

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-515672

(P2023-515672A)

(43)公表日 令和5年4月13日(2023.4.13)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全78頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-552551(P2022-552551)	(71)出願人	521087782
(86)(22)出願日	令和3年2月26日(2021.2.26)		テナヤ セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年10月12日(2022.10.12)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(86)国際出願番号	PCT/US2021/020032		8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント ブールバード 1 7
(87)国際公開番号	WO2021/178246		1, スイート 5 0 0
(87)国際公開日	令和3年9月10日(2021.9.10)	(74)代理人	100078282
(31)優先権主張番号	62/984,183		弁理士 山本 秀策
(32)優先日	令和2年3月2日(2020.3.2)	(74)代理人	100113413
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 森下 夏樹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 心筋細胞発現マイクロRNAによる遺伝子ベクター制御

(57)【要約】

本開示は、マイクロRNA結合部位を使用して導入遺伝子（例えば、心筋細胞リプログラミング因子）の発現を細胞型特異的に抑制するためのベクター及びそれらの使用方法を提供する。本発明は、一般に、導入遺伝子（例えば、心筋細胞リプログラミング因子）の発現を細胞型特異的に抑制するためのベクター及びそれらの使用方法に関連する。本開示は、心臓線維芽細胞と比較して、心筋細胞及び心筋前駆細胞における導入遺伝子（例えば、心筋細胞リプログラミング因子）の発現の特異的抑制を促進するように構成されたマイクロRNA結合部位を含むベクターを提供する。

【選択図】図1

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上の導入遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列と、マイクロRNAに対するマイクロRNA結合部位とを含むポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記マイクロRNA結合部位は、前記1つ以上の導入遺伝子をコードする前記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結され、前記マイクロRNAは、心臓線維芽細胞と比較して、心筋細胞又は心筋前駆細胞においてより高度なレベルで発現される、ベクター。

【請求項 2】

前記マイクロRNA結合部位が、心臓線維芽細胞と比較して、心筋細胞又は心筋前駆細胞において前記1つ以上の導入遺伝子の発現の特異的抑制を促進する、請求項1に記載のベクター。

10

【請求項 3】

前記マイクロRNAが、心筋細胞における前記マイクロRNAの発現レベル、及び／又は心筋細胞リプログラミング因子で約7日間を超えて処理された心臓線維芽細胞における前記マイクロRNAの発現レベルと比較して、心臓線維芽細胞においてより低いレベルで発現され、かつ／又は前記心筋細胞リプログラミング因子で約7日間以内で処理された心臓線維芽細胞においてより低いレベルで発現される、請求項1又は2に記載のベクター。

【請求項 4】

前記マイクロRNAがmiR-208である、請求項1～3のいずれか一項に記載のベクター。

20

【請求項 5】

前記マイクロRNAがmiR-1である、請求項1～3のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 6】

前記マイクロRNAがmiR-133である、請求項1～3のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 7】

前記マイクロRNAがmiR-208aである、請求項4に記載のベクター。

【請求項 8】

前記マイクロRNAがmiR-208bである、請求項4に記載のベクター。

30

【請求項 9】

前記マイクロRNAがmiR-208b-3pである、請求項8に記載のベクター。

【請求項 10】

前記マイクロRNA結合部位が、

【化 6】

ACAAACCTTTTGTTCGTCCTTAT (配列番号135)

に対して70%を超える同一性を共有し、配列CGTCCTTAを含む下線のシード領域にミスマッチを共有しない、請求項9に記載のベクター。

【請求項 11】

前記マイクロRNA結合部位が、AAATATATGTAATCGTCCTTAA (配列番号136)である、請求項9に記載のベクター。

40

【請求項 12】

前記マイクロRNA結合部位が、ACAAACCTTTTGTTCGTCCTTAT (配列番号135)である、請求項9に記載のベクター。

【請求項 13】

前記マイクロRNA結合部位が、TGAAACCTTTTGTTCGTCCTTAT (配列番号137)である、請求項9に記載のベクター。

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNAに対する少なくとも2つのマイクロRNA

50

A 結合部位を含む、請求項 1～13 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNA に対する少なくとも 4 つのマイクロRNA 結合部位を含む、請求項 14 に記載のベクター。

【請求項 16】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNA に対する最大 6 つのマイクロRNA 結合部位を含む、請求項 14 又は 15 に記載のベクター。

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNA に対する 4 つのマイクロRNA 結合部位を含む、請求項 16 に記載のベクター。

【請求項 18】

前記 1 つ以上の導入遺伝子が、1 つ以上の心筋細胞リプログラミング因子を含む、請求項 1～17 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 19】

前記 1 つ以上の心筋細胞リプログラミング因子が、MYOCD、ASCL1、GATA4、MEF2C、TBX5、miR-133、及び MESP1 のうちの 2 つ以上を含む、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 20】

前記 1 つ以上の心筋細胞リプログラミング因子が、MYOCD、ASCL1、GATA4、MEF2C、TBX5、miR-133、及び MESP1 のうちの 3 つ以上を含む、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 21】

前記 1 つ以上の心筋細胞リプログラミング因子が、MYOCD 及び ASCL1 を含む、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチド配列が MYOCD-2A-ASCL1 タンパク質をコードする、請求項 21 に記載のベクター。

【請求項 23】

前記 MYOCD が内部欠失を含む、請求項 20～22 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 24】

前記ポリヌクレオチドが、5' から 3' の順に、プロモーター、MYOCD 及び ASCL1 をコードする配列、前記マイクロRNA 結合部位、並びにポリアデニル化配列を含む、請求項 23 に記載のベクター。

【請求項 25】

前記ポリヌクレオチドが、miR-133 をコードする配列を含む、請求項 18～24 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 26】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 138、配列番号 139 又は配列番号 140 と少なくとも 95% 同一である配列を含む、請求項 24 又は 25 に記載のベクター。

【請求項 27】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 1～26 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 28】

前記ベクターがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 29】

心臓線維芽細胞を心筋細胞にリプログラミングするための方法であって、

a) 心臓線維芽細胞の心筋細胞へのリプログラミングを誘導する有効量の組成物で心臓線維芽細胞を処理し、前記心臓線維芽細胞における 1 つ以上のマイクロRNA の発現を測

10

20

30

40

50

定することによって、誘導された心筋細胞で特異的に発現されたマイクロRNAを選択することであって、前記選択されたマイクロRNAは、所定の時間後にのみ、前記心臓線維芽細胞において発現される、選択することと、

b) 1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、前記選択されたマイクロRNAに対する1つ以上のマイクロRNA結合部位を含むポリヌクレオチドを含むベクターを生成することと、

c) 心臓線維芽細胞を有効量の前記ベクターと接触させることと、を含む、方法。

【請求項30】

前記マイクロRNA結合部位が、心筋細胞における前記1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子の発現を抑制する、請求項29に記載の方法。

10

【請求項31】

前記マイクロRNA結合部位が、骨格筋細胞における前記1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子の発現を抑制する、請求項29又は30に記載の方法。

【請求項32】

前記マイクロRNA結合部位が、心筋前駆細胞における前記1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子の発現を抑制する、請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記マイクロRNAがmiR-208である、請求項29～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

前記マイクロRNAがmiR-1である、請求項29～32のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項35】

前記マイクロRNAがmiR-133である、請求項29～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記マイクロRNAがmiR-208aである、請求項33に記載の方法。

【請求項37】

前記マイクロRNAがmiR-208bである、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

前記マイクロRNAがmiR-208b-3pである、請求項37に記載の方法。

30

【請求項39】

前記マイクロRNA結合部位が、

【化7】

ACAAACCTTTTGTTCGTCCTTAT (配列番号135)

に対して70%を超える同一性を共有し、配列CGTCCTTAを含む下線のシード領域にミスマッチを共有しない、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記マイクロRNA結合部位が、AAAATATATGTAATCGTCCTTAA (配列番号136)である、請求項38に記載の方法。

40

【請求項41】

前記マイクロRNA結合部位が、ACAAACCTTTTGTTCGTCCTTAT (配列番号135)である、請求項38に記載の方法。

【請求項42】

前記マイクロRNA結合部位が、TGAAACCTTTTGTTCGTCCTTAT (配列番号137)である、請求項38に記載の方法。

【請求項43】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNAに対する少なくとも2つのマイクロRNA結合部位を含む、請求項29～42のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 4 4】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNAに対する少なくとも4つのマイクロRNA結合部位を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNAに対する最大6つのマイクロRNA結合部位を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記ポリヌクレオチドが、前記マイクロRNAに対する4つのマイクロRNA結合部位を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記心臓線維芽細胞を有効量の請求項1～28のいずれか一項に記載のベクターと接触させることを含む、心臓線維芽細胞を心筋細胞にリプログラミングするための、方法。

【請求項 4 8】

前記方法が前記心臓線維芽細胞における心筋細胞表現型の少なくとも1つのマーカーの発現を誘導する、請求項47に記載の方法。

【請求項 4 9】

心筋細胞表現型の少なくとも1つのマーカーが、ASC L1、MYOCD、CASQ2、NPPA、又はTNNT2のメッセンジャーRNAレベルである、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

心筋細胞の形成の促進を必要とする対象において心筋細胞の形成を促進する方法であって、請求項1～28のいずれか一項に記載のベクターを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 5 1】

心不全の治療を必要とする対象において心不全を治療する方法であって、請求項1～28のいずれか一項に記載のベクターを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 5 2】

心不全の治療を必要とする対象において心不全を治療する方法であって、5'から3'の順に、プロモーター、MYOCD及びASC L1をコードする配列、マイクロRNA結合部位、並びにポリアデニル化配列を含むポリヌクレオチドを含むAAVベクターを前記対象に投与することを含み、前記マイクロRNA結合部位が、miR-1、miR-133、miR-208a、miR-208b、及び／又はmiR-208b-3pに対するマイクロRNA結合部位である、方法。

【請求項 5 3】

前記マイクロRNA結合部位がmiR-1に対するマイクロRNA結合部位である、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記マイクロRNA結合部位がmiR-133に対するマイクロRNA結合部位である、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記マイクロRNA結合部位がmiR-208aに対するマイクロRNA結合部位である、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記マイクロRNA結合部位がmiR-208bに対するマイクロRNA結合部位である、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記マイクロRNA結合部位がmiR-208b-3pに対するマイクロRNA結合部位である、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記ポリヌクレオチドがmiR-133をコードする配列を含む、請求項52～57の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記心不全が心筋梗塞によるものである、請求項 52～58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記心不全が、駆出率が低下した心不全（HFrEF）である、請求項 52～59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記方法が、投与前の前記対象と比較して、前記対象における駆出率を増加させる、請求項 52～60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記方法が、未治療の対照対象と比較して前記対象における駆出率を増加させる、請求項 52～61 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記方法が、前記対象における駆出率を少なくとも約 28%、29%、30%、31%、又は 32% まで増加させる、請求項 52～62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

駆出率が、前記 AAV ベクターの投与後、所定の時間後、任意選択的に、8 週間後に評価される、請求項 61～64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記方法が、投与前の前記対象と比較して、前記対象における瘢痕組織形成を減少させる、請求項 52～64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 66】

前記方法が、未治療の対照対象と比較して、前記対象における瘢痕組織形成を減少させる、請求項 52～65 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

前記方法が、前記対象における瘢痕組織形成を多くとも約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、又は 20% まで減少させる、請求項 65 又は 66 に記載の方法。

【請求項 68】

瘢痕組織形成が、前記 AAV ベクターの投与後、所定の時間後、任意選択的に、8 週間後に評価される、請求項 65～67 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020 年 3 月 2 日に提出された米国仮特許出願第 62/984,183 号に対する優先権を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

本出願は、EFS-Web を介して電子的に提出されており、.txt 形式で電子的に提出された配列表を含む。.txt ファイルには、2021 年 2 月 25 日に作成された、サイズが 230 キロバイトの「TENA__017__01WO__SeqList__ST25.txt」というタイトルの配列表が含まれている。この.txt ファイルに含まれる配列表は本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、一般に、遺伝子療法ベクターに関する。

【背景技術】

【0004】

心臓のダイレクトリプログラミングは、新しい心筋細胞を作成するための戦略として浮

10

20

30

40

50

上しており、心筋症、心不全、又はその他の心臓病と診断されたか、又はその危険性がある患者において心機能の改善をもたらす。遺伝的及び化学的リプログラミング因子の様々な組み合わせが、他の細胞（例えば、線維芽細胞）の心臓細胞（特に、心筋細胞）へのリプログラミングを促進することが示されている。例えば、3つの心臓発生転写因子-GATA4、MEF2C、及びTBX5（GMT）の組み合わせを使用して、マウスにおいて、真皮又は心臓線維芽細胞を誘導心筋細胞（iCM）様細胞にリプログラムすることができ、GATA4、MEF2C、TBX5、MES P1、及びMYOCD（GMTMM）は、因子のカクテルとして一緒に発現されると、細胞の形態を紡錘状から棒状に変化させ、細胞が自発的な Ca^{2+} 振動を示すようにする。HAND2、NKX2.5、マイクロRNAのmiR-1及びmiR-133、JAK又はTGF- β は、このようなリプログラミングを促進することが示されている。ヒトでは、GMTにETS2及びMES P1を添加すると、心臓特異的な遺伝子発現及びサルコメア形成が誘導される。Srivastava及びDeWitt. Cell 166: 1386-96 (2016)で概説されているように、ダイレクトリプログラミングのための因子の他の組み合わせが当技術分野で説明されている。

10

しかしながら、ベクター又はベクター系などの代替的及び改良されたリプログラミング方法並びにそれらの方法を実施するための手段に対する必要性が、当技術分野において依然として存在する。本開示は、このアンメットニーズに対処する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0005】

【非特許文献1】Srivastava及びDeWitt. Cell 166: 1386-96 (2016)

【発明の概要】

【0006】

本発明は、一般に、導入遺伝子（例えば、心筋細胞リプログラミング因子）の発現を細胞型特異的に抑制するためのベクター及びそれらの使用方法に関連する。本開示は、心臓線維芽細胞と比較して、心筋細胞及び心筋前駆細胞における導入遺伝子（例えば、心筋細胞リプログラミング因子）の発現の特異的抑制を促進するように構成されたマイクロRNA結合部位を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、心臓線維芽細胞の心筋細胞へのリプログラミングを誘導する有効量の組成物で心臓線維芽細胞を処理し、プログラミングプロセス中で発現し、任意選択的に、リプログラミングプロセスの後期に発現される同定されたマイクロRNAに対して、心臓線維芽細胞における1つ以上のマイクロRNAの発現を測定することによって、選択される。いくつかの実施形態において、選択されたマイクロRNAは、所定の時間後にのみ、心臓線維芽細胞で発現される。いくつかの実施形態において、組織及び細胞型特異的な発現の抑制は、非標的細胞型（例えば、心筋細胞）における発現を抑制しながら、標的細胞型（例えば、心臓線維芽細胞）における発現を可能にする。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、標的細胞の非標的細胞への効果的な変換を引き起こすのに十分な時間、標的細胞における発現を可能にする。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】一実施形態によるベクターマップを示す。

【図2A】MOI 160kのAAVによるiPSC-CM形質導入の4日後、フローサイトメトリ分析により評価されたGFP導入遺伝子発現の抑制を示す。

【図2B】MOI 160kのAAVによるhCF形質導入の4日後、フローサイトメトリ分析により評価されたGFP導入遺伝子発現の抑制の欠失を示す。

【図3】MOI 500kのAAVによるiPSC-CM形質導入の4日後、フローサイトメトリ分析により評価されたGFP導入遺伝子発現の抑制を示す。

【図4】ヒトiPSC-CMと比較した、My Δ^3 Aリプログラミングカクテルで処理し

50

た後に qPCR で測定したマイクロRNA の発現レベルを示す。

【図 5 A】AAV (MOI 500 k) による形質導入の 4 日後の iPSC-CM のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 5 B】AAV (MOI 160 k) による形質導入の 2 日後の hCF のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 5 C】MOI 640 k の AAV によるリプログラミングの 3 週間後の免疫蛍光分析を示す。

【図 6 A】miR-208 標的カセットを伴う My^{Δ3}A が、研究の過程を通じて、駆出率 % の動的心エコー検査データによって、心筋梗塞に対して有効であることを示す。

【図 6 B】注射後 8 週目でのインビボ試験終了時の心エコーデータを示し、GFP をコードする陰性対照と比較して全ての群で有意な増加を示している (n = 10 ~ 13 マウス / 群)。

【図 6 C】筋肉が赤く染色され、線維性組織が青く染色されるトリクローム染色に基づく線維化の分析を示す。全ての群にわたって線維性である心臓の横断面の % の定量化は、全ての処置群で有意な減少を示した (n = 6 ~ 8 心臓 / 群、5 断面 / 心臓)。

【図 6 D】陰性対照及び AAV5z: My^{Δ3}A₂₀₈ 4 の代表的なトリクローム染色された心臓横断面を示す。

【図 7】注射後 9 週目までの、虚血性損傷のある処置ブタ及び未処置ブタの駆出率 % における変化のグラフを示す

【図 8】AAV (MOI 500 k) による形質導入の 4 日後の iPSC-CM のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 9】注射後 4 週目のラットの虚血性損傷研究における駆出率パーセントのグラフを示す

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明者らは、遺伝子療法ベクター内に選択されたマイクロRNA 結合部位を含めることにより、ベクターの細胞型特異性を高めることができることを認識した。本開示のベクターは、心筋細胞又は心筋前駆細胞で発現されるマイクロRNA に対する結合部位を利用して、それらの細胞型における導入遺伝子の発現を抑制する。これらのベクターは、インビボ遺伝子療法の有効性及び／又は安全性を高める可能性がある。いくつかの実施形態において、発現は、標的細胞型において許容及び／又は維持される一方で、他の細胞型（例えば、骨格筋）において抑制される。いくつかの実施形態において、標的細胞型は、心臓線維芽細胞である。いくつかの実施形態において、標的細胞型は、心筋細胞にリプログラミングできる細胞である（例えば、インビボ細胞リプログラミングのための）。いくつかの実施形態において、標的細胞型は、遺伝子の機能喪失変異による機能欠陥を有する細胞である（例えば、遺伝子置換療法のための）。本開示のベクターのいくつかの実施形態は、リプログラミングプロセスの後期に発現されるマイクロRNA に対するマイクロRNA 結合部位を利用する。そのような実施形態において、マイクロRNA 結合部位の選択により、早期の発現抑制なしに、ベクターからの心筋細胞リプログラミング因子の発現が可能になる。

【0009】

本開示は、例えば細胞を心筋細胞に直接リプログラミングすることによって、非心筋細胞から心筋細胞を生成するための組成物及び方法を更に提供する。細胞を心筋細胞にリプログラムする力が限られている、又はそのような力がない選択されたマイクロRNA の能力は、選択されたマイクロRNA が MYOCD 及び ASCL1、又は MYOCD 単独とともに発現される場合に増加する。更に、MYOCD、ASCL1、又は MYOCD 及び ASCL1 が細胞を心筋細胞にリプログラムする能力は、選択されたマイクロRNA の発現によって増加する。したがって、本開示は、MYOCD 及びマイクロRNA を発現することができる、又は MYOCD、ASCL1、及びマイクロRNA を発現することができる組成物、並びにそれらの使用方法を提供する。有利なことに、分化細胞（例えば、線維芽

10

20

30

40

50

細胞)の心筋細胞へのリプログラミングは、これらの因子単独の発現と比較して増強される。

【0010】

本開示は、マイクロRNA、MYOCDタンパク質、及び任意選択的にASCL1タンパク質を集合的にコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、ベクターなどの組成物を提供する。単一のベクターが使用される場合、コーディングポリヌクレオチドは、ベクター内の任意の5'から3'の順で、及びベクター内の同じ又は異なるポリヌクレオチド鎖上に提供され得る。本開示は更に、2つ以上のベクターから構成されるベクター系を提供する。一部のベクターはポリシストロン性ベクター、例えば、MYOCD-2A-ASCL1又はASCL1-2A-MYOCDポリヌクレオチドを含むベクターなどであるが、これらに限定されない2A結合ポリシストロン性ベクターである。

10

【0011】

ベクターには、脂質ナノ粒子、トランスポゾン、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルス、レトロウイルス、組み込みレンチウイルスベクター(LVV)、及び非組み込みLVVなどであるが、これらに限定されないウイルスベクター及び非ウイルスベクターが含まれる。ポリヌクレオチドの各々は、任意選択的に、対応する遺伝子の天然のヒトポリヌクレオチド配列と配列同一性を共有するか、又は対応する天然のヒトタンパク質と同一又は配列同一性を共有するタンパク質をコードする異種配列を有する。いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドによってコードされるMYOCDタンパク質は、操作されたミオカルジンである。例えば、MYOCDは、そのサイズを縮小するがその機能を維持する内部欠失を含めるように設計される場合がある。

20

【0012】

本開示は更に、前述のベクター及びベクター系を使用する方法を提供する。使用方法には、分化細胞において(インビボ又はインビトロで)心筋細胞表現型を誘導する方法、及び心臓病に罹患している、又は心臓病の危険性がある対象において心臓病を治療する方法が含まれる。本開示は更に、心臓病の治療に使用するための説明書付きのベクター及びベクター系を含むキットを提供する。

【0013】

本開示は、他の細胞型をリプログラミングすることによるiCM細胞の生成(インビボ、インビトロ、又はエクスピボ)に関する方法及び組成物を提供する。特に、本発明者らは、分化した細胞、例えば線維芽細胞が、マイクロRNA並びにMYOCD及び/又はASCL1の発現によって心筋細胞にリプログラムされ得ることを発見した。

30

【0014】

マイクロRNA(「miRNA」)は、メッセンジャーRNA(mRNA)分子内の相補配列との塩基対合を介して、RNAサイレンシング及び遺伝子発現の転写後調節において機能する小さな非コードRNA分子である。標準命名法では、接頭辞「miR」の後にダッシュ及び数字が続く。「miR-」は、miRNAの成熟形態を指す。「mir-」は、一次mRNA(primiRNA)又は前駆体miRNA(pre-miRNA)を指し、「MIR」は、それらをコードする遺伝子を指す。ほぼ同一の配列を持つmiRNAには、追加の小文字で注釈が付けられている。起源の種は、3文字の接頭辞で指定される。例えば、ヒトは「hsa-」である。同一の成熟miRNAにつながるが、ゲノム内の異なる場所にあるmiRNA遺伝子は、追加のダッシュ数字の接尾辞、例えば、miR-194-1及びmir-194-2で示される。天然のヒトmiRNAは通常、100ヌクレオチド超のprimiRNAとして転写され、これが処理されて、pre-miRNAが形成され、これが更に処理されて、成熟miRNAが形成される。

40

【0015】

miRNAは、pre-miRNAをコードする配列を宿主細胞で活性なプロモーターに作動可能に連結することにより、ベクター、例えばウイルスベクターから発現させることができる。例えば、Cell BiolabsのpMXsレトロウイルス発現ベクターは、推定上のヘアピン構造を維持しながら個々のprimiRNAをクローニング及び

50

発現するように設計されており、内因性プロセッシング機構及び調節パートナーとの生物学的に関連する相互作用を確実なものとし、適切に切断されたマイクロRNAをもたらす。pri-miRNAは、pre-miRNAに加えて、各5'側又は3'側に約150bpのそれ自体のランニング配列を含んでもよく、又は当該技術分野で公知の方法に従って、同じ成熟miRNAを生成するために異なるランニング配列を使用することができる。目的のマイクロRNAの例には、miR-133a-2、miR-133a-1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133b、miR-1-2、miR-92a-2、miR-20b、miR-20a、miR-141、miR-155、miR-17、hsa-let-7c、miR-202、miR-200a、miR-206、miR-509-1、miR-509-2、miR-124-3、miR-124-2、miR-378a、miR-378e、miR-378h、miR-378i、miR-137、miR-671、miR-24-1、miR-182、miR-302d、miR-96、miR-30c-2、及びmiR-146bが含まれる。成熟miRNAを発現するために使用されるpri-miRNA配列を表1に示す。成熟miRNA配列は大文字で示す。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

マイクロ RNA	配列	配列番号 pri-miRNA	配列番号 成熟 miRNA
miR-133a-1	acaatgcttttgctagagctggtaaaatggaa ccaaatcgctcttcaatgga TTGGTCCCC TTCAACCAGCTG tagctatgcattga	65	100
miR-133a-2	gggagccaaatgctttgctagagctggtaaa atggaaccaaactcgactgtccaatgga TTTG GTCCCCTTCAACCAGCTG tagctgtgcattg atggcgccg	66	101
miR-133b	cctcagaagaaagatgccccctgctctggct gggtcaaacggaaccaagtccgtcttctctgag agg TTGGTCCCCTTCAACCAGCTA cagcag ggctggcaatgccagtccttgagaga	67	102
miR-19b-1	cactgttctatggttagttttgcaggttttgc atccagctgtgtgatattctgc TGTGCAAAAT CCATGCAAAACTGA ctgtggtagt	68	103
miR-19b-2	acattgctacttacaattagttttgcaggtt tgcatttcagcgtatatatgtatatgtggc T GTGCAAAATCCATGCAAAACTGA ttgtgataa tgt	69	104
miR-326	ctcatctgtctgttgggctggaggcagggcc tttgtgaaggcgggtggtgctcagatcg CCT CTGGGCCCTTCCTCCAG ccccgaggcgatt ca	70	105
miR-1-1	tgggaacatacttctttatatgcccatatg gacctgctaagcta TGGAATGTAAAGAAGTA TGTAT ctca	71	106
miR-1-2	acctactcagagtacatacttctttatgtac ccatatgaacatacaatgcta TGGAATGTAA AGAAGTATGTAT ttttggtaggc	72	107
miR-1298	agacgaggagttaagag TTCATTCGGCTGTC CAGATGTA tccaagtaccctgtgtattttgg caataaatacatctgggcaactgactgaact tttcaacttttcatgactca	73	108
miR-92a-2	tcatccctgggtgggatttgttgcattact tgtgttctatataaag TATTGCACTTGTCCC GGCCTGT ggaaga	74	109
miR-20a	gtagcac TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG t gtttagttatctactgcattatgagcactta agtactgc	75	110
miR-20b	agtac CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG ttt tggcatgactctactgtagtatgggcacttc cagtact	76	111
miR-141	cggccggccctgggtccatcttccagtacag tggtggatggtctaattgtgaagctcc TAAC ACTGTCGTGTAAGATGG ctcccgggtgggt tc	77	112
miR-155	ctg TAAATGCTAATCGTGATAGGGGT tttg cctccaactgactcctacatattagcattaa cag	78	113
miR-17	gtcagaataatgt CAAAGTGCTTACAGTGCA GGTAG tgatatgtgcatctactgcagtgaag gcactttagcattatggtgac	79	114

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

hsa-let-7c	gcatccgggt TGAGGTAGTAGGTTGTATGGT Ttagagttacaccctgggagttaactgtaca accttctagctttccttgagc	80	115
miR-202	cgcctcagagccgcccgcgttcttt TTCC TATGCATATACTTCTTTG aggatctggccta aagaggatataggcatgggaaacggggcgg tcgggtcctccccagcg	81	116
miR-200a	ccgggccccctgtgagcatcttacggacagt gctggatttcccagcttgactc TAACACTGT CTGGTAACGATGT tcaaaggtagccgc	82	117
miR-206	tgttcccaggccacatgcttctttatatac cccataatgattactttgcta TGGAATGTAA GGAAGTGTGTGG tttcggcaagt	83	118
miR-509-1	catgctgtgtgtgtaccctactgcagacag tggaatcatgtataattaaaa TGATTGGT ACGCTGTGTGGGTAG agtactgcatgacacat g	84	119
miR-509-2	catgctgtgtgtgtaccctactgcagacag tggaatcatgtataattaaaa TGATTGGT ACGCTGTGTGGGTAG agtactgcatgacac	85	120
miR-124-2	atcaagattagaggtctgtctcctgtgttc acagcggaccttgatttaatgtcatacaat T AAGGCACGCGGTGAATGCCAA gagcggagcc tacggctgcacttgaa	86	121
miR-124-3	tgagggccctctgcgtgttcacagcggacc ttgatttaatgtctatacaat TAAGGCACGC GGTGAATGCCAA gagagggcctcc	87	122
miR-378a	agggctcctgactccaggtcctgtgtgttac ctagaaatagc ACTGGACTTGGAGTCAGAAG GC ct	88	123
miR-378e	ctgactccagtgtccaggccagggcagaca gtggacagagaacagtgcceaagacc ACTGG ACTTGGAGTCAGGA cat	89	124
miR-378h	acaggaa ACTGGACTTGGTGT CAGATGGga tgagccctggctctgtttcctagcagaatc tgatcttgagctagtactgg	90	125
miR-378i	gggagc ACTGGACTAGGAGTCAGAAG tggga gttctgggtgtgttttccactcttggggc ctgggcatgttctg	91	126
miR-137	ggctcctctgactctcttcgggtgacgggtatt cttgggtggataatacggattacgttg TTAT TGCTTAAGAATACGCGTAG tcgaggagagta ccagcggca	92	127
miR-671	gcagggtgaactggcaggccaggaagagg AGG AAGCCCTGGAGGGGCTGGAG gtgatggatgt tttctcgggttctcagggtccacctcttt cgggcccgtagagccagggtgtgtgc	93	128
miR-24-1	ctccggtgcctactgagctgatatacagttct cattttacacac TGGCTCAGTTCAGCAGGAA CAG gag	94	129
miR-182	gagctgcttgctcccccggtt TTGGCAAT GGTAGAACTCACACT ggtgaggtaacaggat ccgggtggttctagacttgccaactatggggc gaggactcagccggcac	95	130

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

miR-302d	cctctactttaacatggaggcacttgctgtg acatgacaaaa TAAGTGCTTCCATGTTTGA GTGT gg	96	131
miR-96	tggccgat TTTGGCACTAGCACATTTTGGCT tgtgtctctccgctctgagcaatcatgtgca gtgccaatatgggaaa	97	132
miR-30c-2	agatac TGTAACATCCTACACTCTCAGC tg tggaaagtaagaaagctgggagaaggctgtt tactctttct	98	133
miR-146b	cctggcac TGAGAACTGAATCCATAGGCTG tgagctctagcaatgccctgtggactcagtt ctggtgcccgg	99	134

10

【0016】

ミオカルジン (MYOCD) は、血清応答因子の平滑筋及び心筋特異的な転写コアクチベーターである。非筋肉細胞で異所性に発現すると、MYOCDは血清応答因子との会合によって平滑筋分化を誘導することができる。Du et al. MYOCD is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. Mol. Cell. Biol. 23:2425-37 (2003)。

20

【0017】

Achaete-scuteファミリーbHLH転写因子1 (ASCL1) は、主に、神経系、神経細胞、及び神経内分泌の発達におけるその役割で知られている。細胞のリプログラミングの文脈において、ASCL1は、非神経細胞の機能的ニューロンへの変換に関連する因子として当技術分野で知られている。実際、他のリプログラミング因子と組み合わせたASCL1の発現は、当技術分野では、心筋細胞のリプログラミングの逆効果である、ヒト誘導多能性幹細胞 (hiPSC) を心筋細胞表現型から神経細胞型 (Tuj1 + cTnT-) 又は神経細胞様表現型 (Tuj1 + cTnT+) に変換するために使用されている。対照的に、本開示は、ASCL1を使用して線維芽細胞からiCM細胞を生成することに由来する組成物及び方法を提供する。

30

【0018】

I. 定義

本明細書で使用される場合、「機能的心筋細胞」という用語は、電気信号を送信又は受信できる分化した心筋細胞を指す。いくつかの実施形態において、心筋細胞は、活動電位及び／又はCa²⁺トランジェントなどの電気生理学的特性を示す場合、機能的心筋細胞であると言われる。

【0019】

本明細書で使用される場合、「分化した非心臓細胞」は、成体生物の全ての細胞型に分化することができない（すなわち、多能性細胞ではない）細胞であり、心臓系統以外の細胞系統（例えば、神経細胞系統又は結合組織系統）の細胞を指すことができる。分化細胞には、多能性細胞、複能性細胞、単能性細胞、前駆細胞、及び最終分化細胞が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、より強力でない細胞は、より強力な細胞に関して「分化した」とみなされる。

40

【0020】

本明細書で使用される場合、「タンパク質コード遺伝子」とは、ベクターの成分を指す場合、ベクターの機能に関連する遺伝子以外の、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを意味する。例えば、タンパク質コード遺伝子という用語は、リプログラミング活性を有するヒトタンパク質又はその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドを包含する。ベクターに関して「他のタンパク質コード遺伝子を含まないベクター」という語句は、ベクターが、列挙されている目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むが

50

、多能性又は心筋細胞表現型のいずれかを促進することが当技術分野で知られている他のタンパク質などのリプログラミング活性を有する別のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含まないことを意味することが意図される。「他のタンパク質コード遺伝子を含まないベクター」という語句は、ベクターの機能に必要なタンパク質をコードするポリヌクレオチドを除外せず、それは任意選択的に存在してもよく、タンパク質をコードしないポリヌクレオチドも除外しない。そのようなベクターは、非コードポリヌクレオチド配列を含み、RNA分子（マイクロRNAなど）をコードするポリヌクレオチドを含み得る。逆に、特定のタンパク質コード遺伝子のみが列挙されている場合、リプログラミングを更に促進するタンパク質をコードするタンパク質コード遺伝子など、他のタンパク質コード遺伝子が更に存在する可能性があることを意味する。

10

【0021】

「体細胞」とは、生物の体を構成する細胞のことである。体細胞には、生物の器官、皮膚、血液、骨、及び結合組織を構成する細胞が含まれるが、生殖細胞は含まれない。

【0022】

「心臓病理学」又は「心臓機能不全」という用語は互換的に使用され、心臓のポンプ機能の障害を指す。これには、例えば、収縮性の障害、弛緩能力の障害（拡張機能障害と呼ばれることもある）、心臓弁の異常又は不適切な機能、心筋の疾患（心筋症と呼ばれることもある）、狭心症などの疾患、心筋への不十分な血液供給を特徴とする心筋虚血及び／又は心筋梗塞、アミロイドーシス及びヘモクロマトーシスなどの浸潤性疾患、全体的又は局所的な肥大（例えば、ある種の心筋症又は全身性高血圧症で発生する可能性がある）、並びに心腔間の異常な伝達が含まれる。

20

【0023】

本明細書で使用される「心筋症」という用語は、心臓が異常に肥大し、肥厚し、及び／又は硬化する、心筋（心臓の筋肉）の任意の疾患又は機能不全を指す。その結果、通常、心臓の筋肉が血液を送り出す能力が低下する。疾患又は障害の病因は、例えば、炎症性、代謝性、毒性、浸潤性、線維形成性、血液学的、遺伝性、又は原因不明であってもよい。心筋症には、虚血性（酸素欠乏に起因する）及び非虚血性の2つの一般的なタイプがある。

【0024】

本明細書で使用される場合、「目的の遺伝子」という用語は、リプログラミング因子又はリプログラミング因子をコードする核酸を指す。例えば、リプログラミング因子がタンパク質である場合、目的の遺伝子は、文脈から明らかなように、タンパク質又は対応するタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列のいずれかである。目的の遺伝子の導入、投与、又は他の使用は、遺伝子、遺伝子産物、又は遺伝子産物の機能的バリエーションの発現を増加させるか、又はそれらの活性を増加させる任意の手段を指すと理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、核酸（例えば、デオキシリボヌクレオチド（DNA）又はリボヌクレオチド（RNA））として目的のポリヌクレオチド、例えば、ASCL1及び／又はMYOCDをポリヌクレオチド（例えば、デオキシリボヌクレオチド（DNA）又はリボヌクレオチド（RNA））としての標的細胞に導入することを含む、iCM細胞を生成する方法を提供する。ポリヌクレオチドは、ウイルス、非ウイルスベクターにて、裸のポリヌクレオチド若しくはトランスフェクション試薬と複合体化したポリヌクレオチドと細胞を接触させることによって、又はエレクトロポレーションによってなどを含むがこれらに限定されない、当技術分野で知られている様々な手段のうちのいずれかで細胞に導入することができる。目的の遺伝子を核酸として使用することには、目的の遺伝子の発現若しくは活性の間接的な改変、例えば、内因性遺伝子をコードする遺伝子座の遺伝子編集、転写因子若しくは調節因子の発現、目的の遺伝子の低分子活性化因子を細胞に接触させること、又は核酸としての目的の遺伝子の発現若しくは活性を改変するためのDNA若しくはRNAに基づく方法を含む遺伝子編集方法の使用を含んでもよい。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、調節領域（エンハンサー又はプロモーター）を編集することによって、スプライス部位を改変することによって、マイ

30

40

50

クロRNA認識部位を除去又は挿入することによって、マイクロRNAを抑制するためにアンタゴミア (antagomir) を投与することによって、マイクロRNAミメティックを投与することによって、又は目的の遺伝子の発現若しくは活性を調節する他の任意の様々な手段によって、目的の遺伝子の転写を抑制解除することを含む。

【0025】

本明細書で使用される「マイクロRNA」は、成熟マイクロRNAを指す。マイクロRNAをコードするポリヌクレオチドは、一般に、宿主細胞におけるその発現がその細胞における成熟マイクロRNAの形成をもたらす任意のポリヌクレオチドを指す。マイクロRNAをコードするポリヌクレオチドは、対応するプレRNAと100%の配列同一性を共有し得る。成熟マイクロRNA配列をコードするステム間のループにおける1つ以上の置換は、場合によっては許容される。二本鎖のいずれかの鎖が機能的なmiRNAとして作用する可能性はあるが、通常は、一方の鎖のみがRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれ、そこで、miRNA及びそのmRNA標的が相互作用する。マイクロRNAを使用するための従来の技術は、例えば、Lawrie, ed. (2013) *MicroRNAs in Medicine* にて提供されている。

10

【0026】

本明細書で使用される「対象」又は「患者」という用語は、飼育された動物、動物園の動物、又はヒトなどの任意の動物を指す。「対象」又は「患者」は、イヌ、ネコ、ウマ、家畜、動物園の動物、又はヒトなどの哺乳動物であり得る。対象又は患者は、トリ、ペット、又は農場の動物などの任意の飼育された動物であることもできる。「対象」及び「患者」の具体例としては、心疾患又は障害を有する個体、及び心疾患に関連する特徴又は症状を有する個体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0027】

本開示の実施は、別段の指示がない限り、当業者の範囲内である、組織培養、免疫学、分子生物学、細胞生物学及び組換えDNAの従来の技術を使用する。

【0028】

文脈が別段で示していない限り、本明細書に記載の本発明の様々な特徴を任意の組み合わせで使用することができることが特に意図されている。更に、本開示はまた、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の特徴又は特徴の組み合わせを除外又は省略することができることを企図している。例示するために、複合体が成分A、B、及びCを含むと明細書が述べている場合、A、B、若しくはCのうちのいずれか又はそれらの組み合わせを単独又は任意の組み合わせで省略及び放棄することができることが特に意図されている。

30

【0029】

pH、温度、時間、濃度、及び分子量などの範囲を含む全ての数値表示は、必要に応じて、1.0若しくは0.1の増分で、又は代替的には+/-15%、又は代替的には10%、又は代替的には5%、又は代替的には2%の変動によって、(+)若しくは(-)変化する近似値である。常に明確に述べられているわけではないが、全ての数値表示の前に「約」という用語が付けられていることを理解されたい。このような範囲形式は、便宜上及び簡潔性のために使用されていることが理解されるべきであり、範囲の限界値として明示的に列挙された数値だけでなく、各数値又は部分範囲が明示的に記載されているかのように、その範囲内に包含される全ての個々の数値又は部分範囲を含むように柔軟に解釈されるべきである。例えば、約1~約200の範囲の比は、約1及び約200の明示的に列挙された限界値を含むと理解されるべきであるが、約2、約3、及び約4などの個々の比、並びに約10~約50、約20~約100などの部分範囲を含むと理解されるべきである。また、常に明確に述べられているわけではないが、本明細書に記載の試薬は単なる例示であり、その等価物は当技術分野で知られていることも理解されたい。

40

【0030】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、別途文脈が明確に示さない限り、単数形「a」、「an」、及び「the」が複数の指示対象を含むことに留意されたい

50

。したがって、例えば、「心筋細胞」への言及は、複数の心筋細胞を含む。

【0031】

本明細書で使用される場合、「及び／又は」とは、関連する列挙された項目のうちの1つ以上の任意かつ全ての可能な組み合わせ、及び代替（又は）で解釈される場合の組み合わせの欠如を指し、それらを包含する。

【0032】

「投与」、「投与する」などは、本発明の組成物に関連して使用される場合、インビトロでの非心筋細胞への投与、インビボでの非心筋細胞への投与、医療専門家による対象への投与、若しくは対象による自己投与であり得る直接投与、及び／又は本発明の組成物を処方する行為であり得る間接投与の両方を指す。細胞に関連して本明細書で使用される場合、細胞に組成物を導入することを指す。典型的には、有効量が投与され、その量は当業者によって決定され得る。任意の投与方法を使用することができる。小分子は、例えば、細胞培養培地への小分子の添加又は心臓損傷部位へのインビボ注射によって、細胞に投与され得る。対象への投与は、例えば、血管内注射、心筋内送達などによって達成することができる。

10

【0033】

本明細書で使用される場合、「心臓細胞」という用語は、心臓収縮又は血液供給などの心臓機能を提供するか、又は心臓の構造を維持する働きをする、心臓に存在する任意の細胞を指す。本明細書で使用される心臓細胞は、心臓の心外膜、心筋又は心内膜に存在する細胞を包含する。心臓細胞には、例えば、心筋の細胞又は心筋細胞、及び冠動脈又は静脈の細胞などの心臓血管系の細胞も含まれる。心臓細胞の他の非限定的な例には、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞又は前駆細胞、心臓伝導系細胞、並びに心筋、血管及び心臓細胞支持構造を構成する心臓ペースメーカー細胞が含まれる。心臓細胞は、例えば、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞を含む幹細胞に由来し得る。

20

【0034】

本明細書で使用される場合、「心筋細胞 (cardiomyocyte)」又は「心筋細胞 (cardiomyocytes)」という用語は、骨格筋細胞とは対照的に、哺乳動物の心臓に自然に見られるサルコメア含有横紋筋細胞を指す。心筋細胞は、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、心臓 α -アクチニンなどのタンパク質のような特殊な分子の発現によって特徴付けられる。本明細書で使用される場合、「心筋細胞」という用語は、任意の心筋細胞亜集団又は心筋細胞亜型、例えば、心房、心室及びペースメーカー心筋細胞を含む包括的な用語である。

30

【0035】

「心筋細胞様細胞」という用語は、心筋細胞と特徴を共有するが、全ての特徴を共有するわけではない細胞を意味することを意図している。例えば、心筋細胞様細胞は、特定の心臓遺伝子の発現において心筋細胞とは異なり得る。

【0036】

「培養」又は「細胞培養」という用語は、人工的なインビトロ環境における細胞の維持を意味する。「細胞培養系」は、本明細書では、細胞の集団が単層として又は懸濁液中で増殖され得る培養条件を指すために使用される。「培養培地」は、本明細書では、細胞の培養、成長、又は増殖のための栄養溶液を指すために使用される。培地は、細胞を特定の状態（例えば、多能性状態、静止状態など）に維持する能力、又は細胞を成熟させる能力、いくつかの実施形態において、前駆細胞の特定の系列の細胞（例えば、心筋細胞）への分化を促進する能力などであるが、これらに限定されない機能的特性によって特徴付けることができる。

40

【0037】

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

50

遺伝子の発現レベルは、細胞又は組織試料中の mRNA 又はタンパク質の量を測定することによって決定することができる。

【0038】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」は、宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現するように構成された、タンパク質又は核酸をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むDNAポリヌクレオチドである。典型的には、ポリヌクレオチドの発現は、構成的又は誘導可能なプロモーター、組織特異的調節エレメント、及びエンハンサーを含む特定の調節エレメントの制御下に置かれる。そのようなポリヌクレオチドは、調節エレメント（例えば、プロモーター）に「作動的に連結されている」又は「作動可能に連結されている」と言われる。

10

【0039】

「誘導心筋細胞」という用語又は略語「iCM」は、心筋細胞（及び／又は心筋細胞様細胞）に形質転換された非心筋細胞（及びその子孫）を指す。本開示の方法は、例えば、他の技術を強化するために、誘導心筋細胞を生成するために現在知られている、又は後に発見される任意の方法と併せて使用することができる。

【0040】

本明細書で使用される場合、「非心筋細胞」という用語は、本明細書で定義及び使用される「心筋細胞」の基準を満たさない細胞調製物中の任意の細胞又は細胞集団を指す。非心筋細胞の非限定的な例には、体細胞、心臓線維芽細胞、非心臓線維芽細胞、心臓前駆細胞、及び幹細胞が含まれる。

20

【0041】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又はその他の問題若しくは合併症を伴うことなく、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適な化合物、物質、組成物、及び／又は剤形を指すために本明細書で用いられる。

【0042】

損傷した心臓組織の文脈で本明細書で使用される「再生する」、「再生」などの用語は、それらの通常の意味を与えられるが、更に、損傷した、例えば、虚血、梗塞、再灌流、又は他の疾患に起因して損傷した心臓又は心臓組織において新しい心臓組織を成長及び／又は発達させるプロセスも指すものとする。いくつかの実施形態において、心臓組織の再生は、心筋細胞の生成を含む。

30

【0043】

本明細書で使用する場合、「リプログラミング」又は「分化転換」という用語は、細胞を多能性肝細胞の特徴を示す細胞へと脱分化させる中間プロセスを伴うことなく、異なるタイプの細胞（例えば、線維芽細胞）から特定の系列の細胞（例えば、心臓細胞）を生成することを指す。本明細書で使用する場合、「リプログラミング」には、分化転換、脱分化などが含まれる。

【0044】

本明細書で使用される場合、「リプログラミング活性」とは、タンパク質又はポリヌクレオチドが単独で、又はリプログラミング活性を有する他のタンパク質又はポリヌクレオチドと組み合わせて、細胞に誘導されるか、細胞により発現される場合に、細胞の心筋細胞又は心筋様細胞へのリプログラミングを誘導するか、又は促進するためのリプログラミング活性を有するタンパク質又はポリヌクレオチドの能力を指す。例えば、他の因子を伴わない細胞における第1のタンパク質の発現が細胞のリプログラミングを誘導又は促進する場合、第1のタンパク質はリプログラミング活性を有する。しかし、第1のタンパク質が第2のタンパク質と組み合わせてリプログラミングを促進する場合、すなわち、第1のタンパク質及び第2のタンパク質の両方が一緒に発現される場合、用語が本明細書で使用されるように、第1のタンパク質はまたリプログラミング活性を有する。

40

【0045】

本明細書で使用される場合、「リプログラミング効率」という用語は、試料中の細胞の

50

総数に対する、心筋細胞へのリプログラミングに成功した試料中の細胞の数を指す。

【0046】

本明細書で使用される「リプログラミング因子」という用語は、誘導された心筋細胞への細胞のリプログラミングを支援するために細胞内での発現のために導入される因子を含む。リプログラミング因子には、タンパク質及び核酸（例えば、マイクロRNA、siRNA、又はshRNAなどのRNA）が含まれる。

【0047】

「幹細胞」という用語は、自己複製能力及び分化した子孫を生成する能力を有する細胞を指す。「多能性幹細胞」という用語は、3つの胚葉全て（内胚葉、中胚葉、及び外胚葉）の細胞を生み出すことができるが、完全な生物を生み出す能力を持たない幹細胞を指す。

10

【0048】

「治療」、「治療すること」、及び「治療する」は、疾患、障害、状態及び／又はそれらの症状の有害又はその他の任意の望ましくない影響を軽減又は改善するために、薬剤を用いて疾患、障害、又は状態に作用することと定義される。

【0049】

本明細書で使用される場合、「有効量」などという用語は、所望の生理学的結果（例えば、細胞のリプログラミング又は疾患の治療）を誘導するのに十分な量を指す。有効量は、1回以上の投与、適用又は用量で投与することができる。そのような送達は、個々の投薬単位が使用される期間、組成物のバイオアベイラビリティ、投与経路などを含む多くの変数に依存する。しかし、任意の特定の対象についての組成物（例えば、リプログラミング因子）の特定の量は、利用される特定の薬剤の活性、対象の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、及び食事、投与時間、排泄速度、組成物の組み合わせ、治療される特定の疾患の重症度、及び投与形態を含む様々な要因に依存することが理解される。

20

【0050】

本明細書で使用される場合、ポリペプチド又は核酸配列を参照しての「その等価物」という用語は、参照ポリペプチド又は核酸配列とは異なるが、必須の特性（例えば、生物学的活性）を保持するポリペプチド又は核酸を指す。ポリヌクレオチドの典型的なバリエーションは、別の参照ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。バリエーションのヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更する場合も変更しない場合もある。ヌクレオチドの変化は、参照配列によってコードされるポリペプチドにおいてアミノ酸の置換、欠失、付加、融合、及び切断をもたらし得る。一般に、参照ポリペプチド及びバリエーションの配列が全体的に非常に類似し、多くの領域で同一であるように、違いは限定される。

30

【0051】

「単離された」という用語は、細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、又はその断片が自然界で通常会合している細胞及びその他の構成要素から分離されていることを意味する。例えば、単離された細胞は、異なる表現型又は遺伝子型の組織又は細胞から分離された細胞である。当業者には明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は細胞は、天然に存在する対応物と区別するために「単離」を必要としない。

40

【0052】

本明細書で使用される場合、「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用され、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれか、又はそれらの類似体の任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、線状及び環状核酸、メッセンジャーRNA（mRNA）、cDNA、組換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、及びプライマーが含まれる。

【0053】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指し、これには、遺伝的にコー

50

ドされた、及び非遺伝的にコードされたアミノ酸、化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸、及び修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドが含まれ得る。この用語は、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、N末端メチオニン残基を有する又は有しない異種及び相同リーダー配列との融合、免疫標識されたタンパク質などを含むがこれらに限定されない融合タンパク質を含む。

【0054】

本明細書で使用される場合、遺伝子名が先行する「ポリヌクレオチド」という語（例えば「MYOCDポリヌクレオチド」）は、対応するタンパク質（例えば、「MYOCDタンパク質」）をコードするポリヌクレオチド配列を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、遺伝子名が先行する「タンパク質」という語（例えば、「MYOCDタンパク質」）は、天然タンパク質又はその機能的バリエーションのいずれかを指す。「天然タンパク質」は、遺伝子の機能的アイソフォーム又は機能的対立遺伝子変動のうちのいずれかでの、生物、好ましくはベクターが意図される生物（例えば、ヒト、齧歯類、霊長類、又は獣医学的目的のある動物）の遺伝子のゲノムコピーによってコードされるタンパク質である。

【0056】

本明細書で使用される場合、タンパク質の「機能的バリエーション」は、例えば、他の因子と組み合わせて、細胞の心筋細胞へのリプログラミングを誘導するタンパク質の能力を含む、タンパク質の機能的属性を保持する、任意の数のアミノ酸置換を有するバリエーションである。機能的バリエーションは、保存的置換のみを有するバリエーションなど、計算によって、又はインビトロ若しくはインビボアッセイを使用して実験的に特定できる。

【0057】

本明細書で使用される「前駆細胞」という用語は、特定の種類の細胞に分化するか、又は特定の種類の組織を形成することを約束された細胞を指す。前駆細胞は、幹細胞のように、1つ以上の種類の細胞に更に分化することができるが、幹細胞よりも成熟しており、分化能がより制限／拘束されている。

【0058】

「ベクター」という用語は、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチド又はタンパク質を含む高分子又は分子の複合体を指す。

【0059】

本明細書で使用する場合、「ウイルスベクター」という用語は、典型的には核酸分子の移動又は細胞のゲノムへの組み込みを促進するウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子、又は核酸移入を媒介するウイルス粒子のいずれかを指す。ウイルス粒子は、典型的には、核酸に加えて様々なウイルス成分を含み、時には細胞成分も含む。

【0060】

「遺伝子修飾」という用語は、新しい核酸（すなわち、細胞にとって外因性の核酸）の導入後に細胞内で誘導される永久的又は一過性の遺伝子変化を指す。遺伝子変化は、新しい核酸を心臓細胞のゲノムに組み込むことによって、又は新しい核酸を染色体外エレメントとして一時的又は安定的に維持することによって達成することができる。細胞が真核細胞である場合、細胞のゲノムへの核酸の導入によって永久的な遺伝子変化を達成することができる。遺伝子修飾の適切な方法には、ウイルス感染、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、パーティクルガン技術、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクションなどが含まれる。

【0061】

「幹細胞」という用語は、自己複製能力及び分化した子孫を生成する能力を有する細胞を指す。「多能性幹細胞」という用語は、3つの胚葉全て（内胚葉、中胚葉、及び外胚葉）の細胞を生み出すことができるが、完全な生物を生み出す能力を持たない幹細胞を指す。いくつかの実施形態において、心筋細胞の表現型を誘導するための組成物は、リプログラミングを誘導するために細胞の集団に対して使用することができる。他の実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、組成物は心筋細胞の表現型を誘導する。

【0062】

「人工多能性幹細胞」という用語は、その通常の意味を与えられ、更に、多能性の少なくとも1つの特徴を示すようにリプログラムされた分化した哺乳動物体細胞（例えば、皮膚などの成体体細胞）も指すものとする。例えば、Takahashi et al. (2007) Cell 131 (5) : 861-872、Kim et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. 108 (19) : 7838-7843、Sell (2013) Stem Cells Handbook. を参照されたい。

【0063】

別段の記載がない限り、本明細書を通して使用される略語は、以下の意味を有する。A HCF、成体ヒト心臓線維芽細胞；APCF、成体ブタ心臓線維芽細胞；a-MHC-GFP、 α -ミオシン重鎖緑色蛍光タンパク質；CF、心臓線維芽細胞；cm、センチメートル；CO、心拍出量；EF、駆出率；FACS、蛍光活性化セルソーティング；GFP、緑色蛍光タンパク質；GMT、Gata4、Mef2c、及びTbx5；GMTc、Gata4、Mef2c、Tbx5、TGF- β i、WNTi；GO、遺伝子オントロロジー；HCF、ヒト心臓線維芽細胞；iCM、誘導心筋細胞；kg、キログラム； μ g、マイクログラム； μ l、マイクロリットル；mg、ミリグラム；ml、ミリリットル；MI、心筋梗塞；msec、ミリ秒；min、分；MyAMT、ミオカルジン、Ascl1、Mef2c、及びTbx5；MyA、ミオカルジン及びAscl1；MyMT、ミオカルジン、Mef2c、及びTbx5；MyMTc、ミオカルジン、Mef2c、Tbx5、TGF- β i、WNTi；MRI、磁気共鳴画像法；PBS、リン酸緩衝生理食塩水；PBST、リン酸緩衝生理食塩水、トリトン；PFA、パラホルムアルデヒド；qPCR、定量的ポリメラーゼ連鎖反応；qRT-PCR、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応；RNA、リボ核酸；RNA-seq、RNA配列決定；RT-PCR、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応；sec、秒；SV、一回拍出量；TGF- β 、形質転換増殖因子ベータ；TGF- β i、形質転換成長因子ベータ阻害剤；WNT、wingless-Int；WNTi、wingless-Int阻害剤；YFP、黄色蛍光タンパク質；4F、Gata4、Mef2c、TBX5、及びミオカルジン；4Fc、Gata4、Mef2c、TBX5、及びミオカルジン+TGF- β i及びWNTi；7F、Gata4、Mef2c、及びTbx5、Esrrg、ミオカルジン、Zfp2、及びMesp1；7Fc、Gata4、Mef2c、及びTbx5、Esrrg、ミオカルジン、Zfp2、及びMesp1+TGF- β i及びWNTi。

【0064】

本開示の詳細な説明は、読者の便宜のためだけに様々なセクションに分割されており、任意のセクションで見出される開示は、別のセクションの開示と組み合わせることができる。別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同一の意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と同様又は同等の任意の方法及び材料が本発明の実施又は試験において使用され得るが、好ましい方法及び材料がこれから記載される。本明細書で言及される全ての刊行物は、刊行物が引用されるものに関連して方法及び／又は材料を開示及び説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。

【0065】

II. 導入遺伝子及びマイクロRNA結合部位

本開示のベクターは、BMP2、COL1A1、COL1A2、COL3A1、ELN、FGF1、FGF4、GGF2、HGF、OPRL1、PCSK9、RXFP1、SDF1、TGFB2、TIMP3、TIMP4、VEGFA及び／又はその他を含むがこれらに限定されない1つ以上の導入遺伝子を細胞へ送達するために設計され得る。すなわち、ベクターは、BMP2、COL1A1、COL1A2、COL3A1、ELN、FGF1、FGF4、GGF2、HGF、OPRL1、PCSK9、RXFP1、SDF1、TGFB2、TIMP3、TIMP4、VEGFA及び／又はその他のうちの1つ

以上をコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよい。本開示のベクターは、導入遺伝子の任意の特定のセットに限定されない。導入遺伝子は、タンパク質コーディング、DNAコーディング、又はRNAコーディングであり得る。1つ以上の導入遺伝子は、遺伝子編集システム、例えば、CRISPR-Casシステムを含み得る。

【0066】

リプログラミング因子

いくつかの実施形態において、1つ以上の導入遺伝子は、1つ以上のリプログラミング因子（例えば、心筋細胞リプログラミング因子）を含む。ベクターは、選抜された所望の細胞リプログラミングを成し遂げるに必要な因子の全て、又はそのようなリプログラミング因子の選択されたセットを送達するために使用され得る。例えば、複数のベクターを同時投与することができ、そのうちの1つだけが選択されたマイクロRNA結合部位を含む。望ましい効果を集散的に生み出すために複数の因子の発現が必要な場合、一連の因子の特定のメンバーのみがマイクロRNA結合部位によって制御されている場合、又は全てがマイクロRNA結合部位によって制御されている場合、同じ又は同様の効果及び／又は安全上の利益が見られることがある。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、本開示は、目的のポリヌクレオチド又はタンパク質などの1つ以上の遺伝子の発現を調節することができるリプログラミング因子及びその組成物を提供する。本発明者らは驚くべきことに、ASCL1及び／又はMYOCDなどの目的のポリヌクレオチド又はタンパク質などの1つ以上の遺伝子の発現を調節する1つ以上のリプログラミング因子、並びに任意選択的にはマイクロRNAをコードするポリヌクレオチドを使用して、分化した細胞をiCM細胞にリプログラミングできることを発見し、ここで、前述のポリヌクレオチドの1つ以上は、選抜されたマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のリプログラミング因子は、1つ以上の導入遺伝子をコードするポリヌクレオチド（例えば、RNA、mRNA、又はDNAポリヌクレオチド）として提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のリプログラミング因子は、タンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、マイクロRNAをコードするポリヌクレオチドは、対応するプレマイクロRNAと完全な同一性を共有する。

20

【0068】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される1つ以上のリプログラミング因子は、1つ以上の目的のタンパク質の発現を調節する（例えば、増加又は減少させる）。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的タンパク質は、心筋細胞の分化、増殖、及び／又は機能に関与することが知られている。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的ポリヌクレオチド又はタンパク質は、MYOCD／MYOCD及び／又はASCL1／ASCL1である。本開示の組成物及び方法において有用な例示的な遺伝子配列を表2に提供する。所与の目的遺伝子の2つ以上のアイソフォームが知られている場合、本開示の実施形態は、各目的遺伝子の代替アイソフォームを含む組成物及び方法を含むことが理解される。本開示の組成物及び方法は、開示された配列に限定されず、これらは例示及び説明のために提供され、非限定的である。

30

40

【0069】

いくつかの実施形態において、本開示は、ASCL1、MYOCD、MEF2C、及びTBX5から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節するリプログラミング因子を提供する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、ASCL1、MYOCD、MEF2C、AND TBX5、CCNB1、CCND1、CDK1、CDK4、AURKB、OCT4、BAF60C、ESRRG、GATA4、GATA6、HAND2、IRX4、ISLL、MESP1、MESP2、NKX2.5、SRF、TBX20、ZFPM2、及びMIR-133から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。

【0070】

50

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、GATA4、MEF2C、及びTBX5（すなわち、GMT）から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、MYOCD、MEF2C、及びTBX5（すなわち、MyMT）から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、MYOCD、ASCL1、MEF2C、及びTBX5（すなわち、MyAMT）から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、MYOCD及びASCL1（すなわち、MyA）から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、GATA4、MEF2C、TBX5、及びMYOCD（すなわち、4F）から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。他の実施形態において、本明細書に開示されるリプログラミング因子は、GATA4、MEF2C、TBX5、ESRRG、MYOCD、ZFPM2、及びMESP1（すなわち、7F）から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節する。

10

【0071】

いくつかの実施形態において、本開示は、ASCL1、MYOCD、MEF2C、TBX5、DLX3、DLX6、GATA2、及びGATA5から選択される1つ以上の目的の遺伝子の発現を調節するリプログラミング因子を提供する。

20

【表2】

表2：代表的な配列

	タンパク質	ヌクレオチド(オープンリーディングフレーム)
ASCL1	配列番号1	配列番号2
DLX3	配列番号43	配列番号44
DLX6	配列番号45	配列番号46
ESRRG	配列番号47	配列番号48
GATA2	配列番号49	配列番号50
GATA4	配列番号51	配列番号52
MESP1	配列番号53	配列番号54
MYF6	配列番号55	配列番号56
MYOCD	配列番号3	配列番号4
MEF2C	配列番号5	配列番号6
TBX5	配列番号7	配列番号8

30

【0072】

操作されたミオカルジン（MYOCD）

別の態様において、本開示は、米国仮特許出願第62／788,479号に記載されているように、より小さなオープンリーディングフレームから発現された操作されたMYOCDなどの、MYOCDの操作されたバリエーションに関する。出願人は、内部欠失を含むMYOCDがMYOCDタンパク質の発現及び機能を保持し、内部欠失を含むMYOCDを単独で、又は他のリプログラミング因子と組み合わせて（例えば、線維芽細胞から心筋細胞を生成するために）使用できることを見出した。本開示のいくつかの実施形態において、操作されたMYOCDタンパク質は、天然のMYOCD（配列番号3）のアミノ酸414～764に対応する領域に少なくとも50個のアミノ酸の欠失を含む。いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDは、内部欠失を有する1つ又は3つのMYOCDバリエーションから選択される：残基414～763の欠失を有するMyΔ1（配列番号14）；残基439～763の欠失を有するMyΔ2（配列番号15）；好ましくは、残基56

40

50

0～763の欠失を有するMyΔ3（配列番号16）。

【0073】

いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、操作されたMYOCDポリヌクレオチドである。「MYOCD」又は「ミオカルジン」は、操作されたMYOCDタンパク質又は好ましくは天然のMYOCDのいずれかを指す。いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDポリヌクレオチドは、最大500、550、600、650、700、750、800、850、又はそれらの間の任意の数のアミノ酸の長さを有する操作されたMYOCDタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDタンパク質は、SRF相互作用ドメイン、SAPドメイン、及びTADドメインを含む。いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDタンパク質は、Mef2c相互作用ドメインを更に含む。いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDポリヌクレオチドは、天然のミオカルジン（配列番号3）のアミノ酸414～764に対応する領域に少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、又は350個のアミノ酸の欠失を伴う、操作されたMYOCDをコードする。ミオカルジンの操作に使用される様々なシーケンスを表3で提供する。いくつかの実施形態において、MYOCDの種間保存が残基5から始まるので、MYOCDの約4個のN末端残基が省略又は変更される。いくつかの実施形態において、MYOCDのN末端からの更なる残基が省略又は変更される。

【表3】

表3：MYOCDの操作において使用される配列

タンパク質	配列番号
ネイティブ MYOCD	配列番号 3
MYOCD 5-413	配列番号 10
MYOCD 764-986	配列番号 11
MYOCD 5-438	配列番号 12
MYOCD 1-559	配列番号 13
MYOCD 1-413、764-986(MyΔ1)	配列番号 14
MYOCD 1-438、764-986(MyΔ2)	配列番号 15
MYOCD 1-559、764-986(MyΔ3)	配列番号 16
Mef2c 相互作用ドメイン(5-120)	配列番号 17
SRF ドメイン(210-320)	配列番号 18
SAP ドメイン(360-413)	配列番号 19
LZ ドメイン(510-550)	配列番号 20
TAD ドメイン(764-986)	配列番号 11

【0074】

いくつかの実施形態において、操作されたミオカルジンタンパク質は、Mef2c相互作用ドメイン、SRFドメイン、SAPドメイン、LZドメイン、及びTADドメインのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、操作されたミオカルジンタンパク質は、Mef2c相互作用ドメイン、SRFドメイン、SAPドメイン、LZドメイン、及びTADドメインを含む。いくつかの実施形態において、操作されたミオカルジンタンパク質は、Mef2c相互作用ドメイン、SRFドメイン、SAPドメイン、及びTADドメインを含む。いくつかの実施形態において、操作されたミオカルジンタンパク質は、SRFドメイン、SAPドメイン、LZドメイン、及びTADドメインを含む。いくつか

の実施形態において、操作されたミオカルジンタンパク質は、SRFDメイン、SAPDメイン、及びTADドメインを含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDは、操作されたMYOCDをコードするポリヌクレオチドとして提供され、任意選択的に、目的の1つ以上の他のタンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、又はmRNAポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、MYOCDのアイソフォームのうちのいずれかと同一性を共有する。いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、MyΔ1（配列番号14）、MyΔ2（配列番号15）、及びMyΔ3（配列番号16）から選択される配列と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である操作されたMYOCDタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDタンパク質は、Mef2c相互作用ドメイン、SRFDメイン、SAPDメイン、LZドメイン、及びTADドメインのうちの少なくとも2つ、3つ、4つ、5つを含む。いくつかの実施形態において、Mef2c相互作用ドメインは、配列番号17と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である。いくつかの実施形態において、SRFDメインは、配列番号18と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である。いくつかの実施形態において、SAPDメインは、配列番号19と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である。いくつかの実施形態において、LZドメインは、配列番号20と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である。いくつかの実施形態において、TADドメインは、配列番号11と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である。

【0076】

いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDタンパク質は、リンカーによって連結された天然のMYOCDの2つ以上のフラグメントを含む。一般に、リンカーは、ペプチド結合又はポリペプチド配列のいずれかを指す。いくつかの実施形態において、当技術分野で知られているペプチド化学で使用される様々な化学リンカーのうちのいずれかなど、他のリンカーが使用される。「ペプチド結合」への言及は、アミノ酸残基が介在することなく複合配列を生成するために、2つの配列が一緒に結合されることを意味する。例えば、MyΔ3（配列番号16）は、ペプチド結合によってMYOCD764-986（配列番号11）に連結されたMYOCD1-559（配列番号13）を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、当技術分野でリンカーとして使用される様々なポリペプチドのうちのいずれかであり、例えば、限定されないが、G、GG、GGG、GSS、GGS、GSGGS（配列番号30）、GSSGGS（配列番号31）、GSGSSS（

配列番号 32)、GGSGGSGGS (配列番号 33)、GGSGGSGGSGGS (配列番号 34)、などのグリシン-セリンリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態において、リンカーは、MYOCD 以外のタンパク質のドメインである。

【0077】

本開示全体を通して、ポリヌクレオチドの発現は、目的の遺伝子の発現を増加させるための当技術分野で知られている任意の手段を指し得る。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子は、メッセンジャー RNA (mRNA) にコードされる。mRNA は、合成又は天然のものであり得る。いくつかの実施形態において、mRNA は、当技術分野で知られている様々な方法で化学的に修飾される。例えば、Warren, L. et al. Cell Stem Cell 7: 618-30 (2010)、WO2014081507 A1、WO2012019168、WO2012045082、WO2012045075、WO2013052523、WO2013090648、US9572896 B2 において記載されているように使用することができる。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子の発現は、細胞へのポリヌクレオチドの送達によって増加する。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、ウイルス又は非ウイルスベクターによって送達される。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子は、DNA ポリヌクレオチドにコードされ、任意選択的には、当技術分野で知られている任意のウイルス又は非ウイルス方法によって送達される。いくつかの実施形態において、本開示は、目的の遺伝子をコードする DNA 又は mRNA を含む脂質ナノ粒子と細胞を接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、目的の遺伝子をコードする DNA 又は RNA (例えば、DNA ゲノム、ネガティブセンス RNA ゲノム、ポジティブセンス RNA ゲノム、又は二本鎖 RNA ゲノム) を含むウイルスと細胞を接触させることを含む。いくつかの実施形態において、ウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、非組み込みレンチウイルスベクター (LVV)、及び組み込み LVV から選択される。いくつかの実施形態において、細胞はプラスミドでトランスフェクトされる。いくつかの実施形態において、プラスミドは、リプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、プラスミドは、リプログラミング因子を含むトランスポゾンを含む。

【0078】

いくつかの実施形態において、リプログラミング因子は、目的の 1 つ以上のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとして提供される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、又は mRNA ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも 100、200、300、400 又は 500 ヌクレオチドにわたって、ヒト ASCL1 のヌクレオチド配列 (配列番号 2) と少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の同一性を含む核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ASCL1 ポリヌクレオチドは、ASCL1 のアイソフォームのうちのいずれかと同一性を共有する。いくつかの実施形態において、ASCL1 ポリヌクレオチドは、ヒト ASCL1 (配列番号 1) の配列と少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一である ASCL1 タンパク質をコードする。

【0079】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物及び方法は、MYOCD ポリヌクレオチドを含む、又は MYOCD ポリヌクレオチドを投与することを含む、iCM 細胞又は組換えウイルス若しくは非ウイルスベクターを提供する。いくつかの実施形態において、MYOCD ポリヌクレオチドは、ヒト MYOCD (配列番号 3) の配列と少なくとも 70%、

71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるMYOCDタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、少なくとも100、200、300、400又は500ヌクレオチドにわたって、ヒトMYOCDのヌクレオチド配列（配列番号4）と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を共有する。いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、MYOCDのアイソフォームのうちのいずれかと同一性を共有する。

10

【0080】

いくつかの実施形態において、操作されたMYOCDは、操作されたMYOCDをコードするポリヌクレオチドとして提供される。

【0081】

いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、操作されたMYOCD（例えば、配列番号14）の配列と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるMYOCDタンパク質をコードする。

20

【0082】

いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、操作されたMYOCD（例えば、配列番号15）の配列と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるMYOCDタンパク質をコードする。

【0083】

いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチドは、操作されたMYOCD（例えば、配列番号16）の配列と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるMYOCDタンパク質をコードする。

30

【0084】

いくつかの実施形態において、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは合成mRNAである。合成mRNAは、目的のタンパク質を作成するための遺伝情報を提供し、免疫応答の誘発を避けるために化学的に修飾することができる。Zangi et al. (2013) Nature Biotech 31: 898-907. mRNAは宿主細胞のゲノムに組み込まれないため、合成mRNAは一定期間作用し、その後細胞が分裂するにつれて消失する。いくつかの実施形態において、合成mRNAは、例えば、シュードウリジン及び／又は5-メチルシチジンで修飾されて、一本鎖RNAに対する自然抗ウイルス応答を低下させる。

40

【0085】

いくつかの実施形態において、目的の1つ以上のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、コードされた遺伝子の機能活性が保存される限り、コドン最適化又は別の方法で改変され得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、コードされた遺伝子の機能活性が保存される限り、切断、挿入、欠失、又は断片を含む、1つ以上の目的の遺伝子の修飾又はバリエーションをコードする。

50

【0086】

いくつかの実施形態において、目的の1つ以上のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、発現カセットに含まれる。いくつかの実施形態において、発現カセットは、目的の1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態において、発現カセットは、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の目的の遺伝子をコードする2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のポリヌクレオチドを含む。

【0087】

目的の2つ以上のタンパク質が細胞内で発現される場合、1つ以上のポリヌクレオチド又は発現カセットを使用できることが理解される。例えば、1つの発現カセットが複数のタンパク質を発現する複数のポリヌクレオチドを含むことができるポリシストロン性発現カセットを使用することができる。いくつかの実施形態において、ポリシストロン性発現カセットは、単一のオープンリーディングフレーム内に2つ以上のポリヌクレオチドを含み、これらのポリヌクレオチドは、Donnelly et al., J. Gen. Virol. 82:1013-15 (2001) 及び当技術分野で知られているその改良版において記載されているような、アフトウイルス口蹄疫ウイルス (FMDV) ポリタンパク質の2A領域によって連結されている。2A領域は、ペプチド結合を形成することなく、1つのコドンから次のコドンへのリボソーム「スキップ」を生成する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、翻訳後切断によって2つ以上のペプチドが生成されるように、内部切断部位を含む。

【0088】

いくつかの実施形態において、本開示のマルチシストロン性ベクターは、リボソームスキッピング又は自己切断を誘導できるペプチドを含むリンカーによって連結された複数のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは2Aペプチドを含む。本明細書で使用される場合、「2Aペプチド」という用語は、単一のオープンリーディングフレームから2つ以上のタンパク質を生成するように構成されたりリボソームスキッピング又は自己切断ペプチドのクラスを指す。2Aペプチドは、真核細胞での翻訳中にポリペプチドの「切断」を媒介する18~22残基長のウイルスオリゴペプチドである。「2Aペプチド」は、様々なアミノ酸配列を有するペプチドを指す場合がある。本開示において、レンチウイルスベクターが2つ以上の2Aペプチドを含む場合、2Aペプチドは互いに同一であっても異なってもよいことが理解されるであろう。2Aペプチドの設計及び使用に関する詳細な方法論は、Szymczak-Workman et al., Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors, Cold Spring Harb. Protoc. 2012 Feb 1; 2012 (2):199-204によって提供されている。文献では、2Aペプチドは自己切断ペプチドと称されることが多いが、機序研究では、観察された「自己切断」は、実際には、リボソームが2AペプチドのC末端でグリシル-プロリンペプチド結合の形成をスキップした結果であることが示されている。Donnelly et al., J. Gen. Virol. 2001 May; 82 (Pt 5):1027-41. 本発明は、理論に拘束されるものでも、2Aペプチド機能の特定の機制的理解に限定されるものでもない。

【0089】

例示的な2Aペプチドには、表4に列挙されたものが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4：例示的な 2 A ペプチド

	起源	ヌクレオチド	ペプチド
P2A	ブタデシオウイルス-1	GCC ACG AAC TTC TCT CTG TTA AAG CAA GCA GGA GAC GTG GAA GAA AAC CCC GGT CCT (配列番号 21) 又は GCT ACT AAC TTC AGC CTG CTG AAG CAG GCT GGA GAC GTG GAG GAG AAC CCT GGA CCT (配列番号 22)	ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 23)
T2A	Thoseaasigna ウイルス	GAG GGC AGA GGA AGT CTG CTA ACA TGC GGT GAC GTC GAG GAG AAT CCT GGA CCT (配列番号 24)	EGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 25)
E2A	A 型ウマ鼻炎ウイルス (ERAV)	CAG TGT ACT AAT TAT GCT CTC TTG AAA TTG GCT GGA GAT GTT GAG AGC AAC CCT GGA CCT (配列番号 26)	QCTNYALLKLAGDCESNPGP (配列番号 27)
F2A	口蹄疫ウイルス(FMDV)	GTG AAA CAG ACT TTG AAT TTT GAC CTT CTC AAG TTG GCG GGA GAC GTG GAG TCC AAC CCT GGA CCT (配列番号 28)	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 29)

10

20

30

【0090】

任意選択的に、リンカーの 1 つ以上は、残基 G l y - S e r - G l y をコードする配列を更に含み、これは、いくつかの実施形態において、2 A ペプチドの N 末端にある。2 A ペプチドの N 末端とは、残基をコードする配列が 2 A ペプチドをコードする配列の上流にあることを意味する。一般に、G l y - S e r - G l y モチーフは、2 A ペプチドのすぐ N 末端にあるか、モチーフと 2 A ペプチドとの間に 1 ～ 10 個の他のアミノ酸残基が挿入される。いくつかの実施形態において、このモチーフをコードするポリヌクレオチド配列は、G G A A G C G G A である。任意のペプチドをコードするポリヌクレオチドと同様に、ヌクレオチド配列は、コードされたペプチド配列を変更することなく改変され得る。アミノ酸残基の置換は当業者の技術の範囲内であり、2 A ペプチドという用語は、所望のスキッピング／自己切断活性を保持するが、任意選択的に、参照 2 A ペプチド配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれ以上の置換を有する前述

40

50

のバリエーションを指す。例示的な2Aペプチドは、Kim et al. PLOS ONE 6 (4) : e18556 に記載されている。いくつかの実施形態において、2つ以上の異なる2Aペプチドが同じ構築物で使用される。様々な2Aペプチドが発現の改善をもたらすことが報告されている。Liu et al. Sci Rep. 2017 ; 7 : 2193 を参照されたい。

【0091】

いくつかの実施形態において、本開示は、5' から3' の順に、プロモーター、MYOC-D-2A-ASCL1 をコードするポリヌクレオチド、及びポリアデニル化配列を含む発現カセットを提供する。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号35と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む組換えAAV (rAAV)、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含むrAAV粒子を提供する。いくつかの実施形態において、rAAVは、配列番号35と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む組換えレンチウイルス (rLV)、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含むrLV粒子を提供する。いくつかの実施形態において、rLVは、配列番号35と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるポリヌクレオチドを含む。

【0092】

いくつかの実施形態において、本開示は、5' から3' の順に、プロモーター、MyD3-2A-ASCL1 をコードするポリヌクレオチド、及びポリアデニル化配列を含む発現カセットを提供する。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号37と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含むrAAV、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含むrAAV粒子を提供する。いくつかの実施形態において、rAAVは、配列番号37と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む組換えrLV、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含むrLV粒子を提供する。いくつかの実施形態において、rLVは、配列番号37と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるポリヌクレオチドを含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、本開示は、5' から3' の順に、プロモーター、ASCL1-2A-MYOCD をコードするポリヌクレオチド、及びポリアデニル化配列を含む発

現カセットを提供する。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号 39 と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む r A A V、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含む r A A V 粒子を提供する。いくつかの実施形態において、r A A V は、配列番号 39 と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む組換え r L V、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含む r L V 粒子を提供する。いくつかの実施形態において、r L V は、配列番号 39 と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるポリヌクレオチドを含む。

10

【0094】

いくつかの実施形態において、本開示は、5' から 3' の順に、プロモーター、A S C L 1-2 A-M y Δ 3 をコードするポリヌクレオチド、及びポリアデニル化配列を含む発現カセットを提供する。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号 41 と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む r A A V、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含む r A A V 粒子を提供する。いくつかの実施形態において、r A A V は、配列番号 41 と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、発現カセットを含む組換え r L V、発現カセットを含む移入プラスミド、又は発現カセットを含む r L V 粒子を提供する。いくつかの実施形態において、r L V は、配列番号 41 と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるポリヌクレオチドを含む。

20

30

【0095】

いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号 57 ~ 64 のうちのいずれか 1 つ（例えば、M Y O C D-2 A-A S C L 1、M y Δ 3-2 A-A S C L 1、A S C L 1-2 A-M Y O C D、及び A S C L 1-2 A-M y Δ 3 のうちのいずれか 1 つ）と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるタンパク質配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを提供する。

40

【0096】

いくつかの実施形態において、1 つ以上のリプログラミング因子は、1 つ以上のマイク

50

口RNAを含む。リプログラミング因子として有用なマイクロRNAには、miR-133a-2、miR-133a-1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133b、miR-1-2、miR-92a-2、miR-20b、miR-20a、miR-141、miR-155、miR-17、hsa-let-7c、miR-202、miR-200a、miR-206、miR-509-1、miR-509-2、miR-124-3、miR-124-2、miR-378a、miR-378e、miR-378h、miR-378i、miR-137、miR-671、miR-24-1、miR-182、miR-302d、miR-96、miR-30c-2、及びmiR-146bが含まれる。

【0097】

10

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-19b-1、miR-19b-2、miR-137、miR-133a-2、miR-671、miR-24-1、miR-182、miR-302d、miR-96、miR-30c-2、miR-146b、及びmiR-133a-2からなる群から選択される。

【0098】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-133a-2、miR-133a-1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133b、miR-1-2、miR-92a-2、miR-20b、miR-20a、miR-141、miR-155、miR-17、hsa-let-7c、miR-202、miR-200a、miR-206、miR-509-1、miR-509-2、miR-124-3、miR-124-2、miR-378a、miR-378e、miR-378h、miR-378i、miR-137、miR-671、miR-24-1、miR-182、miR-302d、miR-96、miR-30c-2、及びmiR-146bからなる群から選択される。

20

【0099】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-133a-2、miR-133a-1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133b、miR-1-2、miR-92a-2、miR-20b、miR-20a、miR-141、miR-155、miR-17、hsa-let-7c、miR-202、miR-200a、miR-206、miR-509-1、miR-509-2、miR-124-3、miR-124-2、miR-378a、miR-378e、miR-378h、及びmiR-378iからなる群から選択される。

30

【0100】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-133a-2、miR-133a-1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133b、miR-1-2、miR-92a-2、miR-20b、miR-20a、miR-141、miR-155、miR-17、hsa-let-7c、miR-202、miR-200a、miR-206、miR-509-1、miR-509-2、miR-124-3、miR-124-2、miR-378a、miR-378e、miR-378h、miR-378i、miR-137、miR-671、miR-24-1、miR-182、miR-302d、miR-96、miR-30c-2、及びmiR-146bからなる群から選択される。

40

【0101】

いくつかの実施形態において、2つのマイクロRNAをMYOCD及び／又はASCL1と組み合わせて、分化細胞（例えば、線維芽細胞）の心筋細胞へのリプログラミングを誘導する。マイクロRNAの可能な組み合わせには、5'位置にmiR-133a-2、miR-133a-1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133b、miR-1-2、miR-20b、及びmiR-20aのうちのいずれか1つ、続いて、3'位置にmiR-133

50

a-2、miR-133-a1、miR-19b-2、miR-19b-1、miR-326、miR-1-1、miR-1298、miR-133-b、miR-1-2、miR-20-b、及びmiR-20-aのうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも3つ、4つ、又は5つのmiRNAなど、複数のmiRNAが組み合わされる。同じマイクロRNAの1、2、3、4、5又はそれ以上のコピーなど、同じmiRNAの複数のコピーを使用することができる。

【0102】

目的のマイクロRNAは、shRNA、siRNA、又はマイクロRNAミメティック（任意選択的に、ホスホチオレート骨格、ロックド核酸、及びコレステロール修飾などの修飾を含む）を含むがこれらに限定されない任意の手段によって提供され得る。いくつかの実施形態において、目的のマイクロRNAは、マイクロRNAをpremiRNAとしてコードするポリヌクレオチドから発現される。マイクロRNAをコードするポリヌクレオチドは、一般に、プロモーターに作動可能に連結される。マイクロRNAは、それ自体の転写物上で、又は1つ以上の他の因子（例えば、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチド）と共有する転写物上で発現することができる。いくつかの実施形態において、MYOCDポリヌクレオチド及び／又はASCL1ポリヌクレオチドは、マイクロRNA及びMYOCD及び／又はASCL1が同じ転写物から発現されるように、ベクター内でマイクロRNAをコードするポリヌクレオチドと配置される。いくつかの実施形態において、premiRNA配列は、タンパク質コード配列（例えば、MYOCD、ASCL1、MYOCD-2A-ASCL1、又はASCL1-2A-MYOCD）に対して5'である。いくつかの実施形態において、premiRNA配列は、タンパク質コード配列（例えば、MYOCD、ASCL1、MYOCD-2A-ASCL1、又はASCL1-2A-MYOCD）に対して3'である。マイクロRNAをコードするポリヌクレオチドは、5'又は3'非翻訳領域（UTR）に挿入され得る。マイクロRNAをコードするポリヌクレオチドは、イントロンに挿入され得る。

【0103】

本開示の組成物及び方法において有用な例示的なpremiRNA配列を表1に提供する。いくつかの実施形態において、premiRNAのステム又はループにおける1、2、3、4、又はそれ以上の置換及び／又は挿入が許容される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ネイティブマイクロRNA（例えば、ネイティブヒトマイクロRNA）と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号65～99のうちのいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号100～134のうちのいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む。

【0104】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、hsa-pri-miR-133a-2、hsa-pri-miR-133a-1、hsa-pri-miR-19b-2、hsa-pri-miR-19b-1、hsa-pri-miR-326、hsa-pri-miR-1-1、hsa-pri-miR-1298、hsa-pri-miR-133b、hsa-pri-miR-1-2、hsa-pri-miR-92a-2、hsa-pri-miR-20b、hsa-pri-miR-20a、hsa-pri-miR-141、hsa-pri-miR-155、hsa-pri-miR-17、hsa-pri-miR-let-7c、hsa-pri-miR-202、hsa-pri-miR-200a、hsa-pri-miR-206、hsa-pri-miR-509-1、hsa-pri-miR-509-2、hsa-pri-miR-124-3、hsa-pri-miR-124-2、hsa-pri-miR-378a、hsa-pri-miR-378e、hsa-pri-miR-378h、hsa-pri-miR-378i、hsa-pri-miR-137、hsa-pri-miR-671、hsa-pri-

i-miR-24-1、hsa-pri-miR-182、hsa-pri-miR-302d、hsa-pri-miR-96、hsa-pri-miR-30c-2、及び hsa-pri-miR-146b のうちのいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む。

【0105】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、hsa-MIR-133a-2、hsa-MIR-133a-1、hsa-MIR-19b-2、hsa-MIR-19b-1、hsa-MIR-326、hsa-MIR-1-1、hsa-MIR-1298、hsa-MIR-133b、hsa-MIR-1-2、hsa-MIR-92a-2、hsa-MIR-20b、hsa-MIR-20a、hsa-MIR-141、hsa-MIR-155、hsa-MIR-17、hsa-let-7c、hsa-MIR-202、hsa-MIR-200a、hsa-MIR-206、hsa-MIR-509-1、hsa-MIR-509-2、hsa-MIR-124-3、hsa-MIR-124-2、hsa-MIR-378a、hsa-MIR-378e、hsa-MIR-378h、hsa-MIR-378i、hsa-MIR-137、hsa-MIR-671、hsa-MIR-24-1、hsa-MIR-182、hsa-MIR-302d、hsa-MIR-96、hsa-MIR-30c-2、及び hsa-MIR-146b のうちのいずれか1つと少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む。

10

【0106】

20

マイクロRNA 結合部位

一態様では、本開示は、1つ以上の導入遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列と、マイクロRNAに対するマイクロRNA結合部位とを含むポリヌクレオチドを含むベクターであって、マイクロRNA結合部位は、1つ以上の導入遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結され、マイクロRNAは、心臓線維芽細胞と比較して、心筋細胞又は心筋前駆細胞においてより高度なレベルで発現される、ベクターを提供する。マイクロRNA結合部位は、1つ以上の導入遺伝子をコードするmRNA転写物をコードする配列にマイクロRNA結合部位を挿入することによって、ポリヌクレオチドに作動可能に連結され得る。挿入部位は、コード領域又は非コード領域にあってもよい。コード領域への挿入は、コードされたタンパク質（例えば、ループ）で許容される位置を選択し、インフレーム挿入を使用して結合部位が確実に挿入されるようにすることによって生成され得る。結合部位は、3'非翻訳領域（3'UTR）、つまり最後の導入遺伝子の末端とポリアダニル化部位との間に挿入することができる。結合部位はまた、一对の導入遺伝子の間又は5'UTRに挿入され得る。

30

【0107】

マイクロRNA結合部位はまた、遺伝子調節回路を介して1つ以上の導入遺伝子に間接的に結合され得る。例えば、マイクロRNA結合部位は、転写のエンハンサー、翻訳のエンハンサー、又は補因子に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態において、ベクターは複数のmRNA転写物をコードする。マイクロRNA結合部位は、これらの転写物の一部又は全部に提供され得る。例えば、マイクロRNA結合部位は、ASCL1をコードするmRNA転写物をコードするポリヌクレオチド、ミオカルジンをコードするmRNA転写物をコードするポリヌクレオチド、又はその両方に作動可能に連結され得る。

40

【0108】

いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、心臓線維芽細胞と比較して、心筋細胞又は心筋前駆細胞において1つ以上の導入遺伝子の発現の特異的抑制を促進する。

【0109】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、心筋細胞におけるマイクロRNAの発現レベル、及び／又は心筋細胞リプログラミング因子で約7日間を超えて、約1週間を超えて、約2週間を超えて、約3週間を超えて、若しくは約4週間を超えて処理された心

50

臓線維芽細胞におけるマイクロRNAの発現レベルと比較して、心臓線維芽細胞においてより低いレベルで発現され、かつ／又は心筋細胞リプログラミング因子で約7日間以内、約1週間以内、約2週間以内、約3週間以内、若しくは約4週間以内で処理された心臓線維芽細胞においてより低いレベルで発現される。

【0110】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208である。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-1である。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-133である。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208aである。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208bである。

10

【0111】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208b-3pである。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、

【化1】

ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号135)

に対して70%を超える同一性を共有し、配列CGTCTTAを含む下線のシード領域にミスマッチを共有しない、いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、AAATATATGTAAATCGTCTTAA (配列番号136) である。

【0112】

20

いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号135) である。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、TGAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号137) である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する少なくとも2つのマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する少なくとも3つのマイクロRNA結合部位を含む。

【0113】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する少なくとも4つのマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する少なくとも5つのマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する少なくとも6つのマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する最大6つのマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロRNAに対する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのマイクロRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の導入遺伝子は、1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子は、MYOCD、ASCL1、GATA4、MEF2C、TBX5、miR-133、及びMESP1のうちの2つ以上を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子は、MYOCD、ASCL1、GATA4、MEF2C、TBX5、miR-133、及びMESP1のうちの3つ以上を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子は、MYOCD、ASCL1、GATA4、MEF2C、TBX5、miR-133、及びMESP1のうちの4つ以上を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子は、MYOCD、ASCL1、GATA4、MEF2C、TBX5、miR-133、及びMESP1のうちの5つ以上を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子は、MYOCD及びASCL1を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、MYOCD-2A-ASCL1タンパク質をコードする。

30

40

【0114】

50

本開示は、心筋細胞リプログラミング因子をコードするベクターに限定されない。実際、本明細書に記載のベクターは、選択された非標的細胞における発現が望ましくない他の遺伝子を送達し得る。例えば、限定するものではないが、ベクターは、遺伝子療法を心筋細胞以外の細胞に送達するために使用され得る。標的細胞は、心臓線維芽細胞又は任意の他の細胞型であり得る。いくつかの実施形態において、本開示のベクターは、心臓以外の器官（例えば、肺、脳、肝臓、筋肉など）における細胞の形質導入に有用である。

【0115】

いくつかの実施形態において、MYOCDは内部欠失を含む。例示的なMYOCD遺伝子は、国際特許出願第PCT/US2019/049150号に提供されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0116】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'から3'の順に、プロモーター、MYOCD及びASCL1をコードする配列、マイクロRNA結合部位、並びにポリアダニル化配列を含む。

【0117】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、miR-133をコードする配列を含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターなどである。いくつかの実施形態において、AAVベクターはAAV9ベクターである。いくつかの実施形態において、AAVベクターはAAV5ベクターである。

20

【0119】

別の態様では、本開示は、心臓線維芽細胞を心筋細胞にリプログラミングするための方法であって、a) 心臓線維芽細胞の心筋細胞へのリプログラミングを誘導する有効量の組成物で心臓線維芽細胞を処理し、心臓線維芽細胞における1つ以上のマイクロRNAの発現を測定することによって、誘導された心筋細胞で特異的に発現されたマイクロRNAを選択することであって、選択されたマイクロRNAは、所定の時間後にのみ、心臓線維芽細胞において発現される、選択することと、b) 1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された、選択されたマイクロRNAに対する1つ以上のマイクロRNA結合部位を含むポリヌクレオチドを含むベクターを生成することと、c) 心臓線維芽細胞を有効量のベクターと接触させることと、を含む、方法を提供する。

30

【0120】

いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、心筋細胞における1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子の発現を抑制する。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、骨格筋細胞における1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子の発現を抑制する。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、心筋細胞における1つ以上の心筋細胞リプログラミング因子の発現を抑制する。

40

【0121】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208である。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-1である。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-133である。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208aである。いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208bである。

【0122】

いくつかの実施形態において、マイクロRNAは、miR-208b-3pである。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、

50

【化 2】

ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号 135)

に対して > 70%、> 75%、> 80%、> 90%、> 95%、> 99%、又は > 100% の同一性を共有し、配列 CGTCTTA を含む下線のシード領域にミスマッチを共有しない。いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、AAAATATATGTAAATCGTCTTAA (配列番号 136) である。いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号 135) である。いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、TGAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号 137) である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロ RNA に対する少なくとも 2 つのマイクロ RNA 結合部位を含む。

10

【0123】

いくつかの実施形態において、AAV ベクターは、

【0124】

ACAAACCTTTTGTTCGTCTTATAAAACAAACCTTTTGTTCGTCTTATAAAACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号 138) に対して > 70%、> 75%、> 80%、> 90%、> 95%、> 99%、又は > 100% の同一性を共有する 3' UTR を含む。

20

【0125】

いくつかの実施形態において、AAV ベクターは、

ACAAACCTTTTGTTCGTCTTATAAAACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号 139) に対して > 70%、> 75%、> 80%、> 90%、> 95%、> 99%、又は > 100% の同一性を共有する 3' UTR を含む。

【0126】

いくつかの実施形態において、AAV ベクターは、

AAAATATATGTAAATCGTCTTAAAAAATATATGTAAATCGTCTTAAAAAATATATGTAAATCGTCTTAA (配列番号 140) に対して > 70%、> 75%、> 80%、> 90%、> 95%、> 99%、又は > 100% の同一性を共有する 3' UTR を含む。

30

【0127】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロ RNA に対する少なくとも 4 つのマイクロ RNA 結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロ RNA に対する最大 6 つのマイクロ RNA 結合部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、マイクロ RNA に対する 4 つのマイクロ RNA 結合部位を含む。別の態様では、本開示は、心臓線維芽細胞を有効量の請求項 1~28 のいずれか一項に記載のベクターと接触させることを含む、心臓線維芽細胞を心筋細胞にリプログラミングするための、方法を提供する。

40

【0128】

いくつかの実施形態において、本方法は、心臓線維芽細胞における心筋細胞表現型の少なくとも 1 つのマーカーの発現を誘導する。いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、miR-1、miR-133、miR-208a、miR-208b、及び/又は miR-208b-3p に対するマイクロ RNA 結合部位である。いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、miR-1 に対するマイクロ RNA 結合部位である。いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、miR-133 に対するマイクロ RNA 結合部位である。

【0129】

いくつかの実施形態において、マイクロ RNA 結合部位は、miR-208a に対する

50

マイクロRNA結合部位である。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、miR-208bに対するマイクロRNA結合部位である。いくつかの実施形態において、マイクロRNA結合部位は、miR-208b-3pに対するマイクロRNA結合部位である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、miR-133をコードする配列を含む。

【0130】

いくつかの実施形態において、心不全は心筋梗塞によるものである。いくつかの実施形態において、心不全は、駆出率が低下した心不全（HFREF）である。いくつかの実施形態において、本方法は、投与前の対象と比較して、対象の駆出率を増加させる。

【0131】

いくつかの実施形態において、本方法は、未治療の対照対象と比較して、対象の駆出率を増加させる。いくつかの実施形態において、本方法は、対象における駆出率を少なくとも約28%、29%、30%、31%、又は32%まで増加させる。いくつかの実施形態において、駆出率は、AAVベクターの投与後、所定の時間後、任意選択的に、8週間後に評価される。いくつかの実施形態において、本方法は、投与前の対象と比較して、対象における瘢痕組織形成を減少させる。いくつかの実施形態において、本方法は、未治療の対照対象と比較して、対象における瘢痕組織形成を減少させる。いくつかの実施形態において、本方法は、対象における瘢痕組織形成を多くとも約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、又は20%まで減少させる。いくつかの実施形態において、瘢痕組織形成は、AAVベクターの投与後、所定の時間後、任意選択的に、8週間後に評価される。

【0132】

III. ベクター

いくつかの実施形態において、細胞を心臓系統にリプログラミングするために使用されるリプログラミング因子は、ベクターによって選択された細胞又は選択された細胞集団に導入することができる。いくつかの実施形態において、ベクターは、プラスミド（例えば、DNAプラスミド又はRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、細菌又は酵母人工染色体、又はウイルスベクターなどの核酸ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、ナノ粒子などの非核酸ベクターである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のベクターは、細胞透過性ペプチド又は細胞内在化配列などのペプチドを含む。細胞透過性ペプチドは、原形質膜を通過できる小さなペプチドである。例示的な細胞透過性ペプチドには、アンテナペディア配列、TAT、HIV-Tat、ペネトラチン、Antp-3A（Antp変異体）、プフォリンII、トランスポータン、MAP（モデル両親媒性ペプチド）、KFGF、Ku70、プリオン、pVEC、Pep-1、SynB1、Pep-7、I-IN-1、BGSC（ビス-グアニジニウム-スペルミジン-コレステロール）、及びBGTC（ビス-グアニジニウム-トレニ-コレステロール）が含まれるが、これらに限定されない。

【0133】

組換え遺伝学の分野における技術は、そのような組換え発現のために使用することができる。組換え遺伝学の一般的な方法を開示する基本的なテキストには、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 及びCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994) が挙げられる。いくつかの実施形態において、ベクターは哺乳動物の複製起点を含まない。いくつかの実施形態において、発現ベクターはゲノムに組み込まれず、かつ／又は哺乳動物の複製起点を含まないベクターを介して導入される。

【0134】

場合によっては、発現ベクターは、1つ以上のリプログラミング因子に加えて、トラン

10

20

30

40

50

スフェクト、形質導入又は感染した細胞の識別又は選択を容易にするマーカー遺伝子をコードするか、又は含む。マーカー遺伝子の例としては、蛍光タンパク質、例えば、強化された緑色蛍光タンパク質、Ds-Red (DsRed: Discosoma sp. 赤色蛍光タンパク質 (RFP); Bevis et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20 (11): 83-87)、黄色蛍光タンパク質、mCherry、及びシアノ蛍光タンパク質をコードする遺伝子、並びに選択剤に対する耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0135】

一実施形態において、発現ベクターは、自殺遺伝子を更に含む。自殺遺伝子の発現は、少なくとも1つの増殖及び／又は細胞周期再突入因子ポリペプチドをコードするヌクレオチドを発現する同じ又は異なるプロモーターによって調節され得る。自殺遺伝子は、細胞の負の選択を可能にする遺伝子である。本明細書に記載の方法では、自殺遺伝子が安全系として使用され、遺伝子が発現する細胞が選択剤の導入によって殺されることを可能にする。これは、組換え遺伝子が制御不能な細胞増殖を引き起こす変異を引き起こす場合に望ましい。単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (tk又はTK) 遺伝子、シトシンデアミナーゼ遺伝子、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、大腸菌 (E. coli) gpt 遺伝子、及び E. coli Deo 遺伝子 (例えば、Yazawa K, Fisher W E, Brunicardi F C: Current progress in suicide gene therapy for cancer. World J. Surg. (2002) 26 (7): 783-9) も参照されたい) を含む多数の自殺遺伝子系が同定されている。一実施形態において、自殺遺伝子は、TK 遺伝子である。一態様では、TK 遺伝子は、野生型 TK 遺伝子である。他の態様において、TK 遺伝子は、遺伝子の変異型、例えば、sr23tk である。TK タンパク質を発現する細胞は、ガンシクロビルを使用して殺すことができる。別の実施形態において、テトラサイクリン活性化タンパク質をコードする核酸及び自殺遺伝子は、1つのプロモーターによって調節される。

【0136】

A. 核酸ベクター

1. ウイルスベクター

適切なウイルスベクターには、ウイルスベクター (例えば、ワクシニアウイルス; ポリオウイルス; アデノウイルス (例えば、Li et al. (1994) Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 2543-2549; Borrás et al. (1999) Gene Ther 6: 515-524; Li and Davidson, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 7700-7704; Sakamoto et al. (1999) Hum Gene Ther 5: 1088-1097; WO94/12649; WO93/03769; WO93/19191; WO94/28938; WO95/11984、及び WO95/00655); アデノ随伴ウイルス (例えば、Ali et al. (1998) Hum Gene Ther 9 (1): 81-86, 1998, Flannery et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 6916-6921; Bennett et al. (1997) Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 2857-2863; Jomary et al. (1997) Gene Ther 4: 683-690; Rolling et al. (1999), Hum Gene Ther 10: 641-648; Ali et al. (1996) Hum Mol Genet. 5: 591-594; WO93/09239, Samulski et al. (1989) J. Vir. 63: 3822-3828; Mendelson et al. (1988) Virology 166: 154-165; 及び Flotte et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10613-10617; SV40; 単純ヘルペスウイルス; ヒト免疫不全ウイルス (例えば、Miyoshi et al.

(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:10319-10323; Takahashi et al. (1999) J. Virol 73:7812-7816); レトロウイルスベクター (例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、及びラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳がんウイルスなどのレトロウイルス由来のベクター) などが含まれるが、これらに限定されない。多数の適切な発現ベクターが当業者に知られており、多くは市販されている。以下のベクターは、真核細胞についての例として提供されている: pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40 (Pharmacia)、及び pAd (Life Technologies)。しかしながら、本開示の細胞と適合する限り、任意の他のベクターを使用することができる。

10

【0137】

特定のウイルスが細胞に感染したり、受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に侵入したり、ウイルス遺伝子を安定かつ効率的に発現したりする能力により、外来核酸を細胞 (哺乳動物細胞など) に移入する魅力的な候補となっている。ウイルスベクターは、目的のポリペプチドの発現のためのプロモーターなどの制御配列を含むことができる。多くのウイルスベクターは宿主細胞ゲノムに組み込まれるが、必要に応じて、そのような組み込みを可能にするセグメントを削除又は改変して、そのような組み込みを防ぐことができる。更に、いくつかの実施形態において、ベクターは哺乳動物の複製起点を含まない。転写因子をコードする核酸を選択された細胞に送達するために使用できるウイルスベクターの非限定的な例を以下に記載する。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、複製欠損ウイルスに由来する。

20

【0138】

一般に、他の有用なウイルスベクターは、非必須遺伝子が目的のポリペプチドで置換されている非細胞変性真核ウイルスに基づいている。非細胞変性ウイルスには特定のレトロウイルスが含まれ、その生活環にはゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写とそれに続くプロウイルスの宿主細胞DNAへの組み込みが含まれる。一般に、レトロウイルスは複製欠損性である (例えば、所望の転写物の合成を指示することはできるが、感染性粒子を製造することはできない)。そのような遺伝的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、一般に、インビボでのポリヌクレオチドの高効率な形質導入に有用である。

30

【0139】

いくつかの実施形態において、リプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドは、特異的結合リガンドを発現するように操作された感染性ウイルス内に収容することができる。したがってウイルス粒子は、標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達する。いくつかの実施形態において、ウイルスは、特定のウイルス指向性を付与するように修飾され、例えば、ウイルスは、線維芽細胞、心臓細胞、又はより具体的には心臓線維芽細胞 (CF) に優先的に感染する。AAVの場合、カプシドタンパク質を変異させてウイルスベクターの指向性を改変することができる。レンチウイルスの場合、異なるエンベロープタンパク質を使用することで指向性を修飾できる。これは「シュードタイピング」として知られている。

40

【0140】

a. レトロウイルスベクター

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。レトロウイルスは、その遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大量の外来遺伝物質を移入し、広範囲の種及び細胞型に感染し、特別な細胞株にパッケージングされることができる (Miller et al., Am. J. Clin. Oncol., 15 (3): 216-221, 1992)。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、宿主細胞ゲノムに組み込まれないように改変される。

【0141】

組換えレトロウイルスは、標的細胞への侵入を助けるウイルスポリペプチド (例えば、

50

レトロウイルスenv)を含み得る。そのようなウイルスポリペプチドは、例えば、米国特許第5,449,614号など、当技術分野で十分に確立されている。ウイルスポリペプチドは、元の宿主種以外の細胞を含む、複数の種に由来する細胞への侵入を助ける両指向性ウイルスポリペプチド、例えば、両指向性envであり得る。ウイルスポリペプチドは、元の宿主種以外の細胞への侵入を助ける異種指向性ウイルスポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、ウイルスポリペプチドは、元の宿主種の細胞への侵入を助ける同種指向性ウイルスポリペプチド、例えば、同種指向性envである。

【0142】

レトロウイルスの細胞への侵入を助けることができるウイルスポリペプチドの例には、MMLV両指向性env、MMLV同種指向性env、MMLV異種指向性env、水疱性口内炎ウイルス-gタンパク質(VSV-g)、HIV-1env、テナガザル白血病ウイルス(GALV)env、RD114、FeLV-C、FeLV-B、MLV10A1env遺伝子、及びキメラを含むそれらのバリエーションが含まれるが、これらに限定されない。Yee et al. (1994) *Methods Cell Biol*, Pt A:99-112 (VSV-G); 米国特許第5,449,614号。場合によっては、ウイルスポリペプチドは、遺伝子修飾されて、発現を促進するか、又は受容体への結合を増強する。

【0143】

レトロウイルス構築物は、一連のレトロウイルス、例えば、MMLV、HIV-1、SIV、FIV、又は本明細書に記載の別のレトロウイルスに由来し得る。レトロウイルス構築物は、特定のウイルスの2つ以上の複製サイクルに必要な全てのウイルスポリペプチドをコードし得る。場合によっては、ウイルス侵入の効率は、他の因子又は他のウイルスポリペプチドの添加によって改善される。他の場合では、レトロウイルス構築物によってコードされるウイルスポリペプチドは、2つ以上の複製サイクルを支持しない(例えば、米国特許第6,872,528号)。このような状況では、他の因子又は他のウイルスポリペプチドの添加は、ウイルスの侵入を促進するのに役立つ。例示的な一実施形態において、組換えレトロウイルスは、VSV-gポリペプチドを含むが、HIV-1envポリペプチドを含まないHIV-1ウイルスである。

【0144】

レトロウイルス構築物は、プロモーター、マルチクロニング部位、及び／又は耐性遺伝子を含み得る。プロモーターの例には、CMV、SV40、EFla、 β -アクチン、レトロウイルスLTRプロモーター、及び誘導性プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。レトロウイルス構築物はまた、パッケージングシグナル(例えば、MFGベクターに由来するパッケージングシグナル;psiパッケージングシグナル)を含み得る。当技術分野で知られているいくつかのレトロウイルス構築物の例には、pMX、pBabeX又はそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。Onishi et al. (1996) *Experimental Hematology*, 24:324-329. 場合によっては、レトロウイルス構築物は、自己不活化レンチウイルスベクター(SIN)ベクターである。Miyoshi et al. (1998) *J. Virol* 72(10):8150-8157. 場合によっては、レトロウイルス構築物は、LLCG、LS-CG、CL-CG、CS-CG、CLG又はMFGである。Miyoshi et al. (1998) *J. Virol* 72(10):8150-8157; Onishi et al. (1996) *Experimental Hematology*, 24:324-329; Riviere et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:6733-6737.

【0145】

レトロウイルスベクターは、いくつかのウイルス配列の代わりに核酸(例えば、目的のポリペプチド又はRNAをコードするもの)をウイルスゲノムに挿入して、複製欠損ウイルスを生成することによって構築することができる。ビリオンを産生するために、gag、pol、及びenv遺伝子を含むが、LTR及びパッケージング成分を含有しない

パッケージング細胞系が構築される (Mann et al., Cell 33: 153-159, 1983)。レトロウイルスLTR及びパッケージング配列とともに、cDNAを含む組換えプラスミドが特別な細胞株に導入されると (例えば、リン酸カルシウム沈殿によって)、パッケージング配列により、組換えプラスミドのRNA転写物のウイルス粒子へのパッケージ化が可能となり、その後、培地に分泌される (Nicolas and Rubinstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986; Mann et al., Cell, 33: 153-159, 1983)。次いで、組換えレトロウイルスを含む培地を収集し、任意選択的に、濃縮し、遺伝子移入に使用する。レトロウイルスベクターは、様々な種類の細胞に感染することができる。しかし、組み込み及び安定した発現は、典型的には、宿主細胞の分裂を伴う (Paskind et al., Virology, 67: 242-248, 1975)。

10

【0146】

b. アデノウイルスベクター

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。アデノウイルスの遺伝子構成には、約36 kbの線状の二本鎖DNAウイルスが含まれており、アデノウイルスDNAの大きな断片を7 kbまでの外来配列で置換することができる (Grunhaus et al., Seminar in Virology 200 (2): 535-546, 1992)。リプログラミング因子は、アデノウイルス補助トランスフェクションを使用して細胞に導入することができる。アデノウイルス共役系を用いた細胞系でのトランスフェクション効率の増加が報告されている (Kelleher and Vos, Biotechniques, 17 (6): 1110-7, 1994; Cotten et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89 (13): 6094-6098, 1992; Curriel, Nat Immun, 13 (2-3): 141-64, 1994)。

20

【0147】

c. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、AAVベクターである。AAVは、高い統合頻度を有し、非分裂細胞に感染可能であるため、魅力的なベクターシステムである。そのため、例えば、組織培養又はインビボにおける哺乳動物細胞へのポリヌクレオチドの送達に有用である (Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158: 97-129, 1992)。rAAVベクターの生成及び使用に関する詳細は、米国特許第5,139,941号及び第4,797,368号に記載されており、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0148】

AAVは複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは長さが約4.7 kbで、2つの145ヌクレオチド逆方向末端反復 (ITR) を含む。AAVには複数の血清型がある。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は知られている。例えば、AAV-1の完全なゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_002077で提供され、AAV-2の完全なゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001401及びSrivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983)で提供され、AAV-3の完全なゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_1829で提供され、AAV-4の完全なゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001829で提供され、AAV-5ゲノムはGenBankアクセッション番号AF085716で提供され、AAV-6の完全なゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001862で提供され、AAV-7及びAAV-8ゲノムの

40

50

少なくとも一部は、それぞれ GenBank アクセション番号 AX753246 及び AX753249 で提供され、AAV-9 ゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78:6381-6388 (2004) で提供され、AAV-10 ゲノムは、Moll. Ther., 13(1):67-76 (2006) で提供され、並びに AAV-11 ゲノムは、Virology, 330(2):375-383 (2004) で提供される。AAV rh.74 ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 9,434,928 号で提供される。ウイルス DNA の複製 (rep)、カプシド形成／パッケージング、及び宿主細胞の染色体統合を指示するシス作用配列は、AAV ITR 内に含まれている。3つの AAV プロモーター (相対的なマップ位置から p5、p19、及び p40 と命名される) は、rep 及び cap 遺伝子をコードする 2つの AAV 内部オーブンリーディングフレームの発現を駆動する。2つの rep プロモーター (p5 及び p19) は、単一の AAV イントロン (ヌクレオチド 2107 及び 2227) の異なるスプライシングと相まって、rep 遺伝子から 4つの rep タンパク質 (rep78、rep68、rep52、及び rep40) の産生をもたらす。rep タンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を持っている。cap 遺伝子は、p40 プロモーターから発現し、3つのカプシドタンパク質 VP1、VP2、及び VP3 をコードする。代替的なスプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連するカプシドタンパク質の産生に関与している。単一のコンセンサスポリアデニル化部位は、AAV ゲノムのマップ位置 95 に位置する。AAV の生活環及び遺伝学は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158:97-129 (1992) で概説されている。

10

20

【0149】

AAV は、遺伝子療法などで外来 DNA を細胞に送達するためのベクターとして魅力的な独自の機能を備えている。培養における細胞の AAV 感染は非細胞変性であり、ヒト及び他の動物の自然感染はサイレントで無症候性である。更に、AAV は多くの哺乳動物細胞に感染し、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を可能とする。更に、AAV は、ゆっくりと分裂している細胞と分裂していない細胞に形質導入し、それらの細胞の寿命にわたって、転写的に活性な核エピソーム (染色体外エレメント) として本質的に持続することができる。AAV プロウイルスゲノムは、プラスミドにクローン化された DNA として挿入されるため、組換えゲノムの構築が可能となる。更に、AAV の複製及びゲノムのカプシド形成を指示するシグナルは AAV ゲノムの ITR 内に含有されているため、ゲノムの内部の約 4.3 kb の一部又は全て (複製及び構造カプシドタンパク質、rep-cap をコードする) は、外来 DNA で置換されてもよい。AAV ベクターを生成するために、rep 及び cap タンパク質をトランスで提供することができる。AAV のもう 1つの重要な特徴は、非常に安定した強力なウイルスであることである。アデノウイルスの不活性化に使用される条件 (56~65℃で数時間) に容易に耐えられるため、AAV の冷蔵保存はあまり重要ではない。AAV は凍結乾燥することもできる。最後に、AAV 感染細胞は、重複感染に耐性がない。

30

【0150】

rAAV ゲノム中の AAV DNA は、AAV 血清型 AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、及び AAV rh74 を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスを誘導することができる任意の AAV 血清型に由来し得る。シュードタイプ化 rAAV の産生は、例えば、WO01/83692 に開示されている。他の型の rAAV バリエーション、例えば、カプシド変異を有する rAAV も企図される。様々な AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列が当技術分野で知られている。本開示の AAV ベクターには、血清型 AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV39、AAV43、AAV.rh74、及び AAV.rh8 の AAV ベクターが含まれる。例示的な AAV ベクターは、US7,105,345 号; US15/782,980 号; US7,259,151 号;

40

50

US 6, 962, 815号; US 7, 718, 424号; US 6, 984, 517号; US 7, 718, 424号; US 6, 156, 303号; US 8, 524, 446号; US 7, 790, 449号; US 7, 906, 111号; US 9, 737, 618号; 米国出願第15/433, 322号; US 7, 198, 951号で提供されており、それぞれが参照によりその全体が組み込まれる。

【0151】

いくつかの実施形態において、AAV発現ベクターは、標的化を強化するためにシュードタイプ化される。遺伝子移入を促進し、線維芽細胞での発現を維持するには、AAV5、AAV7、及びAAV8を使用できる。場合によっては、AAV2ゲノムは、Balaji et al. J Surg Res. 2013 Sep; 184 (1): 691-698で記載されているように、シュードタイプ化ベクターAAV2/5、AAV2/7、及びAAV2/8をそれぞれ生成するカプシドへパッケージングされる。いくつかの実施形態において、AAV9は、Piras et al. Gene Therapy 23: 469-478 (2016)に記載されているように、筋線維芽細胞様系統における発現を標的とするために使用され得る。いくつかの実施形態において、AAV1、AAV6、又はAAV9が使用され、いくつかの実施形態において、AAVは、Asokari et al. Hum Gene Ther. 2013 Nov; 24 (11): 906-913; Pozsgai et al. Mol Ther. 2017 Apr 5; 25 (4): 855-869; Kotterman, M. A. and D. V. Schaffer (2014) Engineering Adeno-Associated Viruses for Clinical Gene Therapy. Nature Reviews Genetics, 15: 445-451; 及びUS 2016/0340393 A1、Schaffer et alで記載されているように操作される。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、US 2018/0066285 A1に記載されているように、標的細胞の感染性を高めるように操作されたAAVである。

【0152】

d. レンチウイルスベクター

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスは複雑なレトロウイルスであり、一般的なレトロウイルス遺伝子gag、pol、及びenvに加えて、調節機能又は構造機能を持つ他の遺伝子を含んでいる。レンチウイルスベクターに関する情報は、例えば、Naldini et al., Science 272 (5259): 263-267, 1996、Zufferey et al., Nat Biotechnol 15 (9): 871-875, 1997、Blomer et al., J Virol. 71 (9): 6641-6649, 1997、米国特許第6,013,516号及び第5,994,136号に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。レンチウイルスのいくつかの例には、ヒト免疫不全ウイルス: HIV-1、HIV-2、及びサル免疫不全ウイルス: SIVが含まれる。レンチウイルスベクターは、HIV病毒性遺伝子を弱毒化することによって生成されている。例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、及びnefは、ベクターを生物学的に安全にするために削除される。利用されるレンチウイルスは、複製及び/又は統合に欠陥がある場合もある。

【0153】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、インビボ及びエクスピボの両方の遺伝子移入及び核酸配列の発現に使用することができる。例えば、適切な宿主細胞がパッケージング機能、すなわちgag、pol及びenv、並びにrev及びtatを担持する2つ以上のベクターでトランスフェクトされる、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルスは、米国特許第5,994,136号に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。当業者は、エンベロープタンパク質を特定の細胞型の受容体を標的とする抗体又は特定のリガンドと結合させることにより、組換えウイルスを標的とすることができる。例えば、標的特異的ベクターは、特定の標

的細胞型上の受容体に対するリガンドをコードする別の遺伝子とともに、目的の核酸セグメント（調節領域を含む）をウイルスベクターに挿入することによって生成することができる。

【0154】

レンチウイルスベクターは当技術分野で知られており全て参照により本明細書に組み込まれる、Naldini et al., (1996及び1998)、Zufferey et al., (1997)、Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号及び第5,994,136号を参照されたい。一般に、これらのベクターはプラスミドに基づくか、又はウイルスに基づくものであり、外来核酸の取り込み、選択、及び宿主細胞への核酸の移入に不可欠な配列を担持するように構成されている。場合によっては、レンチウイルスベクターは、pMD2.G、pRSV-rev、pMDLg-pRRE、及びpRRLE-GOIを含むがこれらに限定されない1つ以上のレンチウイルスパッケージングプラスミドと同時に細胞に導入される。レンチウイルスベクターを単独で、又はレンチウイルスパッケージングプラスミドと組み合わせて細胞に導入すると、レンチウイルスベクターがレンチウイルス粒子にパッケージ化される可能性がある。

【0155】

2. ウイルスベクターの作製方法

一般に、ウイルスベクターは、ウイルスDNA又はRNA構築物をプロデューサー細胞に導入することによって生成される。場合によっては、プロデューサー細胞は、外因性遺伝子を発現しない。他の場合において、プロデューサー細胞は、1つ以上の外因性遺伝子、例えば、1つ以上のgag、pol、若しくはenvポリペプチド及び／又は1つ以上のレトロウイルスgag、pol、若しくはenvポリペプチドをコードする遺伝子を含む「パッケージング細胞」である。レトロウイルスパッケージング細胞は、標的細胞への侵入を助けるウイルスポリペプチド、例えばVSV-gをコードする遺伝子を含み得る。場合によっては、パッケージング細胞は、1つ以上のレンチウイルスタンパク質、例えば、gag、pol、env、vpr、vpu、vpx、vif、tat、rev、又はnefをコードする遺伝子を含む。場合によっては、パッケージング細胞は、E1A又はE1Bなどのアデノウイルスタンパク質又は他のアデノウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む。例えば、パッケージング細胞によって供給されるタンパク質は、gag、pol、及びenvなどのレトロウイルス由来のタンパク質、gag、pol、env、vpr、vpu、vpx、vif、tat、rev、及びnefなどのレンチウイルス由来タンパク質、並びにE1A及びE1Bなどのアデノウイルス由来のタンパク質であり得る。多くの例において、パッケージング細胞は、ウイルスベクターが由来するウイルスとは異なるウイルスに由来するタンパク質を供給する。パッケージング細胞から組換えウイルスを作製する方法及びその使用法は十分に確立されている。例えば、米国特許第5,834,256号、第6,910,434号、第5,591,624号、第5,817,491号、第7,070,994号、及び第6,995,009号を参照されたい。

【0156】

パッケージング細胞株には、容易にトランスフェクト可能な細胞株が含まれるが、これらに限定されない。パッケージング細胞株は、293T細胞、NIH3T3、COS、又はHeLa細胞株に基づくことができる。パッケージング細胞は、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子が欠損しているウイルスベクタープラスミドをパッケージ化するためによく使用される。そのようなウイルスベクター又はプラスミドによってコードされるタンパク質を欠くタンパク質又はポリペプチドを供給できる任意の細胞を、パッケージング細胞として使用することができる。パッケージング細胞株の例には、プラチナーE (Plat-E)、プラチナーA (Plat-A)、BOSC23 (ATCC CRL11554)、及びBing (ATCC CRL11270)が含まれるが、これらに限定されない。Morita et al. (2000) Gene Therapy 7 (12): 1063-1066; Onishi et al. (1996) Experimental Hematology, 24: 324-32

9、米国特許第6,995,009号。市販のパッケージング株、例えば、Ampho-Pak 293細胞株、Eco-Pak 2-293細胞株、RetroPack PT67細胞株、及びレトロ-Xユニバーサルパッケージングシステム（全てClontechから入手可能）も有用である。

【0157】

3. プラスミド

ウイルスベクタープラスミド（又は構築物）には、pMXs、pMXs-IB、pMXs-puro、pMXs-neo（pMXs-IBは、pMXs-puroのピューロマイシン耐性遺伝子の代わりにブラストサイジン耐性遺伝子を運ぶベクター）Kimatura et al. (2003) Experimental Hematology 31:1007-1014; MFG Riviere et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., 92:6733-6737; pBabePuro; Morgenstern et al. (1990) Nucleic Acids Research 18:3587-3596; レトロウイルス系としてLL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG Miyoshi et al. (1998) J. Vir. 72:8150-8157等、及びアデノウイルス系としてpAdexl Kanegae et al. (1995) Nucleic Acids Research 23:3816-3821等が含まれる。例示的な実施形態において、レトロウイルス構築物は、ブラストサイジン（例えば、pMXs-IB）、ピューロマイシン（例えば、pMXs-puro、pBabePuro）、又はネオマイシン（例えば、pMXs-neo）を含む。Morgenstern et al. (1990) Nucleic Acids Research 18:3587-3596.

10

20

【0158】

いくつかの実施形態において、ウイルスベクター又はプラスミドは、リプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドを含むトランスポゾン又は転移エレメントを含む。piggyBac及びSleeping BeautyなどのDNAトランスポゾンを介したポリヌクレオチドの送達は、使いやすさ、より大きなカーゴの送達能力、臨床への迅速さ、及び生産コストの点で利点がある。特に、piggyBac DNAトランスポゾンは、ポリヌクレオチドの長期にわたる高レベルで安定した発現を可能にし、変異原性がありに低く、発がん性がなく、かつ完全に可逆的であるという潜在的な利点を提供する。

30

【0159】

4. 導入されたRNAからの直接翻訳

選択した細胞で1つ以上の導入遺伝子が一過性に発現する場合、目的の遺伝子をRNA分子として導入できる。これは、細胞の細胞質内でタンパク質に翻訳される。例えば、目的のタンパク質は、翻訳開始シグナル（例えば、強力なKozak翻訳開始シグナル）を含む5'非翻訳領域（UTR）、及びポリA末端の鑄型付加のためのオリゴ（dT）配列で終了する3'非翻訳領域が隣接する、ポリペプチドのためのオープンリーディングフレーム（ORF）を有する導入されたRNA分子から翻訳することができる。そのようなRNA分子は、ほとんどの発現ベクター及び発現カセットで利用されるプロモーター配列を有していない。RNA分子は、エレクトロポレーション、又はカチオン性ビヒクルと複合体を形成したRNAのエンドサイトーシスを含む様々な技術によって、選択された細胞に導入することができる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Warrenら、Cell Stem Cell 7:618-30 (2010)を参照されたい。

40

【0160】

タンパク質の翻訳は、特にRNA分子が修飾リボヌクレオチドの取り込みによって安定化されている場合、数日間持続する可能性がある。例えば、シチジンの場合は5-メチルシチジン（5mC）を、ウリジンの場合はシュドウリジン（psi）を組み込むと、導入されたRNAのインビボでの半減期が改善され、タンパク質の翻訳の増加に至る。高レベルの発現が所望される場合、又は数日以上が発現が所望される場合は、選択した細胞にRNAを繰り返し導入できる。タンパク質をコードするRNAはまた、5'キャップ、核

50

局在化シグナル、又はそれらの組み合わせを含むことができる。

【0161】

そのようなRNA分子は、例えば、3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G A
RCAキャップ類似体、アデノシン三リン酸及びグアノシン三リン酸、5-メチルシチジ
ン三リン酸及びシュドウリジン三リン酸を含むリボヌクレオチドブレンドを使用して、
目的のポリヌクレオチドについての鋳型のインビトロ転写によって、作成することができ
る。RNA分子をホスファターゼで処理して、細胞毒性を軽減することもできる。

【0162】

マイクロRNAは、細胞又は細胞集団に導入された発現カセット又は発現ベクターから
発現させることができる。あるいは、マイクロRNAは、例えば、リポソーム、マイクロ 10
ベシクル、又はエキソソームなどの送達ビヒクル中で、細胞に直接導入することができる
。単一のRNAは、タンパク質コード配列及びマイクロRNAの両方を含むことができる
。

【0163】

B. 非核酸ベクター

特定の実施形態において、ベクターは、参照により本明細書に組み込まれるKana s
t y R, Delivery materials for siRNA therap
e u t i c s Nat Mater. 12 (11) : 967-77 (2013) で記載さ
れているように、脂質粒子を含む。いくつかの実施形態において、脂質に基づくベクター 20
は、脂質ナノ粒子であり、これはサイズが約1~約100ナノメートルの脂質粒子である
。

【0164】

いくつかの実施形態において、脂質に基づくベクターは脂質又はリポソームである。リ
ポソームは、脂質二重層を含む人工の球状小胞である。

【0165】

いくつかの実施形態において、脂質に基づくベクターは、小さな核酸脂質粒子(SNALP) 30
である。SNALPは、核酸をカプセル化する小さな(直径200nm未満)脂質
に基づくナノ粒子で構成される。いくつかの実施形態において、SNALPは、siRN
AなどのRNA分子の送達に有用である。いくつかの実施形態において、SNALP製剤
は、心臓などの対象の特定の組織に核酸を送達する。

【0166】

いくつかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドは、ポリマーベクターを介
して送達される。いくつかの実施形態において、ポリマーベクターは、ポリマー又はポリ
マーソームである。ポリマーは、モノマーの任意の長い反復鎖を包含し、例えば、線状ポリ
マー、分岐ポリマー、デンドリマー、及び多糖類を含む。線状ポリマーは単一のモノマ
ー列で構成されるが、分岐ポリマーはモノマーの側鎖を含む。デンドリマーは分岐分子で
もあり、分子のコアの周りに対称的に配置される。多糖類は高分子炭水化物分子であり、
互いに結合した長い単糖単位で構成されている。ポリマーソームは、ベシクル膜を形成す
る合成両親媒性共重合体で構成される人工ベシクルであり、ベシクル膜内に中空又は水性
のコアを有する場合がある。 40

【0167】

1つ以上のリプログラミング因子をコードするDNA又はRNAを投与するためのビヒ
クルとして、様々なポリマーに基づくシステムを適合させることができる。ポリマーに基
づくシステムの例としては、ポリ(D, L-乳酸-コグリコール酸)(PLGA)、ポリ
(カプロラクトン)(PCL)、エチレン酢酸ビニルポリマー(EVA)、ポリ(乳酸)
(PLA)、ポリ(L-乳酸)(PLLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、ポリ
(L-乳酸-コグリコール酸)(PLPGA)、ポリ(D, L-ラクチド)(PDLA)
)、ポリ(L-ラクチド)(PLLA)、PLGA-b-ポリ(エチレングリコール)
-PLGA(PLGA-b-PEG-PLGA)、PLLA-b-PEG-PLLA、PLG
A-PEG-マレイミド(PLGA-PEG-mal)、ポリ(D, L-ラクチド)-コ 50

ーカプロラクトン)、ポリ(D, L-ラクチド-コ-カプロラクトン-コ-グリコリド)、ポリ(D, L-ラクチド-コ-PEO-コ-D, L-ラクチド)、ポリ(D, L-ラクチド-コ-PPO-コ-D, L-ラクチド)、ポリアルキルシアノアクラレート(cyanoacrylate)、ポリウレタン、ポリ-レーリジン(PLL)、メタクリル酸ヒドロキシプロピル(HPMA)、ポリエチレングリコール、ポリ-レーグルタミン酸、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリ(エステルアミド)、ポリアミド、ポリ(エステルエーテル)、ポリカーボネート; ポリエチレン及びポリプロピレンなどのポリアルキレン; ポリ(エチレングリコール)(PEG)などのポリアルキレングリコール; ポリアルキレンオキシド(PEO); ポリ(エチレンテレフタレート)などのポリアルキレンテレフタレート; ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルエーテル; ポリ(酢酸ビニル)などのポリビニルエステル; ポリ(塩化ビニル)(PVC)などのポリビニルハロゲン化物; ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、ポリスチレン(PS)、ポリウレタン; アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの誘導体化セルロース; アクリル酸のポリマー、例えば、ポリ(メチル(メタ)アクリレート)(PMMA)、ポリ(エチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソブチル(メタ)アクリレート)、ポリ(ヘキシル(メタ)アクリレート)、ポリ(イソデシル(メタ)アクリレート)、ポリ(ラウリル(メタ)アクリレート)、ポリ(フェニル(メタ)アクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)(ポリアクリル酸)並びにそれらのコポリマー及び混合物; ポリジオキサノン及びそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフマレート)、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポリ(オルト)エステル、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-コ-カプロラクトン)、トリメチレンカーボネート、ポリビニルピロリドン、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリ([β]-アミノエステル(PBAE)、及びポリホスホエステル、並びに2つ以上のそのようなポリマーのブレンド及び/又はブロックコポリマー、が挙げられる。ポリマーに基づくシステムはまた、シクロデキストリンポリマー(CDP)に基づくナノ粒子、例えば、CDP-アダマンタン(AD)-PEGコンジュゲート及びCDP-AD-PEG-トランスフェリンコンジュゲートなどを含み得る。

10

20

30

【0168】

いくつかの実施形態において、脂質に基づくベクターは、脂質カプセル化システムを含む。脂質カプセル化システムは、必要な循環時間及び生分解特性を提供するだけでなく、望ましい組織分布及び細胞侵入特性を促進するように設計できる。脂質カプセル化は、逆ミセルを含み、かつ/又は例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,193,334号に記載されるように、ポリマーマトリックスを更に含み得る。いくつかの実施形態において、粒子は、優先的な方法を含む、組織への粒子の送達を増強する親油性送達化合物を含む。そのような化合物は、US2013/0158021号に開示されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような化合物は、一般に、親油性基及び共役アミノ酸又はペプチド(線状又は環状ペプチドを含む)、及びそれらの異性体を含み得る。いくつかの実施形態において、脂質カプセル化は、リン脂質、コレステロール、ポリエチレングリコール(PEG)脂質、及び親油性化合物のうちの1つ以上を含む。

40

【0169】

粒子は、脂質であろうとポリマーであろうと、あるいはその両方であろうと、インビボ核酸送達の特性を高めるのに有用な追加の成分を含むことができる(それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、US8,450,298及びUS2012/0251560に開示されている化合物を含む)。送達ビヒクルは、特定の組織に優先的に蓄積し、それによって組織標的化効果を提供することができるが、いくつかの実施形態において、送達ビヒクルは、少なくとも1つの細胞標的化リガンド又は組織標的化リガンドを更に含む。例

50

示的な標的化リガンドを含む機能化粒子は、US 2010/0303723 及び 2012/0156135 に開示されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0170】

送達ビヒクルは、必要な循環時間及び生分解特性を提供するだけでなく、本明細書に記載される送達システムの望ましい組織分布及び細胞侵入特性を促進するように設計できる。例えば、脂質粒子は、US 2011/0009641 に開示されているアミノ脂質を使用することができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0171】

脂質又はポリマー粒子は、約 50 nm～約 5 μm の範囲のサイズ（例えば、平均サイズ）を有し得る。いくつかの実施形態において、粒子は、約 10 nm～約 100 μm、又は約 20 nm～約 50 μm、又は約 50 nm～約 5 μm、又は約 70 nm～約 500 nm、又は約 70 nm～約 200 nm、又は約 50 nm～約 100 nm の範囲である。免疫系による急速なクリアランスを回避するように粒子を選択することができる。特定の実施形態において、粒子は球形又は非球形であり得る。

【0172】

C. プロモーター及びエンハンサー

いくつかの実施形態において、リプログラミング因子をコードする核酸は、プロモーター及び／又はエンハンサーに作動可能に連結されて、リプログラミング因子の発現を促進することができる。利用される宿主／ベクター系に応じて、構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含む、多数の好適な転写及び翻訳制御エレメントのうちのいずれかを発現ベクターにおいて使用することができる（例えば、Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153: 516-544）。

【0173】

ポリヌクレオチドのそれぞれに対して別個のプロモーター及び／又はエンハンサーを使用することができる。いくつかの実施形態において、同じプロモーター及び／又はエンハンサーが、単一のオープンリーディングフレーム内の 2 つ以上のポリヌクレオチドに使用される。遺伝エレメントのこの構成を使用するベクターは、「ポリシストロン性」と呼ばれる。ポリシストロン性ベクターの一例は、2A 領域によって連結された 2 つ以上のポリヌクレオチドを含む単一のオープンリーディングフレームに作動可能に連結されたエンハンサー及びプロモーターを含み、それによってオープンリーディングフレームの発現により、複数のポリペプチドが同時に翻訳的に生成される。2A 領域は、コドンスキッピングによって複数のポリペプチド配列の生成を仲介すると考えられている。しかしながら、本開示はまた、翻訳後切断を利用して、同じポリヌクレオチドから目的の 2 つ以上の遺伝子に対するポリペプチドを生成するポリシストロン性ベクターにも関する。例示的な 2A 配列、ベクター、及び関連する方法は、参照により本明細書に組み込まれる US 2004/0265955 A1 に提供されている。本開示の他のポリシストロン性ベクターは、内部プロモーター、スプライシング、再開始、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、タンパク質分解性切断可能部位（例えば、フサゲン）、及び遺伝子の融合を利用する。

【0174】

適切な真核生物プロモーター（真核細胞において機能的なプロモーター）の非限定的な例には、CMV、前初期 CMV、HSV チミジンキナーゼ、初期及び後期 SV40、レトロウイルス由来の長い末端反復 (LTR)、及びマウスメタロチオネイン-1 が含まれる。いくつかの実施形態において、心臓特異的発現を与えることができるプロモーターが使用される。適切な心臓特異的プロモーターの非限定的な例には、デスミン (Des)、α-ミオシン重鎖 (α-MHC)、ミオシン軽鎖 2 (MLC-2)、心筋トロポニン T (cTnT)、及び心筋トロポニン C (cTnC) が含まれる。適切なニューロン特異的プロモーターの非限定的な例には、シナプシン I (SYN)、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II、チューブリンアルファ I、ニューロン特異的エノラーゼ及

10

20

30

40

50

び血小板由来増殖因子ベータ鎖プロモーター、並びにサイトメガロウイルスエンハンサー（E）をそれらのニューロン特異的プロモーターに融合することによるハイブリッドプロモーターが含まれる。

【0175】

発現リプログラミング因子を駆動するための適切なプロモーターの例には、レトロウイルスの長い末端反復（LTR）エレメント；CMV、HSV1-TK、SV40、EF-1a、 β -アクチン、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）などの構成的プロモーター；Tetオペレーターエレメントを含有するものなどの誘導性プロモーター；心臓特異的プロモーター、例えば、デスミン（Des）、 α -ミオシン重鎖（ α -MHC）、ミオシン軽鎖2（MLC-2）、心筋トロポニンT（cTnT）、及び心筋トロポニンC（cTnC）；神経特異的プロモーター、例えば、ネスチン、ニューロン核（NeuN）、微小管関連タンパク質2（MAP2）、ベータIIIチューブリン、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、オリゴデンドロサイト系統（Olig2）、及びグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）；並びに膵臓特異的プロモーター、例えば、Pax4、Nkx2.2、Ngn3、インスリン、グルカゴン、及びソマトスタチンが含まれるが、これらに限定されない。

【0176】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、細胞型特異的転写調節因子（TRE）に作動可能に連結され、TREはプロモーター及びエンハンサーを含む。適切なTREには、以下の遺伝子：ミオシン軽鎖2、 α -ミオシン重鎖、AE3、心臓トロポニンC、及び心臓アクチン、に由来するTREが含まれるが、これらに限定されない。Franz et al. (1997) Cardiovasc. Res. 35: 560-566; Robbins et al. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 752: 492-505; Linn et al. (1995) Circ. Res. 76: 584-591; Parmacek et al. (1994) Cell. Biol. 14: 1870-1885; Hunter et al. (1993) Hypertension 22: 608-617; 及び Sartorelli et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4047-4051.

【0177】

プロモーターは、遺伝子又は核酸セグメントと天然に関連するものであり得る。同様に、RNA（例えば、マイクロRNA）の場合、プロモーターは、マイクロRNA遺伝子（例えば、miRNA-302遺伝子）と天然に関連するものであり得る。そのような天然に関連するプロモーターは「天然プロモーター」と呼ぶことができ、コードセグメント及び／又はエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得ることができる。同様に、エンハンサーは、核酸配列と天然に関連するものであり得る。ただし、エンハンサーは、その配列の下流又は上流のいずれかに配置できる。

【0178】

あるいは、コード核酸セグメントを組換えプロモーター又は異種プロモーターの制御下に配置することによって、特定の利点を得られ、これらのプロモーターは、その天然の環境における核酸と通常は関連していないプロモーターを指す。組換え又は異種エンハンサーはまた、その天然環境において核酸配列と通常関連していないエンハンサーを指す。そのようなプロモーター又はエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーター又はエンハンサー、及び任意の他の原核細胞、ウイルス細胞、又は真核細胞から単離されたプロモーター又はエンハンサー、及び「天然に存在しない」プロモーター又はエンハンサー、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、及び／又は発現を変化させる変異を含むプロモーター又はエンハンサーが含まれ得る。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に生成することに加えて、配列は、本明細書に開示された組成物と関連して、PCR（商標）を含む組換えクローニング及び／又は核酸増幅技術を使用して生成されてもよい（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたい）。

【0179】

利用されるプロモーターは、構成的、誘導可能、発生段階特異的、組織特異的であるか、及び／又は核酸セグメントの高レベル発現を指示する適切な条件下で有用であり得る。例えば、プロモーターは、CMVプロモーター、CMVサイトメガロウイルス前初期プロモーター、CAGプロモーター、EF-1 α プロモーター、HSV1-TKプロモーター、SV40プロモーター、 β -アクチンプロモーター、PGKプロモーター、又はそれらの組み合わせなどの構成的プロモーターであり得る。使用できる真核生物プロモーターの例には、構成的プロモーター、例えば、CMV、SV40及びRSVプロモーターなどのウイルスプロモーター、並びに制御可能なプロモーター、例えば、tetプロモーター、hsp70プロモーター及びCREによって調節される合成プロモーターなどの誘導性又は抑制性プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、プロモーターは、CMV初期エンハンサーエレメント、ニワトリベータアクチンプロモーター、及びSV-40イントロンを含む。いくつかの実施形態において、プロモーターは、CMV初期エンハンサーエレメント、ニワトリベータアクチンプロモーター、及びCMVイントロンを含む。使用できるプロモーターの他の例には、ヒトEF1 α 伸長因子プロモーター、CMVサイトメガロウイルス前初期プロモーター、CAGニワトリアルブミンプロモーター、本明細書に記載のウイルスベクターのいずれかに関連するウイルスプロモーター、又は本明細書に記載のプロモーターのいずれかに相同な（例えば、別の種からの）プロモーターが含まれる。使用できる原核プロモーターの例には、SP6、T7、T5、tac、bla、trp、gal、lac、又はマルトースプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0180】

いくつかの実施形態において、内部リボソーム侵入部位（IRES）エレメントを使用して、多重遺伝子又はポリシストロン性メッセージを作成することができる。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存翻訳のリボソーム走査モデルを迂回し、内部部位で翻訳を開始することができる（Pelletier and Sonenberg, Nature 334 (6180): 320-325 (1988)）。ピコルナウイルス科の2つのメンバー（ポリオ及び脳心筋炎）からのIRESエレメントが記載されており（Pelletier and Sonenberg, Nature 334 (6180): 320-325 (1988)）、並びに哺乳類のメッセージからのIRESも記載されている（Macejak & Samow, Nature 353: 90-94 (1991)）。IRESエレメントは、異種オープンリーディングフレームに連結できる。複数のオープンリーディングフレームをまとめて転写することができ、それぞれがIRESで区切られ、ポリシストロン性メッセージが作成される。IRESエレメントのおかげで、効率的な翻訳のためにリボソームが各オープンリーディングフレームにアクセスできる。複数の遺伝子は、単一のメッセージを転写する単一のプロモーター／エンハンサーを使用して効率的に発現することができる（参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,925,565号及び第5,935,819号を参照されたい）。

30

【0181】

D. 細胞へのベクター送達

ウイルスベクターは、リン酸カルシウム法、リポフェクション法（例えば、Feigner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 7413-7417）、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション、Fugeneトランスフェクション、ヌクレオフェクションなどを含むがこれらに限定されない当該技術分野で知られている任意の方法、及び本明細書に記載の任意の方法によって、標的細胞（例えば、線維芽細胞）へ導入することができる。

40

【0182】

手順の例としては、例えば、Stadtfield and Hochedlinger, Nature Methods 6 (5): 329-330 (2009); Yusa et al., Nat. Methods 6: 363-369 (2009); Woltjen

50

, et al., Nature 458, 766-770 (9 Apr. 2009)) によって記載されたものが挙げられる。そのような方法には、DNA送達、例えば、任意選択的にはフゲン6 (Roche) 若しくはリポフェクタミン (Invitrogen) を用いるエキソビポトランスフェクションなどによる (例えば、Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989, Nabel & Baltimore, Nature 326:711-713, 1987); マイクロインジェクション (例えば、Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099, 1985; 米国特許第5, 789, 215号、参照によりその全てが本明細書に取り込まれる) を含む注射による (例えば、米国特許第. 5, 994, 624号、第5, 981, 274号、第5, 945, 100号、第5, 780, 448号、第5, 736, 524号、第5, 702, 932号、第5, 656, 610号、第5, 589, 466号、及び第5, 580, 859号、これらの各々は参照による本明細書に取り込まれる); エレクトロポレーションによる (例えば、参照によりその全てが本明細書に取り込まれる米国特許第5, 384, 253号、Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986; Potter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984); リン酸カルシウム沈降による (例えば、Graham & Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973; Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987; Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990); DEAE-デキストラン、続いてポリエチレングリコールの使用による (例えば、Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985); 直接超音波ローディング (例えば、Fechheimer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987); リボソーム媒介トランスフェクションによる (例えば、Nicolau & Sene, Biochim Biophys. Acta, 721:185-190, 1982, Fralley et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987, Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980, Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989, Kato et al., Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991)、受容体媒介トランスフェクション (例えば、Wu and Wu, Biochemistry, 27:887-892, 1988; Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987); カチオン性ビヒクルと複合体化したRNAのエンドサイトーシスによる (Warren et al., Cell Stem Cell 7:618-30 (2010)); 及びこのような方法の任意の組み合わせによるDNA送達が含まれるが、これらに限定されない。前述の参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0183】

核酸分子がインビトロ又はインビボで宿主に導入されるかに応じて、本開示の核酸分子を細胞に導入するために様々な技術を使用することができる。このような技術には、核酸分子-リン酸カルシウム沈殿物のトランスフェクション、DEAEに関連する核酸分子のトランスフェクション、目的の核酸分子を含む前述のウイルスによるトランスフェクション又は感染、リボソーム媒介トランスフェクションなどが含まれる。その他の例としては、Sigma-AldrichによるN-TER (商標) ナノ粒子トランスフェクションシステム; Polyplus Transfectionによる昆虫細胞のためのFectoFly (商標) トランスフェクション試薬; Polysciences, Inc. によるポリエチレンアミン「Max»; Cosmo Bio Co. Ltd. によるユニークな非ウイルス性トランスフェクションツール; InvitrogenによるLipofectamine (商標); StratageneによるSatisFfection (商

標) トランスフェクション試薬; InvitrogenによるLipofectamine (商標) トランスフェクション試薬; Roche Applied ScienceによるFuGENE (登録商標) HDトランスフェクション試薬; Polyplus TransfectionによるGMP適合in vivo-jetPEI (商標) トランスフェクション試薬; 及びNovagenによるInsect Gene Juice (登録商標) トランスフェクション試薬が含まれる。

【0184】

IV. 治療用組成物

マイクロRNAと、ASCL1及びMYOCDのうちの一方又は両方とを使用したリプログラミングは、場合によっては他のリプログラミング戦略と組み合わせて、結果を改善することができる。いくつかの実施形態において、標的組織又は開始細胞は、OCT4ポリペプチドを発現するか、又は発現するように誘導される。標的組織又は開始細胞は、それぞれ、1つ以上のWNTアゴニスト、GSK3阻害剤、TGF- β 阻害剤、エピジェネティック修飾因子、アデニルシクラーゼアゴニスト、OCT4発現活性化因子、及びそれらの任意の組み合わせを含有するリプログラミング組成物で処理又はインキュベートすることができる。組成物は、そのような薬剤の少なくとも2つ、又はそのような薬剤の少なくとも3つ、又はそのような薬剤の少なくとも4つ、又はそのような薬剤の少なくとも5つ、又はそのような薬剤の少なくとも6つを含むことができる。例えば、組成物は、SB431542 (ALK4/5/7阻害剤)、CHIR99021 (GSK3阻害剤)、パルネート (LSD1/KDM1阻害剤、トラニルシプロミンとも呼ばれる)、及びフォルスコリン (アデニルシクラーゼ活性化剤) を含むことができる。

10

20

【0185】

特定の実施形態において、リプログラミングは、1つ以上の抗炎症剤、例えば、抗炎症性ステロイド又は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の投与によって増強される。

【0186】

本発明で使用するための抗炎症性ステロイドには、コルチコステロイド、特にグルココルチコイド活性を有するもの、例えばデキサメタゾン及びプレドニゾンが含まれる。本発明で使用するための非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) は、一般に、炎症及び疼痛を引き起こすプロスタグランジン、シクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) 及び/又はシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の産生を遮断することによって作用する。従来のNSAIDは、COX-1及びCOX-2の両方を遮断することで機能する。COX-2選択的阻害剤は、COX-2酵素のみを遮断する。特定の実施形態において、NSAIDは、COX-2選択的阻害剤、例えば、セレコキシブ (Celebrex (登録商標))、ロフェコキシブ (Vioxx)、及びバルデコキシブ (Extra) である。特定の実施形態において、抗炎症剤は、NSAIDプロスタグランジン阻害剤、例えば、ピロキシカムである。

30

【0187】

組成物を調製するために、ベクター及び/又は細胞が生成され、ベクター又は細胞は、必要又は所望に応じて、精製される。ベクター、細胞、及び/又は他の薬剤は、薬学的に許容される担体に懸濁することができる。組成物が細胞を含有せずに化合物のみを含有する場合、組成物は凍結乾燥することができる。これらの化合物及び細胞は、適切な濃度に調整することができ、任意選択的に他の薬剤と組み合わせることができる。単位用量に含まれる所与の化合物及び/又は他の薬剤の絶対重量は、大きく異なり得る。投与量及び投与回数は、当業者によって最適化され得る。

40

【0188】

例えば、約 10^2 ~ 10^{10} のベクターゲノム (vg) を投与することができる。いくつかの実施形態において、用量は、少なくとも約 10^2 vg、約 10^3 vg、約 10^4 vg、約 10^5 vg、約 10^6 vg、約 10^7 vg、約 10^8 vg、約 10^9 vg、約 10^{10} vg、又はそれ以上のベクターゲノムである。いくつかの実施形態において、用量は、約 10^2 vg、約 10^3 vg、約 10^4 vg、約 10^5 vg、約 10^6

50

v g、約 10^7 v g、約 10^8 v g、約 10^9 v g、約 10^9 v g、約 10^{10} v g、又はそれ以上のベクターゲノムである。

【0189】

治療に使用されるベクター及び細胞の量は、選択された特定の担体だけでなく、投与経路、治療される状態の性質、並びに患者の年齢及び状態によっても変化することが理解される。最終的には、担当の医療提供者が適切な投与量を決定することができる。薬学的組成物は、細胞の有無にかかわらず、投与するための単一の単位剤形で、各化合物の適切な比率で製剤化することができる。細胞又はベクターは、別々に提供されるか、化合物組成物の液体溶液と混合されるか、又は別々に投与され得る。

【0190】

化合物及び／又はリプログラムされた細胞を含有する1つ以上の適切な単位剤形は、非経口（皮下、静脈内、筋肉内及び腹腔内を含む）、頭蓋内、脊髄内、経口、直腸、皮膚、経皮、胸腔内、肺内及び鼻腔内（呼吸器）経路を含む様々な経路によって投与することができる。

【0191】

本発明のベクターは、水溶液、懸濁液、錠剤、硬又は軟ゼラチンカプセル、並びにリボソーム、及び成形ポリマーゲルなどの他の徐放製剤を含む多くの形態で調製され得る。ベクターの投与は、多くの場合、水溶液での非経口又は局所投与を伴う。

【0192】

液体医薬組成物は、例えば、水性又は油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ又はエリキシル、使用前に水又は他の適切なビヒクルで再構成するための乾燥粉末の形態であり得る。このような液体医薬組成物は、懸濁剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油を含み得る）、又は防腐剤などの従来の添加剤を含み得る。

【0193】

ベクターは、非経口投与（例えば、ボーラス注射又は持続注入などの注射による）用に製剤化することができ、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量注入容器、又は防腐剤を添加した複数回投与容器中の単位剤形で提供することができる。薬学的組成物は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、又はエマルジョンの形態をとることができ、懸濁剤、安定化剤、及び／又は分散剤などの製剤化剤を含むことができる。適切な担体には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、及び当技術分野で一般的に使用される他の材料が含まれる。

【0194】

組成物はまた、心臓の疾患、状態、及び損傷の治療に有用な薬剤などの他の成分、例えば、抗凝固剤（例えば、ダルテパリン（フラグミン）、ダナパロイド（オルガラン）、エノキサパリン（ロベノックス）、ヘパリン、チンザパリン（イノヘップ）、及び／又はワーファリン（クマジン））、抗血小板薬（例えば、アスピリン、チクロピジン、クロピドグレル、又はジピリダモール）、アンギオテンシン変換酵素阻害剤（例えば、ベナゼプリル（ロテンシン）、カプトプリル（カポテン）、エナラプリル（バソテック）、フォシノプリル（モノプリル）、リシノプリル（プリニビル、ゼストリル）、モエキシプリル（ユニバスク）、ペリンドプリル（アセオン）、クイナプリル（アキュプリル）、ラミプリル（アルテース）、及び／又はトランドラプリル（マビック））、アンギオテンシンII受容体遮断薬（例えば、カンデサルタン（アタカンド）、エプロサルタン（テベテン）、イルベサルタン（アバプロ）、ロサルタン（コザール）、テルミサルタン（ミカルディス）、及び／又はバルサルタン（ディオバン））、ベータ遮断薬（例えば、アセブトロール（セクトラル）、アテノロール（テノーミン）、ベタキソロール（ケルロン）、ピソプロロール／ヒドロクロロチアジド（ジアック）、ピソプロロール（ゼベタ）、カルテオロール（カルトロール）、メトプロロール（ロプレッサ）、トプロロール（XL）、ナドロール（コルガード）、プロプラノロール（インデラル）、ソタロール（ベタペース）、及び／又はチモロール（プロカドレン））、カルシウムチャネル遮断薬（例えば、アムロジピン（ノルバスク、ロトレル）、ベプリジル（バスコール）、ジルチアゼム（カルジゼム、チアザツ

10

20

30

40

50

ク)、フェロジピン(プレンジル)、ニフェジピン(アダラット、プロカルジア)、ニモジピン(ニモトップ)、ニソルジピン(スラー)、ベラパミル(キャラン、イソプチン、ベレラン)、利尿薬(例えば、アミロライド(ミダモール)、ブメタニド(ブメックス)、クロロチアニド(ジウリル)、クロルタリドン(ハイグロトン)、フロセミド(ラシックス)、ヒドロクロロチアジド(エシドリックス、ヒドロジウリル)、インダパミド(ロゾール)、及び/又はスピロノラクトン(アルダクトン))、血管拡張剤(例えば、二硝酸イソソルビド(イソジル)、ネシリチド(ナトレコール)、ヒドララジン(アプレゾリン)、硝酸塩及び/又はミノキシジル)、スタチン、ニコチン酸、ゲムフィブロジル、クロフィブラート、ジゴキシン、ジギトキシン、ラノキシン、又はそれらの任意の組み合わせを含むこともできる。

10

【0195】

抗菌剤、抗微生物剤、抗ウイルス剤、生物学的応答修飾剤、成長因子、免疫修飾モジュレーター、モノクローナル抗体、及び/又は防腐剤などの追加の薬剤も含めることができる。本発明の組成物はまた、他の形態の療法と組み合わせて使用され得る。

【0196】

本明細書に記載のウイルスベクター及び非ウイルスベクターは、疾患又は障害を治療するために対象に投与することができる。そのような組成物は、投与の目的が外傷性損傷に応答するためであるか、又はより持続的な治療目的のためであるかにかかわらず、例えば、レシピエントの生理学的状態、及び当業者に知られている他の要因に応じて、単回投与、複数回投与、連続的、又は断続的な方法であり得る。本発明の化合物及び組成物の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であり得るか、又は一連の間隔をあけた用量であり得る。局所投与及び全身投与の両方が考えられる。いくつかの実施形態において、ウイルス又は非ウイルスベクターの局所送達が達成される。いくつかの実施形態において、細胞及び/又はベクターの局所送達を使用して、心臓内で細胞の集団を生成する。いくつかの実施形態において、そのような局在化した集団は、心臓の「ペースメーカー細胞」として機能する。

20

【0197】

V. リプログラミング方法

本明細書に記載のように、標的組織又は細胞へのウイルス又は非ウイルスベクターの投与により、標的細胞(例えば、非心筋細胞)を心臓系統(例えば、心筋細胞系統)にインビボでリプログラムすることができる。いくつかの実施形態において、標的細胞は線維芽細胞である。いくつかの実施形態において、標的細胞は心臓線維芽細胞(CF)細胞である。

30

【0198】

いくつかの実施形態において、例えば、ASC L1、MYOCD、MEF2C、TBX5、BAF60C、ESRRG、GATA4、GATA6、HAND2、IRX4、ISLL、MEF2C、MESP1、MESP2、NKX2.5、SRF、TBX20、ZFPM2、miR-133、又はそれらの任意の組み合わせである1つ以上のリプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクターが対象に投与される。いくつかの実施形態において、リプログラミング因子は、ASC L1、MYOCD、及び表1から選択されるマイクロRNA、又はそれらの任意の組み合わせの群から選択される。特定の実施形態において、リプログラミング因子は、ASC L1及びMYOCD(MyA)、並びに表1から選択されるマイクロRNAである。特定の実施形態において、リプログラミング因子は、ASC L1、MYOCD、MEF2C及びTBX5(MyAMT)、並びに表1から選択されるマイクロRNAである。いくつかの実施形態において、リプログラミング因子は、GATA4、MEF2C、及びTBX5(GMT)、並びに表1から選択されるマイクロRNAである。他の特定の実施形態において、リプログラミング因子は、MYOCD、MEF2C、及びTBX5(すなわち、MyMT)、並びに表1から選択されるマイクロRNAである。他の特定の実施形態において、リプログラミング因子は、GATA4、MEF2C、TBX5、及びMYOCD(すなわち、4F)、並びに表

40

50

1 から選択されるマイクロRNAである。他の実施形態において、リプログラミング因子は、GATA4、MEF2C、及びTBX5、ESRRG、MYOCD、ZFPM2、及びMESP1（すなわち、7F）、並びに表1から選択されるマイクロRNAである。

【0199】

いくつかの実施形態において、ベクターは、心筋細胞のより多くのマーカー遺伝子、例えば、TNNT2、ACTN2、ATP2A2、MYH6、RYR2、MYH7、ACTCL、MYBPC3、PIN、MB、LMOD2、MYL2、MY13、COX6A2、ATP5AL、TTN、TNNI3、PDK4、MYCZ2、CACNALC、SCN5A、MYOCD、及びNPPAの発現を誘導又は抑制する。

【0200】

VI. 治療方法

本明細書に記載のベクターは、心疾患又は心臓病を有する対象を治療する方法において使用することができる。「治療すること」又は「治療を必要とする状態若しくは対象の治療」とは、（1）症状の軽減などの臨床結果を含む、有益な結果若しくは望ましい結果を得るために手順を踏むこと、（2）疾患を予防すること、例えば、疾患の素因があるかもしれないが、疾患の症状をまだ経験していない、若しくは示していない患者において、疾患の臨床症状が発症しないようにすること、（3）疾患を阻害すること、例えば、疾患の発症若しくはその臨床症状を阻止若しくは軽減すること、（4）疾患を緩和すること、例えば、疾患若しくはその臨床症状の退行を引き起こすこと、又は（5）病気を遅らせること、を指す。本発明の目的のために、有益な又は望ましい臨床結果には、誘導心筋細胞の生成及び／又は心筋再生の促進が含まれるが、これらに限定されない。

【0201】

本開示の組成物、細胞、及び方法を用いた治療を必要とする対象には、先天性心疾患を有する個体、変性筋疾患を患っている個体、虚血性心臓組織をもたらす状態を患っている個体（例えば、冠動脈疾患を有する個体）などが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの例において、方法は、変性筋疾患又は状態（例えば、家族性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、又は虚血性心筋症を伴う冠動脈疾患）を治療するのに有用である。いくつかの例では、主題の方法は、心臓又は心血管の疾患又は障害、例えば、心血管疾患、動脈瘤、狭心症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、脳血管障害（脳卒中）、心血管疾患、先天性心疾患、うっ血性心不全、心筋炎、冠動脈弁膜症、拡張型動脈疾患、拡張機能障害、心内膜炎、高い血圧（高血圧）、心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、虚血性心筋症を伴う冠動脈疾患、僧帽弁逸脱症、心筋梗塞（心臓発作）、又は静脈血栓塞栓症を有する個人を治療するのに有用である。

【0202】

本開示の組成物、細胞及び方法を用いた治療に適した対象には、虚血性心臓組織などをもたらす状態を含むがこれに限定されない心臓状態を有する個体（例えば、冠動脈疾患を有する個体）（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、家畜哺乳動物などの哺乳動物対象、マウス、ラットなどの実験用の非ヒト哺乳動物対象）が含まれる。

【0203】

いくつかの例では、治療に適した個体は、心臓又は心血管の疾患又は状態、例えば、心血管疾患、動脈瘤、狭心症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、脳血管障害（脳卒中）、心血管疾患、先天性心疾患、うっ血性心不全、心筋炎、冠動脈弁膜症、拡張型動脈疾患、拡張機能障害、心内膜炎、高い血圧（高血圧）、心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、虚血性心筋症を伴う冠動脈疾患、僧帽弁逸脱症、心筋梗塞（心臓発作）、又は静脈血栓塞栓症を患っている。いくつかの例では、主題の方法による治療に適した個体には、変性筋疾患、例えば、家族性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、又は虚血性心筋症を結果として伴う冠動脈疾患を有する個体が含まれる。

【0204】

本開示の組成物、細胞、及び方法を用いた治療を必要とする対象には、先天性心疾患を有する個体、変性筋疾患を患っている個体、虚血性心臓組織をもたらす状態を患っている

10

20

30

40

50

個体（例えば、冠動脈疾患を有する個体）などが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの例において、方法は、変性筋疾患又は状態（例えば、家族性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、又は虚血性心筋症を伴う冠動脈疾患）を治療するのに有用である。いくつかの例では、主題の方法は、心臓又は心血管の疾患又は障害、例えば、心血管疾患、動脈瘤、狭心症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、脳血管障害（脳卒中）、心血管疾患、先天性心疾患、うっ血性心不全、心筋炎、冠動脈弁膜症、拡張型動脈疾患、拡張機能障害、心内膜炎、高い血圧（高血圧）、心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、虚血性心筋症を伴う冠動脈疾患、僧帽弁逸脱症、心筋梗塞（心臓発作）、又は静脈血栓塞栓症を有する個人を治療するのに有用である。

【0205】

本開示の組成物、細胞及び方法を用いた治療に適した対象には、虚血性心臓組織などをもたらす状態を含むがこれに限定されない心臓状態を有する個体（例えば、冠動脈疾患を有する個体）（例えば、ヒト、非ヒト霊長類などの哺乳動物対象、マウス、ラットなどの実験用の非ヒト哺乳動物対象）が含まれる。いくつかの例では、治療に適した個体は、心臓又は心血管の疾患又は状態、例えば、心血管疾患、動脈瘤、狭心症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、脳血管障害（脳卒中）、心血管疾患、先天性心疾患、うっ血性心不全、心筋炎、冠動脈弁膜症、拡張型動脈疾患、拡張機能障害、心内膜炎、高い血圧（高血圧）、心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、虚血性心筋症を伴う冠動脈疾患、僧帽弁逸脱症、心筋梗塞（心臓発作）、又は静脈血栓塞栓症を患っている。いくつかの例では、主題の方法による治療に適した個体には、変性筋疾患、例えば、家族性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、又は虚血性心筋症を結果として伴う冠動脈疾患を有する個体が含まれる。

【0206】

リプログラムされた細胞及び／又は組成物（リプログラムされた細胞を伴う又は伴わない本明細書に記載の化合物のいずれかを含有する）を使用して治療することができる疾患及び状態の例には、任意の心臓病又は心機能不全が含まれる。治療可能な疾患及び状態には、遺伝的欠陥、身体的損傷、環境による損傷又は条件付け、悪い健康状態、肥満、及びその他の疾患リスクの結果として生じるものが含まれる。

【0207】

虚血性心筋症は、冠動脈疾患（心臓の表面の冠動脈がアテローム性動脈硬化によって狭窄又は閉塞する疾患）によって引き起こされる慢性疾患である。冠動脈疾患は、酸素が豊富な血液が十分に心筋へ供給されない心虚血のエピソードを引き起こすことがよくある。

【0208】

非虚血性心筋症は、一般に、主に臨床的及び病理学的特徴に基づいて、拡張型心筋症、肥大型心筋症、並びに拘束型及び浸潤型心筋症の3つの群に分類される。

【0209】

別の実施形態において、心臓病は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー及びエメリー・ドレイフス型拡張型心筋症などの遺伝病である。

【0210】

例えば、心臓病は、うっ血性心不全、心筋梗塞、心虚血、心筋炎、及び不整脈からなる群から選択することができる。いくつかの実施形態において、対象は、糖尿病を有する。いくつかの実施形態において、対象は、糖尿病を有さない。いくつかの実施形態において、対象は、糖尿病性心筋症を患っている。

【0211】

療法のために、組換えウイルス、非ウイルスベクター、及び／又は薬学的組成物を局所的又は全身的に投与することができる。リプログラムされた細胞集団は、注射、カテーテル、移植可能な装置などによって導入することができる。組換えウイルス又はリプログラムされた細胞の集団は、細胞に悪影響を及ぼさない生理学的に許容される任意の賦形剤又は担体中で投与することができる。例えば、組換えウイルス、非ウイルスベクター、及び／又は薬学的組成物は、静脈内又は心臓内経路（例えば、心外膜又は心筋内）を介して投

与することができる。本開示の組換えウイルス、非ウイルスベクター、心筋細胞及び薬学的組成物（例えば、ベクターを含む組成物）を対象、特にヒト対象に投与する方法は、薬学的組成物（例えば、ウイルスベクターを含む組成物）又は細胞の、対象の標的部位への注射、移植、又は注入を含む。注射には、筋肉への直接注射が含まれる場合があり、注入には、血管内注入が含まれる場合がある。ベクター又は薬学的組成物は、対象への薬学的組成物又は細胞の注射又は移植による導入を容易にする送達装置に挿入することができる。このような送達装置には、チューブ、例えばカテーテルが含まれる。チューブは更にニードル、例えばシリンジを含むことができ、それを通して本発明の細胞を対象の所望の位置に導入することができる。いくつかの実施形態において、薬学的組成物又は細胞は、例えば、Tang et al. Cardiac cell-integrated microneedle patch for treating myocardial infarction. Science Advances 28 Nov 2018: Vol. 4, no. 11, eaat9365に記載されているように、マイクロニードルパッチによって送達される。

10

【0212】

いくつかの態様では、本開示のウイルスベクターを使用して、それを必要とする対象を治療することができる。いくつかの実施形態において、組換えウイルスは、それを必要とする対象に投与することができ、対象への組換えウイルスの投与は、対象の心血管疾患を治療する。

20

【0213】

組換えウイルスは、局所的又は全身的に投与することができる。組換えウイルスは、適切なカプシドタンパク質を選択するか、又は別のウイルス型のタンパク質でウイルスをシェードタイピングすることにより、特定の細胞型を標的とするように操作することができる。ウイルス粒子組成物の様々な治療的投与レジメン及び投与量の適合性を決定するために、組換えウイルスを最初に適切な動物モデルで試験することができる。あるレベルでは、組換えウイルスは、インビボで標的細胞に感染する能力について評価される。組換えウイルスを評価して、標的組織に移動するかどうか、宿主で免疫応答を誘導するかどうか、又は投与する組換えウイルスの適切な数又は投与量を決定することもできる。治療する疾患に応じて、組換えウイルスが免疫応答を生じることが望ましい場合もあれば、望ましくない場合もある。一般に、ウイルス粒子の反復投与が必要な場合、ウイルス粒子が免疫原性でないことが有利である。試験目的で、ウイルス粒子組成物を免疫不全動物（ヌードマウス、又は化学的若しくは照射により免疫不全にされた動物など）に投与することができる。感染期間後に標的組織又は細胞を採取し、評価して、組織又は細胞が感染しているかどうか、及び標的組織又は細胞で所望の表現型（誘導心筋細胞など）が誘導されているかどうかを判断することができる。

30

【0214】

組換えウイルスは、心臓への直接注射又は心臓カテーテル法を含むがこれらに限定されない様々な経路によって投与することができる。あるいは、組換えウイルスは、静脈内注入などによって全身投与することができる。直接注射を使用する場合は、開心術又は低侵襲手術のいずれかによって行うことができる。場合によっては、組換えウイルスは、注射又は注入によって心膜腔に送達される。注射又は注入された組換えウイルスは、様々な方法で追跡できる。例えば、検出可能な標識（緑色蛍光タンパク質又はベータガラクトシダーゼなど）で標識された、又はそれを発現する組換えウイルスは、容易に検出することができる。組換えウイルスは、標的細胞が表面発現タンパク質又は蛍光タンパク質などのマーカータンパク質を発現するように操作することができる。あるいは、組換えウイルスによる標的細胞の感染は、試験に利用される動物によって発現されない細胞マーカーの発現によって検出することができる（例えば、細胞を実験動物に注入する際のヒト特異的抗原）。標的細胞の存在及び表現型は、蛍光顕微鏡法（例えば、緑色蛍光タンパク質若しくはベータガラクトシダーゼについて）、免疫組織化学法（例えば、ヒト抗原に対する抗体を使用して）、ELISA（ヒト抗原に対する抗体を使用して）、又は心臓の表現型を示す

40

50

R N A に特異的な増幅を引き起こすプライマー及びハイブリダイゼーション条件を使用した R T - P C R 分析によって評価することができる。

【0215】

V I I I . キット

本明細書に記載の組成物、化合物及び／又は薬剤のいずれかを含む様々なキットが本明細書に記載されている。キットは、本明細書に記載の任意の化合物を、乾燥形態又は水和形態で、一緒に混合するか、又は個別に包装した状態で含むことができる。本明細書に記載の化合物及び／又は薬剤は、別個のバイアル、ボトル又は他の容器に別々に包装することができる。あるいは、本明細書に記載の化合物及び／又は薬剤のいずれも、単一の組成物として、又は一緒に若しくは別々に使用できる2つ以上の組成物として、一緒に包装することができる。

10

【0216】

ベクターは、送達装置の形で任意のキット内に提供することができる。あるいは、送達装置をキットに別個に含めることができ、説明書には、対象への投与前に送達装置を組み立てる方法を記載することができる。

【0217】

キットは、本明細書の先行するセクション又は他の部分の組成物について、本明細書に記載されている補足因子又は薬物のいずれかなどの他の因子を提供することができる。

【0218】

以下の非限定的な実施例は、本発明の開発に関与する実験作業のいくつかを説明する。

20

【実施例】

【0219】

実施例 1

この実施例では、2つの導入遺伝子、ミオカルジン (M Y O C D) 及び A S C L 1 (まとめて「M y A」と呼ばれる) を発現するアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを使用した。M y A リプログラミングカクテルは、インビボ及びインビトロでの心臓線維芽細胞の誘導心筋細胞 (i C M) へのダイレクトリプログラミングを促進する (データは示さず)。M y Δ 3 (配列番号 16) と呼ばれるこのベクターで使用されるミオカルジン導入遺伝子は、遺伝子機能に明らかな影響を与えることなく遺伝子のサイズを縮小する内部欠失を有する (データは示さず)。

30

【0220】

本発明者らは、非標的細胞 (心筋細胞) で M y A の発現を抑制しながら、標的細胞 (心臓線維芽細胞) で M y A を発現するマイクロ R N A に基づくシステムを設計した。試験ベクターは、M y Δ 3 - 2 A - A S C L 1 導入遺伝子をコードするポリヌクレオチドの 3' U T R において、選択された様々なマイクロ R N A の各々に対するマイクロ R N A 結合部位を含むように操作された。マイクロ R N A 結合部位は、選択されたマイクロ R N A を発現する細胞における M y A の発現を抑制することを意図していた。以下に説明するいくつかの実験では、M y A の代わりに緑色蛍光タンパク質 (G F P) レポーターシステムを使用した。

【0221】

40

m i R - 1 結合部位

2つの m i R - 1 結合部位を試験した: m i R - 1 の完全な相補体 (m i R 1 __ 4)、及び 3' U T R 又はヒト M Y O C D のネイティブ m i R - 1 結合部位 (M y m i R 1 __ 4)。各結合部位について、シード配列 (下線) が変異したミスマッチ負対照が生成された (m i R 1 __ 4 m u t、M y m i R 1 __ 4 m u t)。

50

【化 3】

miR1-1/1-2	3'-UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU-5' (配列番号 141)
miR1_4	5'-AUACAUAUCUUCUUUACA <u>U</u> CCA-3' (配列番号 142)
miR1_4mut	5'-AUACAUAUCUUCUUUACA <u>gag</u> CA-3' (配列番号 143)
MymiR1_4	5'-ACGAUGUCAUUUAACA <u>U</u> CCG-3' (配列番号 144)
MymiR1_4mut	5'-ACGAUGUCAUUUAACA <u>gag</u> CG-3' (配列番号 145)

【0222】

10

各ベクターにおいて、試験される結合部位は、AAVCAG-GFPベクターの3'UTRにタンデムで4回挿入された。ベクターはAAVにパッケージ化され、iPSC-CMの感染に使用された。iPSC-CMは、心筋細胞を形成するように誘導された多能性幹細胞であり、培養中の初代心筋細胞を維持することは現実的ではないため、実験で使用する。GFP-miR1_4及びGFP-MymiR1_4は両方とも、対照構築物GFP-miR1_4mut及びGFP-MymiR1_4mutと比較して、iPSC-CMにおいて抑制された(図2A)。GFPレポーターの発現は、ヒト心臓線維芽細胞(hCF)細胞において依然として観察された(図2B)。miR1_4及びGFP-MymiR1_4構築物は、それらのmiR-1 mismatches対照とほぼ同じレベルでGFPレポーターを発現した。したがって、miR-1マイクロRNA結合部位は、CF細胞と比較してCM細胞における導入遺伝子の発現を選択的に抑制する。

20

【0223】

miR1_4及びmiR1_4mut配列をAAVMY^{Δ3}Aカセットの3'UTRに挿入して、ミオカルジン及びASCL1(MYA)の組み合わせによる心筋細胞のリプログラミングに対する結合部位の影響を評価した。リプログラミング効率は、心筋細胞の表現型に関連する7つの遺伝子の発現を測定することによって決定された。表5のデータは、ベクターによるhCF細胞の形質導入後7日目に、miR-1マイクロRNA結合部位を含むMYAベクターがCM表現型の発現を誘導したことを実証している。

【表 5】

表5

30

	MYOCD	ASCL1	CASQ2	ACTC1	NPPA	PLN	TNNT2
ベクターなし	1.0	1.0	1.1	1.0	1.4	1.0	1.00
My ^{Δ3} A	1911.1	21794.4	885.4	545.7	35551.0	158.5	665.3
My ^{Δ3} A_miR1_4mut	2221.0	25468.2	805.3	491.3	25610.8	202.1	688.4
My ^{Δ3} A_miR1_4	1353.8	13703.1	82.8	81.7	1954.6	45.7	163.4

【0224】

40

試験ベクターMy^{Δ3}A_miR1_4は、My^{Δ3}A_miR1_4mut又は親My^{Δ3}Aカセットよりも5~10倍低い効力でリプログラミング活性を示した。

【0225】

次に、1、2、又は3つのmiR-1結合部位を持つベクターを、4つのmiR-1結合部位を持つベクターと比較した。表6に示すように、miR-1結合部位を1つだけ持つベクターMy^{Δ3}A_miR1_1は、My^{Δ3}A_miR1_4よりも高い効力を示したが、親My^{Δ3}Aベクターよりも低い効力のままだった。

50

【表 6 - 1】

表 6

	ASCL1	MYOCD	NPPA	TNNT2
ベクターなし	0.7	0.9	1.4	1.2
	1.5	1.1	1.3	0.9
My ^{Δ3} A	8295.8	2383.1	17204.8	625.5
	9270.1	2352.9	19162.1	598.4
My ^{Δ3} A_miR1_4mut	10747.8	3419.4	17009.0	594.1
	10243.2	2694.1	13668.2	583.5
My ^{Δ3} A_miR1_1	7523.6	2419.9	1113.9	217.0
	5419.9	1789.6	1320.8	163.8
My ^{Δ3} A_miR1_2	6882.7	1932.6	1292.5	170.5
	5126.6	1433.8	915.1	105.4
My ^{Δ3} A_miR1_3	4292.3	1628.4	554.4	139.2
	4796.4	1467.3	1010.8	127.5
My ^{Δ3} A_miR1_4	5258.8	1644.2	602.4	119.4
	5285.4	1498.5	690.0	114.2

10

20

【0226】

My^{Δ3}Aの3'UTR内の単一のmiR-1結合部位内のシード領域の外側に2つ(miR1_1mis2)又は3つ(miR1_1mis3)のミスマッチを含有する構築物を生成し、これらのmiR-1結合部位の標的化をそれを廃止することなく減少させた。

【化4】

miR-1 UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU(配列番号141)
miR1_1 AUACAUACUUCUUUACAUUCCA(配列番号142)
miR1_1mis2 AUACAUAGUUGUUUACAUUCCA(配列番号146)
miR1_1mis3 AUACAUAGUUGUCUACAUUCCA(配列番号147)

30

【0227】

これらの構築物は、My^{Δ3}A_miR1_1と比較してリプログラミング効力を増加させたが(表7)、心筋細胞における導入遺伝子発現は十分には抑制しなかった(図3)。

40

50

【表 6 - 2】

表 6

	ASCL1	MYOCD	CASQ2	NPPA	TNNT2
ベクターなし	1.1	1.0	1.2	2.6	1.1
My ^{Δ3} A	2675.0	1026.1	1053.5	23166.2	870.2
My ^{Δ3} A_miR1_4mut	2479.7	1116.7	742.7	15176.0	656.4
My ^{Δ3} A_miR1_1	1773.7	805.7	130.7	1823.3	213.6
My ^{Δ3} A_miR1_1mis2	1853.8	776.0	434.0	6980.6	422.4
My ^{Δ3} A_miR1_1mis3	2623.7	1007.5	515.3	9044.4	476.8

10

【0228】

miR-208a/b 結合部位

本発明者らは、My^{Δ3}Aによって誘導される心筋細胞のリプログラミングプロセス中に、マイクロRNA miR-1及びmiR-133の発現増加が、miR-208a/bの発現増加に先行することを観察した（図4）。マイクロRNA miR-208a/bはiPSC-CMで検出されたが、最大3週間のリプログラミングを受けているhCFでは検出されなかった。シード部位が変異したミスマッチ負対照ベクター（208__4mut）とともに、完全に相補的なmiR-208b結合部位（208__4）の4Xタンデムアレイを持つAAVCAG-GFPベクターが生成され、ヒトiPSC-CMの感染に使用された。GFP-208__4は、GFP-miR1__4と同様に導入遺伝子の発現を抑制した（図5A）。hCFでは、GFP-208__4及びGFP-208__4mutの両方が、GFP-miR1__4及びGFP-miR1__4mutと比較してより低いレベルで導入遺伝子を発現した（図5B）。My^{Δ3}A__208__4及びMy^{Δ3}A__208__4mutは両方とも、hCF細胞の形質導入の21日後のRNAマーカーの発現によって評価されるように、堅牢なリプログラミングを駆動することができた（表7及び図5C）。My^{Δ3}A__208__4及びMy^{Δ3}A__208__4mutは、同様のリプログラミング効力を示した。

20

30

【表 7】

表 7

	NPPA	TNNT2
ベクターなし	1.1	1.0
	1.9	1.0
My ^{Δ3} A	31900.1	108.4
	56894.4	169.6
My ^{Δ3} A_miR1_mut	59336.0	167.5
	43705.0	154.1
My ^{Δ3} A_miR1	1169.5	15.1
	1456.2	20.8
My ^{Δ3} A_miR208_mut	34120.0	114.0
	31381.7	112.5
My ^{Δ3} A_miR208	25148.6	109.1
	28183.4	105.5

40

50

【0229】

マウスにおけるインビボ試験

インビボ試験では、 $My^{\Delta 3}A_208_4$ を、野生型カプシド配列を持つAAV5カプシド、又は心臓線維芽細胞の感染性が高いバリエーションであるAAV5zカプシドのいずれかにパッケージングし（データは示さず）、心筋梗塞（MI）のLADライゲーションマウスモデルを使用してマウスで試験し、損傷時に心外膜にAAVベクターの注射を実施した。ベクター設計及び投与量を表8に要約する。

【表8】

表8

	群	用量	マウス数
1	AAV5:GFP	1.2×10^{11} GC	7
2	AAV5z:GFP	1.2×10^{11} GC	8
3	AAV5:My $^{\Delta 3}A$	1.2×10^{11} GC	15
4	AAV5:My $^{\Delta 3}A_208_4$	1.2×10^{11} GC	15
5	AAV5z:My $^{\Delta 3}A_208_4$	1.2×10^{11} GC	15

【0230】

有効性は、注射後2、4、6、及び8週目で心エコーによって評価された。3つの試験物質は全て、GFPをコードする対照と比較して、心機能（駆出率）を有意に維持した（図6A）。8週間後、3つの試験物質は、心機能（駆出率）を有意に維持したが、MyAとMyA+mIR-208結合部位ベクターの間でリプログラミング効率に統計的に有意な差はなかった（図6B）。AAV5:My $^{\Delta 3}A$ 及びAAV5:My $^{\Delta 3}A_208_4$ は、同じウイルスカプシドAAV5で送達された場合、MIにおいて同等に有効であった。

【0231】

代表的な顕微鏡写真（図6D）に示されるように、トリクローム染色による終末瘢痕分析及び心臓断面あたりの線維性組織のパーセンテージの定量化は、3つの処置群全てが瘢痕領域の有意な減少を示したことを示した（図6C）。

【0232】

ブタにおけるインビボ試験

ベクターは、ブタ心筋梗塞（MI）モデルで更に試験された。My $^{\Delta 3}A_208_4$ は、AAV5zカプシドにパッケージ化され、虚血性損傷を導入するための90分間のバルーン閉塞の28日後に、ブタの心臓の境界領域に心外膜注射された。並行して、各群が10匹の動物から構成されるように、梗塞したブタにも製剤緩衝液を注射した。心エコーは、注射後3週間、5週間、7週間、及び9週間で実施された。My $^{\Delta 3}A_208_4$ を投与されたブタは、注射後5週間、7週間、及び9週間で、対照と比較して、駆出率の有意な改善を示した（図7）。このように、心筋細胞を標的としないリプログラミングカクテルでの治療は、投与前のベースラインを上回る、心機能において平均10%の改善をもたらした。

【0233】

mIR-1及びmIR-208a/b結合部位の改善

2つの5'ヌクレオチド位置に置換を導入することにより、マイクロRNA結合部位で予測されるRNAヘアピンを破壊するmIR-208結合部位のバリエーションを試験し、結果を表9に示した。

10

20

30

40

50

【化 5】

miR-208b	UGUUUGGAAAACAAGCAGAAUA (配列番号 148)
miR208	ACAAACCUUUUGUUCGUCUUAU (配列番号 149)
miR208_melt	UGAAACCUUUUGUUCGUCUUAU (配列番号 150)
miR208_meltmut	UGAAACCUUUUGUUCGUGAGAU (配列番号 151)

【表 9】

表 9

	NPPA	TNNT2
ベクターなし	2.0	0.9
	1.2	1.2
My ^{Δ3} A	17101.6	1254.6
	18991.2	1458.7
My ^{Δ3} A_208_4mut	7866.3	759.6
	7967.1	805.7
My ^{Δ3} A_208_4	8299.2	821.6
	7008.7	805.3
My ^{Δ3} A_208_4meltmut	14532.9	1249.7
	17627.5	1247.2
My ^{Δ3} A_208_4melt	6688.9	724.4
	9748.2	797.4

【 0 2 3 4】

シード領域外の更なる配列バリエーションを試験して、iPSC-CMでの発現を抑制しながら、hCFでの導入遺伝子の発現を可能にし、リプログラミングの3週間後に高品質のiCMをもたらすマイクロRNA結合部位を特定した（表10を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 10

構築物	部位 数	ミスマッチ	iPSC- CMs	hCFs	iCMs	配列
miR1_4	4	0	-	+++	-/+	ATACATACTTCTTTACATTCCA(配列番号 152)
miR1_4mut	4	3 シード	+++	+++	+++	ATACATACTTCTTTACAgagCA(配列番号 153)
MymiR1_4	4	ネイティブ	-/+	+/>++	n.d.	ACGATGTCATTTAACATTCCG(配列番号 154)
MymiR1_4mut	4	3 シード	++	+/>++	n.d.	ACGATGTCATTTAACAgagCG(配 列番号 155)
miR1_1	1	0	-	+++	-/+	ATACATACTTCTTTACATTCCA(配列番号:156)
miR1_2	2	0	n.d.	n.d.	-/+	ATACATACTTCTTTACATTCCA(配列番号 157)
miR1_3	3	0	n.d.	n.d.	-/+	ATACATACTTCTTTACATTCCA(配列番号 158)
miR1_1mis2	1	2	+/>++	n.d.	+/>++	ATACATAGTTGTTACATTCCA(配列番号 159)
miR1_1mis3	1	3	+/>++	n.d.	+/>++	ATACATAGTTGTCTACATTCCA(配列番号 160)
miR1_1TB4	1	ネイティブ	+/>++	n.d.	+/>++	AATATGCACTGTACATTCCA(配 列番号 161)
208_4	4	0	-	++/>+++	++/>+++	ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT(配列番号 135)
208_4mut	4	2 シード	++/>+++	++/>+++	++/>+++	ACAAACCTTTTGTTCGTCgaAT(配列番号 162)
208_2	2	0	-	++/>+++	++/>+++	ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT (配列番号 135)
208_4melt	4	2	-	++/>+++	++/>+++	TGAAACCTTTTGTTCGTCTTAT(配列番号 137)
208_4mut3	4	3 シード	+++	+++	+++	TGAAACCTTTTGTTCGTgagAT(配 列番号 163)
208_moMEL1	4	3	+/>++	++/>+++	++/>+++	TGAAAGCTTTTGTTCGTCTTAT(配列番号 164)
208_moMEL2	4	4	++/>+++	++/>+++	++/>+++	TGATAGCTTTTGTTCGTCTTAT(配列番号 165)
208MED13	4	ネイティブ	-/+	+++	+++	AAAATATATGTAATCGTCTTAA(配列番号 136)

10

20

30

40

50

【表 10-2】

208_chim	4	4	+ / + +	++ / + + +	++ / + + +	ATACATACTTCGTTTCGTCTTAT(配列番号 166)
		理想的な結 果	-	+++	+++	

i P S C - C M = 以前に心筋細胞に分化した多能性幹細胞。

h C F = ヒト心臓線維芽細胞。

i C M = M y A をコードする A A V ベクターで 3 週間処理した、すなわち、心筋細胞への分化過程にあるヒト心臓線維芽細胞。

10

【0235】

これらのセットの m i R - 208 結合部位のいくつかについて、i P S C - C M における導入遺伝子発現を抑制する能力（図 8）、及び親ベクターと比較してインビトロでのリプログラミング効力を維持又は増加させる能力を試験した（表 9）。M E D 13 転写産物のネイティブ m i R - 208 標的化部位に基づく挿入である 208 M E D 13 は、良好に機能し、i P S C - C M 抑制を維持しながら、リプログラミングの効力を高めた。

【0236】

実施例 2

20

この実施例では、2つの導入遺伝子、内部欠失を伴うミオカルジン（M Y O C D）及び A S C L 1（M y Δ^3 A）、並びにマイクロRNA-133をコードするポリヌクレオチド（つまり、M y A 133の3因子の組み合わせ）を発現するアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを利用した。m i R - 133をコードするこの配列は、C A G プロモーターと M Y O C D（M y Δ^3 ）コード配列の間のイントロンに挿入される。

【0237】

表 11 に示されるように、M y Δ^3 A への m i R 133 の追加は、640k の M O I で A A V ベクターによる形質導入後 21 日目の心筋細胞の R N A 発現によって評価されるように、リプログラミングを増加させた。208__4 と 208 M E D 13 の両方のマイクロRNA結合部位は、ベクターのリプログラミング効果を保持しており、208 M E D 13 は 208__4 よりも良好な結果を示している。

30

【表 11】

表 11

	ASCL1	MYOCD	NPPA	TNNT2	CASQ2	MYH6	TNNC1
ベクターなし	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
My Δ^3 A	3263.2	480.8	93021.7	103.0	2807.8	284.2	166.7
My Δ^3 A_208_4	2260.6	360.3	45307.8	65.3	2184.6	153.8	96.0
My Δ^3 A_208MED13	2274.2	328.8	65595.4	82.2	2608.5	229.2	122.5
[133]-My Δ^3 A	2745.4	404.8	140836.9	116.9	4337.4	650.1	296.6
[133]-My Δ^3 A_208_4	2093.7	335.9	68343.5	87.8	3029.2	389.9	246.8
[133]-My Δ^3 A_208MED13	2452.8	391.3	107163.2	115.1	4008.7	584.9	324.6

40

【0238】

結果は、表 12 に示すように、独立して誘導された h C F 細胞株で 2 つの異なるウイルス用量を使用して確認された。

50

【表 1 2】

表 1 2

	ASCL1	MYOCD	NPPA	TNNT2	ACTC1	CASQ2	MYH6	TNNC1
INF なし	1.6	1.0	1.7	1.0	2.2	1.0	1.0	1.0
MOI 160K								
My ^{Δ3} A	11990.4	5005.5	129562.0	850.6	87606.8	2123.9	390.7	403.8
My ^{Δ3} A_208MED13	11601.3	4384.3	104344.4	668.1	73309.3	2059.4	473.7	370.6
[133]-My ^{Δ3} A	10749.2	4416.2	242293.2	862.8	94985.9	4116.0	1324.9	853.2
[133]-My ^{Δ3} A_208MED13	10272.2	4233.5	197659.7	653.3	80234.7	4196.3	1401.9	738.9
MOI 640K								
My ^{Δ3} A	14774.5	6651.8	148557.6	953.3	100463.3	2298.6	494.2	512.0
My ^{Δ3} A_208MED13	16895.8	6011.2	125222.6	838.6	85719.8	2217.3	487.5	465.3
[133]-My ^{Δ3} A	14441.0	5441.3	261500.1	1026.5	111517.6	5341.2	2362.0	1211.0
[133]-My ^{Δ3} A_208MED13	13431.2	5241.6	233383.7	766.9	98889.0	5019.7	2125.1	1014.1

【0 2 3 9】

m i R - 1 3 3 の追加により、多くの心臓マーカーの発現が、3 週間のインビトロリプログラミング後に、約 2 倍に増強された。m i R - 1 3 3 a を追加しても、M y ^{Δ3} A カセットと M y ^{Δ3} A _ 2 0 8 M E D 1 3 カセットの間で効力に差はなく、これは、m i R - 1 3 3 a の追加によってカセットが早期に抑制されなかったことを示している。

【0 2 4 0】

2 0 8 M E D 1 3 m i R - 2 0 8 マイクロRNA 結合部位を有する M y ^{Δ3} A 及び M y ^{Δ3} A + 1 3 3 ベクターを、虚血性損傷のラット L A D 結紮モデルで試験した。結紮の 2 週間後にウイルス注射を行い、処置動物を無作為化して、処置群間で同等のベースライン駆出率を確保した。図 9 に示されるデータは、全ての試験物質がビヒクル対照 (H B S S) と比較して駆出率を維持することを実証する (n = 1 0 ラット / 群)。カセットへの m i R - 1 3 3 a の包含とは無関係に、M y ^{Δ3} A と M y ^{Δ3} A _ 2 0 8 M E D 1 3 との間に有意差は識別できなかった。

【0 2 4 1】

材料及び方法

初代成体ヒト線維芽細胞の単離。成体ヒト心臓線維芽細胞 (A H C F) を単離するために、成体ヒト左心室を小片に切り刻み、心臓線維芽細胞消化培地 (1 0 μ g / m l のリペラーゼ T H、1 0 μ g / m l のリペラーゼ T M、1 単位 / m l の D N a s e I、0 . 0 1 % のボラキソマー) 中、3 7 ° C で 1 時間、消化させた。消化後、細胞を 7 0 μ M のストレナーを通して、5 0 m l のファルコンチューブにろ過した。1 2 0 0 × g で 5 分間スピンドウンすることにより細胞をペレット化し、線維芽細胞増殖培地中に入れた。培地は、2 日ごとに交換した。4 日後、ウイルス形質導入のために、A H C F を凍結又は再度プレートに播種した。

【0 2 4 2】

細胞のリプログラミング。インビトロ心臓リプログラミングのために、A H C F を培養皿又はプレートに 5 × 1 0 ³ / c m ² の密度で線維芽細胞増殖培地に播種した (- 1 日目)。細胞を播種した 1 日後 (0 日目)、線維芽細胞増殖培地を除去し、ウイルス培地を添加した。ウイルス形質導入の 1 日後 (1 日目)、ウイルス培地を、4 日目まで 2 日ごとに、4 部のダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) 及び 1 部の G i b c o (商標登録) 培地 1 9 9、1 0 % の F B S、1 % の非必須アミノ酸、1 % のペニシリン / ストレプトマイシンで構成される i C M 培地に交換した。4 日目に、培地を 7 5 % の i C M 培地並びに 2

5 %のRPMI及びB27に変更した。7日目に、培地を50 %のiCM及び50 %のRPMI+B27に変更した。11日目に、培地を25 %のiCM並びに75 %のRPMI及びB27に変更した。14日目に、培地を、21日目まで毎日、RPMI並びにB27及びFFV (10 ng/mlのrhFGF、15 ng/mlのrhFGF-10、及び5 ng/mlのrhVEGF) に交換した。

【0243】

免疫細胞化学。免疫細胞化学のために、細胞を4 %のパラホルムアルデヒドで20分間固定し、室温で30分間、0.1 %のTriton (登録商標) -X100で透過処理した。細胞をPBSで3回洗浄した後、1 %のウシ血清アルブミン (BSA) で1時間ブロッキングした。次に、細胞を、1:200希釈のマウスモノクローナル抗心臓トロポニンT (cTnT) 抗体 (Thermo Scientific、MA5-12960)、又は1 %のBSA中の1:200希釈のマウス抗 α -アクチニン抗体 (Sigma、A7811) で1時間でインキュベートした。PBSで3回洗浄した後、細胞を、1 %のBSA中の1:200希釈のロバ抗マウスAlexa Fluor 594 (Invitrogen、A21203) とともに1時間インキュベートした。次に、細胞イメージングマルチモードリーダー、Cytation (商標) 5 (BioTek) を使用して、細胞を画像化及び定量化した。

10

【0244】

定量化及び統計分析。全てのデータは、平均値の標準誤差 (SEM) を含む平均値として表示され、群当たり $n=2\sim3$ である。P値は、対応のない／二元配置t検定又は一元配置分散分析 (ANOVA) のいずれかで計算された。GraphPad Prism (登録商標) 7ソフトウェアパッケージ (GraphPad Software (商標)) を使用して、統計分析を行った。0.05未満のP値は、複数のペアワイズ比較に対して補正が行われた後、全ての場合で有意であるとみなされた。

20

【0245】

MI手術、AAVの心外膜注入、及び心エコー。マウスの手術は、9~10週齢のCHARLES RIVER (登録商標) CD-1 IGS雄マウスで実施された。マウスを、2.4 %のイソフルラン／97.6 %の酸素で麻酔し、加熱パッド (37℃) 上に仰臥位で置いた。動物に20ゲージの静脈内カテーテルを挿管し、マウス人工呼吸器 (MINI-VENT (商標)、Harvard Apparatus, Inc.) で換気した。MIは、左前下行枝 (LAD) を7-0プロレン縫合糸で永久的に結紮することによって誘発された。20 μ lのAAV (合計1.2E11 GC) を、組み込まれた29ゲージニードル (BD) を備えたインスリンシリンジを通して心筋に注射した。冠動脈閉塞後の白化した梗塞領域に基づいて、梗塞ゾーン (IZ) と境界ゾーン (BZ) との間の境界に沿って、全量を注射した。注射後、胸部を縫合糸で閉じた。全ての外科的処置は無菌条件下で行われた。ラット梗塞は上記のように生成されたが、ウイルス投与はLAD結紮の2週間後に行われ、合計3E11 GCに対して3回の30 μ lの注射が行われた。心機能は、VISUALSONICS (商標) VEVO (登録商標) 3100イメージングシステムを使用して、意識のあるマウスの2次元経胸壁心エコーによって評価された。心収縮機能の指標として、駆出率 (EF)、収縮末期容積 (ESV)、及び拡張末期容積 (EDV) を用いた。全てのブタの処置及び心エコーは、MattawanのCharles Riverで行われた。雄の去勢されたユカタンミニブタを、観察下で90分間バルーン閉塞し、閉塞から28日後に開胸心外膜注射を行った。試験物質又は製剤緩衝液は、それぞれ500 μ lの10回の注射で境界ゾーンに送達され、E14 GCの総用量が得られた。

30

40

【0246】

実施例3

内因性miR-208の存在下での様々な形態の非標的化構築物のmRNA及びタンパク質の安定性は、ヒトiPSC由来心筋細胞 (hiPSC-CM) で評価される。hiPSC-CMは、以下のカセットを含有するAAVに感染している。

【0247】

50

$My^{\Delta 3}A_{-208}$
 【0248】
 $My^{\Delta 3}A_{-208mut}$
 【0249】
 $My^{\Delta 3}A-CMVInt-133-MED13$
 【0250】
 $My^{\Delta 3}A-CMVInt-133-208$
 【0251】
 $My^{\Delta 3}A-CMVInt-208$
 【0252】

10

形質導入後4日目及び14日目に細胞を採取する。 $My^{\Delta 3}A$ 転写物のRNAレベルは、qRT-PCRによって測定される。ASCL1のタンパク質レベルは、ウェスタンブロットによって評価される。効果的な非標的化により、変異したmiR-208部位を含有する構築物と比較して、タンパク質レベルの低下がもたらされる。

【0253】

これらの同じ構築物のmRNA及びタンパク質の安定性も、様々なレベルのmiR-208に応じて評価される。内因性miR-208を発現しないHEK293細胞に、上記の構築物を感染させる。2日後、それらに、様々なレベルのmiR-208a又はmiR-208bをトランスフェクトさせる。トランスフェクション後4日目に細胞を採取する。 $My^{\Delta 3}A$ 転写物のRNAレベルは、qRT-PCRによって測定される。ASCL1

20

【0254】

様々な非標的化構築物からの発現も、インビボのブタモデルで評価される。以下の7つのカセットがAAVで作成される。

【表13】

番号	イントロン	導入遺伝子	miR-133	miR-208 結合部位
1	SV40	$My^{\Delta 3}A$	存在しない	完璧にマッチする
2	CMV	$My^{\Delta 3}A$	存在しない	完璧にマッチする
3	CMV	$My^{\Delta 3}A$	現在	完璧にマッチする
4	SV40	$My^{\Delta 3}A$	存在しない	Med13
5	CMV	$My^{\Delta 3}A$	存在しない	Med13
6	CMV	$My^{\Delta 3}A$	現在	Med13
7	CMV	$My^{\Delta 3}A$	現在	存在しない

30

【0255】

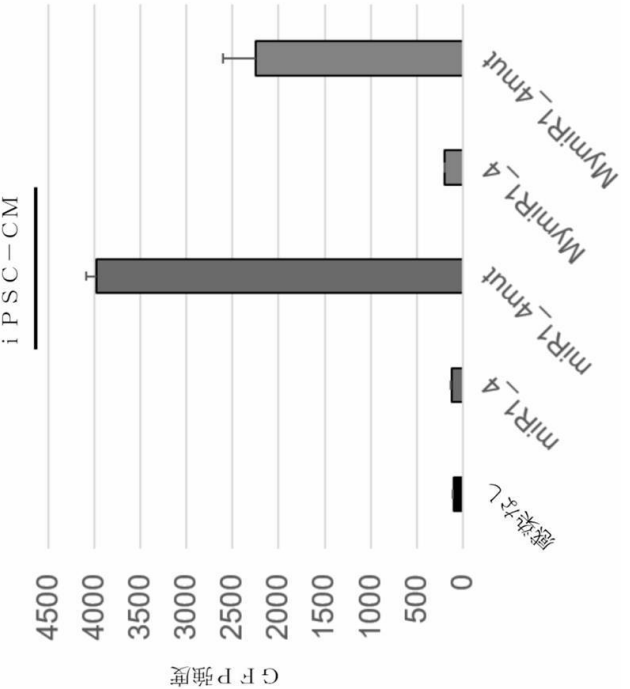
7つの構築物のプールは、6匹の健康なヨークシャーブタの心臓に、開胸心外膜注射により、3つの別々の部位に送達される。各注射部位は、剖検時に識別できるように、ガラスビーズの縫合によって、印付けされている。注射後4週間（ $n=3$ ）又は12週間（ $n=3$ ）で、動物を安楽死させる。RNA及びDNA分析のために、各注射部位からの生検パンチは、剖検時に収集される。両方の時点で7つのベクターのそれぞれについて送達されたベクターゲノムに対するRNA発現を比較する。

40

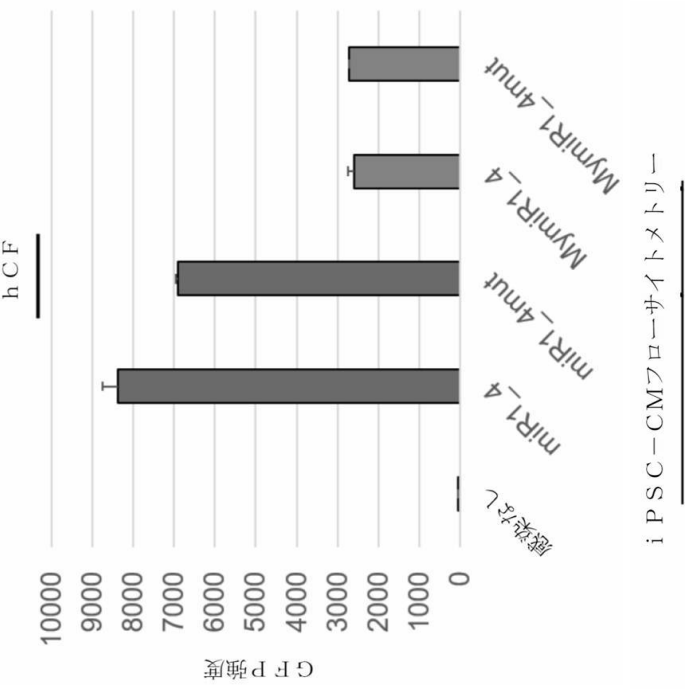
【図面】
【図 1】



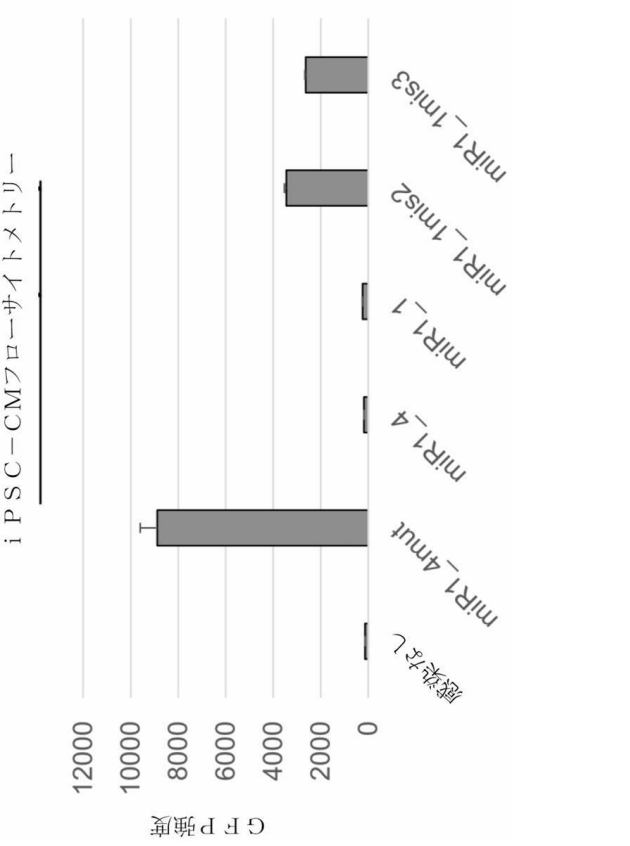
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3】



10

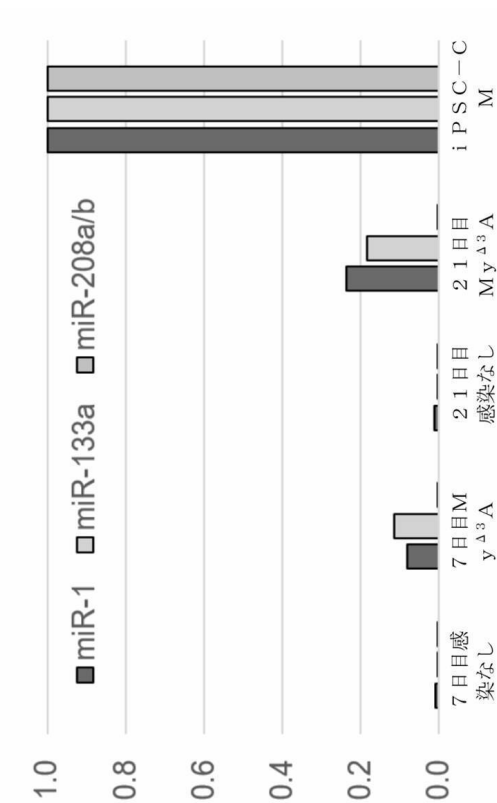
20

30

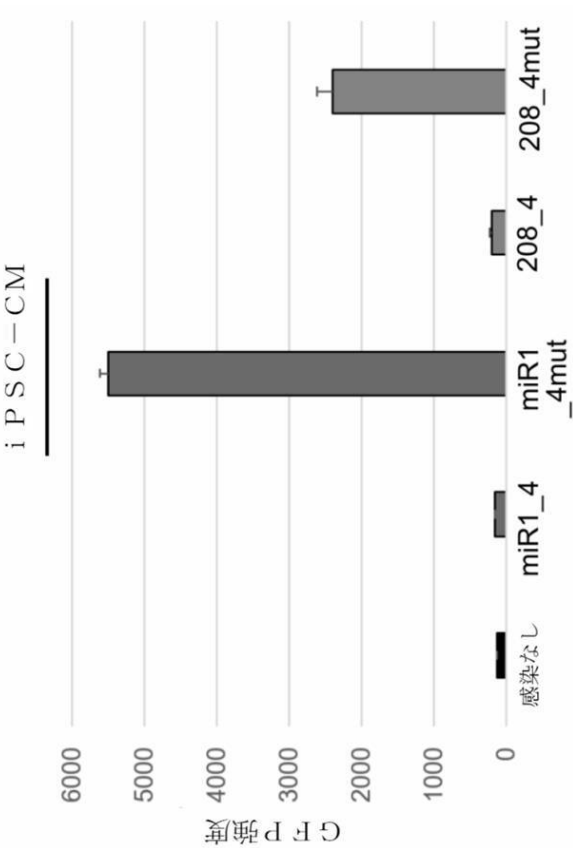
40

50

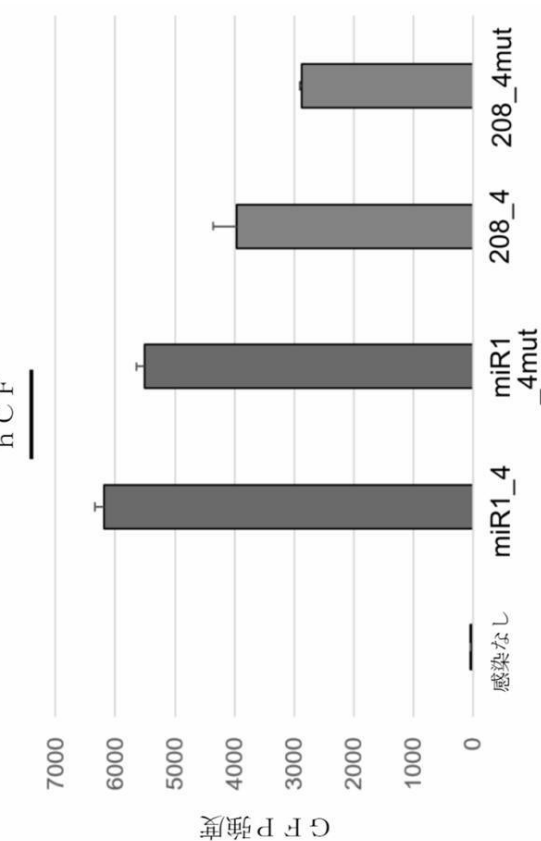
【図 4】



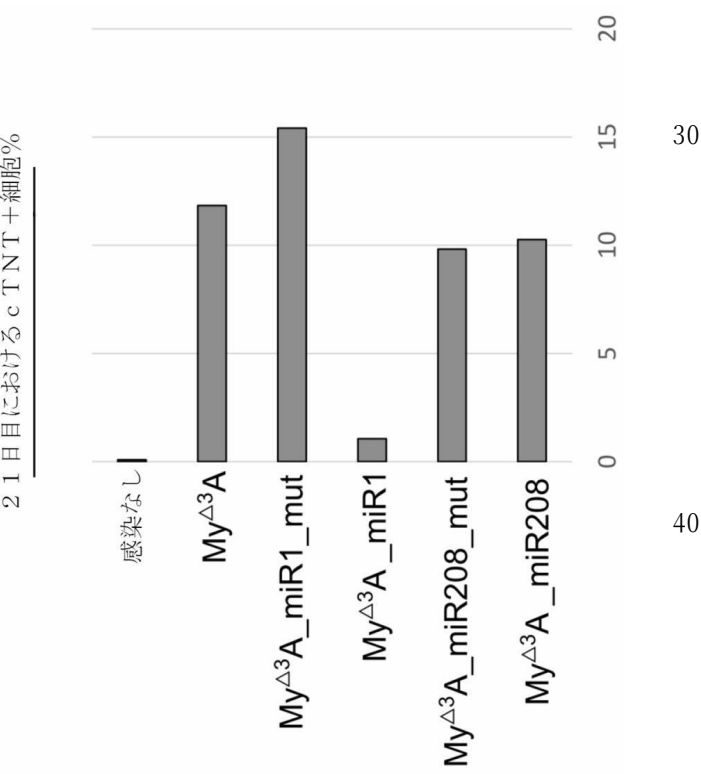
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



10

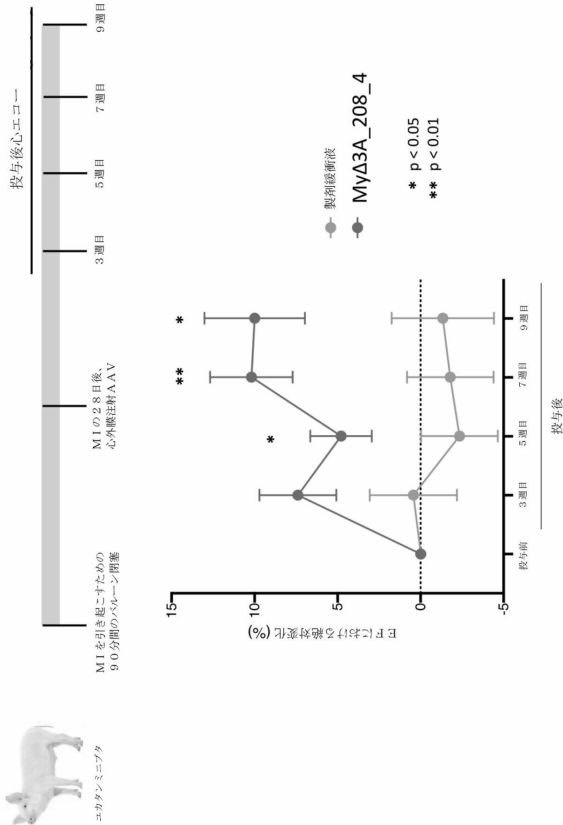
20

30

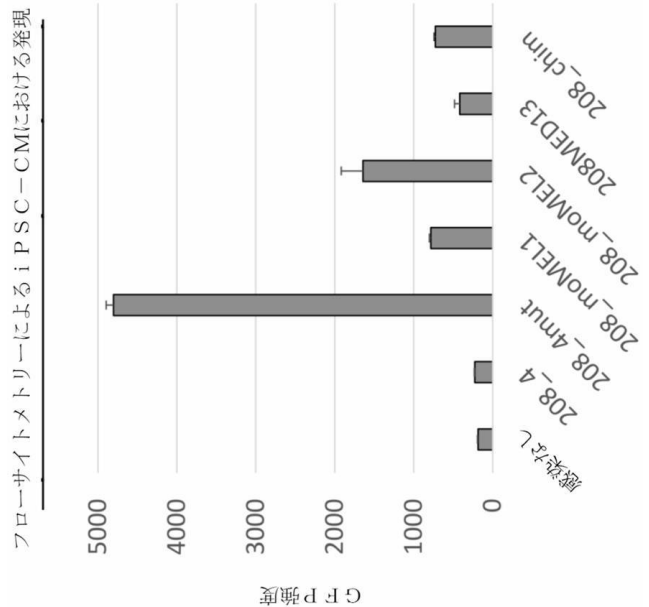
40

50

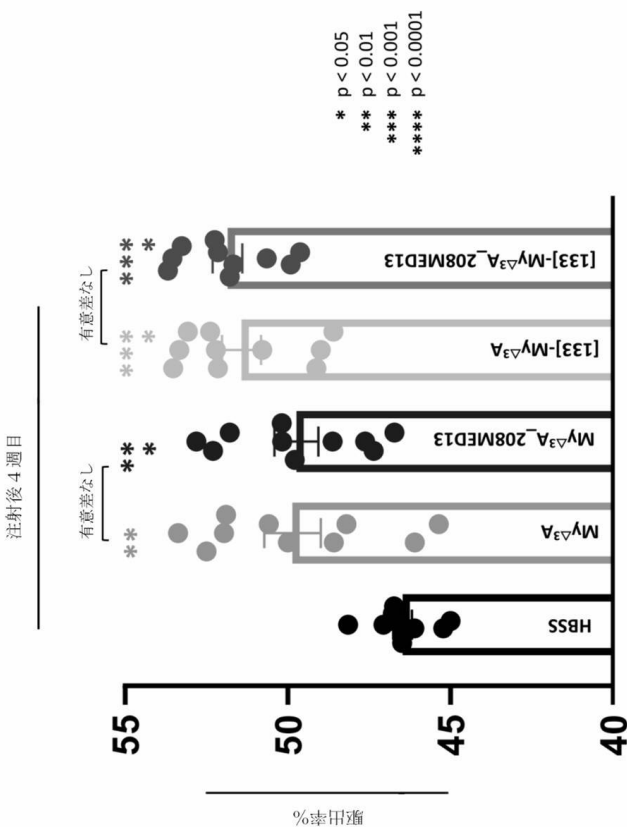
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023515672000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/020032
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	10
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	20
3.	Additional comments:	
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/020032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K35/76 C12N15/86 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/070483 A2 (UNIV NORTH CAROLINA [US]; WANG DA-ZHI [US]; CHEN JIANFU [US]) 21 June 2007 (2007-06-21) page 17, paragraph 1; figure 18; example 9 page 12, line 1 - line 13 -----	1-4, 14, 15, 17, 18, 50, 51
A	WO 2009/105759 A2 (UNIV TEXAS [US]; OLSON ERIC [US]; SMALL ERIC [US]; XIN MEI [US]) 27 August 2009 (2009-08-27) page 32, line 23 - page 33, line 8; claims 1-50 -----	1-68
A	WO 2009/018492 A2 (UNIV TEXAS [US]; OLSON ERIC [US]; VAN ROOIJ EVA [US]) 5 February 2009 (2009-02-05) page 21, line 8 - line 19; claims 1-83; figures 35, 37 ----- -/--	1-68
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2021		Date of mailing of the international search report 23/07/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Strobel, Andreas

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/020032

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WERNER JOHN H. ET AL: "Molecular discoveries and treatment strategies by direct reprogramming in cardiac regeneration", TRANSLATIONAL RESEARCH, vol. 203, 1 January 2019 (2019-01-01), pages 73-87, XP055813831, NL ISSN: 1931-5244, DOI: 10.1016/j.trsl.2018.07.012 the whole document	1-68
A	BROWN BRIAN D ET AL: "Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, NEW YORK, vol. 25, no. 12, 16 November 2007 (2007-11-16), pages 1457-1467, XP002471752, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1372 the whole document	1-68
T	WANG HAOFEI ET AL: "Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress", NAT REV MOL CELL BIOL, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 22, no. 6, 22 February 2021 (2021-02-22), pages 410-424, XP037464714, ISSN: 1471-0072, DOI: 10.1038/S41580-021-00335-Z [retrieved on 2021-02-22] the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/020032

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007070483 A2	21-06-2007	AU 2006326517 A1	21-06-2007
		BR P10619755 A2	18-10-2011
		CA 2634046 A1	21-06-2007
		CA 2903764 A1	21-06-2007
		CN 101448942 A	03-06-2009
		CN 104027818 A	10-09-2014
		DK 1969125 T3	23-07-2012
		EP 1969125 A2	17-09-2008
		EP 2497827 A1	12-09-2012
		EP 2671949 A1	11-12-2013
		ES 2387250 T3	19-09-2012
		JP 5740460 B2	24-06-2015
		JP 5796027 B2	21-10-2015
		JP 2009519339 A	14-05-2009
		JP 2013126996 A	27-06-2013
		JP 2014094943 A	22-05-2014
		KR 20080080177 A	02-09-2008
		KR 20140130562 A	10-11-2014
		NZ 569738 A	30-03-2012
		NZ 593688 A	25-01-2013
		NZ 602571 A	28-03-2014
		PL 1969125 T3	30-11-2012
		PT 1969125 E	16-08-2012
		US 2010292297 A1	18-11-2010
		US 2013225658 A1	29-08-2013
		US 2013225665 A1	29-08-2013
		WO 2007070483 A2	21-06-2007
WO 2009105759 A2	27-08-2009	CA 2716343 A1	27-08-2009
		CN 102083980 A	01-06-2011
		EP 2257625 A2	08-12-2010
		JP 2011513238 A	28-04-2011
		US 2009226375 A1	10-09-2009
		US 2011293674 A1	01-12-2011
WO 2009018492 A2	05-02-2009	WO 2009105759 A2	27-08-2009
		AU 2008283794 A1	05-02-2009
		BR P10814991 A2	31-03-2015
		CA 2694928 A1	05-02-2009
		CN 101808649 A	18-08-2010
		EP 2187896 A2	26-05-2010
		HK 1143948 A1	21-01-2011
		JP 5654347 B2	14-01-2015
		JP 2010535246 A	18-11-2010
		JP 2015013864 A	22-01-2015
		KR 20100057022 A	28-05-2010
		NZ 583025 A	29-06-2012
		US 2010269183 A1	21-10-2010
		US 2013245092 A1	19-09-2013
		WO 2009018492 A2	05-02-2009

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

C 1 2 N 5/077

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ロンバルディ, ローラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 7 1, スイート 5 0 0, テナヤ セラピューティクス, インコーポレイテッド
 気付

(72)発明者 レオン, エレナ シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 7 1, スイート 5 0 0, テナヤ セラピューティクス, インコーポレイテッド
 気付

(72)発明者 クレシ, タウニー ニール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 7 1, スイート 5 0 0, テナヤ セラピューティクス, インコーポレイテッド
 気付

(72)発明者 アイビー, キャスリン エヌ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 7 1, スイート 5 0 0, テナヤ セラピューティクス, インコーポレイテッド
 気付

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA44

4C084 AA13 NA14 ZA361 ZA362

4C087 AA01 AA02 BB33 CA12 NA05 NA14 ZA36