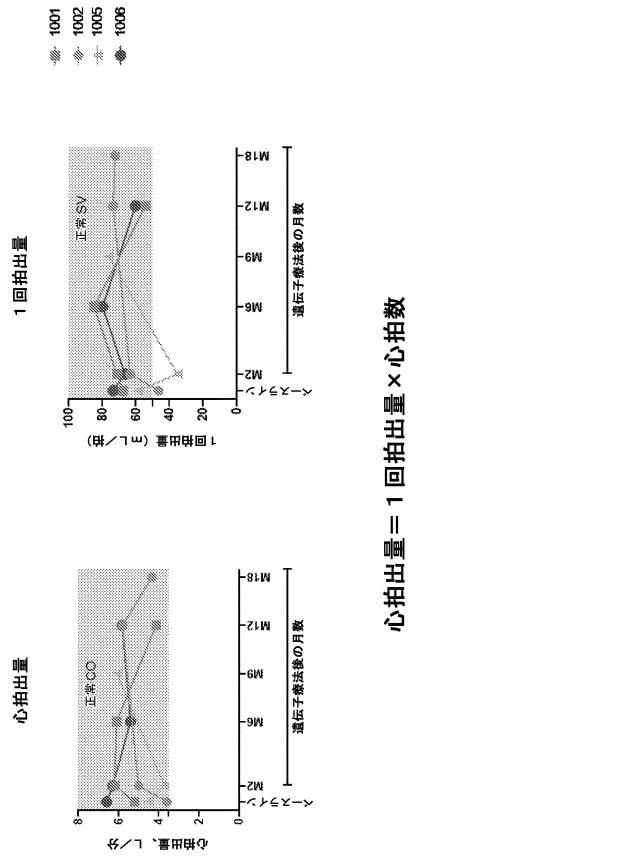
【図 15 C】



【図 15 B】



【図 15 D】



心拍出量 = 1 回拍出量 × 心拍数

【配列表】

2023552443000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/62112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 35/76; A61K 35/761; A61K 48/00; A61P 3/00 (2022.01) CPC - A61K 48/00; A61K 48/005; A61P 3/00; C12N 15/8645; C12N 2750/14143		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0054190 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 21 February 2019 (21.02.2019) abstract; claims 16, 21-23; para [0038]; [0073]; [0076]; [0090]; [0104]-[0116]	1-9, 38-46
A	US 2020/0148745 A1 (ROCKET PHARMACEUTICALS, LTD.) 14 May 2020 (14.05.2020) abstract; para [0007]-[0032]; [0060]-[0061]; [0127]-[0130]	1-9, 38-46
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "&" document member of the same patent family "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		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2022		Date of mailing of the international search report MAY 03 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 Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/62112

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.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.
b.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.	<input type="checkbox"/> 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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/62112

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.: 10-37, 47-58
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-9, drawn to a method for treating Danon disease.

Group II: Claims 38-46, drawn to a composition comprising an adeno-associated virus (AAV) comprising a polynucleotide sequence encoding a I AMP-2 protein

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

--continued on extra sheet--

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

30

- 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.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/62112

--continued from: Box III Unity of Invention is lacking--

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of administering a therapeutically effective amount of rAAV virion, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a unit does pharmaceutical composition comprising an adeno-associated virus (AAV) comprising a polynucleotide sequence encoding a LAMP-2 protein, not required by Group I.

10

Common Technical Feature:

Groups I and II share the common technical feature of an adeno-associated virus (AAV) comprising a polynucleotide sequence encoding a LAMP-2 protein composition for treating Danon disease.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art and is disclosed by US 2019/0054190 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter "UCalifornia").

As to the common technical feature, UCalifornia discloses an adeno-associated virus (AAV) comprising a polynucleotide sequence encoding a LAMP-2 protein composition for treating Danon disease (claims 1, 4; "1. A gene therapy vector comprising an expression cassette comprising a polynucleotide encoding one or more isoforms of lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP-2)"; "4. The gene therapy vector of claim 3, wherein the vector is from one or more of adeno-associated virus (AAV) serotypes 1-11, or any subgroups thereof").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

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

20

Item 4(cont.): Claims 10-37, 47-58 are dependent claims and are no drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/864 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)

A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 21/00
 C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
 C 1 2 N 15/12 Z N A

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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 トレベホ ホセ エム .

アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャージー州 クランベリー シダー ブルック ドライブ 9
 スペースクラフト セブン リミテッド ライアビリティ カンパニー内

(72)発明者 シャー ガウラブ

アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャージー州 クランベリー シダー ブルック ドライブ 9
 スペースクラフト セブン リミテッド ライアビリティ カンパニー内

F ターム (参考) 4C084 AA13 MA66 NA14 ZA361 ZA362 ZA941 ZA942 ZC511 ZC512
 4C085 AA14 BB11 EE03
 4C086 AA01 AA02 DA10 EA04 MA02 MA04 MA52 MA66 NA05 ZA36
 ZA94 ZC51 ZC75
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA36 ZA94 ZC51