

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7253379号
(P7253379)

(45)発行日 令和5年4月6日(2023.4.6)

(24)登録日 令和5年3月29日(2023.3.29)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	35/761(2015.01)	A 6 1 K	35/761
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04

F I

請求項の数 22 (全32頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-551837(P2018-551837)
 (86)(22)出願日 平成29年3月31日(2017.3.31)
 (65)公表番号 特表2019-515663(P2019-515663
 A)
 (43)公表日 令和1年6月13日(2019.6.13)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/025614
 (87)国際公開番号 WO2017/173411
 (87)国際公開日 平成29年10月5日(2017.10.5)
 審査請求日 令和2年3月19日(2020.3.19)
 審判番号 不服2022-689(P2022-689/J1)
 審判請求日 令和4年1月17日(2022.1.17)
 (31)優先権主張番号 62/317,524
 (32)優先日 平成28年4月2日(2016.4.2)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 515289842
 リサーチ インスティチュート アット
 ネイションワイド チルドレンズ ホスピ
 タル
 アメリカ合衆国 オハイオ 43205 ,
 コロンバス , チルドレンズ ドライブ
 700 , ルーム ダブリュー172
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (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】 組織特異的発現のための改変U6プロモーターシステム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号4のヌクレオチド配列を含む改変U6プロモーター配列。
 (b) miRNA-122および/またはmiRNA-208の結合部位である、少なくとも1つの非標的配列を含むマイクロRNA(miRNA)の成熟ガイド鎖、及び
 (c) 5'末端に5~6つのチミジンを含む、核酸。

【請求項2】

a) miRNA-122の結合部位が、配列番号5のヌクレオチド配列を含み、かつ/または
 b) miRNA-208の結合部位が、配列番号6のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の核酸。

【請求項3】

前記miRNAの成熟ガイド鎖が、miDUX4、miRNA-92、miRNA-17、miRNA-18a、miRNA-19a、miRNA-20a、miRNA-19b-1、miRNA-26a、miRNA-126、miRNA-335、let-7a(let-7b)、miRNA-34、miRNA-34a、miRNA-10b、miRNA-208、miRNA-499、miRNA-195、miRNA-29a、miRNA-29b、またはmiRNA-29cである、請求項1または2に記載の核酸。

【請求項4】

前記m i R N Aの成熟ガイド鎖が、配列番号8 4 8 2、配列番号8 3 7 2、配列番号8 3 7 1、配列番号8 3 7 0、配列番号8 3 6 7、配列番号8 3 6 6、配列番号8 3 6 5、配列番号8 2 1 9、配列番号8 2 1 8、配列番号8 1 5 2、配列番号8 1 4 7、配列番号8 1 4 5、配列番号7 3 9 7、配列番号7 3 9 6、配列番号7 3 9 5、配列番号7 1 0 8、配列番号7 1 0 7、配列番号7 1 0 6、配列番号6 6 3 3、配列番号6 6 3 1、配列番号6 6 2 2、配列番号6 6 1 9、配列番号6 6 0 9、配列番号6 6 0 8、配列番号6 5 6 8、配列番号6 5 6 1、配列番号6 5 6 0、配列番号1 0 9 7 1、または配列番号1 0 9 7 2のヌクレオチド配列を含む、請求項1または2に記載の核酸。

【請求項5】

前記m i R N Aの成熟ガイド鎖がm i D U X 4である、請求項1または2に記載の核酸。 10

【請求項6】

配列番号1、2、または1 0 9 1 3 ~ 1 0 9 6 8のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む、請求項1または2に記載の核酸。

【請求項7】

請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項8】

前記ベクターが、プラスミド、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ウマ随伴ウイルス、アルファウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、またはワクシニアウイルスである、請求項7に記載のベクター。 20

【請求項9】

請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(A A V)。

【請求項10】

前記A A Vが、A A V 6、A A V r h . 7 4、またはA A V - B 1である、請求項9に記載の組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項11】

請求項7もしくは8に記載のベクターまたは請求項9もしくは10に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む、組成物。

【請求項12】

細胞内の遺伝子の発現を阻害するための医薬の調製のための、請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項11に記載の組成物の使用。 30

【請求項13】

細胞内のD U X 4遺伝子の発現を阻害するための医薬の調製のための、請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項11に記載の組成物の使用。

【請求項14】

D U X 4 m i R N AをコードするD N Aをそれを必要とする動物の骨格筋へ送達するための医薬の調製のための、請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項11に記載の組成物の使用。 40

【請求項15】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための医薬の調製のための、請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項11に記載の組成物の使用。

【請求項16】

前記医薬が、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射のために製剤化される、請求項12~15のいずれか1項に記載の使用。

【請求項17】

細胞内の遺伝子の発現を阻害するための、請求項1~6のいずれか1項に記載の核酸を

含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項 1_1に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 18】

細胞内の D U X 4 遺伝子の発現を阻害するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項 1_1に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 19】

D U X 4 m i R N A をコードする D N A をそれを必要とする動物の骨格筋へ送達するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項 1_1に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 20】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは請求項 1_1に記載の組成物を含む、組成物。

10

【請求項 21】

前記組成物が、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射のために製剤化される、請求項 1_7 ~ 2_0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記組成物が、筋肉内注射、経皮輸送、血流への注射または肝臓への注射によって投与される、請求項 1_7 ~ 2_0 のいずれか一項の記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本出願は、2016年4月2日に出願された米国仮出願第 62/317,524 号の優先権の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、R N A 干渉に基づく遺伝子療法のための、マイクロ R N A (m i R N A) を発現させるための組織特異的プロモーターシステムに関する。これらのシステムでは、m i R N A は、遺伝子発現を阻害するか、またはマイクロ R N A を用いて天然の m i R N A 発現を置換する。

【0003】

配列表の参照による組み込み

30

本出願は、開示の別個の部分として、コンピュータ可読形式の配列表（ファイル名：50393A_SeqList.txt、1,684,397 バイト、A S C I I テキストファイル）を含み、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

R N A 干渉 (R N A i) は、様々な疾患の治療のために検討されている、真核細胞における遺伝子調節のメカニズムである。 R N A i は、マイクロ R N A (m i R N A) によって媒介される遺伝子発現の転写後制御を表す。天然の m i R N A は、同種のメッセンジャー R N A (m R N A) の 3' 非翻訳領域と配列相同性及び塩基対を共有する、小さな (21 ~ 25 個のヌクレオチド) 、ノンコーディング R N A であるが、コード領域の調節も起こり得る。 m i R N A と m R N A との間の相互作用は、標的 m R N A を分解し、及び / または m R N A の翻訳を妨げるように、細胞遺伝子サイレンシング機構を導く。 R N A i 経路は、 Duan (Ed.), Muscle Gene Therapy , Springer Science + Business Media , LLC (2010) の第 7 章第 7.3 節に要約されている。

40

【0005】

天然の R N A i 経路についての理解が深まるにつれて、研究者らは、疾患を治療するための標的遺伝子の発現の調節に用いるための人工 m i R N A を設計してきた。上記 D u a n の第 7.4 節に記載されているように、人工 m i R N A は D N A 発現カセットから転写されることができる。標的遺伝子に特異的な m i R N A 配列は、細胞中の m i R N A のプ

50

ロセシングを導くために必要とされる配列と共に転写される。アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターは、筋肉にm i R N Aを送達するために使用されてきた [F e c h n e r et al . , J . M o l . M e d . , 8 6 : 9 8 7 - 9 9 7 (2 0 0 8)] 。

【 0 0 0 6 】

アデノ随伴ウイルス (A A V) は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖 D N A ゲノムの長さは、約 4 . 7 k b であり、 1 4 5 ヌクレオチドの逆位末端反復配列 (I T R) を 2 つ含む。 A A V には、複数の血清型が存在する。 A A V 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、既知である。例えば、 A A V - 1 の完全ゲノムは、 G e n B a n k 登録番号 N C _ 0 0 2 0 7 7 に提供されており、 A A V - 2 の完全ゲノムは、 G e n B a n k 登録番号 N C _ 0 0 1 4 0 1 及び S r i v a s t a v a et al . , J . V i r o l . , 4 5 : 5 5 5 - 5 6 4 { 1 9 8 3) に提供されており、 A A V - 3 の完全ゲノムは、 G e n B a n k 登録番号 N C _ 1 8 2 9 に提供されており、 A A V - 4 の完全ゲノムは、 G e n B a n k 登録番号 N C _ 0 0 1 8 2 9 に提供されており、 A A V - 5 ゲノムは、 G e n B a n k 登録番号 A F 0 8 5 7 1 6 に提供されており、 A A V - 6 の完全ゲノムは、 G e n B a n k 登録番号 N C _ 0 0 1 8 6 2 に提供されており、 A A V - 7 及び A A V - 8 ゲノムの少なくとも一部は、それぞれ、 G e n B a n k 登録番号 A X 7 5 3 2 4 6 及び A X 7 5 3 2 4 9 に提供されており、 A A V - 9 ゲノムは、 G a o et al . , J . V i r o l . , 7 8 : 6 3 8 1 - 6 3 8 8 (2 0 0 4) に提供されており、 A A V - 1 0 ゲノムは、 M o l . T h e r . , 1 3 (1) : 6 7 - 7 6 (2 0 0 6) に提供されており、 A A V - 1 1 ゲノムは、 V i r o l o g y , 3 3 0 (2) : 3 7 5 - 3 8 3 (2 0 0 4) に提供されている。 A A V r h . 7 4 血清型のクローニングは、 R o d i n o - K l a p a c et al . , J o u r n a l o f T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e 5 , 4 5 (2 0 0 7) に記載されている。 A A V - B 1 血清型の単離は、 C h o u d h u r y et al . , M o l . T h e r a p . 2 4 (7) : 1 2 4 7 - 5 7 , 2 0 1 6 に記載されている。ウイルス D N A 複製 (r e p) 、カプシド形成 / パッケージング、及び宿主細胞染色体組み込みを導くシス作用配列が、 A A V I T R 内に含まれる。 3 つの A A V プロモーター (相対的なマップ位置について p 5 、 p 1 9 、及び p 4 0 と命名される) は、 r e p 及び c a p 遺伝子をコードする 2 つの A A V 内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。 単一の A A V イントロンの差異的スプライシング (ヌクレオチド 2 1 0 7 及び 2 2 2 7 における) と相まって、 2 つの r e p プロモーター (p 5 及び p 1 9) により、 r e p 遺伝子から 4 つの r e p タンパク質 (r e p 7 8 、 r e p 6 8 、 r e p 5 2 、及び r e p 4 0) が生成される。 R e p 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有する。 c a p 遺伝子は、 p 4 0 プロモーターから発現され、 3 つのカプシドタンパク質 V P 1 、 V P 2 、及び V P 3 をコードする。選択的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生成を担う。 単一のコンセンサスポアリデニル化部位は、 A A V ゲノムのマップ位置 9 5 に位置する。 A A V の生活環及び遺伝学は、 M u z y c z k a , C u r r e n t T o p i c s i n M i c r o b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y , 1 5 8 : 9 7 - 1 2 9 (1 9 9 2) において総説されている。

【 0 0 0 7 】

A A V は、例えば、遺伝子療法において、外来 D N A を細胞に送達するためのベクターとして A A V を魅力的なものにする特有の特徴を有する。 培養中の細胞の A A V 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無症状性かつ無症候性である。 さらに、 A A V は多くの哺乳動物細胞に感染し、インビオで多くの異なる組織を標的とする可能性をもつ。 さらに、 A A V は、分裂細胞及び非分裂細胞に徐々に形質導入し、本質的にこれらの細胞寿命の間、転写的に活性な核エピソーム (染色体外因子) として存続することができる。 A A V プロウイルスゲノムは、プラスミドにクローニングされた D N A として挿入され、組換えゲノムの構築を実現可能にする。 さらに、 A A V 複製及びゲノムカプシド形成を指示するシグナルが A A V ゲノムの I T R 内に含まれるため、 (複製及び構造カプシドタンパク質、 r e p - c a p をコードする) ゲノムの内部約 4 . 3 k b の一部または

10

20

30

40

50

全てが外来DNAで置換され得る。AAVベクターを作製するために、rep及びcapタンパク質はトランスで提供されてもよい。AAVの別の重要な特徴は、それが極めて安定かつ丈夫なウイルスであるということである。AAVは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件(56 ~ 65で数時間)に容易に耐えるため、AAVの低温保存はそれほど重要ではない。AAVは、凍結乾燥することさえできる。最後に、AAVに感染した細胞は、重複感染に耐性を示さない。

【0008】

C型肝炎ウイルス感染、筋ジストロフィー、神経変性疾患、末梢神経障害、慢性心不全及び心筋梗塞後リモデリング、ならびに癌などの多くの疾患を治療するために、miRNA阻害及びmiRNA置換を含むmiRNAに基づく療法が用いられてもよい。さらに、miRNA指向性の遺伝子発現調節は、ベクターペイロードがタンパク質コード遺伝子である伝統的な遺伝子療法アプローチを改善し得る。全身送達されたAAVベクターは、肝臓に優先的に形質導入し、肝臓活性プロモーターが使用される場合、その器官において高レベルの導入遺伝子の発現をもたらす。本明細書に詳細に記載されるように、肝臓特異的プロモーターが使用される場合、肝臓特異的miR-122結合部位の挿入は、肝臓における導入遺伝子の発現を低下させる。

miRNA発現の過負荷は、骨格筋、肝臓、及び他の器官において潜在的に毒性である。したがって、遺伝子療法中のmiRNAの高発現の毒性を回避する手段としてmiRNA発現を指示する、より弱いプロモーターの開発が必要とされている。例えば、減弱化されたU6システムが、肝臓におけるC型肝炎ウイルス(HCV)についてのAAV8媒介性RNAi治療のために開発された。このシステムは現在、AAVを用いたRNAi治療の最初の臨床試験において試験されている。要約すると、この試験を裏付ける前臨床データは、野生型(WT)U6プロモーターによって產生されたshRNAがHCVを効果的に破壊したが、マウス及びサルにおいて肝細胞毒性も引き起こしたことを示した。WT U6プロモーターの重要な残基を変異させることは、HCV破壊の効力を維持しながら、U6転写を弱め、16倍少ないshRNAを生じることにより、これを軽減した(Suh et al., Mol. Ther. 20: 1737-49, 2012, Safety and Efficacy Study of Single Doses of TT034 in Patients with Chronic Hepatitis C, clinicaltrial.gov, July 8, 2013)。この例では、標的器官は肝臓であった。本発明は、肝臓を回避することを追い求めたものであり、したがって、遺伝子療法に使用され得る減弱化された骨格筋特異的U6プロモーターシステムを提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】Duan (Ed.), Muscle Gene Therapy, Springer Science+Business Media, LLC (2010)
 Fechner et al., J. Mol. Med., 86: 987-997 (2008)
 Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983)
 Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)
 Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006)
 Virology, 330(2): 375-383 (2004)
 Rodino-Klapac et al., Journal of Translational Medicine 5, 45 (2007)
 Choudhury et al., Mol. Therap. 24(7): 1247-57, 2016
 Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992)
 Suh et al., Mol. Ther. 20: 1737-49, 2012

10

20

30

40

50

Safety and Efficacy Study of Single Doses of TT034 in Patients with Chronic Hepatitis C, clinicaltrial.gov, July 8, 2013

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、有害な過負荷を回避するために、低レベルでのm i R N Aの組織特異的発現のための改変U 6 プロモーターシステムを提供する。改変U 6 プロモーターシステムは、その効力を弱める突然変異を含むU 6 プロモーター配列を含む核酸分子である。さらに、m i R N Aペイロードは、m i R N A成熟ガイド鎖内の様々な位置に配置された非標的化m i R N A結合配列を含む。例えば、本発明の核酸分子は、近位配列エレメント内の置換を有する改変U 6 プロモーターと、各々肝臓及び心臓におけるm i R N Aの発現を非標的化するm i R - 1 2 2 及びm i R - 2 0 8 結合部位を含むm i R N A成熟ガイド鎖と、を有する。

10

【0011】

概念実証研究では、肝特異的なm i R - 1 2 2 標的配列を、ルシフェラーゼまたはL a c Z レポーター遺伝子を有するA A Vベクターに挿入した。これらのベクターでは、遍在的に活性のあるU 6 プロモーターを用いて、両方の遺伝子の転写を駆動した。m i R - 1 2 2 部位を欠くA A Vベクターは、マウス肝臓において極めて高いレベルのルシフェラーゼまたはL a c Z 発現をもたらしたが、それぞれのコード遺伝子中にm i R - 1 2 2 結合部位を有するベクターによって送達された場合、同じ遺伝子の転写は、それぞれ5 0 倍及び7 0 倍、軽減された。このようなシステムは、マイクロR N A発現ベクターに用いられない（参照P M I D : 2 1 1 5 0 9 3 8 ）。

20

【0012】

本発明は、改変U 6 プロモーター配列、少なくとも1つの非標的配列を含むm i R N A成熟ガイド鎖、及び5'末端に5~6つのチミジンを含む核酸分子を提供する。本発明の核酸分子は、少なくとも2つの非標的配列、少なくとも3つの非標的配列、少なくとも4つの非標的配列、少なくとも5つの非標的配列、またはそれ以上を含む。組織特異的m i R N A結合部位に加えて、D N A核酸配列は、5'末端に5つのチミジンを含むか、または5'末端に6つのチミジンを含む、R N AポリメラーゼI I I の転写終結シグナルを含む。R N Aに転写されると、これらのチミジンはウラシルとして転写物に付加される。

30

【0013】

「非標的配列」は、組織において阻害されることが望まれる任意の組織特異的m i R N Aの結合部位である。例えば、本発明は、非標的配列が任意の天然m i R N A、例えば、m i R - 1 2 2 、m i R - 2 0 8 、m i R - 1 、m i R - 2 0 6 、m i R - 1 3 3 、、m i R - 2 9 a 、m i R - 2 9 b 、またはm i R - 2 9 c の結合部位である核酸配列を提供する。

【0014】

本発明の核酸分子は、減弱化された改変U 6 プロモーターを含む。例えば、改変U 6 プロモーター配列は、近位配列エレメント(P S E)領域または遠位配列エレメント(D S E)に少なくとも置換、挿入または欠失を含む。例えば、改変U 6 プロモーター配列は、P S E配列中のヌクレオチド-6 6 のシトシンのチミジンへの置換、ヌクレオチド-5 7 のシトシンのチミジンへの置換、及びヌクレオチド-5 2 のチミジンのシトシンへの置換を含む。

40

【0015】

本発明の核酸分子は、目的の遺伝子の発現を阻害し得る任意のm i R N A成熟ガイド鎖を含む。例えば、核酸分子は、m i D U X 4 、m i R N - 9 2 、m i R N A - 1 7 、m i R N A - 1 8 a 、m i R N A - 1 9 a 、m i R N A - 2 0 a 、m i R N A - 1 9 b - 1 、m i - R N A - 2 6 a 、m i R N A - 1 2 2 、m i R N A - 1 2 6 、m i R N A - 3 3 5 、l e t - 7 a 及びl e t - 7 b 、m i R N A - 3 4 (m i R - 3 4 a) 、m i R N A -

50

10 b、miRNA - 208、miRNA - 499、miRNA - 195、miRNA - 29a、miRNA - 29b、またはmiRNA - 29cのmiRNA成熟ガイド鎖を含む。核酸分子は、配列番号10～10912として示されるmiRNA成熟ガイド鎖のいずれかを含む。本発明の核酸分子は、配列番号1(miDUX4-1；mi405)または配列番号2(miDUX-4-2；mi1155)の核酸配列を有するmiDUX4の成熟ガイド鎖を含む。

【0016】

本発明の核酸分子は、mir450(配列番号10973)、mi1155mi70(配列番号8482)、mi180(配列番号8372)、mi181(配列番号8371)、mi182(配列番号8370)、mi185(配列番号8367)、mi186(配列番号8366)、mi187(配列番号8365)、mi333(配列番号8219)、mi334(配列番号8218)、mi400(配列番号8152)、mi405(配列番号8147)、mi407(配列番号8145)、mi1155(配列番号7397)、mi1156(配列番号7396)、mi1157(配列番号7395)、mi1308(配列番号7108)、mi1309(配列番号7107)、mi1310(配列番号7106)、mi1420(配列番号6633)、mi1422(配列番号6631)、mi1431(配列番号6622)、mi1434(配列番号6619)、mi1444(配列番号6609)、mi1445(配列番号6608)、mi1485(配列番号6568)、mi1492(配列番号6561)、mi1493(配列番号6560)、mi1519((配列番号10971)、またはmi1520(配列番号10972)のヌクレオチド配列を含むmiRNAの成熟ガイド鎖を含む。これらの配列は、mi405及びmi1155の成熟ガイド鎖と同様に折り畳まれる。したがって、本発明は、mir-208結合部位配列(配列番号5または配列番号66)及び/またはmir-122結合部位配列(配列番号6または配列番号67)が表1の配列に示されたものと同様の位置で上記の成熟ガイド鎖のいずれかのループに挿入されてもよい核酸分子を提供する。

【0017】

例示的な一実施形態では、本発明の核酸分子は、近位配列エレメント内に置換を有する改変U6プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の5'または3'末端にmiR-122及び/またはmiR-208結合部位を有するmiDUX4の成熟ガイド鎖と、5～6つのチミジンと、を有する。本発明の例示的な核酸分子は、miDUX4のmiRNA成熟ガイド鎖と、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入された少なくとも1つの非標的配列、例えば、miR-122(配列番号5)またはmiR-208(配列番号6)結合部位、例えば、配列番号10913～10968のいずれか1つとして示される核酸配列と、を含む。

【0018】

本発明は、配列番号1、2、または10913～10968のいずれか1つの核酸配列を含む核酸分子を提供する。

【0019】

別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子のいずれかを含む組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)を提供する。AAVは、任意の血清型、例えば、AAV-B1、AAV-rh.74、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、及びAAV-13であり得る。偽型rAAVの產生は、例えば、WO01/83692に開示されている。他の種類のrAAV変異体、例えば、カブシド変異を有するrAAVもまた企図される。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11):1900-1909(2014)を参照されたい。本発明はまた、本発明のAAVのいずれかを含む組成物を提供する。さらに、本発明は、自己相補的AAVベクターである組換えAAVベクターを提供する。

【0020】

別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子のいずれかを含むベクターと細胞とを

10

20

30

40

50

接触させることを含む、細胞における遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。例えば、本発明は、本発明の核酸分子のいずれかを含む組換えAAVと細胞とを接触させることを含む、要求における遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。本発明の他の実施形態は、本発明の核酸分子を送達するために、他のベクターまたはプラスミドを、例えば、本発明の核酸分子を送達するために、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ウマ関連ウイルス、アルファウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルスを、利用する。

【0021】

本発明は、細胞におけるDUX4遺伝子の発現を阻害する方法であって、本発明の任意の核酸分子を含む組換えAAVまたは任意の組成物とその細胞を接触させることを含む、方法も提供する。例えば、本発明は、近位配列エレメント内に置換を有する改変U6プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入されたmiR-122及び/またはmiR-208結合部位を有するmiDUX4の成熟ガイド鎖と、5~6つのチミジンとを含む本発明の核酸分子を用いて実施されるか、あるいは本発明の核酸分子は、配列番号10913~10968のいずれか1つの核酸配列を含む。

10

【0022】

本発明は、細胞におけるDUX4遺伝子の発現を阻害するための医薬の調製のための、本発明の任意の核酸分子を含む組換えAAVまたは本発明の組成物の使用を提供する。医薬を調製するために利用されるAAVまたは組成物は、近位配列エレメント内に置換を有する改変U6プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入されたmiR-122及び/またはmiR-208結合部位を有するmiDUX4の成熟ガイド鎖と、5~6つのチミジンとを含む本発明の核酸分子を含むか、あるいは本発明の核酸分子は、配列番号10913~10968のいずれか1つの核酸配列を含む。

20

【0023】

本発明はまた、細胞におけるDUX4遺伝子の発現を阻害するための、本発明の任意の核酸分子を含む組換えAAVまたは本発明の組成物の使用のための組成物を提供する。医薬を調製するために利用されるAAVまたは組成物は、近位配列エレメント内に置換を有する改変U6プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入されたmiR-122及び/またはmiR-208結合部位を有するmiDUX4の成熟ガイド鎖と、5~6つのチミジンとを含む本発明の核酸分子を含むか、あるいは本発明の核酸分子は、配列番号10913~10968のいずれか1つの核酸配列を含む。

30

【0024】

本発明はさらに、DUX4 miRNAをコードするDNAをそれを必要とする動物の骨格筋に送達させる方法を提供し、この方法は、配列番号10913~10968のいずれか1つの核酸配列を含む組換えAAVを動物に投与することを含む。

40

【0025】

本発明はまた、DUX4 miDNAをコードする核酸分子をそれを必要とする動物の骨格筋に送達させるための、本発明の核酸配列を含む組換えAAVの使用を提供する。本発明は、DUX4 miDNAをコードする核酸分子をそれを必要とする動物の骨格筋に送達させるための、配列番号10913~10968のいずれか1つの核酸配列を含む組成物を提供する。

【0026】

別の実施形態では、本発明は、本発明の任意の核酸分子または任意の組成物を含む組換えアデノ随伴ウイルスを投与することを含む、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療する方法を提供する。例えば、本方法は、近位配列エレメント内の置換を有する改変U6プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入されたmiR-122及び/またはmiR-208結合部位を有するmiDUX4の成熟

50

ガイド鎖と、及び 5 ~ 6 つのチミジンとを含む本発明の核酸分子か、あるいは配列番号 1 0 9 1 3 ~ 1 0 9 6 8 のいずれか 1 つの核酸配列を有する核酸分子を用いて、実施される。

【 0 0 2 7 】

本発明の方法のいずれかにおいて、組換え A A V は、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射によって投与される

【 0 0 2 8 】

本発明は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための医薬の調製のための、本発明の任意の核酸分子を含む組換え A A V または本発明の組成物の使用を提供する。医薬を調製するために利用される A A V または組成物は、近位配列エレメント内に置換を有する改変 U 6 プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の 5 ' または 3 ' 末端に挿入された m i R - 1 2 2 及び / または m i R - 2 0 8 結合部位を有する m i D U X 4 の成熟ガイド鎖と、5 ~ 6 つのチミジンとを含む本発明の核酸分子を含むか、あるいは配列番号 1 0 9 1 3 ~ 1 0 9 6 8 のいずれか 1 つの核酸配列を有する核酸分子を含む。

10

【 0 0 2 9 】

本発明の用途のいずれにおいても、医薬は、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射による投与のために製剤化される。

【 0 0 3 0 】

本発明は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための、本発明の任意の核酸分子を含む組換え A A V または本発明の組成物の使用も提供する。医薬を調製するために利用される A A V または組成物は、近位配列エレメント内に置換を有する改変 U 6 プロモーターと、成熟ガイド鎖のループ内あるいは成熟ガイド鎖の 5 ' または 3 ' 末端に挿入された m i R - 1 2 2 及び / または m i R - 2 0 8 結合部位を有する m i D U X 4 の成熟ガイド鎖と、5 ~ 6 つのチミジンとを含む本発明の核酸分子を含むか、あるいは配列番号 1 0 9 1 3 ~ 1 0 9 6 8 のいずれか 1 つの核酸配列を有する核酸分子を含む。本発明の組成物は、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射による投与のために製剤化される。

20

(発明を実施するための形態)

【 0 0 3 1 】

本発明は、有害な過負荷を回避するために、低レベルでの m i R N A の組織特異的な特異的発現のための改変 U 6 プロモーターシステムを提供する。改変 U 6 プロモーターシステムは、改変 U 6 プロモーター配列、成熟ガイド鎖配列内に挿入された非標的配列を有する m i R N A の成熟ガイド鎖を含む核酸分子である。例えば、肝臓特異的 m i R - 1 2 2 の結合部位及び / または心臓特異的 m i R - 2 0 8 の結合部位は、m i R N A の成熟ガイド鎖のループ内あるいは m i R N A の成熟ガイド鎖の 5 ' または 3 ' 末端に挿入されており、肝臓及び心臓において m i R N A の発現を非標的化する。

30

【 0 0 3 2 】

改変 U 6 プロモーター

本発明は、改変 U 6 プロモーターシステムを提供し、これは引き続き標的遺伝子の m i R N A 誘導阻害をもたらすか、あるいは標的遺伝子の阻害をもたらし得る m i R N A の置換をもたらすか、あるいは転写下にある m i R N A の置換をもたらしてもよい。野生型 U 6 プロモーター (U 6 - 1) は、配列番号 3 として示される。一方、P S E 領域内に置換を有する減弱化された U 6 プロモーターは、図 1 に示されるように配列番号 4 として示される。

40

【 0 0 3 3 】

改変 U 6 プロモーターシステムは、野生型 U 6 プロモーター配列内に少なくとも 1 つの置換、少なくとも 1 つの挿入、少なくとも 1 つの欠失、またはそれらの組み合わせを含む改変 U 6 プロモーターを含む核酸分子であり、この改変はプロモーター活性を弱めるものである。改変は、遠位配列エレメント (D S E) 、近位配列エレメント (P S E) 、または T A T A エレメントなどの 1 つまたは複数のエレメント内にあってもよい。例えば、改変は、P S E ヌクレオチド配列における、置換、挿入、または欠失である。例示的な改変は、野生型 U 6 - 1 プロモーターの P S E の、U 6 - 2 プロモーター、U 6 - 7 プロモータ

50

一、U 6 - 8 プロモーター、またはU 6 - 9 プロモーターのP S E ヌクレオチド配列での置換であってもよい

【 0 0 3 4 】

本発明の一実施形態では、核酸分子は、P S E またはD S E ヌクレオチド配列がプロモーターの活性を減弱化する置換を有するU 6 ヌクレオチド配列を含む。例えば、野生型U 6 プロモーター配列（配列番号3）は、P S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～10の置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～9つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～8つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～7つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～6つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～5つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～4つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～3つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に5～10の置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に5～8つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に5～7つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に5～6つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に4～8つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に4～6つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に3～6つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に3～9つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に2～4つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に2～3つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に3～4つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に3～5つの置換を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に4～5つの置換を、含む。一実施形態では、核酸分子は、P S E またはD S E ヌクレオチド配列内に、1つの置換、2つの置換、または3つの置換、4つの置換、5つの置換、6つの置換、7つの置換、8つの置換、9つの置換、または10の置換を含む。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態では、野生型U 6 プロモーター配列（配列番号3）は、P S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～10の挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～9つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～8つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～7つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～6つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～5つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～4つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～3つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に5～10の挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に4～8つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に6～9つの挿入を、P S E またはD S E ヌクレオチド配列内に2～4つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に2～3つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に3～4つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に3～5つの挿入を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に4～5つの挿入を、含む。一実施形態では、核酸分子は、P S E またはD S E ヌクレオチド配列内に、1つの挿入、2つの挿入、3つの挿入、4つの挿入、5つの挿入、6つの挿入、7つの挿入、8つの挿入、9つの挿入、または10の挿入を含む。

【 0 0 3 6 】

別の実施形態では、野生型U 6 プロモーター配列（配列番号3）は、P S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～10の欠失を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～9つの欠失を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～8つの欠失を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～7つの欠失を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～6つの欠失を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配列内に1～5つの欠失を、あるいはP S E またはD S E ヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列内に1～4つの欠失を、あるいはPSEまたはDSEヌクレオチド配列内に1～3つの欠失を、あるいはPSEまたはDSEヌクレオチド配列内に2～4つの欠失を、あるいはPSEまたはDSEヌクレオチド配列内に2～3つの欠失を、あるいはPSEまたはDSEヌクレオチド配列内に3～4つの欠失を、あるいはPSEまたはDSEヌクレオチド配列内に3～5つの欠失を、あるいはPSEまたはDSEヌクレオチド配列内に4～5つの欠失を、含む。一実施形態では、核酸分子は、PSEまたはDSEヌクレオチド配列内に、1つの欠失、2つの欠失、または3つの欠失、4つの欠失、5つの欠失、6つの欠失、7つの欠失、8つの欠失、9つの欠失、または10の欠失を含む。

【0037】

非標的miRNA配列発現

本発明のプロモーターシステムは、miRNAを非標的化するための結合部位が、miRNAの成熟ガイド鎖のループ内あるいはmiRNAの成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入されている、miRNAの成熟ガイド鎖を含む核酸分子である。例えば、骨格筋におけるmiRNA配列の発現を促進し、肝臓及び心臓組織におけるmiRNAの発現を非標的化するために、核酸分子は、肝臓特異的miR-122の結合部位及び/または心臓特異的miR-208の結合部位が、成熟ガイド鎖のループ内またはmiRNAの成熟ガイド鎖の5'もしくは3'末端に挿入されている、miRNAの成熟ガイド鎖を含む。miRNA-122の結合部位のヌクレオチド配列は、配列番号5として示され、miRNA-208の結合部位のヌクレオチド配列は、配列番号6として示される。

【0038】

骨格筋におけるmiRNAの発現の非標的化が所望される場合、miR-1、miR-206、またはmiR-133の結合部位は、miRNAの成熟ガイド鎖のループ内に、あるいはmiRNAの成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入される。

【0039】

骨格筋、肝臓、及び/または心臓以外の組織における発現の非標的化が所望される場合、異なるmiRNA転写物についての結合部位が、miRNAの成熟ガイド鎖内に挿入されてもよい。例えば、miR-142結合部位は、造血細胞における転写発現を非標的化するために使用されてもよい。miR-29a、miR-29b、及び/またはmiR-29cの結合部位は、正常組織におけるmiRNA発現を非標的化し、腫瘍組織におけるmiRNA発現を標的化するために使用されてもよい。

【0040】

組織中のmiRNA発現を非標的化するために使用されてもよいmiRNA結合配列は、本明細書では集合的に「非標的配列」と称される。本発明の核酸配列は、少なくとも1コピーの非標的配列、または少なくとも2コピーの非標的配列、または少なくとも3コピーの非標的配列、または少なくとも4コピーの非標的配列、または少なくとも5コピーの非標的配列を含む。本発明の核酸分子は、1～5コピーの非標的配列、または1～4コピーの非標的配列、または1～3コピーの非標的配列、または1～2コピーの非標的配列、または2～5コピーの非標的配列、2～4コピーの非標的配列、または2～3コピーの非標的配列、または3～5コピーの非標的配列、または3～4コピーの非標的配列、または4～5コピーの非標的配列を含む。

【0041】

非標的配列は、miRNAの成熟ガイド鎖のループ内に、あるいはmiRNAの成熟ガイド鎖の5'または3'末端に挿入されてもよい。非標的配列の挿入のための例示的な位置は、図4に示され、miDUX4の成熟ガイド鎖(mi405(配列番号10973)またはmi1155(配列番号10974)、及びmiR-122結合部位(配列番号5または配列番号66)あるいはmiR-208結合部位(配列番号6または配列番号67)を含む例示的な核酸は、以下の表1に提供される。

【0042】

ヒト及びマウスゲノムには、2つのmiR-208配列(miR-208a及びmiR-208b)が存在する。以下の例示的な配列において、5'U(p01_I1Iプロモー

10

20

30

40

50

ター終結配列)の実行を回避するために、結合部位の単一塩基を「c」(太小文字の「c」)に突然変異させた。この変化はmir-208bについて完璧な結合部位を作り出すために含まれたが、mir-208aとはミスマッチを有し得る。

【表1-1】

表1

配列番号	miDUX	miR 結合部位 (下線)	結合部位の位置	ヌクレオチド配列 (小文字-miRNA 前駆体骨格の適切な折り畳みを容易にするためのスペーサー)
10913	mi405	miR-122	ループ	CTCGAGTGAGCGATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTATT</u> <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> AAACCA <u>GATCTGAATCCTGG</u> ACTGCCTACTAGT
10914	mi1155	miR-122	ループ	CTCGAGTGAGCGACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>TATT</u> <u>AGTGTGATAATGGTGT</u> TTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGC TGCCTACTAGT
10915	mi405	miR-122	5'末端	CTCGAG <u>TATTAGTGTGATAATGGTGT</u> TTctcgggTGAGC GATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTGAAAGCCACAGATG</u> GGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTGCCTACTAGT
10916	mi1155	miR-122	5'末端	CTCGAG <u>TATTAGTGTGATAATGGTGT</u> TTctcgggTGAGC GACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>ACTGTAAAGCCACAGAT</u> GGGTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCCTACTAGT
10917	mi405	miR-122	3'末端	CTCGAGTGAGCGATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTGAA</u> AGCCACAGATGGGAAACCA <u>GATCTGAATCCTGGACTGC</u> CT <u>actagaTATTAGTGTGATAATGGTGT</u> TTACTAGT
10918	mi1155	miR-122	3'末端	CTCGAGTGAGCGACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>CTGTA</u> AAGCCACAGATGGGTT <u>CTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTG</u> CCT <u>actagaTATTAGTGTGATAATGGTGT</u> TTACTAGT
10919	mi405	miR-208	ループ	CTCGAGTGAGCGATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTATT</u> <u>ACGAGCcTTTGCTCGTCTTATGGAAACCAGATCTGAATCCT</u> GG ACTGCCTACTAGT
10920	mi1155	miR-208	ループ	CTCGAGTGAGCGACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>ACTAC</u> <u>GAGCcTTTGCTCGTCTTATGGTTCTAGGAGAGGTTGCG</u> CCTGCTGCCTACTAGT
10921	mi405	miR-208	5'末端	CTCGAG <u>ACGAGCcTTTGCTCGTCTTAT</u> ctcgggTGAGCG ATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTGTAAGCCACAGATG</u> GGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTGCCTACTAGT
10922	mi1155	miR-208	5'末端	CTCGAG <u>ACGAGCTTTGCTCGTCTTAT</u> ctcgggTGAGCG ACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>ACTGTAAAGCCACAGATG</u> GGTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCCTACTAGT
10923	mi405	miR-208	3'末端	CTCGAGTGAGCGATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTGTA</u> AAGCCACAGATGGGAAACCA <u>GATCTGAATCCTGGACTG</u> CCT <u>actagaACGAGCcTTTGCTCGTCTTAT</u> ACTAGT
10924	mi1155	miR-208	3'末端	CTCGAGTGAGCGACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>CTGTA</u> AAGCCACAGATGGGTT <u>CTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTG</u> CCT <u>actagaACGAGCcTTTGCTCGTCTTAT</u> ACTAGT
10925	mi405	5'miR-122、3'miR-208		CTCGAG <u>TATTAGTGTGATAATGGTGT</u> TTctcgggTGAGC GATCCAGGATTCA <u>GATCTGGTTCTGTAAGCCACAGAT</u> GGGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTGCCT <u>actagaACG</u> <u>AGCcTTTGCTCGTCTTAT</u> ACTAGT
10926	mi1155	5'miR-122、3'miR-208		CTCGAG <u>TATTAGTGTGATAATGGTGT</u> TTctcgggTGAGC GACAGGCGCAACCTCTCCTAGAA <u>ACTGTAAAGCCACAGAT</u> GGGTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCCT <u>actagaACG</u> <u>AGCcTTTGCTCGTCTTAT</u> ACTAGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号	miDUX 4	miR 結合 部位 (下線)	結合部 位の位 置	ヌクレオチド配列 (小文字-miRNA 前駆体骨格の適切な折り畳 みを容易にするためのスペーサー)
10927	mi405	miR- 122、 miR-208	5' (両方)	CTCGAGTATTA <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> ACGAGCc <u>TTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATctcgggTGAGCGATCCAGGATTAGATCTGAA GGTTCTGTAAGCCACAGATGGGAAACCAGATCTGAA TCCTGGACTGCCTACTAGT
10928	mi1155	miR- 122、 miR-208	5' (両方)	CTCGAGTATTA <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> ACGAGCc <u>TTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATctcgggTGAGCGACAGGCGCAACCTCTC CTAGAACTGTAAGCCACAGATGGGTTCTAGGAGAGGT TGGCCTGCTGCCTACTAGT
10929	mi405	miR- 122、 miR-208	3' (両方)	CTCGAGT <u>GAGCGATCCAGGATT</u> CAGATCTGGTTCTGTA AAGCCACAGATGGGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTG CCT <u>actaga</u> TATTA <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> ACGAGCc <u>TTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATCTAGT
10930	mi1155	miR- 122、 miR-208	3' (両方)	CTCGAGT <u>GAGCGACAGGCGCAACCTCTC</u> CTAGAACTGTA AAGCCACAGATGGGTTCTAGGAGAGGTGCGCCTGCTG CCT <u>actaga</u> TATTA <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> ACGAGCc <u>TTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATCTAGT
10931	mi405	miR-122 ループ、 5'miR-208		CTCGAG <u>ACGAGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATctcgggTGAGCG ATCCAGGATTAGATCTGGTTCT <u>TATTA</u> <u>TAGTGTGATAAA</u> <u>TGGTGT</u> GGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTGCCTAC TAGT
10932	mi1155	miR-122 ループ、 5'miR-208		CTCGAG <u>ACGAGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATctcgggTGAGCG ACAGGCGCAACCTCTCAGAACT <u>TATTA</u> <u>TAGTGTGATAAA</u> <u>TGGTGT</u> GGTTCTAGGAGAGGTGCGCCTGCTGCCTAC TAGT
10933	mi405	miR-122 ループ、 3'miR-208		CTCGAGT <u>GAGCGATCCAGGATT</u> CAGATCTGGTTCT <u>TAT</u> <u>TTAGTGTGATAATGGTGT</u> GGAAACCAGATCTGAATC TGGACTGCCT <u>actaga</u> <u>ACGAGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ACT AGT
10934	mi1155	miR-122 ループ、 3'miR-208		CTCGAGT <u>GAGCGACAGGCGCAACCTCTC</u> CTAGAACT <u>TAT</u> <u>TTAGTGTGATAATGGTGT</u> GGTTCTAGGAGAGGTG GCCTGCTGCCT <u>actaga</u> <u>ACGAGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ACT AGT
10935	mi405	miR-208 ループ、 5'miR-122		CTCGAGTATTA <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> TT <u>ctcg</u> ggTGAGC GATCCAGGATTAGATCTGGTTCT <u>ACGAGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> <u>GTCTT</u> ATGGAAACCAGATCTGAATCCTGGACTGCCTACT AGT
10936	mi1155	miR-208 ループ、 5'miR-122		CTCGAGTATTA <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> TT <u>ctcg</u> ggTGAGC GACAGGCGCAACCTCTCAGAACT <u>ACGAGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> <u>CGTCTT</u> ATGGTTCTAGGAGAGGTGCGCCTGCTGCCTAC TAGT
10937	mi405	miR-208 ループ、 3'miR-122		CTCGAGT <u>GAGCGATCCAGGATT</u> CAGATCTGGTTCT <u>ACG</u> <u>AGCcTTT</u> <u>TGCTCGTCTT</u> ATGGAAACCAGATCTGAATC GGACTGCCT <u>actaga</u> <u>TATTA</u> <u>TAGTGTGATAATGGTGT</u> AC TAGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

配列番号	miDUX 4	miR 結合部位 (下線)	結合部位の位置	スクレオチド配列 (小文字-miRNA 前駆体骨格の適切な折り畳みを容易にするためのスペーサー)
10938	mi1155	miR-208 ループ、 3'miR-122		CTCGAGTGAGCGACAGCGCAACCTCTCCTAGAACT <u>AC</u> <u>GAGCcTTTGCTCGTCTTATGGTTAGGAGAGGTTGCG</u> CCTGCTGC <u>actaga</u> TATTTAGTGTGATAATGGTGT <u>TTA</u> CTAGT
10939	mi405	miR-122 miR-122	ループ (両方)	CTCGAGTGAGCGATCCAGGATTAGATCTGGTTCT <u>TTT</u> <u>AGTGTGATAATGGTGT<u>TTGACGAGCTTTGCTCGTCTT</u></u> <u>ATGGAAACCA</u> GATCTGAATCCTGGACTGCCTACTAGT
10940	mi1155	miR-122 miR-122	ループ (両方)	CTCGAGTGAGCGACAGCGCAACCTCTCCTAGAACT <u>TTT</u> <u>AGTGTGATAATGGTGT<u>TTGACGAGCTTTGCTCGTCTT</u></u> <u>ATGGTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTGCTGCCTACTAGT</u>
10941	mi405	miR-122	ループ	CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUU <u>U</u> <u>AUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUUAAACCA</u> GAUCUGA AUCCUGGACUGCCUACUAGU
10942	mi1155	miR-122	ループ	CUCGAGUGAGCGACAGCGCAACCUCUCCUAGAA <u>U</u> <u>UUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> CUAGGAGAGGUUGCG CCUGCUGCCUACUAGU
10943	mi405	miR-122	5'末端	CUCGAG <u>U</u> UUUAGUGUGAUAAUGGUGUU <u>U</u> cUcg <u>gg</u> GAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUUCUGAAAGCC ACAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCCUGGACUGCCU ACUAGU
10944	mi1155	miR-122	5'末端	CUCGAG <u>U</u> UUUAGUGUGAUAAUGGUGUU <u>U</u> cUcg <u>gg</u> GAGCGACAGCGCAACCUCUCCUAGAACUGUAAGCC ACAGAUGGGUUCUAGGAGAGGUUGCGCCUGCCU ACUAGU
10945	mi405	miR-122	3'末端	CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUU GAAAGCCACAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCCUGGA CUGCCU <u>a</u> U <u>aga</u> U <u>A</u> UUUAGUGUGAUAAUGGUGUU CUAGU
10946	mi1155	miR-122	3'末端	CUCGAGUGAGCGACAGCGCAACCUCUCCUAGAACUG UAAAGCCACAGAUGGGUUCUAGGAGAGGUUGCGCCU GCUGCCU <u>a</u> U <u>aga</u> U <u>A</u> UUUAGUGUGAUAAUGGUGUU ACUAGU
10947	mi405	miR-208	ループ	CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUU <u>ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUAU</u> UGGAACCAGAUCUG AAUCCUGGACUGCCUACUAGU
10948	mi1155	miR-208	ループ	CUCGAGUGAGCGACAGCGCAACCUCUCCUAGAACU <u>A</u> <u>CGAGCcUUUUGCUCGUCUUAU</u> GGUUCUAGGAGAGG UUGCGCCUGCCUACUAGU
10949	mi405	miR-208	5'末端	CUCGAG <u>ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUAU</u> cUcg <u>gg</u> UGA GCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUUCUGUAAGCCA CAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCCUGGACUGCCUAC UAGU
10950	mi1155	miR-208	5'末端	CUCGAG <u>ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUAU</u> cUcg <u>gg</u> UGA GCGACAGCGCAACCUCUCCUAGAACUGUAAGCCAC AGAUGGGUUCUAGGAGAGGUUGCGCCUGCCUAC UAGU

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

配列番号	miDUX 4	miR 結合部位 (下線)	結合部位の位置	ヌクレオチド配列 (小文字-miRNA 前駆体骨格の適切な折り畳みを容易にするためのスペーサー)
10951	mi405	miR-208	3'末端	CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUCU GUAAAGCCACAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCUG GACUGCC <u>acUaga</u> ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA CUAGU
10952	mi1155	miR-208	3'末端	CUCGAGUGAGCGACAGGGCGCAACCUCUCCUAGAACUG UAAAGCCACAGAUGGGUUCUAGGAGAGGUUGCGCCU GCUGCC <u>acUaga</u> ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA UAGU
10953	mi405	5'miR-122、3'miR-208		CUCGAG <u>UUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> <u>cUggg</u> GAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUCUGUAAAGC CACAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCCUGGACUGCCU <u>acUaga</u> ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA ACUAGU
10954	mi1155	5'miR-122、3'miR-208		CUCGAG <u>UUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> <u>cUggg</u> GAGCGACAGGC <u>GAACCUCCUAGAACUGUA</u> ACAGAUGGGUUCUAGGAGAGGUUGCGCCUGCUGCCU <u>acUaga</u> ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA ACUAGU
10955	mi405	miR-122、 miR-208	5' (両方)	CUCGAG <u>UUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA <u>cUggg</u> UGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUCUGUAAAGC CACAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCCUGGACUGCCU ACUAGU
10956	mi1155	miR-122、 miR-208	5' (両方)	CUCGAG <u>UUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA <u>cUggg</u> UGAGCGACAGGC <u>GAACCUCCUAGAACUGUA</u> ACCUCUCCUAGAACUGUAAAGCCACAGAUGGGAAAC GGAGAGGUUGCGCCUGCUGCCUACUAGU
10957	mi405	miR-122、 miR-208	3' (両方)	CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUCU GUAAAGCCACAGAUGGGAAACCAGAUCUGAAUCCUG GACUGCC <u>acUaga</u> UAUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA ACUAGU
10958	mi1155	miR-122、 miR-208	3' (両方)	CUCGAGUGAGCGACAGGGCGCAACCUCUCCUAGAACUG UAAAGCCACAGAUGGGUUCUAGGAGAGGUUGCGCCU GCUGCC <u>acUaga</u> UAUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA ACUAGU
10959	mi405	miR-122 ループ、 5'miR-208		CUCGAG ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA <u>cUggg</u> UGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUCU <u>UAUUUAGU</u> GUGAUAAUGGUGUUU GGAAACCAGAUCUGAAUCCU GGACUGCCUACUAGU
10960	mi1155	miR-122 ループ、 5'miR-208		CUCGAG ACGAGCcUUUUGCUCGUCUUA <u>cUggg</u> UGAGCGACAGGC <u>GAACCUCCUAGAACU</u> <u>UAUUUAGU</u> UGAUAAUGGUGUUU GGUUCUAGGAGAGGUUGCGCC UGCUGCCUACUAGU
10961	mi405	miR-122 ループ、 3'miR-208		CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUUCAGAUCUGGUUUCU <u>UAUUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> GGAAACCAGAUC UGAAUCCUGGACUGCC <u>acUaga</u> ACGAGCcUUUUGC CGUCUUA ACUAGU

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

配列番号	miDUX 4	miR 結合部位 (下線)	結合部位の位置	ヌクレオチド配列 (小文字-miRNA 前駆体骨格の適切な折り畳みを容易にするためのスペーサー)
10962	mi1155	miR-122 ループ、 3'miR-208		CUCGAGUGAGCGACAGGCGCAACCUCUCCUAGAACU <u>UUUAGUGUGAUAAUGGUGUUUUGGUUCUAGGAGA</u> GGUUGCGCCUGCUGCC <u>ac</u> <u>Uaga</u> <u>ACGAGCc</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CGUCUUAU</u> ACUAGU
10963	mi405	miR-208 ループ、 5'miR-122		CUCGAG <u>UUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> <u>c</u> <u>UcgggU</u> GAGCGAUCCAGGAUCAGAUCUGGUUU <u>ACGAGCc</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CUCUUAU</u> GGAAACCAGAUCUGAAUCUG GACUGCCUACUAGU
10964	mi1155	miR-208 ループ、 5'miR-122		CUCGAG <u>UUUAGUGUGAUAAUGGUGUUU</u> <u>c</u> <u>UcgggU</u> GAGCGACAGGGCGAACCUUCUCCUAGAACU <u>ACGAGCc</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CUCUUAU</u> GGAAACCAGAUCUG UGCUGCCUACUAGU
10965	mi405	miR-208 ループ、 3'miR-122		CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUCAGAUCUGGUUU <u>ACGAGCc</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CUCUUAU</u> GGAAACCAGAUCUG AAUCCUGGACUGCC <u>ac</u> <u>Uaga</u> <u>UAAAAGUGUGAUAA</u> <u>UGGUGUUU</u> ACUAGU
10966	mi1155	miR-208 ループ、 3'miR-122		CUCGAGUGAGCGACAGGCGCAACCUCUCCUAGAACU <u>CGAGCc</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CUCUUAU</u> GGAAACCAGAUCUGAAUCUG UUGCGCCUGCUGCC <u>ac</u> <u>Uaga</u> <u>UAAAAGUGUGAUAA</u> <u>UGGUGUUU</u> ACUAGU
10967	mi405	miR-122 miR-122	ループ (両方)	CUCGAGUGAGCGAUCCAGGAUCAGAUCUGGUUU <u>UUUAGUGUGAUAAUGGUGUUUUGACGAGC</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CUCUUAU</u> GGAAACCAGAUCUGAAUCUG CCUACUAGU
10968	mi1155	miR-122 miR-122	ループ (両方)	CUCGAGUGAGCGACAGGCGCAACCUCUCCUAGAACU <u>UUAGUGUGAUAAUGGUGUUUUGACGAGC</u> <u>UUUUGCU</u> <u>CUCUUAU</u> GGAAACCAGAUCUGAAUCUG CCUACUAGU

〔 0 0 4 3 〕

mi70 (配列番号8482)、mi180 (配列番号8372)、mi181 (配列番号8371)、mi182 (配列番号8370)、mi185 (配列番号8367)、mi186 (配列番号8366)、mi187 (配列番号8365)、mi333 (配列番号8219)、mi334 (配列番号8218)、mi400 (配列番号8152)、mi405 (配列番号8147)、mi407 (配列番号8145)、mi1155 (配列番号7397)、mi1156 (配列番号7396)、mi1157 (配列番号7395)、mi1308 (配列番号7108)、mi1309 (配列番号7107)、mi1310 (配列番号7106)、mi1420 (配列番号6633)、mi1422 (配列番号6631)、mi1431 (配列番号6622)、mi1434 (配列番号6619)、mi1444 (配列番号6609)、mi1445 (配列番号6608)、mi1485 (配列番号6568)、mi1492 (配列番号6561)、mi1493 (配列番号6560)、mi1519 ((配列番号10971)、またはmi1520 (配列番号10972)のヌクレオチド配列を含む、mRNAの成熟ガイド鎖。これらの配列は、mir405及びmir1155の成熟ガイド鎖と同様に折り畳まれ、mi405及びmi1155の成熟ガイド鎖と同様に折り畳まれる。したがって、本発明は、mir-208結合部位配列 (配列番号5または配列番号66)、及び/またはmir-122結合部位配列 (配列番号6または配列番号67) が表1の配列に示されたものと同様の位置で上記の成熟ガイド鎖のいずれかのループに挿入されてもよい核酸分子を提供する。

(0 0 4 4)

目的のm i R N A

本発明の核酸分子は、組織特異的発現を有することが所望される任意のm i R N A転写配列の成熟ガイド鎖の配列を含み得る。例えば、一実施形態では、D U X 4 m i R N Aの骨格発現が企図される。例示的なD U X 4 m i R N A配列は、国際特許出願第P C T / U S 2 0 1 2 / 0 4 7 9 9 9号(WO 2 0 1 3 / 0 1 6 3 5 2)及び米国特許公開第U S 2 0 1 2 / 2 0 2 2 5 0 3 4号に記載されており、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 4 5】

m i D U X 4の2つの例は、m i D U X 4 - 1 (m i D u x 4 0 5、配列番号1)及びm i D U X 4 - 2 (m i D u x 1 1 5 5、配列番号2)である。D U X 4 m i R N A、及びm i R - 1 2 2、またはm i R - 2 0 8のいずれかの結合部位を含む例示的なヌクレオチド配列は、表1及び配列番号1 0 9 1 3 ~ 1 0 9 6 8に提供される。

10

【0 0 4 6】

以下のm i R N A、m i R - 1 2 2、m i R - 1 2 4、m i R - 1 4 2、m i R - 1 5 5、m i R - 2 1、m i R - 1 7 - 9 2、m i R - 1 7、m i R - 1 8 a、m i R - 1 9 a、m i R - 2 0 a、m i R - 1 9 b - 1、m i R - 2 6 a、m i R - 1 2 6、m i R - 3 3 5、l e t - 7 ファミリー：l e t - 7 a及びl e t - 7 b、m i R - 3 4 (m i R - 3 4 a)、m i R - 1 0 b、m i R - 2 0 8、m i R - 4 9 9、m i R - 1 9 5、m i R - 2 9 a、m i R - 2 9 b、及びm i R - 2 9 cのいずれかは、本発明の核酸分子を用いて、発現されてもよい。これらのm i R N Aのいずれも、所望の組織特異性及び所望の非標的化に応じて、異なる非標的配列と共に使用されてもよい。

20

【0 0 4 7】

A A V

本発明の組換えA A Vゲノムは、本発明の核酸分子、及び核酸分子に隣接する1つ以上のA A V I T Rを含む。r A A Vゲノム中のA A V D N Aは、任意のA A V血清型に由来してもよく、その組換えウイルスは、A A V血清型、A A V - B 1、A A V r h . 7 4、A A V - 1、A A V - 2、A A V - 3、A A V - 4、A A V - 5、A A V - 6、A A V - 7、A A V - 8、A A V - 9、A A V - 1 0、A A V - 1 1、A A V - 1 2、及びA A V - 1 3を含むが、これらに限定されない。偽型r A A Vの產生は、例えば、W O 0 1 / 8 3 6 9 2に開示されている。他の種類のr A A V変異体、例えば、カプシド変異を有するr A A Vもまた企図される。例えば、M a r s i c e t a l . , M o l e c u l a r T h e r a p y , 2 2 (1 1) : 1 9 0 0 - 1 9 0 9 (2 0 1 4)を参照されたい。上記の背景技術の項で述べたように、種々のA A V血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当該技術分野で既知である。骨格筋特異的発現を促進するために、A A V 1、A A V 5、A A V 6、A A V 8、またはA A V 9が使用されてもよい。

30

【0 0 4 8】

自己相補的A A V(s c A A V)ベクターもまた、本発明における使用のために企図される。s c A A Vベクターは、二量体としてパッケージングされた1 4 5塩基対のI T Rの2コピーに加えて2 2 0 0塩基対の独特的な導入遺伝子配列を含む約2 5 0 0塩基対にベクターサイズを減少させることによって、作製される。s c A A Vは、発現のために二本鎖D N A鑄型へと再び折り畳まれる能力を有する。M c C a r t h y , M o l . T h e r a p . 1 6 (1 0) : 1 6 4 8 - 1 6 5 6 , 2 0 0 8。

40

【0 0 4 9】

本発明のD N Aプラスミドは、本発明のr A A Vゲノムを含む。D N Aプラスミドは、感染性ウイルス粒子中にr A A Vゲノムを構築するために、A A Vのヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルス、E 1欠損アデノウイルス、またはヘルペスウイルス)による感染を許容できる細胞に導入される。パッケージングされるべきA A Vゲノム、r e p及びc a p遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が細胞に提供されるr A A V粒子を產生する技術は、当該技術分野で標準的である。r A A Vの產生は、以下の構成成分、r A A Vゲノム、r A A Vゲノムから分離された(すなわち、その中には存在しない)A A Vのr

50

e p 及び c a p 遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が单一細胞（本明細書中、パッケージング細胞と称される）内に存在することを必要とする。AAVのr e p 及びc a p 遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型に由来してもよく、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、及びAAV-13を含むがこれらに限定されない、rAAVゲノムITRとは異なるAAV血清型に由来してもよい。偽型rAAVの产生は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 01/83692に開示されている。

【0050】

パッケージング細胞を作製する方法は、AAV粒子产生に必要な全ての構成成分を安定に発現する細胞株を作製することである。例えば、AAVのr e p 及びc a p 遺伝子を欠くrAAVゲノム、rAAVゲノムから分離されたAAVのr e p 及びc a p 遺伝子、ならびにネオマイシン耐性遺伝子等の選択可能なマーカーを含むプラスミド（または複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれる。AAVゲノムは、GCテーリング（Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S 6. U S A, 79: 2077-2081）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む合成リンカーの付加（Laughlin et al., 1983, Gene, 23: 65-73）、または直接的な平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259: 4661-4666）などの方法によって、バクテリアプラスミドに導入されている。次いで、パッケージング細胞株を、アデノウイルス等のヘルパーウイルスに感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、rAAVの大規模な产生に好適であることである。好適な方法の他の例は、プラスミドではなくアデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いて、rAAVゲノムならびに／またはr e p 及びc a p 遺伝子をパッケージング細胞内に導入する。

【0051】

rAAV产生の一般原則は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539、及びMuzychka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158: 97-129）において総説されている。種々のアプローチが、Ratschini et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984)、Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 81: 6466 (1984)、Tratschini et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985)、McLaughlin et al., J. Virol., 62: 1963 (1988)、及びLebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7: 349 (1988)。Samulski et al. (1989, J. Virol., 63: 3822-3828)、米国特許第5,173,414号、WO 95/13365及び対応する米国特許第5,658,776号、WO 95/13392、WO 96/17947、PCT/US98/18600、WO 97/09441 (PCT/US96/14423)、WO 97/08298 (PCT/US96/13872)、WO 97/21825 (PCT/US96/20777)、WO 97/06243 (PCT/FR96/01064)、WO 99/11764、Perrin et al. (1995) Vaccine 13: 1244-1250、Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4: 609-615、Clark et al. (1996) Gene Therapy 3: 1124-1132、米国特許第5,786,211号、同第5,871,982号、ならびに同第6,258,595号に記載されている。上記の文献は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれ、特にrAAV产生に関連する文献のこれらのセクションが特に強調される。

【0052】

したがって、本発明は、感染性rAAVを产生するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、HeLa細胞、293細胞、及びPer C. 6細

10

20

30

30

40

50

胞（同種の 293 株）等の、安定して形質転換された癌細胞であってもよい。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換された癌細胞ではない細胞、例えば、低継代 293 細胞（アデノウイルスの E1 で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、MRC-5 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、WI-38 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Vero 細胞（サル腎細胞）、及び FRHL-2 細胞（アカゲザル肺細胞）である。

【0053】

本発明の組換えAAV（すなわち、感染性カプシド化 rAAV 粒子）は、rAAV ゲノムを含む。実施形態には、DUX4 miRNA hDux.mi405 をコードする（配列番号 1 に示される DNA によりコードされる）ゲノムを含む「AAV.miDUX4.405」と命名された rAAV、及び DUX4 miRNA hDux.mi1155 をコードする（配列番号 2 に示される DNA によりコードされる）ゲノムを含む「AAV.miDUX4.1155」と命名された rAAV が含まれるが、これらに限定されない。例示的な実施形態において、両方の rAAV のゲノムは、AAV rep 及び cap DNA を欠いており、すなわち、ゲノムの ITR の間に AAV rep または cap DNA は存在しない。本発明の核酸分子を含むように構築されてもよい rAAV の例は、国際特許出願第 PCT/US2012/047999 号 (WO 2013/016352) に示されており、その全体は参考により本明細書に組み込まれる。

【0054】

rAAV は、当該技術分野における標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によって精製されてもよい。ヘルパーウイルスから rAAV ベクターを精製する方法は、当該分野で既知であり、例えば、Clark et al. , Hum. Gene Ther., 10(6) : 1031-1039 (1999), Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002)、米国特許第 6,566,118 号、及び WO 98/09657 に記載されている。

【0055】

別の実施形態において、本発明は、本発明の rAAV を含む組成物を企図する。本発明の組成物は、薬学的に許容される担体中に rAAV を含む。組成物はまた、希釈剤及びアジュバント等の他の成分を含んでもよい。許容される担体、希釈剤、及びアジュバントは、レシピエントにとって非毒性であり、好ましくは、用いられる投与量及び濃度で不活性であり、リン酸塩、クエン酸塩、もしくは他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸等の抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA 等のキレート剤；マンニトールもしくはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/または Tween、ブルロニック、もしくはポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0056】

本発明の方法において投与される rAAV の力価は、例えば、特定の rAAV、投与様式、治療目標、個体、及び標的とされる細胞型（複数可）に依存して異なり、当該技術分野における標準的な方法によって決定され得る。rAAV の力価は、1 ml 当たり、約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、 1×10^{13} ~ 約 1×10^{14} 、またはそれ以上の DNase 耐性粒子 (DRP) の範囲であってもよい。投与量は、ウイルスゲノム (vg) の単位で表されてよい。

【0057】

インビポまたはインビトロで、rAAV を用いて標的細胞に形質導入する方法が、本発明によって企図される。インビポ方法は、本発明の rAAV を含む組成物の有効用量、または有効な複数用量を、それを必要とする動物（ヒトを含む）に投与する工程を含む。用

10

20

30

40

50

量が障害 / 疾患の発症前に投与される場合、その投与は予防的である。用量が障害 / 疾患の発症後に投与される場合、投与は治療的である。本発明の実施形態では、有効用量は、治療される障害 / 疾患状態に関連する少なくとも 1 つの症状を緩和（排除または軽減）する用量であり、疾患 / 疾病状態への進行を遅らせ、または予防する用量であり、疾患 / 疾病状態の進行を遅らせ、または予防する用量であり、疾患の範囲を縮小する用量であり、疾患の寛解（部分的または完全な）をもたらす用量であり、及び / または生存を延長させる用量である。本発明の方法を用いた予防または治療のために企図される疾患の例は、F S H D である。

【 0 0 5 8 】

併用療法もまた、本発明によって企図される。本明細書で使用される組み合わせには、同時治療及び逐次治療の両方が含まれる。本発明の方法と標準的な医療処置（例えば、コルチコステロイド）との組み合わせが、新規療法との組み合わせと同様に、具体的に企図される。

10

【 0 0 5 9 】

有効用量の組成物の投与は、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、経鼻、経肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、または腔を含むが、これらに限定されない当該技術分野において標準的な経路によるものであり得る。本発明の r A A V の A A V 成分（特に、A A V I T R 及びカプシドタンパク質）の投与経路（複数可）及び血清型（複数可）は、治療される感染及び / もしくは疾患の状態、ならびに D U X 4 m i R N A を発現する標的細胞 / 組織（複数可）を考慮して、当業者によって選択及び / または適合され得る。

20

【 0 0 6 0 】

本発明は、本発明の組換え A A V 及び組成物の有効量での局所投与及び全身投与を提供する。例えば、全身投与は、体全体が影響を受けるように循環系への投与である。全身投与には、胃腸管を通じた吸収等の経腸投与、及び注射、注入または移植による非経口投与が含まれる。

【 0 0 6 1 】

特に、本発明の r A A V の実際の投与は、r A A V 組換えベクターを動物の標的組織に輸送し得る任意の物理的方法を使用することによって達成されてもよい。本発明による投与には、筋肉、血流、及び / または肝臓への直接の注射が含まれるが、これらに限定されない。リン酸緩衝生理食塩水に r A A V を単に再懸濁することは、筋組織発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、r A A V と同時投与することができる担体または他の構成成分について既知の制限はない（ただし、D N A を分解する組成物は、r A A V を用いる通常の様式では回避されるべきである）。r A A V のカプシドタンパク質は、r A A V が、筋肉などの目的の特定の標的組織を標的とするように改変されてもよい。例えば、参照によりその開示内容が本明細書に組み込まれる、W O 0 2 / 0 5 3 7 0 3 を参照されたい。医薬組成物は、注射可能な製剤として、または経皮輸送によって筋肉に送達される局所製剤として調製ができる。筋肉内注射及び経皮的輸送の両方のための多数の製剤が既に開発されており、本発明の実施に使用することができる。r A A V は、投与及び取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用することができる。

30

【 0 0 6 2 】

筋肉内注射の目的で、ゴマ油もしくはピーナッツ油等のアジュバント中、または水性プロピレングリコール中の溶液、ならびに滅菌水溶液が用いられ得る。そのような水溶液は、必要に応じて緩衝化することができる。液体希釈剤は、最初に生理食塩水またはグルコースで等張にすることができる。遊離酸（D N A が酸性リン酸基を含む）または薬理学的に許容される塩としての r A A V の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤と水中で好適に混合して調製することができる。r A A V の分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中、ならびに油中で調製することができる。通常の保存及び使用条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。これに関連して、用いられる滅菌水性媒体は全て、当業者に周知の標

40

50

準的な技術によって容易に得ることができる。

【 0 0 6 3 】

注射用途に好適な薬学的形態には、滅菌水溶液または分散液、及び滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、その形態は無菌でなければならず、容易に注射可能となる程度に流体でなければならない。それは製造及び保存の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌等の微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、それらの好適な混合物、及び植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合は必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサール等によってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用により、注射用組成物の長期吸収をもたらすことができる。

【 0 0 6 4 】

滅菌注射溶液は、必要に応じて、必要な量の r A A V を、上記に列挙した種々の他の成分とともに適切な溶媒に組み込み、続いて濾過滅菌することにより調製される。一般に、分散液は、滅菌された活性成分を、塩基性分散媒体及び上記に列挙したものから必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製の方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技術であり、予め滅菌濾過した活性成分及び任意の追加の所望の成分の溶液からそれらの粉末が得られる。

【 0 0 6 5 】

r A A V による形質導入は、インピトロで行うこともできる。一実施形態では、所望の標的筋細胞が対象から取り出され、r A A V で形質導入され、対象に再導入される。代替的に、それらの細胞が対象において不適切な免疫応答を惹起しない場合、同一遺伝子型または異種の筋細胞を使用することができる。

【 0 0 6 6 】

形質導入、及び形質導入された細胞を対象に再導入するための好適な方法は、当該技術分野において既知である。一実施形態では、例えば、適切な培地中で、r A A V を筋細胞と組み合わせ、ササンプロット及び／もしくは P C R 等の従来の技術を用いて、または選択可能なマーカーを用いて、目的の D N A を有する細胞についてスクリーニングすることにより、細胞がインピトロで形質導入され得る。形質導入された細胞は、次いで、薬学的組成物中に製剤化でき、その組成物は、種々の技術によって、例えば、筋肉内、静脈内、皮下、及び腹腔内注射によって、または、例えば、カテーテルを使用して平滑筋及び心筋内に注射することによって、対象に導入することができる。

【 0 0 6 7 】

本発明の r A A V による細胞の形質導入は、D U X 4 m i R N A の持続的な発現をもたらす。したがって、本発明は、D U X 4 m i R N A を発現する r A A V を動物、好ましくはヒトに投与／送達する方法を提供する。これらの方法には、本発明の 1 つ以上の r A A V で組織（筋肉等の組織、肝臓及び脳等の器官、ならびに唾液腺等の腺を含むが、これらに限定されない）に形質導入することが含まれる。形質導入は、組織特異的制御エレメントを含む遺伝子カセットを用いて行われてもよい。例えば、本発明の一実施形態は、アクチン及びミオシン遺伝子ファミリーに由来するもの、例えば、m y o D 遺伝子ファミリーなどに由来するもの [Weintraub et al., Science, 251: 761-766 (1991) を参照のこと]、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 M E F - 2 に由来するもの [Cserejesi and Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)]、ヒト骨格アクチン遺伝子 [Muscat et al., Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)]、心筋アクチン遺伝子、筋クリアチンキナーゼ配列エレメント [Johnson et al.

10

20

30

40

50

, Mol Cell Biol, 9:3393-3399 (1989) を参照のこと]、及びネズミクレアチンキナーゼエンハンサー (mCK) エレメントに由来する制御エレメント、骨格速筋トロポニンC 遺伝子、遅筋心筋トロポニンC 遺伝子、及び遅筋トロポニンI 遺伝子：低酸素誘導性核因子 (Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88:5680-5684 (1991))、グルココルチコイド応答エレメント (GRE) を含むステロイド誘導性エレメント及びプロモーター (Made and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607 (1993) を参照のこと) に由来する制御エレメント、ならびに他の制御エレメントを含むが、これに限定されない、筋肉特異的制御エレメントにより導かれる筋細胞及び筋組織に形質導入する方法を提供する。

10

【0068】

筋組織は、生命維持に不可欠な器官ではなく、かつ到達しやすいため、インビオでのDNA送達の魅力的な標的である。本発明は、形質導入された筋線維からのmiRNAの持続的な発現を企図する。

【0069】

「筋細胞」または「筋組織」とは、任意の種類の筋肉（例えば、消化管、膀胱、血管、または心組織からの骨格筋及び平滑筋）由来の細胞または細胞群を意味する。筋芽細胞、筋細胞、筋管、心筋細胞、及び心筋芽細胞等の、上記のような筋細胞は、分化または未分化であり得る。

【0070】

「形質導入」という用語は、レシピエント細胞によるDUX4 miRNAの発現をもたらす、本発明の複製欠損rAAVを介した、インビオまたはインビトロのいずれかでの、レシピエント細胞へのDUX4 miRNAの投与/送達を意味するように使用される。

20

【0071】

したがって、本発明は、DUX4 miRNAをコードするrAAVの有効用量（または本質的に同時に投与される用量、もしくは間隔をあけて投与される用量）を、それを必要とする患者に投与する方法を提供する。

【0072】

DUX4 及び顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー

筋ジストロフィー (MD) は、遺伝性疾患群である。この群は、運動及び呼吸を制御する骨格筋の進行性の衰弱及び変性によって特徴付けられる。いくつかの形態のMDは幼年期または小児期に発症するが、中年以降まで発症しないものもある。この障害は、筋力の低下（いくつかの形態のMDは心筋にも影響を及ぼす）の分布及び程度、発病年齢、進行速度、ならびに遺伝パターンに関して異なる。

30

【0073】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) は、顔、肩、及び四肢の筋肉の進行性及び非対称性の衰弱を特徴とする、複合常染色体優性遺伝疾患である。症状は、成人期に典型的に起こり、ほとんどの患者は30才までに臨床的特徴を示す。患者の約5%が乳幼児または若年者として症状を発症し、彼らは概してより重症である。臨床症状は、軽度（ある程度限定的な筋力低下）から重度（車椅子依存）まで様々であり得る。歴史的に、FSHDは、3番目に一般的なMDに分類され、全世界で2万人あたり1人に発症している。しかしながら、最近のデータは、FSHDがヨーロッパで最も一般的なMDであることを示し、世界的な発生率が8,333人あたり1人にもなり得ることを示唆している。

40

【0074】

典型的なFSHDの症例 (FSHD1A、これまでFSHDと称されてきた) は、ヒト染色体4q35上の3.3キロベース (kb) のD4Z4反復配列のコピー数を減少させるヘテロ接合性染色体欠失に関連している。簡潔に言えば、正常な個体は、両方の4q35対立遺伝子上に11~100個の縦列反復D4Z4のコピーを有するのに対し、FSHD患者は、1つの正常な対立遺伝子と、1~10個の反復配列を含む1つの収縮した対立遺伝子とを有する。加えて、FSHDに関連するD4Z4の収縮は、特定の疾患許容性染

50

色体4q35バックグラウンド(4qAと呼ばれる)で起こらなければならない。重要なことに、FSHD関連欠失の結果として、遺伝子が完全に失われるか、または構造的に変異することはない。代わりに、FSHDに関連する遺伝的变化は、筋肉を損傷する毒性DUX4遺伝子の発現を引き起こす。FSHD2(FSHD1Bとしても知られている)は、FSHD1と表現型的に同一であり、DUX4の発現と関連し、4qA染色体バックグラウンドを必要とする。FSHD2は、D4Z4反復配列の収縮には関連していないが、代わりに、通常4qAでDUX4遺伝子座の抑制に関与するクロマチン調節因子であるSMCHD1遺伝子の突然変異によって引き起こされる。突然変異したSMCHD1タンパク質は、ヘテロクロマチンを4qA DUX4対立遺伝子に付加することに関与できず、それによってDUX4遺伝子の発現を可能にする。

10

【0075】

主要なFSHD病因モデルでは、D4Z4の収縮がDUX4遺伝子の発現を可能にするエピジェネティックな変化を引き起こすと提案されている。その結果、別様にサイレントなまたはほぼサイレントなDUX4遺伝子、及びそれが制御する遺伝子(複数可)の異常な過剰発現が、最終的にFSHDを引き起こす可能性がある。このモデルは、正常な4q35 D4Z4反復配列がヘテロクロマチン特性を有するのに対し、FSHDに関連するD4Z4反復配列は活性に転写されたユーロクロマチンをより多く示す特徴を含むことを示すデータと一致している。これらの転写許容性のエピジェネティック変化は、完全な一染色体性のD4Z4欠失(すなわち、反復配列がゼロ)がFSHDを引き起こさないという観察と合わせて、D4Z4反復配列が、FSHDの筋肉において異常に発現される、潜在的に筋障害性のオープンリーディングフレーム(ORF)を有するという仮説を裏付ける。この概念は、DUX4と呼ばれるD4Z4局在化ORFが最初に同定された1994年に最初に検討された。しかしながら、その遺伝子座は、発現していない偽遺伝子のいくつかの特徴を有しており、したがってDUX4はFSHD候補として即座に却下された。その後何年間も、FSHD関連遺伝子の探索は主にD4Z4反復配列以外に焦点を当てていたが、これらの研究から興味深い候補がいくつか出現したものの、FSHDの発症と決定的に関連付けられる単一遺伝子は存在しなかった。この遅い進展により、2007年にFSHD候補としてDUX4が再登場した。しかし、2010年の時点でも、研究者は、候補として他の遺伝子に注目し続けていた。例えば、FSHD領域遺伝子1(frg1)に注目している、Wuebbles et al., Int. J. Clin. Exp. Pathol., 3(4):386-400(2010)を参照のこと。対照的に、Wallace et al., Mol. Ther., 17(Suppl. 1):S151(2009)、Wei et al., Mol. Ther., 17(Suppl. 1):S200(2009)、及び2010年8月19日のScience express号のLemmersらの報告は、DUX4に注目している。Neguembor and Gabelini, Epigenomics, 2(2):271-287(2010)は、FSHDに関する最近の総説論文である。

20

【0076】

FSHDの病因におけるDUX4の役割は、以下のように説明することができる。第1に、D4Z4反復配列は同一のDUX4コード領域を含み、また、D4Z4反復配列は、いくつかの類似したマイクロRNAを含む、より小さいセンス及びアンチセンス転写物も有する。過剰発現されたDUX4転写物及び約50kDaの全長DUX4タンパク質は、FSHD患者からの生検及び細胞株で見出される。これらのデータは、FSHDの病因の転写抑制解除モデルと一致する。加えて、偽遺伝子とは異なり、縦列整列したD4Z4反復配列は、少なくとも11種の異なる胎盤哺乳動物種において保存されており(非胎盤動物にはD4Z4反復配列がない)、DUX4のORF内に生じる最大の配列保存であるため、D4Z4反復配列及びDUX4は機能的に重要である可能性が高い。第2に、過剰発現されたDUX4は、組織培養細胞、及びインビオで発達中の下等生物の胚性前駆体に対して毒性を示す。この毒性は、少なくとも部分的には、DUX4トランスクレクト細胞におけるカスパーゼ-3の活性化と、2細胞期でDUX4 mRNAを注入された発育停止

30

40

50

アフリカツメガエル胚におけるTUNEL陽性核の存在とにより示される、アポトーシス促進性機序によって生じる。これらの知見は、カスパーゼ-3を含むいくつかのアポトーシス促進性タンパク質がFSHD患者の筋肉に存在することを示す研究と一致する。アポトーシスを刺激することに加えて、DUX4は、筋形成を負に制御し得る。ヒトDUX4は、潜在的にPAX3及び/またはPAX7を妨害することによってインビトロでマウスC2C12筋芽細胞の分化を阻害し、ゼブラフィッシュ胚またはアフリカツメガエル胚の前駆細胞に送達されると、発育停止及びいくつかの筋肉マーカーの染色低下を引き起こす。最後に、異常なDUX4機能は、FSHD患者の筋肉に見られる潜在的に重要な分子変化に直接関連する。具体的には、全長ヒトDUX4は、約50kDaの二重ホメオドメイン転写因子をコードし、DUX4標的は、FSHD患者の筋肉において上昇したレベルで見出され得る。これらのデータは、DUX4が、正常な筋肉の完全性を維持することと矛盾する多数の下流分子変化を触媒することを裏付ける。

10

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】野生型U6-1プロモーター（配列番号3）、及びPSE領域内に変異を有する減弱化されたU6-1プロモーター（配列番号4）を示す。図1では、PSE領域に下線が引かれている。

【0078】

【図2A】DUX4標的化miRNAの配列を示す。各パネルにおいて、上の配列はDNA鑄型を示し、そこから各々のmiRNAが転写される。上部パネルにおいて、DNA鑄型miDUX4.405（miDUX4-1またはmi405）は、配列番号1である。下部パネルでは、DNA鑄型miDUX4.1155（miDUX4-2；またはmi1155）は、配列番号2である。折り畳まれたmiRNA転写物は、ヘアピン構造として示される。miDUX4.405折り畳みmiRNAは、配列番号8である。miDUX4.1155折り畳みmiRNAは、配列番号9である。成熟miDUX4.405及びmiDUX4.1155配列は、宿主miRNAプロセシング機構（Drosophila、DGCR8、Dicer、及びExportin-5を含む）による標的細胞におけるプロセシングに続いて生じる。灰色で網掛けされた配列は、各miRNAをU6T6ベクターにクローニングするために使用される制限部位を示す。CTCGAGはXhoI部位であり、ACTAGTはSpeI部位である（RNAでは、CUCGAG及びACUAGU、Uはウラシル塩基である）。赤色の配列は、最終的にDUX4標的mRNAの切断を触媒するのに役立つ成熟miRNAアンチセンスガイド鎖を示す。この配列も、この図のmiRNAヘアピン部分に下線が引かれている。灰色及び黒色の矢印は、それぞれDrosophila及びDicerが触媒する切断部位を示す。番号13、35、53、及び75は、方向付けのために設けられている。位置35～53の間（及び両端を含む）の配列は、位置39のAを除いて天然のヒトmir-30a配列に由来し、Gが正常なmir-30a配列である。このスクレオチドでは、in silico RNA折り畳みモデルに基づいて、miRNAループの折り畳みを促進するためにAに変更された。骨格の塩基（5'の位置13及び3'の位置75）もまた、mir-30a構造及び配列に由来し、ガイド鎖の一次配列に依存していくつかの変更を伴う。具体的には、13位のスクレオチドは、13位と75位のスクレオチド間で必要とされるミスマッチを容易にするのに役立つように変化し得る。この膨れた構造は、適切なDrosophila切断を促進すると仮定される。

20

【図2B】同上。

【0079】

【図3】変更U6プロモーターシステムの一例を示す。パネルAは、miDUX4を発現するいくつかのtMCKシステムを示し、V5標識DUX4を過剰発現するヒト筋芽細胞においてそれらの機能が試験された。代表的なウェスタンは、U6.miDUX4に匹敵するレベルでサイレンシングされたDUX4タンパク質である、本発明の最良のtMCK.miDUX4（Var1）を示す。パネルBは、減弱化されたU6プロモーター-miDUX4の開発を示す。WT U6プロモーターは、高レベルのshRNA/miRNA発

30

40

50

現を駆動し、一方、減弱化されたバージョン (wU6) は、標的遺伝子サイレンシングに有意な影響を及ぼさずに約16倍少ない転写物を产生する。ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼがDUX4配列を含み、miDUX4によってサイレンシングされ得るルシフェラーゼアッセイにおいて、miDUX4について同様の結果が観察された。

【0080】

【図4】miDUX4を心臓及び肝臓で非標的化する戦略を示す。mir-122(肝臓)及びmir-208(心臓)のための完全な結合部位を図に示す。mir-122改変miDUX4がDUX4-ルシフェラーゼ標的に対して機能的であるという証拠、ならびに、mir-122を発現する肝臓細胞が、mir-122結合部位がmiDUX4配列に含まれる場合に、miDUX4サイレンシングを阻害し得るという証拠。

10

【0081】

【図5】ヒトDUX4 DNA配列(配列番号7)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0082】

配列

配列番号1 (miDUX4.405またはmiDUX4-1)

【0083】

配列番号2 (miDUX4.1155またはmiDUX4-2)

【0084】

配列番号10~10912、10971、10972、例示的miRNA成熟ガイド鎖
スクレオチド配列

20

【0085】

配列番号3、野生型U6-1プロモーター

【0086】

配列番号4、PSE領域内に突然変異を有する、減弱化されたU6-1プロモーター

【0087】

配列番号5、mir-122(5' TATTTAGTGAT AATGGTGT 3')の結合部位

30

【0088】

配列番号6、miRNA-208(5' ACAGAGCcTTT GCTCGTC TT AT 3')の結合部位

30

【0089】

配列番号8、miDUX4.405(miDUX4-1)折り畳みmiRNA

【0090】

配列番号9、miDUX4.1155(miDUX4-2)折り畳みmiRNA

【0091】

配列番号7、DUX4遺伝子配列

【0092】

配列番号10913~10968、miDUX4の成熟ガイド鎖、及びmir-122またはmir-208の結合部位を含む、例示的な核酸配列(表1にも示される)

40

【0093】

配列番号10969、mir-122(5' UAUUUAGU GUGAUAAUGG UGUUU 3')の結合部位

【0094】

配列番号10970、mir-208(5' ACAGAGCcUUU GCUUCGUC UUAU 3')の結合部位

【0095】

配列番号10973、miDUX4.405(miDUX4-1)成熟ガイド鎖スクレオチド配列

【0096】

50

配列番号 10974、m i D U X 4 . 1155 (m i D U X 4 - 2) 成熟ガイド鎖又クレオチド配列

【0097】

本明細書中、成熟ガイド鎖配列がDNA配列として提示される場合、当業者は、このDNA配列がRNAへの転写のための鑄型として機能し、チミジン塩基がウリジン塩基に変換されることを理解するだろう。実施例

【実施例】

【0098】

したがって、本発明の態様及び実施形態は、以下の実施例により説明される。実施例1は、肝臓及び心臓を非標的化した、減弱化されたプロモーターシステムを記載する。実施例2は、DUX4 miRNAのmiRNA発現の効果を測定するためのルシフェラーゼアッセイを記載する。実施例3は、DUX4 miRNAをコードするrAAVベクターを記載する。

10

【0099】

実施例1

肝臓及び心臓を非標的化した、減弱化されたU6プロモーターシステム

筋肉は、大過剰量のmiRNAによる損傷を受けやすい。したがって、骨格筋特異的miRNA発現のための変更U6プロモーターシステムが開発された。野生型U6プロモーターを、図1に示されるような近位配列エレメントにおいて変異させた。この突然変異は、Suh y et al., Mol. Therapy 20:1737-1749, 2012に記載されているように、肝炎治療のためのHCV破壊の効力を維持しながら、U6転写を弱め、AAV8において16倍少ないshRNA転写を産生する。本実験では、ウミシイタケルシフェラーゼがDUX4配列を含むルシフェラーゼアッセイを用いて、m i D U X 4を駆動するこの減弱化されたU6(wU6)システムを含む核酸分子が、インピトロで有意なDUX4サイレンシングを達成した。(図3B)。

20

【0100】

しかしながら、提案された減弱化されたU6プロモーターシステムは広範に活性があるので、最高レベルの安全性を達成するために、このプロモーターシステムは、可能な限り骨格筋への発現に限定するように、さらに変更される。骨格筋特異的発現のための1つの選択肢は、AAV6ベクターを使用することであり、これは、AAV6ベクターが主に、血管送達後に骨格筋、肝臓、及び心臓に形質導入し、他の組織では有意に少ないためである。肝臓及び心臓における発現を避けるために、変更U6プロモーターシステムは、それらの組織においてm i D U X 4を非標的化する。これを行うために、図4に示されるように、m i r - 122及びm i r - 208(肝臓及び心臓特異的天然マイクロRNA)の完全な結合部位が、m i D U X 4転写物内の様々な位置に組み込まれる。以下の実施例2に記載されるDUX4-ルシフェラーゼ標的を用いて、非標的化m i D U X 4転写物を、それぞれ肝臓及び心臓におけるm i R - 122及びm i R - 208 R I S C複合体によって破壊した。

30

【0101】

実施例2

DUX4 miRNAの発現の効果のためのルシフェラーゼアッセイ

DUX4 miRNAの存在下で、DUX4標的配列の発現をアッセイした。リポフェクタミン2000トランスフェクションを、96ウェルの白壁アッセイプレート中の293細胞で行った。DUX4標的配列を含む20ngのウミシイタケ-ホタルのプラスミドと、実施例1のU6T6駆動m i D u x 4 . 405またはm i D u x 4 . 1155ベクターを含む180ngの種々のDUX4 miRNAコード化ベクターとを用いて、140,000個の細胞をトランスフェクトした。24時間後にルシフェラーゼアッセイを実施した。

40

【0102】

培地を細胞から除去し、ウェル当たり20μlの溶解緩衝液を添加した。50μlのル

50

シフェラーゼ基質を添加する前に、プレートをシェーカーに室温で15分間置いた。最初の読み取りは10分後に行われた。次に、50 μlのStop and Goルシフェラーゼ基質を加え、10分後に2回目の読み取りを行った。Renilla発現をfirefly発現で割ることにより、相対的発現を算出した。次いで、相対的発現を、EGFPを標的とする対照mRNAでトランスフェクトした細胞の発現に対して正規化した。DUX4 mRNA midiDUX4.405及びmidiDUX4.1155は、トランスフェクトされた細胞におけるルシフェラーゼタンパク質発現を減少させるのに最も有効であった。以下の実施例1に記載されるDUX4-ルシフェラーゼ標的を用いて、非標的化midiDUX4転写物を、それぞれ肝臓及び心臓におけるmir-122及びmir-208RISC複合体によって破壊される。

10

【0103】

実施例3

DUX4マイクロRNAをコードするrAAVの产生

HEK293細胞における3つのプラスミド[pAdhelper、AAVヘルパー、及びmidiDUX4を含むrAAVゲノム、以下に詳細に記載される]の同时トランスフェクションによりrAAVベクターを产生し、次いで、細胞を回収し、ベクター精製、力価測定、及び品質管理アッセイを行った。

【0104】

プラスミド：pAdhelperは、アデノウイルス遺伝子E2A、E4 ORF6、及びVA I/IIを含み、AAVヘルパープラスミドは、AAV rep2及びcap6を含み（例えば、AAV血清型6調製物については、カプシド遺伝子はcap6と呼ばれ得る）、rAAVプラスミドは、ベクターにパッケージングされる遺伝子エレメントに隣接するAAV逆位末端反復（ITR）配列を含む。AAV.midiDUX4については、これには、CMV.eGFPレポーター遺伝子の上流にクローニングされるU6.midiDUX4が含まれる。

20

【0105】

トランスフェクション：CapO4を使用して、4:4:1（1プレートあたり20 μgのpAdヘルパー:20 μgのAAVヘルパー:5 μgのrAAVベクタープラスミド）の比で、293細胞（Corning 10-Stack）にプラスミドをトランスフェクトした。

30

【0106】

細胞採取：トランスフェクションの48時間後、細胞を回収し、5 × 10⁶個の細胞/mlの密度で、20 mM Tris（pH 8.0）、1 mM MgCl₂、及び150 mM NaCl（T20M1N150）中に再懸濁した。細胞を4回の連續凍結/解凍サイクルによって溶解し、細胞溶解物の清澄化の前に、ベンゾナーゼヌクレアーゼ（AIC、ストック：250 U/μl）を最終濃度90 U/mlとなるように加えた。

【0107】

ベクター精製及び力価測定：清澄化した溶解物を、以前に記載されているように（Xiao, X et al., J. Virol. 72: 2224-32）、イオジキサノール段階勾配精製に供した。40%イオジキサノール層（rAAVを含む）を無塩希釈緩衝液（pHは血清型に応じて異なる）で5倍に希釈し、Hi-Trap HP-Q/Sカラムに適用した。NaCl塩勾配で溶出して、ピーカ1 ml画分（典型的には3~5）をプールし、T20M1N200（pH 8.0）で透析し、次いで、滅菌濾過し、0.001%のPluronic F68を補足した。ベクターは-80°で保存される。精製されたウイルスを、以前に記載されたように[Schnepf and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002)]、Q-PCRを用いて、vgについて力価測定した。

40

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目1）

改変U6プロモーター配列、少なくとも1つの非標的配列を含むmRNAの成熟ガイド

50

ド鎖、及び 5' 末端に 5 ~ 6 つのチミジンを含む、核酸分子。

(項目 2)

前記非標的配列が、m i R N A - 1 2 2 または m i R N A 2 0 8 の結合部位である、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 3)

前記改変 U 6 プロモーター配列が、近位配列エレメント (P S E) 領域または遠位配列エレメント (D S E) に少なくとも置換、挿入または欠失を含む、項目 1 または 2 に記載の核酸分子。

(項目 4)

前記改変 U 6 プロモーター配列が、P S E 配列中のヌクレオチド - 6 6 のシトシンのチミジンへの置換、ヌクレオチド - 5 7 のシトシンのチミジンへの置換、及びヌクレオチド - 5 2 のチミジンのシトシンへの置換を含む、項目 1 または 2 に記載の核酸分子。

10

(項目 5)

前記 m i R N A の成熟ガイド鎖が、m i D U X 4、m i R N 9 2、m i R N A - 1 7、m i R N A - 1 8 a、m i R N A - 1 9 a、m i R N A - 2 0 a、m i R N A - 1 9 b - 1、m i - R N A - 2 6 a、m i R N A - 1 2 6、m i R N A - 3 3 5、l e t - 7 a 及び l e t - 7 b、m i R N A - 3 4、m i R - 3 4 a、m i R N A - 1 0 b、m i R N A - 2 0 8、m i R N A - 4 9 9、m i R N A - 1 9 5、m i R N A - 2 9 a、m i R N A - 2 9 b、または m i R N A - 2 9 c である、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

20

(項目 6)

前記 m i R N A の成熟ガイド鎖が、配列番号 8 4 8 2、配列番号 8 3 7 2、配列番号 8 3 7 1、配列番号 8 3 7 0、配列番号 8 3 6 7、配列番号 8 3 6 6、配列番号 8 3 6 5、配列番号 8 2 1 9、配列番号 8 2 1 8、配列番号 8 1 5 2、配列番号 8 1 4 7、配列番号 8 1 4 5、配列番号 7 3 9 7、配列番号 7 3 9 6、配列番号 7 3 9 5、配列番号 7 1 0 8、配列番号 7 1 0 7、配列番号 7 1 0 6、配列番号 6 6 3 3、配列番号 6 6 3 1、配列番号 6 6 2 2、配列番号 6 6 1 9、配列番号 6 6 0 9、配列番号 6 6 0 8、配列番号 6 5 6 8、配列番号 6 5 6 1、配列番号 6 5 6 0、配列番号 1 0 9 7 1、または配列番号 1 0 9 7 2 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

30

(項目 7)

前記 m i R N A の成熟ガイド鎖が m i D U X 4 である、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

(項目 8)

配列番号 1、2、または 1 0 9 1 3 ~ 1 0 9 6 8 のいずれか 1 つの核酸配列を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

30

(項目 9)

項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

(項目 10)

前記ベクターが、プラスミド、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ウマ随伴ウイルス、アルファウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、またはワクシニアウイルスである、項目 9 に記載のベクター。

40

(項目 11)

項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、組換えアデノ随伴ウイルス。

(項目 12)

前記 A A V が、A A V 6、A A V r h . 7 4、または A A V - B 1 である、項目 1 1 に記載の組換えアデノ随伴ウイルス。

(項目 13)

項目 9 もしくは 1 0 に記載のベクターまたは項目 1 1 もしくは 1 2 に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む、組成物。

50

(項目 1 4)

細胞内の遺伝子の発現を阻害する方法であって、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物と前記細胞を接触させることを含む、方法。

(項目 1 5)

細胞における DUX4 遺伝子の発現を阻害する方法であって、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物と前記細胞を接触させることを含む、方法。

(項目 1 6)

DUX4 miRNA をコードする DNA をそれを必要とする動物の骨格筋に送達する方法であって、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物を前記動物に投与することを含む、方法。

10

(項目 1 7)

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療する方法であって、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 1 8)

前記組換えアデノ随伴ウイルスが、筋肉内注射、経皮輸送、血流への注射、または肝臓への注射によって投与される、項目 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 9)

細胞内の遺伝子の発現を阻害するための医薬の調製のための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物の使用。

20

(項目 2 0)

細胞内の DUX4 遺伝子の発現を阻害するための医薬の調製のための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物の使用。

(項目 2 1)

DUX4 miRNA をコードする DNA をそれを必要とする動物の骨格筋へ送達するための医薬の調製のための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物の使用。

30

(項目 2 2)

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための医薬の調製のための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物の使用。

(項目 2 3)

前記医薬が、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射のために製剤化される、項目 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の使用。

(項目 2 4)

細胞内の遺伝子の発現を阻害するための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物を含む、組成物。

40

(項目 2 5)

細胞内の DUX4 遺伝子の発現を阻害するための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物を含む、組成物。

(項目 2 6)

DUX4 miRNA をコードする DNA をそれを必要とする動物の骨格筋へ送達するための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組換えアデノ随伴ウイルスまたは項目 1 3 に記載の組成物を含む、組成物。

(項目 2 7)

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載

50

の核酸分子を含む組換えアデノ隨伴ウイルスまたは項目13に記載の組成物を含む、組成物。

(項目28)

前記組成物が、筋肉内注射、経皮輸送、または血流への注射のために製剤化される、項目24～27のいずれか1項に記載の組成物。

【図面】

【図1】

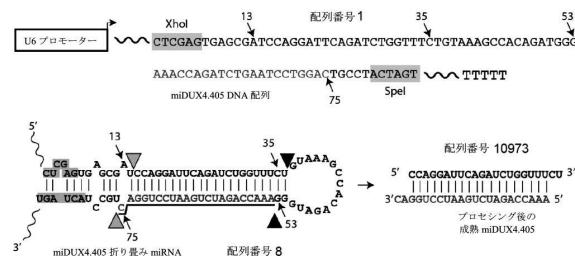
配列番号3- 野生型U6-1プロモーター

ACGTGACGGAGCGTGACCGCGCGCCAGGGCAGGAGAG
GCCTATTCAGATTCATATTCGATACAGATAAGGCTTGGAGAGAT
AATAGAATAATTGACTGAAACACAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTA
GAAAGTAATAATTCTGGGTAGTTGAGTTAAATATTGTTAAATGGACT
ATCATATGCTTACCGTAACITGAAGATATTGATTCGATTCTGGCTTATATCTTGCT
GAAAGGACGAAACACCCCTCGAG

配列番号4: PSE領域内に変異を有する減弱化されたU6-1プロモーター

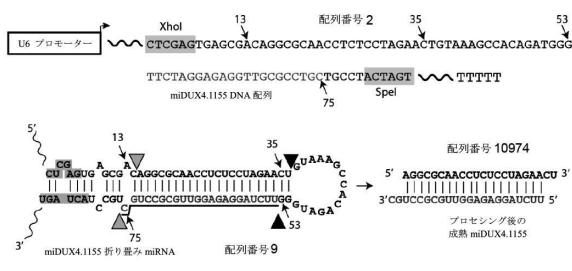
ACGTGACGGAGCGTGACCGCGCGCCAGGGCAGGAGAG
GCCTATTCAGATTCATATTCGATACAGATAAGGCTTGGAGAGAT
AATAGAATAATTGACTGAAACACAAGATATTAGTACAAATACGTGACGTA
GAAAGTAATAATTCTGGGTAGTTGAGTTAAATATTGTTAAATGGACT
ATCATATGTTACCGTAAGGAAACAAATGATTGATTCGATTCTGGCTTATATCT
TGTGGAAAGGACGAAACACCCCTCGAG

【図2A】

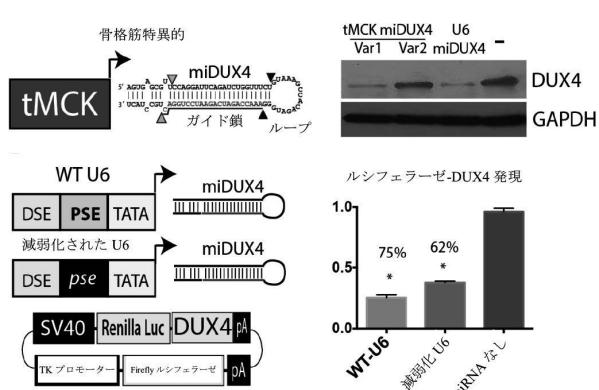


10

【図2B】



【図3】



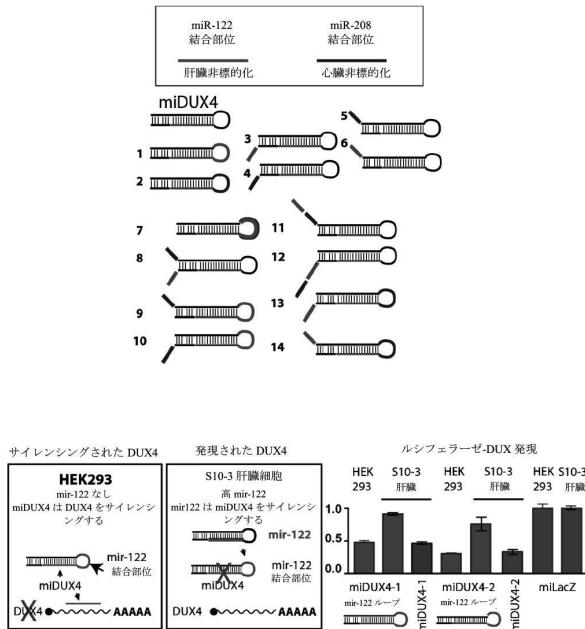
20

30

40

50

【 図 4 】



【 四 5 】

cccccccccc cccccccacc caccacacc accaccaccc cgccgcggcc caggctccg 61
ccgcctgggt cccctccggg gtgggggggg ctgtccagg gggttcaccc gccattctcg 121
aagggttgtt aagggttgtt gctgcctgc ctgtggccct ttacaagggg ggtgtctggg ctgtggctgg 181
tgcggccgg ggccttcggc tgccatccgg gtcgtgcaca ggccggccgg ggtgcacagg 241
acggccgcgg ctcttcgggg cccggctccg ctggtaatgggg tccggccggg gtcggccggg 301
atggcccccgg cccggccatcc ggacggaccc ctccggccggg aaggccgggg acggaggccgg 361
cgacggagac tgggtttggc cccggaccaa agggacggcc ctggacggcc ctggacggctg ctggacggccg 421
aacccgttacc cccggatccgg cccggacggaa cccggccggcc aggtccatgggg cggccggccgg cattccgggg 481
ccccggggccg agatgtttgg tcaatgtatgg agatccggcc aggtggggcc acggccggccgg 541
gaatcttccgg ctggccgggg cggacggccgg cccggccgggg cggccggccgg gggccggccgg 601
tgcacccggat cccggccgggg ctggcttcgg ctggccgggg cggccggccgg aaggatggatc ctggccggccgg 661
atccggccggg gggggggggat ggcggccgggg cccggccgggg acggccggccgg cggatccgggg 721
tggttttccgg atggaaaggcc cccggccgggg cggccggccgg gtcacccgggg ctccggccgggg 781
ggccggccgggat gccggccggcc cccggccgggg gtcacccgggg ctccggccgggg 841
ggccatccggat cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg cccggccggccgg acggccggccgg 901
gttccatccgg atgggggtttt ctggatggccgg acggccggccgg cccggccgggg cccggccggccgg 961
ggggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg cccggccggccgg gggccggccgg 1021
acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg cccggccggccgg gggccggccgg 1081
tacggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg cccggccggccgg gggccggccgg 1141
ccggccggccgg gccaaaaggcc ggccggccgg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg 1201
tgcggccgggg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg cccggccggccgg 1261
ccacccacggat cccggccgggg tccatgggggg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg 1321
ggccggccgggg aaccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg 1381
tccggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccggccgg 1441
ggccggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccggccgg 1501
ggccggccggccgg tccatgggggg acggccggccgg cccggccgggg acggccggccgg cccggccggccgg 1561
ggccggccggccgg ttttagggccgg ggggttgggg cccggccgggg tccatgggggg acggccggccgg 1621

【配列表】

0007253379000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 12 N	15/113 (2010.01)	F I	C 12 N	15/113	Z
C 12 N	15/864 (2006.01)		C 12 N	15/864	100Z

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハーパー, スコット クエントン

アメリカ合衆国 オハイオ 43065, パウエル, ブライアーベンド ブールバード 384

合議体

審判長 上條 肇

審判官 飯室 里美

審判官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第2013/016352 (WO, A1)

米国特許出願公開第2014/0194322 (US, A1)

Nucleic Acids Research, 1992年, Vol. 20, No. 18
, p. 4903 - 4912Molecular Therapy, 2012年, Vol. 20, No. 9, p. 173
7 - 1749

Gene Therapy, 2011年, Vol. 18, p. 199 - 209

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N, A61P, A61K

BIOSIS/MEDLINE/CAplus/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)