

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7336769号

(P7336769)

(45)発行日 令和5年9月1日(2023.9.1)

(24)登録日 令和5年8月24日(2023.8.24)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/34 (2015.01)

A 6 1 K

35/34

Z N A

A 6 1 P 21/04 (2006.01)

A 6 1 P

21/04

Z M D

A 6 1 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P

21/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 0 5

C 1 2 N 5/077(2010.01)

A 6 1 P

43/00

1 2 1

請求項の数 14 (全114頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-556176(P2019-556176)

(86)(22)出願日 平成30年4月18日(2018.4.18)

(65)公表番号 特表2020-517601(P2020-517601  
A)

(43)公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/028184

(87)国際公開番号 WO2018/195210

(87)国際公開日 平成30年10月25日(2018.10.25)

審査請求日 令和3年4月15日(2021.4.15)

(31)優先権主張番号 62/487,393

(32)優先日 平成29年4月19日(2017.4.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/487,402

(32)優先日 平成29年4月19日(2017.4.19)

最終頁に続く

(73)特許権者 513268380

シーダーズ シナイ メディカル センター

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9

0 0 4 8, ロサンゼルス, 8 7 0 0 ペ

パリー ブールバード

(73)特許権者 514309457

カプリコール, インコーポレイテッド

アメリカ合衆国 9 0 2 1 1 カリフォル

ニア州 ビバリーヒルズ ウィルシェア

ブールバード セカンド フロア 8 8 4 0

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 骨格筋ジストロフィーを治療する方法及び組成物

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

骨格筋ジストロフィーの治療を必要とするヒト対象において骨格筋ジストロフィーを治療するのに使用するための組成物であって、前記組成物は、治療有効量の心筋球由来細胞(CDC)を含み、前記治療有効量のCDCが、前記ヒト対象の異栄養性骨格筋の等尺性の力または筋線維の数を改善するための静脈内注射による投与用に構成された少なくとも約 $7.5 \times 10^6$ 個のCDCである、組成物。

## 【請求項 2】

前記骨格筋ジストロフィーが、骨格筋のジストロフィン異常症を伴うデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記骨格筋ジストロフィーが、骨格筋のジストロフィン異常症を伴うベッカー型筋ジストロフィーである、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記異栄養性骨格筋が、横隔膜、腕又は脚の骨格筋である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記治療有効量のCDCが、前記組成物の2回以上の投与を介して送達される、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

10

20

C D Cの前記2回以上の投与が、約3カ月の間隔で行われる、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記治療有効量のC D Cが、単回の投与を介して送達される、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】

前記治療有効量のC D Cが、 $150 \times 10^6$ 個のC D Cであるか、又は少なくとも $150 \times 10^6$ 個のC D Cである、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項9】

前記治療有効量のC D Cが、 $7.5 \times 10^7$ 個～ $1 \times 10^9$ 個のC D Cを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項10】

前記C D Cが同種ヒトC D Cである、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】

前記対象が小児対象である、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項12】

前記対象が3歳～11歳である、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項13】

前記対象が12歳～18歳である、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

ステロイドと共に投与されるように構成されている、請求項1～13のいずれか1項に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

【0002】

本出願は、2017年4月19日付で出願された米国仮出願番号第62/487393号、2017年4月19日付で出願された米国仮出願番号第62/487402号、及び2017年4月19日付で出願された米国仮出願番号第62/487408号、及び2017年7月21日付で出願された米国仮出願番号第62/535672号に対する優先権を主張する。また、本出願は、2017年10月6日に提出された米国仮出願番号第62/569,440号、及び2018年1月8日に提出された米国仮出願番号第62/614,753号に対する優先権も主張する。先の出願はいずれも、参照することによりそれらの全体が本明細書の一部をなす。

30

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

【0003】

本発明は、国立衛生研究所から支給された助成金番号HL124074のもと政府支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

技術分野

【0004】

40

幾つかの実施形態は、ジストロフィン異常症（筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、及びベッカー型筋ジストロフィー）、及びそれと関連する症状又は疾患状態（デュシェンヌ型筋ジストロフィーに関連する骨格筋ミオパチーを含む）の治療のための心筋球由来細胞及びそれに由来する細胞外小胞（例えばエキソソーム等）と並んで、その単離された分子カーゴ（例えば、核酸、短い非コードRNA、マイクロRNA、及び/又は変異体及びその合成類縁体）の使用に関する。

【背景技術】

【0005】

米国では、約20000人の少年及び青年がデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に罹患している。主要な原因は、ジストロフィン複合体の遺伝子異常であり、骨格筋及

50

び心臓組織の二次的損傷を伴う。ジストロフィン、細胞内骨格と細胞外マトリクスの間に物理的連結を提供する大きな桿状の筋鞘タンパク質である。ジストロフィン欠損により、筋鞘は不安定となり、筋線維は反復する収縮により物理的損傷を受けやすい。この壊滅的なX連鎖筋減少症には特定の治療がない。誕生する男児3500人に1人が罹患し、DMDは筋ジストロフィーの全症例の80%を占める。異栄養性筋肉はミオパチー（筋線維における細胞膜の損害）を経て、非常に若い年齢で歩行の喪失に結び付き、後に呼吸筋力低下及び心不全を伴う。小児対象では、骨格筋衰弱は発症から3年～5年で始まり、進行性衰弱が起こって、発症からおよそ13年の時点で車椅子依存を伴う。重要なことに、心筋症は発症から13年未満では患者の1/3で発症し、発症から18年未満では1/2の患者まで増加し、18年以降では全ての患者で発症することが観察されている。DMDに起因する及び/又はそれに続発する、特に後期での心不全（HF-DMD）は、重大な排他的疾患を示し、症候性又は進行した心不全（HF）を上回る後期心不全に対しては細胞、組織、心臓又は機械的な移植は選択肢となり得ない。患者は、血管機能不全、更には胃腸及び尿路系の関与を含む平滑筋ミオパチーに更に罹患している場合がある。共通する予後は、呼吸機能不全又は心筋症による死亡である。

10

#### 【0006】

これらの臨床的特徴の根底にあるのはジストロフィン遺伝子突然変異（欠失）であり、ジストロフィンの喪失が細胞膜損傷及び細胞外 $Ca^{2+}$ の細胞内への漏出をもたらす。細胞内カルシウムレベルの上昇は、最終的には、酸化及び/又はニトロソ化のストレス及び炎症の増加、並びにカルパインの活性化をもたらす。これらの効果の組み合わせは、筋肉のタンパク質分解及びアポトーシスをもたらす。これらの効果の組み合わせは、筋肉のタンパク質分解及びアポトーシスをもたらす。これらの効果の組み合わせは、筋肉のタンパク質分解及びアポトーシスをもたらす。これらの効果の組み合わせは、筋肉のタンパク質分解及びアポトーシスをもたらす。現在の治療は副腎皮質ステロイド及びその疾患の効果を緩和する心保護剤の使用に制限されているが、疾患それ自体を治療せず、その進行の遅延もしない。したがって、当該技術分野において、初期の介入が後期の併存症の出現を予防し得る小児患者を含めて、治療に対する大いなる要求が今も存在している。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

ジストロフィン異常症及び/又はそれと関連する疾患状態に苦しむ患者に対して、治療有効量の心筋球細胞（CDC: cardiosphere-derived cell）、CDCに由来するエキソソームCDC（CDC-XO）及び/又はそれらの組み合わせを投与することによる、ジストロフィン異常症及び/又はそれと関連する1つ若しくは複数の疾患状態を治療する方法が本明細書に記載される。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症が、デュシェンヌ筋ジストロフィー（DMD）及び/又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ以上である。幾つかの実施形態では、治療される疾患状態は、骨格ミオパチー（例えば、骨格筋のDMD又は骨格筋のベッカー型筋ジストロフィー）である。幾つかの実施形態では、CDC及び/又はCDC-XOの投与は、ジストロフィン異常症を有する対象において、筋肉機能不全（骨格筋機能不全におけるものを含む）の発症を遅延させる、及び/又は筋肉機能及び完全性（骨格筋におけるものを含む）を維持する、改善する、及び/又は回復する。幾つかの実施形態では、治療される患者の異栄養性骨格筋としては、横隔膜、四肢の筋肉（例えば、腕及び/又は脚における）及び/又は体幹の筋肉の1つ以上が挙げられる。

30

40

#### 【0008】

簡潔に表現するため、幾つかの実施形態がCDC-XO及びCDCに関して具体的に開示される。しかしながら、本明細書に開示される1つ以上の治療は、CDCに由来する細胞外小胞（本明細書ではCDC-EVと称され、CDC由来微小胞（CDC-MV: CDC-derived microvesicle）を含み得る）、CDC-XO又はCDC-EVの単離された分子カーゴ、及びそれらの組み合わせによって達成されることが理解されるべきである。したがって、幾つかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法は、CDC-XO、CDC、CDC-EV、CDC-XOの単離及び/又は精製された分子カーゴ、CDC-EVの単離及び/又は精製された分子カーゴ、及び/又はそれらの

50

組み合わせの1つ以上を使用して行われ得る。

#### 【0009】

幾つかの実施形態では、治療方法は、対象（例えば、ジストロフィン異常症又はそれに関連する病状に苦しむ患者）に治療有効量のCDC、CDC-XO及び/又はCDC-EVを投与することを含む。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-XO及び/又はCDC-EVは、対象に対して自己由来又は同種である（例えば、自身の組織、別の対象の組織及び/又は別の動物種の組織に由来する）。幾つかの実施形態では、治療方法は、治療有効量のCDC-XO及び/又はCDC-EV（CDC由来微小胞（CDC-MV）を含む）に由来する分子カーゴを対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、CDC-XO又はCDC-EVの分子カーゴは単離及び/又は合成され、その分子カーゴ（例えば、RNAポリヌクレオチド及び/又は短い非コードRNAを含む、特定の分子及び/又は種々の分子の組み合わせ）を、それを必要とする対象（例えば、ジストロフィン異常症及び/又はその疾患状態を有する対象）に投与する。幾つかの実施形態では、治療方法は、治療有効量の単離されたRNAポリヌクレオチド、又はCDC-XO及び/又はCDC-EVに見られるRNAポリヌクレオチドをコードする（及び/又は含む）ベクターを対象に投与することを含む。

10

#### 【0010】

幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、対象の全身に送達される。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、対象の全身に又は局所に送達される。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、対象の局所ではなく全身に送達される。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、対象の全身と局所（systemically locally）に送達される。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、対象に全身ではなく局所に送達される。幾つかの実施形態では、治療有効量のCDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOを投与する方法の非限定的な例としては、全身投与（例えば、静脈内、動脈内、心室内、大動脈内及び/又は腹腔内の注射及び/又は注入）が挙げられる。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは静脈内で注射又は注入される。幾つかの実施形態では、治療有効量のCDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは筋肉の注射及び/又は注入によって患者に投与される。幾つかの実施形態では、治療有効量のCDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、局所部位（例えば、異栄養性骨格筋及び/又は治療が望まれる標的部位へと若しくはその付近に）に直接注入によって患者に投与される。幾つかの実施形態では、有効量のCDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOは、心臓内ではない身体の領域の注射及び/又は注入により全身に送達される。幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOの静脈内投与としては、頸静脈及び/又は大腿静脈の注射及び/又は注入が挙げられる。

20

30

#### 【0011】

幾つかの実施形態では、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOのそれを必要とする対象への投与は、単回用量及び/又は頻回用量（例えば、2回、4回、6回、8回、10回以上の用量）を含む。幾つかの実施形態では、頻回用量が使用される場合、CDC、CDC-EV及び/又はCDC-XOの投与は、毎日、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、6カ月毎、又は毎年行われる。幾つかの実施形態では、投薬スケジュールは、例えば、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、5カ月、6カ月、1年、5年、又は上述の値を含む及び/又はその期間に及ぶ範囲の期間に亘って行われる。実例として、幾つかの実施形態では、時間間隔は1カ月～5カ月の間隔で2回用量～10回用量の投与を含む。幾つかの実施形態では、投薬スケジュールは、各投薬の間が約3カ月の3回の投薬である。幾つかの実施形態では、投薬スケジュールは、各投薬を約1週間あける5回の投薬である。幾つかの実施形態では、投薬スケジュールは、0週、6週及び9週の3回の投与（例えば、異なる時に3回の単回用量）である。幾つかの実施形態では、時間間隔スケジュールを使用し、投薬の期間、及び投薬の期間の間の休止の期間（例えば、1カ月間の毎週の投薬に続

40

50



いて5カ月の休止期間、その後続く1カ月間の毎週の投薬等)がある。幾つかの実施形態では、単回用量は、治療有効量のCDC、CDC-XO及び/又はCDC-EVを含む。幾つかの実施形態では、投薬期間及び/又は時間間隔スケジュールは、患者の一生を通じて行われる。幾つかの実施形態では、各単回用量の頻回投与が対象に提供される。様々な実施形態では、本明細書において他に開示されるように、投与は、2回、3回、4回、4回以上に順次適用される用量等の反復投与であってもよい。

#### 【0012】

幾つかの実施形態では、治療有効量CDCは、少なくとも約 $75 \times 10^6$ 個 $\sim 500 \times 10^6$ 個のCDCを含む。幾つかの実施形態では、治療有効量のCDCは、約： $75 \times 10^6$ 個以上のCDC、 $150 \times 10^6$ 個以上のCDC、 $300 \times 10^6$ 個以上のCDC、 $400 \times 10^6$ 個以上のCDC、 $500 \times 10^6$ 個以上CDC、又は上述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲を含む。幾つかの実施形態では、治療有効量のCDCは、約： $75 \times 10^6$ 個以下のCDC、 $150 \times 10^6$ 個以下のCDC、 $300 \times 10^6$ 個以下のCDC、 $400 \times 10^6$ 個以下のCDC、 $500 \times 10^6$ 個以下のCDC、又は上述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲を含む。

10

#### 【0013】

幾つかの実施形態では、各用量(単回又は頻回の用量が使用される場合)及び/又は一連の治療レジメンに亘って投与されるCDC-EV又はCDC-XOの数は、以下に等しい又は少なくとも約： $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^{10}$ 個、 $1 \times 10^{11}$ 個、 $1 \times 10^{12}$ 個、又は上述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲である。幾つかの実施形態では、各用量(単回又は頻回の用量が使用される場合)及び/又は一連の治療レジメンに亘って投与されるCDC-EV又はCDC-XOの量は、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 以上の範囲である。

20

#### 【0014】

幾つかの実施形態では、或る容量(又は投薬レジメン)において対象に送達されるCDC-XO(又はCDC-EV)の数は、細胞療法の方法において臨床的に有効な量で使用され得るCDCの数に基づいて決定される。例えば、幾つかの実施形態では、 $75 \times 10^6$ 個 $\sim 500 \times 10^6$ 個のCDCが骨格ミオパチーの治療的処置に対する有効量である場合、*in vivo*においてそれらのCDCによって放出され得る当量のCDC-XO又はCDC-MVを使用することは、「無細胞」治療法で患者に適用され得る。言い換えれば、CDC-XO及び/又はCDC-MVのCDC当量を使用することができる。実例として、幾つかの実施形態では、 $3 \text{ mL} / 3 \times 10^8$ 個のCDCは治療上の利益を提供することができる。したがって、それらのCDCが体内に留まる時間経過と共に、その数のCDCに由来し得る複数のCDC-XOが使用される。幾つかの実施形態では、患者に送達されるCDC-XO又はCDC-EVの量は、以下に等しい又は少なくとも約： $75 \times 10^6$ 個のCDC、約 $150 \times 10^6$ 個のCDC、約 $300 \times 10^6$ 個のCDC、約 $400 \times 10^6$ 個のCDC、約 $500 \times 10^6$ 個のCDC、又は上述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲の注射を介して放出され得るCDC-XO又はCDC-EVの量である。幾つかの実施形態では、任意の単回用量で投与されるCDCの数は、 $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^{10}$ 個、 $1 \times 10^{11}$ 個、 $1 \times 10^{12}$ 個(又は上述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲)である。幾つかの実施形態では、患者に送達されるCDC-XO又はCDC-EVの量は、以下に等しい又は少なくとも約： $1 \times 10^5$ 個のCDC、約 $1 \times 10^6$ 個のCDC、約 $1 \times 10^7$ 個のCDC、約 $1 \times 10^8$ 個のCDC、約 $1 \times 10^9$ 個のCDC、約 $1 \times 10^{10}$ 個のCDC、約 $1 \times 10^{11}$ 個のCDC、約 $1 \times 10^{12}$ 個のCDC、又は上述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲の注射を介して放出され得るCDC-XO又はCDC-EVの量である。幾つかの実施形態では、CDCの用量は、約10個 $\sim 9000$ 万個、約10個 $\sim$ 約2000万個、約20個 $\sim$ 約3000万個、約30個 $\sim$ 約5000万個、約50個 $\sim$ 約6000万個、約60個

30

40

50

～約7000万個、約70個～約7500万個、約7500万個～約8000万個、約8000万個～約9000万個、並びに上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含む範囲である。幾つかのかかる用量は、冠状動脈による送達に特に好都合である。幾つかの実施形態では、CDCの用量は、約3000万個～約4500万個、約4000万個～約5000万個、約5000万個～約5000万個、約60個～約7500万個、約75個～約10億個、約9000万個～約11億個、約10億個～12億5000万個、約12億5000万個～約15億個、並びに上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含む、約3000万個～約15億個の範囲である。特定の理論に拘束されないが、注入された場合、CDCは対象に一時的に留まると考えられる。実施形態に応じて、CDCの定着の程度は変化する。例えば、幾つかの実施形態では、定着率は、約0.01%～約0.05%、約0.05%～約0.1%、約0.1%～約0.5%、約0.5%～約1.0%、約1.0%～約2.5%、約2.5%～約5%、約5%～約10%、並びに上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含む約0.01%～10%である。したがって、幾つかの実施形態では、患者に送達されるCDC-XO又はCDC-EVの当量は、約1週間、約2週間、約3週間以上の体内にCDCが滞在する所与の時間に亘って、開示される量のCDCの投与（例えば、注射又は注入）により放出され得る、CDC-XO又はCDC-EVの量として計算される。特定の例では、投与量は、体重に対して割り当てられ得る（100000M～1M CDC/体重kgの範囲の総CDC用量）。幾つかの実施形態では、心臓への注射に関して、投与されるCDCの数としては、XO又はEVの投与量に対する別のベースラインとして、冠状動脈当たり2500万個のCDC（すなわち、合計7500万個のCDC）が挙げられる。

10

20

#### 【0015】

幾つかの実施形態では、患者に送達されるCDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVの量（例えば用量）は、（例えば、CDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVを取り巻く溶液及び／又は環境を除去又は実質的に除去した場合）CDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVの重量（mg単位）により測定され得る。例えば、幾つかの実施形態では、CDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVの用量は、以下に等しい又は少なくとも：約0.001～約0.005、約0.005～約0.01、約0.01～約0.05、約0.05～約0.1、約0.1～約0.5、約0.5～約1、約1～約10、約10～約25、約25～約50、約50～約75、約75～約100のmg単位のおよその重量、又は上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含んでもよい。本明細書においてさらに詳細に検討されるように、これらの質量は、実施形態に応じて対象に投薬されるCDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVの数を表す。例えば、幾つかの実施形態では、或る用量のCDCの数は、約 $5 \times 10^4$ 個～約 $1 \times 10^5$ 個、約 $1 \times 10^5$ 個～約 $2.5 \times 10^5$ 個、約 $2.5 \times 10^5$ 個～約 $1 \times 10^6$ 個、約 $1 \times 10^6$ 個～約 $1 \times 10^7$ 個、約 $1 \times 10^7$ 個～約 $1 \times 10^8$ 個、約 $1 \times 10^8$ 個～約 $1 \times 10^9$ 個、約 $1 \times 10^9$ 個～約 $2 \times 10^9$ 個、約 $2 \times 10^9$ 個～約 $5 \times 10^9$ 個、並びに上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含む、約 $5 \times 10^4$ 個～約 $2 \times 10^9$ 個の範囲であってもよい。同様に、実施形態に応じて、対象に投薬されるエキソソーム又は粒子（例えば小胞）の数は、約 $1 \times 10^9$ 個～約 $2 \times 10^9$ 個、約 $2 \times 10^9$ 個～約 $4 \times 10^9$ 個、約 $4 \times 10^9$ 個～約 $1 \times 10^{10}$ 個、約 $1 \times 10^{10}$ 個～約 $1 \times 10^{11}$ 個、約 $1 \times 10^{11}$ 個～約 $1 \times 10^{12}$ 個、約 $1 \times 10^{12}$ 個～約 $2 \times 10^{12}$ 個、約 $2 \times 10^{12}$ 個～約 $2 \times 10^{13}$ 個、約 $2 \times 10^{13}$ 個～約 $1 \times 10^{14}$ 個、約 $1 \times 10^{14}$ 個～約 $2 \times 10^{14}$ 個、並びに上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含む範囲を含む、約 $1 \times 10^9$ 個～約 $2 \times 10^{14}$ 個の範囲であってもよい。幾つかの実施形態では、患者に送達されるCDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVの量は、タンパク質重量（mg単位）によって測定されてもよく、及び／又は細胞若しくは小胞の総重量（例えば、水が細胞又は小胞の外側の区域から除去されている場合）によって測定されてもよい。幾つかの実施形態では、患者に送達されるCDC、CDC-XO及び／又はCDC-EVの量は、1mg～10mg、10mg～25mg、25mg～50mg、50mg～75mg、75mg～100mg、又は100mg以上の

30

40

50

タンパク質に等しい。幾つかの実施形態では、治療有効量の組成物の投与は、単回用量に約 1 m g ~ 約 1 0 0 m g の X O 及び / 又は E V のタンパク質を含む。

#### 【 0 0 1 6 】

幾つかの実施形態では、C D C、C D C - E V 及び / 又は C D C - X O を含む製剤又は組成物が提供される。幾つかの実施形態では、製剤及び / 又は組成物は薬学的に許容可能な担体を含む。幾つかの実施形態では、担体は、生理学的な p H の及び / 又は等張な水である。幾つかの実施形態では、製剤又は組成物は、上述の方法に従って、ジストロフィン異常症（例えば、骨格筋ジストロフィー、異栄養性心筋症等）の治療に使用される。幾つかの実施形態では、製剤又は組成物は、治療有効量の、C D C、C D C - E V 及び / 又は C D C - X O を含む製剤及び / 又は組成物が標的とされる異栄養性骨格筋に送達される、それを必要とする対象においてジストロフィン異常症を効果的及び / 又は安全に治療するため使用される。

10

#### 【 0 0 1 7 】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示されるように、治療方法は、ミオパチーに罹患した対象（例えば患者）に対するものである。幾つかの実施形態では、筋肉のミオパチーは、細胞膜変性、間質性炎症、脂肪置換及び線維化の 1 つ以上を含み、そのうちの 1 つ以上が、本明細書に開示される治療の間に治療される及び / 又は実質的に緩和される。

#### 【 0 0 1 8 】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示されるように、治療法は心筋症に罹患した対象（例えば患者）に対するものである。幾つかの実施形態では、対象は、心不全ではなく心筋症に罹患している。幾つかの実施形態では、対象は心筋症と診断される。幾つかの実施形態では、対象は、心不全ではなく心筋症と診断される。幾つかの実施形態では、心筋症は、左心室後底部線維化、異常 A V 結節伝導を伴う S V T を含む心房内の伝導異常の 1 つ以上を含み、そのうちの 1 つ以上が、本明細書に開示される治療により治療される及び / 又は実質的に緩和される。様々な実施形態では、心筋症は、進行期の心室拡大、呼吸困難、末梢性浮腫及び肝腫大を含み、そのうちの 1 つ以上が、本明細書に開示される治療により治療される及び / 又は実質的に緩和される。様々な実施形態では、心不全（H F）は、心臓の構造及び機能が抑制される無症候性異常（ステージ B）、顕性 H F（ステージ C）、そして進行性 H F（ステージ D）を含み、そのうちの 1 つ以上が、本明細書に開示される治療により治療される及び / 又は実質的に緩和される。

20

30

#### 【 0 0 1 9 】

様々な実施形態では、対象は、骨格筋ミオパチー、G I 及び尿路系の合併症を更に含む血管系機能不全を含む平滑筋ミオパチーに罹患している。幾つかの実施形態では、これらの疾患状態の 1 つ以上が、本明細書に開示される方法によって治療される及び / 又は実質的に緩和される。幾つかの実施形態では、ミオパチーは、細胞膜変性、間質性炎症、脂肪置換及び線維化の 1 つ以上を含み、そのうちの 1 つ以上が、本明細書に開示される治療により治療される及び / 又は実質的に緩和される。

#### 【 0 0 2 0 】

幾つかの実施形態では、対象の治療は、骨格筋組織における機能改善を含む、対象における機能改善を判断することを更に含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、筋肉組織の機能改善をもたらす。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、例えば、随意筋収縮における機能改善をもたらす。幾つかの実施形態では、機能改善は、収縮力の増加、歩行能力の改善、座位から立ち上がる能力の改善、臥位若しくは背臥位から座る能力の改善、並びにマウスのポインティング及び / 又はクリック等の手先の器用さの改善の 1 つ以上を含む。幾つかの実施形態では、対象の治療は、神経損傷の治療に応答する認知、肺損傷の治療に応答する血液酸素運搬、及び損傷した免疫学関連組織の治療に応答する免疫機能を評価することを更に含む。

40

#### 【 0 0 2 1 】

幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症の治療を必要とする上記対象は、ヒト対

50

象である。幾つかの実施形態では、ヒト対象は、約：3歳以下、8歳以下、11歳以下、12歳以下、15歳以下、18歳以下、又は上述の値を含む及び／又はそれに及ぶ範囲を含む範囲の年齢である。幾つかの実施形態では、ヒト対象は、例えば、約3歳～11歳、又は約12歳～18歳の年齢の小児対象である。幾つかの実施形態では、対象は、列挙される年齢集団の1つ等の上記の1つ以上の特徴によって分類され、及び／又は上記の1つ以上の疾患状態（例えばミオパチー、心筋症及び／又は心不全）に罹患している及び／又は診断されている。幾つかの実施形態では、患者は、上に開示される1つ以上の疾患状態を患っているが、その他の疾患には罹患していない。例えば、3歳～11歳であり、心不全ではなく心筋症に罹患している及び／又は心筋症と診断されている対象。別の実例として、対象は8歳～15歳であってもよく、心筋症又は心不全ではなく骨格筋ミオパチーに罹患しているもよい

10

#### 【0022】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示されるように、注入は動脈内又は静脈内であってもよい。動脈及び静脈は、脚、体幹（例えば、肺の又は肺周辺）、首等のものを含んでもよい。幾つかの実施形態では、注入は、身体の1つ以上の場所（例えば、注入部位又は注入部位から離れた場所）に治療有効用量のCDC-XO、CDC-EV及び／又はCDCを送達する。幾つかの実施形態では、注入は、平滑筋及び骨格筋の組織に対して治療的に有効な投薬量のエキソソームを送達する。幾つかの実施形態では、治療有効量の組成物の投与は注射を含む。幾つかの実施形態では、注射は、心筋内注射、心臓腔及び心室、それらと関連する血管を含む、心臓への注射を含む。幾つかの実施形態では、心臓、心臓腔及び心室、それらと関連する血管への注射は、平滑筋及び骨格筋の組織に対して治療的に有効な投薬量のエキソソームを送達することができる。幾つかの実施形態では、注射は全身送達の達成をもたらす及び／又は全身送達を達成するため行われる。幾つかの実施形態では、注射は、体内の1つ以上の標的とする場所（例えば、注射部位又は注射部位から離れていてもよい場所）に治療的容量のCDC-XO、CDC-EV及び／又はCDCを送達する。幾つかの実施形態では、注射は、骨格筋注射（骨格筋への注射）を含む。幾つかの実施形態では、注射は、腹腔内注射を含む。幾つかの実施形態では、注射は、皮下注射を含む。

20

#### 【0023】

幾つかの実施形態によれば、筋ジストロフィーの治療必要とする対象における筋ジストロフィー（例えばジストロフィン異常症）の治療方法が本明細書において提供され、該方法は、治療有効量の心筋球由来細胞（CDC）を対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、心筋症の治療を必要とする対象における心筋症の治療方法も提供され、該方法は、治療有効量のCDCを対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、心筋症は、異栄養性心筋症であり、幾つかの実施形態によれば、異栄養性心筋症は、慢性筋ジストロフィーに続発する心不全である。幾つかの実施形態では、上記方法は、CDC自体に代えて又はそれに加えて、CDCに由来するエキソソームを用いる。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症を治療する方法が提供され、該方法は、治療有効量のエキソソームをジストロフィン異常症に罹患した小児対象に投与することにより該対象を治療することを含む。幾つかの実施形態では、無血清培地で成長させた心筋球由来細胞（CDC）から複数のエキソソームを単離する。幾つかの実施形態では、異栄養性骨格筋を治療する方法が提供され、心筋球由来細胞（CDC）及び／又はCDC由来エキソソーム（CDC-XO）をジストロフィン異常症に罹患した対象に投与することにより、異栄養性骨格筋を治療することを含み、ここで、CDC及び／又はCDC-XOは心臓ではない部位で対象に投与され、異栄養性骨格筋は標的とされる異栄養性骨格筋であり、標的とされる異栄養性骨格筋は治療有効量のCDC及び／又はCDC-XOを投与される。一実施形態では、骨格筋ジストロフィーの治療を必要とする対象において骨格筋ジストロフィーを治療する方法が提供され、該方法は、治療有効量の心筋球由来細胞（CDC）を含む組成物の第1の用量を対象に投与すること（ここで、第1の用量の治療有効量は約 $1 \times 10^7$ 個～約 $1 \times 10^9$ 個のCDCの範囲である）、上記第1の用量の投与後第1の期間を待つこと（

30

40

50

ここで、上記第1の期間は約1カ月～6カ月である)、治療有効量のCDCを含む第2の用量の組成物を対象に投与すること(ここで、第2の用量の治療有効量は約 $1 \times 10^7$ 個～約 $1 \times 10^9$ 個のCDCの範囲である)、上記第2の用量の投与後第2の期間を待つこと(ここで、上記第2の期間は約1カ月～6カ月である)、治療有効量のCDCを含む少なくとも1回の追加の用量の組成物を対象に投与すること(ここで、少なくとも1回の追加の用量の治療有効量は約 $1 \times 10^7$ 個～約 $1 \times 10^9$ 個のCDCの範囲である)、上記少なくとも1回の用量の投与後少なくとも1回の追加の期間を待つこと(ここで、上記第2の期間は約1カ月～6カ月である)を含み、上記投与は運動能力又は筋肉機能の改善をもたらし、上記CDCは上記対象に関して同種であり、上記複数回の投与は対象において著しい免疫応答を誘導せず、上記複数回の投与は全身投与を含む。幾つかの実施形態では、CDCの投与(1回又は複数回)は、T細胞の活性化又は増殖の1つ以上のマーカーの発現を変更し、該マーカーはCD69及び/又はHLA-DRを含む。

10

#### 【0024】

幾つかの実施形態では、治療有効量のCDCは、幾つかの実施形態によれば、各々骨格筋のジストロフィン異常症を伴うデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)又はベッカー型筋ジストロフィーを患う対象の異栄養性骨格筋を治療するのに十分である。いずれの骨格筋も冒される可能性があるが、幾つかの実施形態によれば、異栄養性骨格筋は、横隔膜、腕又は脚の骨格筋である。

#### 【0025】

投与経路は、実施形態に応じて変化し得る。例えば、幾つかの実施形態ではCDCは、異栄養性骨格筋において筋肉内注射(例えば、局所投与)により対象に投与される。幾つかの実施形態ではCDCは、対象に全身投与され、その場合、幾つかの経路が自由に選択される。例えば、幾つかの実施形態では、全身投与は静脈内の注射又は注入による。幾つかの実施形態では、全身投与は右心室への注射によるが、一方で更なる実施形態では、全身の投与は左心室への注射による。

20

#### 【0026】

幾つかの実施形態では、CDCの投与は単回用量によるが、幾つかの実施形態では2以上の用量が投与される。幾つかの実施形態では、頻回用量によれば、投薬は、約3週間～3カ月の間隔、例えば、3週間～4週間、4週間～5週間、5週間～6週間、6週間～8週間、8週間～12週間、又は終了点を含むその間の任意の時に与えられる。幾つかの実施形態では、その後の用量は、最初のCDC用量が投与された6週間後及び12週間後に与えられる。実施形態に応じて、CDCの数及び/又は投与の場所は、反復用量の間変化してもよい。代替的には、投薬レジメンは該レジメンに亘り一定のCDCの数及び位置を使用することができる。

30

#### 【0027】

例として、本明細書に開示される方法は、少なくとも約 $75 \times 10^6$ 個のCDCの用量(例えば、CDCの治療有効量)を採用することができる。より具体的には、幾つかの実施形態では、その容量は、少なくとも約 $150 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $300 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $350 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $400 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $450 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $500 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $550 \times 10^6$ 個のCDC、少なくとも約 $600 \times 10^6$ 個のCDC、又はそれらの間のいずれかの数である。エキソソームを利用するそれらの実施形態では、或るの実施形態は、単回用量に約1mg～約100mgの用量のエキソソームタンパク質を含む。

40

#### 【0028】

幾つかの実施形態では、CDC又はエキソソームは、CDCを投与される対象に関して同種である。

#### 【0029】

幾つかの実施形態では、CDC又はエキソソームの投与は、結果的にジストロフィン発現の増加(例えば、「正常な」ジストロフィン発現、例えば対照集団又は疾患のより初期

50

の時点に対する増加)をもたらす。幾つかの実施形態では、ジストロフィンの増加は、例えば、骨格筋及び/又は横隔膜において検出可能である。

【0030】

幾つかの実施形態では、上記方法は、CDCと共にステロイドを投与すると(例えば、別々に又は同時に投与すること)を更に含む。

【0031】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される上記方法、使用及び、組成物は、結果的に筋肉機能における改善、又は筋線維化若しくは組織損傷の減少をもたらす。幾つかの実施形態では、改善は骨格筋に関するものである。幾つかの実施形態では、改善は心筋に関するものである。

【0032】

また、CDC及び/又はCDCエキソソームを含む組成物の使用が本明細書において提供され、ここで、該組成物は、筋ジストロフィーを有する対象に対する全身投与に適しており、上記組成物の投与は、上記筋ジストロフィーを治療する(例えば、骨格筋を治療する)。

【0033】

幾つかの実施形態では、CDC、CDC-XO又はCDC由来細胞外小胞(CDC-EV)に由来する単離されたRNAポリヌクレオチド又は該RNAポリヌクレオチドをコードするベクターを含む組成物が更に提供され、ここで、RNAポリヌクレオチドは短い非コードRNAを含む。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド配列は、DMDに由来する短い非コードRNA(srDMD)に対して、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のパーセンテージ同一性を含む。幾つかの実施形態では、短い非コードRNAはsrDMDを含む。幾つかの実施形態では、短い非コードRNAはマイクロRNAを含む。実施形態に応じて、マイクロRNAは、5'末端又は3'末端にGCCGを含んでもよい。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、miR-148aに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%のパーセンテージ同一性を含む。一実施形態では、マイクロRNAはmiR-148aを含む。幾つかの実施形態では、ベクターは、ウイルス(例えば、パルボウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス等)である。一実施形態では、アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスである。

【0034】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、1つ以上の所望の患者の転帰を達成する。幾つかの実施形態では、対象の治療は、ジストロフィン発現の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、ジストロフィン発現の増加が骨格筋に生じる。幾つかの実施形態では、骨格筋におけるジストロフィン発現の増加は、ヒラメ筋等の四肢(例えば、腕又は脚)の骨格筋を含む。幾つかの実施形態では、ジストロフィン発現の増加は横隔膜において生じる。幾つかの実施形態では、対象の治療は、線維化の減少、炎症の減少及び/又はミトコンドリア機能の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、線維化の減少は、コラーゲン蓄積の減少を含む。幾つかの実施形態では、コラーゲンは、コラーゲンI及び/又はコラーゲンIIIを含む。幾つかの実施形態では、炎症の減少は、細胞質核因子(赤血球由来2)様2(Nrf2)の増加、脂肪酸過酸化最終生成物の減少、炎症細胞数の減少及び/又は抗酸化物質のアップレギュレートされた発現を含む。幾つかの実施形態では、アップレギュレートされる抗酸化物質は、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2(SOD-2)及びグルタメート-システインリガーゼ触媒(GCLC)サブユニットの1つ以上を含む。幾つかの実施形態では、ダウンレギュレートされる炎症細胞は、CD68<sup>+</sup>マクロファージ及びCD3<sup>+</sup>T細胞を含む。幾つかの実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、ミトコンドリアの超微細構造の増加及び/又はミトコンドリア生合成の増加を含む。幾つかの実施形態では、ミトコンドリア機能の増加は、核PPAR- $\gamma$ コアクチベーター-1(PGC-1)発現の増加を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 5 】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示されるように、C D C - X O の分子カーゴの1つ以上の単離された成分を含む治療用組成物は、本明細書に開示される方法において使用される。幾つかの実施形態では、治療用組成物はC D C - X O R N A を含む。幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示されるように、R N A は、C D C、C D C - X O 及び/又はC D C - M V から単離され、再度組み合わせられて(例えば、混合及び適合されて)治療方法における使用のための治療用混合物を提供する。幾つかの実施形態では、R N A の治療用混合物は、非コードR N A を含む、単一のR N A 又は複数のR N A (例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のR N A )を含んでもよい。幾つかの実施形態では、非コードR N A は、とりわけt R N A、Y R N A、r T N A、m i r R N A、I n c R N A、p i R N A、S n R N A、s n o R N A を含み、更にそれらのフラグメントを含む。幾つかの実施形態では、治療用混合物は、マイクロR N A、m i R - 1 4 6 a、m i R - 1 4 8 a、m i R - 2 2、m i R - 2 4、m i R - 2 1 0、m i R - 1 5 0、m i R - 1 4 0 - 3 p、m i R - 1 9 a、m i R - 2 7 b、m i R - 1 9 b、m i R - 2 7 a、m i R - 3 7 6 c、m i R - 1 2 8、m i R - 3 2 0 a、m i R - 1 4 3、m i R - 2 1、m i R - 1 3 0 a、m i R - 9、m i R - 1 8 5、m i R - 2 3 a、m i R - 2 1 5、m i R - 3 3 a、m i R 2 0 4、m i R - 3 7 6 c、m i R 4 5 3 2、m i R - 4 7 4 2、m i R - 5 8 2、m i R - 6 2 9、m i R - 2 2 3、m i R - 3 1 2 5、m i R - 3 6 7 7、m i R - 3 7 6 b、m i R - 4 4 4 9、m i R - 4 7 7 3、m i R - 4 7 8 7、m i R - 4 9 1、m i R - 4 9 5、m i R - 5 0 0 a、m i R - 5 4 8 a h、m i R - 5 5 0、m i R - 5 4 8 a h、m i R - 5 5 0 a、m i R - 5 5 1 n、m i R - 5 5 8 1、m i R - 6 1 6、若しくは図29で豊富であると示される任意のその他のマイクロR N A、及び/又は前述のものいずれかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%のパーセンテージ同一性を有するポリヌクレオチドからなる群から選択される1つ以上のマイクロR N A を含む。幾つかの実施形態では、治療用混合物は、m i R - 1 4 8 a、m i R - 1 4 8 - 5 p、m i R - 1 4 8 - 3 9、s r D M D、及び/又は前述のものいずれかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のパーセンテージ同一性を有するポリヌクレオチドの1つ以上を含む。幾つかの実施形態では、治療用混合物のマイクロR N A は、m i R - 1 4 8 a - 3 p、及び/又は前述のものいずれかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%のパーセンテージ同一性を有するポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、マイクロR N A は、m i R - 1 4 8 a - 3 p、及び/又は前述のものいずれかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%のパーセンテージ同一性を有するポリヌクレオチドを含む。様々な実施形態では、エキソソームは、D M D に由来する小さな非コードR N A であるs r D M D、及び/又は前述のいずれかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%のパーセンテージ同一性を有するポリヌクレオチドを含む。

## 【 0 0 3 6 】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示される方法は、C D C - X O から単離された非コードR N A を使用して遂行され得る。特定の理論に拘束されないが、非コードR N A は、マイクロR N A であると確認され指定された非コードR N A 遺伝子を含む、高度に特異的な核酸認識を必要とする調節性の役割に非常に適していると考えられている。幾つかの実施形態では、単離されたR N A ポリヌクレオチドは、m i R - 1 4 8 a、m i R - 1 4 8 - 5 p、m i R - 1 4 8 - 3 9、s r D M D、及び/又はm i R - 1 4 8 a、m i R - 1 4 8 - 5 p、m i R - 1 4 8 - 3 9 若しくはs r D M D に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のパーセンテージ同一性を有するポリヌクレオチドの1つ以上から選択される。幾つかの実施形態では、m i R - 1 4 8 a のヌクレオチド配列は以下の通りである：

5' G A G G C A A A G U U C U G A G A C A C U C C G A C U C U G A G U A U G A U A

G A A G U C A G U G C A C U A C A G A A C U U U G U C U C 3' (配列番号 1) ;  
 miR - 148 - 5 p のヌクレオチド配列は以下の通りである :  
 5' A A A G U U C U G A G A C A C U C C G A C U 3' (配列番号 2) ;  
 miR - 148 - 3 p のヌクレオチド配列は以下の通りである :  
 5' U C A G U G C A C U A C A G A A C U U U G U 3' (配列番号 3) ; 及び  
 srDMD のヌクレオチド配列は以下の通りである :  
 5' U G U A C A C A G A G G C U G A U C G A U U C U C C C U G A A C A G C C U A U  
 U A C G G A G G C A C U G C A G A U C A A G C C C G C C U G G A G A G G U G G A  
 G U U U C A A G A G U C C C U U C C U G G U U C A C C G U C U C C U U U 3' (配列  
 番号 4) 。

10

#### 【0037】

幾つかの実施形態では、CDC、CDC - XO、及び/又は CDC - MV の分子カーゴ  
 の1つ以上の単離された成分は、ウイルス又は非ウイルスのベクターを使用して細胞に送  
 達される。幾つかの実施形態では、ベクターはウイルスである。幾つかの実施形態では、  
 ウイルスはアデノウイルス又はアデノ随伴ウイルスである。

#### 【0038】

或る実施形態では、それを必要とする対象において、効果的に及び/又は安全にジス  
 トロフィン異常症を治療する前述の方法に従った、骨格筋ジストロフィー及び/又は異栄  
 養性心筋症の治療における使用のための miR - 148a、miR - 148 - 5 p、mi  
 R - 148 - 39、srDMD、及び/又は miR - 148a、miR - 148 - 5 p、  
 miR - 148 - 39 若しくは srDMD に対して少なくとも約 80%、85%、90%  
 、95%、96%、97%、98% 又は 99% のパーセンテージ同一性を有するポリヌク  
 レオチドを含む製剤又は組成物。幾つかの実施形態では、それを必要とする対象において  
 、効果的に及び/又は安全にジストロフィン異常症を治療する前述の方法に従って、骨格  
 筋ジストロフィー及び/又は異栄養性心筋症を治療するための上述の製剤及び/又は組成  
 物の使用が提供される。

20

#### 【0039】

幾つかの実施形態では、外植片へと培養され、外植片由来細胞へと更に培養され、更に  
 心筋球形成細胞として培養された後に心筋球細胞として培養され、そしてその後、XO 及  
 び EV が単離される CDC として培養された生検試料から CDC が生成される。幾つかの  
 実施形態では、CDC はヒトのものである。様々な実施形態では、CDC はジストロフィ  
 ン異常症に罹患した対象から得られた生検試料から生成される。幾つかの実施形態では、  
 約 24 時間の期間に亘り低酸素条件下 (例えば 2% O<sub>2</sub>) で CDC を培養する。幾つかの  
 実施形態では、無血清条件下で CDC を培養する。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0040】

【図1】図1 - 図1J。mdx 心臓への CDC の移植。mdx マウスへの CDC の移植によ  
 って改善された機能、生存率、抗酸化剤経路、炎症、ミトコンドリア機能不全、及びジス  
 トロフィン発現。図1A：ベースライン (10 カ月齢) 及び 3 カ月後の、注射に応答した  
 CDC 注射 mdx マウス (Mdx + CDC) 及びビヒクル注射 mdx マウス (Mdx + ビ  
 ヒクル) における駆出率 (EF) (CTL: n = 7; Mdx + ビヒクル及び Mdx + CDC  
 : それぞれ n = 12)。図1B：単回用量の CDC 又はビヒクルの投与から 3 週間後に  
 開始する毎週の高強度トレッドミル運動に供したマウスにおける運動能力 (CTL: n =  
 7; Mdx + ビヒクル及び Mdx + CDC: それぞれ n = 11)。異なる群の実験マウス  
 のに対しては、心臓及びトレッドミルの実験を別々に行った。図1C：図1Cと同じ動物  
 におけるカプラン・マイヤー分析は、ビヒクル処理 mdx マウスでは、CDC 治療 mdx  
 マウス又は野生型対照よりも生存率がより低いことを示す (p < 0.01、ログランク検  
 定); しかしながら、後者の 2 つの群は統計学的に同等であった。図1D：ビヒクル又は  
 CDC を投与した 3 週間後の mdx マウス心臓における Nr1h2 の免疫組織化学画像。年  
 齢適合野生型マウス (CTL) は、対照としての役割を果たした。心臓を炎症細胞マーカ

40

50



ーCD68、CD20及びCD3に対して染色する。黒矢印は、CD68<sup>+</sup>（上段）、CD20<sup>+</sup>（中段）及びCD3<sup>+</sup>（下段）の細胞を指す。図1E：ビヒクル又はCDCの投与から3週間後のmdxマウス心臓におけるマロンジアルデヒドタンパク質付加物（WT、n = 4；Mdx + ビヒクル、n = 6；及びMdx + CDC、n = 6）。図1F：リン酸化-Akt（Akt - p<sup>T308</sup>、Akt - p<sup>S473</sup>）、細胞質リン酸化-Nrf2（Nrf2 - p<sup>S40</sup>）、及び核Nrf2のタンパク質存在量のウエスタンブロット及びプールデータ。図1G：mdxマウス心臓における核p65、P-I B（NF- B経路）のタンパク質存在量のウエスタンブロット及びプールデータ。図1H：Nrf2下流遺伝子産物、ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）のタンパク質存在量のウエスタンブロット及びプールデータ。図1I：mdxマウス心臓におけるMCP1（単球走化性タンパク質1）のタンパク質存在量及び指定の炎症細胞の平均数を表すウエスタンブロット、プールデータ及び棒グラフ。図1J：ビヒクル又はCDCの投与の3週間後のmdxマウス心臓におけるNrf2免疫組織化学画像。プールデータは平均 ± SEMである；CM：心筋細胞；\* p < 0.05；# p < 0.005；† p < 0.05；‡ p < 0.002；スケールバー：10 µm。

10

【図2】図2A - 図2B。ミトコンドリア完全性の回復。図2A：ビヒクル又はCDCの投与の3週間後のmdxマウス心臓の透過型電子顕微鏡（TEM）画像。年齢適合WTマウスは対照としての役割を果たした。スケールバー：5 µm。ミトコンドリア構造は、体系化された構造物の明らかな回復を示した。図2B：WT及びビヒクル/CDC mdx心臓組織におけるミトコンドリア呼吸鎖サブユニットのウエスタンブロット及びプールデータ、並びに処理3週間後のCDC又はビヒクル処理mdxマウスの心臓から単離したミトコンドリアの酸素消費速度（OCR）（WT、n = 3；Mdx + ビヒクル及びMdx + CDC、それぞれn = 8）。示されている場合には、酸化リン酸化の基質（ピルビン酸、リンゴ酸及びADP）、選択的脱共役剤（FCCP）及び遮断剤（オリゴマイシン；アンチマイシン及びロテノン）を適用した。

20

【図3】図3A - 図3B。安定なコンピテントミトコンドリアによる再増殖。図3A：最初の損傷ミトコンドリアのターンオーバーの後、健康なミトコンドリアによる再増殖が続く。図3B：群間で存在するミトコンドリア数が同じであるTEM画像によるミトコンドリア数、及びmdx心臓組織における核ゲノム当たりのミトコンドリアDNAコピー数。

【図4】図4A - 図4B。心臓のコラーゲン含有量及び線維化の減少。図4A：心臓線維化の減少。野生型心臓、ビヒクル注射されたmdx心臓、及びCDC注射されたmdx心臓の代表的なマッソントリクローム画像、並びに形態計測分析のプールデータ。図4B：mdx心臓におけるCDC注射の3週間後の心筋の心臓コラーゲンIA1、IIIA1に関するウエスタンブロット及びプールデータ。データは平均 ± SEMである；† p < 0.05；# p < 0.05。

30

【図5】図5A - 図5B。心筋形成。mdxマウスにおけるCDC注射の3週間後の心筋形成の増強は、代表的な免疫組織化学画像及びプールデータから明らかである。図5A：免疫組織化学画像（Ki67及びAurora Bに対して染色された野生型、ビヒクル処理、CDC処理のmdxマウスの心臓；1群当たりn = 4 ~ 6）。矢印は、Ki67<sup>+</sup>（上段）及びAurora B<sup>+</sup>（下段）の心筋細胞を指す。図5B：Aurora B<sup>+</sup>及びKi67<sup>+</sup>の染色の形態計測分析に関するプールデータ。データは平均 ± SEMである；† p < 0.05；スケールバー：10 µm。

40

【図6】筋細胞喪失、線維化、酸化ストレス、炎症、ミトコンドリアの無効/喪失、アポトーシス、線維化等を含む、筋ジストロフィーの病態形成を解除する（unpinning）様々な機構の図。

【図7】図7A - 図7B。ジストロフィン発現の回復。図7A：ビヒクル又はCDC投与の3週間後のmdxマウス心臓における、ジストロフィンアイソフォーム：dp427、dp260、dp140、dpi16、dp71、dp40のタンパク質存在量に関する免疫組織化学画像、ウエスタンブロット及びプールデータ。mdx心臓におけるCDC注射は、全ての測定されたアイソフォームに対してジストロフィン発現の回復をもたらした

50

。図 7 B : 追加の代表図。

【図 8】筋ジストロフィーにおいて作用する病態生理学的機構、並びに筋細胞喪失、線維化、酸化ストレス、炎症、ミトコンドリアの無効/喪失、アポトーシス、線維化等を含む、CDC 及び CDC - XO によって動員される細胞機構の概要。

【図 9】図 9 A - 図 9 D。CDC - XO は、CDC の効果を総括 (recap) する。CDC - XO の心筋内注射は、コラーゲンを減少させて野生型とほぼ同じレベルにする。図 9 A : 心臓コラーゲン I A 及び I I I A に関するウェスタンプロット及プールデータ。細胞膜の染色及び描写のため WGA (コムギ胚芽凝集素) を適用した。図 9 B : Ki 6 7 及び Aurora B に対して染色した mdx マウス心臓による免疫組織化学画像及びプールデータ (野生型、 $n = 4$  ; 及び CDC - XO 処理及びビヒクル処理、それぞれ  $n = 6$  )

10

。矢印は、Ki 6 7 + (上段) 及び Aurora B + (下段) の心筋細胞を指す。図 9 C : ビヒクル、CDC 又は CDC - XO の投与の 3 週間後の mdx マウス心臓 ( $n = 4 \sim 6$  ) における、ジストロフィンアイソフォームのタンパク質 : dp 4 2 7、dp 2 6 0、dp 1 4 0、dpi 1 6、dp 7 1、dp 4 0 の存在量に関するウェスタンプロット及びプールデータ。図 9 D : mdx 心臓への CDC - XO の注射は、駆出率の段階的な減少を遅らせた ( $n = 1 1$  )。データは平均  $\pm$  SEM である ; \*  $p < 0 . 0 5$  ; †  $p < 0 . 0 2$  ; ‡  $p < 0 . 0 1$ 。スケールバー : 1 0  $\mu$  m

【図 1 0】図 1 0 A - 図 1 0 B。CDC 処理 mdx マウスにおける心臓機能及び運動能力の不均衡な増加。これは、CDC 自体、生着した CDC から分泌されたメディエータ (エキソソーム、EV、タンパク質等)、心臓セクレトームの調節及び/又は全身血行動態の改善に起因し得る。図 1 0 A : CDC 処理 mdx マウスにおける心臓機能の不均衡な増加。図 1 0 B : CDC 処理 mdx マウスにおける運動能力の不均衡な増加。

20

【図 1 1】図 1 1 A - 図 1 1 N。CDC - XO の心室内注射。CDC - XO 投与は同様の有益な結果を実証した。図 1 1 A : mdx マウスの心室内注射後の CDC - XO の全身生体内分布。CDC - XO を蛍光脂質染料で染色し、生物発光画像法を使用して 6 時間後に追跡した。図 1 1 B : CDC - XO は、CDC を反映するように遺伝子発現を調節した。図 1 1 C : 非処理 mdx マウス、又は心筋内 CDC 若しくは静脈内 CDC - XO 処理 mdx マウスの心臓に由来する遺伝子を使用する、次元階層的クラスタリング。非処理 mdx マウスにおいて対応する転写産物と少なくとも 2 倍の違いを有する遺伝子を含めた。図 1 1 D : CDC - XO 心室内注射により改善された駆出率。図 1 1 E : CDC - XO 心室内注射により改善された運動能力。図 1 1 F : 心筋内 CDC 注射又は心室内 CDC - XO 注射の 3 週間後の横隔膜における同じ遺伝子発現の倍率変化の相関。図 1 1 G : 非処理 mdx マウス、及び心筋内 CDC 又は心室内 CDC - XO 処理 mdx マウスの横隔膜に由来する遺伝子を使用する 2 次元階層的クラスタリング。非処理 mdx マウスの対応する遺伝子と少なくとも 2 倍の違いがある遺伝子を含めた。図 1 1 H : 心室内 CDC - XO 注射後 3 週間の横隔膜収縮特性。単収縮力及び比筋力の両方が心室内 CDC - XO 注射により改善した。図 1 1 I : 遺伝子発現の結果について示されるように、これらの結果をヒラメ筋において更に観察した。図 1 1 J : 次元階層的クラスタリング。図 1 1 K : 心室内 CDC - XO 注射の 3 週間後のヒラメ筋による収縮特性。単収縮力及び比筋力の両方が心室内 CDC - XO 注射により改善した。図 1 1 L : 心臓、図 1 1 M : 横隔膜、図 1 1 N : ヒラメ筋について示されるジストロフィンレベル。データは平均  $\pm$  SEM である ; \*  $p < 0 . 0 5$  ; †  $P < 0 . 0 5$ 。

30

40

【図 1 2】心室内 CDC - XO 注射後の生体内分布。図 1 2 は、mdx マウスにおける蛍光脂質染料によって染色された CDC - XO の分布を示す。

【図 1 3】図 1 3 A - 図 1 3 J。CDC - XO 筋肉注射は、筋成長、及び筋ジストロフィーの病態生理学的異常の逆転をもたらした。図 1 3 A : Myo D に対して染色したヒラメ筋 (野生型、ビヒクル処理及び CDC - XO 処理 mdx マウスのヒラメ筋) の H & E 及び免疫組織化学の画像。H & E 画像中の矢印は、直線的に配列された核 (左カラム) 及び筋線維 (右カラム) を示す。免疫組織化学では、直接的に配列された核は、Myo D (中カラム) に対して陽性であった。図 1 3 B 及び図 1 3 C : mdx ヒラメ筋 ( $n = 5 9$  ) にお

50

けるビヒクル及びCDC-XO注射の3週間後の筋線維サイズ及び筋芽細胞(Myod<sup>+</sup>)の数の度数分布。図13D~図13F:ヒラメ筋内のビヒクル及びCDC-XOの注射(n=4~6)後の3週間のmdxヒラメ筋における、図13D:Myod及びミオゲニン、図13E:IGF1受容体、並びに図13F:細胞質p-p65のタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプールデータ。図13G: CDC-XOマイクロRNAを筋形成の尺度として読む。図13H: mdxヒラメ筋(n=5~9)へのビヒクル及びCDC-XOの投与の3週間後のmdxヒラメ筋における代表的なマッソントリクローム画像及び形態測解析。図13I: ビヒクル及びCDC-XO(n=4~6)のヒラメ筋内注射の3週間後のmdxマウスヒラメ筋におけるジストロフィン免疫組織化学画像。年齢適合野生型のマウスは対照としての役割を果たした。ビヒクル及びCDC-XO(n=4~6)投与の3週間後のmdxマウスヒラメ筋におけるジストロフィンアイソフォームdp427のタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプールデータ。図13J: ヒラメ筋収縮特性のex vivo測定: mdxヒラメ筋へのビヒクル及びCDC-XO注射の3週間後の単収縮力及び絶対筋力。プールデータは平均±SEMである; \*p<0.05; †p<0.05; ‡p<0.002; スケールバー: 5µm(図13A、右カラム)、10µm(図13A、中央カラム)、50µm(図13A、左カラム)、200µm(図13H)、20µm(図13I)。

【図14】図14A-図14C。図14A: CDC-XO注射は、横隔膜の転写調節を調節することができた。図14B: CDC-XOによるプライミングの1週間後のヒトデュシェンヌ型心筋細胞(DMD CM)におけるジストロフィンアイソフォームのタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプールデータ。1Hzのバーストペーシング中に測定した正常及びDMD CMからのカルシウムトランジェント。デュシェンヌ心筋細胞を、評価1週間前にビヒクル(DMD CM)又はCDCエキソソーム(DMD CM+XO)でプライミングした。棒グラフは、カルシウムトランジェント交互脈(alternans)(心拍間隔のカルシウムトランジェント振幅の変動)及びピーク到達時間のものである。3週間後のmdxマウス心臓におけるジストロフィンアイソフォーム: dp427、dp260、dp140、dpi16、dp71、dp40のタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプールデータ。図14C: 酸素消費速度(OCR)測定1週間前にCDC-XO又は正常ヒト真皮線維芽細胞由来EV(NHDF-XO)でプライムしたDMD CMにおけるOCR。正常及び非処理DMD CMを並行して研究した。

【図15】CDC投与後の左室の拡張終期容積(LV EDV)及び収縮終期容量(LV ESV)。CDC移植は、プラセボと比較して、mdxマウスにおける第1及び第2(3カ月間隔)の注射後、3カ月間に亘ってLV EDV及びLV ESVの持続的な改善をもたらした。データは平均±SEMである; 各群n=12; #p<0.05。

【図16】移植の1週間後、2週間後及び3週間後の心臓におけるCDCのパーセンテージ生着。1週間のCDCのパーセンテージ生着は約8%であり、2週間で1%未満であった。3週間には、生存するCDCを検出することができなかった。各時間点でn=3。

【図17】図17A-図17D。CDC治療後3週間のmdx心臓転写プロトームの変化。図17A: ビヒクル治療とCDC治療のmdx心臓間の少なくとも2倍の差を伴う560個の遺伝子を使用する2次元階層的クラスタリング。各行はmdx心臓を表し、各列は遺伝子を表す。プローブセットシグナル値をmdx心臓の平均に対して正規化した。遺伝子発現の相対レベルを、上部に示されるスケールに従って、最低(緑)から最高(赤)まで表す。図17B: ミトコンドリア完全性、図17C: 酸化ストレス、及び図17D: 炎症を含む、目的の様々な経路に関連する遺伝子の転写産物の倍率変化の例をここにプロットする。

【図18】タンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプールデータ。ビヒクル又はCDC投与後3週間のmdxマウス心臓におけるカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2(SOD-2)、及びグルタメートシステインリガーゼ(GCLC)の触媒サブユニットを含む測定。

10

20

30

40

50

【図 19】差次的に発現された遺伝子の IPA 解析。CDC 又はビヒクルで処理された md x マウス心臓の炎症に関与する遺伝子を表し、CDC 治療後 3 週間の md x 心臓における炎症細胞遊走の減少が付随する炎症反応の阻害を示す。青色は機能 / 応答の阻害を表し、赤色及び緑色はそれぞれアップレギュレーション及びダウンレギュレーションを表す。

【図 20】図 20 A - 図 20 C。免疫組織化学画像。図 20 A：ビヒクル処理 md x マウス、図 20 B：CDC 処理 md x マウス、及び図 20 C：対照としての野生型心臓を含む、炎症細胞マーカー CD 3 に対して染色された md x 心臓を、四角で囲んだ領域の拡大図と共に表す。

【図 21】図 21 A - 図 21 B。ミトコンドリア。図 21 A：TEM 像によるミトコンドリアの数。図 21 B：治療後 3 週間の心臓組織における核ゲノム当たりのミトコンドリア DNA コピー数。

10

【図 22】XO 解析。超遠心分離によって得られた単離された XO を、Nano S i g h t NS 300 システム（英国の Nano S i g h t L t d）を使用する、ナノ粒子追跡によって分析した。動画を収集し、最小予想粒子サイズ、最小トラック長及びぼかしの設定を全て自動に設定して、NTA ソフトウェア（バージョン 2.3）を使用して分析した。カメラシャッタースピードを 30.01 ミリ秒に固定し、カメラゲインを 500 に設定した。カメラ感度及び検出閾値をそれぞれほぼ最大（15 又は 16）及び最小（3 又は 4）に設定して、小粒子を表示させた。周囲温度を手動で記録したところ、24 ~ 27 の範囲であった。各サンプルについて、記録間に 10 秒間の遅延を入れた 60 秒間のビデオを 5 回記録して、5 つのリプリケートヒストグラムを作製し、これを平均化した。サイズ / 濃度を示す代表的な 5 つのリプリケートヒストグラム。5 つのレプリケートで計算した平均濃度の標準誤差を赤色で示す。

20

【図 23】CDC - XO 投与後の LV 拡張終期容積（LV EDV）及び LV 収縮終期容積（LV ESV）。CDC - XO 移植は、プラセボに比べて、md x マウスにおける第 1 及び第 2（3 カ月間隔）の両方の注射後 3 カ月の間、LV EDV 及び LV ESV の持続的な改善をもたらした。データは平均 ± SEM である；1 群当たり n = 11；# p < 0.05。

【図 24】免疫グロブリン血清レベル。md x マウスにおける、マウス CDC、ヒト CDC - XO 及びビヒクルの第 1 の注射後 6 カ月及び反復注射後 3 カ月の Ig G 血清レベル。循環抗ドナー Ig G 抗体をフローサイトメトリーによってスクリーニングした。

30

【図 25】XO のクラスリン依存性心筋取り込み。クロルプロマジン（CPZ）前処理をした又は前処理のない md x マウス心臓における心筋内注射された CDC - XO の分布。CPZ はクラスリン依存性取り込みの阻害剤である。蛍光標識化 XO（Xenolight DiR、5 μM、一晚インキュベーション；マサチューセッツ州ホプキントンの Caliper Life Sciences）を md x マウス心尖に心筋内注射し；6 時間後、心臓を採取して、固定し、XO 分布の評価のため切片を作製した。各心臓の心尖領域（3 個の切片；50 μm 間隔）、中央領域（4 個の切片；50 μm 間隔）及び心底領域（3 個の切片；50 μm 間隔）から無作為に選択した 10 個の各切片から細胞を 10 視野で心筋細胞内 XO を計数することにより、心筋細胞の内部の標識化 XO の平均数（筋節性アクチニン [緑] 及び DAPI [青] について共染色することにより検証された）を計算した。心筋細胞の内部の蛍光標識化 XO の存在は、エンドサイトーシスによる取り込みの尺度であり；CPZ による前処理（50 μg / g、i.p. 単回用量、XO 注射前の 1 時間）は、XO の細胞内の存在の顕著な減少をもたらし、特に md x 心筋細胞における CDC - XO の内部移行におけるクラスリン媒介取り込みの関与を示した。棒グラフは、CPZ が投与された及び投与されていない心筋細胞の内部の標識化 XO（紫）の数を表し、1 つの高倍率視野（HPF）当たりの心筋細胞の総数で割った心筋内の標識化 XO の数として表される。矢印は蛍光標識化エキソソームを指す。プールデータは平均 ± SEM である；† p < 0.001。

40

【図 26】収縮特性。心筋内 CDC 注射後の長指伸筋（EDL）収縮特性を表す：md x 心臓の CDC / ビヒクル治療後 3 週間の ELD の収縮特性、絶対単収縮力及び最大強縮力

50

の *in situ* 測定。

【図 27】差次的に発現された遺伝子の IPA 解析。CDC 又はビヒクルで心筋内処理された *mdx* マウスの肝臓の炎症に関与する遺伝子を表し、心筋内 CDC 注射後 3 週間の *mdx* 肝臓における NF- $\kappa$ B 炎症経路の阻害を示す。青色は機能 / 応答の阻害を表し、赤色及び緑色はそれぞれアップレギュレーション及びダウンレギュレーションを表す。

【図 28】酸素正常条件下で成長させた CDC に由来する XO と比べた、低酸素培養した CDC に由来する XO におけるミトコンドリア関連マイクロ RNA の倍率変化。- 6 ~ 6 倍の  $\log_2$  倍率変化 (230 個のマイクロ RNA) を示すマイクロ RNA を使用する 2 - 次元階層的クラスタリングを表す。マイクロ RNA の相対的な  $\log_2$  倍率変化は、上部に示されるスケールによれば、最低 (赤 (底部)、- 6) から最高 (緑 (上部)、+ 6) まで表される。各行は XO 調製物を表し、各列はマイクロ RNA 種を表す。低酸素 XO で検出された 389 個のマイクロ RNA のうち、248 個が以前にミトコンドリア関連マイクロ RNA であると報告されている。

10

【図 29】異なる培養状態下でのマイクロ RNA の倍率変化。正常酸素馴化培地から単離した CDC - XO と比較した、低酸素順化培地 (2% O<sub>2</sub>) から単離した CDC - XO の特性を表す：10 超かつ - 20 未満の倍率変化を含んだ。XO から抽出した低分子 RNA の miRNA 配列ライブラリー調製のため、NEB Next Small RNA Library Pre kit (マサチューセッツ州イプスウィッチの New England Bio Labs) を使用した。miRNeasy Serum/Plasma Kit (メリーランド州ジャーマンタウンの QIAGEN) を使用して、XO から RNA を抽出した。

20

【図 30】図 30A - 図 30B。CDC - XO 及び miR - 148 投与後の生理学的特性。図 30A：*mdx* マウスにおけるベースライン及び CDC - XO 及び NHDF - XO の心筋内注射の 3 週間後の LV 駆出率。図 30B：*mdx* マウスにおけるベースライン及び miR - 148 及びマイクロ RNA 模倣対照の心筋内注射の 3 週間後の LV 駆出率。データは平均  $\pm$  SEM である；1 群当たり *n* = 5。

【図 31】図 31A - 図 31B。*mdx* 心臓におけるジストロフィン発現の加齢性変化。図 31A：若年 (8 週) 及び高齢 (10 カ月) の *mdx* 心臓におけるジストロフィン発現。図 31B：第 1 の心筋内 CDC 注射の 3 週間後及び 3 カ月後、並びに心筋への第 2 の (反復) CDC 注射の 3 カ月後の野生型対照マウス心臓及び *mdx* マウス心臓におけるジストロフィンタンパク質のウエスタンブロット。全ての心臓はベースラインで 10 カ月齢のものであった。CS：クエン酸シンターゼ。

30

【図 32】図 32A - 図 32D。心臓以外の兆候 CDC 又は CDC - XO 注射。図 32A：心筋内 CDC 注射の 3 週間後の *mdx* 肝臓における NF- $\kappa$ B 炎症性経路の阻害を示す、CDC 又はビヒクルを心筋内に注入された *mdx* マウスの肝臓における炎症に関与する差次的に発現された遺伝子の本発明の経路分析。青色は機能 / 応答の阻害を表し、赤色及び緑色はそれぞれアップレギュレーション及びダウンレギュレーションを表す。図 32B：染色したヒト CDC - XO の全身注射後の *mdx* マウス器官の生物発光画像法。*mdx* マウスの左心室腔への XO の全身注射の 6 時間後に指定される臓器を解剖し、IVI-S 分子イメージングシステム (米国マサチューセッツ州ホプキントンの Caliper Life Sciences) を使用して画像化した。図 32C：第 1 の心室内 CDC - XO 注射後 1 週間、3 週間及び 3 カ月、並びに第 2 の (反復) CDC - XO 注射後 3 カ月の野生型マウス心臓及び *mdx* マウス心臓におけるジストロフィンタンパク質のウエスタンブロット。図 32D：心室内注射による CDC - XO 全身送達後の 3 週間後の野生型対照及び *mdx* マウスの心臓、視床下部、横隔膜、ヒラメ筋、前脛骨筋及び長指伸筋におけるジストロフィンのタンパク質含有量を示すウエスタンブロット。CS：クエン酸シンターゼローディング対照。ジストロフィン発現は EDL では明らかではないが、心筋内 CDC 注射後に EDL において収縮力が増加され、ジストロフィン再発現が骨格筋における唯一の有益な機構ではない可能性があることを示唆した。

40

【図 33】ジストロフィン発現及びその結果。XO におけるジストロフィンの欠如。ジストロフィン探査のため野生型心臓溶解物を陽性対照として使用した。

50

【図34】図34A - 図34D。ここで研究されたXOの生体活性が、特性評価されたエキソソームに起因し得ることの検証。エキソソームを線形のイオジキサノール密度勾配で浮遊させ（これは、透過型電子顕微鏡（TEM）によって小胞、及びタンパク質の存在を実証した）、生物学的作用が関連する小胞であることを示した。図34A：線形イオジキサノール密度勾配によって精製して（Exo1、左）及精製せずに（Exo2、右）連続遠心分離されたエキソソームのTEM像は、いずれの状態でも小胞を示す。小胞はサイズ及び形態学が可変であり、先の研究と一致する。図34B：エキソソームのキータンパク質（key protein）の特徴に関して、溶解されたエキソソーム：CD63、CD81及びTSGに対するウエスタンブロット。図34C、図34D：Exo1及びExo2の生物活性を、mdxヒラメ筋への注射、及び注射の3週間後のmdxヒラメ筋トランスクリプトームの評価によって比較した。図34C：Exo1及びExo2注射の3週間後のmdxヒラメ筋トランスクリプトームの変化。mdxヒラメ筋におけるビヒクル/Exo1及びビヒクル/Exo2の間の少なくとも2倍の差を有する332個の遺伝子を使用する2次元の階層的クラスタリング。図34D：mdxヒラメ筋におけるExo1及びExo2注射の3週間後の同じ遺伝子の発現の倍率変化の相関。Exo1及びExo2の効果の類似性は、デフォルトプロトコルによって単離した小胞の生物活性は真にエキソソームに起因し、超遠心分離によって同時精製された可能性のあるその他の種類の小胞に起因するものではないという概念を支持する。スケールバー：50  $\mu$ m（Exo1）；100 nm（Exo2）。

10

【図35】図35A - 図35C。mdx心臓へのmiR-148a-3p及びsrDMDの移植。図35A：srDMDの明らかな二次構造の描写と共に、酸素正常状態の順化培地（n=2）から単離したCDC-XOと比較した、低酸素順化培地（2%O<sub>2</sub>）から単離したCDC-XOにおけるmiR-148a-3p及びsrDMDの差次的発現。図35B：ビヒクル、CDC、CDC-XO（n=4~6）、miR-148a-3p又はsrDMDの心筋内注射の3週間後のmdxマウス心臓における、ジストロフィンアイソフォーム：dp427、dp260、dp140、dpi16、dp71、dp40のタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプルデータ。図35C：ビヒクル、CDC、CDC-XO（n=4~6）、miR-148a-3p及びsrDMDの心筋内注射の3週間後のmdxマウス心臓における、ジストロフィンアイソフォーム：dp427、dp260、dp140、dpi16、dp71、dp40のタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプルデータ。

20

30

【図36】図36A - 図36B。エクソスキッピング/選択的スプライシングの排除。図36A：miR-148aはNF- $\kappa$ B及びリン酸化-Aktの両方のレベルの減少をもたらす。図36B：ジストロフィンのエクソン23に隣接するプライマーを使用するRT-PCR。ビヒクル、miR-148a-3p及びsrDMDで処理したマウス（n=4~6）に由来するmdx心臓において発現されたジストロフィンのエクソン23封入を評価するため使用した。ビヒクル、miR-148a-3p又はsrDMDで治療したmdx心臓に由来するジストロフィンに対するRNA-seqデータのSashimi plotは、エクソン23に及ぶジャンクションリード（junction read）を表さない。データは全て平均 $\pm$ SEMである；tp<0.03。

40

【図37】図37A - 図37B。ジストロフィンのウエスタンブロット検出。図37A：野生型マウス心臓及びsrDMDの心筋内注射の3週間後のsrDMD処理mdxマウスにおけるジストロフィンのタンパク質含有量を表すウエスタンブロット。図37B：ジストロフィン遺伝子のエクソン23における点突然変異又はジストロフィン遺伝子のエクソン50の欠失があるデュアルレポーターコンストラクトを用いてトランスフェクトされたHEK293NT細胞におけるCDC-XO、miR-148a-3p又はsrDMDによる処理後のビヒクル（PBS）と比べたジストロフィン/eGFP発現のパーセンテージ増加。

【図38】図38A - 図38B。ジストロフィン発現及びその結果。図38A：ベースライン及びmdxマウスにおけるmiR-148a-3p又はマイクロRNA模倣対照の心

50

筋内注射の3週間後の駆出率。参照のため野生型EF値を示す；1群当たり $n = 5$ 。図38B：野生型マウス心臓、及び心筋内注射の3週間後のピヒクル、変異体srDMD又はsrDMDを注射したmdxマウス心臓におけるジストロフィンタンパク質含有量を表すウエスタンブロット。

【図39】図39A - 図39B。図39A：哺乳動物発現ベクターにクローニングした合成DNAコンストラクトのプラスミドマップ。全長ヒトジストロフィンを野生型、又は2つの変異体：エクソン23中のUAAの中途終止コドン（PTC）、又はエクソン50欠失（エクソン50）のうちの1つとしてORFにクローニングした。コンストラクトは、緑色蛍光をジストロフィン発現のレポーターとみなすことができるように、eGFPを含むインフレームで全長ジストロフィンの融合タンパク質を作製する。トランスフェクション効率に対して正規化するため恒常的ルシフェラーゼ発現（SV40プロモータによって独立して駆動される）を使用した。図39B：全長（WT）、PTC又はエクソン50コンストラクトでトランスフェクトしたHEK-293NT細胞のジストロフィン/eGFP発現。総細胞溶解物の蛍光及び発光を96ウェル分光光度計においてウェルベースで定量し；また、各ウェルにおける蛍光を、同様の播種密度及び溶解体積のトランスフェクトされていない細胞を用いて定量した。

【図40】図40A - 図40D。10カ月齢～12カ月齢のmdxマウスを以下の通り処理した：大腿静脈への静脈注射による、単回用量のピヒクル（mdx）、 $2.5 \times 10^5$ 個の同系CDC、又は $2.0 \times 10^9$ 個のヒトCDC-エキソソーム（CDC-XO）。図40Aは、治療前（ベースライン）及び治療の3週間後の最大運動能力（1群当たり $n = 8 \sim 10$ ）を示し、図40Bは、治療前（ベースライン）及び治療の3週間後のin vivo心臓駆出率1群当たり $n = 6 \sim 8$ ）を示す。図40Cは、ピヒクル（上段パネル）、CDC（中段パネル）、又はXO（下段パネル）で処理したmdxマウスのマッソントリクローム顕微鏡写真を示す。図40Dは、心臓線維化（1群当たり $n = 5 \sim 6$ ）のマーカーとして赤色染色（細胞質）に対し、青色染色（コラーゲン）の区域を分析するプールデータを示す。データを平均 $\pm$ SEMとして表す。\*は、ピヒクル治療とは統計学的に差があることを示す。統計的有意差を $P < 0.05$ に設定した。

【図41】図41A - 図41D。図40に記載されるように、動物を処理した。図41Aは、RNAシーケンシングデータによる心臓の全トランスクリプトーム解析を示す。 $P < 0.05$ を伴う2以上倍の変化で転写産物が差次的に発現したとみなし、パネルAにおいてヒートマップで表した。mdx列を年齢適合性野生型マウス心臓と比較したのに対し、CDC及びXOの列をそれぞれmdxマウス心臓と比較した。図41Bは、野生型（WT）、ピヒクル（mdx）、CDC又はXOで処理したマウスにおけるリン酸化NF- $\kappa$ Bタンパク質レベルを探索した代表的なウエスタンブロット及びプールデータを示す。図41Cは、図41Dのmdx、CDC又はXOで処理した心臓からのCD68の免疫蛍光画像（1群当たり $n = 3$ ）によるプールデータを示す。データは平均 $\pm$ SEMとして表される。\*はピヒクル治療とは統計学的に差があることを示す。統計的有意差を $P < 0.05$ に設定した。

【図42】図42A - 図42D。図40に記載されるように動物を処理した。図42A。WT、mdx、CDC又はXOで処理した心臓によるミトコンドリアの電子伝達経複合体（1群当たり $n = 6$ ）のウエスタンブロット分析によるプールデータ。図42B。WT、mdx、CDC又はXOで処理した心臓におけるタンパク質-カルボニル付加物形成（1群当たり $n = 8 \sim 10$ ）。図42C。Ki-67の免疫蛍光画像（1群当たり $n = 3$ ）によるプールデータ。図42D。mdx、CDC又はXOで治療した心臓による。データは平均 $\pm$ SEMとして表される。\*はピヒクル治療とは統計学的に差があることを示す。統計的有意差を $P < 0.05$ に設定した。

【図43】図43A - 図43F。図40に記載されるように、動物を処理した。図43A。WT（円）、mdx（正方形）、CDC（上向き三角形）又はXO（下向き三角形）によるヒラメ筋（1群当たり $n = 5 \sim 8$ ）の力-収縮頻度関係。WT、mdx、CDC又はXOで処理したマウスによるヒラメ筋によって発生した図43B単収縮力及び図43C強

縮力。図 4 3 D。WT (円)、mdx (正方形)、CDC (上向き三角形) 又は CDC - XO (下向き三角形) による横隔膜 (1 群当たり  $n = 5 \sim 6$ ) の力 - 収縮頻度関係。WT、mdx、CDC 又は CDC - XO で治療したマウスによる横隔膜によって発生した図 4 3 E 単収縮力及び図 4 3 F 強縮力。図 4 3 G。mdx (左パネル)、CDC (中央パネル) 又は CDC - XO (右パネル) で処理したマウスのマッソントリクローム顕微鏡写真。図 4 3 H。ヒラメ筋 (1 群当たり  $n = 5 \sim 6$ ) における骨格筋線維化のマーカーとしての赤色染色 (細胞質) に対する青色染色 (コラーゲン) の面積を分析するプルデータ。図 4 3 I。ヒラメ筋 (1 群当たり  $n = 5 \sim 6$ ) の全筋切片当たりの筋線維の数の定量。データを平均  $\pm$  SEM として表す。\* はビヒクル治療とは統計学的に差があることを示す。統計的有意差を  $P < 0.05$  に設定した。

10

【図 4 4】図 4 4 A - 図 4 4 D。図 4 0 に記載されるように、動物を処理した。図 4 4 A。RNA シーケンシングデータによる心臓の全トランスクリプトーム解析。 $P < 0.05$  の 2 以上倍の変化で転写産物が差次的に発現したとみなし、パネル A においてヒートマップで表した。mdx 列を年齢適合性野生型マウスヒラメ筋と比較したのに対し、CDC 及び XO の列をそれぞれ mdx マウスヒラメ筋と比較した。図 4 4 B。CDC - XO で処理したヒラメ筋の Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 解析。列挙される経路は、mdx ヒラメ筋と比べてアップレギュレートされているとみなされ、多くは炎症に関与する。CDC 及び CDC - XO 処理によってヒラメ筋において変更された図 4 4 C の TNF 及び図 4 4 D の NF- $\kappa$ B のシグナル伝達に関与することが知られている遺伝子の倍率変化。

20

【図 4 5】図 4 5 A - 図 4 5 C。図 4 0 に記載されるように動物を処理した。図 4 5 A。野生型 (WT)、ビヒクル (mdx)、CDC 又は CDC - XO で処理したマウスによるヒラメ筋におけるリン酸化 NF- $\kappa$ B タンパク質レベル (1 群当たり  $n = 3$ ) を探査する代表的なウエスタンブロット及びプルデータ。図 4 5 B。CD68 免疫蛍光画像 (1 群当たり  $n = 3$ ) によるプルデータ。図 4 5 C、mdx、CDC、又は CDC - XO で処理した心臓による。データを平均  $\pm$  SEM として表す。\* はビヒクル治療とは統計学的に差があることを示す。統計的有意差を  $P < 0.05$  に設定した。

【図 4 6】図 4 6 A - 図 4 6 B。図 4 0 に記載されるように、動物を処理した。ビヒクル (mdx)、CDC、GW4869 で処理した CDC、及び CDC - XO で処理したマウスによる図 4 6 A ヒラメ筋及び図 4 6 B 横隔膜における全長ジストロフィンを探査するウエスタンブロット。左の 2 列は、WT ジストロフィンの相対レベルを表す (例えば 5 % 及び 1 %)。

30

【図 4 7】図 4 7 は、DMD マウスモデル (mdx マウス) を使用して運動能力を改善するため、CDC の静脈内投与の用量を拡大する有効性を評価するために使用した概要プロトコルを表し、ここで、mdx マウスは、0 週に治療又は対照ビヒクルを投与され、週 1 回運動し、6 週に 殺された。

【図 4 8】図 4 8 A - 図 4 8 B。48 A 及び図 4 8 B は、75000 個、150000 個又は 250000 個 (図中、「75K」、「150K」及び「250K」と称される) の CDC 対リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 対照を注入した mdx マウスの運動能力に対する CDC の静脈内 (IV) 投与の効果をグラフで示す。

40

【図 4 9】図 4 9 は、75K ~ 250K CDC 対 PBS 対照で注射したマウスの横隔膜筋肉機能に対する CDC の頸部 IV 投与の効果をグラフで示す。

【図 5 0】図 5 0 A - 図 5 0 B。図 5 0 A 及び図 5 0 B は、37K ~ 150K CDC 対 PBS 対照を注射した mdx マウスの体重に対する CDC の頸部 IV 投与の効果をグラフで示す。

【図 5 1】図 5 1 は、本明細書に開示される幾つかの実施形態に従って投与された CDC が、mdx マウスの心臓の線維化を減少することを示す (線維化の指標であるコラーゲン染色が示される)。

【図 5 2 A】図 5 2 A は、心エコー検査を使用して、心臓駆出率に対する CDC 処理の効果を評価するため使用された概要プロトコルを表す。

50



【図52B】図52Bは、150K CDC対PBS対照を注射したmd x マウスの心臓駆出率に対するCDCの頸部IV投与の効果をグラフで示す。

【図53】図53は、PBSの対照に対して、頸部IV注射により150K CDC、又は大腿部IV注射により250K CDCを注射したmd x マウスの心臓組織切片のマッソントリクローム染色を表す。

【図54】図54は、全身注射による300KのCDC（大腿IV注射又は右心室への注射による100KのCDC）、対心筋内注射による100KのCDC、対PBS対照による心筋梗塞のマウスモデルにおける心臓（左心室）駆出率に対するIV投与の効果をグラフで示す。

【図55A】図55Aは、精製ヒトCDCのDNAに対して行われたqPCRを検証したことをグラフで示す。

10

【図55B】図55Bは、試験される各組織について調製されたマウス組織DNAにスパイクされたヒトCDC DNAの標準曲線をグラフで示す。

【図56A】図56Aは、ヒトAlu配列qPCR法による、頸静脈投与後の野生型（WT）マウスにおけるヒトCDCの生体内分布を判定するための概要プロトコルを表す。

【図56B】図56Bは、肺、肝臓、血液、心臓、ヒラメ筋、横隔膜及び脾臓の組織における、頸静脈注射後10分及び24時間のWTマウスにおけるヒトCDCの生体内分布をグラフで示す。

【図57A】図57Aは、mヒトAlu配列qPCR法による、頸静脈投与後の重症複合免疫不全症（SCID）マウスにおけるヒトCDCの生体内分布及びクリアランスを判定するための概要プロトコルを表す。

20

【図57B】図57Bは、肺組織において、頸静脈注射後の24時間、1週間及び3週間のSCIDマウスにおけるヒトCDCの生体内分布を示す。

【図57C】図57Cは、肝臓、血液、心臓、ヒラメ筋、横隔膜、脾臓及び精巣の組織における、頸静脈注射後、24時間、1週間、3週間のSCIDマウスにおけるヒトCDCの生体内分布をグラフで示す。

【図58】図58は、ブタ急性心筋梗塞モデルにおける高用量のCDCの安全性を評価するための組織病理学的解析用の肺サンプル収集を概略的に説明する。

【図59】図59は、5000万個、1億個又は2億個（それぞれ「50M」、「100M」又は「200M」）のCDCで治療したブタにおける血清トロポニンI（TnI）レベルの変化をグラフで示す。

30

【図60】図60は、5000万個、1億個又は2億個のCDCで処理したブタにおける平均リスク面積（AAR）を示す。

【図61】図61は、5000万個、1億個又は2億個CDCで処理したブタの心筋血管閉塞（MVO）を示す、ノーリフロー（no reflow）（非染色）とリスク面積の平均比をグラフで示す。

【図62】図62は、5000万個、1億個又は2億個CDCで処理したブタにおいて癒痕サイズを示す、トリフェニルテトラゾリウムクロリド（TTC）染色とリスク面積の平均比をグラフで示す。

【図63】図63は、5000万個、1億個又は2億個のCDCで処理したブタにおいて、処理又は非処理の動物について計算したEFをグラフで示す。

40

【図64】図64は、定常状態のCDCによるT及びナチュラルキラー（NK）免疫応答に関連する免疫分子の発現をグラフで示す。陽性細胞のパーセンテージ及び幾何平均蛍光強度を示す。

【図65】図65は、目的に合わせたMLR培養の代表的な画像を示す。

【図66】図66は、CDCによるT細胞の活性化をグラフで示す。3名の異なるPBM C（ドナーA、C及びD）に由来するCD4+（黒）及びCD8+（白）T細胞による、CD69（左パネル）及びHLA-DR（右パネル）の発現。結果は3回反復の平均値±SDである。\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001。

50

【図 6 7】図 6 7 A - 図 6 7 C。C D C に応答した未分画 P B M C に由来する T 細胞の増殖をグラフで示す。図 6 7 A は、代表的等ットプロット（ドナー A による）を示す。図 6 7 B は、3 名の異なる P B M C ドナーに由来する T 細胞の増殖を示す。図 6 7 C は、3 名の異なるドナーに由来する T 細胞の増殖を示す。図 6 7 B について、結果は、3 回反復による平均値  $\pm$  S D である。図 6 7 C について、結果は、それぞれ 3 回反復で 3 名の異なるドナーから得られた平均値  $\pm$  S D である。

【図 6 8】図 6 8 は、C D C に応答した精製 T 細胞の活性化及び増殖をグラフで示す。結果は、各ドナー（上段及び中段のパネル）に対する応答（2 回反復）から得られた平均値  $\pm$  S D であり、及びそれぞれ 3 回反復して両方のドナーから得られた平均値  $\pm$  S D である（下段パネル）。

10

【図 6 9】図 6 9 は、C D C によるフィトヘマグルチニン（P H A）誘導性 T 細胞増殖の免疫調節を示す。代表的な培養物及びヒストグラム（上段）、並びに 3 回反復してそれぞれ行われた 3 名の異なるドナーによる平均パーセンテージ  $\pm$  S D として提示される結果。

【図 7 0】図 7 0 は、P H A 誘導性 C D 6 9 及び H L A - D R 発現の調節、並びに C D C による P H A 誘導性 T 細胞増殖をグラフで示す。各ドナーに関する結果を、3 回反復して得られた平均値  $\pm$  S D として提示する。下段パネルは、活性化マーカー発現の減少（C D 6 9）又は増加（H L A - D R）の平均値  $\pm$  S D（左及び中間のパネル）、並びにそれぞれ 3 回反復して行われた両方のドナーから得られた増殖阻害のパーセンテージを提示する。

【図 7 1】図 7 1 は、認識されたエキソソームマーカーの C D C - E V の含有量を示すウエスタンブロットである。

20

【図 7 2】図 7 2 は、C D C - E V に対する T 及びナチュラルキラー（N K）免疫応答に関与する免疫分子の発現をグラフで示す。

【図 7 3】図 7 3 A - 図 7 3 B。C D C 及び C D C - E V による T 細胞の活性化を示す。図 7 3 A は、目的に合わせた M L R 培養の代表的な画像を示す。図 7 3 B は、C D 4 <sup>+</sup> 及び C D 8 <sup>+</sup> T 細胞による C D 6 9 及び H L A D R の発現を示す。

【図 7 4】図 7 4 A - 図 7 4 B。C D C 及び E V に応答した T 細胞の増殖をグラフで示す。図 7 4 A は、代表的等ットプロットを示す。図 7 4 B は、3 回反復による平均値  $\pm$  S D として提示される 3 名の異なるドナーに由来する T 細胞の増殖を示す。

【図 7 5】図 7 5 は、C D C 及び C D C - E V に応答した精製 T 細胞活性化及び増殖をグラフで示す。結果は、2 名の異なるドナーによる応答（2 回反復）から得られた平均値  $\pm$  S D として提示される。

30

【図 7 6】図 7 6 は、E V の存在下及び不在下での I D C 培養、並びに関連する免疫分子の発現（下段パネル）を示す。

【図 7 7】図 7 7 は、i D C によって提示される C D C - E V による精製 T 細胞の活性化及び増殖をグラフで示す。結果は 3 回反復による平均値  $\pm$  として提示される。

【図 7 8】図 7 8 は、E V の存在下及び不在下での m D C 培養（上段パネル）並びに関連する免疫分子の発現（下段パネル）を示す。

【図 7 9】図 7 9 は、m D C 及び m D C - E V による精製 T 細胞の活性化及び増殖をグラフで示す。結果は 3 回反復による平均値  $\pm$  として提示される。

【図 8 0】図 8 0 は、C D C 及び C D C - E V による P H A 誘導性 T 細胞増殖の免疫調節を示す。結果は、それぞれ 3 回反復して行われた 3 名のドナーによる平均パーセンテージ値  $\pm$  S E M である。

40

【図 8 1】図 8 1 は、P H A 誘導性 C D 6 9 のダウンレギュレーション及び / 又は C D C 及び C D C - E V による H L A - D R 発現をグラフで示す。結果は 3 回反復による平均パーセンテージ値  $\pm$  S E M である。

【図 8 2】図 8 2 は、C D C 及び C D C - E V が P H A 誘導性 T 細胞増殖をダウンレギュレートすることをグラフで示す。3 回反復による平均値  $\pm$  S D である。

【図 8 3】図 8 3 は、C D C 及び C D C - E V による P H A 誘導性 C D 4 <sup>+</sup> 及び C D 8 <sup>+</sup> T 細胞の増殖の免疫調節をグラフで示す。結果は、それぞれ 3 回反復して行われた 2 名のドナーによる平均パーセンテージ値  $\pm$  S E M である。

50

【図 8 4 A】図 8 4 A は、同系 C D C ( C 5 7 B L / 1 0 マウスに由来 ) 又は P B S 対照の複数回の投与による運動能力のベースラインからの変化のグラフ式表示である。

【図 8 4 B】図 8 4 B は、同種 C D C ( C 3 H マウスに由来 ) 又は P B S 対照の複数回の投与後の運動能力のベースラインからの変化のグラフ式表示である。

【図 8 4 C】図 8 4 C は、図 8 4 A と図 8 4 B を 1 つに合わせたグラフである。

【図 8 5 A】図 8 5 A は、同種 C D C ( C 3 H マウス由来 )、ステロイド及び / 又は P B S ビヒクルの 2 回の投与による運動能力のベースラインからの変化のグラフ表示である。

【図 8 5 B】図 8 5 B は、様々な遺伝子マーカーに陽性細胞のパーセントのグラフである。

【図 8 5 C】図 8 5 C は、I g G 抗体の量を示すグラフである。

【図 8 6】図 8 6 は、C D C の投与に応答した ( P B S と比較される ) 抗体産生の評価に関するデータを示す。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 1 】

発明の詳細な説明

【 0 0 4 2 】

本明細書に開示される幾つかの実施形態は、C D C、C D C - X O、C D C - E V、C D C の単離された分子カーゴ (例えば、C D C、C D C - X O、及び / 又は C D C - E V に由来する個々の分子又は分子の組み合わせ) ; 及び / 又は前述の組み合わせを使用して、疾患、疾患状態、及び / 又は疾患の症状を治療する方法に関する。幾つかの実施形態では、疾患はジストロフィン異常症である。幾つかの実施形態では、疾患状態は異栄養性障害である。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー ( D M D ) 及び / 又はベッカー型筋ジストロフィーのうちの 1 つ以上を含む。幾つかの実施形態では、疾患状態はミオパチーである。幾つかの実施形態では、ミオパチーは骨格筋ミオパチーである。幾つかの実施形態では、この方法は、治療有効量の C D C、C D C - X O、C D C - E V、C D C - X O 又は C D C - E V の分子カーゴ及び / 又は前述の組み合わせを、疾患を患っている対象 (例えば患者) に投与することにより、疾患及び / 又はその症状を治療することを含む。本明細書で提供される方法及び組成物の幾つかの実施形態は、とりわけ、m d x マウスへの C D C の静脈内投与が、投与された C D C の少なくとも一部が肺に蓄積するという知見にもかかわらず、本書に提示されている様々なデータが示すように、骨格筋ジストロフィーを患うヒト対象に治療有効量の C D C を投与することによって異栄養性骨格筋の機能改善が達成され、それにより骨格筋ジストロフィー、例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー ( D M D ) を患っているヒト対象の効果的な治療を可能にする、という驚くべき発見に基づく。

20

30

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される「及び / 又は」は、1 つ以上の関連する列挙項目のあらゆる組み合わせと並んで、代替として (「又は」) 解釈される場合の組み合わせの欠如を指す。

【 0 0 4 4 】

「治療する」又は「治療すること」又は「治療」とは、調節効果を与える任意の種類の作用を指し、これは、例えば、障害、疾患、又は病気に苦しんでいる対象にとって有益な効果である可能性があり、状態と関連する病状の発現の予防、対象の状態の改善 (1 つ以上の症状又は疾患等)、病状の進行の遅延若しくは減少、及び / 又は臨床パラメーター、疾患若しくは病気の変化、病気の治癒等を含む。

40

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、障害、疾患又は病気に苦しんでいる対象に対して、例えば、有益な効果となり得る、対象の状態の改善 (例えば、1 つ以上の症状の調節)、状態の進行の遅延若しくは減少、障害の発症の予防若しくは遅延、及び / 又は臨床パラメーター、疾患若しくは病気の変化等を含む、調節効果を与える治療薬 (例えば、C D C - X O、C D C - E V、C D C、X O 及び E V の分子カーゴ、又はそれらの組み合わせ) の量を指す。例えば、幾つかの実施形態では、有効量は、対象における状態を、少なくとも 5 %、例えば少なくとも 1 0 %、少なくとも 1 5 %、少なくとも 2 0 %

50

、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも100%改善する組成物、化合物、又は薬剤の量を指す場合がある。開示される主題の活性組成物中の有効成分及び薬剤の実際の投薬量レベルは、特定の対象及び/又は用途に対して所望の応答を達成するのに有効な量の活性剤(複数の場合もある)を投与するように変更されてもよい。選択される投薬量のレベルは、組成物の活性、製剤、投与経路、他の薬物又は治療との組み合わせ、治療されている状態の重症度、並びに治療されている対象の身体状態及び以前の病歴を含むが、これらに限定されない様々な要因に依存する。本明細書では、有効用量の決定及び調整と並んで、そのような調整を行う時期及び方法の評価が企図される。「治療有効量」という用語は、標的とされる異栄養性骨格筋において、ジストロフィンの再発現及び/又は骨格筋機能を永続的に(例えば、実質的に不可逆的に)回復するのに十分なCDC-XO、CDC-EV、CDC、及び/又は分子カーゴXO及びEVの量を意味する。

#### 【0046】

本明細書で使用される「標的とされる異栄養性骨格筋」という用語は、異栄養性骨格筋の部位での或る量のCDC-XO、CDC-EV、CDC、分子カーゴCDC-XO及びCDC-EV、及び/又はそれらの組み合わせの送達である。幾つかの実施形態では、標的送達は、標的部位へのCDC-XO、CDC-EV、CDC、及び/又はCDC-XO及びCDC-EVの分子カーゴの偶然の、偶発的な、又は不注意による送達は含まれない。幾つかの実施形態では、標的送達には全身送達は含まれない。幾つかの実施形態では、標的送達には、異栄養性骨格筋の部位における、ジストロフィン異常症を治療するには不十分となり得る量のCDC-XO、CDC-EV、CDC、及び/又はCDC-XO及びCDC-EVの分子カーゴの偶然の、偶発的な、又は不注意による送達は含まれない。

#### 【0047】

本明細書で使用される「異栄養性」という用語は、ジストロフィンの欠如又は欠乏である(例えば、骨格筋及び/又は心筋における)。

#### 【0048】

細胞は、エキソソーム(XO)及び微小胞(MV)と称されるエンドソーム及び原形質膜を起源とする多様な種類の細胞外小胞(EV)を細胞外環境に放出する。EVは、細胞間コミュニケーションの重要な様式であり、細胞間及び細胞膜を通過する分子カーゴ(例えば、1つ以上の細胞質タンパク質、脂質、及びRNA)の移行の媒体としてはたらく。豊富な生物学的因子の環境を含む分泌脂質小胞であるXOは、強力なパラクリンシグナルを提供し、これによって、幹細胞が疾患又は損傷細胞を含む近隣の細胞に対する生物学的効果を増強する。タンパク質、生物活性脂質、及び核酸カーゴの封入及び移行により、これらの天然の送達装置は、再生プログラムの活性化につながるレシピエント細胞の顕著な表現型及び機能の変化を誘導することができる。国際公開第2016/05491号において、XOの投与は、mdxマウスの心不全を治療することが実証されており、その全体が参照されることより本明細書の一部をなす。

#### 【0049】

本明細書に開示される幾つかの実施形態は、治療用途の方法におけるCDC及びCDC-XOの使用に関する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるジストロフィン異常症の治療方法は、治療有効量のCDC及び/又はCDC-XOを、ジストロフィン異常症を患っている又はそれを有する対象に投与し、それによって対象を治療する工程を含む。幾つかの実施形態において、対象は、ジストロフィン異常症を患う小児対象である。幾つかの実施形態では、XOはCDCから単離される。幾つかの実施形態では、CDCは無血清培地で増殖される。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。他の実施形態では、ジストロフィン異常症はベッカー型筋ジストロフィーである。幾つかの実施形態では、CDC-XO、CDC-EV、CDC-XO又はCDC-EVの分子カーゴ、XO及びEVを産生するCDC、及び/又は上記の組み

合わせは、ジストロフィンの再発現を達成する方法で使用される。幾つかの実施形態では、CDC-EVの全身心室内注射による、また同様にmdxマウスの骨格筋へのCDC-EVの直接筋肉内注射による、CDC-XO、CDC-EV、CDC-XO又はCDC-EVの分子カーゴ、XO及びEVを産生するCDC、及び/又は組み合わせによって、本発明者らは、本明細書に初めて記載された新規の治療方法、例えば、単回又は複数回の全身投与で治療有効量のCDC及び/又はCDC-EVSを投与することによる骨格DMDの治療方法を想到した。幾つかの実施形態では、疾患は筋ジストロフィーである。

#### 【0050】

本明細書に開示されるデータ及び実験は、ジストロフィン発現の誘導におけるCDC、CDC-XO、及び/又はCDC-EVの予想外の利点を実証している。本明細書で他に示されるように、mdxマウスの心臓へのCDCの注射は、心臓と骨格筋の両方において全長ジストロフィントタンパク質レベルをブーストし、心機能、歩行能力及び生存率を劇的かつ永続的に改善する。同様の結果は、ヒトのデュシェンヌ型心筋細胞でも実証されている。正の因子は、CDCによって生成される細胞XOに存在するようであり、CDCは、多小胞エンドソームが原形質膜と融合したときに細胞によって分泌される脂質二重層ナノ小胞である。

10

#### 【0051】

幾つかの実施形態では、ヒトCDCによって分泌されるXO（及びEV）は、mdxマウス及びヒトデュシェンヌ型心筋細胞においてCDCの利点を再現することが実証されている。幾つかの実施形態では、CDC-XO（例えば、miR-148a）に見られる非コードRNA種の送達は、転写産物の長さやエクソン/イントロンの接合部に影響を与えることなく、CDC、CDC-XO、及び/又はCDC-EVがジストロフィントタンパク質レベルを増加させる能力を模倣する。幾つかの態様において、CDC-XOが媒介する非コードRNAの移行は、心臓及び骨格筋のジストロフィンを回復させることによりDMDを改善する。

20

#### 【0052】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される結果は、ジストロフィン異常症の治療選択肢としてのCDC及びそれらのXO（及び/又はEV）を実証する。CDC及びそれらの分泌されたXO（及び/又はEV）は、心臓と骨格筋のジストロフィンレベルを確実に増加させる。幾つかの実施形態において、心臓及び骨格筋におけるジストロフィンレベルの増加は、身体へのCDC、CDC-XO、及び/又はCDC-EVの注射後（例えば、全身又は局所、骨格筋への局所を含む）の大きな持続性の全体的利益に結び付く。幾つかの実施形態では、本明細書に開示されるように、CDC、CDC-XO、及び/又はCDC-EVは、再生性であるだけでなく、抗炎症性及び抗線維性でもある。CDCは、血管新生を促進し、内因性の前駆細胞を動員し、生存する心臓細胞をうまく増殖させる拡散因子を分泌し；また、移植されたCDCは、不適応なりモデリング及びアポトーシスを抑制する。幾つかの実施形態では、CDCは、間接経路により（CDC-XO及び/又はCDC-EVを介して）動作する；そらは、マイクロRNA（分子カーゴの構成要素）を含む非コードRNAを含むCDC-XO及び/又はCDC-EVの分泌を介して間接的に作用する。幾つかの実施形態では、同種CDCは数週間以内に完全に排除されるが、それらの機能的及び構造的な利点は少なくとも6カ月持続する。これらの多様なメカニズムは、マイクロRNAを含む非コードRNAによるCDC-XO及び/又はCDC-EVの分泌を介して媒介される。

30

40

#### 【0053】

特定の理論に拘束されることなく、上記のメカニズムは、ベッカー型筋ジストロフィー等の類似の筋ジストロフィーへの適用により、CDC、CDC-EV、又はCDC-XOにDMDを治療する能力もたらす。幾つかの実施形態において、CDC、CDC-XO、及び/又はCDC-EVは、再生細胞を動員し、線維化を逆転させ、炎症を標的とすることにより、ジストロフィンを置き換え、ジストロフィン欠失の病態生理学的結果を相殺する。幾つかの実施形態では、小児患者のDMDの中心的欠陥を逆転させ、本明細書の方法

50

は、疾患の進行を未然に防ぐか又は予防することができ、それらの患者が治療的介入の選択肢を著しく制限する可能性のある併存疾患を回避できるようにする。

【 0 0 5 4 】

本明細書に開示される方法は、患者への C D C の送達に関与するものを含むが、幾つかの実施形態では、細胞ではなく C D C により分泌される C D C - E V (例えば C D C - X O) を使用することにより、移植及び細胞自体の送達と比較した場合に有利な点を提供し得る。幾つかの実施形態では、C D C によって生成されるものを含む C D C - E V 及び C D C - X O は、「無細胞」療法を開発するための強力な豊富なソースを提供することができる。C D C - X O ベースの「無細胞」療法は、細胞療法とは対照的に、再生医療において以下の利点の 1 つ以上を提供する。幾つかの実施形態では、免疫原性又は腫瘍原性の可能性が低い又は存在しない生存不能な実体として、これらの特徴は特定の安全性の問題を有意に取り除く。幾つかの実施形態において、幹細胞由来のエキソソーム (及び / 又は C D C - X O) は、M H C 複合体分子を含む膜結合タンパク質の含有量が低いため、親細胞よりも免疫原性が低くなる可能性がある。幾つかの実施形態では、脂質小胞内の生物活性成分の C D C - X O 封入により、i n v i v o での分解から内容物を保護することができ、それによって、サイトカイン、成長因子、転写因子、R N A 等の可溶性分子の送達としばしば関連する障害を潜在的に無効にすることができる。幾つかの実施形態では、C D C - X O 及び / 又は C D C - E V の投与 (及び / 又は保管) の容易さにより、最終的に患者への繰り返しかつ持続的な送達が可能となり、それによって疾患及び / 又は機能不全組織の再生及び修復の可能性が最大化される。

【 0 0 5 5 】

幾つかの実施形態では、C D C 及び / 又は C D C - X O を使用して、免疫調節プロセス、血管新生、及び内皮細胞の遊走を含む多数の細胞、組織及び生理学的プロセスを刺激することができる。本明細書に開示されるように、酸化及び / 又はニトロソ化ストレスの増加、炎症の増加、アポトーシス促進及びリモデリング状態の環境を含む、D M D 患者の病態生理に基づいて、細胞によって分泌される C D C 及び / 又は C D C - X O を含む治療アプローチは、疾患の経過 (及び前述の疾患状態及び / 又は症状の 1 つ以上) を逆転させるのに大きな利点を提供する。幾つかの実施形態では、C D C、C D C - X O、及び / 又は C D C - E V は、抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス、抗リモデリング効果を促進する。幾つかの実施形態では、C D C、C D C - X O、及び / 又は C D C - E V は、疾患細胞及び組織の再生能力を高める。幾つかの実施形態では、C D C、C D C - X O、及び / 又は C D C - E V の投与は、D M D の遅延及び / 又は逆転に有益であり、C D C に由来するエキソソーム集団は、これらの利益がもたらされることを可能にする。小児対象への早期治療介入は、心不全等の後期疾患の併存疾患を予防又は回避する永続的かつ全身的な利益を提供する。幾つかの実施形態において、それらの持続する利益は、以下に等しいか、少なくともおよそ：3 カ月、6 カ月、12 カ月、又は前述の値を含む範囲及び / 又は前述の値に及ぶ範囲である。

【 0 0 5 6 】

エキソソームの幾つかの実施形態。 X O は、サイトカイン、増殖因子、転写因子、脂質、コーディング核酸及び非コーディング核酸等の様々な生物学的因子に富む脂質二重層小胞である。X O は、血液、尿、羊水、間質腔及び細胞外空間に見られる。エンドソーム起源のこれらのエキソサイトーシス小胞は、40 nm ~ 100 nm のサイズを含む、30 nm ~ 200 nm の範囲のサイズであり、電子顕微鏡で明らかにされるように、カップ状の形態を有する。それらの初期形成は、細胞膜の内向きの出芽から始まり、エンドソームを形成し、その後、後期エンドソームの制限膜の陥入が続き、多胞体 (M V B) を形成する。M V B と原形質膜の融合は、その後エキソソームとして知られる小胞の形成により、細胞外空間に内部小胞の放出をもたらす。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される X O は、エキソサイトーシスされた及び / 又はエンドソーム起源の細胞外小胞である。幾つかの実施形態では、本明細書に記載の X O は、以下に等しいか、少なくともおよそ：30 nm、50 nm、100 nm、150 nm、200 nm、又は前述の値を含む範囲及び / 又

は前述の値に及ぶ範囲の直径を有することができる。

【0057】

本明細書に記載されるように、XOの「カーゴ」内容物は、形成時の親細胞の細胞調節状態を含む、親細胞起源に関連する生物学的因子の異なるサブセットを含むように親細胞起源を反映する。エキソソーム内のサイトカイン及び成長因子、脂質、コーディングRNA分子及び非コーディングRNA分子を含む様々なタンパク質の豊富な生物学的環境はいずれも、必然的に親細胞に由来する。細胞質誘導体の豊富なアレイを含むことに加えて、エキソソームは、膜の表面で膜結合受容体の細胞外ドメインを更に発現する。

【0058】

幾つかの実施形態では、記載されるカプセル化及び形成プロセスは、親細胞起源及び形成時の調節状態に基づいてXO組成物に不均一性を作り出す。それにもかかわらず、幾つかの実施形態では、一般的な出芽形成及び放出メカニズムは、エンドソーム関連タンパク質(Rab GTPase、SNARE、アネキシン、フロチリン等)原形質膜又はエンドソームでミクロドメインにクラスター化することが知られているタンパク質(4つの膜貫通ドメインであるテトラスパニン、例えばCD63、CD81、CD82、CD53、及びCD37)、脂質ラフト関連タンパク質(例、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質及びフロチリン)、コレステロール、スフィンゴミエリン、及びヘキソシルセラミド等のそれらの起源の結果として共通する一組の性質を確立する。

【0059】

幾つかの実施形態では、小胞の起源を反映する成分に加えて、XOは、シグナル伝達プロセスに関連するmRNA及びマイクロRNAの両方を含有し、カーゴmRNAはレシピエント細胞で翻訳可能であるか、又はマイクロRNAはレシピエント細胞で標的mRNAを機能的に分解する。幾つかの実施形態では、遺伝子発現に影響を与えることが可能な他の非コードRNAもXOに存在し得る。mRNA又はマイクロRNAの集団のXOへの選択的取り込みを支配するプロセスは完全には理解されておらず、特定の理論に拘束されることはないが、他のエキソソーム及びそれらの起源細胞のRNAプロファイルと比較した場合、XOカーゴRNAの濃縮によって実証されるように、RNA分子はXOにランダムにではなく、選択的に取り込まれると考えられている。幾つかの実施形態では、理論に拘束されることなく、RNA分子が疾患の病因及び再生プロセスでの可能性のある役割を考慮すれば、XO中のRNA分子の存在及び標的レシピエント細胞に影響を及ぼす際の明確な効力により、本明細書で他に開示されるように、XO及びそれらの分子カーゴが治療的に有効となる。

【0060】

幾つかの実施形態では、エキソソームの天然の二重膜カプセル化は、カーゴ内容物が血流中又は組織内で分解することなく持続又は移動できるように保護され、制御された内部微小環境も提供する。幾つかの実施形態では、細胞外環境へのこのカーゴのその後の放出により、脂質リガンド受容体相互作用、エンドサイトーシス取り込みを介する内在化、又は小胞と細胞膜の直接融合によって媒介される、細胞表面への接着を介するレシピエント細胞との相互作用が可能になる。これらのプロセスにより、エキソソームカーゴ内容物が標的細胞に放出される。

【0061】

幾つかの実施形態では、XO細胞相互作用は、抗原提示、転写因子、サイトカイン、成長因子、mRNA及びマイクロRNA等の核酸の移行を含む、幾つかの異なる機構のいずれかによって誘導されるように、標的レシピエント細胞の遺伝的経路を調節することができる。

【0062】

エキソソームの単離及び調製。幾つかの実施形態では、XO単離は、分離及び分析のためのそれらの一般的な生化学的及び生物物理学的な特徴を使用して達成され得る。幾つかの実施形態では、分画超遠心法が、分泌されたXOを培養細胞の上清から単離する技術として使用され得る。幾つかの実施形態では、このアプローチは、比較的低い浮遊密度を活用

10

20

30

40

50

することにより、非膜状粒子からのX Oの分離を可能にする。幾つかの実施形態では、サイズ排除により、生化学的に類似しているが生物物理学的に異なるM Vからの分離が可能になり、M Vは最大1 0 0 0 n mのより大きな直径を持つ。幾つかの実施形態では、M Vはまた、X Oと共に治療混合物に含まれる（E VがX O及びM Vの両方を含む場合）、及び/又はM VはX Oから除去されない。他の実施形態では、X Oが濃縮され、及び/又はM Vが実質的に含まれないように、X OをM Vから単離することができる。幾つかの実施形態では、浮揚速度の違いにより、異なるサイズのエキソソームの分離がさらに可能になる。幾つかの実施形態では、X Oサイズは、4 0 n m ~ 1 0 0 n mのサイズを含む3 0 n m ~ 2 0 0 n mの範囲の直径を有する。幾つかの実施形態では、開示されるM V及びE Vは、約：1 0 0 0 n m、7 5 0 n m、5 0 0 n m、4 0 0 n m、3 0 0 n m、2 5 0 n m、2 0 0 n m以上の、又は前述の値を含む範囲及び/又は前述の値に及ぶ範囲のサイズ（n m単位）を有する。

10

**【0 0 6 3】**

幾つかの実施形態では、目的の特定のエキソソームの具体的な特性に基づいて、X Oの更なる精製を実施することができる。これには、例えば、目的のタンパク質を用いた免疫吸着の使用が含まれ、エキソプラズマ又は外向きの特定の小胞を選択する。

**【0 0 6 4】**

幾つかの実施形態では、示差遠心分離、不連続密度勾配、免疫親和性、限外濾過及び高速液体クロマトグラフィー（H P L C）のいずれか1つを使用してX O（及び/又はM V）を単離できるが、示差超遠心分離が使用される。幾つかの実施形態では、この手法は、2 0 0 0 × g から1 0 0 0 0 × g の遠心力の増加を利用して、1 0 0 0 0 0 × g でエキソソームベレットから中型及び大型の粒子及び細胞破片を分離する。遠心分離だけで馴化培地からのX Oの顕著な分離/収集が可能になるが、幾つかの実施形態では、超遠心分離も、様々なタンパク質凝集体、遺伝物質、一般的な汚染物質である培地や細胞片に由来する粒子を除去し得る。幾つかの実施形態では、エキソソーム精製の特異性の増強は、エキソソーム調製物のより高い純度（浮選密度1 . 1 g / m l ~ 1 . 2 g / m l ）又は調製中に個別のシュガークッション（s u g a r c u s h i o n ）の適用を提供するため、限外濾過と組み合わせた連続遠心分離、又はスクロース密度勾配における平衡密度勾配遠心分離を展開し得る。

20

**【0 0 6 5】**

幾つかの実施形態では、限外濾過を使用して、生物活性を損なうことなくエキソソームを精製することができる。幾つかの実施形態では、膜は、約：2 0 0 k D a、1 0 0 k D a、7 5 k D a、5 0 k D a以下の、又は前述の値を含む範囲及び/又は前述の値に及ぶ範囲の分子量カットオフ（M W C O）等種々の細孔サイズを有する。幾つかの実施形態では、ゲル濾過は、小さい粒子を排除するため、代替的に又は追加して使用されてもよい。幾つかの実施形態において、メンブレン（例えば、透析、限外濾過等）及び/又はゲル濾過は、実質的な生理学的p Hを使用して及び/又は実質的な生理学的塩濃度で行われる（例えば、非中性p H又は非生理学的塩濃度の使用を避ける）。幾つかの実施形態では、接線流濾過（T F F）システムが使用される。幾つかの実施形態では、T F Fシステムはスケラブル（1 0 0 0 0 L 超まで）であり、X O画分を精製するだけでなく濃縮することもできる。幾つかの実施形態において、かかるアプローチは、有利には、示差遠心分離よりも時間がかからない。幾つかの実施形態では、H P L Cを使用してX Oを精製する。幾つかの実施形態では、H P L Cを使用して、エキソソームを均一なサイズの粒子に精製し、調製物が生理学的p H及び塩濃度に維持されるようにそれらの生物活性を維持することもできる。

30

40

**【0 0 6 6】**

幾つかの実施形態では、化学的方法を使用してX Oを単離する。幾つかの実施形態において、これらの化学的方法は、沈殿手法における異なる溶解度による分離を含む。幾つかの実施形態では、沈殿試薬をX Oの溶液に加えてX Oを精製する。幾つかの実施形態において、これらの化学的方法は、体積排除ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（P

50



E G) 等) への添加による分離を含む。幾つかの実施形態では、これらの化学的方法を、追加のラウンドの遠心分離又は濾過等と組み合わせることができる。幾つかの実施形態では、例えば、エキソソームの集団を即座に及び迅速に沈殿させるために、沈殿試薬、ExoQuick (登録商標) を馴化細胞培地に添加する。幾つかの実施形態では、フローフィールドフローフラクション (FFFF: flow field-flow fractionation) は、高分子 (例えば、タンパク質) 及びナノサイズからマイクロサイズの粒子 (例えば、オルガネラ及び細胞) を分離及び特性評価するために使用される溶出に基づく手法であり、培養培地からのエキソソームの分画に適用される。

#### 【0067】

幾つかの実施形態では、XOの生化学的及び生物物理学的な特徴に依存して、本明細書で他に開示される技術を超えて、焦点があてられる技術が目的の単離された特定のエキソソームに適用され得る。幾つかの実施形態では、抗体の免疫親和性を使用して、XO関連抗原を認識する。幾つかの態様において、XOは、親細胞の膜の表面で膜結合受容体の細胞外ドメインを発現する。幾つかの実施形態では、この発現は、共有される抗原プロファイルに基づいて、親細胞の起源に関連してXOを単離及び分離することを可能にする。幾つかの実施形態では、磁気ビーズへの複合化、クロマトグラフィーマトリクス、プレート若しくはマイクロ流体デバイス、及び/又はかかる技術と本明細書に開示される他の技術との組み合わせは、(例えば、目的の親細胞又は関連する細胞の調節状態に関連する可能性がある) 目的の特定のXO又はMVの集団の単離を可能にする。他の親和性捕捉方法では、XO表面の特定の糖残基に結合するレクチンを使用する。

#### 【0068】

エキソソームに基づく治療法。幾つかの実施形態では、本明細書で他に開示されるように、XOに基づく治療法は、潜在的な「無細胞」療法を有利に可能にする (例えば、CDC等がCDC-XO等から分離される)。「無細胞」療法の使用は、リスクを低減した細胞療法の潜在的な利点を保持し、及び/又は細胞療法が利用できない (及び/又は不可能な) 状況で使用され得る。幾つかの実施形態では、本明細書で他に記載されるように、CDC等の細胞に基づく治療法の治療上の利点は、内因性の起源から生じる再生組織を伴う間接的な機構により生じ得る。幾つかの実施形態では、CDCによって産生される細胞XOは、疾患の進行を改善するだけでなく、疾患及び/又は機能不全の組織を修復及び再生する方法で、新たな治療アプローチのための増殖因子、転写因子、サイトカイン及び核酸の産生及び送達を可能にし得る。これに関して、CDC由来エキソソームは、相乗機構を動員して内因性幹細胞を心筋損傷部位に引き付け、細胞分化を促進し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー等の慢性疾患の病態生理を逆転させることにより、主な満たされていない医学的ニーズに効果的に対処することができる。幾つかの実施形態において、CDCは、XO (及び/又はEV) の製造所として使用され得て、有利には、患者においてCDCの滞在期間を通してXOの持続的な供給源を提供する。

#### 【0069】

幾つかの実施形態では、特に、DMD等の慢性状態の場合、XCを産生するCDC-XO又はCDCの患者への反復送達及び持続送達は、細胞に基づく治療法を使用する場合よりもより容易で、潜在的により安全となり得る方法で、疾患組織及び/又は機能不全組織の再生及び修復の可能性を高め得る。投薬レジメン及びスケジュールは、本明細書で他に更に詳細に開示される。

#### 【0070】

幾つかの実施形態では、本明細書の他の箇所で開示されるように、患者に提供されるXO及び/又はCDCの投与方法及び量は、治療用量を送達する様々な方法で提供され得る。幾つかの実施形態では、例えば、XOの投与のための組成物及び/又は溶液を投与は、単回投与で約1mg～約100mgのCDC-XOタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、CDC-EV (例えば、CDC-XO) の用量は、以下に等しい又は少なくとも約: 1mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、200mg、又は前述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲のEV又はXO (mg単位) を含んでもよい。幾

つかの実施形態では、投与方法は、対象への各単回用量の複数回投与を含む。幾つかの実施形態では、組成物（例えば、CDC-XO、CDC-EV、CDC、又はそれらの組み合わせを含む組成物）の投与には注射が含まれる。幾つかの実施形態では、注射は骨格筋注射を含む。幾つかの実施形態では、注射は腹腔内注射を含む。幾つかの実施形態では、組成物の投与には、動脈内又は静脈内の注入が含まれる。幾つかの実施形態では、対象の治療（例えば、CDC-XO及び/又はCDC-XOを放出するCDCの単回又は複数回用量の送達による）は、ジストロフィン発現の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、ジストロフィン発現の増加は、四肢（例えば、腕又は脚のうちの1つ以上）の骨格筋で生じる。幾つかの実施形態では、横隔膜でジストロフィン発現の増加が起こる。幾つかの実施形態では、本明細書の他の箇所で開示される治療を受けている患者は、心筋症を患う小児患者である。幾つかの実施形態では、小児対象は心筋症と診断されている。幾つかの実施形態では、小児対象は心筋症に罹患しているが、心不全には罹患していない。幾つかの実施形態では、小児対象は3歳～11歳である。他の実施形態では、小児対象は12歳～18歳である。幾つかの実施形態では、ヒト対象は、約：3、6、11、12、15、18以下、又は前述の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲の年齢の小児対象である。

#### 【0071】

幾つかの実施形態では、本明細書で他に開示されるように、組成物（例えば、CDC、CDC-XO、又はCDC-EVを含むもの）の投与には注射が含まれる。幾つかの実施形態では、注射は骨格筋注射を含む。幾つかの実施形態では、注射は腹腔内注射を含む。幾つかの実施形態では、組成物の投与は、動脈内又は静脈内注入を含む。幾つかの実施形態では、対象の治療は、ジストロフィン発現の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、ジストロフィン発現の増加は、四肢の骨格筋で起こる。他の実施形態では、ジストロフィン発現の増加は横隔膜で起こる。他の実施形態において、対象は心筋症に罹患している。他の実施形態では、対象は心筋症と診断されている。他の実施形態では、対象は心筋症に罹患しているが、心不全には罹患していない。他の実施形態では、対象は3歳～11歳である。他の実施形態では、対象は12歳～18歳である。

#### 【0072】

本明細書に記載されるのは、CDC及びCDC-XOを介した損傷組織又は疾患組織の修復又は再生において顕著な利益を提供する組成物及び方法である。特定の支援技術は、例えば、米国特許出願第11/666,685号、同第12/622,143号、同第12/622,106号、同第14/421,355号、国際出願PCT/US2013/054732号、同PCT/US2015/053853号、同PCT/US2015/054301号、及び同PCT/US2016/035561に記載され、これらは参照することにより完全に本明細書の一部をなす。

#### 【0073】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、治療有効量のCDC及び/又はCDC-XOを対象に投与し、それにより該対象を治療することを含む、骨格筋疾患の治療方法である。本明細書に更に記載されるのは、CDC及び/又はCDC-XOを含む治療有効量の組成物を対象に投与し、それにより該対象を治療することを含む、骨格筋疾患の治療方法である。他の実施形態では、組成物は薬学的に許容可能な担体を含む。本明細書に更に記載されるのは、複数のCDC及び/又はCDC-XOを含む治療有効量の組成物を対象に投与し、それにより該対象を治療することを含む、慢性筋肉疾患の治療方法である。様々な実施形態において、複数のCDC及び/又はCDC-XOは、無血清培地で増殖されたCDCから単離される。様々な実施形態において、エキソソームは約90nm～約200nmの直径を有し、CD81+、CD63+、又はそれらの両方である。他の実施形態では、慢性筋疾患にはジストロフィン異常症が含まれる。様々な実施形態において、ジストロフィン異常症には、デュシェンヌ型筋ジストロフィーが含まれる。様々な実施形態において、ジストロフィン異常症にはベッカー型筋ジストロフィーが含まれる。様々な実施形態において、対象は18歳未満の小児患者である。様々な実施形態において、対象は13歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は12歳未満の

10

20

30

40

50

思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は11歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は10歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は3歳～11歳である。様々な実施形態において、対象は12歳～18歳である。

【0074】

本明細書の幾つかの実施形態は、治療有効量のCDC-XO、CDC-EV、及び/又はXO放出CDCを対象に投与し、それにより該対象を治療することを含む、骨格筋疾患の治療方法である。幾つかの実施形態は、CDC-XO、CDC-EV、及び/又はXO放出CDCを含む治療有効量の組成物を対象に投与し、それにより該対象を治療することを含む、骨格筋疾患の治療方法に関する。幾つかの実施形態では、組成物は薬学的に許容される担体を含む。本明細書にさらに記載されるのは、CDC-XO、CDC-EV、及び/又はXO放出CDCを含む治療有効量の組成物を対象に投与し、それにより該対象を治療することを含む、慢性筋疾患の治療方法である。幾つかの実施形態では、慢性筋疾患にはジストロフィン異常症が含まれる。他の実施形態において、ジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症には、ベッカー型筋ジストロフィーが含まれる。様々な実施形態において、対象は18歳未満の小児患者である。様々な実施形態において、対象は13歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は12歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は11歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は10歳未満の思春期前の患者である。様々な実施形態において、対象は3歳～11歳である。様々な実施形態において、対象は12歳～18歳である。

【0075】

様々な実施形態において、対象は心筋症に罹患している。様々な実施形態において、対象は心筋症に罹患しているが、心不全には罹患していない。様々な実施形態において、対象は心筋症と診断されている。様々な実施形態において、対象は、心不全ではなく心筋症と診断されている。

【0076】

様々な実施形態において、心筋症には、細胞膜分解、間質性炎症、脂肪置換、及び線維化のうちの1つ以上が含まれる。様々な実施形態において、心筋症には左心室後心底線維化；異常な房室結節伝導を伴うSVTを含む、心房内の伝導異常が含まれる。様々な実施形態において、心筋症は、心室拡大、呼吸困難、末梢性浮腫及び肝腫大の進行した段階が含まれる。様々な実施形態において、心不全(HF)は、心臓の構造及び機能が抑制される無症候性異常(ステージB)、顕性HF(ステージC)、そして進行性HF(ステージD)を含む。様々な実施形態において、対象は、GI及び尿路系の関与を更に含む、血管機能不全を含む平滑筋ミオパチーに罹患している。

【0077】

幾つかの実施形態では、対象は、上記の年齢群の1つ等上記の1つ以上であり、心筋症及び/又は心不全に罹患及び/又は診断されている。これには、例えば、心不全ではなく、3歳～11歳で心筋症に罹患した及び/又は診断された対象が含まれる。

【0078】

他の実施形態において、治療有効量の組成物を投与することは、単回用量で約 $1 \times 10^5$ 個～約 $1 \times 10^8$ 個以上のCDCを含む。別の例では、投与されるCDCの数としては、エキソソーム投薬量の別のベースラインとして、冠動脈当たり2500万個のCDC(すなわち、合計7500万個のCDC)が含まれる。様々な実施形態において、CDCの数は、エキソソーム投薬量の別のベースラインとして、単回用量に $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個のCDCを含む。特定の例では、これは体重に案分されてもよい( $100000 \text{ CDC} / \text{kg}$  体重～ $1 \text{ M CDC} / \text{kg}$  体重の範囲の総CDC用量)。様々な実施形態において、投与は、2回、3回、4回、4回以上等の連続的に適用される用量の反復投薬であってもよい。

【0079】

他の実施形態では、治療有効量の組成物の投与には、動脈内及び静脈内の注入を含む注入が含まれる。他の実施形態では、注入は全身送達をもたらす。他の実施形態では、注入は、治療有効量のエキソソームを体内の1つ以上の場所に送達することができる。他の実施形態において、注入は、治療有効量のエキソソームを平滑筋組織又は骨格筋組織に送達することができる。他の実施形態では、治療有効量の組成物の投与には注射が含まれる。他の実施形態では、注射は、心筋内注射、心臓腔及び心内腔、ならびにそれらに関連する血管を含む、心臓への注射を含む。他の実施形態では、心臓、心臓腔及び心内腔、それらに関連する血管への注射は、平滑筋又は骨格筋組織に治療的に有効な投薬量のエキソソームを送達することができる。他の実施形態では、注射は骨格筋注射を含む。他の実施形態では、注射は腹腔内注射を含む。他の実施形態では、注射は経皮注射を含む。

10

#### 【0080】

他の実施形態では、対象の治療は、ジストロフィン発現の増加をもたらす。他の実施形態では、ジストロフィン発現の増加は骨格筋で起こる。これには、ヒラメ筋等の四肢の骨格筋が含まれる。他の実施形態において、ジストロフィン発現の増加は横隔膜で生じる。他の実施形態において、対象の治療は、線維化の減少、炎症の減少、及び/又はミトコンドリア機能の増加をもたらす。他の実施形態では、線維化の減少には、コラーゲン蓄積の減少が含まれる。他の実施形態では、コラーゲンにはコラーゲンI及び/又はコラーゲンIIIが含まれる。他の実施形態において、炎症の減少には、細胞質核因子(赤血球由来2)様2(Nrf2)の増加、脂肪酸過酸化最終産物の減少、炎症細胞の数の減少、及び/又は抗酸化物質の発現亢進が含まれる。他の実施形態では、抗酸化剤には、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2(SOD-2)、及びグルタミン酸システインリガーゼ触媒(GCLC)サブユニットが含まれる。他の実施形態では、炎症細胞には、CD68<sup>+</sup>マクロファージ及びCD3<sup>+</sup>T細胞が含まれる。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加には、ミトコンドリア超微細構造の増加及び/又はミトコンドリア生合成の増加が含まれる。他の実施形態では、ミトコンドリア機能の増加には、核PPAR- $\gamma$ コアクチベーター-1(PGC-1)発現の増加が含まれる。

20

#### 【0081】

様々な実施形態において、CDCは、外植片へと培養された生検サンプルから生成され、外植片由来細胞に更に培養され、更に心筋球形成細胞として培養され、その後心筋球として培養され、続いて培養される。他の実施形態では、CDCはヒトのものである。様々な実施形態において、CDCは、ジストロフィン異常症に罹患した対象から得られた生検サンプルから生成される。

30

#### 【0082】

他の実施形態では、対象の治療は、骨格筋組織の機能改善を含む、対象の機能改善を評価することを更に含む。様々な実施形態において、機能改善には、収縮強度の増加、歩行能力の改善、座位から立ち上がる能力の改善、臥位若しくは背臥位から座る能力の改善、並びにマウスのポインティング及び/又はクリック等の手先の器用さの改善の1つ以上が含まれる。他の実施形態では、対象の治療は、神経損傷の治療に応答する認知、肺損傷の治療に応答する血液酸素移行、及び損傷した免疫学的関連組織の治療に応答する免疫機能を評価することを更に含む。

40

#### 【0083】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、対象から生検標本を単離し、外植片として生検標本を培養し、外植片由来細胞(EDC)を生成し、EDCを心筋球に培養し、心筋球由来細胞(CDC)の形成を誘導することを含む方法である。他の実施形態では、この方法は、CDCを対象に投与することを含む。他の実施形態では、本方法は、CDCからエキソソームを単離すること、及びCDC由来エキソソームを対象に投与することを含む。種々の実施形態において、外植片として生検標本を培養することは、生検標本を細かく刻み、フィブロンекチン被覆容器上で培養することを含む。様々な実施形態において、EDCの生成には、外植片から細胞を単離することが含まれる。様々な実施形態に

50

において、外植片から単離された細胞には、緩く付着した細胞及び／又は間質様細胞が含まれる。様々な実施形態において、EDCを心筋球に培養することは、ポリ-D-リジンプレート上でEDCを培養することを含む。種々の実施形態において、CDCの形成には、フィブロネクチン被覆容器上で剥離された心筋球を培養することが含まれる。CDC生成のための更なる例及び実施形態は、米国特許出願公開第6,217,415号に記載されており、参照することにより完全に本明細書の一部をなす。様々な実施形態において、CDC由来エキソソームを単離することは、本明細書に記載される技術のいずれかの使用を含む。様々な実施形態において、CDCを対象に投与することは、本明細書に記載される技術のいずれかの使用を含む。様々な実施形態において、CDC又はCDC由来エキソソームを対象に投与することは、本明細書に記載される技術のいずれかの使用を含む。様々な実施形態において、生検標本は、CDC又はCDC由来エキソソームを投与された同じ対象から単離される。様々な実施形態において、生検標本は、CDC由来エキソソームを投与される対象とは異なる対象から単離される。様々な実施形態において、対象は慢性筋肉疾患に罹患している。他の実施形態では、慢性筋疾患にはジストロフィン異常症が含まれる。他の実施形態において、ジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。他の実施形態において、ジストロフィン異常症は、ベッカー型筋ジストロフィーを含む。様々な実施形態において、慢性筋疾患に罹患している対象は、18歳未満の小児対象である。様々な実施形態において、対象は12歳未満の思春期前の対象である。

#### 【0084】

幾つかの実施形態では、CDC由来エキソソーム（例えば、miR-148a-3p、又は以前は機能が不明の小さな115ヌクレオチドRNAであるsrDMD）に見られる非コードRNA種の送達は、CDC及びCDC由来エキソソームの能力を模倣して、転写産物の長さやエクソン/イントロン接合に影響を与えることなく、ジストロフィンのタンパク質レベルを増加させる。幾つかの実施形態では、これらの非コードRNAは、心臓及び骨格筋のジストロフィンを回復することにより、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを改善する。幾つかの実施形態では、本明細書に開示されるのは、ジストロフィンを置き換えて、ジストロフィン欠失の病態生理学的結果を相殺することができる因子である。幾つかの実施形態では、該因子は、ジストロフィン発現に影響を与えるためにレシピエント細胞に移行されて、初めて、DMDの治療選択肢として核酸を確立するmiR-148a-3p及びsrDMDの1つ以上を含む。

#### 【0085】

幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、その配列が、本明細書で他に言及されるマイクロRNA又は短い非コードRNAに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるものが使用される。本明細書で使用される場合、「同一」（すなわち、「配列同一性」）という用語は、2つのポリヌクレオチド配列が比較のウィンドウに亘り（すなわち、ヌクレオチド毎に）同じであることを意味する。配列同一性のパーセンテージ（すなわち、「X%同一」、「同一性パーセント」である配列）を参照する場合、「同一」のパーセンテージは、比較のウィンドウにわたって最適に配列された配列を含む2つの整列された配列を比較し、一致する位置の数を得るために、両方の配列で同一の核酸塩基（A、T、C、G、U、又はI）が生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割り、結果に100を掛けて、配列同一性の割合を求めることによって計算される。幾つかの実施形態では、少なくとも15ヌクレオチド位置、頻繁には、少なくとも15個～50個、50個～100個、又は100個以上のヌクレオチドのウィンドウに亘る比較ウィンドウであって、配列同一性のパーセンテージは、参照配列を目的のポリヌクレオチド配列と比較することにより計算される。幾つかの実施形態では、参照と目的のポリヌクレオチド配列の不連続セグメントを含む目的のポリヌクレオチド配列との間の1つ以上の比較ウィンドウを組み合わせ、転座を説明する配列同一性のパーセンテージを計算してもよい。幾つかの実施形態では、目的のポリヌクレオチド配列は、比較のウィンドウに亘って参照配列の合計20パーセント以下の欠失又は付加を含んでも

10

20

30

40

50

よい。幾つかの実施形態において、本発明のマイクロRNAは、少なくとも、最大で、又は約1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又はそれ以上の追加のヌクレオチドを、5'末端、3'末端、又は5'と3'の両方の末端に含んでもよい。これには、例えば、5'末端又は3'末端にGCGが追加されたGCG改変miR-148aの追加が含まれる。

#### 【0086】

幾つかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、本明細書の他の箇所で開示される1つ以上のベクターにコードされる。幾つかの実施形態では、1つ以上のベクターは、遺伝子送達ビヒクルを介して細胞に導入される。幾つかの実施形態では、送達媒体は、アデノウイルスベクター等のウイルスベクター及び（例えば、アデノ随伴ウイルスベクター）を含む。幾つかの実施形態では、送達媒体は発現ベクター及び送達媒体を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは放出因子又はリボソーム自体に作用することができる。幾つかの態様において、1つ以上のポリヌクレオチドは、ジストロフィン転写物のリードスルーを増強することができる。

#### 【0087】

幾つかの実施形態では、治療用組成物はCDC、CDC-XO、及び/又はCDC-EVを含むことができるが、他の実施形態では、治療用組成物はCDC及び/又は小胞を欠いてもよく、代わりに有効量のRNAポリヌクレオチド又はRNAポリヌクレオチドをコードするベクターを含む組成物を含む。幾つかの実施形態では、RNA治療薬の有効量は、0.1mg/kg~20mg/kg、0.5mg/kg~10mg/kgの範囲である。幾つかの実施形態では、治療有効量は単一の単位用量である。幾つかの実施形態では、有効量には、0.1nM~10Mの範囲の濃度が含まれる。幾つかの実施形態では、濃度は0.3nM~400nM、及び/又は1nM~200nMの範囲である。幾つかの実施形態では、有効量は、例えば、心筋及び骨格筋組織を含む1つ以上の組織におけるジストロフィン発現を増加させることができる量を含む。幾つかの実施形態では、短い非コードRNA及びマイクロRNAは、少なくとも、最大で、又は約6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、50個、100個、150個、又は200個のヌクレオチド（その間で導かれ得る全ての整数又は範囲、並びに上述の値を含む及び/若しくはそれに及ぶ範囲を含む）の長さのRNAポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される任意の投与と同様に、投薬レジメンにおける治療有効量の投与は、治療される対象に依存し、患者のサイズに基づいて外挿されてもよい（マウスモデルから外挿して、より大きな患者では増加され、より小さな患者では減少される、（マウスの用量に、少なくとも約1500、2000、2500、3000、又はそれに等しい、及び/又は上記の値を含む及び/又はそれに及ぶ範囲の係数を掛ける等）。幾つかの実施形態では、投薬レジメンにおける投与は、単回投薬であってもよく、又は10分、20分、30分、40分、50分、60分、及び/又は1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間以上、及び/又は1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日以上に亘る投薬の頻回投与であってもよい。幾つかの実施形態において、投与は、製剤及び/又は投与様式により実施される、時間放出又は持続放出機構によるものであってもよい。

#### 【0088】

幾つかの実施形態では、1つ以上のRNAポリヌクレオチドは生物活性を持つ。幾つかの実施形態では、生物活性は、目的のペプチド又はタンパク質の翻訳のリードスルーの増強を含んでもよい。これには、例えば、異種発現システムでのペプチド又はタンパク質の発現を使用した生物活性の評価が含まれる。幾つかの実施形態では、ジストロフィン-eGFP等の異種発現融合タンパク質システムを使用して、生物活性を評価するための翻訳リードスルーの増強の尺度として野生型又は突然変異タンパク質を細胞にトランスフェク

10

20

30

40

50

トしてもよい。幾つかの実施形態では、生物活性は、野生型又は突然変異タンパク質と比較した場合、ビヒクルのみに対して正規化された蛍光のパーセンテージとして評価され得る。幾つかの実施形態では、G 4 1 8 は陽性対照としての役割を果たす。幾つかの実施形態では、生物活性を評価するための蛍光のパーセンテージには、変異体と比較して蛍光シグナルの約 1 0 % ~ 2 5 %、2 5 % ~ 5 0 %、5 0 % ~ 7 5 %、7 5 % ~ 1 0 0 % 又は 1 0 0 % の増加が含まれる。幾つかの実施形態では、生物活性を評価するための蛍光のパーセンテージには、野生型ペプチド若しくはタンパク質発現、又は G 4 1 8 陽性対照の蛍光の 0 % ~ 2 5 %、2 5 % ~ 5 0 %、5 0 % ~ 7 5 %、7 5 % ~ 1 0 0 % 又は 1 0 0 %、が含まれる。

#### 【 0 0 8 9 】

幾つかの実施形態では、RNA ポリヌクレオチド組成物の投与には、動脈内、静脈内、及び心筋内の注入を含む注入が含まれる。幾つかの実施形態では、組成物の投与には注射が含まれる。幾つかの実施形態では、注入は、心筋内注入、心臓腔及び心内腔、それに関連する血管を含む、心臓への注入を含む。幾つかの実施形態では、注射は骨格筋注射を含む。幾つかの実施形態では、注射には腹腔内注射が含まれる。幾つかの実施形態では、注射には経皮注射が含まれる。幾つかの実施形態では、組成物の投与には吸入が含まれる。

#### 【 0 0 9 0 】

幾つかの実施形態では、RNA ポリヌクレオチド組成物による対象の治療は、ジストロフィン発現の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、ジストロフィン発現の増加は骨格筋で起こる。幾つかの実施形態では、これには、ヒラメ筋等の四肢の骨格筋が含まれる。幾つかの実施形態では、ジストロフィン発現の増加は横隔膜で生じる。幾つかの実施形態では、対象の治療は、線維化の減少、炎症の減少、及び/又はミトコンドリア機能の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、線維化の減少には、コラーゲン蓄積の減少が含まれる。幾つかの実施形態では、コラーゲンにはコラーゲン I 及び/又はコラーゲン I I I が含まれる。幾つかの実施形態では、炎症の減少には、細胞質核因子 ( 赤血球由来 2 ) 様 2 ( N r f 2 ) の増加、脂肪酸過酸化最終産物の減少、炎症細胞の数の減少、及び/又は抗酸化物質の発現のアップレギュレーションが含まれる。幾つかの実施形態では、抗酸化剤には、ヘムオキシゲナーゼ - 1 ( H O - 1 )、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ - 2 ( S O D - 2 )、及びグルタミン酸システインリガーゼ触媒 ( G C L C ) サブユニットが含まれる。幾つかの実施形態において、炎症細胞には、C D 6 8 + マクロファージ及び C D 3 + T 細胞が含まれる。幾つかの実施形態では、ミトコンドリア機能の増加には、ミトコンドリア超微細構造の増加及び/又はミトコンドリア生合成の増加が含まれる。幾つかの実施形態では、ミトコンドリア機能の増加には、核 P P A R - コアクチベーター - 1 ( P G C - 1 ) 発現の増加が含まれる。

#### 【 0 0 9 1 】

幾つかの実施形態では、RNA ポリヌクレオチドによる対象の治療は、骨格筋組織の機能改善を含む、対象の機能改善を更に含む。幾つかの実施形態では、機能的改善には、収縮力の増加、歩行能力の改善、座位から立ち上がる能力の改善、臥位若しくは背臥位から座る能力の改善、並びにマウスのポインティング及び/又はクリック等の手先の器用さの改善等の 1 つ以上が含まれる。幾つかの実施形態では、対象の治療は、神経損傷の治療に  
 40  
 応答する認知、肺損傷の治療に  
 50  
 応答する血液酸素移行、及び損傷した免疫学的関連組織の  
 治療に  
 応答する免疫機能の改善を更に含む。

#### 【 0 0 9 2 】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に開示されるように、本明細書に記載されるのは、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個以上の RNA ポリヌクレオチド等の 1 つ以上の RNA ポリヌクレオチドを含む RNA ポリヌクレオチド組成物である。幾つかの態様において、組成物は、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個以上の RNA ポリヌクレオチド等の 1 つ以上の RNA ポリヌクレオチドを含む。幾つかの態様において、RNA には非コード RNA が含まれる。幾つかの態様において、非コード RNA には、とりわけ、それらの断片を更に含む、t RNA、y RNA、

rRNA、miRNA、lncRNA、piRNA、snRNA、snoRNAが含まれる。幾つかの態様において、1つ以上のRNAポリヌクレオチドはマイクロRNAである。幾つかの態様において、マイクロRNAは、miR-148a、miR-215、miR-33a、miR204、miR-376c、miR4532、miR-4742、miR-582、miR-629、miR-223、miR-3125、miR-3677、miR-376b、miR-4449、miR-4773、miR-4787、miR-491、miR-495、miR-500a、miR-548ah、miR-550、miR-548ah、miR-550a、miR-551n、miR-5581、miR-616、又は図29に濃縮されると示される他のマイクロRNAからなる群から選択される。幾つかの態様において、マイクロRNAは、マイクロRNA miR-146a、miR148a、miR-22、miR-24、miR-210、miR-150、miR-140-3p、miR-19a、miR-27b、miR-19b、miR-27a、miR-376c、miR-128、miR-320a、miR-143、miR-21、miR-130a、miR-9、miR-185、及びmiR-23aからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、マイクロRNAはmiR-148a-3pを含む。幾つかの実施形態では、エキソソームは、DMDに由来する小さな非コードRNA、すなわちsrDMDを含む。幾つかの態様において、1つ以上のポリヌクレオチドは、対象のジストロフィン発現を増加させることができる。幾つかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチド又は1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターは、薬学的に受容可能な担体を添加することにより、薬学的に活性な混合物又は組成物に組み込まれ得る。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、1つ以上のポリヌクレオチド及び/又は1つ以上のポリヌクレオチドをコードするウイルスベースのベクターと、薬学的に許容可能な担体とを含む。幾つかの態様において、1つ以上のポリヌクレオチド及び/又は1つ以上のポリヌクレオチドをコードするベクターと、薬学的に許容される担体又は賦形剤とを含む医薬組成物は、1つ以上のポリヌクレオチドを送達する複合体、小胞及び/又はリポソームを形成可能な賦形剤、及び/又は細胞膜を通して小胞若しくはリポソームに複合化又は捕捉されたオリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、賦形剤は、ポリエチレンイミン及び誘導体、又はポリプロピレンイミン又はポリエチレンイミンコポリマー（PEC）及び誘導体を含む類似のカチオン性ポリマー、合成両親媒性物質、Lipofectin（商標）、かかる1つ以上のポリヌクレオチドを送達できる粒子への自己集合が可能である、DOTAP及び/又はウイルスキャプシドタンパク質の1つ以上を含む。

#### 【0093】

幾つかの態様において、1つ以上のポリヌクレオチドの濃度は0.1nM~10Mの範囲である。様々な実施形態において、濃度は、0.3nM~400nM、1nM~200nMより多く及び/又はその間の範囲である。幾つかの態様において、1つ以上のポリヌクレオチドは、0.1mg/kg~20mg/kg、及び/又は0.5mg/kg~10mg/kgの範囲の用量で使用され得る。幾つかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの総濃度又は添加された各ポリヌクレオチドの濃度を指す濃度を含む。

#### 【0094】

幾つかの実施形態では、本明細書において他に記載されるように、RNAポリヌクレオチドはマイクロRNA（及び/又はマイクロRNAの組み合わせ）である。幾つかの態様において、マイクロRNAにはmiR-148aが含まれる。幾つかの実施形態において、miR-148aマイクロRNAは、以下の配列5'GAGGC AAAGUUCUGAG AACACUGCGACUCUGAGUAUGAUAGAAGUCAGUGCACUAC AGAACUUUGUCUC3' [配列番号1]を有する。幾つかの実施形態では、マイクロRNAを接尾辞「5P」又は「3P」によって表すことができ、「5P」は成熟マイクロRNAが前駆体の5'末端に由来することを示し、対応する「3P」は前駆体の3'末端に由来することを示す。幾つかの実施形態では、マイクロRNAはmiR-148-5pを含み、その配列は5'AAAGUUCUGAGACACUCCGACUC3' [配列番号2]



」である。幾つかの実施形態では、マイクロRNAはmiR-148a-3pを含み、その配列は5'UCAGUGCACUACAGAACUUUGU3'[配列番号3]である。様々な実施形態において、マイクロRNAは、その配列がmiR-148a、miR-148-5p及び/又はmiR-148a-3p、及び/又は前述のいずれかの断片と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるRNAポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、例えば、少なくとも15ヌクレオチド位置、頻繁には、少なくとも15個~50個、50個~100個、又は100個以上のヌクレオチドのウインドウに亘る比較ウインドウであって、配列同一性のパーセンテージは、参照配列を目的のポリヌクレオチド配列と比較することにより計算される。幾つかの実施形態では、参照と目的のポリヌクレオチド配列の不連続セグメントを含む目的のポリヌクレオチド配列との間の1つ以上の比較ウインドウを組み合わせ、転座を説明する配列同一性のパーセンテージを計算してもよい。幾つかの実施形態では、目的のポリヌクレオチド配列は、比較のウインドウに亘って参照配列の合計20パーセント以下の欠失又は付加を含んでもよい。幾つかの実施形態において、本発明のマイクロRNAは、少なくとも、最大で、又は約1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又はそれ以上の追加のヌクレオチドを、5'末端、3'末端、又は5'と3'の両方の末端に含んでもよい。これには、例えば、5'末端又は3'末端にGCGが追加されたGCG改変miR-148aの追加が含まれる。

#### 【0095】

幾つかの実施形態において、RNAポリヌクレオチドは、配列5'UGUACACAGAGGCGUGAUCGAUUCUCCUGAACAGCCUAUUACGGAGGACACUGCAGAUCAAGCCCGCCUGGAGAGGUGGAGUUUCAAGAGUCCCUUCCUGGUUCACCGUCUCCUUU3'[配列番号4]であるデュシェンヌ型ジストロフィー(dysrophy)(DMD)に由来する短い非コードRNA、すなわちsrDMDである。

#### 【0096】

幾つかの実施形態では、短い非コードRNAは、その配列がsrDMD及び/又はその断片と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるRNAポリヌクレオチドを含む。これには、例えば、配列が5'UGUACACGGUGGAGUUUCAAGAGUCCCUUCCUGGUUCACCGUCUCCUUUAGAGGCGUGAUCGAUUCUCCUGAACAGCCUAUUACGGAGGACACUGCAGAUCAAGCCCGCCUGGA3'[配列番号5]であるsrDMDの113ヌクレオチド長バリエーション(srDMDバリエーション)が含まれる。別の例には、5'UCCCCACAGAGGCGUGAUCGAUUCUCCUGAACAGCCUCCUCCGGAGGACACUGCAGAUCAAGCCCGCCUGGAGAGGUGGAGUUUCAAGAGUCCCUUCCUGGUUCACCGUCUCCUUU3'[配列番号6]であるsrDMD変異体が含まれる。幾つかの実施形態において、マイクロRNAを含む短い非コードRNAは、少なくとも、又は最大で12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、51個、52個、53個、54個、55個、56個、57個、58個、59個、60個、61個、62個、63個、64個、65個、66個、67個、68個、69個、70個、71個、72個、73個、74個、75個、76個、77個、78個、79個、80個、81個、82個、83個、84個、85個、86個、87個、88個、89個、90個、91個、92個、93個、94個、95個、96個、97個、98個、99個、100個、101個、102個、103個、104個、105個、106個、107個、108個、109個、110個、111個、112個、113個、114個、115個、116個、117個、118個、119個、120個、121個、122個、123個、124個、125個、126個、

127個、128個、129個、130個、140個、145個、150個、160個、170個、180個、190個、200個以上（その間で導かれ得る全ての整数又は範囲を含む）の残基長の長さを含む。幾つかの実施形態では、マイクロRNAを含む短い非コードRNAは、少なくとも、最大で、又は約6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、50個、100個、150個、又は200個のヌクレオチド（その間で導かれ得る全ての整数又は範囲を含む）の長さのRNAポリヌクレオチドを指す。

#### 【0097】

幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは生物活性を有する。幾つかの実施形態では、生物活性は、目的のペプチド又はタンパク質の翻訳のリードスルーの増強を含んでもよい。これには、例えば、異種発現系でのペプチド又はタンパク質の発現を使用した生物活性の評価が含まれる。例えば、ジストロフィン-eGFP等の異種発現融合タンパク質システムを使用して、生物活性を評価するための翻訳リードスルーの増強手段として、野生型の又は変異体タンパク質を細胞にトランスフェクトすることができる。様々な実施形態において、生物活性は、野生型又は変異体タンパク質と比較した場合、ビヒクルのみに対して正規化された蛍光のパーセンテージとして評価されてもよい。様々な実施形態において、G418は陽性対照としての役割を果たす。様々な実施形態において、生物活性を評価するための蛍光のパーセンテージは、変異体と比較して蛍光シグナルの約10%~25%、25%~50%、50%~75%、75%~100%又は100%以上の増加を含む。様々な実施形態において、生物活性を評価するための蛍光のパーセンテージには、野生型ペプチド若しくはタンパク質発現、G418陽性対照の蛍光の0%~25%、25%~50%、50%~75%、75%~100%又は100%が含まれる。

#### 【0098】

幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは合成のものである。例えば、核酸は、リン酸トリエステル、亜リン酸、又はホスホリアルミダイト化学及び固相技術により合成され得る。様々な実施形態において、RNAポリヌクレオチドは組換え法で産生される。例えば、これにはベクター（ウイルス及び非ウイルス）、プラスミド、コスミド、及び（大量の所望のRNA分子を生成するため）宿主細胞等の細胞に核酸を送達するためのその他のビヒクルの使用が含まれる。

#### 【0099】

幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドをコードするベクターは、アデノウイルスベクター（例えば、アデノ随伴ウイルスベクター）等のウイルスベクターである。様々な実施形態において、ベクターは非ウイルス発現ベクターである。

#### 【0100】

幾つかの実施形態では、RNAの有効量は、0.1mg/kg~20mg/kg、及び/又は0.5mg/kg~10mg/kgの範囲である。幾つかの実施形態では、治療有効量は単一の単位用量である。幾つかの実施形態では、RNAの有効量には、0.1nM~10Mの間の範囲の濃度が含まれる。幾つかの態様において、RNAの濃度は0.3nM~400nM、又は1nM~200nMの範囲である。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド又はベクターは、添加されるRNAポリヌクレオチド又はベクターの総濃度を指す濃度を含む。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド又はRNAベクターの量は、特定の結果に対して有効な量であり、特定の細胞特性（複数の場合もある）を誘導する等、所望の目標を達成するために必要な量を指す。様々な実施形態において、RNAポリヌクレオチドの有効量には、例えば心筋及び骨格筋組織を含む1つ以上の組織におけるジストロフィン発現を増加させることができる量が含まれる。

#### 【0101】

幾つかの実施形態において、RNAポリヌクレオチド又はRNAポリヌクレオチドをコードするベクターは、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を添加することにより、薬学的に活性な混合物又は組成物に組み込まれる。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、RN

10

20

30

40

50

A ポリヌクレオチド及び／又はRNAポリヌクレオチドをコードするウイルススペースのベクター及び薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を含む。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド及び／又はRNAポリヌクレオチドをコードするベクター、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物は、RNAポリヌクレオチドを送達する複合体、小胞及び／又はリポソームを形成できる賦形剤、及び／又は細胞膜をにより小胞又はリポソームに複合化若しくは捕捉されたオリゴヌクレオチドを含む。これらの賦形剤の多くは当業者に知られており、ポリエチレンイミン及び誘導体、又はポリプロピレンイミン又はポリエチレンイミンコポリマー（PEC）及び誘導体を含む類似のカチオン性ポリマー、合成両親媒性物質、Lipofectin（商標）、かかるRNAポリヌクレオチドを送達できる粒子への自己集合が可能である、DOTAP及び／又はウイルスキャプシドタンパク質を含む。他の実施形態において、RNAポリヌクレオチドはエキソソーム内に含まれる。幾つかの態様において、エキソソーム内に含まれるRNAポリヌクレオチドは、細胞に由来するエキソソーム内のRNAポリヌクレオチドと比較して濃縮されている。幾つかの実施形態において、濃縮は、細胞に由来するエキソソーム内のRNAポリヌクレオチドと比較した場合、10%～100%、100%～200%、200%～400%、400%～1000%高いレベルのRNAポリヌクレオチドを含み得る。

10

#### 【0102】

幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド又はRNAポリヌクレオチドをコードするベクターを投与することを含む、慢性筋疾患を治療する方法が提供される。幾つかの実施形態では、組成物の投与は、対象の慢性筋疾患を治療する。幾つかの実施形態では、慢性筋疾患はジストロフィン異常症である。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。幾つかの実施形態では、ジストロフィン異常症はベッカー型筋ジストロフィーである。幾つかの態様において、RNAポリヌクレオチドはマイクロRNAである。様々な実施形態において、マイクロRNAはmiR-148a [配列番号1]を含む。一部の実施形態では、マイクロRNAは、miR-148-5p [配列番号2]、及び／又はmiR-148a-3p [配列番号3]を含む。幾つかの実施形態では、マイクロRNAは、その配列が、miR-148a [配列番号1]及び／又はその断片（例えば、[配列番号2]、[配列番号3]）に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一（すなわちパーセント同一性）であるRNAポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、マイクロRNAは、少なくとも、多くても、又は約1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個以上のヌクレオチドの5'、3'、又は5'と3'の両方の末端の追加のヌクレオチドを含んでもよい。これには、例えば、5'末端又は3'末端にGCCGが付加されたGCCG修飾miR-148aの追加が含まれる。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（dysrophy）（DMD）由来の短い非コードRNA、srDMDである。幾つかの態様において、短い非コードRNAは、その配列が、srDMD [配列番号4]及び／又はその断片に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるRNAポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、短い非コードRNAには、srDMD変異体 [配列番号5]及び／又はsrDMD変異体 [配列番号6]が含まれる。

20

30

40

#### 【0103】

幾つかの実施形態では、組成物の投与には、有効量のRNAポリヌクレオチド又はRNAポリヌクレオチドをコードするベクターを含む組成物が含まれる。幾つかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド又はRNAポリヌクレオチドをコードするベクターの有効量は、0.1mg/kg～20mg/kg、及び／又は0.5mg/kg～10mg/kgの範囲である。幾つかの実施形態では、治療有効量は単一の単位用量である。幾つかの実施形態では、有効量には、0.1nM～10Mの範囲の濃度が含まれる。幾つかの実施形態では、濃度は0.3nM～400nM、及び／又は1nM～200nMの範囲である。幾つかの実施形態では、有効量は、例えば、心筋及び骨格筋組織を含む1つ以上の組織に

50

おけるジストロフィン発現を増加させることができる量を含む。幾つかの実施形態では、短い非コードRNA及びマイクロRNAは、少なくとも、最大で、又は約6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、50個、100個、150個、又は200個のヌクレオチド（その間で導かれ得る全ての整数又は範囲を含む）の長さのRNAポリヌクレオチドを含む。

#### 【0104】

幾つかの実施形態では、投薬レジメンにおける治療有効量の投与は、治療される対象に依存する。幾つかの実施形態では、投薬レジメンにおける投与は、単回投与、又は10分、20分、30分、40分、50分、60分、及び/又は1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間以上、及び/又は1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日以上に及ぶ期間に亘る投与の複数回投与であってもよい。さらに、投与は、製剤及び/又は投与様式により実施される、時間放出又は持続放出メカニズムによるものであってもよい。

10

#### 【0105】

幾つかの実施形態では、組成物の投与には、動脈内、静脈内、及び心筋内の注入を含む注入が含まれる。幾つかの実施形態では、組成物の投与には注射が含まれる。幾つかの実施形態では、注射は、心筋内注射、心臓腔及び心内腔、それに関連する血管を含む、心臓への注射を含む。幾つかの実施形態では、注射は骨格筋注射を含む。幾つかの実施形態では、注射には腹腔内注射が含まれる。幾つかの実施形態では、注射には経皮注射が含まれる。幾つかの実施形態では、組成物の投与には吸入が含まれる。

20

#### 【0106】

幾つかの実施形態において、対象の治療は、ジストロフィン発現の増加をもたらす。幾つかの実施形態において、ジストロフィン発現の増加は骨格筋で起こる。幾つかの実施形態では、これには、ヒラメ筋等の四肢の骨格筋が含まれる。他の実施形態において、ジストロフィン発現の増加は横隔膜で生じる。幾つかの実施形態では、対象の治療は、例えばジストロフィンを含むタンパク質のリードスルー翻訳の増強をもたらす。幾つかの実施形態では、対象の治療は、骨格筋組織の機能改善を含む、対象の機能改善を評価することを更に含む。幾つかの実施形態では、機能的改善には、収縮力の増加、歩行能力の改善、座位から立ち上がる能力の改善、臥位若しくは背臥位から座る能力の改善、並びにマウスのポインティング及び/又はクリック等の手先の器用さの改善等の1つ以上が含まれる。幾つかの実施形態では、対象の治療は、神経損傷の治療に応答する認知、肺損傷の治療に応答する血液酸素移行、及び損傷した免疫学的関連組織の治療に応答する免疫機能を評価することを更に含む。

30

#### 【実施例】

#### 【0107】

本明細書の実施形態は、CDC及びCDC由来XOが、mdxマウスにおいて、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの重要な病態生理学的特徴を回復させるため使用され得ることを実証する。ヒトCDCによって分泌されるエキソソームは、mdxマウスにおいてCDCの利益を再現し、ヒトデュシェンヌ型心筋細胞におけるカルシウムサイクリング及びミトコンドリア呼吸の異常を回復させる。CDC及びそれらのエキソソームはいずれも、mdxマウスにおいて心機能を改善する；CDCの単回注射は、最大運動能力を増加させ、生存率を改善するのに十分である。CDC由来エキソソーム（例えばmiR-148a）で見出された非コーディングRNA種の送達は、転写産物の長さ又はエクソン/イントロン接合に影響することなく、CDC及びCDC由来エキソソームの能力を模倣してジストロフィンタンパク質レベルを増加させる。よって、CDC及びCDC由来エキソソームは、シグナル伝達分子のエキソソーム媒介輸送を介してデュシェンヌ型筋ジストロフィーの特徴を改善する。

40

50

実施例 1動物研究

【0108】

本発明者らは、10カ月齢からDMD (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) のmdxマウスモデル、及び野生型系統適合マウス (C57BL/10ScSnJ野生型マウス心臓) (米国のJackson Laboratory) を研究した。CDC移植のプロセスを最適化するため、予備の用量応答実験を行ったところ、有効用量として1回目の注射に $1 \times 10^5$ 個の細胞、及び2回目の注射に $1 \times 10^4$ 個の細胞 (1回目の注射後3カ月) を確認し、虚血及び非虚血のマウスモデルにおける先の用量決定実験と一致した。合計 $1 \times 10^5$ 細胞/40 $\mu$ Lリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 1回目の注射)、又は $1 \times 10^4$ 細胞/40 $\mu$ L PBS (2回目の注射)、又はPBS単独を記載される通り4部位に等しく分けた左心室 (LV) 心筋に注射した。LVを3つの区域: 心底部、中央部及び心尖部に視覚的に分け、心底部に1回の注射、中央部に2回の注射及び心尖部に1回の注射を行った。10カ月齢のCDC/mdx及びビヒクル/mdrマウスをCDC (Mdx + CDC,  $n = 12$ ) 又はビヒクル [プラセボ: Mdx + ビヒクル (PBS),  $n = 12$ ] で、それぞれ2回 (3カ月間隔) 注射した。開胸術の間に28 - 1/2ゲージ針により注射を行った。動物が全身麻酔 (デクスメトミジン (0.5 mg/k) / ケタミン (75 mg/kg); IP; 手術前に1回) の状態にある間に全ての外科手術の手順を行った。CDC由来エキソソーム、NHDF由来エキソソーム (対照として)、miR-148a-3p (Sigma-Aldrich カタログ番号HMI0237)、マイクロRNA模倣対照 (Sigma-Aldrich カタログ番号HMC0002)、srDMD、及び変異体srDMDの注射のため、同様のプロトコルを使用した。CDC由来エキソソーム [ $(10.32 \pm 3.28) \times 10^9 / 150 \mu$ L PBS] 又はPBS単独のLV腔への心室内単回注射を、28 - 1/2ゲージ針により開胸術の間に行った。首の頸動脈を経るPE-10カテーテル (ALZET; カリフォルニア州クパチーノ) を使用して、CDC ( $1 \times 10^4$ 細胞/40 $\mu$ L PBS) 又はPBSの動脈内注射を実施した。31ゲージ針を備えた25 $\mu$ Lハミルトンシリンジ (0.5 $\mu$ Lの印付き) を使用して、筋肉の下1/3の単一の部位でヒラメ筋 (SOL) の筋肉へのエキソソームの筋肉内注射を行った。針を筋肉の上部1/3まで進行させ、次いでエキソソーム [ $(20.64 \pm 2.12) \times 10^7 / 3 \mu$ L] を注射しながら、筋腹を通してゆっくりと引き抜いた。

実施例 2

CDC、CDC由来エキソソーム、NHDF由来エキソソーム、miR-148a-3p、miR模倣対照、srDMD及び変異体srDMD

【0109】

記載される通り、野生型系統適合マウス心臓 (C57BL/10ScSnJ野生型マウス心臓) からマウスCDCを増殖させた。簡潔に言えば、心室組織を約1mmの外植片に細かく刻み、部分的に酵素消化し、接着性 (フィブロネクチンコーティング) 培養皿に播種した。これらの外植片が自然に生じた増殖細胞 (外植片由来細胞) をもたらし、それをコンフルエント後に採取し、懸濁培養液に播種 (ポリ-D-リジンコーティングディッシュ上に細胞 $10^5$ 個/mL) して、三次元心筋球の自己集合を可能にした。続いて、心筋球を接着性培養皿上に再度播種してCDCを得て、これを、全ての実験において1継代目で使用した。CDC由来エキソソーム: 培養したヒトCDCによって一晩 (24時間) 順化した無血清培地からエキソソームを単離した。低酸素 (2%  $O_2$ ; デフォルト条件) 又は酸素正常状態 (20%  $O_2$ 、単独でエキソソームのRNA含量を比較する研究のため) における (CDC由来エキソソーム) [又は対照としての正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)]。300g (10分間) 及び10000g (30分間) の連続する遠心分離、並びに0.22ミクロンフィルタによる濾過後の順化培地からエキソソームを単離するため、超遠心分離 (1時間に亘り100000g) を使用した。単離されたエキソソームをPBSに再懸濁し (in vivo及びin vitroの実験のため)、タンパク質に対するエキソソームの比を、Nanosight particle counter及びMi

c r o B C A P r o t e i n A s s a y K i t ( ニューヨーク州グランドアイランドの L i f e t e c h n o l o g i e s ) をそれぞれ使用して測定した。予備用量応用研究は、i n v i t r o 及び i n v i v o ( 心筋内 C D C 由来エキソソーム注射 ) 実験に対して、それぞれ  $[ ( 2 . 2 4 \pm 1 . 3 4 ) \times 1 0 ^ 7 ]$  及び  $[ 6 . 1 9 \pm 3 . 6 8 \times 1 0 ^ 8 ]$  の低酸素 C D C 由来エキソソームを有効用量と確認した。

#### 【 0 1 1 0 】

総容量 4 0  $\mu$  l で室温にて 3 0 分間の R N A i M A X トランスフェクション試薬 ( ニューヨーク州グランドアイランドの l i f e t e c h n o l o g i e s ) と混合した m i R - 1 4 8 a - 3 p 模倣対照及び m i R 模倣対照 ( h s a - m i R - 1 4 8 a - 3 p 及び m i R N A 陰性対照 1 ; それぞれ 2  $\mu$  g ; ミズーリ州セントルイスの S i g m a - A l d r i c h ) 、短い非コード RNA 、 s r D M D 又は s r D M D 変異体 ( それぞれ 1 2  $\mu$  g ; コロラド州ラファイエットの G E D h a r m a c o n ) を、上に記載される通り、1 つの心臓当たり 4 つのポイントに注射した。

#### 【 0 1 1 1 】

s r D M D 変異体のヌクレオチド配列は、5 ' U C C C C C A C A G A G G C U G A U C G A U U C U C C C U G A A C A G C C U C C U C C G G A G G C A C U G C A G A U C A A G C C C G C C U G G A G A G G U G G A G U U U C A A G A G U C C C C U U C C U G G U U C A C C G U C U C C U U U 3 ' ( 配列番号 6 ) である。

#### 実施例 3

##### 心エコー検査

#### 【 0 1 1 2 】

V e v o 7 7 0 イメージングシステム ( カナダ国トロントの V i s u a l S o n i c s ) を使用して、1 回目の C D C / C D C 由来エキソソームまたはビヒクル注射の 2 日前 ( ベースライン ) 及び 3 週間後、2 カ月後及び 3 カ月後に、並びに 2 回目の C D C / C D C - X O 注射の 3 週間後、2 カ月後及び 3 カ月後に、心エコー検査研究を実施した。同じイメージングシステムを使用して、ベースライン ( 2 日前 ) 及び選択した RNA ( 又は対照 ) の注射の 3 週間後に、心エコー検査研究を実施した。軽い全身麻酔の誘導後に、最大 L V 径のレベルで、心臓をイメージングした。V i s u a l S o n i c s バージョン 1 . 3 . 8 ソフトウェアを用いて、2 次元長軸像から、L V 駆出率 ( L V E F ) を測定した。

#### 【 0 1 1 3 】

C D C 注射後の左心室 ( L V ) 拡張終期容積及び収縮終期容積の変化。1 回目及び 2 回目の C D C 移植は、プラセボと比べて、少なくとも 6 カ月間に亘る m d x マウスにおける L V 拡張終期容積 ( L V E D V ) 及び収縮終期容積 ( L V E S V ) の持続的改善をもたらした。

#### 実施例 4

##### トレッドミル運動試験及び生存率分析

#### 【 0 1 1 4 】

術前 1 週間及び C D C / ビヒクル注射 3 週間後から E x e r - 3 / 6 オープントレッドミル ( オハイオ州コロンバスの C o l u m b u s I n s t r u m e n t s ) を用いて、運動能力を週 1 回評価した ( 術前 1 週間に m d x マウスのサブセットにおいて測定した運動能力は、術後 3 週間に M d x + ビヒクル群において測定したものと同等であった ) 。順応期間 ( 1 0 m / 分で 2 0 分間 ) 後、トレッドミル運動中は、マウスが疲労するまで、平均速度の段階的な増加 ( 1 m / 分 ) を 2 分間毎に適用した ( ショッカーにおいて 1 0 秒超を費やす ; トレッドミル中は、マウスがトラックに留まるのを支援するために、軽く押し続けた ) 。続いて、マウスをケージに戻し、合計距離を記録した。トレッドミルプロトコールは、A m e r i c a n P h y s i o l o g i c a l S o c i e t y のガイドラインに準拠していた。週 1 回の運動を 3 カ月間行った後に、死亡率の評価のために、C D C / ビヒクル m d x マウスを、野生型年齢適合性マウスと一緒に追跡した ( 図 1 C ) 。

#### 実施例 5

##### 骨格筋の i n v i t r o 等尺性収縮特性

## 【0115】

ケタミン/キシラジン(80mg/体重kg及び10mg/体重kgのIP)でマウスに深く麻酔をかけ、ヒラメ筋(SOL)及び/又は長指伸筋(EDL)及び/又は横隔膜(DIA)の筋肉を迅速に摘除し、動物を安楽死させた。簡潔に言えば、下腿側面の正中皮膚切開の後、SOL及び/又はEDLの筋肉を切開し、単離して、その起始腱及び停止腱を絹縫合糸(3-0)で締め、迅速に摘除した。SOL又はEDLの筋肉を、以下の組成:(mM単位)137 NaCl、5 KCl、2 CaCl<sub>2</sub>、1 MgSO<sub>4</sub>、1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、24 NaHCO<sub>3</sub>、11 グルコースの哺乳動物リンガー溶液を含む組織浴に垂直に取り付けた。その溶液を、pHを7.35及び温度24℃に維持しながら95% O<sub>2</sub>及び5% CO<sub>2</sub>で絶えず通気した。横隔膜の研究のため、左肋弓下縁皮膚及び筋肉切開に続いて、肋弓下(midcostal)半横隔膜の切片を、冷リンガー液を含む予備Sylgar裏打ちディッシュに移し、線維を肋骨に付着させ、また絹縫合糸で締めて、組織浴に垂直に取り付けられた腱中心を無傷のままにして、3mm~4mmの幅の狭い横隔膜の条片を単離した。SOL、EDL又はDIAの一端をディッシュ底のクランプに固定し、もう一端を較正済みの力変換器(マサチューセッツ州ウォータータウンのCambridge Technology Model 300B)に取り付けた。システムに連結されたマイクロマニピュレーターを、筋長を調整するために使用した。筋肉の両側に置いた白金プレート電極を、過最大強度で送達される定電流の0.2ミリ秒持続時間単相矩形パルスを使用する直接筋肉刺激(マサチューセッツ州クインシーのGrass Model S88刺激装置)に使用した。最大等尺性単収縮応答が得られるまで筋長を調整した。等尺性収縮特性を最適な長さ(L<sub>0</sub>)で決定した。ピーク単収縮力(P<sub>t</sub>)を一連のシグナルパルスから決定した。力/頻度関係を1秒当たり5パルス~150パルス(PPS)の範囲の刺激頻度で測定した。刺激を、各刺激列の間を少なくとも1分隔てる間隔で、1秒の継続期間の刺激列で提示した。P<sub>t</sub>及び最大強縮力(P<sub>o</sub>)を含む発生した筋力を、筋板の推定される生理学的断面積(CSA)に対して正規化し(CSA=筋肉重量/1.056×L<sub>0</sub>;式中、1.056g/cm<sup>3</sup>が筋肉の密度を表す)、ニュートン(N)/cm<sup>2</sup>で表した。SOL及びEDLに関し、筋肉の比筋力を推定する際に、L<sub>0</sub>も筋線維長に対して正規化した(それぞれ、0.71及び0.44のL<sub>0</sub>)。SOL及びEDLによって発生した絶対筋力も報告する(mN)。

## 実施例6

## iPSC由来心筋細胞

## 【0116】

尿由来細胞を50000細胞/ウェルでマトリゲル(カリフォルニア州サンホセのBD)被覆12ウェルプレートに蒔き、一晚付着させた(0日目)。2日目、3時間、8µg/mlポリブレンの存在下で、細胞を高力価OSKMウイルス上清により形質導入した。ウイルス上清を新鮮なUSC培地で置き換え、3日後にmTeSR1培地(ブリティッシュコロンビア州バンクーバーのStemCell Technology)で置き換え、毎日交換した。iPSC様コロニーが経時的に出現すると、それらを実態解剖顕微鏡(イリノイ州バッファローグローブのLeica M205C)下でガラス毛细管ピペットを使用して採取し、更なる増殖のため新たなマトリゲル被覆プレートに移した。修正を含む確立されたプロトコルに従って、尿由来iPSCを心筋細胞に分化させた。簡潔に言えば、iPSCコロニーをVersene(カリフォルニア州カールスバッドのLife Technologies)と共に10分間インキュベートすることによって剥離させ、単一細胞浮遊液にトリチュレートして、TeSR1培地中250000細胞/cm<sup>2</sup>の密度でマトリゲル被覆プラスチックディッシュに蒔き、更に4日間培養した。次に、培地を、2%インスリン減少B27((Life Technologies)及び新鮮なL-グルタミンで補足したRPMI-1640培地に入れ替えて、分化を開始した。

## 実施例7

## 組織学

## 【0117】

1 回目の C D C / C D C 由来エキソソーム注射 3 週間後 ( C T L : n = 4 ; M d x + ビヒクル : n = 6 ; M d x + C D C / M d x + C D C 由来エキソソーム : それぞれ n = 6 ) 又は 3 カ月後 ( C T L : n = 4 ; M d x + ビヒクル : n = 6 ; M d x + C D C / M d x + C D C 由来エキソソーム : n = 6 ) 及び m i R - 1 4 8 注射 3 週間後 ( n = 6 ) に、マウスを 殺した。組織学のため、各心臓の心尖部、中央部及び心底部由来のパラフィン包埋切片を使用した。線維化の評価のために、マッソントリクローム染色 ( H T 1 5 T r i c h r o m e S t a i n [ M a s s o n ] K i t ; ミズーリ州セントルイスの S i g m a - A l d r i c h ) を実施した。それぞれマウス C D 3、C D 2 0 及び C D 6 8 に対する抗体による免疫染色によって、T 細胞、B 細胞及びマクロファージを評価し、各心臓の心尖領域 ( 3 個の切片 ; 5 0  $\mu$  m 間隔 )、中央領域 ( 4 個の切片 ; 5 0  $\mu$  m 間隔 ) 及び心 10 底領域 ( 3 個の切片 ; 5 0  $\mu$  m 間隔 ) から無作為に選択した 1 0 個の各切片から 1 0 視野 ( 倍率 2 0 倍 ) の細胞を数え、各心臓における平均細胞数を計算した。データを細胞 / m m <sup>2</sup> 視野の数として提示した。活性なサイクリング ( K i 6 7 <sup>+</sup> ) 及び増殖 ( A u r o r a B <sup>+</sup> ) 心筋細胞、並びにジストロフィンに対して陽性の心筋細胞を同様に数え、記載されているように、K i 6 7 <sup>+</sup>、A u r o r a B <sup>+</sup> 及びジストロフィン<sup>+</sup>心筋細胞の数を強拡大視野 ( H P F ) 当たりの心筋細胞の総数で割ったものとして、サイクリング画分及び増殖画分、並びにジストロフィン陽性心筋細胞をそれぞれ表した。各心臓について、測定結果を平均化した。

#### 【 0 1 1 8 】

免疫蛍光染色 : 低又は高 p H 緩衝液 ( カリフォルニア州カーピンテリアの D A K O ) 中で 20 熱誘導性エピトープ回復を行い、続いて 1 % サポニン ( ミズーリ州セントルイスの S i g m a ; 3 % サポニンを含有するタンパク質ブロッキング溶液を K i 6 7 の免疫蛍光染色に適用した ) を含有するタンパク質ブロッキング溶液で 2 時間透過処理 / ブロッキングした。続いて、各心臓の心尖部、中央部及び心底部由来の 5  $\mu$  m 切片の免疫蛍光染色のため、一次抗体のタンパク質ブロッキング溶液を 4 で一晩適用した。P B S で 3 回洗浄 ( 各 1 0 分間 ) した後に、A l e x a F l u o r 二次抗体 ( ニューヨーク州グランドアイランドの L i f e T e c h n o l o g i e s ) を検出に使用した。L e i c a T C S S P 5 X 共焦点顕微鏡システムによって、画像を撮影した。マウスジストロフィン ( 1  $\mu$  g / m l ; カリフォルニア州フリーモントの T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c )、K i - 6 7 ( S P 6 ; 1 : 5 0 ; カリフォルニア州フリーモントの T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c )、W G A ( コムギ胚芽凝集素 ; 1 : 2 0 0 ; ニュー 30 ヲーク州グランドアイランドの L i f e T e c h n o l o g i e s )、N r f 2 ( C 2 0 ; 1 : 5 0 ; カリフォルニア州サンタクルスの S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y )、a u r o r a B ( 1 : 2 5 0 ; カリフォルニア州サンホセの B D B i o s c i e n c e s ) に対する抗体を使用して、免疫蛍光染色を行った。

#### 【 0 1 1 9 】

免疫ペルオキシダーゼ染色 : V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m ( アリゾナ州 ツーソン ; C D 6 8 ) 及び C e l l M a r q u e ( カリフォルニア州ロッキン ; C D 3、C D 2 0 ) の予め希釈されているウサギモノクローナル抗体を使用して、C D 3、C D 2 0 及び C D 6 8 の免疫組織化学的検出を 5  $\mu$  m 切片で実施した。高 p H E R 2 緩衝 40 液 ( イリノイ州バッファローグローブの L e i c a B i o s y s t e m s ) 中でオンボード熱誘導性エピトープ回復法を使用して、L e i c a B o n d - M a x V e n t a n a 自動スライド染色機 ( イリノイ州シカゴ ) によって、染色を行った。D a k o E n v i s i o n <sup>+</sup> ウサギ検出システム及び D a k o D A B ( カリフォルニア州カーピンテリア ) を使用して、染色を可視化した。続いて、メイヤーヘマトキシリンでスライドを 1 分間対比染色し、カバーガラスで覆った。

#### 【 0 1 2 0 】

電子顕微鏡法 : 1 m m <sup>3</sup> の立方体を 2 % グルタルアルデヒドに浸漬することによって、各心臓由来の後壁の心尖部 ( 1 つの立方体 )、中央部 ( 右側サブ部分、中央サブ部分及び左側サブ部分から 3 つの立方体 ) 及び心底部 ( 右側サブ部分、中央サブ部分及び左側サブ部 50



分から3つの立方体) (CTL: n = 3; Mdx + ビヒクル: n = 3; Mdx + CDC: n = 3) を固定し、オスミウムで後固定し、エポンに包埋した。切片を銀厚で切断し、酢酸ウラニル及びクエン酸塩で染色し、AMTデジタルカメラシステムを備えるJEOL 1010を用いて観察した。

#### 実施例 8

##### ウエスタンブロット

##### 【0121】

ウエスタンブロットを実施して、Nrf2シグナル伝達 [Nrf2、リン酸化Nrf2 (Nrf2 - p<sup>S40</sup>) 及びNrf2下流遺伝子産物: ヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO - 1)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ - 2 (SOD - 2)、及びグルタミン酸 - システインリガーゼ (GCLC) の触媒サブユニット]、Nrf2リン酸化 [リン酸化Akt (Akt - p<sup>T308</sup>)]、酸化的リン酸化 [CI (NDUFB8サブユニット)、CII (SDHBサブユニット)、CIV (MTCO1サブユニット)、CIII (UQCRC2サブユニット) 及びCV (ATPSAサブユニット)]、ミトコンドリア合成 (PGC - 1)、マイトファジー (PINK1)、炎症 (NF - 及びMCP - 1) 及び線維化 (コラーゲンIA1及びコラーゲンIIIA1) に寄与するジストロフィン及び標的タンパク質の心筋存在量を比較した。ウエスタンブロッティング (WB) によって、酸化ストレスのマーカーであるマロンジアルデヒドタンパク質付加物の心筋密度も測定した。各心臓の心尖部、中央部及び心底部由来のサンプル (各1mm厚の横断面) を混合し、均質化し、製造業者の指示 (Cell Lytic Nuclear Extraction Kit、ミズーリ州セントルイスのSigma - Aldrich) に従って、核画分及び細胞質画分を抽出した。呼吸測定の際に記載されているように、新鮮な全心臓 (CTL: n = 3; Mdx + ビヒクル: n = 8; Mdx + CDC: n = 8) からミトコンドリアを抽出した。WB分析のための細胞質抽出物、核抽出物及びミトコンドリア抽出物を - 80 で保存した。マイクロBCAタンパク質アッセイキット (ニューヨーク州グランドアイランドのLife technologies) によって、抽出物中のタンパク質濃度を決定した。以下の抗体を使用してウエスタンブロット分析によって、細胞質画分、核画分及びミトコンドリア画分の標的タンパク質を測定した: マウスNrf2、HO - 1、カタラーゼ、SOD - 2、GCLC、コラーゲンIA1及びコラーゲンIIIA1、並びにPGC - 1に対する抗体を、Santa Cruz Biotechnology (カリフォルニア州サンタクルス) から購入し、リン酸化Nrf2 (Nrf2 - p<sup>S40</sup>; カリフォルニア州サンフランシスコのBiorbyt)、呼吸鎖サブユニット (全OXPHOS齧歯類WB抗体カクテル抗体)、マロンジアルデヒド、クエン酸シンターゼ及びTBP (Abcam、マサチューセッツ州ケンブリッジ)、Akt及びAkt - p<sup>T308</sup>、p - (カリフォルニア州デンプーのCell Signaling Technology)、PINK1、MCP - 1及びNF - p65 (ミズーリ州セントルイスのSigma - Aldrich) 抗体を、引用されている供給業者から購入した。核 (TBP)、細胞質ゾル及びミトコンドリア (クエン酸シンターゼ) 標的タンパク質のハウスキーピングタンパク質の測定のために、TBP (TATA結合タンパク質) 及びクエン酸シンターゼに対する抗体を使用した。

##### 【0122】

ウエスタンブロット法: 簡潔に言えば、8%、10%及び4% ~ 12% Bis - Tris ゲル (ニューヨーク州グランドアイランドのLife technologies) 上で、20 µgのタンパク質を含有するアリコートに120Vで2時間分画し、PVDF膜 (ニューヨーク州グランドアイランドのLife technologies) に転写した。ブロッキング緩衝液 (1xTBS、0.05% Tween - 20及び5%脱脂乳) 中で膜を1時間インキュベートし、次いで、最適希釈で所定の抗体を含有する同じ緩衝液中で一晩インキュベートした。メンブレンを、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG、抗マウスIgG (コロラド州デンプーのCell Signaling Technology) 及び抗ヤギIgG (ミズーリ州セントルイスのSigma - Aldrich

h) を 1 : 1 0 0 0 ~ 3 0 0 0 希釈で含むバッファー ( T B S、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 及び 3 % 脱脂乳 ) 中で 2 時間インキュベートする前に、1 × T B S、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 中で 5 分間、3 回洗浄した。メンブレンを 1 × T B S、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 中で 5 分間、3 回洗浄し、E C L 化学発光物質 ( S u p e r S i g n a l W e s t P i c o C h e m i l u m i n e s c e n t S u b s t r a t e ; ニューヨーク州グランドアイランドの L i f e T e c h n o l o g i e s ) を使用してオートルミノグラフィにより発色させた。クエン酸シンターゼ及び T B P を、それに対して目的のタンパク質の発現が正規化されるハウスキーピングタンパク質として使用した。リン酸化された A k t、N r f 2 及び I B - を、A k t、N r f 2 及び I B - の合計に対して正規化した。コラーゲン I 及びコラーゲン I I I のウエスタンブロット解析を、非還元、非変性条件下で行った。

10

#### 実施例 9

##### 統計分析

##### 【 0 1 2 3 】

平均 ± S D として提示される代替データに対する結果を除いて、全てのプールデータを平均 ± S E M として提示する。それぞれコルモゴロフ・スミルノフ検定及びレーベン検定を使用して、データセットの正規性及び等分散性を試験した。両方とも確認された場合、t 検定又は分散分析とそれに続くボンフェローニ事後検定を統計的有意性の決定に使用した；正規性又は等分散性のいずれかが保証されなかった場合、ノンパラメトリック検定 ( ウィルコクソン検定又はクラスカル・ワリス検定とそれに続くダン事後検定 ) を適用した ( S P S S I I、イリノイ州シカゴの S P S S I n c . )。検出力分析について、予備データは利用不可能であった。パイロットプロジェクトの結果から、本発明者らは、その後の研究を行うことができた。本研究は、記載されているように、臨床前報告基準に準拠していた。年齢適合マウスを、コンピューターに生成された無作為化スケジュールを使用して実験群に無作為に割り付けた。実験の実施、並びに結果及び転帰の解析を盲検法 ( 割り付けの隠匿及び盲検評価 ) で行った。非盲検の前の解析後にマウス又はデータの事後の排除はなかった。

20

##### 【 0 1 2 4 】

駆出率データ：ベースライン、及び m d x 及び対応する野生型マウス ( C 5 7 B L / 1 0 S c S n J ) における細胞又はビヒクル対照による処理の 3 週間後の駆出率を測定する、1 群当たり 5 匹の動物のパイロット研究から予備データを収集した。測定された治療効果は、およそ 1 単位の時間効果、3 . 5 単位の群標準偏差を伴って、およそ 4 単位であった。本発明者らは、測定された分散の増加の可能性がある、より後の時間点について、群間のより大きな差を予想した。したがって、複合対称性共分散構造、経時的な動物の測定間の相関 0 . 7、及び両側 0 0 5 を仮定する ( P o w e r c o m p u t e d v i a P A S S v . 1 1 . 0 . )、経時的に動物 1 匹当たり 6 回の測定を含む研究計画で、各 m d x 群において 1 処理群当たり 1 2 匹の動物、及び 7 匹の野生型対照動物により、研究は、治療効果において 4 . 5 単位以上及び時間効果において 1 . 4 単位以上の違いを検出するための少なくとも 8 0 % の検定力を有していた。

30

##### 【 0 1 2 5 】

トレッドミルデータ：ベースライン、及び m d x 及び対応する野生型マウスにおける細胞又はビヒクル対照による処理の 3 週間後のトレッドミル距離 ( すなわち、以下に記載されるように、疲労する前に歩行した距離 ) を測定する、1 群当たり 5 匹の動物のパイロット研究から予備データを収集した。測定された処理効果は、およそ 1 5 0 メートルであり、非処理群では経時的な観察の差が限定的であった。群標準偏差はおよそ 7 5 メートルであり、処理後に観察されたより大きな偏差を伴っていた。本発明者らは、測定された分散の増加の可能性があるより後の時間点について、群間のより大きな差を予想した。したがって、複合対称性共分散構造、経時的な動物の測定間の相関 0 . 7、及び両側 0 0 5 を仮定する ( P o w e r c o m p u t e d v i a P A S S v . 1 1 . 0 . )、動物 1 匹当たり 1 2 回の経時的な測定を含む研究計画で、各トランスジェニック群において 1 処理

40

50

群当たり 11 匹の動物、及び 7 匹の野生型対照動物により、研究は、治療効果において 100 メートル以上の違い、及び経時的に少なくとも 30 メートルの変化を検出するための少なくとも 80 % の検定力を有していた。

#### 実施例 10

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応による CDC の生着の評価

##### 【0126】

細胞生着を評価するため、CDC 注射の 1 週間後、2 週間後及び 3 週間後に定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。TaqMan アッセイ (カリフォルニア州フォスターシティの Applied Biosystems) を使用して、生着のマーカーとして Y 染色体上に位置する SRY 遺伝子の検出を可能とするため、雄性 CDC を雌性 mdx マウスに注射した。マウス心臓全体を採取し、計量して、均質化した。注射した CDC から単離されたゲノム DNA の複数の希釈物を用いて標準曲線を作成した。全てのサンプルを、対照として注射していないマウス心臓に由来する等量のゲノム DNA でスパイクした。各反応について、50 ng のゲノム DNA を使用した。リアルタイム PCR を 3 回反復して行った。

##### 【0127】

標準曲線より生着を定量した。1 週間目の CDC のパーセンテージ生着は約 8 % であり、2 週間目には 1 % 未満であった。3 週間には生存する CDC を検出することはできなかった。

#### 実施例 11

呼吸測定

##### 【0128】

イソフルラン麻酔後に、頸部脱臼によってマウスを殺した。心臓を直ちに摘出し、PBS ですすぎ、1 mL の氷冷 HES 緩衝液 (250 mM スクロース、1 mM EDTA、10 mM HEPES、pH 7.4) 中でポリトロンによって均質化した。溶解物を 4、1000 g で 5 分間スピンドウンして、破碎されていない細胞及び大きな残屑を除去した。次いで、上清を 4、7000 g で 10 分間スピンドウンして、粗細胞質ゾルからミトコンドリアが豊富な画分を分離した。ペレットを 1 mL の HES 緩衝液 (WB 用の溶解緩衝液の一部) に再懸濁した。タンパク質の定量を実施し、HES 緩衝液で調整して、50 µL の緩衝液中に 10 µg のタンパク質を含有するサンプルを得て、これを 24 ウェル Seahorse 細胞培養プレートにロードし、これを 4、2000 g で 20 分間スピンドウンして、プレート表面へのミトコンドリア接着を可能とした。次いで、Seahorse XF24 ミトコンドリアストレス試験の前に、450 µL MAS 緩衝液 (70 mM スクロース、220 mM マンニトール、5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、0.2 % 脂肪酸不含 BSA、pH 7.4) を添加した。5 mM / 5 mM ピルビン酸 / リンゴ酸及び 0.25 mM ADP を使用し、続いて、1 µM オリゴマイシン、1 µM FCCP、1 µM アンチマイシン、500 nM ロテノンの混合物を使用して、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を刺激した。サンプル溶解物中でクエン酸シンターゼ活性を測定して、試験のためにロードした実際のミトコンドリアの量について正規化した。記載されるように、Seahorse (商標) XF96 Extracellular Flux 分析器を使用して、正常及びヒトデュシェンヌ iPs 細胞由来心筋細胞に対する Seahorse 呼吸測定を実施した。

#### 実施例 12

蛍光標識付化 CDC 由来エキソソームの全身注射後の mdx マウス器官の生物発光撮像

##### 【0129】

mdx マウス左心室腔への蛍光標識された CDC 由来エキソソームの全身的な注射の 6 時間後、マウスを殺し、器官を解剖して、IVIS 分子イメージングシステム (米国マサチューセッツ州ホプキントンの Caliper Life Sciences) を使用して撮像した。

##### 【0130】

細胞内  $Ca^{2+}$  の記録：5  $\mu$ M の蛍光カルシウム感受性色素  $Ca1-520$ （カリフォルニア州サニーベールの  $AAT\ Bioquest$ ）を  $iPS$  由来心筋細胞に 30 分間ロードし、チャンバー底部の両側に配置した 2 本の白金線（約 1 cm 離間）を介して 20 V の振幅と共に 0.2 ミリ秒二乗の電圧パルスを送達する  $Ion-Optix\ Myopacer$ （ $IonOptix\ Corp$ ）を使用して、周波数 1 Hz の電場刺激によってペーシングした。本発明者らは、 $Leica\ TCS-SP5-II$ （ $Leica\ Microsystems\ Inc.$ ；ドイツ国ヴェツラー）の  $xyt$  モード（2D）を使用して、細胞内  $Ca^{2+}$  をイメージングした。488 nm レーザーで  $Ca1520$  を励起し、視野サイズに応じて 36 ミリ秒/フレーム～7 ミリ秒/フレームのスキャン速度で、10 倍対物レンズ（ $Leica: NPLAN\ 10\times/0.25$ ）を用いて、その発光（505 nm 超）を収集した。 $Ca^{2+}$  濃度に比例する蛍光強度（ $F$ ）を、ベースライン蛍光  $F_0$ （ $F/F_0$ ）に対して正規化した。ソフトウェア  $Clampfit$ （ $ver. 10.2$ 、 $Molecular\ Devices, Inc.$ ）を用いて、ピーク到達時間及び  $Ca^{2+}$  トランジェント振幅（ $F/F_0$ ）を分析した。各群における心拍間隔の交互脈を、1 Hz ペーシングの 5 秒～10 秒間隔で計算した。ペーシング中に各細胞の各トランジェント振幅（各群で  $n =$  細胞 10 個）を測定し、平均及び標準偏差を計算し、群間で比較した。

#### 【0131】

RNA シーケンシング及び 2 次元階層的クラスタリング：ランダム及びポリ（T）プライミングの混合物を使用して二本鎖  $cDNA$  を作製するため  $Nugen\ Ovation\ RNA-Seq\ System\ V2\ kit$  を使用した。 $Kapa\ LTP\ library\ kit$ （マサチューセッツ州ウィルミントンの  $Kapa\ Biosystems$ ）を使用してシーケンシングライブラリを作製した。ワークフローは、本鎖  $cDNA$  の断片化、平滑末端を生成する末端修復、A-テリング、アダプタライゲーション及び PCR 増幅からなる。1 つのレーンにおけるサンプルのマルチプレクシングには異なるアダプタを使用した。シーケンシングを、ペアリード 100 ランに対して  $Illumina\ HiSeq\ 2500$  で行った。データの質のチェックを  $Illumina\ SAV$  上で行った。デマルチプレクシングを  $Illumina\ CASAVA\ 1.8.2$  で行った。リードを、最初に  $Bowtie2$  バージョン 2.1.0 を使用して最新の  $UCSC$  トランスクリプトセットに対してマッピングし、遺伝子発現レベルを  $RSEM\ v1.2.15$  を使用して推定した。TMM（M 値のトリム平均）を、遺伝子発現を正規化するため使用した。差次的に発現された遺伝子を、 $edgeR$  プログラムを使用して同定した。 $p < 0.05$  を伴う発現の変更及び 2 超の倍率変化を示す遺伝子を、差次的に発現されたとみなした。経路及びネットワークの解析を、 $Ingenuity\ (IPA)$  を使用して行った。 $IPA$  は、供給されたフォーカス遺伝子セットの適合度に従って各ネットワークのスコアを算定する。これらのスコアは、偶然得られたものに対して、ネットワークに属するフォーカス遺伝子の可能性を示す。2 超のスコアは、フォーカス遺伝子ネットワークは単に偶然に生成されたのではないという約 99% 信頼を示す。 $IPA$  によって作製される正規の経路は、アップロードされたデータセットに最も有意である。 $FDR$  オプションを用いるフィッシャーの正確確率検定を、正規の経路の重要性を計算するために使用した。2 次元階層的クラスタリングは、ビヒクル/ $CDC$  又はビヒクル/ $CDC$  由来エキソソーム（静脈内注射） $md\times$  心臓、横隔膜、ヒラメ筋及び  $EDL$  筋の間で少なくとも 2 倍の倍率変化を有する遺伝子を使用した。各行は  $md\times$  分析された組織、各列は遺伝子を表す。プローブセットシグナル値を  $md\times$  分析された組織の平均に対して正規化した。遺伝子発現の相対レベルを、示されるスケールに従って、最低（緑）から最高（赤）で表す：目的の様々な経路に關与する遺伝子の転写産物の倍率変化の例をプロットする。

#### 【0132】

心筋内  $CDC$  注射後の心臓ミトコンドリア：各心臓の心尖部、中央部及び心底部に由来する TEM 画像を、 $CTL$ （野生型）及び  $CDC$ /ビヒクル  $md\times$  マウス心臓におけるミトコンドリアの平均数の計算に使用した。全心臓組織から抽出された DNA（ $QIAamp\ DNA\ Mini\ Kit$ 、メリーランド州ジャーマンタウンの  $QIAGEN$ ）を、製造業

10

20

30

40

50

者の説明書によりPCRフォーマット(NovaQUANT(商標)Mouse Mitochondrial to Nuclear Ratioキット、マサチューセッツ州ビレリカのEMD Millipore)を使用して核DNAに対するミトコンドリア比を測定するため使用した。

### 実施例 13

mdx心臓におけるCDC移植

#### 【0133】

CDCの心筋内注射に続いて、図1Aに示されるように心機能の改善、図1Bに示されるように運動能力の増加、及び図1Cに示されるように生存率の増加が観察された。酸化ストレス及び炎症もDM Dにおける主な役者と確認された。CDC投与は、図1Dに示されるように炎症細胞浸潤の減少、及び図1E、図1F及び図1Gに示されるように酸化ストレスの減少をもたらした。

10

#### 【0134】

これらの結果は、さらに、ミトコンドリア完全性の回復を含んだ。ミトコンドリア構造は、図2Aに示されるように組織的構造の明らかな回復を示し、図2Bに示されるようにサブユニット測定によって確認された。安定したコンピテントミトコンドリアによる再増殖が更に観察された。図3Aに示されるように、損傷したミトコンドリアの最初のターンオーバーの後、健全なミトコンドリアを伴う再増殖が続いた。図3Bに示されるように、群間で同じ数のミトコンドリアが存在した。

20

#### 【0135】

さらに、図4Aに示される顕微鏡画像に示されるように心臓コラーゲン含有量及び線維化の減少が観察され、図4Bに示されるようにコラーゲンタンパク質の検出が確認された。図5Aに示されるように、また図5BにおいてAurora B<sup>+</sup>及びki67<sup>+</sup>の染色により心筋形成における更なる改善が観察された。

#### 【0136】

この態様では、CDCは、骨格筋ミオパチー、筋細胞喪失をもたらす心筋症、線維化、酸化ストレス、炎症、ミトコンドリア無効/喪失、アポトーシス及び線維化を含む、DM Dの主要な特徴を改善するのに効果的であると示される。

#### 【0137】

より具体的には、mdxマウスの心臓へのCDCの第1及び第2(より低用量)の用量の心筋内注射は、少なくとも6カ月に亘って、プラセボと比した左心室機能(駆出率[EF]に現れる)及び容積を改善した。EFにおけるCDC誘導性の改善は、mdx心臓における生存CDCの検出ができなくなる時点を越えて持続した(CDC送達の3週間後)。EFの改善に加えて、CDC注射は歩行機能を増強した。10カ月齢の野生型マウス(CTL)及びmdxマウス(その他の実験で研究されたmdxマウスとは別の)を単回用量のCDC又はビヒクル投与の3週間後に開始する、週1回の高強度トレッドミル運動に供した。CDC処理mdxマウスは、運動能力を測定した3カ月間に亘って、ビヒクル処理mdxマウスと比べて、最大運動能力の実質的な増加を示した;生存率も2つの群で異なっていた。約23カ月齢までに、全てのビヒクル処理mdxマウスが死亡したのに対し、50%超のCDC処理mdxマウスが生存したままであった。機構の調査において、本発明者らは、最初に、CDCの抗酸化、抗炎症、抗線維化及び心筋形の効果を研究した。CDC注射は、酸化ストレス、炎症及びミトコンドリア完全性に関連する遺伝子の発現の大きな変化に結び付いた。Nrf2抗酸化経路が、CDC処理mdx心臓において活性化された。Nrf2は、通常Keap1によって抑制されるが、酸化ストレス(同様に、Akt等のタンパク質キナーゼによるNrf2リン酸化)は、Nrf2-Keap1複合体の解離を引き起こし、Nrf2の核移行及び抗酸化酵素の転写活性化に達する。mdx心臓では、リン酸化Akt、全Nrf2及び各Nrf2のレベルが高い(予想通り、酸化ストレスに応答して);CDC処理は、それらのタンパク質及びそれらの下流遺伝子産物(ヘムオキシゲナーゼ-1[HO-1]、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ-2[SOD-2]及びグルタメートシステインリガーゼ[GLC]の触媒サブユニット

30

40

50

）のレベルを更に増加させた。付随して、マロンジアルデヒド付加物の明らかな減少によって証明されるように、酸化ストレスが減弱された。組織学的分析は、ビヒクル処理 m d x 心臓における広範囲の線維化を明らかにしたが、C D C 処理 m d x 心臓でははるかに少なかった（年齢適合野生型 [ W T ] 対照に匹敵する）。同様に、C D C 処理は、処理の 3 週間後に m d x 心臓組織におけるコラーゲン I 及び I I I の蓄積を大きく回復した。C D C は、m d x 心筋症に特徴的な炎症及びミトコンドリア機能不全を阻害した。炎症促進性のサイトカイン及びケモカインのマスター調節因子である N F B が、ビヒクル m d x 心臓において活性化された。リン酸化 I B 及び各 p 6 5 の増加は M C P 1（単球走化性タンパク質 1）のアップレギュレーション、並びに C D 6 8 + マクロファージ及び C D 3 + T 細胞の蓄積を伴っていた。C D C 注射の 3 週間後では、C D C 処理は、m d x 心臓において N F B の活性化を逆転させ、炎症細胞数を減少させた。ミトコンドリアの構造及び機能は、筋ジストロフィー関連心不全において異常である。全トランスクリプトーム解析は、m d x 心臓のミトコンドリア完全性に関連する遺伝子発現の大きな変化を明らかにした。この知見と一致して、C D C は、ミトコンドリア超微細構造を回復し、ミトコンドリア D N A コピー数を増加（ミトコンドリアの数ではない）させ、呼吸鎖サブユニットレベルを増大させ、単離された m d x ミトコンドリアの不完全な肺活量を正常化させた。注目すべきことに、m d x マウス心臓において C D C 処理 3 週間後に観察されたミトコンドリア完全性の改善及びミトコンドリアターンオーバーの減少は、抗酸化酵素のアップレギュレーション、並びに酸化ストレス及び炎症の減少に関連していた。また、本発明者らは、心筋形成に対する C D C の効果を探索した。ビヒクル処理 m d x 心臓は、恐らくは進行中の心筋細胞喪失の代償として、サイクリング（K i 6 7 +）及び増殖（a u r o r a B +）心筋細胞の数の数倍の増加を示した。C D C は、虚血モデル及び非虚血モデルにおける内因性心筋形成を増加させることが知られている。同様の効果が m d x 心臓においてみられた：C D C 処理は、K i 6 7 + 及び a u r o r a B + 心筋細胞の顕著な増加によって証明されるように、心筋形成を促進した。

#### 【 0 1 3 8 】

興味深いことに、本発明者らは、C D C 処理 m d x 心臓（19.8 ± 2.7 % ジストロフィン陽性心筋細胞）における免疫組織化学（I H C）による明らかなジストロフィン染色を見つけた。ウエスタンブロット（ジストロフィンの C 末端に対する抗体を使用する）は、ビヒクル処理 m d x 心臓におけるジストロフィンの実質的な不在を明らかにしたが、C D C 注射後でははるかに高いレベルであった。ジストロフィンの天然起源の全てのアイソフォームは C D C によって増大された；生理学的に関連する全長アイソフォームを、平均でウエスタンブロットデンストメトリーによる対照レベルの 20.1 ± 0.8 % まで回復した。I H C 又はより定量的に信頼できる免疫ブロットのいずれかによって測定されたジストロフィン回復に関する値は、この範囲のジストロフィン発現の C R I S P R / C a s 9 媒介回復として重要であり、より低い値であっても実質的に機能上の利益をもたらすのに十分である。心筋内 C D C 注射（L V 4 注射部位）は、図 7 B に示されるように全ての測定されたアイソフォームに対するものを含めて、図 7 A に示されるようにジストロフィン発現の増加をもたらした。

#### 実施例 1 4

m d x 心臓における C D C 由来エキソソーム移植

#### 【 0 1 3 9 】

分泌された小胞エキソソームにを介してそれらの治療効果を媒介する C D C に関する報告と一致する、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遅延又は回復における C D C 及び C D C 由来エキソソームの役割の描写を図 8 に示す。C D C は、C D C 由来エキソソームにより媒介されるように、筋細胞喪失を防止し、アポトーシス、線維化及び炎症を減少させる。興味深いことに、心筋内エキソソームは C D C の効果をリキャップする。心筋内 C D C 由来エキソソーム注射は、図 9 A に示されるように、コラーゲンを野生型とほぼ同じレベルまで減少させる。さらに、心筋内エキソソームは、図 9 B 及び図 9 C に示されるように、C D C の効果をリキャップする。エキソソームの注射は、図 9 D に示されるように、駆

出率の段階的な減少を遅らせることができた。

【0140】

CDC処理mdxマウスにおける心臓機能及び運動能力の不均衡な増加。これは、CDC自体、生着したCDCから分泌されるメディエータ（エキソソーム、ECV、タンパク質等）、調節された心臓セクレトーム、及び/又は改善された全身の血行力学に起因し得る。CDC処理されたmdxマウスにおける、図10Aに示される心臓機能及び図10Bに示される運動能力の不均衡な増加。

【0141】

CDCによって分泌されたエキソソーム（すなわち、CDC由来エキソソーム）は、心筋梗塞の齧歯類モデルにおいてCDCの機能的及び構造的な利益を模倣する。mdxマウスでも同様に、CDCの利益は、低酸素CDCによって順化された培地から単離されたエキソソーム（直径約30nm~200nm）により再現された。ヒトCDC由来エキソソームの2回の反復投薬（3カ月間隔）は、ビヒクル注射と比べて、非免疫抑制mdxマウスにおいて最小であるが検出可能なホルモン応答を伴って、EFの持続的な改善に結び付いた。コラーゲンI及びIIIのレベルは減少したが、サイクリン（Ki67<sup>+</sup>）及び増殖（aurora B<sup>+</sup>）心筋細胞の数は、CDC由来エキソソーム注射mdxマウスにおいて増加した。CDC由来エキソソームの効果は、少なくとも部分的には、周辺的心筋によるクラスリン媒介取り込みを介して媒介されていた。親CDCと同様に、心筋内CDC由来エキソソーム注射は、mdx心臓においてジストロフィン発現を増加した。ジストロフィンタンパク質アップレギュレーションの程度は、CDC又はCDC由来エキソソームによる処理後と同等であった。

実施例15

全身的なCDC由来エキソソーム注射

【0142】

全身の利益を媒介するエキソソームの可能性を更に評価するため、本発明者らはmdx心臓の左心室腔にCDC由来エキソソームを注射した。

【0143】

CDC由来エキソソームの心室内注射は、図11Aに示されるように心臓において同様の有益な結果を実証した。CDC由来エキソソームは、図11Bに示されるようにCDC自体を反映する方法で、図11Cに示されるように高い相関度で遺伝子発現を調節することができた。さらに図11D及び図11Eにおいてそれぞれ示されるように、CDC由来エキソソーム注射により駆出率及び距離の両方が改善した。これらの結果は、図11F及び図11Gの遺伝子発現の結果について示されるように、横隔膜において更に観察された。図11Hに示されるように、CDC由来エキソソーム注射によって、単収縮力及び比筋力の両方が改善した。これらの結果は、図11I及び図11Jの遺伝子発現の結果について示されるように、ヒラメ筋において更に観察された。図11Kに示されるように、CDC由来エキソソーム注射によって、単収縮力及び比筋力の両方が改善した。心室内CDC由来エキソソーム注射後の生体内分布は、多くの組織型に亘り幅広い分布を示した。

【0144】

注射の6時間後、蛍光標識されたCDC由来エキソソームは、心臓及び骨格筋のみならず、脳、肝臓、肺、脾臓、腸及び腎臓でも明らかであった。心室内CDC由来エキソソーム注射の3週間後のmdx心臓、横隔膜及びヒラメ筋における変化は、心筋内CDC注射後のこれらの器官で見られた変更を模倣した。mdx心臓では、CDC由来エキソソームの注射の3週間後、本発明者らは、心筋内CDC注射後に見られる変化を反映する大きなトランスクリプトームの変化を見出した。その間に、心臓のジストロフィンレベルは増加し、EFが改善して及び運動能力が増大され、横隔膜は同様に広範囲なトランスクリプトーム変化を示し、これは、ジストロフィンレベルの増加と同様に、心筋内CDC注射後にmdx横隔膜で見られたものと十分に相関した。横隔膜の機能は、実質的には、心室内CDC由来エキソソーム注射の3週間後に正常化された。同様に、ヒラメ筋は、遺伝子発現の特徴的な変化、ジストロフィンのロバストな回復、及び筋肉機能の増強を示す。結果は

、心筋内 C D C 注射のメディエータとして C D C 由来エキソソームを集合的に関係づける。

#### 実施例 1 6

m d x 骨格筋への C D C 由来エキソソーム注射

【 0 1 4 5 】

骨格筋に対する主な効果を調べるため、発明者らは、m d x マウスのヒラメ筋に直接 C D C 由来エキソソームを注射した。上の結果は、骨格筋組織の効果において観察された効果が、少なくとも部分的には C D C 由来エキソソームを介することを示した。ヒラメ筋への直接の C D C 由来エキソソーム注射の結果を、図 1 3 A、図 1 3 B 及び図 1 3 C に示す。M y o D 及びミオゲニンのレベルの更なる改善を図 1 3 D に示す。図 1 3 F 及び図 1 3 G において、I G F 1 R 及び p - p 6 5 のレベルは野生型とほぼ同じに達する。図 1 3 H に示されるヒラメ筋質量、並びに図 1 3 1 に示されるジストロフィン発現及び分布には目に見える改善が観察された。これらの改善は、図 1 3 J に示されるように単収縮及び絶対筋力の改善において更に測定された。

10

【 0 1 4 6 】

m d x マウスにおける C D C の動脈弓内注射では、C D C 由来エキソソーム注射は、図 1 4 A に示されるように横隔膜のトランスクリプトームを調節することができた。i P S C 細胞に由来するヒトデュシェンヌ心筋細胞を評価する場合、図 1 4 B 及び図 1 4 C に示されるように、ジストロフィンタンパク質発現における同様の改善が観察された。

【 0 1 4 7 】

組織学的解析は、野生型と比べて、ビヒクル注射 m d x ヒラメ筋に生存する少数の筋線維を明らかにし、残ったものは肥大型であった。C D C 由来エキソソームは筋線維の総数を著しく増加させて、サイズ分布をより小さな直径にシフトさせ、これは注射の 3 週間後の筋線維増殖の指標である。この解釈と一致して、筋芽細胞及び筋線維の分化を編成する主な転写因子である、M y o D 及びミオゲニンの組織レベルの増加と共に M y o D + 細胞の数は C D C 由来エキソソーム注射後に増大された。生理学的な筋肉成長では、I G F - 1 は、上流のシグナルとして一般的に関係があるとされるが、m d x ヒラメ筋に対する C D C 由来エキソソームの効果は I G F - 1 受容体に依存しなかった。増強された筋肉再生と共に、ヒラメ筋内の C D C 由来エキソソーム注射は、m d x ヒラメ筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を増加させながら（免疫組織化学及びウエスタンブロットの両方によって明らか）、炎症及び線維化を減少させた。正味の影響は、C D C 由来エキソソームを注射したヒラメ筋にける収縮力の十分な回復であった。

20

30

#### 実施例 1 7

i P S C 細胞由来ヒトデュシェンヌ心筋細胞における C D C 由来エキソソーム

【 0 1 4 8 】

D M D の複数のモデルにおける有効性の証明は、C D C 由来エキソソームが実行可能な処理の候補物質の可能性があるという概念を支持し得る。デュシェンヌヒト i P S 由来心筋細胞 ( D M D C M ) は、m d x 心臓のミトコンドリアにおいて観察されたものを思い起こさせる酸素消費速度 ( O C R ) の減少、及び異常なカルシウムサイクリングを含む、D M D に特徴的な多くの表現型の欠陥を示す。1 週間前に C D C エキソソームで D M D C M をプライミングするとジストロフィン発現を増加し（ここでは、m d x 心臓におけるよりも更に大きく、対照レベルの  $27.2 \pm 1.1\%$  まで）、1 H z のバーストペーシング中の心拍間隔のカルシウムトランジェントの変化（催不整脈性の尺度）を抑制し、O C R を正常化した。2 つ D M D モデルにおける実験結果の一致は注目すべきである：m d x マウスはマウスジストロフィン遺伝子のエクソン 2 3 中にミスセンス突然変異を有しているのに対し、その i P S C 細胞が研究された D M D 患者はジストロフィン遺伝子に根本的に異なる遺伝病変を有している（フレームシフトによるエクソン 5 0 欠失）。したがって、C D C 由来エキソソームの有効成分は、単一のジストロフィン突然変異、又は単一のクラスのジストロフィン突然変異に特異的ではない。

40

#### 実施例 1 8

無血清低酸素条件下で調製された C D 由来エキソソーム

50



【 0 1 4 9 】

図 2 8 に示されるように、低酸素培養 C D C に由来するエキソソームのマイクロ R N A は、酸素正常状態のもとで成長させた C D C に由来するエキソソームと比べて豊富である。 - 6 倍 ~ 6 倍の  $\log 2$  倍率変化 ( 2 3 0 個のマイクロ R N A でマイクロ R N A を使用する 2 次元階層的クラスタリングを表す。低酸素エキソソームにおいて 3 8 9 個の検出されたマイクロ R N A ( 無血清低酸素培地で 2 4 時間培養された C D C に由来する ) のうち、 2 4 8 個は、以前にミトコンドリア関連マイクロ R N A と報告されていた。目的のエキソソームの更なる描写を図 2 9 に示す。この態様では、無血清低酸素エキソソームの元での C D C の培養は、正常酸素条件等の代替の培養条件と比較した場合、そこから由来するエキソソームによる効力を高め、有益な利益を改善する可能性がある。

10

実施例 1 9

異種発現系

【 0 1 5 0 】

H E K - 2 9 3 N T 細胞を、 M E M - N E A A 及び 1 0 m M L - グルタミンで補足された D M E M ( ピルビン酸ナトリウムを含まない ) 中の 1 0 % F B S を用いて成長させた。細胞を採取し、 3 継代目に 6 ウェル組織培養処理プレートの 1 ウェル当たり 3 . 5 × 1 0 5 個の細胞密度で蒔いた。細胞を一晩接着させた後、次の日に製造業者のプロトコルに従って R o c h e H P D N A T r a n s f e c t i o n R e a g e n t を使用してトランスフェクトした。簡潔に言えば、全ての試薬を室温にした。次いで、各ウェルについて、 1 μ g のプラスミド D N A を 1 0 0 μ L の O p t i - M E M に懸濁し、該溶液に 4 μ L のトランスフェクション試薬を添加した。この反応物を室温で 3 0 分間インキュベートし、次いで 1 0 0 μ L を各ウェルに滴下して添加した。細胞をトランスフェクション溶液と共に 3 0 で 2 4 時間インキュベートしてタンパク質の翻訳を刺激し、次いで、実験処理物を直接各ウェルに加えた。処理物は以下からなる： U l t r a P u r e 蒸留水 ( D N アーゼ及び R N アーゼを含まない ) 中に再構成された 1 m g G 4 1 8 硫酸塩 ( G i b c o ) 、 1 2 5 n g の m i R - 1 4 8 a 模倣物又は 1 . 2 5 μ g の s r D M D 。ピヒクル処理物は、上に列挙される各処理物に使用される容量に対応する等量の P B S からなる。 2 4 時間の処理期間に続いて、 G F P 蛍光及びルシフェラーゼ活性の解析のため細胞を採取した。簡潔には、 6 ウェルプレートを氷上に置き、各ウェルを氷冷 P B S で 2 回洗浄した。次に 1 m L の氷冷非変性溶解バッファー ( P B S 中、 2 0 m M T r i s H C l p H 8 、 1 3 7 m M N a C l 及び 1 % T r i t o n X - 1 0 0 ) を各ウェルに添加し、氷上で 1 5 分間インキュベートした。次に細胞溶解物を、細胞スクレーパーを使用して微小遠心管に移し、 1 2 0 0 0 R P M で 4 にて 1 時間遠心分離した。上清を新しい予め冷やした微小遠心管に移し、氷上で維持した。各サンプルについて、 2 0 0 μ L の細胞溶解物を、黒色 / 透明底 9 6 ウェルプレートの 1 つのウェルに移した。このプレートを使用して、 S p e c t r a M a x M 5 プレートリーダー上で G F P 蛍光を測定した。次いで、 2 0 μ L の細胞溶解物をそれらの各ウェルから取り、黒色 / 透明底 9 6 ウェルプレートに移した。室温に平衡化したルシフェラーゼ基質 ( S i g m a - A l d r i c h : F U C - 1 ) を、製造業者のプロトコルに従って各ウェルに添加し、 S p e c t r a M a x M 5 プレートリーダー ( トップリード、 1 s 積分時間 ) 上で蛍光を測定した。ルシフェラーゼ基質の添加と蛍光の測定の間に 2 0 秒以上経過しないことを確実にするため、交代でルシフェラーゼ測定を行った。各実験について、トランスフェクトされていない対照の生 G F P 蛍光測定値 ( R F U 単位 ) を、全てのトランスフェクトサンプルに関する蛍光測定値から引いた。次いで、これらの補正值を、対応するルシフェラーゼ活性測定値によって割り算した。最後に、正規化された値を、指数関数を使用して変換した。

20

30

40

【 0 1 5 1 】

生 G F P 蛍光測定値を、対応するルシフェラーゼ活性によって補正し、次いで指数関数 ( 等式 1 ) を使用して変換した。 Y 軸上、 1 はトランスフェクトされていないウェルの蛍光レベルである。生 G F P 蛍光測定を、対応するルシフェラーゼ活性によって補正し、次いで指数関数 ( 等式 1 ) を使用して形質転換した。 Y 軸上、 1 はトランスフェクトされて

50

いないウェルの蛍光レベルである。

【数 1】

$$\text{正規化 GFP} = e^{\left(\frac{\text{GFP}}{\text{LUC}} \times 1000\right)}$$

野生型に対する P T C 及びエクソン 5 0 発現のベースレベル間の非直線の関係は、飽和関数 ( s a t u r a t i n g f u n c t i o n ) によって最も良く説明され、発現の増加 (例えば小胞体ストレスに起因する) 3 に伴って全長融合タンパク質の分解が増加するという仮定と一致している。P T C : ビヒクル ( n = 1 5 )、G 4 1 8 ( n = 7 )、m i R - 1 4 8 a - 3 p ( n = 4 ) 及び s r D M D ( n = 4 ) ; エクソン 5 0 : ビヒクル ( n = 8 )、G 4 1 8 ( n = 3 )、m i R - 1 4 8 a - 3 p ( n = 4 ) 及び s r D M D ( n = 3 ) ; \* P < 0 . 0 5 対ビヒクル。野生型 : C M V プロモータ + C - e G F P タグ + S C 4 0 ホタル l u c ( C - e G F P の前にネオマイシン及び停止コドンはない) を含む哺乳動物発現ベクターにおけるヒト D M D バリエーション D p 4 2 7 m [ B C 1 1 1 5 8 7 . 2 ] P T C : C M V プロモータ + C - e G F P タグ + S C 4 0 ホタル l u c ( C - e G F P の前にネオマイシン及び終始コドンはない) を含む哺乳動物発現ベクターにおけるヒト D M D バリエーション D p 4 2 7 m [ B C 1 1 1 5 8 7 . 2、U A A 終始コドンを導入するためトランスフェクト配列に基づいて 6 8 6 3 位に G を U に変異] エクソン 5 0 : C M V プロモータ + C - e G F P タグ + S V 4 0 - ホタル l u c ( C - e G F P の前にネオマイシン及び終始コドンなし) を含む哺乳動物発現ベクターにおけるヒト D M D バリエーション D p 4 2 7 m [ B C 1 1 1 5 8 7 . 2 , d e l e x o n 5 0 ]

#### 実施例 2 0

m d x 心臓への m i R - 1 4 8 a - 3 p 及び s r D M D の移植

【 0 1 5 2】

図 3 5 A では、s r D M D の明らかな二次構造の描写と共に、正常酸素順化培地から単離された C D C 由来エキソソームと比較した場合の、低酸素順化培地 ( 2 % O<sub>2</sub> ) から単離された C D C 由来エキソソームにおける m i R - 1 4 8 a - 3 p 及び s r D M D の差次的発現を観察した。図 2 8 及び図 2 9 に示される培養条件下での変化の更なる結果。図 3 5 B に示される、ビヒクル、又は m i R - 1 4 8 a - 3 p の模倣物若しくは s r D M D の心筋内注射の 3 週間後の m d x マウス心臓における、ジストロフィンアイソフォーム : d p 4 2 7、d p 2 6 0、d p 1 4 0、d p i 1 6、d p 7 1、d p 4 0 のタンパク質存在量に関するウエスタンブロット及びプールデータ。さらに、図 3 5 C では、ビヒクル、又は m i R - 1 4 8 a - 3 p 若しくは s r D M D の模倣物の心筋内注射の 3 週間後の m d x マウス心臓における、ジストロフィンアイソフォーム : d p 4 2 7、d p 2 6 0、d p 1 4 0、d p i 1 6、d p 7 1、d p 4 0 のタンパク質存在量、及びジストロフィン発現のレベルに関するウエスタンブロット及びプールデータ。

#### 実施例 2 1

エクソンスキッピング / 選択的スプライシングの排除

【 0 1 5 3】

図 3 6 では、m i R - 1 4 8 a - 3 p は N F - B p 6 5 及びリン酸化 - A k t の両方のレベルの減少をもたらした。N F - B p 6 5 及び A k t は m i R - 1 4 8 a - 3 p の既知の標的である。図 3 6 B では、ジストロフィンのエクソン 2 3 に隣接するプライマーを使用する R T - P C R。上記 R T - P C R をビヒクル、m i R - 1 4 8 a - 3 p 又は s r D M D で処理したマウス ( n = 4 ~ 6 ) に由来する m d x 心臓において発現されたジストロフィンにおけるエクソン 2 3 の包含を評価するため使用した。ビヒクル、m i R - 1 4 8 a - 3 p 又は s r D M D で処理したマウス心臓に由来するジストロフィンに関する R N A - S e q データの S a s h i m i プロットは、エクソン 2 3 に亘るジャンクションリード ( j u n c t i o n r e a d ) を表さない。全てのデータは平均 ± S E M である。‡ P < 0 . 0 0 2 対 m i R - 1 4 8 a - 3 p 及び s r D M D ; † P < 0 . 0 3 対 m i R -

148a-3p及びCTL(野生型)。

【0154】

図37Bにおける、ジストロフィン遺伝子(PTC)のエクソン23中の点突然変異又はジストロフィン遺伝子エクソン50の欠失(エクソン50)を持つ、デュアルレポーターコンストラクトを用いてトランスフェクトされたHEK293NT細胞におけるmiR-148a-3p又はsrDMDによる処理後のジストロフィン/eGFP発現のパーセンテージ増加[ビヒクル(PBS)と比較]。

#### 実施例22

ジストロフィン発現及びその結果

【0155】

図38Aにおける、mdxマウスのベースライン、及びmiR-148a-3p又はマイクロRNA模倣対照[miRMimic(CTL)]の心筋内注射の3週間後の駆出率(EF)。参照のため野生型(WT)EF値も示す、1群当たりn=5。図38Bにおける、心筋内注射の3週間後の野生型(WT)マウス心臓、及びビヒクル(Veh.)、変異体srDMD及びsrDMD注射(srDMD)mdxマウス心臓のタンパク質存在量を表すウエスタンブロット。

#### 実施例23

異種発現を使用する機構的研究

【0156】

図39Aに示されるように、全長ヒトジストロフィンを、野生型又は2つの変異体：エクソン23(PTC)中のUAA中途終止コドン、又はエクソン50欠失(エクソン50)のうちの1つとしてORFにクローニングした。コンストラクトは、緑色蛍光をジストロフィン発現のレポーターとみなすことができるように、eGFPとインフレームで全長ジストロフィンの融合タンパク質を構築する。恒常的ルシフェラーゼ発現(SV40プロモーターによって独立して駆動される)をトランスフェクション効率に対して正規化するため使用した。

【0157】

図39Bに示されるように、全長(WT)、PTC又はエクソン50のコンストラクトでトランスフェクトしたHEK-293NT細胞のジストロフィン/eGFP発現。96ウェル分光光度計においてウェル毎に全細胞溶解物の蛍光及び発光を定量した；等価な播種密度及び溶解体積で非トランスフェクト細胞を用いて各々ウェルにおける蛍光も定量した。応答は、アミノグリコシドG418に対するものを模倣し、両方の突然変異に対して性質上類似している。いかなる特定の理論にも拘束されないが、これらの知見は、短い非コードRNAが終結因子又はリボソーム自体に作用するという考えを支持する。

#### 実施例24

ジストロフィン再発現のエフェクターとしてのmiR-148a-3p及びsrDMD

【0158】

本発明者らは、機構を探索するため、新規なデュアルレポーターコンストラクト(eGFPに対してインフレームで融合された野生型及び突然変異型のジストロフィン、及び独立して発現されるルシフェラーゼ)の異種発現を利用した。応答は、アミノグリコシドG418に対するものを模倣し、両方の突然変異に対して性質上類似する。両方の種類の突然変異に対する有効性を考慮すれば、短い非コードRNAは、読み替え(recording)を増強するため、遊離因子又はリボソーム自体に作用することによって間接的にジストロフィン発現を増加させる可能性が最も高い。

【0159】

より具体的には、PTCのリードスルー及びリボソームフレームシフトは、特定の遺伝子エラーの転写効率を高める、天然の「読み替え」プロセスである；いずれも、アミノグリコシド抗生物質(in vivoでは毒性となり得る濃度にもかかわらず)によって増強される。翻訳を定量するため、本発明者らは、eGFPにインフレームで融合された全長ヒトジストロフィンを発現するデュアルレポータープラスミドを構築し、ルシフェラ

10

20

30

40

50

ーゼはアッセイトランスフェクション効率とは独立して共発現させた。本発明者らは、野生型ジストロフィン又は2つの変異体：mdx突然変異を模倣するためにPTCを導入するエクソン23中の点突然変異、及びヒトDMD突然変異を複製するエクソン50の欠失を有する別の変異体の各々をコードするプラスミドでトランスフェクトされたHEK-293NT細胞において、ジストロフィン-eGFPが翻訳された場合にのみ見られる緑色蛍光を比較した。ビヒクルのみに対してパーセント増強として表される正規化された蛍光は、両方の変異体において陽性対照としてのアミノグリコシドG418による適切な増加を示した。miR-148a-3p模倣物又はsrDMDの適用は、同様に、両方の変異体においてジストロフィンeGFP発現を増強した。

#### 【0160】

エキソソームの効果は、それらのRNAペイロードに寄与するという確たる証拠がある。ジストロフィントランスクリプトは、RNA-seqにより不在であり、CDC由来エキソソームでは定量的PCRにより検出不可能であったため、ジストロフィン回復はそのRNAの細胞-細胞移入に起因しない。それにもかかわらず、調節性RNAは、不完全なエクソンを除去するためのスプライシング、又は未成熟終始コドンのリードスルーにより、ジストロフィン発現を直接又は間接に増加させるように作用し得る。本発明者らの条件下(24時間の無血清低酸素培地)で成長させたCDC由来エキソソームのRNA-seqは、酸素正常状態のCDC由来エキソソームと比較して、未知の機能のDMD(srDMD)試料に由来するmiR-148a-3p及び小型RNAの144倍及び337倍の増大をそれぞれ含む、大きな違いを明らかにした。エキソソームにおいて配列決定された小型RNA(25bp~200bp)のうち、miR-148a-3pが、その濃縮を考慮すると調査するにふさわしいように見える。この検討に加えて、srDMDがUAA(mdxマウスのジストロフィンのエクソン23中の未成熟終始コドン)を含む同族の配列を有し、ナンセンスサプレッサーRNAがリードスルーを促進するように機能し得ることを示唆することから、本発明者らの注意を引いた。miR-148a-3p又はsrDMDの心筋内注射は、投与の3週間後にmdx心臓におけるジストロフィンの発現を回復した。ジストロフィンタンパク質レベルに対するmiR-148a-3pの予想外の生体活性は、miR-148a-3pの既知の効果(NF-Bp65及びリン酸化Aktの両方のレベルの減少)と並行して起こった。srDMDの効果は、これまでのところこの短いRNAが既知の機能を有していないことから際立っていた。同族UAA部位を変更するためのsrDMDの変異導入は、srDMDを無効にした。ナンセンス抑制活性と一致するものの、これらの知見はその機構を証明するには十分ではない。しかしながら、本発明者らは、有力因子としてエクソスキッピングを除外した：miR-148a-3p又はsrDMD注射mdx心臓に由来する配列決定されたジストロフィンmRNAのジャンクションリード解析はエクソン23に及ぶリードがないことを明らかにした。選択的スプライシングに不利な証拠は、排除により、miR-148a-3p又はsrDMDの投与によってみられるジストロフィン発現の増加の根底にある可能性のある機構としてリードスルーの増強を残す。図28及び図29は、低酸素条件下で濃縮される様々なその他のRNAポリヌクレオチド及び処理剤の可能性のある候補物質を収載する。

#### 【0161】

前述の作用を担う可能性のあるエキソソームの含有量を比較するため、srDMDと比較してmiR-148a-3pを測定し、それらはいずれも同様の活性レベル及びジストロフィン発現レベルを示した。

#### 【0162】

本発明者らは、機構を探索するため、新規なデュアルレポーターコンストラクト(eGFPに対してインフレームで融合された野生型及び突然変異型のジストロフィン、及び独立して発現されるルシフェラーゼ)の異種発現を利用した。データは、それらの個々の構成要素であるmiR-148a-3p及びsrDMDが行うように、エキソソームがジストロフィン変異体の翻訳を増加させるという考えを支持する。応答は、アミノグリコシドG418に対するものを模倣し、両方の突然変異に対して性質上類似する。両方の種類の

10

20

30

40

50

突然変異に対する有効性を考慮すれば、C D Cエキソソームは、読み替えを増強するため、遊離因子又はリボソーム自体に作用することによって間接的にジストロフィン発現を増加させる可能性が最も高い。

【 0 1 6 3 】

より具体的には、P T Cのリードスルー ( r e a d - t h r o u g h ) 及びリボソームフレームシフトは、特定の遺伝子エラーの転写効率を高める、天然の「読み替え」プロセスである；いずれも、アミノグリコシド抗生物質によって増強される ( i n v i v o で は毒性となり得る濃度にもかかわらず)。翻訳を定量するため、本発明者らは、e - G F Pにインフレームで融合された全長ヒトジストロフィンを発現するデュアルレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼはアッセイトランスフェクション効率とは独立して共発現した。本発明者らは、野生型ジストロフィン又は2つの変異体：m d x突然変異を模倣するためにP T Cを導入するエクソン23中の点突然変異、及びヒトD M D突然変異を複製するエクソン50の欠失を有する別の変異体の各々をコードするプラスミドでトランスフェクトされたH E K - 2 9 3 N T細胞において、ジストロフィン - e G F Pが翻訳された場合にのみ見られる緑色蛍光を比較した。ビヒクルのみに対してパーセント増強として表される正規化された蛍光は、両方の変異体において陽性対照としてのアミノグリコシドG 4 1 8による適切な増加を示した。C D C - エキソソーム ( X O )、m i R - 1 4 8 a - 3 p模倣物又はs r D M Dの適用は、同様に、両方の変異体においてジストロフィンe G F P発現を増強した。両方の種類の突然変異に対する有効性を考慮すれば、C D Cエキソソーム及びそれらの内容物は、遊離因子又はリボソーム自体に作用することにより間接的にジストロフィン発現を増加させる可能性が最も高い。対照的に、非異栄養性H E K - 2 9 3 N T細胞におけるジストロフィン - e G F P翻訳の観察された増大は、酸化ストレスの緩和による翻訳抑制解除と相反する。ここでは発現ベクターはイントロンを含まないジストロフィンに対するオープンリーディングフレームを使用し、有益な機構としてのスプライシングを更に排除した。データは、それらの構成要素であるm i R - 1 4 8 a - 3 p及びs r D M Dが行うように、エキソソーム自体がジストロフィン変異体の翻訳有効性を増加させるという考えを支持する

#### 実施例 2.5

更なる目的の短い非コードのR N Aの識別及び検証プラットフォーム

【 0 1 6 4 】

e G F P及びルシフェラーゼを使用するデュアルレポーター系の構築は、翻訳効率を増強する生理活性を持つ可能性がある新たな短い非コードR N Aを同定するためのロバストなプラットフォームを提供する。この態様では、治療活性を持つ細胞のR N Aプロファイリングを、濃縮されたR N Aを同定するため不活性な細胞と比較することができる。代替的には、治療活性を有する同じ細胞を、繰り返しになるが濃縮されたR N Aを同定するため、処理活性を増強する又は縮小する変更可能な培養条件に対して比較することができる。これらのアプローチによって同定された短い非コードR N Aを、次に、デュアルレポーター系を発現する細胞との接触によって検証することができる。具体的には、融合インフレームタンパク質 (ジストロフィン - e G F P) が翻訳された場合に見られる緑色蛍光を測定することによる。対照としてのアミノグリコシドとの更なる比較により、翻訳を増強する短い非コードR N Aの生体活性を同定することができる。

#### 実施例 2.6

m d x心臓におけるC D C移植の遠隔効果

【 0 1 6 5 】

C D C及びそれらのエキソソームの心筋内注射は、m d xマウス心臓においてジストロフィンを増加させること及び主要な病態生理学的プロセスを回復させることにより、デュシェンヌ型心筋症を改善した。これらの変化は、運動能力の実質的な増加と関連し、これは、心機能におけるC D Cと関連する改善に対して不相応に見える：E Fは10%未満増加したのに対し、歩行能力は2倍になった。C D C処理m d xマウスにおける運動能力の増強機構を更に評価するため、本発明者らは、C D C又はビヒクルの心筋内注射の3週週

間後に、3つの異なる骨格筋：横隔膜（D I A、重要な呼吸筋）、及び2つの四肢の筋肉（ヒラメ筋及び長指伸筋 [ E D L ]、それぞれ遅筋及び速筋を代表する）を検査した。

#### 【 0 1 6 6 】

上の効果におけるC D C由来エキソソームの寄与を理解するため、本発明者らは、心筋内C D C注射の3週間後に骨格筋、横隔膜及びヒラメ筋を評価した。心筋内C D C注射後の横隔膜遺伝子発現に対する二次的効果はC a <sup>2+</sup>の違いを実証した。追加の結果を、炎症経路及び応答において観察した。心筋内C D C由来エキソソーム注射は、示される野生型とほぼ同じレベルまで酸化ストレスマーカーであるM D Aの減少をもたらした。炎症マーカーであるp 6 5及びI k Bの更なる減少を観察した。炎症細胞の減少と同様に線維化の減少が観察された。横隔膜力発生及びヒラメ筋の改善を観察した。同様に、ヒラメ筋及びE D Lは、トランスクリプトームと機能の両方のレベルにおいて注目すべき改善を示した：ヒラメ筋収縮力は完全に正常化された。遺伝子発現の変化は、横隔膜及びヒラメ筋において有意に相関した。

10

#### 【 0 1 6 7 】

全身の利益を媒介するエキソソームの可能性を更に評価するため、本発明者らは、m d x心臓の左心室腔にC D C由来エキソソームを注射した。C D C由来エキソソームの心室内注射は、示されるように心臓において同様の有益な結果を実証した。C D C由来エキソソームは、C D C自体を反映する方法で遺伝子発現を調節することができた。さらに、駆出率及び距離の両方がC D C及びC D C由来エキソソーム注射によって改善した。これらの結果が横隔膜において更に観察され、C D C由来エキソソーム注射によって強縮力及び比筋力の両方が改善した。これらの結果は、遺伝子発現について示されるヒラメ筋で更に観察され、ここでもC D C由来エキソソーム注射によって強縮力及び比筋力の両方が改善した。

20

#### 実施例 2.7

##### 動物及び注射

#### 【 0 1 6 8 】

全て動物の処置が、シーダーズ - サイナイ医療センター動物実験委員会によって承認された。10カ月齢～12カ月齢のm d x（C 5 7 B L 1 0 / S c S n - D M D <sup>m d x</sup> / J）及び野生型の系統適合（C 5 7 B L 1 0 / S c S n / J）動物をこの研究に使用した。マウスを、12時間の光周期で温度管理された部屋において無菌条件下で飼育した。最大運動能力及びi n v i v o心機能のベースライン測定を注射の前に記録した。C D C（ $2.5 \times 10^5$ 個）及びC D C - e x o s（ $2 \times 10^9$ 個）を100  $\mu$  LのD P B Sに懸濁し、m d xマウスの大腿静脈に注射した。ビヒクル処理m d xマウスは、大腿静脈に同じ容量のD P B S注射を受けた。マウスを、注射後3週間に最大運動能力及びi n v i v o心機能について再度評価し、次いで、組織を採取し、筋肉生理学実験、組織学及び免疫組織化学のため処理するか、又は液体窒素で凍結させて- 8 0 に保存した。

30

##### 心筋球由来細胞培養物及びエキソソーム精製

#### 【 0 1 6 9 】

マウスC D Cを、8週齢の系統適合野生型ドナーから増殖させた。心室を1 mm<sup>3</sup>未満の断片に切断し、洗浄して、部分的にトリプシン（0.05%；G i b c o）で消化した。これらの断片を個別にフィブロネクチン（C o r n i n g）被覆培養ディッシュに蒔き、成長培地 [ イスコフ改変ダルベッコ培地（G I B C O）、20%ウシ胎児血清（A t l a s B i o l o g i c a l s）、1%ペニシリン/ストレプトマイシン（G I B C O）、及びI X 2 - メルカプトエタノール（G I B C O） ] で培養した。変動可能な増殖期間の後、細胞の単層が外植片から出現し、高輝度（p h a s e b r i g h t）細胞が増殖した。外植片を囲んで緩く接着している細胞（外植片由来細胞と称される）を、穏やかな酵素消化（T r y p L E；G I B C O）を使用して採取し、ポリ-D-リジン被覆培養フラスコ（超低接着）に3日間播種した。懸濁培養において、外植片由来細胞は、心筋球と称される三次元クラスターを自然に形成し、これを採取し、フィブロネクチン被覆培養フラスコに播種した。接着培養では、本明細書において他にも開示されるように、心筋球

40

50

はC D Cと称される単層の細胞を形成する。C D Cを3継代～5継代まで増殖させ、これを全ての実験に使用した。エキソソームの生合成を遮断するため、コンフルエントのC D CをD P B Sで洗浄し、培地を無血清培地に取り換えた。i n v i v o実験に使用されるC D Cを洗浄し、接着培養皿から酵素により解離させ、計数してD P B Sに懸濁した。エキソソームを生成するため、ヒトC D Cを5継代目にコンフルエントになるまで培養した。細胞をD P B Sで洗浄し、培地を無血清培地に取り換えた。次いで、C D Cを、生理学的に低酸素（2 % O<sub>2</sub>）で24時間培養した。次いで、順化培地を収集し、0.45 μmフィルタを使用して滅菌濾過し、その後使用するまで凍結した。その後、順化培地を解凍し、エキソソームを3 k D aの遠心フィルタ（E M D M i l l i p o r e）を使用する遠心分離により限外濾過によって精製し濃縮した。濾液のエキソソーム濃度を、ナノ粒子トラッキング解析（N a n o S i g h t N S 3 0 0）によって測定した。次いで、エキソソームを使用する準備ができているチューブに等分し、凍結して、その後使用するまで - 8 0 で保管した。

#### トレッドミル運動試験

##### 【0170】

ショックプレートを装備したE x e r - 3 / 6 齧歯類トレッドミル（C o l u m b u s I n s t r u m e n t s）の内部にマウスを入れた。順化期間中、ショックプレートを非働化して、ベルト速度を10 m / 分に設定し、マウスを環境に順応させるため20分間干渉せずに置いた。順化期間の後、運動プロトコルに従事させた（0.15 mAで1ショック / 秒の頻度でショックプレートを稼働させた）。プロトコルは、毎分1 m / 分でベルト速度を加速することによって、意欲の消耗（v o l i t i o n a l e x h a u s t i o n）を誘導することを意図している。軽く押しながら、10秒超に亘ってショックプレート上で休息しているマウスを、最大運動能力に達したとみなし（累積移動距離を記録する）、運動試験を終了する。

#### i n v i t r oでの単離された骨格筋生理学

##### 【0171】

マウスをイソフルラン吸入で深く麻酔し、ヒラメ筋又は横隔膜の筋肉を素早く摘出した。簡潔に言えば、下腿側面の正中皮膚切開の後、ヒラメ筋を切り開いて、単離して、その起始腱及び停止腱を絹縫合糸（3 - 0）で締め、迅速に摘出した。ヒラメ筋を、以下の組成：（m M単位）137 N a C l、5 K C l、2 C a C l<sub>2</sub>、1 M g S O<sub>4</sub>、1 N a H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、24 N a H C O<sub>3</sub>、11 グルコースの哺乳動物リンガー溶液を含む組織浴に垂直に取り付けた。その溶液を、p Hを7.35及び温度24 に維持しながら95 % O<sub>2</sub>及び5 % C O<sub>2</sub>で絶えず通気した。左肋弓下縁皮膚及び筋肉の切開に続いて、肋弓下半横隔膜の切片を通気した冷リンガー液を含む予備 S y l g a r 裏打ちディッシュに移し、線維を肋骨に付着させ、また絹縫合糸で締められ及び組織浴に垂直に取り付けられた腱中心を無傷のままにして、3 mm ~ 4 mmの幅の狭い横隔膜の条片を単離した。ヒラメ筋の一端をディッシュ底のクランプに固定し、もう一端を較正済みの力変換器（マサチューセッツ州ウォータータウンのC a m b r i d g e T e c h n o l o g y M o d e l 3 0 0 B）に取り付けた。システムに連結されたマイクロマニピュレーターを、筋長を調整するために使用した。筋肉の両側に配置されたプラチナプレート電極を、過最大強度で送達される定電流の0.2ミリ秒持続時間単相矩形パルスを使用する直接の筋肉刺激（マサチューセッツ州クインシーのG r a s s M o d e l S 8 8刺激装置）に使用した。最大等尺性単収縮応答に達するまで筋肉前負荷を増加的に調整した。L oを、デジタルノギス（日本、M i t u t o y o）を使用して0.1 mm精度で測定した。次いで、ピーク単収縮力（P t）、収縮時間（すなわちP tまでの時間）、及び半弛緩時間（すなわちP tが1 / 2最大値になるまでの時間）を一連のシグナルパルスから決定した。力 / 頻度関係を1秒あたり5パルス～180パルスの範囲の刺激頻度で測定した。刺激を、各刺激列の間を少なくとも1分隔てる間隔で、1秒の継続期間のパルス列で提示した。P t及び最大強縮力（P o）を含む発生した筋力を、筋板の推定される生理学的横断面積（C S A）に対して正規化し（C S A = 筋肉重量 / 1.056 × L o；式中、1.056 g / c m<sup>3</sup>が

筋肉の密度を表す)、ニュートン(N)/cm<sup>2</sup>で表した。ヒラメ筋に関し、筋肉の比筋力を推定する際に、Loも筋線維長に対して正規化した(0.71のLo)。発生する絶対筋力も報告する(mN)。

#### 【0172】

図40は、mdxマウスにおける同系心筋球由来細胞(CDC)及びヒトCDC由来エキソソーム(CDC-XO)の単回静脈内投薬による心呼吸系に対する機能的改善を実証する。10カ月齢~12カ月齢の野生型(WT)及びmdxマウスを、心エコー検査によって最大運動能力及びin vivo心機能のベースライン評価に供した。この年齢では、mdxマウスは、左心室駆出率が損なわれたことにより運動に耐える能力が著しく減少していた(図40A)。CDC又はCDC-XOの単回静脈内投薬は、処理の3週間後のmdxマウスの最大運動能力を劇的に改善した。運動能力の改善に加えて、CDC及びCDC-XO処理は、ビヒクル処理mdxマウスと比べて、左心室の機能(駆出率によって証明される)を促進した(図40B)。心機能におけるロバストな改善は、間質性線維化の有意な減少を伴って(図40D)、mdx心臓の組織病理学における全体的な減少(図40C; ビヒクル: 上段パネル、CDC: 中段パネル、及びCDC-XO: 下段パネル)により反映される。

#### 実施例28

#### 【0173】

実施例27に記載される通り動物を処理した。図41及び図42は、mdx心臓のトランスクリプトーム、炎症、酸化ストレス及び再生に対するCDC及びCDC-XOの効果を明らかにする。RNAシーケンシングデータの全トランスクリプトーム解析は、CDC及びCDC-XOが、mdx心臓のトランスクリプトームプロファイルを部分的に回復し、WT心臓へと遺伝子発現を歪めることを実証した(図41A)。722個の差次的に調節される遺伝子のKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)濃縮分析は、サイトカイン-受容体相互作用、補体及び凝固カスケード、並びにNF- $\kappa$ B等の炎症に関与する幾つかの経路における著しいアップレギュレーションを示す(データは示していない)。したがって、炎症促進性遺伝子の宿主のマスター転写調節因子であるNF- $\kappa$ Bの活性化(リン酸化)を探索した。mdx心臓において、NF- $\kappa$ Bは強力に活性化される(図41B)。逆に、CDC及びCDC-XO処理は、リン酸化NF- $\kappa$ Bのタンパク質レベルを減少させ(図41B)、炎症促進性シグナル伝達の減少を示した。NF- $\kappa$ Bシグナル伝達の減少がmdx心臓における炎症に対して生理学的効果を有するかどうかを判断するため、ビヒクル(対照: 標識化mdx)、CDC及びCDC-XO処理マウスに由来するmdx心臓の凍結切片を、活性化マクロファージマーカーであるCD68に対して免疫染色し、共焦点顕微鏡によって免疫蛍光を可視化した。ビヒクル処理mdx心臓と比較して、CDC及びCDC-XO処理mdx心臓は、有意に少ないCD68<sup>+</sup>マクロファージ(図41C及びD)を含み、mdx心臓において炎症を調節するCDC及びCDC-XOの直接的な効果を実証した。mdxマウス由来の心臓は以前にミトコンドリア機能不全を有すると記載されていることから、電子輸送及び酸化的リン酸化に関与する複合体のタンパク質発現に対するアッセイを行った。一貫して、中程度であるが有意な、ほとんどの電子伝達連鎖複合体及びATP合成酵素(複合体V)の減少が実証された(図42A)。対照的に、CDC及びCDC-XO処理は、電子伝達連鎖複合体及びATP合成酵素のタンパク質発現を回復した(図42A)。ミトコンドリア機能不全は、細胞の酸化ストレスの増加と関係している。重篤な酸化剤ストレスによって引き起こされるタンパク質への不可逆酸化修飾である、タンパク質-カルボニル付加物の形成を試験した。CDC及びCDC-XOによる処理はカルボニル化されたタンパク質蓄積をWT心臓と一致するレベルまで減少した(図42B)。最後に、静脈内で送達された場合、CDC又はCDC-XOが、心臓再生のマーカーである心筋細胞の増殖を誘導することができるかどうか判断するため試験を行った。CDC及びCDC-XO処理mdx心臓は、ビヒクル処理mdx心臓と比較して、Ki-67<sup>+</sup>心筋細胞(細胞分裂中に排他的に発現されるタンパク質)が2.5倍~3倍多かった(図42C及びD)。



## 実施例 2.9

### 【0174】

実施例 2.7 に記載される通り動物を処理した。図 4.3 は、CDC 及び CDC-XO の静脈内送達の治療上の利益は、mdx 心臓に限定的ではなく、骨格筋機能の改善にも有効であることを示す。mdx マウスの骨格筋が mdx 心臓と共通の病態生理学的プロセスを共有するならば、CDC 及び CDC-XO の全身送達は、mdx マウスの骨格筋の利益となるかどうかを試験した。ビヒクル処理 mdx マウスは、それぞれ主要な呼吸及び自発運動の筋肉である横隔膜（図 4.3 A ~ 図 4.3 C）及びヒラメ筋（図 4.3 D ~ 図 4.3 F）の等尺性の単収縮力及び強縮力の著しい減少を示した。CDC 及び CDC-XO の静脈内送達は、横隔膜及びヒラメ筋によってもたらされる等尺性の力を強力に促進した（図 4.3 A ~ 図 4.3 F）。mdx 心臓のように、これらの改善は、組織病理学（図 4.3 G；ビヒクル：左パネル、CDC：中パネル、及び CDC-XO：右パネル）及び関連する線維化（図 4.3 H）の減少によって反映される。並行して、CDC 及び CDC-XO 処理は、mdx マウスのヒラメ筋を含む筋線維の数を増加した（図 4.3 I）。

10

## 実施例 3.0

### 【0175】

実施例 2.7 に記載される通り動物を処理した。図 4.4 及び図 4.5 は、トランスクリプトームに対する CDC 及び CDC-XO の効果、並びに mdx マウスのヒラメ筋の炎症を示す。mdx の心臓のように、全トランスクリプトーム分析は、CDC 及び CDC-XO が mdx マウスのヒラメ筋のトランスクリプトームプロファイルを部分的に逆転させることを示す（図 4.4 A）。KEGG 濃縮は、CDC（データは示していない）及び CDC-XO（図 4.4 B）で処理した mdx ヒラメ筋の炎症に関与する経路の劇的なアップレギュレーションを示す。CDC 及び CDC-XO 処理による、TNF 及び NF- $\kappa$ B シグナル伝達に関与する遺伝子の倍率変化（ビヒクル処理 mdx ヒラメ筋に対する）をそれぞれ図 4.3 C 及び図 4.3 D に示す。一貫して、ビヒクルで処理された mdx 心臓では、リン酸化 NF- $\kappa$ B は、WT ヒラメ筋よりもビヒクルで処理された mdx ヒラメ筋で有意に大きかった（図 4.5 A）。次に、ビヒクル、CDC 及び CDC-XO で処理された mdx ヒラメ筋凍結切片の CD68 免疫組織化学を探索した。ビヒクル処理された mdx 心臓のように、ヒラメ筋にも CD68<sup>+</sup> マクロファージが浸潤していた。しかしながら、CDC 及び CDC-XO で処理された mdx 心臓とは異なり、これらの処理はヒラメ筋における CD68<sup>+</sup> マクロファージ蓄積を促進するようであり、これは RNA シーケンシングデータと一致する観察結果である（図 4.5 及び図 4.5 C）。これらの筋肉の束状配列（図 4.5 C 中、 $\alpha$ -サルコメリックアクチン [緑色] チャネル）を注意深く調べると、CDC 及び CDC-XO の処理に起因する CD68<sup>+</sup> マクロファージの蓄積の増加は病的ではないようであることを明らかにする。実際、これらの処理は筋肉の収縮機能を高め（図 4.3 D ~ 図 4.3 F）、タンパク質-カルボニル付加物を減衰させる（データは示していない）。

20

30

### 【0176】

図 4.6 は、単回投与の 3 週間後のヒラメ筋（図 4.6 A）及び横隔膜（図 4.6 B）における全長ジストロフィンアイソフォームのタンパク質発現を適度に増加させる CDC 及び CDC-XO（静脈内送達時）の能力を示す。

40

## 更なる背景及び実施例

上で検討されるように、本明細書で提供される方法及び組成物の幾つかの実施形態は、mdx マウスへの心球由来細胞（CDC）の静脈内投与がそれらの肺における CDC の大部分の蓄積をもたらすという発見にもかかわらず、本書に提示される様々なデータが示すように、治療有効量の CDC を骨格筋ジストロフィーに苦しむヒト対象に投与することにより、異栄養性骨格筋の機能改善が達成され、それによって筋ジストロフィー、例えば DMD に苦しむヒト対象の効果的な治療を可能にするという驚くべき発見に基づく。

### 【0177】

肺に蓄積された CDC は、例えば脚等の異栄養性骨格筋との直接的な相互作用、又は間接的な機構（免疫調節反応や慢性炎症の軽減等）によりエクソソーム及び微小胞を含む細

50

胞外小胞（E V）と並んでパラクリン因子を放出し、それを必要とする対象を治療する治療有効量に達した可能性がある。したがって、この文脈では、理論に拘束されることを望まないが、「治療有効量のC D C」とは、対象において骨格筋機能を増加及び／又は回復し、慢性炎症性免疫応答を免疫調節するために、対象の標的異栄養性骨格筋への十分な量のE Vの送達をもたらす、対象に投与されるC D Cを意味する。

【0178】

したがって、幾つかの実施形態の一態様は、治療有効量の自己又は同種C D C及び／又はE V、例えばエキソソーム及び微小胞を対象に投与することを含む、それを必要とする対象において骨格筋ジストロフィーを安全に処理する方法を提供する。特に、C D C及び／又はE Vの治療有効量は、対象の標的とされる異栄養性骨格筋を処理又は緩和するのに十分である。この文脈において「標的とされる異栄養性骨格筋」とは、異栄養性骨格筋の部位でジストロフィン異常症を治療するのに十分な量ではないかもしれないC D C及び／又はC D Cから分泌され得るE Vの偶発的又は不注意による送達ではなく、治療有効量のC D C及び／又はE Vが、異栄養性骨格筋の部位で対象の特定の異栄養性骨格筋のジストロフィン異常症を治療又は軽減する、及び／又は骨格筋機能を回復するのに十分であることを意味する。

10

【0179】

上記骨格筋ジストロフィーの非限定的な例として、D M D及びベッカー型筋ジストロフィーが挙げられ、ここで、例えば横隔膜、腕及び／又は脚の1つ以上の骨格筋がジストロフィーである。この文脈で治療有効量のC D C及び／又はE Vを投与する手段の非限定的な例には、単回投与又は頻回投与による異栄養性骨格筋への直接の筋肉内注射又は注入、及び全身投与が含まれる。

20

【0180】

別の態様は、異栄養性心筋症を安全に治療する方法を提供し、該方法は、治療有効量のC D Cを対象に全身投与することを含む。特に、C D Cの治療有効量は、対象のジストロフィー心筋を治療又は緩和するのに十分である。上記異栄養性心筋症の非限定的な例としては、急性又は慢性の筋ジストロフィー、例えばD M D又はベッカー型筋ジストロフィーに続発する、又は関連する心不全が含まれる。

【0181】

上で検討されるように、異栄養性組織には、骨格筋及び／又は心筋におけるジストロフィンの欠如又は不足が含まれる。

30

【0182】

幾つかの実施形態では、上記対象はヒト等の哺乳動物である。上記C D Cの全身投与の非限定的な例としては、血管内投与（例えば、静脈内又は動脈内の注射又は注入）、大動脈内投与、心室内投与（例えば、右心室若しくは左心室又は心房への注射又は注入）、脊髄内投与、及び腹腔内投与が挙げられる。前記C D Cの静脈内投与の非限定的な例には、頸静脈及び／又は大腿静脈の注射及び／又は注入が含まれる。頻回投与によるC D Cの上記投与の非限定的な例には、1カ月～5カ月の間隔で2回～10回の投与、例えば、約3カ月の間隔で3回の投与、又は約1週間の間隔で5回の投与が含まれる。頻回投薬によるC D Cの上記投与の非限定的な例には、0週、6週及び12週での3回の投与が含まれる。前記治療有効量のC D Cの非限定的な例としては、少なくとも約 $75 \times 10^6$ 個～ $500 \times 10^6$ 個のC D C、例えば約 $75 \times 10^6$ 個のC D C、約 $150 \times 10^6$ 個のC D C、約 $300 \times 10^6$ 個のC D C、 $400 \times 10^6$ 個のC D C、及び $500 \times 10^6$ 個のC D Cが挙げられる。

40

【0183】

幾つか実施形態は、前述の方法による骨格筋ジストロフィー及び／又はジストロフィー心筋症の治療に使用するためのC D Cを含む製剤を提供する。

【0184】

幾つかの実施形態は、前述の方法に従って骨格筋ジストロフィー及び／又は異栄養性心筋症を治療するため、前述の製剤を使用する。

50

### 心筋球

幾つかの実施形態では、心筋球は、それらの開示が参照により全体が本明細書の一部をなす、国際公開第2005/012510号、及びMessina et al., "Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart," *Circulation Research*, 95:911-921 (2004)に記載される、心臓組織に由来し、自己接着クラスターとして成長する未分化の心臓細胞を含む。

#### 【0185】

簡潔に言えば、手術又は心臓生検の間に患者から心臓組織を収集することができる。心臓組織は、左心室、右心室、中隔、左心房、右心房、分界稜、右心室内膜、中隔又は心室壁、心耳、又はそれらの組み合わせから採取され得る。生検は、例えば、特許出願公開第2009/012422号及び同第2012/0039857号に記載されるように経皮生検鉗子を使用することにより得ることができ、それらの開示は、参照によりその全体が本明細書の一部をなす。次に、組織を直接培養するか、あるいは心臓組織を凍結、解凍してから培養することができる。組織を、コラゲナーゼ、トリプシン等のプロテアーゼ酵素で消化することができる。心臓組織は、線維芽細胞様細胞及び心筋球形成細胞を含む細胞が外植片から成長するように、外植片として培養され得る。幾つかの例では、外植片は、細胞外マトリクスの1つ以上の成分（例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、エラスチン、又は他の細胞外マトリクスタンパク質）で被覆された培養容器で培養される。組織外植片を、心筋球形成細胞を収集する前に、約1週間、2週間、3週間、4週間、又はそれ以上の間培養してもよい。線維芽細胞様細胞の層は、心筋球形成細胞が現れる外植片から成長し得る。心筋球形成細胞は、位相差顕微鏡下では小さく丸い位相の明るい（phase-bright）細胞として出現し得る。心筋球形成細胞を含む外植片を取り巻く細胞は、手作業の方法又は酵素消化によって収集され得る。収集された心筋球形成細胞は、心筋球の形成を促進する条件下で培養され得る。幾つかの態様では、細胞は、緩衝培地、アミノ酸、栄養素、血清又は血清代替物、EGF及びbFGFを含むがこれらに限定されない増殖因子、カルジオトロフィンを含むがこれらに限定されないサイトカイン、並びにトロンピン等の他の心筋球促進因子を含む心筋球成長培地で培養される。心筋球形成細胞は、約20000細胞/mL～100000細胞/mL等、心臓球形成に必要な適切な密度で播種され得る。細胞は、ポリ-D-リジン、又は細胞がディッシュの表面に付着するのを妨げる他の天然又は合成分子で被覆された滅菌ディッシュで培養され得る。心筋球は、心筋球形成細胞を播種した後、約2日～7日又はそれ以上で自然に現れる。

### 心筋球由来細胞（CDC）

#### 【0186】

幾つか実施形態では、CDCは、例えば米国特許出願公開第2012/0315252号に記載される方法で心筋球を操作することにより生成された細胞の集団を含み、その開示は全体を参照することにより本明細書の一部をなす。例えば、CDCは、フィブロネクチン、ヒドロゲル、ポリマー、ラミニン、血清、コラーゲン又はゼラチン等の培養容器の固体表面への細胞の付着を促進する物質で被覆された固体表面に心筋球を播種すること、及び接着単層培養としてそれを増殖することによって生成され得る。CDCは、標準的な細胞培養方法に従って、繰り返し継代することができ、例えば、2回以上継代することができる。

### 細胞外小胞（EV）

#### 【0187】

幾つかの実施形態において、エキソソーム及び微小小胞を含むEVは、細胞の原形質膜の多胞体又はエンドソーム関連領域を含む特定の細胞内経路を介して形成される小胞を含む。EVは、例えば直径が約20nm～150nmの範囲のサイズである。幾つかの場合には、EVは、約1.1g/mL～1.2g/mLの特徴的な浮力密度及び、特徴的な脂質組成を有する。それらの脂質膜はコレステロールが豊富で、スフィンゴミエリン、セラミド、脂質ラフト、及び露出したホスファチジルセリンを含む場合がある。EVは、イン

テグリンや細胞接着分子等の特定のマーカートンパク質を発現するが、一般的にはリソソーム、ミトコンドリア、又はカベオラのマーカーを欠いている。幾つかの実施形態では、EVは、タンパク質、DNA及びRNA（例えば、マイクロRNA及び非コード化RNA）等であるがこれらに限定されない細胞由来成分を含む。幾つかの実施形態では、EVを、エキソソームのレシピエントに対して同種、自己、異種、又は同系の供給源から得られた細胞から得ることができる。

#### 【0188】

幾つかの実施形態では、特定の種類のRNA、例えばマイクロRNA（miRNA）はEVによって運ばれる。miRNAは、多くの場合、標的メッセンジャーRNA転写産物（mRNA）上の相補配列に対する結合により転写後調節因子として機能し、それにより翻訳抑制、標的mRNA分解及び／又は遺伝子サイレンシングをもたらす。例えば、国際公開第2014/028493号に記載されるように、正常なヒト皮膚線維芽細胞から単離されたEVと比較して、miR146aはCDCにおいて250倍超の発現増加を示し、miR210はおよそ30倍アップレギュレートされる。

#### 【0189】

心筋球及びCDCに由来するEVの例は、例えば、国際公開第2014/028493号に記載され、その開示は全体を参照することにより本明細書の一部をなす。EVの調製方法には、馴化培地で循環心筋球又はCDCを培養する工程、馴化培地から細胞を単離する工程、連続遠心分離等によりEVを精製する工程、及び任意に密度勾配、例えばスクロース密度勾配でEVを清澄化する工程が含まれる。幾つかの場合には、単離及び精製されたEVは、心筋球又はCDCの成分等の非エキソソーム成分を本質的に含まない。EVは、0.01%～1%のヒト血清アルブミンを含む滅菌PBSバッファー等のバッファーに再懸濁されてもよい。EVを将来使用するため凍結して保管することができる。

#### 実施例31：マウスCDCの調製

#### 【0190】

本明細書で提供される組成物及び方法の幾つかの実施形態には、マウス又はヒト等の哺乳動物から調製されたCDCが含まれる。マウスCDCを使用する例では、例えば、Smith, R. R. et al., Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens, Circulation 115, 896-908 (2007)に記載される通り、野生型系統適合マウス心臓（C57BL/10ScSn野生型マウス心臓）からマウスCDCを増殖させた。簡潔に言えば、心室組織を約1mmの外植片に切り刻み、酵素で部分的に消化し、接着性（フィブロネクチン被覆）培養皿に播種した。これらの外植片は自発的に成長細胞（外植片由来細胞）を生成し、一旦コンフルエントで採取され、懸濁培養（ポリ-D-リジン被覆ディッシュに $10^5$ 細胞/mL）に播種して、3次元心筋球の自己組織化を可能とした。その後、接着培養皿に心筋球を再播種すると、3継代目、4継代目、又は5継代目で使用されるCDCが得られた。

#### 実施例32：mdxマウスの運動能力

#### 【0191】

図47に示すように、処理前に、8カ月齢～10カ月齢のmdxマウスにおける左心室駆出率のベースライン測定値を心エコー検査によって得て、トレッドミル運動を使用して運動能力を測定した。CDC処理又はビヒクル対照をt=0週に与えた。CDC処理は、75000細胞（頸静脈に静脈内注射）、150000細胞（特に指定のない限り頸静脈に静脈内注射）、又は250000細胞（大腿静脈に静脈内注射）の3種類のCDCの用量のいずれか1つを含んだ。ビヒクル対照はPBS（頸静脈に静脈内注射）を含んだ。左心室駆出率を、処理の3週間後に測定した。運動能力を、処理後6週間にわたり週1回測定した。研究の終わりに、マウスを殺し、分離した筋肉機能を各マウスのヒラメ筋及び横隔膜で測定し、マッソントリクローム染色により心臓組織を分析してコラーゲン沈着を測定した。図47に示される実験プロトコルを使用して、図48A、図48B、図49及び図

50A～図54、並びに実施例32A～36Bに記載されるデータを生成した。

【0192】

一実験では、投与経路が運動能力に影響を与えたかどうかを判断するため、mdxマウスの頸静脈又は大腿静脈のいずれかにCDCを静脈内投与した。マウスは、0週間で頸静脈(n=4)若しくは大腿静脈(n=4)により15000個のCDCで処理されるか、又はCDCを含まないPBSビヒクル(n=10)を投与された。運動能力を週1回評価し、図48Aに示す。Exer-3/6オープントレッドミル(オハイオ週コロンバスのColumbus Instruments)で運動能力を評価した。各マウスについて、順応期間(20分で10m/分)の後、マウスが疲労するまでレッドミル運動中に2分ごとに平均速度の段階的な増加(2m/分)を適用した(ショッカーにおいて10秒超を費やすまで;レッドミル中は、マウスがトラックに留まるのを支援するために、軽く押し続けた)。その後、マウスをケージに戻し、レッドミル上を移動した合計距離を記録した。両方の処理経路(頸部及び大腿部)は、6週間の研究期間中に同様の運動能力の増加をもたらした。\*=対照に対して $p < 0.05$ 。したがって、幾つか実施形態では、全身投与によるCDC処理は、骨格筋のジストロフィン異常症を伴う、DMD又はベッカー型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーを有す対象の運動能力を改善する。治療上有効な投与には、頸静脈又は大腿静脈等の血管又は静脈への静脈内注射が含まれる。

【0193】

運動能力、筋肉機能、体重、並びに心臓の線維化、構造及び機能に対する様々なCDC用量の効果を判断するため、一連の実験を行った(実施例32～実施例36Bに記載)。マウスを0週に75000個のCDC(n=8)、150000個のCDC(n=8)若しくは250000個のCDC(n=4)、又はPBSビヒクル(n=12)のIV投与で処理し、Exer-3/6オープントレッドミルで運動能力を毎週評価した。各マウスについて、順応期間(20分で10m/分)の後、マウスが疲労するまでレッドミル運動中に2分ごとに平均速度の段階的な増加(2m/分)を適用した(ショッカーにおいて10秒超を費やすまで;レッドミル中は、マウスがトラックに留まるのを支援するために、軽く押し続けた)。その後、マウスをケージに戻し、マウスが移動した合計距離を記録した。結果を図48Bにグラフで示す。処理後1週間～3週間で運動能力が最初に増加した後、75KのCDCで処理されたマウスの運動能力はPBS処理マウスの運動能力に戻った。150K及び250KのCDCで処理されたマウスは、75K又はPBSで処理されたマウスと比較して、6週間の研究の間、運動能力の増加を示し、用量応答を示した。\*=対照に対して $p < 0.05$ 。これらの結果はいずれも、一部の実施形態では、約75000個、100000個、125000個、150000個、200000個、250000個のCDC、又は約500000個若しくは $1 \times 10^6$ 個のCDC等の用量が、骨格筋のジストロフィン異常症を伴う、DMD又はベッカー型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーを有する対象の運動能力を改善するのに治療上有効であることを示す。これらの結果はまた、幾つかの実施形態では、前述の数のCDCを含む及び/又はそれに及ぶ範囲が、骨格筋のジストロフィン異常症を伴う、DMD又はベッカー型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーを有する対象の運動能力を改善するのに治療上有効であることを示している。これらの結果はまた、幾つかの実施形態では、約150000個、200000個、250000個、500000個、又は $1 \times 10^6$ 個のCDCの用量、又はより多くのCDCが75000個のCDCの用量よりも更に有効となり得ることを示す。したがって、幾つかの実施形態では、約75000個～約250000個のCDC、又は約150000個～約250000個のCDCの全身投与を使用して、ランニング能力を含む対象の運動能力を改善する可能性がある。

【0194】

本明細書及び他の実施例で例示される治療有効用量は、治療される対象のサイズ及び/又は体重に応じて増加又は調整されてもよい。例えば、約75000個～約250000個のCDCがマウスに治療上有効である場合、ヒトの治療有効用量も約75000個～約250000個のCDCであるが、平均的なヒトの体重に応じて調整して、約 $1.86 \times$

10

20

30

40

50

10<sup>8</sup>個～約6.2×10<sup>8</sup>個のCDC（一般的なマウスの体重25gから平均的な人間の体重62kgに調整するため）等の用量を含めてもよい。

#### 実施例33：in vitroで単離された筋肉の機能

##### 【0195】

全身投与された様々な用量のCDCの筋肉機能に対する効果も判断した。図48Bに示すデータを生成するため使用したのと同じマウスを、ケタミン/キシラジン（80mg/kg体重及び10mg/kg体重の腹腔内投与）で深く麻酔した。各マウスについて、横隔膜の筋肉を素早く摘除し、動物を安楽死させた。左肋弓下縁皮膚及び筋肉の切開に続いて、肋弓下半横隔膜の切片を、冷リンガー液を含む予備Sylgar裏打ちディッシュに移し、線維を肋骨に付着させ、絹縫合糸で締めて組織浴に垂直に取り付けた腱中心を無傷のままにして、3mm幅～4mmの幅の狭い横隔膜の条片を単離した。横隔膜の一端をディッシュ底のクランプに固定し、もう一端を校正済みの力変換器（マサチューセッツ州ウォータータウンのCambridge Technology Model 300B）に取り付けた。システムに連結されたマイクロコンピュータを使用して、筋肉の長さを調整した。筋肉の両側に配置されたプラチナプレート電極を、最大強度で送達される定電流の0.2ミリ秒持続時間単相矩形パルスを使用する直接筋肉刺激（マサチューセッツ州クインシーのGrass Model S88刺激装置）に使用した。最大等尺性単収縮力応答の測定値が得られるまで、筋肉の長さを調整した。等尺性収縮特性を最適な長さ（L<sub>o</sub>）で決定した。ピーク単収縮力（P<sub>t</sub>）を、一連の単一パルスから決定した。力/周波数の関係を、5パルス/秒～150パルス/秒（pps）の範囲の刺激周波数で測定した。刺激を、各刺激トレインの間に少なくとも1分の間隔を置いて、1秒間のトレインで提示した。生成されたP<sub>t</sub>及び最大強縮力（P<sub>o</sub>）を含む筋肉力を、筋肉セグメントの推定生理学的断面積（CSA）に対して正規化し（CSA = 筋肉重量 / 1.056 × F<sub>o</sub> ; 1.056 g/cm<sup>3</sup>は筋肉の密度を表す）、ニュートン（N）/cm<sup>2</sup>で表す。図49に示すように、横隔膜筋機能は、PBSビヒクル（n = 6）と比較して75K（n = 8）、150K（n = 8）で処理したマウスで増加する傾向があった。250K（n = 4）CDCは、150K CDC及び75K CDCと比較して横隔膜筋機能により大きな影響を与え、用量応答を示した。250K用量のデータは、PBS対照処理と比較して統計学的に有意であった（p < 0.05）。したがって、幾つかの実施形態では、CDCの全身投与は、骨格筋のジストロフィン異常症を伴う、DMD又はベッカー型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーを有する対象において、骨格筋機能を含む筋肉機能を改善する。筋肉機能を改善するための治療有効用量としては、限定されないが、約75000個～約250000個のCDC、約150000個～約250000個のCDC、又は約250000個以上のCDCが挙げられる。

#### 実施例34：Mdxマウスの体重

##### 【0196】

CDCで処理したマウスの体重を運動直後に毎週測定し、CDC処理が体重に何らかの影響を与えたかどうかを判定した。体重データを図50A～図50Bに示す。群間の体重の差は観察されなかった。したがって、幾つかの実施形態では、CDCの治療有効用量は、対象の体重又は体重に影響を与えることなく全身投与され得る。

#### 実施例35：PBS又はCDC処理マウスに由来するmdxマウス心臓のマッソントリクローム染色

##### 【0197】

実施例31に記載されるように、CDCで処理されたマウスを、処理の6週間後に殺した。各心臓のパラフィン包埋切片を組織学に使用して、心臓線維化に対するCDC処理の効果を識別した。マッソントリクローム染色（HT15 Trichrome Stain [Masson] Kit ; ミズーリ州セントルイスのSigma-Aldrich）を線維化の評価のために実施した。図51に示す通り、PBS処理マウスの左心室心臓組織は、CDC処理マウス心臓切片の青色の減少によって示されるように、150KのCDCで処理したマウスと比較して、より多くの線維化及びコラーゲン沈着を示した。したがっ

て、幾つかの実施形態では、C D C の全身投与は、骨格筋のジストロフィン異常症を伴う、D M D 又はベッカー型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーを有する対象の心臓又は左心室の線維化を含む線維化を減少又は予防する。心臓線維化を軽減又は予防するための治療有効量には、少なくとも 1 5 0 0 0 0 個の C D C が含まれる。

#### 【 0 1 9 8 】

図 5 1 の画像を生成するために使用された組織学スライドを再切断して、マッソントリクロームで再染色した。再切断及び再染色されたスライドの心臓全体の切片を図 5 3 に示す。図 5 1 に示す画像と同じように、図 5 3 に示す心臓全体の切片でも同様の結果が見られた。したがって、幾つかの実施形態では、C D C の全身投与は、心臓全体を通して線維化を予防又は減少させる。心臓全体の線維化を予防又は減少するための治療有効量には、約 7 5 0 0 0 個 ~ 約 2 5 0 0 0 0 個の C D C 、約 1 5 0 0 0 0 ~ 約 2 5 0 0 0 0 個の C D C 、又は約 2 5 0 0 0 0 個の C D C が含まれる。さらに、C D C で処理したマウスの心臓では、全体的な心臓構造に対する悪影響は見られなかった。したがって、幾つかの実施形態では、治療有効量の C D C は、対象の心臓構造に悪影響を及ぼさない。

10

#### 実施例 3 6 : m d x マウスの駆出率のベースラインから注射の 3 週間後までの変化

#### 【 0 1 9 9 】

図 5 2 A ( また図 4 7 ) に示すように、V e v o 3 1 0 0 I m a g i n g S y s t e m ( カナダ、トロントの V i s u a l S o n i c s ) を使用して、処理の 1 日前 ~ 3 日前、及び処理の 3 週間後に心エコー研究を行って C D C の心機能に対する効果を判断した。軽い全身麻酔の導入後、心臓を最大左心室 ( L V ) 径のレベルで撮像した。L V 駆出率 ( E F ) を、2 次元長軸断面から V i s u a l S o n i c s バージョン 3 . 0 . 0 ソフトウェアで測定した。1 5 0 0 0 0 個の C D C による処理は、駆出率を減少しなかった ( 図 5 2 B ) 。したがって、幾つかの実施形態では、治療有効量の C D C を、対象の心機能に悪影響を与えることなく骨格筋のジストロフィン異常症を伴う D M D 又はベッカー型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーの対象に投与することができる。

20

#### 実施例 3 7 : 永続的な L A D 結紮による S C I D マウスの駆出率の変化

#### 【 0 2 0 0 】

様々な投与経路が心臓機能に有益に影響を及ぼし得るかどうかを判断するため、ヒト C D C を筋肉内 ( I M ) 、大腿静脈、又は右心室の 3 つの別々の投与経路により S C I D マウスに投与した。3 つ全ての経路による投与は、左心室駆出率の肯定的な変化をもたらした ( 図 5 4 ) 。変化は、対照処理を受けたマウスと比較して、3 つ全ての群で統計学的に有意であった。筋肉内及び静脈内の投与経路は同様に効果的であり、静脈内投与による有効性を示した。したがって、幾つかの実施形態では、ヒト C D C による処理は、S C I D を有する対象の心機能を改善する。処理用の投与経路としては、筋肉内注射、大腿静脈への全身静脈内注射、又は右心室注射等の心臓注射が挙げられる。

30

#### 実施例 3 8 : ヒト A 1 u シーケンス q P C R 法を使用して評価された野生型マウスにおける頸静脈投与後の C D C の体内分布

#### 【 0 2 0 1 】

この実施例における研究の 1 つの目的は、全身送達後の C D C の生体内分布を判断することであった。ヒト C D C を、頸静脈への静脈注射により野生型マウスに全身投与した。体内分布の決定には、ほとんどのヒト D N A に豊富で、一般にマウス D N A には存在しない転移因子であるヒト A 1 u 配列を含む D N A の存在量の測定を含めた。C D C 投与の 1 0 分後と 2 4 時間後に収集した組織で q P C R を使用して、ヒト A 1 u 配列を含む D N A の存在量を決定した。

40

#### C D C の調製

#### 【 0 2 0 2 】

ヒト C D C を、上記のマウス C D C と同様の方法で得た。細胞溶液中の培地の量に等しい量の培地でフラスコをすすいだ後、細胞溶液を 1 0 0 0 r p m ( 1 9 7 × g ) で 5 分間遠心分離して、細胞溶液中の細胞をペレット化した。C D C をイスコフ改変ダルベッコ培地 ( I M D M ) に再懸濁し、フェノールレッド及び追加の補充を行わずに、i N C Y T O

50

Cチップ使い捨て血球計を使用して計数した。フェノールレッド及び追加のサプリメントを添加せずに、IMDMでCDCを $1.5 \times 10^6$ 細胞/mLに希釈した。CDCを、注射前に氷上で保管し、又は組織スパイク研究のため細胞ペレットを $-20^\circ\text{C}$ で凍結した。

#### qPCR法の検証

##### 【0203】

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) を使用して、5継代目に $1 \times 10^6$ 個のCDCからゲノムDNAを単離した。CDC DNAの10倍連続希釈液を滅菌水で調製し、カスタムAluプライマーとカスタムAluプローブ (ThermoFisher製) を含むTaqman Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher) を使用してqPCRを行った。プローブとプライマーのDNA配列は以下の通りである：

##### 【0204】

フォワード：5' - GTCAGGAGATCGAGACCATCCT - 3'、

##### 【0205】

リバース：5' - AGTGGCGCAATCTCGGC - 3'、

##### 【0206】

プローブ：5' - 6 - FAM - AGCTACTCGGGAGGCTGAGGCGAGGA - MGB - 3'

##### 【0207】

qPCR反応を、QuantStudio 6 FlexリアルタイムPCR (RT-PCR) システム (ThermoFisher) で行った。Ct値を、各qPCRサンプルのCDC数の対数に対してプロットした。GraphPad Prism 5を使用して線形回帰分析を行い、直線の勾配を使用し、式： $\% \text{効率} = -1 + 10^{(1/\text{slope})} \times 100$ を用いてqPCRの効率を計算した。

#### 組織スパイク曲線

##### 【0208】

ヒトCDCから単離されたDNAの希釈物を、生後8週齢～12週齢のナীবC57BL/6Jマウス組織から単離されたDNAにスパイクし、qPCRを1μLのスパイクDNAを用いてQuantStudio 6 Flex RT-PCRシステムで3回実行した。qPCR反応にはTaqman Fast Advanced Master Mix、及びAlu配列の「qPCR法の検証」で上に記載されるものと同じプライマー/プローブが含まれ、マウス - アクチン (ThermoFisher、Mm00607939\_s1) Taqmanプライマーを、Ct値を正規化するためのハウスキーピング遺伝子として使用した。Ctを、各サンプルによるAluのCt値から - アクチンのCt値を引くことで計算した。1μLのqPCRサンプルの既知の細胞数に対してCtをプロットした。GraphPad Prism 5を使用して、線形回帰分析を行った。

#### マウス注射と組織採取

##### 【0209】

C57BL/6Jマウス (8週齢～12週齢、Jackson Laboratory) に、IMDM中100μLのヒトCDC ( $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL) を、吸入イソフルランによる麻酔下で頸静脈に注射した。利用されたこの用量のCDCは、頸静脈注射により投与された場合、mdxマウスに有効であった。10分後 (n = 8) 又は24時間後 (n = 8)、頸椎脱臼によりマウスを殺した。頸下静脈から血液を採取した後、心臓、肺、脾臓、肝臓、横隔膜、及びヒラメ筋を摘除した。組織を、細胞注入を受けなかった2匹の対照マウスからも収集した。組織をPBSで洗浄した後、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結した。 $-80^\circ\text{C}$ で凍結する前に、0.05 Mの最終濃度のEDTAを抗凝固剤として血液に添加した。

#### Alu及び - アクチンのqPCR

##### 【0210】

組織サンプルを解凍し、計量し、均質化するため小片に切断した。平均組織重量、均質化に使用される組織の量、及びDNA分離に使用される組織の量を表1に示す。DNea



sy Kitの製造業者の指示に従って、DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)を使用してDNAを単離した。DNAを、100  $\mu$ Lの溶出バッファーでDNeasyカラムから溶出した。組織スパイク曲線について上に記載されるようにqPCRを行った。

#### データ分析

Ctを、各サンプルのAluのCt値から - アクチンのCt値を引くことで計算した。標準曲線からの傾きとy切片を使用して、qPCRサンプルの細胞数の対数を計算した。組織1グラムあたりの細胞数は、DNA単離に使用した組織の量及び溶出したDNAの最終量を考慮して、qPCRサンプルの細胞数に組織に固有の係数を掛けて計算した(表1)。3回の実施を平均し、組織1グラムあたりの細胞を各時点の各器官についてグラフ化した。有意性をp = 0.05の片側スチューデントのT検定を使用して決定した。

10

#### 【0211】

表1を参照して、各組織の重量を測定し、組織重量に近似するように平均を取った。ほとんどの場合、他の組織よりも大きい肝臓を除いて、組織全体が均質化された。ホモジナイズされた組織から、10 mg ~ 25 mgに相当する量をDNA分離に使用した。組織1グラムあたりのCDCの計算に使用される係数は、100  $\mu$ Lの精製DNAのうちqPCRに使用される1  $\mu$ Lと、DNAの分離に使用される組織の量とに基づく。

#### 【表1】

表1：組織重量及びDNA単離の情報

組織	おおよその組織重量 (mg)	均質化された量	DNA単離に使用された量 (mg)	組織1gあたりのCDCを計算する係数
肺	175	全組織	25	4000
肝臓	1300	250 mg	25	4000
心臓	130	全組織	25	4000
ヒラメ筋	10	全組織	全組織	10000
横隔膜	40	全組織	25	4000
脾臓	80	全組織	15	6666

20

#### qPCR法の検証

30

#### 【0212】

qPCRプライマーを検証し、アッセイの比例領域を評価するため、既知の数の細胞からヒトCDC DNAを単離した。連続希釈液を調製し、Aluプライマーを使用してqPCRを行った。図55Aに示すように、このアッセイは1つのqPCRサンプル当たり0.0025個 ~ 2500個の細胞の範囲で直線であり、全ての研究サンプルを網羅でき、1個未満の細胞からDNAを検出することができる。

#### 組織スパイク曲線 - 結果

#### 【0213】

各組織の - アクチンレベルに起因するいかなる組織特異的な変動も除去するため、目的の各組織でスパイク研究を行った。図55Bに示すように、既知の量のCDC DNAをナীব組織DNAにスパイクすることにより、肺、肝臓、心臓、脾臓、横隔膜、血液、及びヒラメ筋の標準曲線を作成し、表2に、各ラインの傾き、切片、及びR<sup>2</sup>を要約する。これらの標準曲線を使用して、研究サンプルのqPCRにおけるCDC DNAの量を計算した。

40

【表 2】

表 2：組織スパイク曲線の概要

組織	勾配	切片	R <sup>2</sup>
肺	- 3 . 7 2	1 . 3 6	0 . 9 9 3 2
肝臓	- 3 . 4 7 1	1 . 0 2	0 . 9 9 8 2
血液	- 3 . 6 0 1	- 3 . 0 1 1	0 . 9 9 7 9
心臓	- 3 . 6 6 2	- 0 . 5 3 1 8	0 . 9 9 7
ヒラメ筋	- 3 . 5 8 2	- 0 . 1 1 5 1	0 . 9 9 5 8
横隔膜	- 3 . 5 7 4	0 . 4 0 3 4	0 . 9 9 7 7
脾臓	- 3 . 5 8 8	3 . 6 7 8	0 . 9 9 7 5

10

## 頸静脈投与の 10 分後及び 24 時間後の WT マウスにおける CDC 生体内分布

## 【0214】

C57BL/6J マウスに、頸静脈投与により 150000 個のヒト CDC を注射した。注射後 10 分 (n = 8) 又は 24 時間 (n = 8) に各マウスを安楽死させ、組織を摘出した (図 56A)。組織をホモジナイズし、DNA を単離し、上に記載される Alu 配列とマウス - アクチンプライマーを使用して qPCR を行った。

## 【0215】

図 56B に示されるように、ヒト CDC の大部分が肺で見られた (10 分間で  $155000 \pm 12500$  細胞 / g 組織)。注入された CDC の 1% 未満が他の全ての組織に分布しており、CDC 注入の 10 分後に肝臓に  $120 \pm 47$  CDC / g 組織が分布していた。血液、心臓、及びヒラメ筋にも、バックグラウンドレベル (それぞれ  $67 \pm 15$  細胞 / g 組織、 $19 \pm 4$  細胞 / g 組織、 $14 \pm 2$  細胞 / g 組織) を超える CDC が含まれていたが、肺ほど高くはなかった。投与の 24 時間後、肺に CDC の約 23% が残っていた ( $36000 \pm 7900$  細胞 / g 組織)。低レベルの CDC が、肝臓、血液、心臓、脾臓、及びヒラメ筋にそれぞれ残っていた (それぞれ  $31 \pm 4$  細胞 / g 組織、 $15 \pm 6$  細胞 / g 組織、 $11 \pm 4$  細胞 / g 組織、 $17 \pm 5$  細胞 / g 組織、及び  $23 \pm 11$  細胞 / g 組織)。細胞の急速なクリアランスは、WT マウスによる免疫系のクリアランスに一部起因する可能性があるが、この仮説を確認するには更に研究が必要である。

20

## 【0216】

頸静脈投与後、ヒト CDC はマウス肺に急速に捕捉され、注入された細胞の 1% 未満が残りの試験組織に残った。CDC は急速に排除され、24 時間後には、10 分後に肺、肝臓、又は血液中にあった細胞の 22% ~ 26% しか残っていなかった。より低い CDC クリアランス比が、心臓 (投与の 10 分後に見られた細胞の 58% が 24 時間後に残っている) 及びヒラメで観察された。実際、ヒラメ筋において細胞送達後 10 分後よりも 24 時間後に、組織 1 グラム当たりにより多くの細胞が見られた。これらの結果は、幾つかの実施形態では、CDC の全身投与により大部分の CDC が肺に入るにもかかわらず、幾つかの CDC が心臓、並びにヒラメ筋及び横隔膜等の骨格筋に到達することを示している。したがって、幾つかの実施形態では、全身 CDC 投与の心臓及び骨格筋に対する少なくとも

30

40

## 実施例 39：ヒト Alu シーケンス qPCR 法を使用して評価した SCID マウスにおける頸静脈投与後の CDC の生体内分布とクリアランス

## 【0217】

この実施例における研究の 1 つの目的は、頸静脈への全身送達後の重症複合免疫不全 (SCID) マウスにおける CDC の生体内分布及びクリアランスを判断することであった。ヒト CDC の体内分布を、ヒト Alu 配列を測定することにより決定した。CDC の生体内分布及びクリアランスを、SCID マウスに頸静脈を投与してから 24 時間後、1 週間後、及び 3 週間後に収集した組織で qPCR を使用して決定した (図 57A)。免疫系

50

の障害がヒトCDCに対する免疫反応を制限し得ることから、この研究にSCIDマウスが選択され、免疫応答がCDCをより早く体から除去すれば、より長い時間点を研究することが可能であった。

#### 【0218】

この研究のためのCDC調製、qPCR法の検証、及び組織スパイク曲線に関する方法は、実施例39に記載されているものと同じ方法で行われた。

#### マウス注射と組織採取

#### 【0219】

8週齢～12週齢の雄性SCIDマウス(Jackson Laboratory)に、イソフルラン吸入による麻酔下で、IMDM中100μLのCDC( $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL)を頸静脈注射した。24時間後(n=4)、1週間後(n=8)、又は3週間後(n=8)、顎下静脈から血液を収集し、続いて心臓、肺、脾臓、肝臓、横隔膜、ヒラメ筋及び精巣を摘除した。細胞注入を受けなかった2匹の対照マウスからも組織を収集した。-80で凍結する前に、組織をPBSで洗浄した。-80で凍結する前に、EDTAを抗凝固剤として最終濃度0.05Mまで血液に加えた。

#### 【0220】

Alu及びβ-アクチンqPCRに関連する方法、及びこの研究のためのデータ分析は、実施例38、図55A～55B、及び表2に記載されるのと同じ方法で行われた。表3は、精巣に関するデータが表3に含まれているが表1には含まれていないことを除いて、表1と同じである。

#### 【表3】

表3：組織重量及びDNA単離の情報

組織	およその組織重量(mg)	均質化された量	DNA単離に使用される量(mg)	組織1gあたりのCDCを計算する係数
肺	175	全組織	25	4000
肝臓	1300	250mg	25	4000
心臓	130	全組織	25	4000
ヒラメ筋	10	全組織	全組織	10000
横隔膜	40	全組織	25	4000
脾臓	80	全組織	15	6666
精巣	190	全組織	25	4000

#### 頸静脈投与の24時間後、1週間後、及び3週間後のSCIDマウスにおけるCDC生体内分布

#### 【0221】

上に記載されるように、SCIDマウスに頸静脈投与により150000個のヒトCDCを注射した。注射の24時間後(n=4)、1週間後(n=8)、3週間後(n=8)にマウスを殺し、組織を摘除した。組織を均質化し、DNAを単離し、実施例38に記載されているAlu配列用のプライマー及びマウスβ-アクチンを使用してqPCRを実施した。

#### 【0222】

図57B及び図57Cでは、CDCの大部分が肺に見られた(24時間で $217000 \pm 71000$  CDC/g組織)。注入されたCDCの1%未満が他の全ての組織に分布していることがわかった。肝臓及び血液には、CDC投与の24時間後に、バックグラウンドを超えるCDCが含まれていた(それぞれ $50 \pm 15$ 細胞/g組織、 $39 \pm 8$ 細胞/g組織)。投与の1週間後、24時間に肺で見られたCDCの4%( $8600 \pm 1900$ 細胞/g組織)が留まった。興味深いことに、投与の1週間後には、心臓(1週間で $7700 \pm 5000$ 対24時間で $110 \pm 58$ )、横隔膜( $107 \pm 82$ 対 $42 \pm 18$ )及び脾臓( $170 \pm 80$ 対 $107 \pm 37$ )において、投与後24時間でこれらの組織で見つかる

よりも多くのC D Cが見つかる傾向にあった。投与の1週間後にこれらの組織で見られるC D Cの増加は、幾つかの実施形態では、細胞は肺から解放されて他の組織に再分布され、特に肺静脈を経て肺を出た後に出会う最初の器官である心臓に特に留まるようになる。試験した組織のいずれも、ビヒクルと比較して、C D C投与の3週間後に統計学的に有意な数の細胞を有しておらず、ほとんどのC D Cは送達後3週間以内に排除されることを示唆した。

#### 【0223】

この研究は、C D Cが肺に捕捉され、比較的少数のC D Cが他の組織に分布した、W Tマウスで実施された生体内分布研究（実施例38を参照されたい）の知見を確認する。W Tマウスでの投与後24時間と比較して、S C I DマウスはC D Cを迅速に排除せず（W Tマウスで $36000 \pm 7900$ 細胞/g組織 対 S C I Dマウスで $218000 \pm 71000$ 細胞/g組織が24時間で存在する）、おそらくS C I Dマウスの免疫不全の性質によるものである。

10

#### 【0224】

この研究は、頸静脈による細胞投与の24時間後にC D Cが肺に捕捉されることを示している。同様のC D C生体内分布は、免疫不全S C I Dマウス及びW T C 5 7 B L / 6マウスにおいて24時間に観察され、免疫応答性マウスで観察されるより速いクリアランスの原因は免疫系にある可能性があるが、細胞分布に大きな影響は無いことが示唆された。

#### 【0225】

頸静脈投与の24時間後に肺に見られるC D Cの約4%が1週間後に留まっていた。この研究では、細胞送達後1週間以内に再分布する可能性が示されており、24時間よりも1週間で心臓、脾臓、横隔膜において多くの細胞が見られた。したがって、結果は、幾つかの実施形態では、C D Cの全身投与が肺へのC D Cの一部の進入に結び付くにもかかわらず、幾つかの実施形態によると、いくらかのC D Cが心臓及び骨格筋に到達することを示す（非限定的な例として、ヒラメ筋及び横隔膜）。したがって、幾つかの実施形態では、全身C D C投与の心臓及び骨格筋に対する少なくともいくらかの治療上の効果は、それらの組織内に局在するC D Cによる心臓及び骨格筋に対する効果によるものである可能性がある。

20

実施例40：静脈内投与を使用した急性心筋梗塞（A M I）ブタモデルにおけるC D Cの用量依存的な安全性及び有効性

30

#### 【0226】

この研究の目的は、C D Cの最大耐量（M T D : m a x i m u m t o l e r a b l e d o s e）及びC D Cの用量有効性応答（d o s e e f f i c a c y r e s p o n s e）を調査することであった。この非限定的な例では、A M Iで広く使用されているA M Iブタモデルにおける静脈内投与を使用した。

#### C D Cの調製

#### 【0227】

シンクレアミニブタC D C（p C D C）を、上に記載されるマウスC D C及びヒトC D C（h C D C）と同様の方法で産生して製剤化した。ブタの心臓を採取して解剖した。心房及び中隔の両方の断片を分離し、刻んで外植片とした。これらの外植片を、20%成長培地を含むc e l l b i n d 1 - s t a c kに播種した。3日～4日後、外植片由来細胞（E D C）は各外植片の周りで増殖し始めた。E D Cを採取し、使用の準備が整うまで2 mLのクライオバイアルにおいてC S 10中で凍結した。E D Cは、バイアルに少量の氷が残るまで37℃で解凍した。細胞溶液を少量の20%培地（約10 mL）に滴下した。細胞を約280 Gで5分間遠心分離して、残留C S 10を除去した。細胞を再懸濁し、計数し、フィブロネクチン被覆N u n c トリプルフラスコに1つのフラスコ当たり約 $3 \times 10^6$ 個～ $6 \times 10^6$ 個の細胞で播種した。p C D Cを、P 5及びP 6までのハイクロン（h y c l o n e）血清で補足した20%培地で増殖させた。C r y o S t o r C S 10で細胞を浮かせて凍結させた。バイアルに少量の氷が残るまで、凍結細胞を37℃で解凍した。細胞を以下の投与バッファーに再懸濁した：

40

50

・CryoStor（登録商標）CS10（22.5 mL）、ヘパリン（2.5 mL）、ニトログリセリン（250  $\mu$ L）；及び

・5%ヒト血清アルブミン（103 mL）、HypoThermosol（登録商標）（13.5 mL）、CS10（13.5 mL）（この濃度は、ヒト等価用量に比例する。I V注射について130 mLの最適量が決定された後、量を変更した。）。

#### 【0228】

細胞濃度を比較的一定に保つため、ほとんどの用量については45分間に亘って細胞に適用した。また、130 mLの容量で送達された細胞を45分かけて送達した。

#### 動物モデル

#### 【0229】

心筋梗塞は、先に記載されるように（Kanazawa, Tseliou et al., 2015）、血管形成バルーンを使用して左前下行（LAD）動脈を90分間閉塞した後、30分間再灌流することによりユカタンミニブタで誘発された。次いで、動物はベースラインの左心室図（LVグラム）を受けて、心機能の変化（駆出率の変化によって示される）が評価され、その後、ビヒクル（CryoStor（登録商標）CS10、72 = 10）又は同種CDC（ $n = 18$ ）を注入した。3種類のCDC用量：50  $\times 10^6$ （ $n = 8$ ）、100  $\times 10^6$ （ $n = 3$ ）、及び200  $\times 10^6$ （ $n = 3$ ）を連続して投与した。注入を、右室流出路（RVOT）に配置されたスワングアンツカテーテル（6フレンチ～8フレンチ）を使用して行った。追加の群（ $n = 4$ ）の動物に、大腿静脈注入を使用して200  $\times 10^6$ 個のCDCを注射した。注入の2日後、動物はフォローアップLVグラムを受けた。心筋組織の損傷を特定するために、ベースライン及び48時間でAbbot Architect i2000 SRを用いる化学発光によってトロポニンI（TnI）レベルを評価した。簡潔に言えば、血液サンプルを遠心分離して血漿を収集し、一旦血漿を収集してAbbot Architect i2000 SRで分析した。投与の24時間及び48時間後に動物は身体検査を受けた。1匹の動物に大腿静脈注入により200  $\times 10^6$ 個のCDCを投与し、2週間後にフォローアップした。この動物は、CDCの長期的な影響を示すことを目的としている。

#### 組織病理学分析

#### 【0230】

心臓及び肺組織を組織学的検査に供した。ゲンチアナバイオレット及びチオフラビンT色素を動物の殺の前に左心房に注入して、心臓のリスク領域（AAR: area at risk）及び微小血管閉塞（MVO: microvascular obstruction）を評価した。切除された心臓をスライスし、塩化トリフェニルテトラゾリウム（TTC）で染色して、梗塞サイズ（IS）を測定した。ビヒクル又は200 MのCDCを注射した2匹のブタRVOTに由来する肺を収集し、4%パラホルムアルデヒドを注入した。図58に示すように、4%PFAにおいて48時間後、前部及び後部から組織サンプルを収集した。各肺から15個のサンプルを収集し、パラフィン包埋した。スライド上の5  $\mu$ m組織切片をH&Eで染色した。

#### 結果

#### 【0231】

50  $\times 10^6$ 用量を注入した最初の動物には、後の全ての動物に使用された45分とは対照的に、15分間に亘って注入を行った。このブタは、注入の間、酸素飽和度の持続的な減少を経験した（SpO<sub>2</sub>は100%から76%に減少した）。注入後24時間の身体検査の間、胸部聴診により正常な肺音が明らかになった。48時間のエンドポイントで、この動物はベースラインからのSpO<sub>2</sub>の減少（85%）を示し続けた。その結果、後の全ての動物の注入時間を45分に増加させた。100  $\times 10^6$ の用量を注入した1匹の動物は、SpO<sub>2</sub>の一時的な減少（98%から81%）を示し、注入の20分後にベースラインに戻った。この動物は、フォローアップの身体検査では正常であった。200  $\times 10^6$ の用量を注入した1匹の動物は、SpO<sub>2</sub>のわずかな一時的減少（100%から94%）を示したが、SpO<sub>2</sub>の正常範囲内に留まった。心臓酵素（すなわちTnI）の増加は

中程度で、ビヒクル及びCDCで処理した動物で同様であった。図59に示すように、 $Tn1$ の増加はCDC用量と統計学的に相関しなかった。代わりに、CDC処理は $Tn1$ を減少させる傾向があり、幾つかの実施形態では、全身CDC投与は心臓組織損傷を引き起こさず、心臓組織損傷を予防又は減少させる可能性があることを示した。図60～図62に示すように、AAR、NR/AAR、TTC/AARは群間で類似していた。これは、注入後48時間の心筋損傷の程度が、この研究のCDC処理によって悪影響を受けなかったという更なる証拠を提供する。図63に示すように、CDCを $100 \times 10^6$ 及び $200 \times 10^6$ の用量で投与すると、EFは改善する傾向があった。しかしながら、 $200 \times 10^6$ 個の細胞の大腿静脈投与では、EFの減少が示された。全体として、これらの結果は、幾つかの実施形態では、例えばRVO又は大腿静脈へのCDCの全身投与は、心臓組織の損傷又は機能不全を引き起こさず、心臓組織の損傷又は機能不全を予防又は減少させる可能性があることを示している。

10

#### 【0232】

ビヒクル又は $200 \times 10^6$ 個のCDCをRVOへと注射したブタの肺を、虚血/再灌流事象及び製品投与の48時間後に収集し、組織学的分析のためパラホルムアルデヒドで固定した。32個のサンプルを得て、パラフィン包埋し、スライスして、H&E染色後に分析した。肺表面と並んで切片表面には明らかな病変がないことがわかった。ビヒクル又は $200 \times 10^6$ 個CDCを注射した2頭のRVOからの68枚のスライドを、無関係の病理学者が分析した。ビヒクルを注射したブタ又はCDCを注射したブタから分析されたH&Eスライドは、明らかな組織学的異常を伴わず、正常な肺構造を示した。血液小胞又はその他の肺領域にはCDCは見つからなかった。したがって、幾つかの実施形態では、CDCの全身投与は肺組織に悪影響を及ぼさない。

20

#### 【0233】

投与された細胞の種々の用量のうち、CDCがRVOによって送達されたときの最小有効用量は $100 \times 10^6$ であり、より高い用量( $200 \times 10^6$ )では、明らかな更なる利益が加わることはなかった。両方の用量は、AMIモデルの駆出率に同様の効果を示した。瘢痕の大きさは全ての条件で類似していた。ただし、 $200 \times 10^6$ 個のCDCを大腿静脈に注射したブタでは、EFの改善が限定的であった。これは、幾つかの実施形態では、異なる経路を介した投与が異なる有効性を有する可能性があることを示唆している。

#### 【0234】

肺サンプルの組織学的分析は、RVOを介して又は大腿静脈経路を使用して投与された $200 \times 10^6$ 個の細胞を有するブタにおいて組織損傷がないことを示した。RVOを介した細胞の投与は、例えば大腿静脈よりも心臓から肺へのより直接的な経路であり、その経路によるCDCの投与は、幾つかの実施形態では、大腿静脈によるCDC投与により大きな影響を示すと予想される。

30

#### 【0235】

この研究の結果は、CDCの全身投与は、少なくとも $400 \times 10^6$ 個(ブタの場合は $200 \times 10^6$ 個の用量)のヒト等価用量までは、合理的に安全であることを示している(すなわち、一般的に、注入中の数回を超える軽度の一時的な有害事象と関連しない)。

#### 【0236】

この研究は、 $100 \times 10^6$ 個の細胞を全身送達することにより、AMIブタモデルにおけるEFの有効な改善を示すことを示した。 $100 \times 10^6$ 個又は $200 \times 10^6$ 個の細胞を投与したブタ間で、有効性の点で有意な差は観察されなかった。したがって、幾つかの実施形態では、治療有効用量には、 $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、 $1 \times 10^8$ 個、 $2 \times 10^8$ 個、 $5 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個、又は $1 \times 10^{10}$ 個のCDCが含まれ、心臓に傷害がある対象の心臓機能障害、並びに心臓及び/又は肺の組織損傷を予防又は減少させる。

40

#### 【0237】

この実施例の研究における証拠は、幾つかの実施形態では、最大有効用量が $100 \times 10^6$ 個～ $200 \times 10^6$ 個のCDC(ヒト等価用量は $200 \times 10^6$ 個～ $400 \times 10^6$ 個

50

のCDC)であってもよいという結論を支持する。さらに、これらの投与量を投与しても、該投与量が投与された対象の肺組織に何らの毒物学的影響も生じなかった。

#### 実施例41: CDCのヒトT細胞との相互作用

##### 【0238】

この実施例における研究の1つの目的は、ヒト同種T細胞に連結されたCDCの免疫学的活性を決定することであった。この研究は、PBMCから分離された、HLA遺伝子型が同定されたヒト末梢血単核細胞(PBMC)( $n=3$ )及びヒトCD3<sup>+</sup>T細胞( $n=2$ )を用いて行われた。CDCを上記の方法で調製した。

##### CDC免疫表現型

##### 【0239】

定常状態のCDC( $10^5$ 個の細胞)を、免疫関連分子又はそれらの各アイソタイプ対照に特異的な抗体で染色した。細胞をCanto II BD FACSで取得し、FlowJoソフトウェアで解析した。全ての細胞が有意なレベルのHLAクラスI分子を発現したが、HLA II分子は陰性であった(図64)。

##### 【0240】

中程度の割合の細胞が、非古典的HLA I分子であるHLA-E及びHLA-Gのかすかな発現を示した。かなりの割合の細胞が中程度のレベルの共刺激CD86及び共刺激/調節CD274(PD-L1)分子を発現したが、共刺激CD80及び共刺激/調節CD275(ICOS-L)分子のわずかな発現を示した細胞はほとんどなかった。また、CDCの65%近くが、受容体NKG2Dリガンド(ULBP及びMICA/B)を活性化するNK細胞のかなりの発現を示した。したがって、幾つかの実施形態では、少なくとも幾つかの免疫刺激マーカー又は免疫調節マーカーがCDCに存在する可能性がある。

##### 同種環境でT細胞を刺激するCDCの能力

##### 【0241】

調整された一方向混合リンパ球培養物を使用して、CDCが同種T細胞を刺激する能力を調査した。簡潔に言えば、Ficoll-Hypaque密度勾配での遠心分離により、3名の異なる健康ドナーの血液サンプルからヒトHLA不適合PBMCを調製した。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)(10分間2.5µM)で標識された応答性未分画PBMC( $1 \times 10^5$ )を、陽性対照として使用として使用されるHLA不適合マイトマイシンC処理刺激性PBMC( $1 \times 10^5$ )(A11oPBMC)又はマイトマイシンC処理CDC( $1 \times 10^4$ )のいずれかと共に、U底96ウェルプレートにおいてRPMI-10%FBS中で共培養した。

##### 【0242】

5日間の共培養の終わりに、複合化された抗CD3、抗CD4、抗CD8-APC、抗CD69、抗HLA-DRを用いる染色により2つのT細胞活性化マーカー、CD69及びHLA-DRの発現;CFSE標識の喪失によるT細胞増殖;及び7AAD染色による細胞死をモニターした。図66の結果は、CDCのわずかな染色を示すが、A11oPBMC陽性対照ほど顕著ではない。したがって、幾つかの実施形態では、CDCは同種T細胞を刺激するわずかな能力を有する可能性がある。

##### 【0243】

図66に見られるように、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>の両方のT細胞が、同種CDCにตอบสนองして2つの活性化マーカーの少なくとも1つを多少ともアップレギュレートした。HLA-DRのアップレギュレーションは、CD69よりも顕著であった。したがって、幾つかの実施形態では、CDCは未分画PBMC中のT細胞を活性化することができる。しかしながら、同種PBMC誘導性活性化(陽性対照)と比較して、これらのマーカーの観察されたアップレギュレーションは、ドナーAによるHLA-DRの発現に関しては概して非常に弱い。

##### 【0244】

次いで、この活性化がT細胞増殖をもたらすことができるかどうかを判断した。CFSEをモニターすることにより、CDCは弱いCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘発できる可能性が

10

20

30

40

50

あることが観察されたが、ドナー依存的であった。図 6 6 に示すように、観察された増殖は活性化マーカーの発現と一致しているようである。図 6 7 B では、未分画 P B M C ドナー A 由来の T 細胞のみが C D 6 9 及び H F A - D R の両方の有意な発現を示し、C D C に応答して増殖することが可能であった。未分画の P B M C ドナー C の T 細胞は、H F A - D R の有意な発現のみを示したのに対し、ドナー D は C D 6 9 も H F A - D R も発現せず、また、いずれも C D C への応答による有意な増殖を示さなかった。図 6 7 A ~ 図 6 7 B に示すように、対照的に、C D C は C D 8 + T 細胞において実質的な応答を誘発しなかった。まとめると、幾つかの実施形態では、C D C は C D 4 + T 細胞において同種 P M B C 対照で観察されるよりもはるかに弱い応答を誘発するようである。図 6 7 C に示すように、応答はドナーによってある程度異なるが、幾つかの実施形態によれば、治療有効量の C D C の全身投与は、C D 4 + 若しくは C D 8 + の T 細胞も、いかなる有意な免疫応答も活性化しない。

#### 【 0 2 4 5 】

上記と同じ実験環境を使用して、精製 C D 3 + T 細胞 (ドナー C 及びドナー A) の C D C 誘導性の活性化及び増殖を評価した。簡潔に言えば、C F S E ( 2 . 5  $\mu$  M、10 分間) で標識された応答性同種 T ( 1  $\times$  10<sup>5</sup> ) を、H L A 不適合マイトマイシン C 処理刺激 P B M C ( 1  $\times$  10<sup>5</sup> ) ( A l l o P B M C ) 又は C D C ( 1  $\times$  10<sup>4</sup> ) のいずれかと共に U 底 96 ウェルプレートにおいて R P M I - 10 % F B S 中で共培養し、5 日後、それらの活性化 ( C D 6 9 及び H L A - D R の発現 ) 及び増殖 ( C F S E 喪失 ) をモニターした。両方のドナーに由来する C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞は、C D 6 9 ではなく H L A - D R 活性化マーカーの発現を多かれ少なかれアップレギュレートした。しかしながら、図 6 8 に示すように、この活性化は C D 4 又は C D 8 の T 細胞の有意な増殖をもたらさなかった。したがって、幾つかの実施形態では、C D C の投与は、同種 C D C に再曝露されているにもかかわらず、驚くほど弱い免疫応答若しくは免疫応答の欠如をもたらすか、又は免疫応答を活性化しない。

#### C D C による免疫調節

#### 【 0 2 4 6 】

次いで、免疫応答の活性化の欠如が C D C 処理に応答した副作用の減少を伴って改善された安全性プロファイルを示す可能性があるため、C D C が同種環境で進行中の免疫応答を調節する能力を調べた。この目的で、C D C が U 底 96 ウェルプレートで P H A 刺激を強化し得るかどうかを確認するため、C D C ( 1  $\times$  10<sup>4</sup> ) の不在下又は存在下で H L A 不適合未分画 C L S E 標識 P B M C ( 1  $\times$  10<sup>5</sup> ) を P H A ( 1  $\mu$  g / m l ) で刺激し、C F S E をモニターすることにより同種 T 細胞の増殖を評価した。図 6 9 に示すように、C D C は C D 4 + 及び C D 8 + の両方の T 細胞の P H A 誘導性増殖を大幅にダウンレギュレートした。これらの結果は、幾つかの実施形態では、C D C が免疫刺激を驚くほど減少させ、それを強化しないことを示している。

#### 【 0 2 4 7 】

したがって、同様の実験を、2 名のドナー (ドナー C 及びドナー A) に由来する精製 C D 3 + T 細胞を使用して実施した。これらの H L A 不適合 T 細胞での P H A 誘導性 C D 6 9 及び H L A - D R の発現の調節と並んで、それらの P H A 誘導性増殖の調節を評価した。

#### 【 0 2 4 8 】

P H A 誘導性 C D 6 9 を有意にダウンレギュレートする一方で、C D C は C D 4 + 及び C D 8 + の両方の T 細胞で H L A - D R の発現を有意に増加させた。活性化マーカーのこの調節は、C D 4 + 及び C D 8 + の両方の T 細胞増殖の強力な阻害をもたらした。C D 4 + T 細胞増殖の阻害は、C D 8 + T 細胞で観察された阻害よりも顕著であった。したがって、ドナー間の変動にもかかわらず、2 名のドナーのみで得られた結果の限界内で、C D C は強力な免疫調節物質のようである。H L A - D R は、エフェクター制御性 T 細胞 ( T r e g ) のマーカーである。したがって、観察された H L A - D R 発現の増加は、C D C の存在によって誘導される調節性 T 細胞の最終的な増殖を示唆している可能性があり、これは、観察された進行中の T 細胞増殖の強い阻害を説明する可能性がある。これらの結果は



、図70に示すように、CDCによる同種T細胞の活性化及び増殖の誘導を分析する上記のデータと一致している。全体として、これらの結果は、幾つかの実施形態では、同種異系CDCの治療有効量が免疫応答を驚くほどダウンレギュレートできることを示す。

#### 実施例42：CDC由来細胞外小胞(CDC-EV)とT細胞との相互作用

この実施例における研究の1つの目的は、T細胞の活性化及び調節につながるCDC-EVの免疫学的活性を判断することであった。

##### CDC-EV及び免疫表現型の特性評価

エキソソームの有益なマーカーの発現を、ウエスタンブロッティングを使用してCDC-EVで分析した。CDC-EV(20 µl = 10 µg)をRIP Aバッファーを使用して溶解し、10% SDS-Pageゲルにロードし、ニトロセルロース膜に転写した。膜を5% BSAでブロックした後、HSP70、CD81、CD63、ALIX、HLA II及びβ-アクチンに対する特異的抗体とハイブリダイズさせた。CDC及び樹状細胞(DC)溶解物と並んで、エキソソーム不含上清(SN)を対照として使用した。CDC-EVは、予想されるエキソソームマーカーCD81、CD63及びALIXを発現したが、SNは完全に陰性であった(図71)。

##### 【0249】

次に、免疫関連マーカーの表面発現についてCDC-EVを分析した。CDC-EV(30 µl = 15 µg)を5 µl ラテックスビーズ(4 µm)に結合させた。抗体との又はビーズとのこれらのEV/ビーズの最終的な非特異的結合をブロックするため、CDC-EV/ビーズを100 mMグリシン及び2% BSA緩衝液で連続的に処理した。洗浄後、EV/ビーズを、Canto II BD FACSで取得した関連免疫分子に対する特異抗体で染色し、FlowJoソフトウェアで分析した。同量のそれぞれの抗体とインキュベートしたビーズを対照として使用した。

##### 【0250】

ビーズ抗体対照と比較して、CDC-EVはHLAクラスI分子及びCD86を発現したが、HLA II分子及びCD80分子については陰性であった(図72)。CDC-EVは、共刺激PD-L1分子を発現しているようだが、ICOS-Lは発現していないようである。NK活性化受容体リガンドは、CDC-EVで顕著に発現された。EVマーカーCD81及びCD63の両方の有意な発現が検出された。したがって、幾つかの実施形態では、少なくとも幾つかの免疫刺激マーカー又は免疫調節マーカーがCDC-EVに存在し得る。

#### 同種環境でT細胞を活性化するCDC及びCDC-EVの能力

##### 【0251】

PBMCを、Ficoll-Hypaque密度勾配での遠心分離により3名の異なる健康ドナーの血液サンプルから調製し、種々の実験で使用するため凍結保存した。CDC及びCDC-EVに応答したT細胞の活性化及び増殖を、2つのT細胞活性化マーカーCD69及びHLA-DRの発現、並びにCFSEレベルをそれぞれフローサイトメトリーによってモニターすることで調査した。簡潔に言えば、CFSE(2.5 µM、10分間)で標識された応答しているPBMC(1 × 10<sup>5</sup>)を、図73Aに示すように、指定されるHLA不適合マイトマイシンC処理刺激性PBMC(1 × 10<sup>5</sup>)若しくはHLA不適合CDC(1 × 10<sup>4</sup>)、又は種々の用量のCDC-EVのいずれかと共にU底96ウェルプレートのRPMI-10% FBSで共培養した。複合化された抗CD3、抗CD4、抗CD8-APC、抗CD69、抗HLA-DR及び7AADとの5日間の共培養染色の終わりに、T細胞の活性化、増殖、及び細胞死をモニターした。結果は、幾つかのCDC-EVによる染色を示すが、AlloPBMC陽性対照ほどではない。したがって、幾つかの実施形態では、CDC-EVは同種T細胞を刺激できる可能性がある。

##### 【0252】

図74に示すように、対照と比較して、CDC及びCDC-EVは弱いCD4<sup>+</sup>T細胞増殖を誘発できるように見えるが、CD8<sup>+</sup>T細胞では実質的な応答を誘発しなかった。観察された応答は、同種異系のPBMC対照で観察された応答よりもはるかに弱かった。

## 【0253】

したがって、精製されたCD3<sup>+</sup>T細胞（2名の異なるドナー）のCDC及びCDC-EV誘導性の活性化及び増殖を、上記と同じ実験環境を使用して評価した。簡潔に言えば、CFSE（2.5 μM、10分間）で標識された応答性同種T（ $1 \times 10^5$ ）を、U底96ウェルプレートのRPMI-10%FBSにおいて、指定される種々の用量のHLA不適合マイトマイシンC処理刺激性PBMC（ $1 \times 10^5$ ）又はCDC（ $1 \times 10^4$ ）又はCDC-EVのいずれかと共に共培養した。図75に示すように、CD4<sup>+</sup>T細胞の弱い活性化及び増殖はCDC-EVでのみ観察され、CDCでは観察されなかった。しかしながら、未分画PBMCを使用した場合に得られたものと比べて、活性化及び増殖のいずれの大きさもかなり低かった。したがって、幾つかの実施形態では、CDC及び/又はCDC-EVの投与は、驚くほど弱い免疫応答若しくは免疫応答の欠如をもたらすか、又は免疫応答を活性化しない。

10

## 【0254】

また、これらの結果を合わせると、幾つかの実施形態では、観察されるCDC-EV誘導性のT細胞の活性化及び増殖が主に単球/マクロファージ及び樹状細胞（DC）等の抗原提示細胞が関与し得る間接経路を介して起こることを示す。

同種EVに応答した間接的なT細胞の活性化及び増殖

## 【0255】

2名の異なる健康ドナーから得られた血液サンプルから単球を単離した。次いで、単離された単球を、GM-CSF（20 ng/ml）とIL4（20 ng/ml）の組み合わせで6日間刺激し、樹状細胞（DC）と分化させた。GM-CSF+IL4による単球の分化は、HLAII、CD80、及びCD86の分子の中程度の発現、CD16の欠如（単球/マクロファージのマーカー）、及びTLR-2の低発現を特徴とする未成熟DC（iDC）を生成する。次いで、これらの単球由来iDCをHLA不適合CDC-EVと共に一晩インキュベートした。

20

## 【0256】

EVで培養されたiDCは、成熟DC（mDC）の特徴を示した；図76に示すように、それらはHLAII、CD80及びCD86分子をアップレギュレートし、これはmDC特性と認められる。次いで、 $1 \times 10^4$ のiDC又はEVと接触していたiDC（iDC-EV）を、U底96ウェルプレートで更に6日間、自己T細胞（ $1 \times 10^5$ ）と共培養させた。iDC又はiDC-EVと共培養された自己T細胞を、CD69及びHLA-DRの発現及びそれらの増殖について分析した。図77に示すように、2名の異なるドナーに由来するT細胞の応答は変動したが、iDC-EV全体は、iDC単独よりもT細胞の増殖を活性化及び誘導するのにより強力であった。直接的なCDC-EV誘導性T細胞増殖と比較して、間接的なCDC-EV誘導性T細胞増殖の大きさはかなり高かった。

30

## 【0257】

成熟DC（mDC）により提示される場合のT細胞を刺激するCDC-EVの能力を評価した。mDCの食作用は非常に低いことを考慮に入れ、EVの適切な摂取を確保するため、アポトーシス体の食作用の以前の経験に基づいて、iDC及びiDC-EVを、DC成熟のインデューサーであると認識されているIFN（500 IU/ml）で一晩処理することにより、DCの成熟を誘導した。iDCと比較して、これらのmDCは、mDCの特徴であるHLAII、CD80及びCD86のより高い発現、並びにTLR-2のより高い発現を示した。mDCへのiDC成熟中のCDC-EVの存在は、図78に示すように、HLAII、CD86、CD80、及びTLR-2分子を更にアップレギュレートし、CDC-EVがDC成熟を促進し得ることを示した。

40

## 【0258】

次いで、mDC又はmDC-EVを自己T細胞（ $1 \times 10^5$ ）と共にU底96ウェルプレートで6日間共培養し、それらの活性化（CD69及びHLA-DRの発現）及び増殖を分析した。ここでも2名のドナーによる応答は変動したが、mDC-EV全体としては、mDC単独よりもT細胞の増殖を活性化及び誘導するのにより強力であった。iDC-

50

E V 誘発性応答と比較して、同じドナーの m D C - E V 誘発性 T 細胞の活性化及び増殖は高かった。

【 0 2 5 9 】

T 細胞の活性化及び増殖に関するこれらの結果全体が、直接経路の少なくともいくつかの活性化を排除することなく、C D C - E V が間接経路を通じて T 細胞の増殖を活性化及び誘導できることを示唆する。したがって、幾つかの実施形態では、間接経路が活性化される。他の実施形態では、直接経路は部分的に活性化される。更に追加の実施形態では、直接経路と間接経路の組み合わせが活性化される。

C D C 及び C D C - E V による免疫調節

【 0 2 6 0 】

C D C 又は C D C - E V は、D C 成熟を増強する可能性があるが、これは、それらが対象内で必ずしも有害反応をもたらすことを意味するものではない。これを評価するため、C D C 及び C D C - E V が同種の環境において進行中の免疫応答を調節する能力を調査した。図 8 0 の上段パネルに示すように、C D C (  $1 \times 10^4$  ) 又は様々な用量の C D C - E V の不在下又は存在下において、H L A 不適合未分画 C F S E 標識 P B M C (  $1 \times 10^5$  ) を P H A (  $1 \mu g / m l$  ) で刺激した。実験を U 底 9 6 ウェルプレートで実施し、同種 T 細胞増殖を、C F S E をモニタリングすることにより評価した。C D C 及び C D C - E V はいずれも、P H A 誘導性の C D 4 <sup>+</sup> 及び C D 8 <sup>+</sup> T 細胞増殖をダウンレギュレートすることができた。T 細胞増殖の C D C - E V 誘導性ダウンレギュレーションは用量依存的であり、最高使用量 (  $20 \times 10^9$  粒子 ) では、図 8 0 に示すように、C D C - E V は親細胞よりも進行中の応答のダウンレギュレーションにおいてより強力であった。

【 0 2 6 1 】

C D C 及び C D C - E V により誘導される免疫調節は、同じ実験環境内で P B M C に代えて精製された C D 3 <sup>+</sup> T 細胞が使用された場合に同様の結果が得られたことから、直接効果による可能性が高い。実際、C D C 及び C D C - E V は、図 8 1 に示すように、2 名の異なるドナーから得られた T 細胞上で C D C 6 9 及び / 又は H L A - D R の P H A 誘導性発現をダウンレギュレートすることができた。

【 0 2 6 2 】

図 8 2 に示すように、C D C 及び C D C - E V による T 細胞活性化マーカーのダウンモジュレーションは、P H A 誘導性 C D 4 <sup>+</sup> 及び C D 8 <sup>+</sup> T 増殖の顕著なダウンレギュレーションをもたらした。同じく図 8 3 に示すように、2 名のみのドナーで得られたドナー間の変動にもかかわらず、結果の限界内で、C D C 及び C D C - E V はいずれも強力な免疫調節因子である。

【 0 2 6 3 】

免疫調節を誘導する C D C - E V の能力のこれらの研究は、それらが強力な免疫調節物質であることを実証した。したがって、幾つかの実施形態では、C D C 及び / 又は C D C - E V の投与は、全体的に免疫応答を驚くほど抑制する。

実施例 4 3 : 単回投与と比較した同種 C D C の頻回投与による更なる改善

【 0 2 6 4 】

幾つかの場合には、C D C 及び C D C - E V は免疫応答を抑制し得ることから、免疫応答が治療上の効果を著しく弱めることなく、又は炎症応答を引き起こすことなく、対象に繰り返し投与され得る。この実施例の研究の目的の 1 つは、同種 C D C を頻回全身投与すると、単回投与と比較して相加効果又は増強効果が得られるかどうかを評価することであった。例えば、m d x マウスでモデル化されているように、複数回の投与により、筋ジストロフィーの対象の筋肉活動及び運動能力の更なる改善が促進される可能性がある。したがって、目標は、同種 C D C の頻回投与後の免疫応答を分析することであった。

【 0 2 6 5 】

心臓外植片に由来する細胞を超低接着性プレートで培養して心筋球を得た後、フィブロネクチン被覆プレートに播種して C D C を作製した。加齢 m d x マウス ( 生後 8 カ月 ~ 1 0 カ月 ) に 3 用量の C D C を 6 週間おきに I V 投与し ( 0 週目、6 週目及び 1 2 週目に頻

10

20

30

40

50

静脈を介して全身投与)、14週間に亘って運動能力を毎週分析した。この実験で使用した用量は、150000個の同系CDC( $n=8$ )、150000個の同種CDC( $n=6$ )、又は対照としてのPBS( $n=6$ )であった。また、同種抗体の有無を分析して、CDCが引き起こした可能性がある免疫活性化の程度を判断した。

#### 【0266】

同系又は同種CDCの全身投与を繰り返した結果、図84A~図84Cに示されるように、mdxマウスへの各投与後の運動能力の増加がもたらされた。これらの結果は、幾つかの実施形態では、複数の全身投与で送達される治療有効用量が、単回投与と比較した場合に処理上の利益を高めることを示している。驚くべきことに、CDC投与は同種抗体の産生が弱い低免疫原性プロファイルをもたらし、幾つかの実施形態では、同系及び/又は同種のCDCの頻回投与は免疫応答を生じないことを示す。或る実施形態では、単回投与と比較した頻回投与の増強された利点は、低い免疫原性プロファイル及び/又はアロ抗体の弱い産生が、より多くのCDCを体内に残すことができる、及び/又はCDCを体内により長く残すことができるため、CDCの数が増える又は期間が長くなると、有益な効果がより大きく発揮され得ることから、弱い免疫原性プロファイル及び/又は弱い同種抗体の産生をもたらす。例えば、免疫応答が、CDCが有益な効果を発揮する前に、2回目の投与でCDCを破壊した可能性があることから、強い免疫応答が2回目の投与による治療効果の向上を妨げた可能性がある。幾つかの実施形態では、CDCの数回の全身投与が行われ、追加の投与の少なくとも1回がCDCの最初の投与の利益を高める。

#### 【0267】

別の例では、同系CDC及び/又は同種CDCの頻回投与は、CDCに対する免疫応答の欠如又は比較的弱い免疫応答の結果として少なくとも部分的に、単回のCDC投与と比較して、心臓線維化、心臓組織損傷及び心臓リモデリングの減少、並びに心臓又は心室機能の改善等の心臓に対してより有益な効果を発揮する。

#### 【0268】

複数のCDC投与と免疫応答の相互作用を更に評価するため、免疫系と炎症を抑制する副腎皮質ステロイドの有無にかかわらずCDCを投与する別の実験を含めた。8カ月齢~10カ月齢のmdxマウスにPBSビヒクル( $n=6$ )、PBSビヒクル+ステロイド( $n=7$ )、CDC( $n=7$ )、又はCDC+ステロイド( $n=8$ )を投与した。CDCを、投与毎にマウス1匹当たり150000個のCDCの用量で投与した。ステロイド(プレドニゾン、1mg/kg/日)をCDC及び/又はPBS投与の各週に5日間投与した。ステロイド、CDC及び/又はビヒクルを0週に1回と6週に2回目の2回投与した。各投与には、頸静脈への全身静脈内注射を含めた。図85Aに示すように、ステロイドの投与はCDCの有効性に影響を与えず、ステロイドの有無にかかわらず運動能力の同様の改善が観察された。血液中のCDCに対するアロ抗体をフローサイトメトリーによって測定した。図85B及び図85Cに示すように、CDCは、ステロイドの有無にかかわらず、免疫原性プロファイルが低かった(図86も参照されたい)。これらの結果は、免疫応答が1回以上のCDC投与の治療上の利益を妨げ又は減少させた場合、ステロイドは、その免疫応答を低下させることによりCDCの治療効果を高めると予想されていることから、全身CDC投与に対する免疫応答の欠如と一致する。したがって、幾つかの実施形態では、免疫応答の欠如又は弱い免疫応答により、追加のCDCを複数回投与することが可能になり、それによって、CDCに対する免疫反応が最小限又は存在しない状態で、単回投与と比較して増強された治療効果を発揮する。

#### 【0269】

これらのデータは、CDCの反復投与がmdxマウスの更なる運動改善に効果的であることを示している。同種CDCは免疫系によって認識されるが、それらの免疫原性プロファイル及び免疫調節能力が低いことにより、同種CDCを複数回効果的に投与され得る。

#### 【0270】

上記は、明確化及び理解の目的で、例示及び実施例によってある程度詳細に記載されているが、本開示の趣旨から逸脱することなく修正がなされてもよいことが当業者によって

理解されるであろう。したがって、本明細書に開示される形態は例示にすぎず、本開示の範囲を限定するものではなく、むしろ本発明の実施形態の真の範囲及び趣旨に沿った全ての修正及び代替も網羅することが明確に理解されるべきである。

#### 【 0 2 7 1 】

上に開示される実施形態の具体的な性質及び態様の様々な組み合わせ又はサブコンビネーションが作られてもよく、なおも本発明の1つ以上の範囲に含まれることが企図される。さらに、実施形態に関連する特定の性質、態様、方法、特性、特徴、品質、属性、要素等の本明細書における開示は、本明細書に記載される他の全ての実施形態で使用され得る。したがって、開示される発明の様々な様式を形成するため、開示される実施形態の様々な特徴及び態様を互いに組み合わせ、又は置換できることが理解されるべきである。よって、本明細書に開示される本発明の範囲は、上記の特定の開示される実施形態によって限定されるべきではないことが意図される。さらに、本発明は様々な修正及び代替の形態が可能であるが、その具体例は図面に示され、本明細書で詳細に説明される。しかしながら、本発明は、開示される特定の形態又は方法に限定されるものではないが、それとは対照的に、本発明は、記載される様々な実施形態及び添付の特許請求の範囲の趣旨及び範囲に含まれる全ての修正、同等物及び代替物を網羅するものであると理解されるべきである。開示されるどの方法も本明細書に列挙される順で行う必要はない。本明細書で開示される方法は、主治医によってとられる特定の行動を含むが、明示的又は暗示的にこれらの動作の任意の第三者の指示を含めることもできる。例えば、「抗原結合タンパク質の投与」等の動作には、「抗原結合タンパク質の投与の指示」が含まれる。さらに、本開示の特徴又は態様がマーカッシュグループに関して記載されている場合、当業者は、それによってマーカッシュグループの個々のメンバー又はメンバーのサブグループに関しても本開示が記載されていることを認識するであろう。

10

20

#### 【 0 2 7 2 】

また、本明細書に開示される範囲は、任意の及び全ての重複、部分範囲及びそれらの組み合わせを包含する。「最大、まで」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」、「間」等の言語には列挙される数字が含まれる。「約」や「およそ」等の用語が前に付く数字には、記載されている数字が含まれる。例えば、「約90%」には「90%」が含まれる。幾つかの実施形態では、少なくとも95%の相同性には、参照配列に対して96%、97%、98%、99%、及び100%の相同性が含まれる。さらに、配列がヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を「含む」と開示される場合、かかる言及には、特に明記しない限り列挙される配列を「含む」、「からなる」又は「から本質的になる」ことも含まれる。

30

#### 【 0 2 7 3 】

特に明示的に述べられていない限り、本出願、特に添付の特許請求の範囲で使用される用語及び語句、並びにその変形、限定ではなく非限定であると解釈されるべきである。前述のものの例として、「含む」という用語は、「限定されずに含む」、「を含むが、これらに限定されない」等を意味すると読まれるべきである。

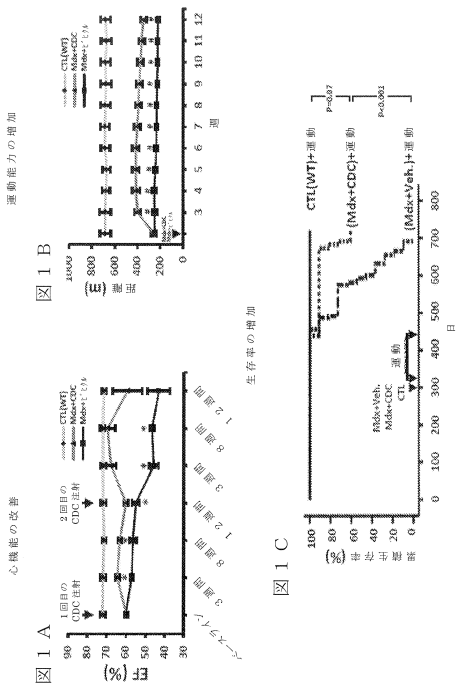
#### 【 0 2 7 4 】

不定冠詞「1つの(a)」又は「1つの(an)」は複数を排除しない。例えば、分子量の値及び範囲を定義するための、本明細書で使用される「約」という用語は、表示の値及び/又は範囲の限界が $\pm 20\%$ 内、例えば $\pm 10\%$ 内で変動し得ることを意味する。数字の前の「約」の使用は、その数自体を含む。例えば、「約5」は、「5」の明示的な支持を提供する。重複する範囲及びその間の整数を含む範囲で提供される数字、例えば、1~4及び5~7の範囲は、例えば、1~7、1~6、1~5、2~5、2~7、4~7、1、2、3、4、5、6及び7を含む。

40

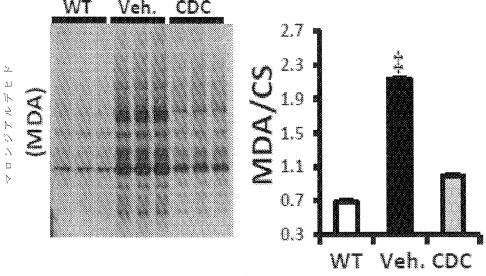
【図面】

【図 1 - 1】

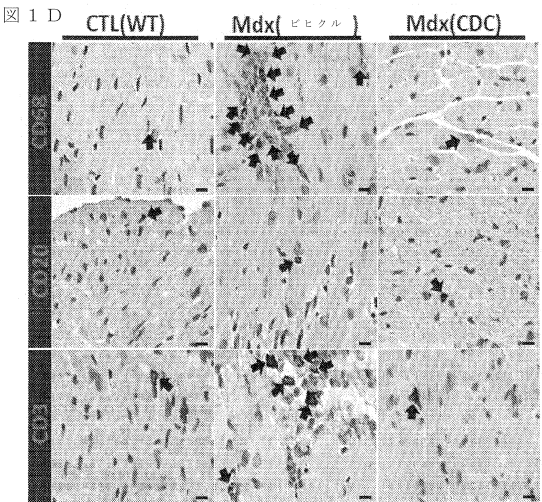


【図 1 - 3】

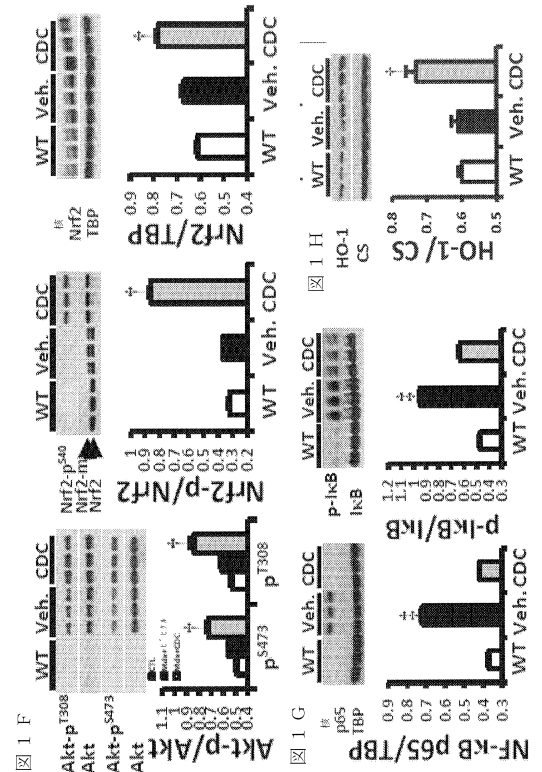
図 1 E



【図 1 - 2】



【図 1 - 4】



10

20

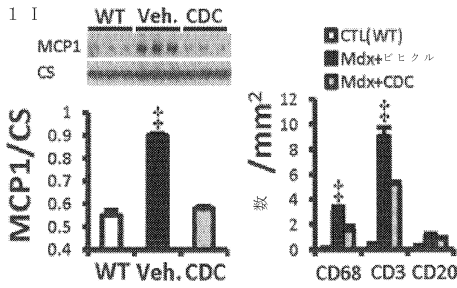
30

40

50

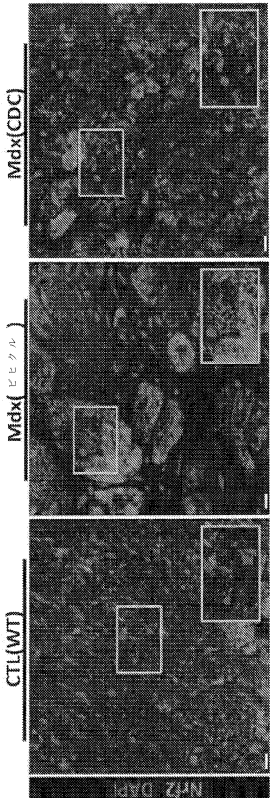
【 図 1 - 5 】

図 1 I

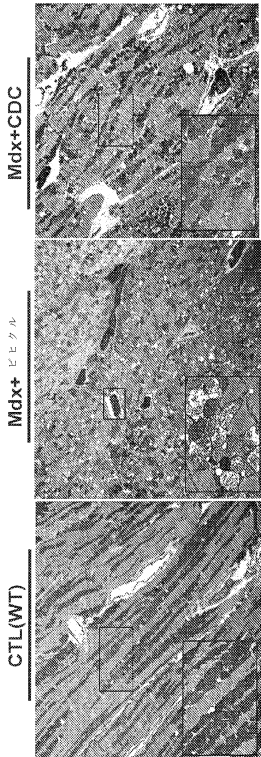


【 図 1 - 6 】

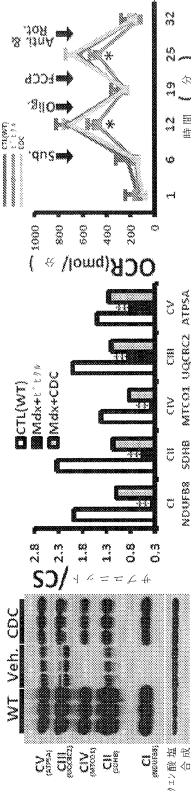
図 1 J



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



10

20

30

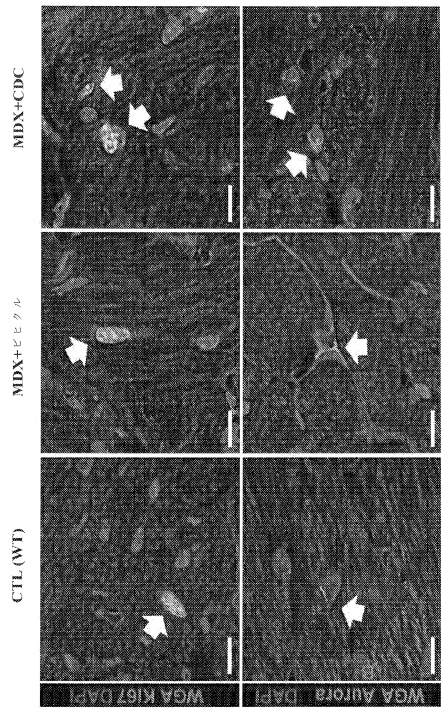
40

50

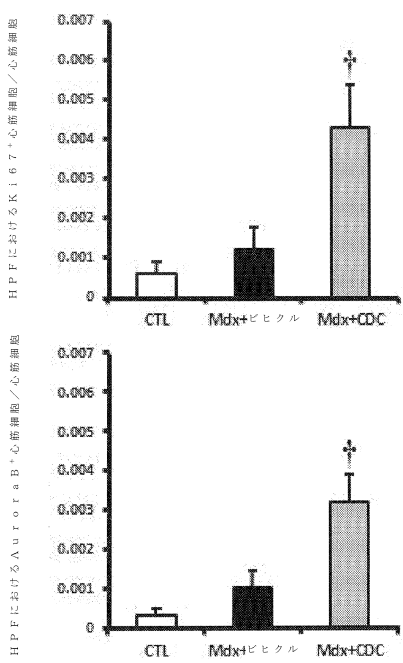




【図 5 A】



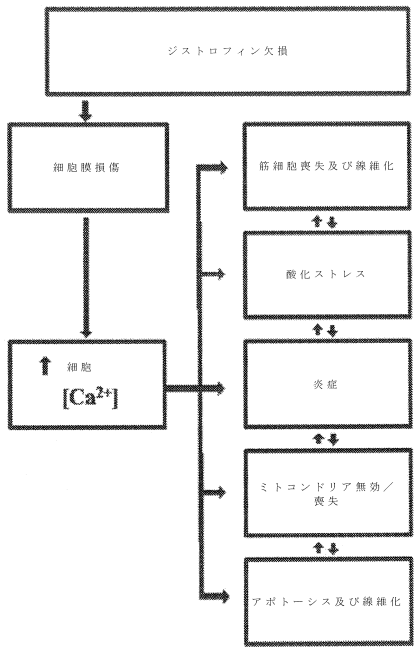
【図 5 B】



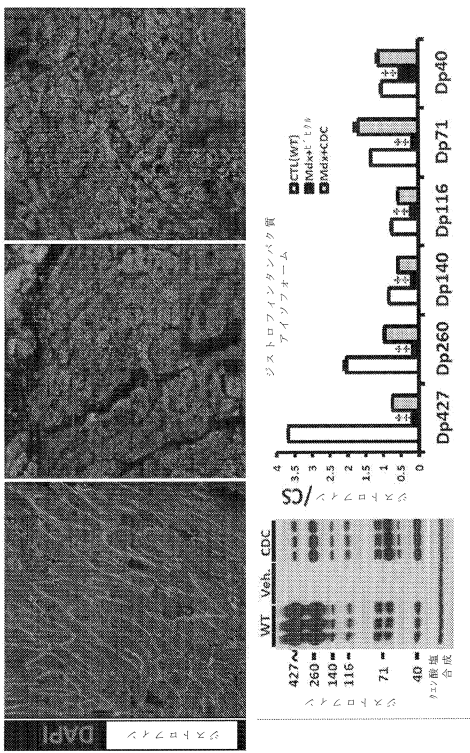
10

20

【図 6】



【図 7 A】



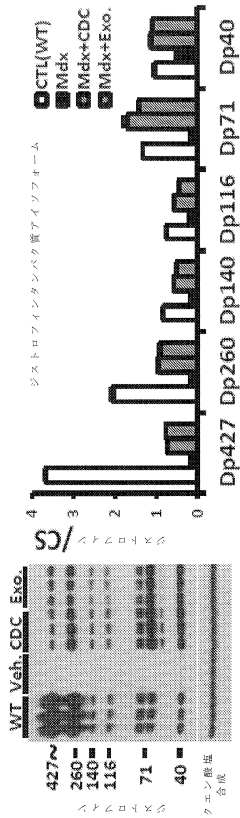
30

40

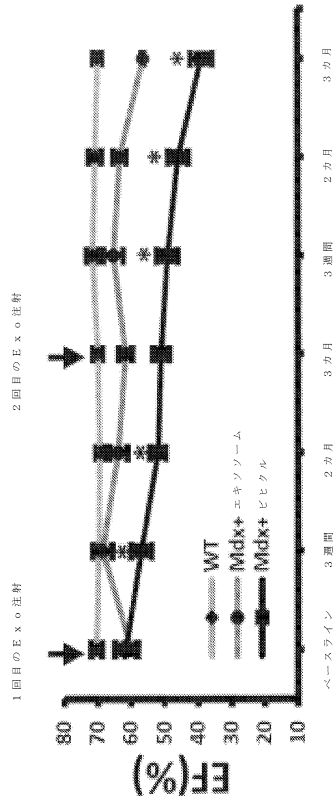
50



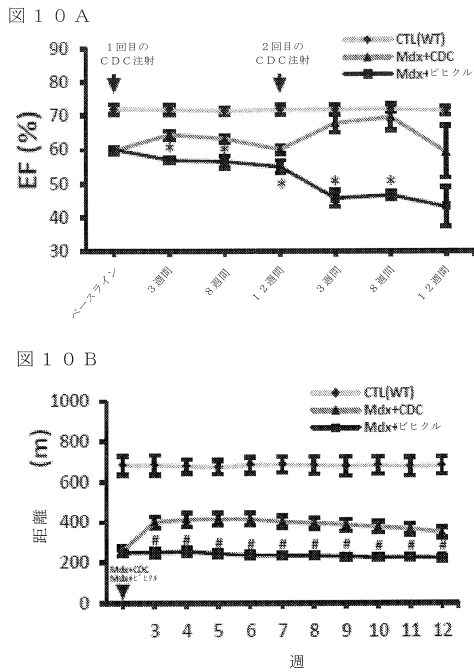
【図 9 C】



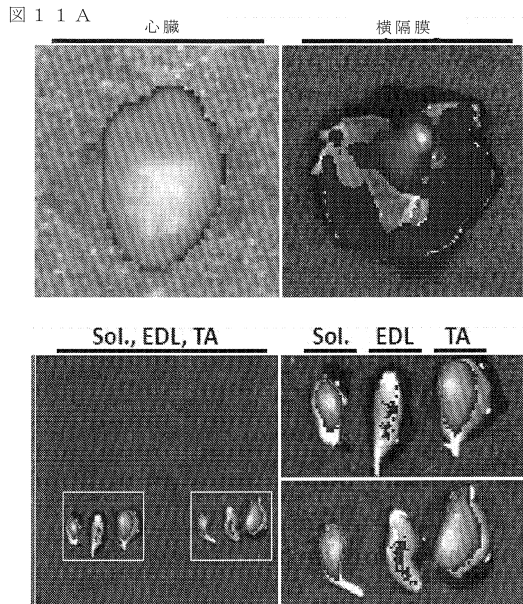
【図 9 D】



【図 10】



【図 11 - 1】



10

20

30

40

50

【図 1 1 - 2】

図 1 1 B

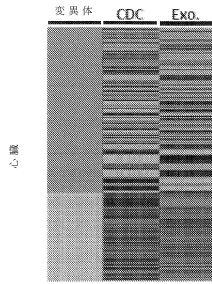
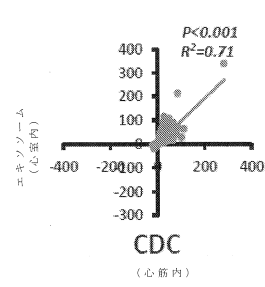


図 1 1 C



【図 1 1 - 3】

図 1 1 F

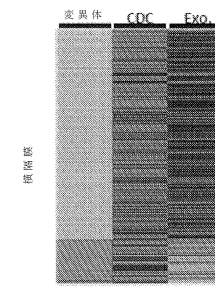


図 1 1 G

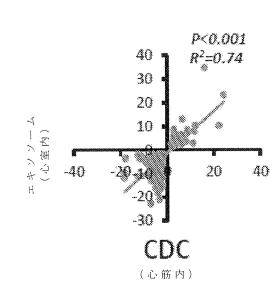


図 1 1 D

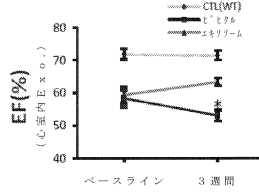


図 1 1 E

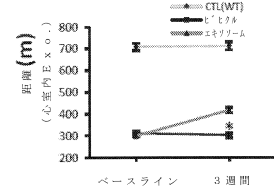
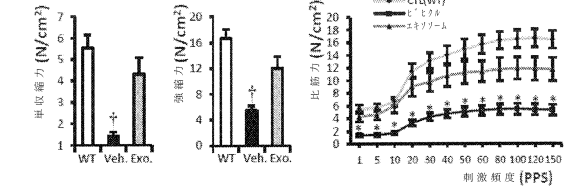


図 1 1 H



【図 1 1 - 4】

図 1 1 I

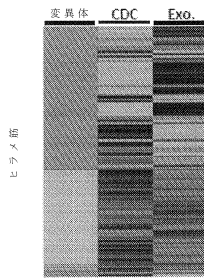
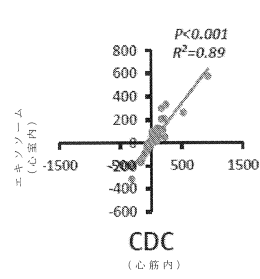


図 1 1 J



【図 1 1 - 5】

図 1 1 L

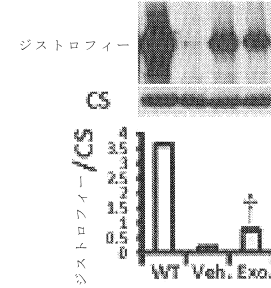


図 1 1 M

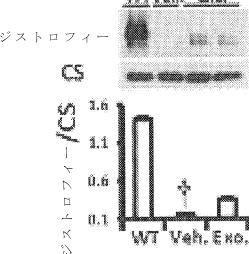


図 1 1 K

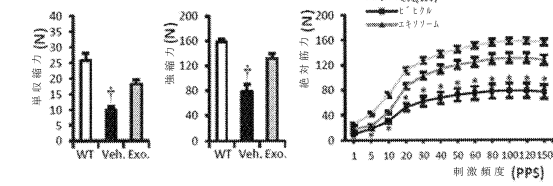
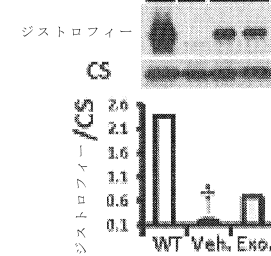


図 1 1 N



10

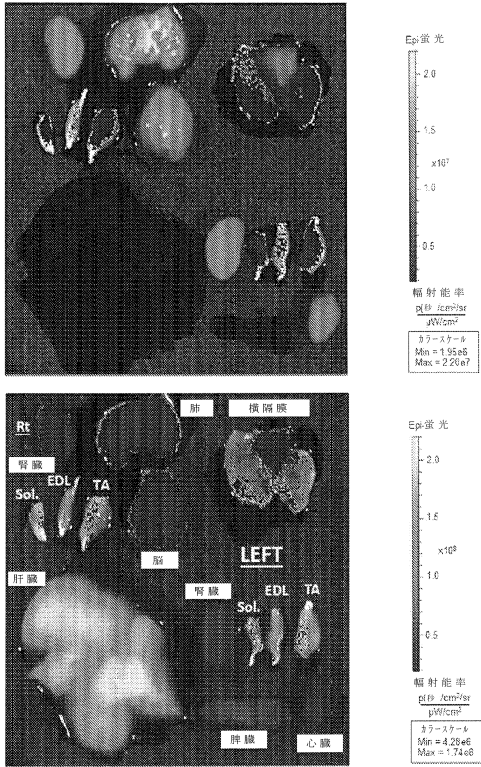
20

30

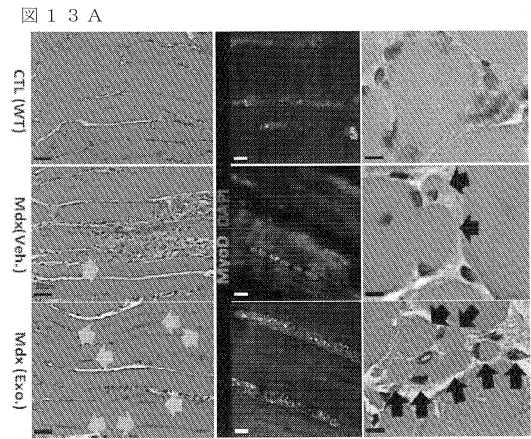
40

50

【図 1 2】



【図 1 3 - 1】



10

20

【図 1 3 - 2】

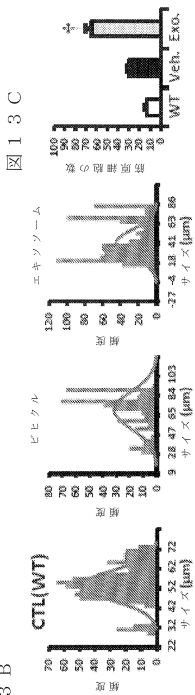
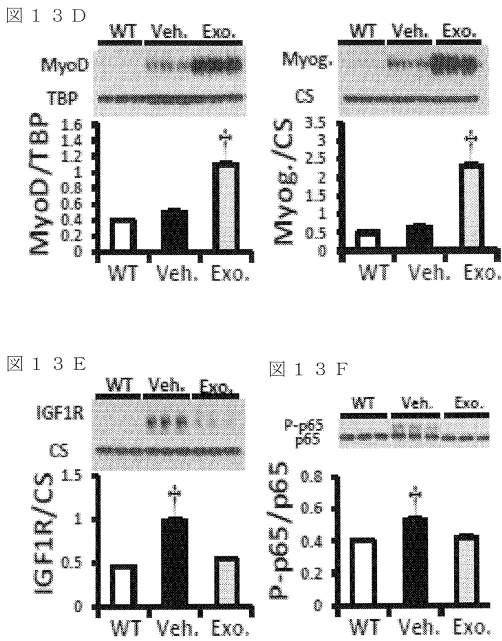


図 1 3 B

【図 1 3 - 3】

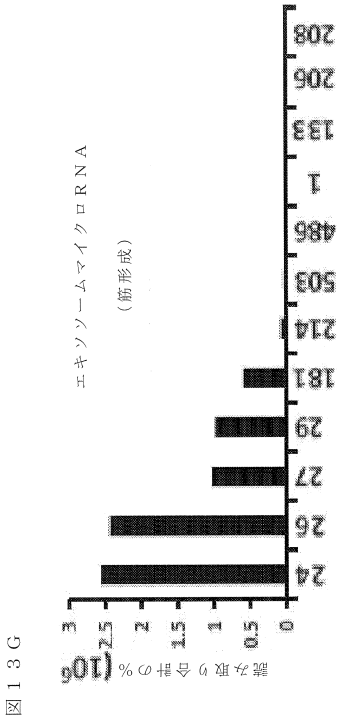


30

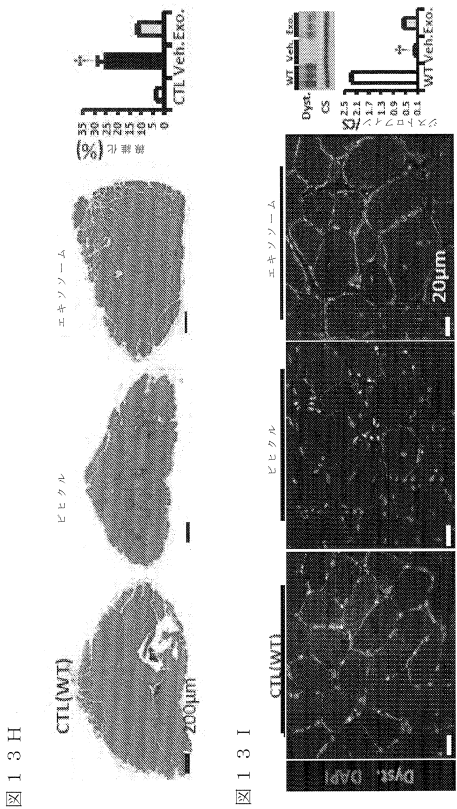
40

50

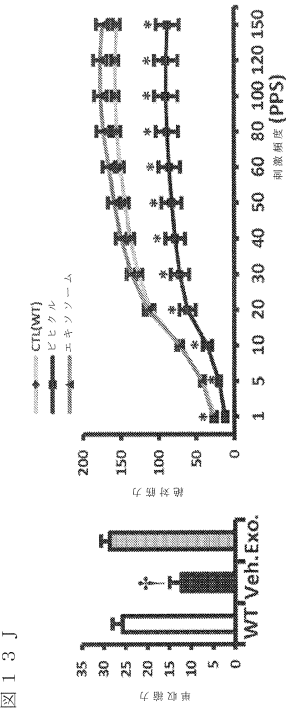
【図 1 3 - 4】



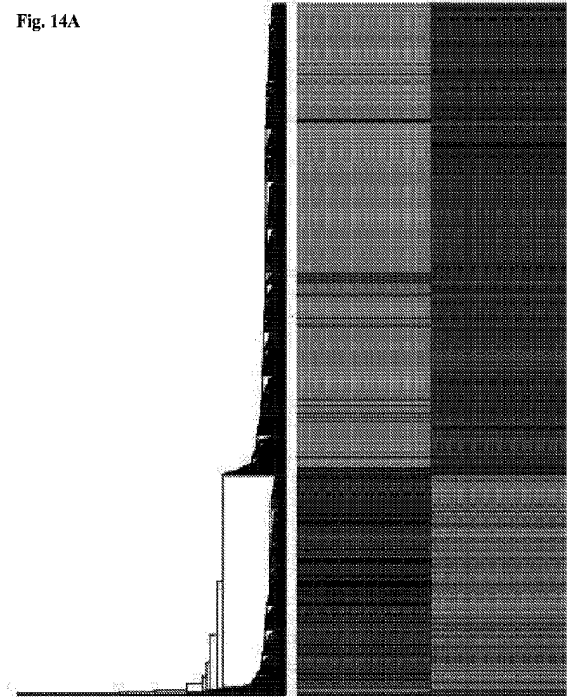
【図 1 3 - 5】



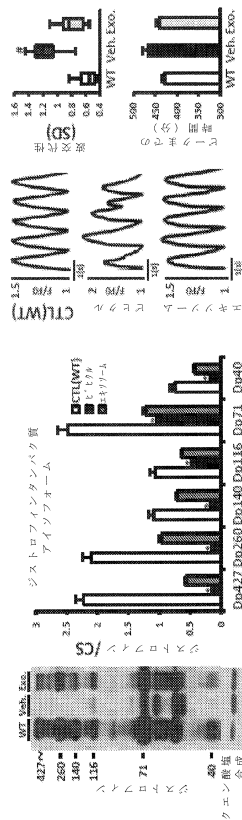
【図 1 3 - 6】



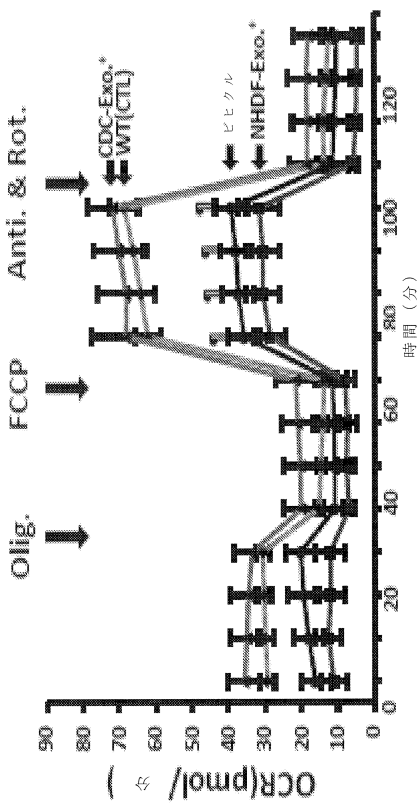
【図 1 4 A】



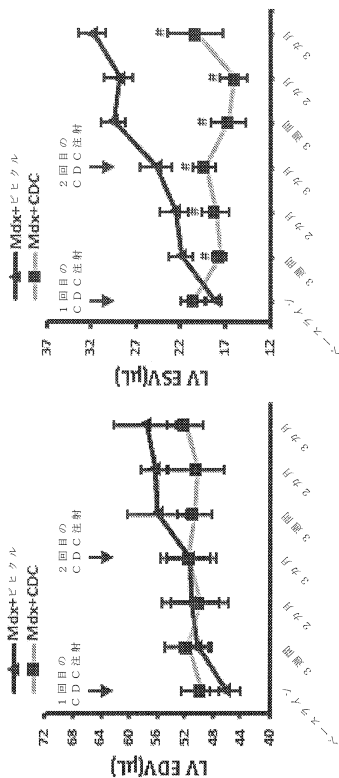
【図 1 4 B】



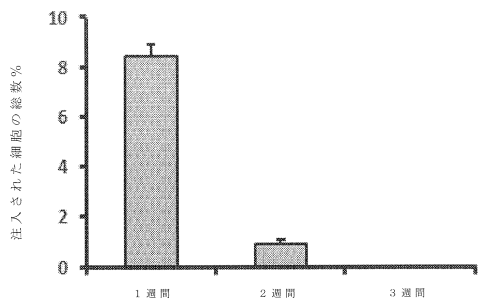
【図 1 4 C】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

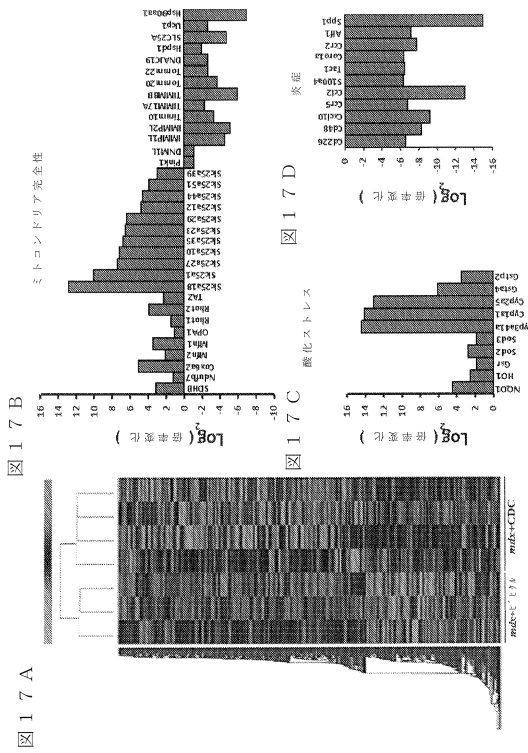
20

30

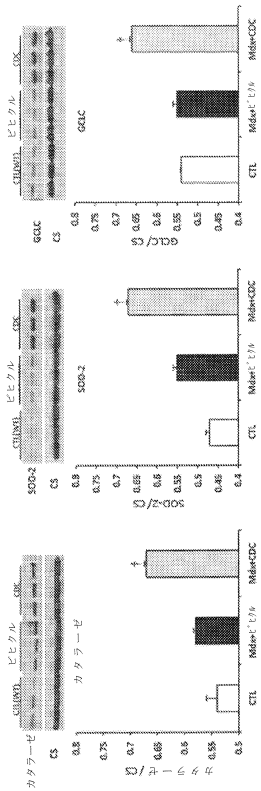
40

50

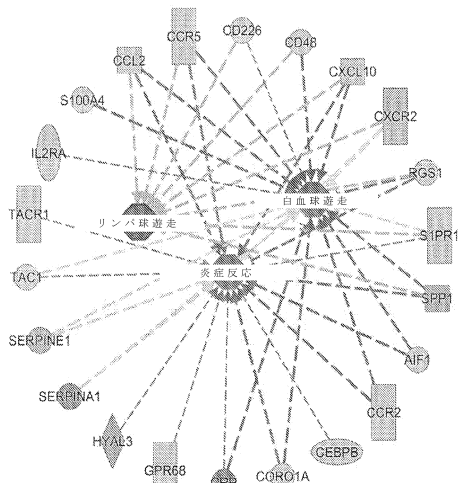
【図 17】



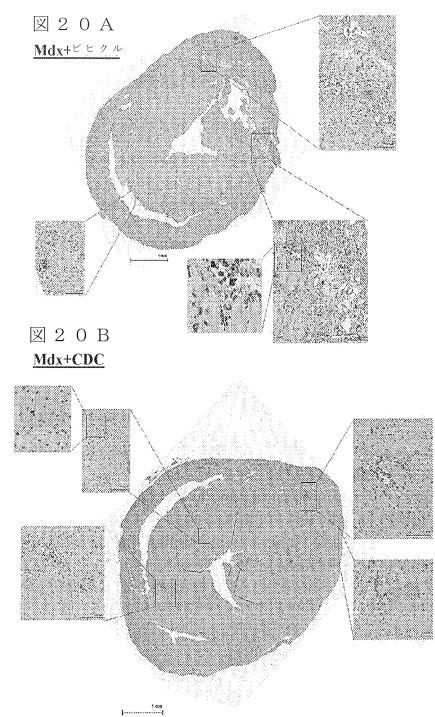
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

20

30

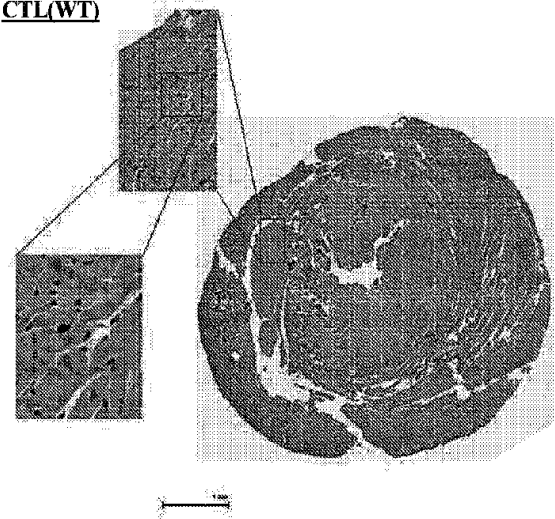
40

50

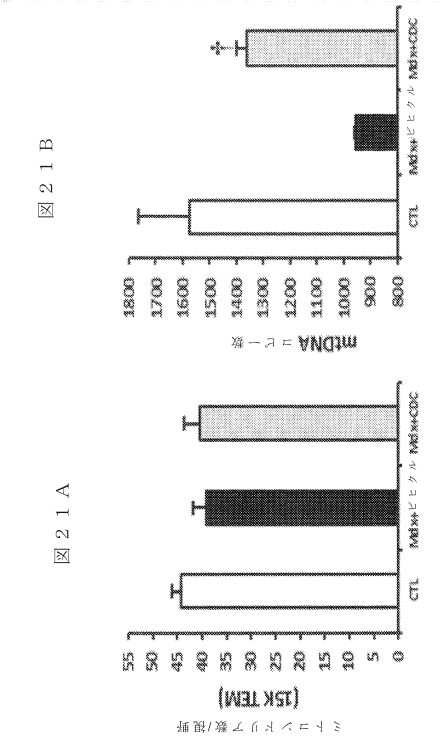


【図 20C】

Fig. 20C  
CTL(WT)



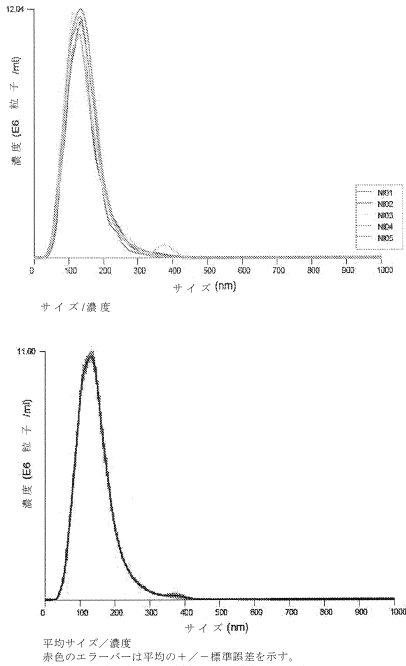
【図 21】



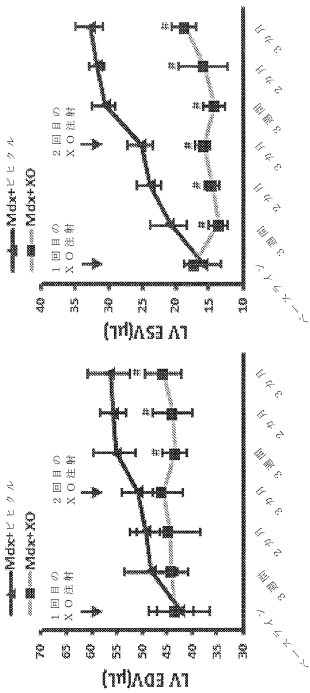
10

20

【図 22】



【図 23】



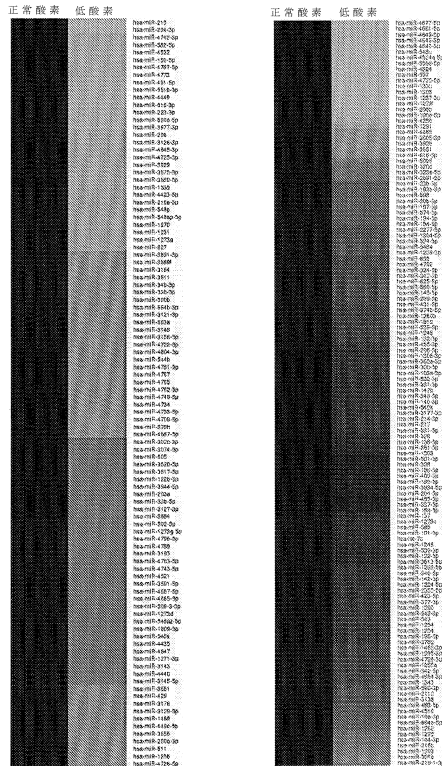
30

40

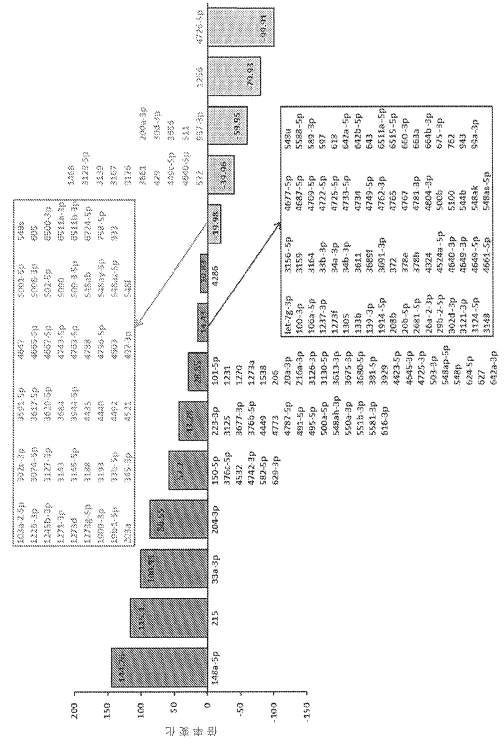
50



【図 28】



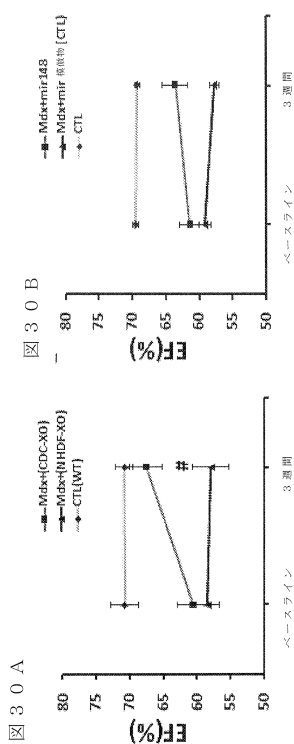
【図 29】



10

20

【図 30】



【図 31】

図 31 A

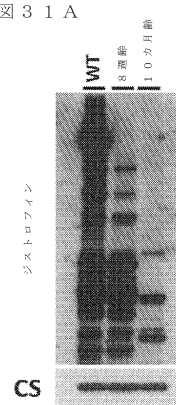
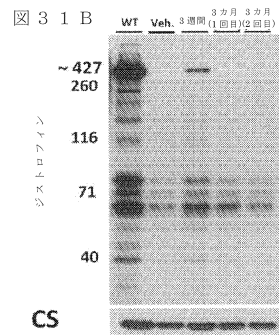


図 31 B



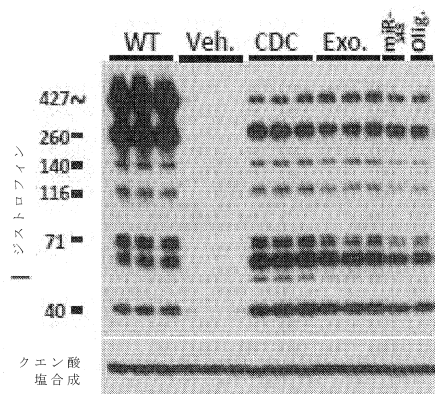
30

40

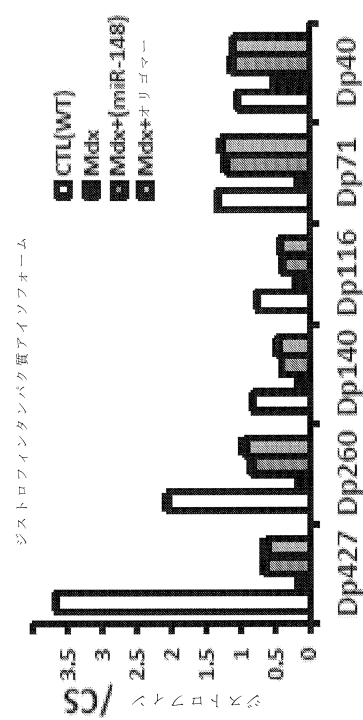
50



【図 3 5 B】

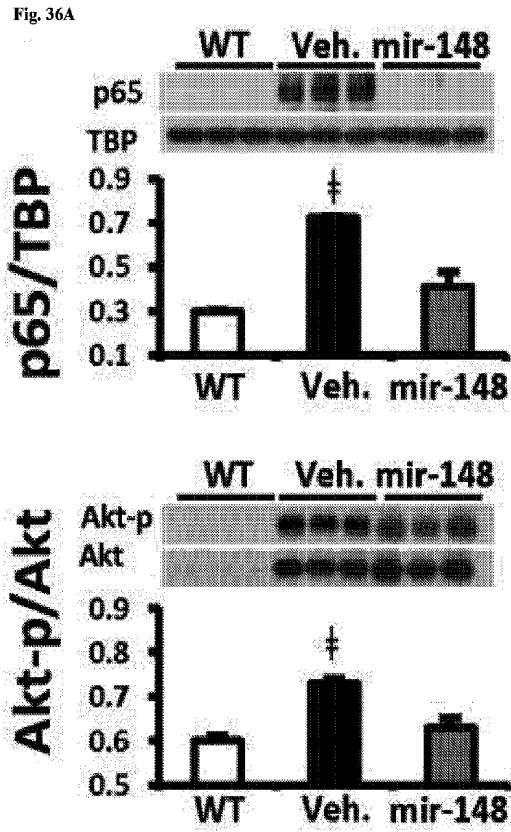


【図 3 5 C】

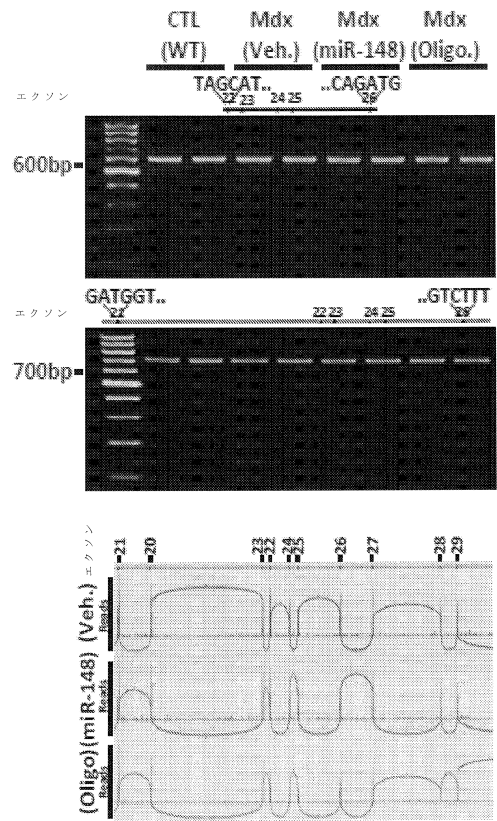


【図 3 6 A】

Fig. 36A



【図 3 6 B】



10

20

30

40

50

【図 3 7】

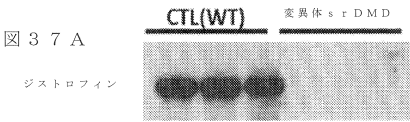
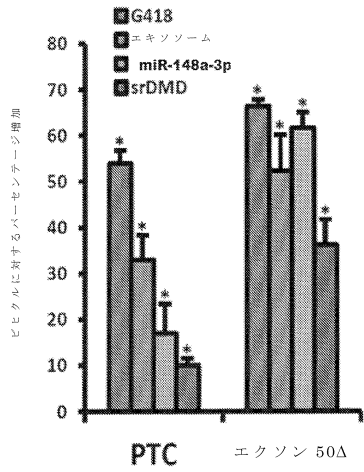
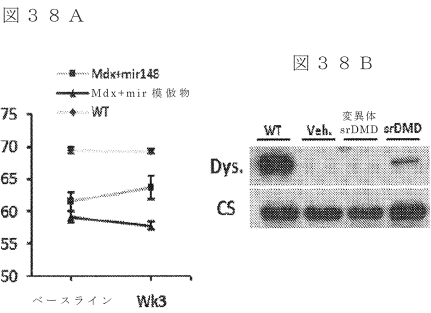


図 3 7 B

ジストロフィン・GFP 発現



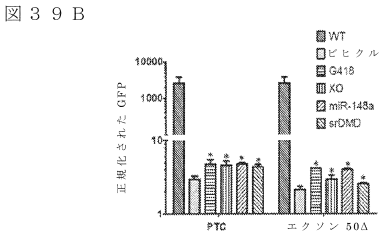
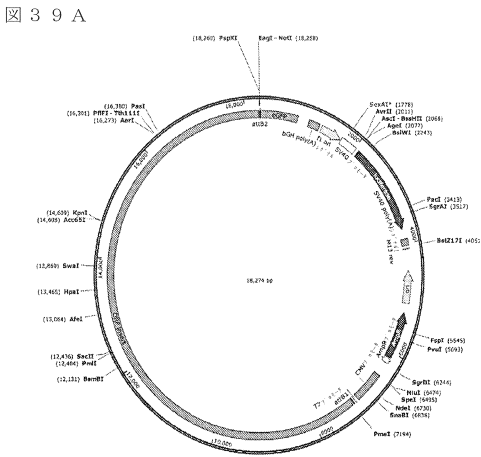
【図 3 8】



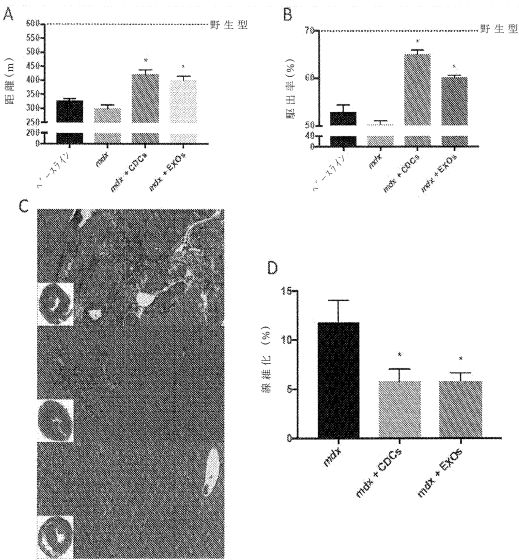
10

20

【図 3 9】



【図 4 0】

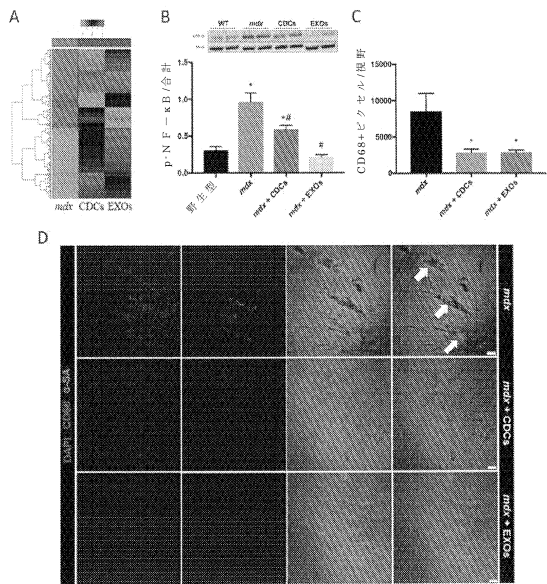


30

40

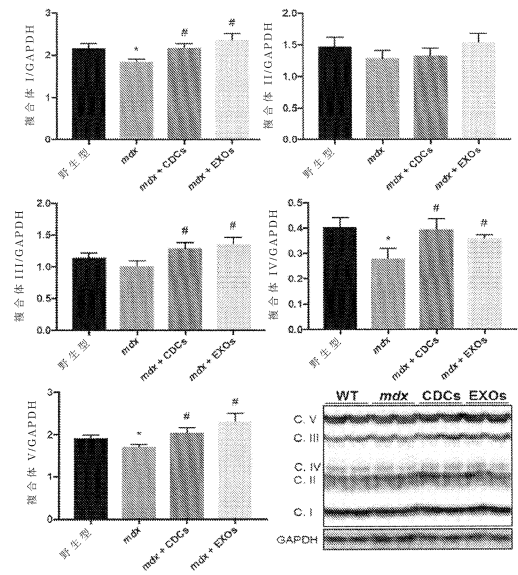
50

【図 4 1】



【図 4 2 - 1】

図 4 2 A



10

【図 4 2 - 2】

図 4 2 B

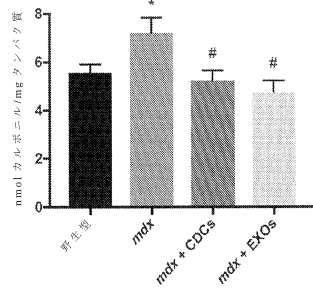
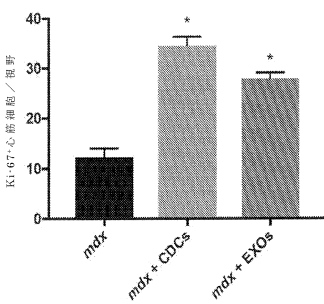
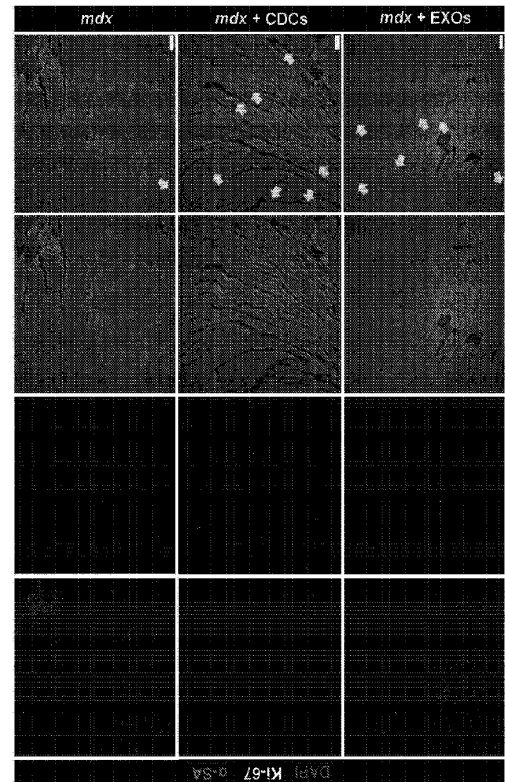


図 4 2 C



【図 4 2 - 3】

Fig. 42D



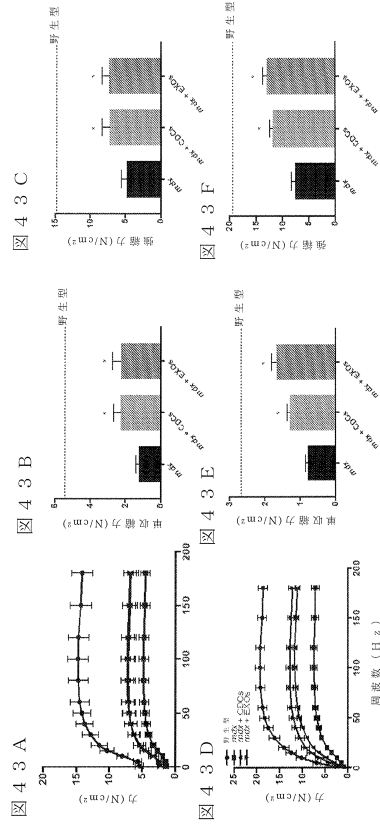
20

30

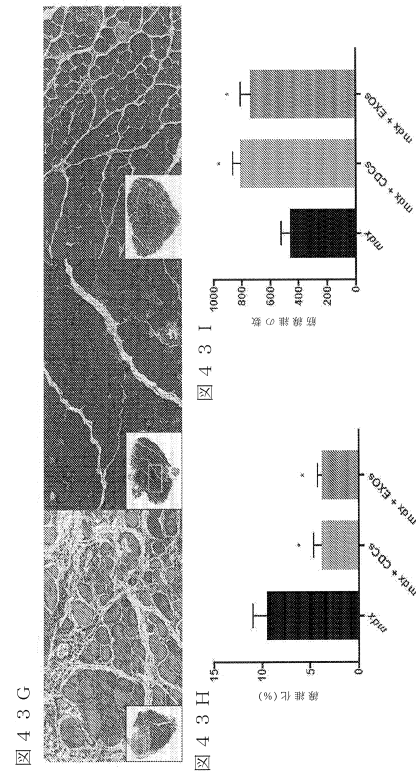
40

50

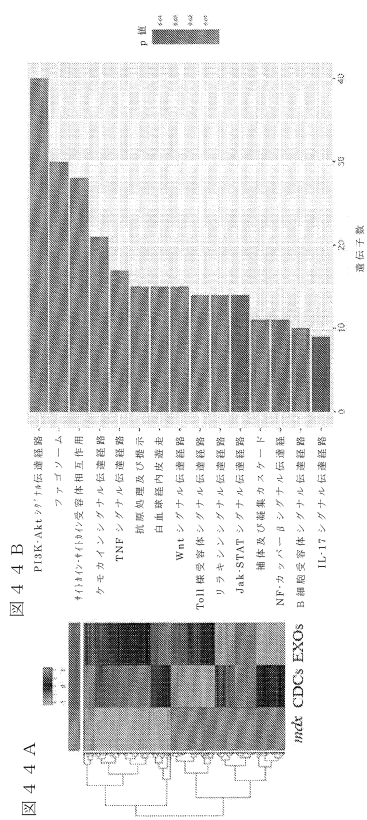
【図 4 3 - 1】



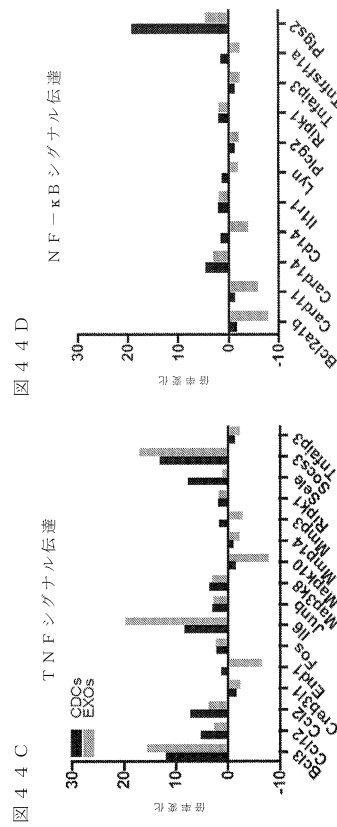
【図 4 3 - 2】



【図 4 4 - 1】



【図 4 4 - 2】



10

20

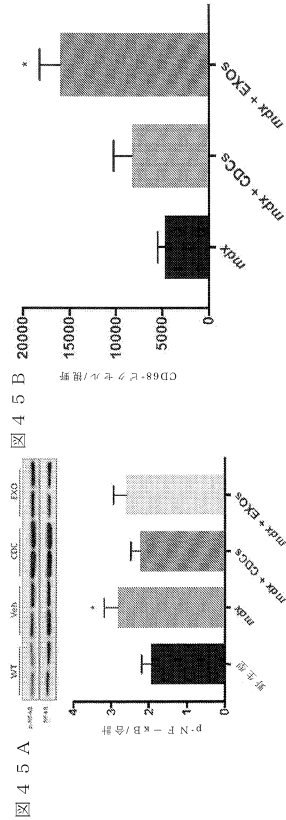
30

40

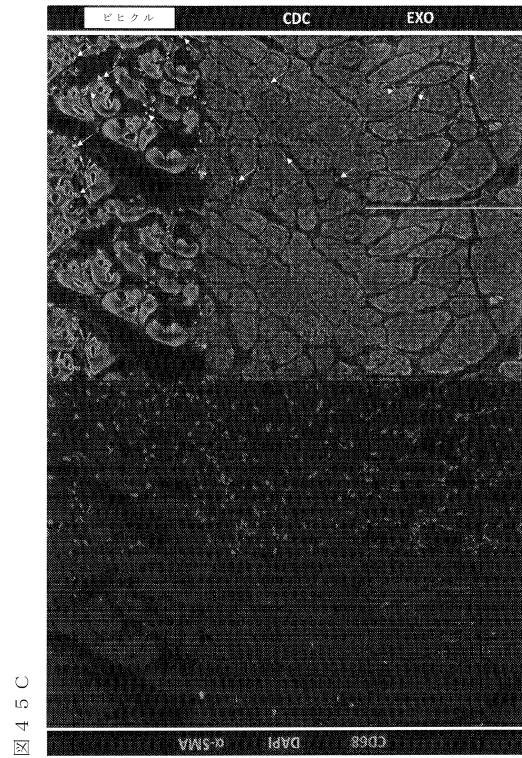
50



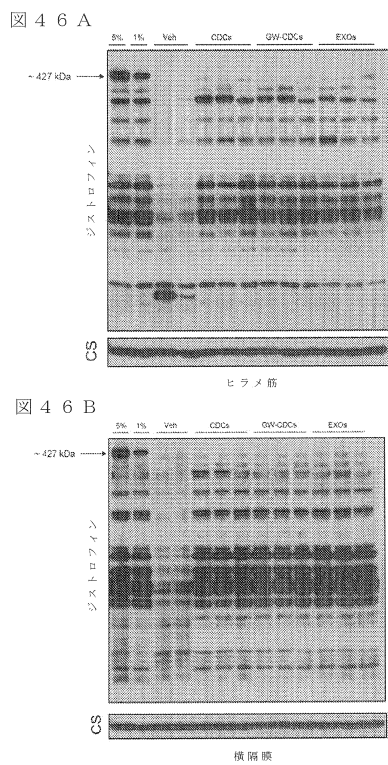
【図 4 5 - 1】



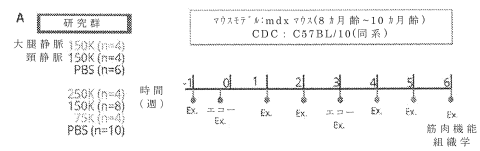
【図 4 5 - 2】



【図 4 6】



【図 4 7】



10

20

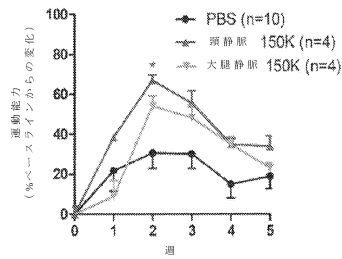
30

40

50

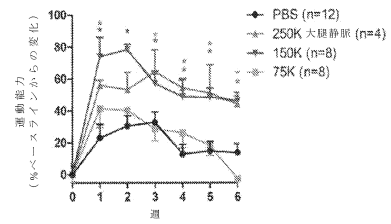
【図 48 A】

マウスモデル： M d x マウス (8 カ月齢～10 カ月齢)  
 CDC： C57BL/10 (同系)  
 用量： 150k  
 注射経路： 頸静脈又は大腿静脈  
 注射時間： 0 週



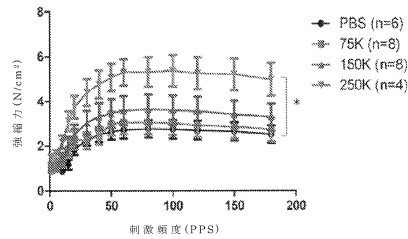
【図 48 B】

マウスモデル： M d x マウス (8 カ月齢～10 カ月齢)  
 CDC： C57BL/10 (同系)  
 用量： 75k、150k 又は 250k  
 注射経路： PBS、150k、75k：頸静脈  
 250k：大腿静脈  
 注射時間： 0 週



【図 49】

マウスモデル： M d x マウス (8 カ月齢～10 カ月齢)  
 CDC： C57BL/10 (同系)  
 用量： 75k、150k 又は 250k  
 注射経路： PBS、150k、75k：頸静脈  
 250k：大腿静脈  
 注射時間： 0 週



【図 50】

図 50 A

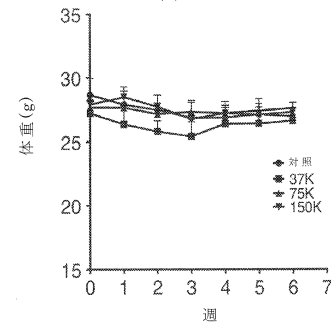
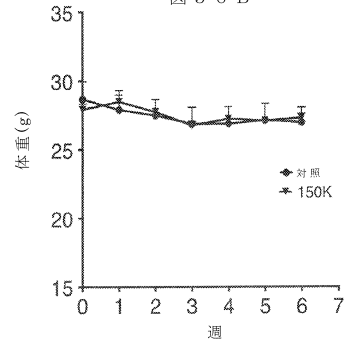


図 50 B



10

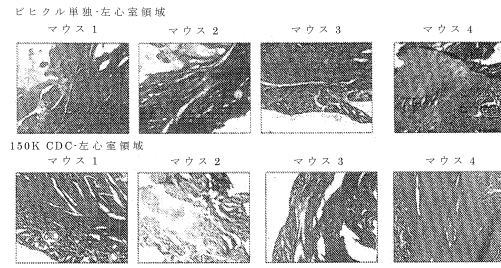
20

30

40

50

【図 5 1】



【図 5 2】

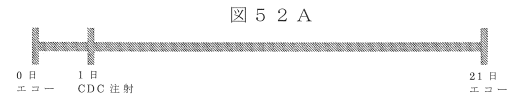
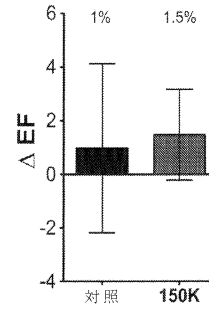
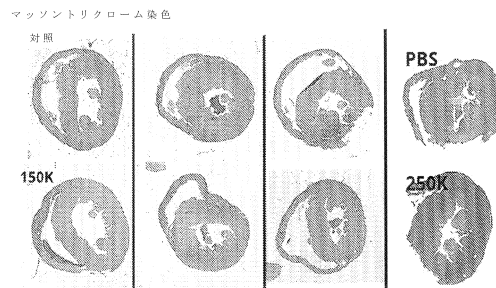


図 5 2 B

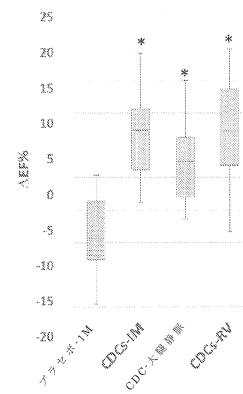


10

【図 5 3】



【図 5 4】



20

30

40

50

【図 5 5】

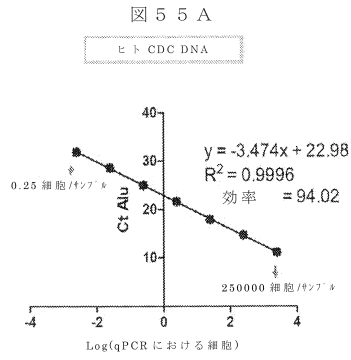
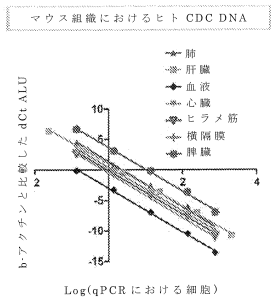


図 5 5 B



【図 5 6】

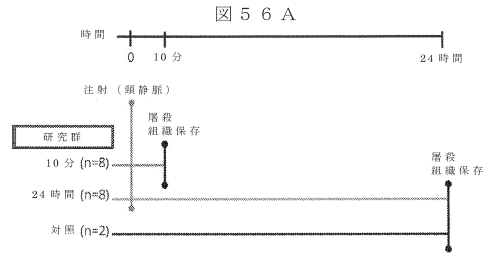
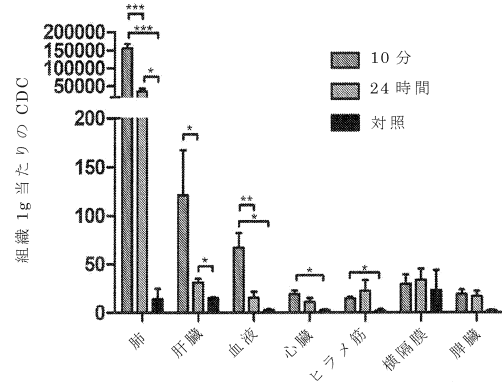


図 5 6 B



【図 5 7 - 1】

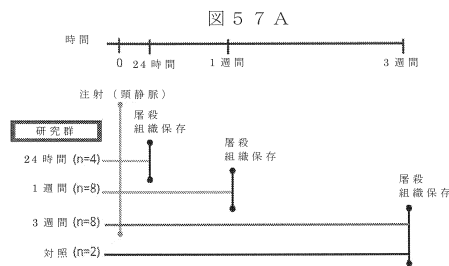
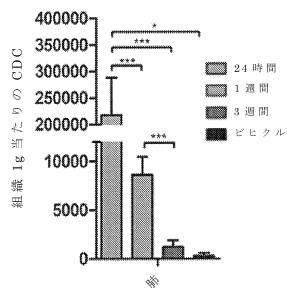
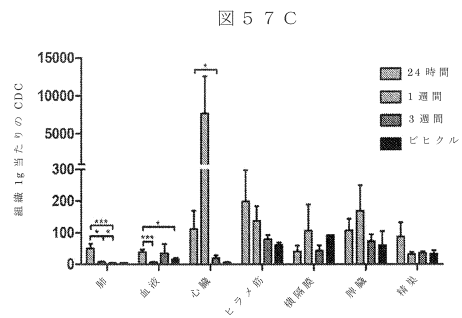


図 5 7 B



【図 5 7 - 2】



10

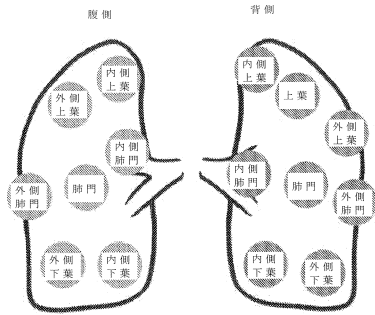
20

30

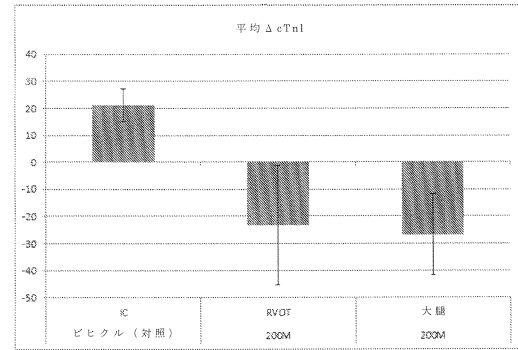
40

50

【図 58】

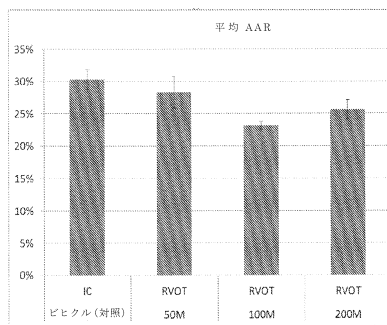


【図 59】

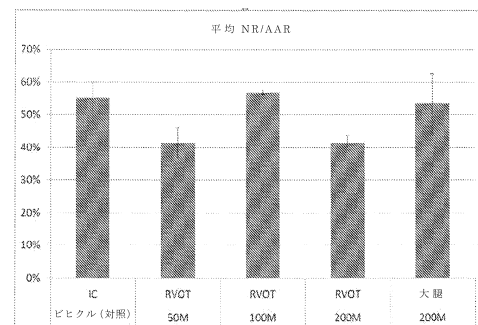


10

【図 60】

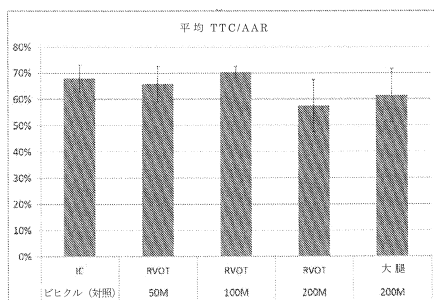


【図 61】

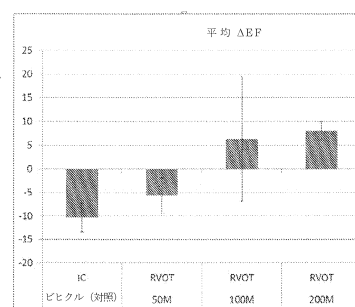


20

【図 62】



【図 63】

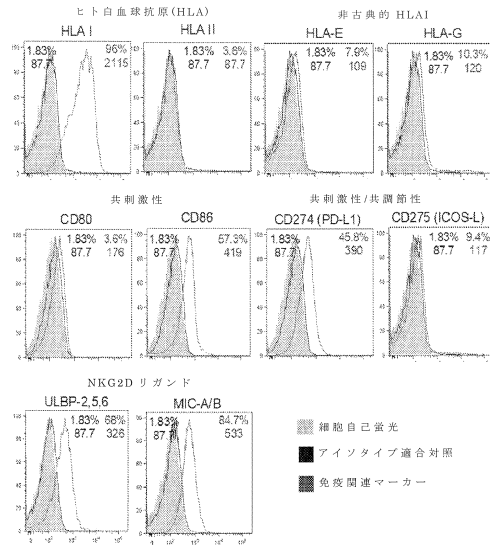


30

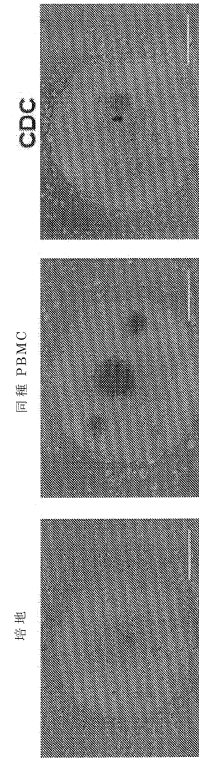
40

50

【図 6 4】



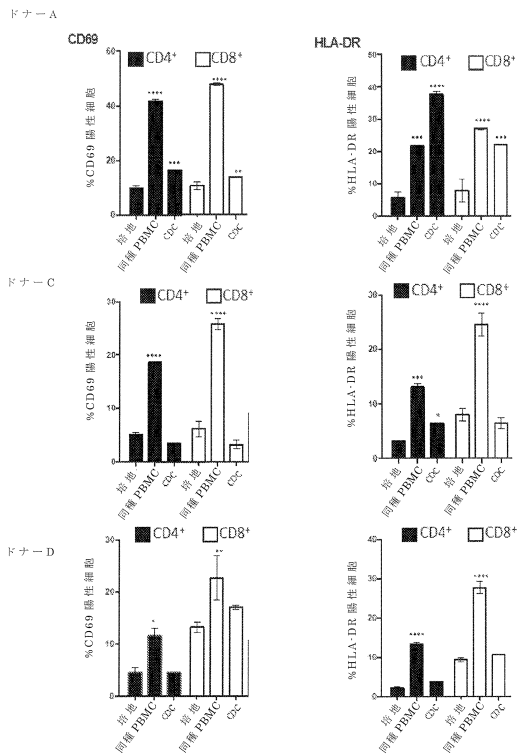
【図 6 5】



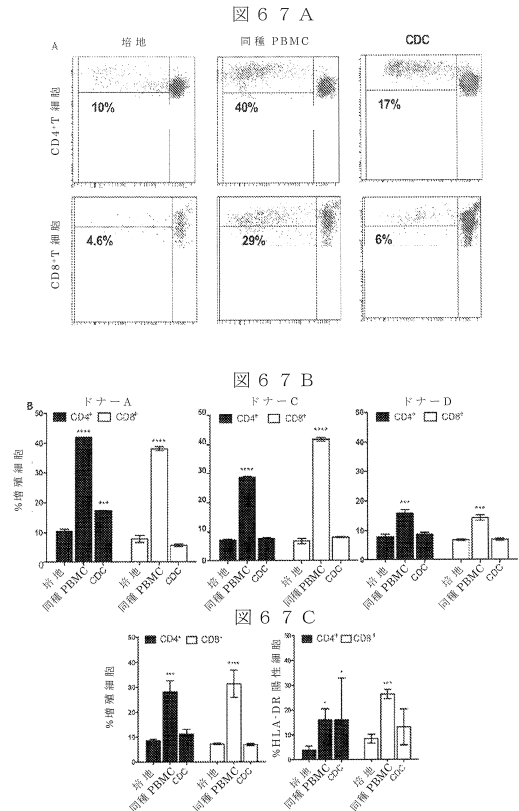
10

20

【図 6 6】



【図 6 7】



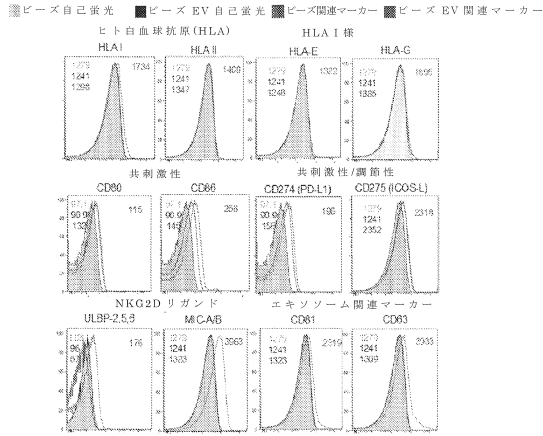
30

40

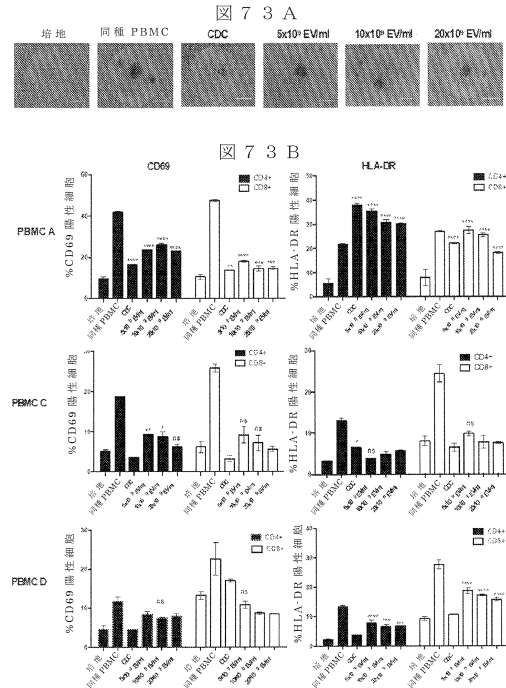
50



【図 7 2】



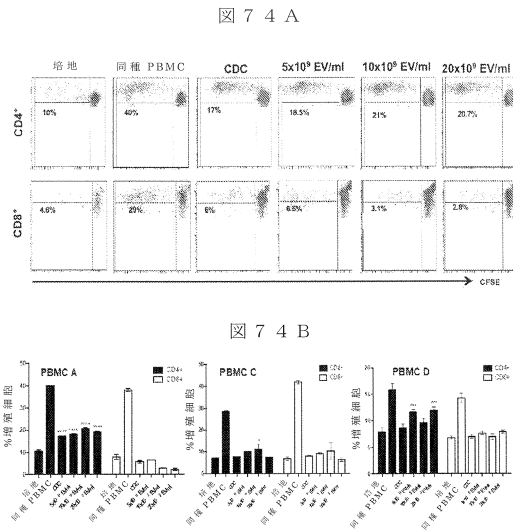
【図 7 3】



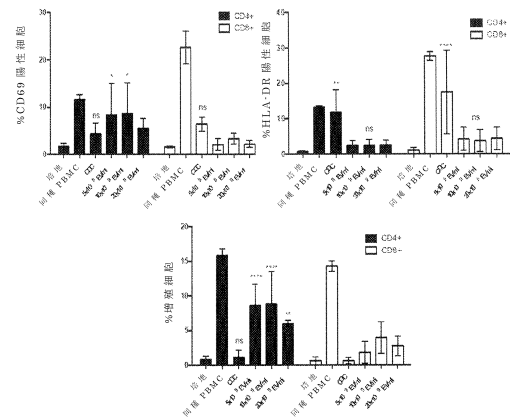
10

20

【図 7 4】



【図 7 5】



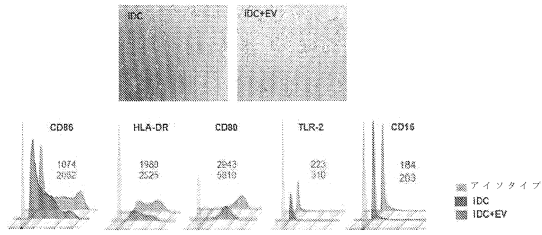
30

40

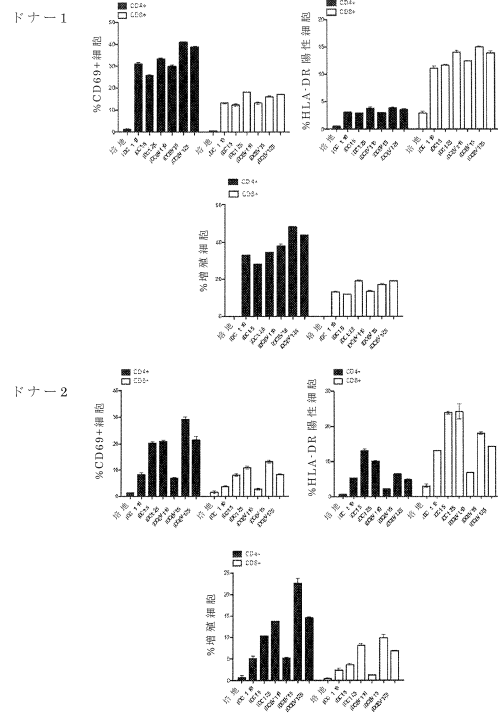
50



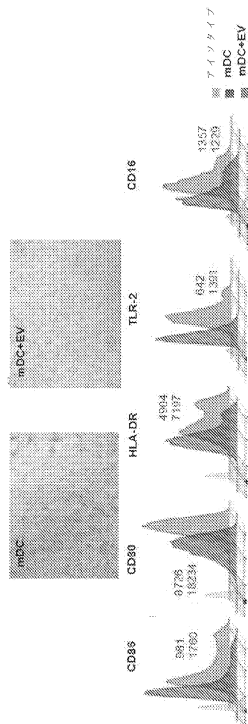
【図 7 6】



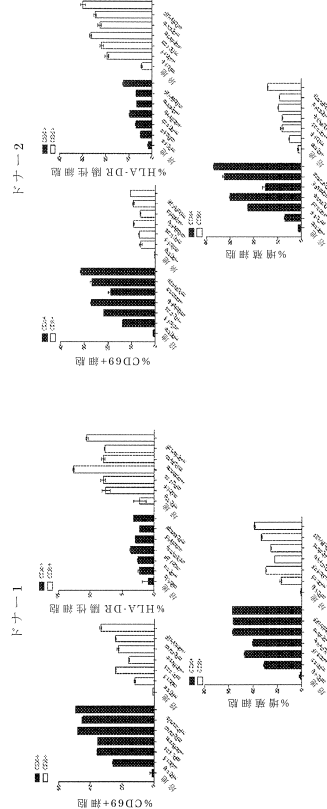
【図 7 7】



【図 7 8】



【図 7 9】



10

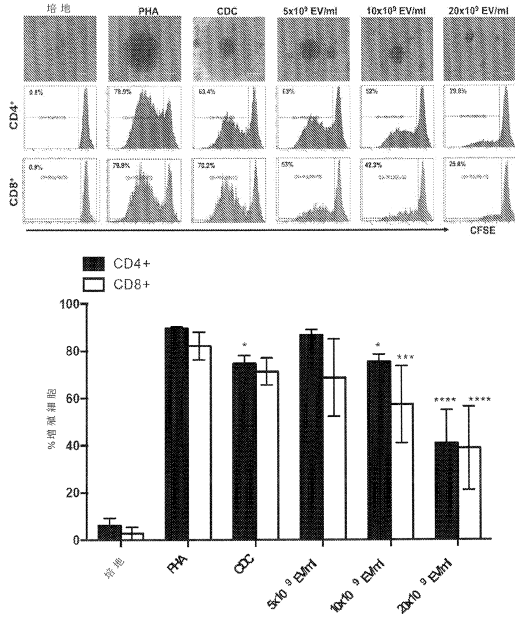
20

30

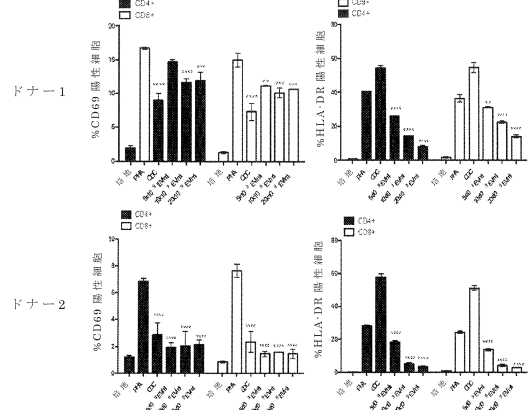
40

50

【図 8 0】

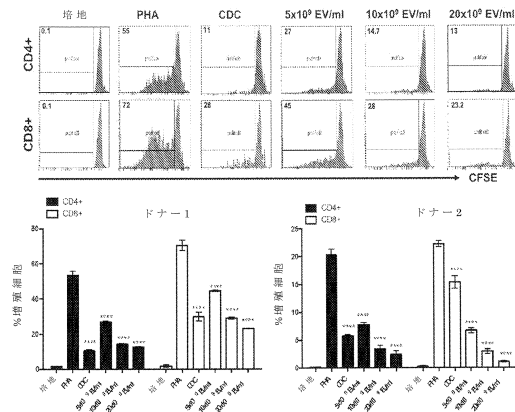


【図 8 1】

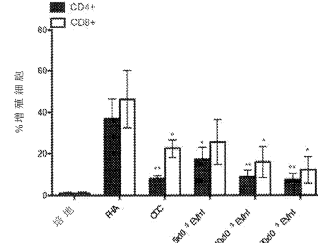


10

【図 8 2】



【図 8 3】

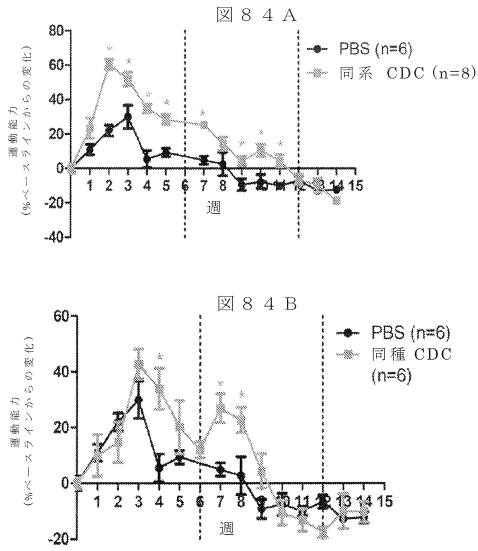


30

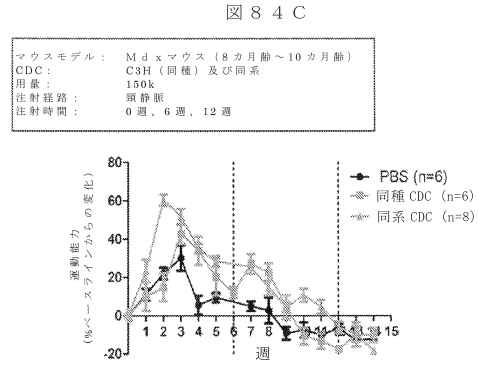
40

50

【図 8 4 - 1】

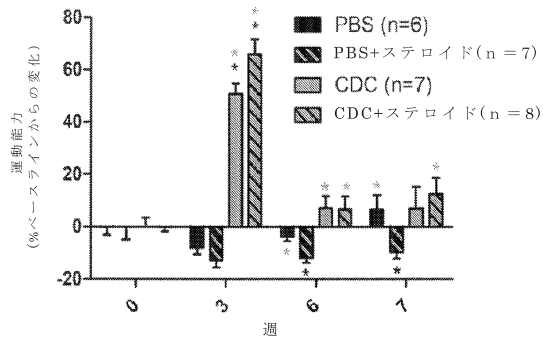


【図 8 4 - 2】

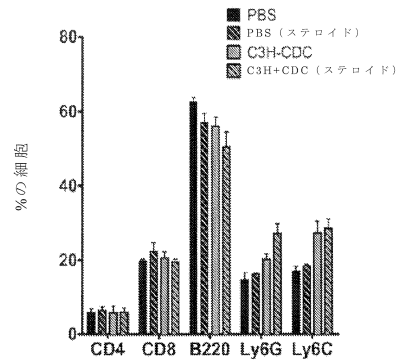


10

【図 8 5 A】



【図 8 5 B】



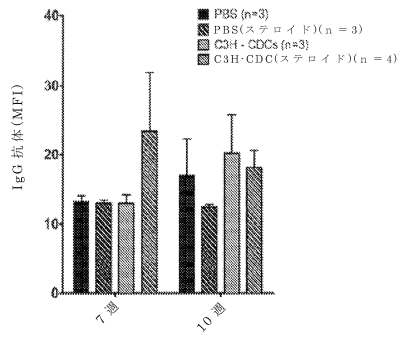
20

30

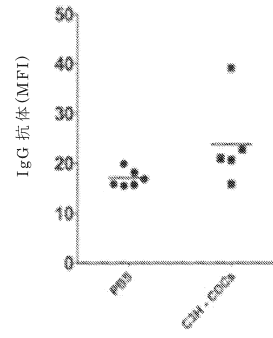
40

50

【図 8 5 C】



【図 8 6】



10

【配列表】

0007336769000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	5/077	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/861	(2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 K	35/761	(2015.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
			A 6 1 K	48/00	

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/487,408

## (32)優先日 平成29年4月19日(2017.4.19)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/535,672

## (32)優先日 平成29年7月21日(2017.7.21)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/569,440

## (32)優先日 平成29年10月6日(2017.10.6)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/614,753

## (32)優先日 平成30年1月8日(2018.1.8)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 岩堀 明代

## (74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

## (72)発明者 マルバーン, エドワルド

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, スイート ティーエスビー - 2 9 0 , 8 7 0 0 ビバリー ブールバード

## (72)発明者 アミンツァデ, マーク, エー .

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 4 8 , ロサンゼルス, スイート ティーエスビー - 2 9 0 , 8 7 0 0 ビバリー ブールバード

## (72)発明者 ロジャーズ, ラッセル

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 1 1 , ロサンゼルス, スイート ティーエスビー - 2 9 0 , 8 7 0 0 ビバリー ブールバード

## (72)発明者 モーズリー, ジェニファー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 1 1 , ビバリー ヒルズ, セカンド フロア, 8 8 4 0 ウィルシャー ブールバード

## (72)発明者 ロドリゲス - ボーラード, ルイス

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 1 1 , ビバリー ヒルズ, セカンド フロア, 8 8 4 0 ウィルシャー ブールバード

## (72)発明者 カナガベル, サラヴァーナ

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 0 2 1 1 ，ピバリー ヒルズ，セカンド フロア，8 8 4 0  
ウィルシャー ブールバード

(72)発明者 サコダ，クリストファー，スチュワート

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 0 2 1 1 ，ピバリー ヒルズ，セカンド フロア，8 8 4 0  
ウィルシャー ブールバード

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表 2 0 0 3 - 5 0 9 3 7 4 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 6 / 0 5 4 5 9 1 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 0 1 8 3 ( W O , A 1 )

Circulation Research , 2015年 , 117(12) , p.e125, 22919

脳と発達 , 2011年 , 43 , pp.24-29

難病と在宅ケア , 2006年 , Vol.11, No.11 , pp.56-59

The Journal of Cell Biology , 2000年 , Vol.150, No.5 , pp.1085-1099

The FASEB Journal , 2017年04月 , Vol.31, Issue S1 p.877.10 , [https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.877.10](https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.31.1_supplement.877.10)

Circulation , 2017年12月 , Vol.136, No.24 , pp. e463, 21682

ClinicalTrials.gov Archive NCT02485938 on 2015\_06\_26 , 2015年06月26日 , Retrieved from the Internet: U R L , [https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02485938?V\\_1=View#StudyPageTop](https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02485938?V_1=View#StudyPageTop)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )