

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6832280号  
(P6832280)

(45) 発行日 令和3年2月24日(2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月3日(2021.2.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/12	(2006.01)	C 12 N	15/12	Z N A
C 12 N 15/864	(2006.01)	C 12 N	15/864	1 O O Z
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K	48/00	
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K	31/7088	
A 61 P 21/04	(2006.01)	A 61 P	21/04	

請求項の数 18 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-536343 (P2017-536343)  
 (86) (22) 出願日 平成28年1月15日 (2016.1.15)  
 (65) 公表番号 特表2018-503374 (P2018-503374A)  
 (43) 公表日 平成30年2月8日 (2018.2.8)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/013733  
 (87) 國際公開番号 WO2016/115543  
 (87) 國際公開日 平成28年7月21日 (2016.7.21)  
 審査請求日 平成31年1月7日 (2019.1.7)  
 (31) 優先権主張番号 62/104,537  
 (32) 優先日 平成27年1月16日 (2015.1.16)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73) 特許権者 517075883  
 ユニバーシティ オブ ワシントン  
 University of Washington  
 アメリカ合衆国 98105 ワシントン  
 , シアトル, スイート 400, ル  
 ーズベルト ウェイ エヌイー 4545  
 4545 Roosevelt Way  
 NE, Suite 400, Seattle, Washington 981  
 05 US  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規のマイクロジストロフィンおよび使用の関連する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ末端アクチニ結合ドメインと、  
 -ジストログリカン結合ドメインと、  
 スペクトリン様リピート1(SR1)、スペクトリン様リピート16(SR16)、  
 スペクトリン様リピート17(SR17)、スペクトリン様リピート23(SR23)、  
 およびスペクトリン様リピート24(SR24)を含む5個のスペクトリン様リピートからなるスペクトリン様リピートドメインとを含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含み、前記マイクロジストロフィン遺伝子が制御カセットに機能可能に連結されている、単離および精製されたポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 2】

前記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる前記タンパク質は、ヒンジドメインの少なくとも一部をさらに含む、請求項1に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

前記ヒンジドメインは、ヒンジ1ドメイン、ヒンジ2ドメイン、ヒンジ3ドメイン、ヒンジ4ドメイン、およびヒンジ様ドメインのうちの少なくとも1つから選択される、請求項2に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

前記制御カセットは、CK8プロモーターおよび心筋トロポニンT(cTnT)プロモ

20

ーターから成る群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記制御力セットは、CK8 プロモーターであり、前記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記制御力セットは、cTnT プロモーターであり、前記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 7】

前記マイクロジストロフィン遺伝子が、スペクトリン様リピート 1 6 と直接連結されたスペクトリン様リピート 1 、スペクトリン様リピート 2 3 と直接連結されたスペクトリン様リピート 1 7 、およびスペクトリン様リピート 2 4 と直接連結されたスペクトリン様リピート 2 3 のうちの少なくとも 1 つを含むタンパク質をコードする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

ヒンジ 1 ドメイン (H1) と、

ヒンジ 4 ドメイン (H4) とを含む、請求項 3 に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離および精製されたポリヌクレオチド、および送達媒体を含む医薬組成物。

【請求項 10】

筋ジストロフィーを有する対象を処置するため、または筋ジストロフィーを発症するリスクのある対象を予防的に処置するための医薬組成物であって、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離および精製されたポリヌクレオチドを含む医薬組成物。

【請求項 11】

制御力セットと機能可能に連結されたマイクロジストロフィン遺伝子をさらに含み、前記制御力セットは、CK8 プロモーターおよび心筋トロポニン T (cTnT) プロモーターから成る群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 12】

前記制御力セットは、横紋筋細胞における前記マイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルが、非筋肉細胞における前記マイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも 100 倍高くなるように前記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成される、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記制御力セットは、CK8 プロモーターであり、前記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 11 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 14】

前記送達媒体が、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが、AAV6 血清型、AAV8 血清型、または AAV9 血清型からなる、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターが、rAAV6、rAAV8、rAAV9、または rAAV2/6 からなる、請求項 14 に記載の医薬組成物。

50

**【請求項 17】**

前記アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが、AAV9 血清型である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

**【請求項 18】**

前記組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターが、rAAV9 である、請求項 16 に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

10

本出願は、2015年1月16日に出願された米国仮特許出願第 62/104,537 号の利益を主張するものであり、その全体を参照により本明細書に組み込む。

**【0002】****連邦政府資金による研究の記載**

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金第 R01 AG033610 号のもと政府の支援を受けて成された。政府は、本発明の一定の権利を有する。

**【0003】**

本開示は、概してマイクロジストロフィンに関する。本開示はまた、筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全または悪液質を有する対象を処置する方法に関する。本開示はまた、筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全または悪液質を発症するリスクのある対象に予防的処置を行う方法に関する。特に、本方法は、マイクロジストロフィン遺伝子および送達媒体 (delivery vehicle) を含む医薬組成物を対象に投与することを含んでもよい。特に、本方法は、医薬組成物をデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーを有する対象に投与することを含んでもよい。

20

**【背景技術】****【0004】**

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、およそ 3500 人に 1 人の男性を冒す劣性遺伝性筋消耗疾患である。DMD 患者は、ジストロフィン遺伝子に突然変異があり、これがジストロフィンタンパク質の異常な発現または発現の欠損を引き起こす。DMD 患者は、骨格筋の進行性消耗および心機能不全を経験し、これが、歩行の減少および主に心不全または呼吸器不全のため早期の死亡につながる。不運にも、現在利用可能な処置は、一般に DMD の病態を遅らせることしかできない。したがって、DMD を処置するための組成物および方法に対して差し迫ったニーズがある。

30

**【発明の概要】****【0005】****本開示は以下の [1] から [94] を含む。****[1] (a) アミノ末端アクチン結合ドメインと、****- ジストログリカン結合ドメインと、**

少なくとも 4 個のスペクトリン様リピートを含むスペクトリン様リピートドメインで  
あって、上記少なくとも 4 個のスペクトリン様リピートのうちの 2 個は、神経型一酸化窒  
素合成酵素結合ドメインを含む、スペクトリン様リピートドメインと、

40

を含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子、および

**(b) 制御カセット**

を含む、単離および精製されたヌクレオチド配列。

[2] 上記少なくとも 4 個のスペクトリン様リピートは、スペクトリン様リピート 1 (S R 1)、スペクトリン様リピート 16 (S R 16)、スペクトリン様リピート 17 (S R 17)、およびスペクトリン様リピート 24 (S R 24) を含む、上記 [1] に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[3] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、ヒンジドメインの少なくとも一部をさらに含む、上記 [1] または [2] に記載の単離および

50

精製されたヌクレオチド配列。

[4] 上記ヒンジドメインは、ヒンジ1ドメイン、ヒンジ2ドメイン、ヒンジ3ドメイン、ヒンジ4ドメイン、およびヒンジ様ドメインのうちの少なくとも1つから選択される、上記[3]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[5] 上記制御カセットは、CK8プロモーターおよび心筋トロポニンT(cTnT)プロモーターから成る群から選択される、上記[1]～[4]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[6] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、5個のスペクトリン様リピートから8個のスペクトリン様リピートの間のスペクトリン様リピートを有する、上記[1]～[5]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。 10

[7] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、上記[1]～[6]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[8] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、上記[1]～[7]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[9] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、上記[1]～[8]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。 20

[10] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、上記[1]～[9]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[11] 上記制御カセットは、CK8プロモーターであり、上記CK8プロモーターは、配列番号19の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、上記[1]～[10]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[12] 上記制御カセットは、CK8プロモーターであり、上記CK8プロモーターは、配列番号19の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、上記[1]～[11]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[13] 上記制御カセットは、cTnTプロモーターであり、上記cTnTプロモーターは、配列番号1の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、上記[1]～[12]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。 30

[14] 上記制御カセットは、cTnTプロモーターであり、上記cTnTプロモーターは配列番号1の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、上記[1]～[13]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[15] アミノ末端アクチン結合ドメインと、

スペクトリン様リピート2と直接連結されたスペクトリン様リピート1、スペクトリン様リピート3と直接連結されたスペクトリン様リピート2、スペクトリン様リピート16と直接連結されたスペクトリン様リピート1、スペクトリン様リピート23と直接連結されたスペクトリン様リピート17、スペクトリン様リピート24と直接連結されたスペクトリン様リピート17、およびスペクトリン様リピート24と直接連結されたスペクトリン様リピート23のうちの少なくとも1つから選択される、互いに直接連結された少なくとも2個のスペクトリン様リピートと 40

を含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含む、単離および精製されたヌクレオチド配列。

[16] 順番に

ヒンジ1ドメイン(H1)と、

スペクトリン様リピート1(SR1)と、

スペクトリン様リピート16(SR16)と、

スペクトリン様リピート17(SR17)と、 50

スペクトリン様リピート24(SR24)と、  
ヒンジ4ドメイン(H4)と  
を含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含む、単離および精製されたヌクレオチド配列。

[17] 上記H1は、上記SR1と直接連結されている、上記[16]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[18] 上記SR1は、上記SR16と直接連結されている、上記[16]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[19] 上記SR16は、上記SR17と直接連結されている、上記[16]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[20] 上記SR17は、上記SR24と直接連結されている、上記[16]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[21] 上記SR24は、上記H4と直接連結されている、上記[16]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[22] 上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、上記SR1と上記SR16との間に順番にスペクトリン様リピート2(SR2)およびスペクトリン様リピート3(SR3)をさらに含む、上記[16]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[23] 上記SR1は、上記SR2と直接連結され、上記SR2は、上記SR3とさらに連結されている、上記[22]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[24] 順番に  
ヒンジ1ドメイン(H1)と、  
スペクトリン様リピート1(SR1)と、  
スペクトリン様リピート16(SR16)と、  
スペクトリン様リピート17(SR17)と、  
スペクトリン様リピート23(SR23)と、  
スペクトリン様リピート24(SR24)と、  
ヒンジ4ドメイン(H4)と、

を含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含む、単離および精製されたヌクレオチド配列。

[25] 上記H1は上記SR1と直接連結され、上記SR1は上記SR16と直接連結され、上記SR16は上記SR17と直接連結され、上記SR17は上記SR23と直接連結され、上記SR23は上記SR24と直接連結され、上記SR24は上記H4と直接連結されている、上記[24]に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列。

[26] 上記[1]～[25]のいずれか一項に記載の単離および精製されたヌクレオチド配列、および

送達媒体  
を含む医薬組成物。

[27] 上記送達媒体は、組換えアデノ隨伴ウイルスベクターを含む、上記[26]に記載の医薬組成物。

[28] 上記送達媒体は、上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させ、上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、上記[26]または[27]に記載の医薬組成物。

[29] 上記送達媒体は、上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させ、上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、上記[26]～[28]のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[30] 上記送達媒体は、上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させ、上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [ 26 ] ~ [ 29 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 31 ] 上記送達媒体は、上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させ、上記マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされる上記タンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [ 26 ] ~ [ 30 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 32 ] 上記制御カセットは、CK8 プロモーターであり、上記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [ 26 ] ~ [ 31 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 33 ] 上記制御カセットは、CK8 プロモーターであり、上記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [ 26 ] ~ [ 32 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 34 ] 上記制御カセットは、cTnT プロモーターであり、上記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [ 26 ] ~ [ 33 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 35 ] 上記制御カセットは、cTnT プロモーターであり、上記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [ 26 ] ~ [ 34 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 36 ] 上記医薬組成物は、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、およびエメリードレイフス型筋ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つから選択される筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減するよう構成される、上記 [ 26 ] ~ [ 35 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 37 ] 上記医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッcker型筋ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つから選択される筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減するよう構成される、上記 [ 26 ] ~ [ 36 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 38 ] 上記医薬組成物は、サルコペニア、心臓疾患および悪液質のうちの少なくとも 1 つの病理学的影響または症状を低減するよう構成される、上記 [ 26 ] ~ [ 37 ] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[ 39 ] 配列番号 16 の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを含む医薬組成物。

[ 40 ] 上記 AAV ベクターまたは上記 rAAV ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 および血清型 9 のうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 39 ] に記載の医薬組成物。

[ 41 ] 配列番号 4 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを含む医薬組成物。

[ 42 ] 上記 AAV ベクターまたは上記 rAAV ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 および血清型 9 のうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 41 ] に記載の医薬組成物。

[ 43 ] 配列番号 18 の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを含む医薬組成物。

10

20

30

40

50

[ 4 4 ] 上記 A A V ベクターまたは上記 r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 および血清型 9 のうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 4 3 ] に記載の医薬組成物。

[ 4 5 ] 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子、および

アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターを含む医薬組成物。

[ 4 6 ] 上記 A A V ベクターまたは上記 r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 および血清型 9 のうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 4 5 ] に記載の医薬組成物。

[ 4 7 ] 配列番号 1 6 または配列番号 1 8 の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子、および

アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターであって、上記 A A V ベクターまたは上記 r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 および血清型 9 のうちの少なくとも 1 つから選択される、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターを含む、筋ジストロフィーの処置または予防的処置において使用するための医薬組成物。

[ 4 8 ] 配列番号 1 6 または配列番号 1 8 の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子、および

アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターであって、上記 A A V ベクターまたは上記 r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 および血清型 9 のうちの少なくとも 1 つから選択される、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターを含む、筋ジストロフィーの処置または予防的処置のための医薬組成物。

[ 4 9 ] 筋ジストロフィーを有する対象を処置する方法であって、

上記対象に制御カセットと、機能可能に連結されたマイクロジストロフィン遺伝子とを含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む方法。

[ 5 0 ] 上記制御カセットは、 C K 8 プロモーターおよび心筋トロポニン T ( c T n T ) プロモーターから成る群から選択される、上記 [ 4 9 ] に記載の方法。

[ 5 1 ] 上記制御カセットは、横紋筋細胞における上記マイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルが、非筋肉細胞における上記マイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも 1 0 0 倍高くなるように上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成される、上記 [ 4 9 ] または [ 5 0 ] に記載の方法。

[ 5 2 ] 上記医薬組成物は、上記対象において上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成された組換えアデノ随伴ウイルスベクターをさらに含む、上記 [ 4 9 ] ~ [ 5 1 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 5 3 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [ 4 9 ] ~ [ 5 2 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 5 4 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [ 4 9 ] ~ [ 5 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 5 5 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [ 4 9 ] ~ [ 5 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 5 6 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [ 4 9 ] ~ [ 5 5 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 5 7 ] 上記制御カセットは、 C K 8 プロモーターであり、上記 C K 8 プロモーターは、

10

20

30

40

50

配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [ 49 ] ~ [ 56 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 58 ] 上記制御カセットは、CK8 プロモーターであり、上記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [ 49 ] ~ [ 57 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 59 ] 上記制御カセットは、cTnT プロモーターであり、上記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [ 49 ] ~ [ 58 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 60 ] 上記制御カセットは、cTnT プロモーターであり、上記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [ 49 ] ~ [ 59 ] のいずれか一項に記載の方法。 10

[ 61 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、上記対象の 1 つまたは複数の筋肉の収縮性が向上するように、上記 1 つまたは複数の筋肉においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [ 49 ] ~ [ 60 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 62 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、1 つまたは複数の骨格筋のうちの少なくとも 1 つの比筋力発揮能力が正常な比筋力発揮能力の少なくとも 40 % の範囲内まで増加させられるように、上記対象の上記 1 つまたは複数の骨格筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [ 49 ] ~ [ 61 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 63 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、基準拡張終末期容積の不足が正常な拡張終末期容積の少なくとも 40 % の範囲内まで回復するように、上記対象の 1 つまたは複数の心筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [ 49 ] ~ [ 62 ] のいずれか一項に記載の方法。 20

[ 64 ] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、ジストロフィン糖タンパク質複合体への神経型一酸化窒素合成酵素の局在化が上記対象において向上するように、マイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [ 49 ] ~ [ 63 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 65 ] 上記筋ジストロフィーは、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帶型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、およびエメリードレイフス型筋ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 49 ] ~ [ 64 ] のいずれか一項に記載の方法。 30

[ 66 ] 上記筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 49 ] ~ [ 65 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 67 ] 上記医薬組成物は、上記筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減する、上記 [ 49 ] ~ [ 66 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 68 ] 上記筋ジストロフィーの病理学的影響または症状は、筋痛、筋力低下、筋肉疲労、筋萎縮、線維症、炎症、骨格筋の平均筋線維直径の増加、心筋症、6 分間歩行試験時間の減少、歩行の減少、および心ポンプ失調のうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 67 ] に記載の方法。

[ 69 ] 上記筋ジストロフィーを有する上記対象を特定することさらに含む、上記 [ 49 ] ~ [ 68 ] のいずれか一項に記載の方法。 40

[ 70 ] 上記対象は、哺乳動物である、上記 [ 49 ] ~ [ 69 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 71 ] 上記対象はヒトである、上記 [ 49 ] ~ [ 70 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 72 ] 筋ジストロフィー発症するリスクのある対象に予防的処置を行うための方法であつて、機能可能に制御カセットと連結されたマイクロジストロフィン遺伝子を含む治療有効量の医薬組成物を上記対象に投与することを含む方法。

[ 73 ] 上記制御カセットは、CK8 プロモーターおよび心筋トロポニン T ( cTnT ) プロモーターから成る群から選択される、上記 [ 72 ] に記載の方法。

[ 74 ] 上記制御カセットは、横紋筋細胞における上記マイクロジストロフィン遺伝子の 50

発現のレベルが、非筋肉細胞における上記マイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも 100 倍高くなるように上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成される、上記 [72] または [73] に記載の方法。

[75] 上記医薬組成物は、上記対象において上記マイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成された組換えアデノ随伴ウイルスベクターをさらに含む、上記 [72] ~ [74] のいずれか一項に記載の方法。

[76] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [72] ~ [75] のいずれか一項に記載の方法。

[77] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [72] ~ [76] のいずれか一項に記載の方法。

[78] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [72] ~ [77] のいずれか一項に記載の方法。

[79] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする、上記 [72] ~ [78] のいずれか一項に記載の方法。

[80] 上記制御カセットは、CK8 プロモーターであり、上記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [72] ~ [79] のいずれか一項に記載の方法。

[81] 上記制御カセットは、CK8 プロモーターであり、上記 CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [72] ~ [80] のいずれか一項に記載の方法。

[82] 上記制御カセットは、cTnT プロモーターであり、上記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、上記 [72] ~ [81] のいずれか一項に記載の方法。

[83] 上記制御カセットは、cTnT プロモーターであり、上記 cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、上記 [72] ~ [82] のいずれか一項に記載の方法。

[84] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、上記対象の 1 つまたは複数の筋肉の収縮性が向上するように、上記 1 つまたは複数の筋肉においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [72] ~ [83] のいずれか一項に記載の方法。

[85] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、上記対象の 1 つまたは複数の骨格筋のうちの少なくとも 1 つの比筋力発揮能力が正常な比筋力発揮能力の少なくとも 40 % の範囲内まで増加させられるように、上記 1 つまたは複数の骨格筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [72] ~ [84] のいずれか一項に記載の方法。

[86] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、基準拡張終末期容積の不足が正常な拡張終末期容積の少なくとも 40 % の範囲内まで回復するように、上記対象の 1 つまたは複数の心筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [72] ~ [85] のいずれか一項に記載の方法。

[87] 上記マイクロジストロフィン遺伝子は、上記ジストロフィン糖タンパク質複合体への神経型一酸化窒素合成酵素の局在化が上記対象において向上するように、マイクロジストロフィンタンパク質を発現する、上記 [72] ~ [86] のいずれか一項に記載の方法。

[88] 上記筋ジストロフィーは、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帶型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、およびエメリードレイフス型筋ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [72] ~ [87] のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

[ 8 9 ] 上記筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 7 2 ] ~ [ 8 8 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 9 0 ] 上記医薬組成物は、上記筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を発症するリスクを低減する、上記 [ 7 2 ] ~ [ 8 9 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 9 1 ] 上記筋ジストロフィーの病理学的影響または症状は、筋痛、筋力低下、筋肉疲労、筋萎縮、線維症、炎症、骨格筋の平均筋線維直径の増加、心筋症、6 分間歩行試験時間の減少、歩行の減少、および心ポンプ失調のうちの少なくとも 1 つから選択される、上記 [ 9 0 ] に記載の方法。

[ 9 2 ] 上記筋ジストロフィーを発症するリスクのある上記対象を特定することをさらに含む、上記 [ 7 2 ] ~ [ 9 1 ] のいずれか一項に記載の方法。 10

[ 9 3 ] 上記対象は、哺乳動物である、上記 [ 7 2 ] ~ [ 9 2 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 9 4 ] 上記対象は、ヒトである、上記 [ 7 2 ] ~ [ 9 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

。 本開示は、少なくとも部分的に新規のマイクロジストロフィン、その組成物および使用の関連する方法に基づく。

【 0 0 0 6 】

本開示の一部の実施形態において、単離および精製されたヌクレオチド配列は、( a ) アミノ末端アクチン結合ドメインと、-ジストログリカン結合ドメインと、少なくとも 4 個のスペクトリン様リピートのうちの 2 個が神経型一酸化窒素合成酵素結合ドメインを含むような少なくとも 4 個のスペクトリン様リピートを含むスペクトリン様リピートドメインとを含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子；および( b ) 制御カセットを含む。 20

【 0 0 0 7 】

一実施形態において、少なくとも 4 個のスペクトリン様リピートは、スペクトリン様リピート 1 ( S R 1 )、スペクトリン様リピート 1 6 ( S R 1 6 )、スペクトリン様リピート 1 7 ( S R 1 7 )、およびスペクトリン様リピート 2 4 ( S R 2 4 ) を含む。

【 0 0 0 8 】

別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、ヒンジドメインの少なくとも一部をさらに含む。 30

【 0 0 0 9 】

さらに別の実施形態において、ヒンジドメインは、ヒンジ 1 ドメイン、ヒンジ 2 ドメイン、ヒンジ 3 ドメイン、ヒンジ 4 ドメイン、およびヒンジ様ドメインのうちの少なくとも 1 つから選択される。

【 0 0 1 0 】

さらに別の実施形態において、制御カセットは、C K 8 プロモーターおよび心筋トロボニン T ( c T n T ) プロモーターから成る群から選択される。

【 0 0 1 1 】

一実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、5 個のスペクトリン様リピートから 8 個のスペクトリン様リピートの間のスペクトリン様リピートを有する。 40

【 0 0 1 2 】

別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する。

【 0 0 1 3 】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。

【 0 0 1 4 】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタ

50

ンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する。

【0015】

一実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。

【0016】

別の実施形態において、制御カセットは、CK8 プロモーターであり、CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する。

【0017】

さらに別の実施形態において、制御カセットは、CK8 プロモーターであり、CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。 10

【0018】

さらに別の実施形態において、制御カセットは、cTnT プロモーターであり、cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する。

【0019】

一実施形態において、制御カセットは、cTnT プロモーターであり、cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。

【0020】

本開示の特定の実施形態において、単離および精製されたヌクレオチド配列は、アミノ末端アクチン結合ドメインと、スペクトリン様リピート 2 と直接連結されたスペクトリン様リピート 1 、スペクトリン様リピート 3 と直接連結されたスペクトリン様リピート 2 、スペクトリン様リピート 16 と直接連結されたスペクトリン様リピート 1 、スペクトリン様リピート 23 と直接連結されたスペクトリン様リピート 17 、スペクトリン様リピート 24 と直接連結されたスペクトリン様リピート 17 、およびスペクトリン様リピート 24 と直接連結されたスペクトリン様リピート 23 のうちの少なくとも 1 つから選択される、互いに直接連結された少なくとも 2 個のスペクトリン様リピートとを含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含む。 20

【0021】

本開示の特定の他の実施形態において、単離および精製されたヌクレオチド配列は、順番にヒンジ 1 ドメイン (H1) と、スペクトリン様リピート 1 (SR1) と、スペクトリン様リピート 16 (SR16) と、スペクトリン様リピート 17 (SR17) と、スペクトリン様リピート 24 (SR24) と、ヒンジ 4 ドメイン (H4) とを含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含む。 30

【0022】

一実施形態において、H1 は、SR1 と直接連結されている。

【0023】

別の実施形態において、SR1 は、SR16 と直接連結されている。

【0024】

さらに別の実施形態において、SR16 は、SR17 と直接連結されている。

【0025】

さらに別の実施形態において、SR17 は、SR24 と直接連結されている。 40

【0026】

別の実施形態において、SR24 は、H4 と直接連結されている。

【0027】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、SR1 と SR16 との間に、順番にスペクトリン様リピート 2 (SR2) およびスペクトリン様リピート 3 (SR3) をさらに含む。

【0028】

さらに別の実施形態において、SR1 は、SR2 と直接連結され、SR2 は、SR3 とさらに連結されている。

【0029】

10

20

30

40

50

本開示の一部の実施形態において、単離および精製されたヌクレオチド配列は、順番にヒンジ1ドメイン(H1)と、スペクトリン様リピート1(SR1)と、スペクトリン様リピート16(SR16)と、スペクトリン様リピート17(SR17)と、スペクトリン様リピート23(SR23)と、スペクトリン様リピート24(SR24)と、ヒンジ4ドメイン(H4)とを含むタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含む。

【0030】

一実施形態において、H1はSR1と直接連結され、SR1はSR16と直接連結され、SR16はSR17と直接連結され、SR17はSR23と直接連結され、SR23はSR24と直接連結され、SR24はH4と直接連結されている。

10

【0031】

本開示の特定の実施形態において、本医薬組成物は、本明細書に記載されている単離および精製されたヌクレオチド配列および送達媒体を含む。

【0032】

一実施形態において、送達媒体は、組換えアデノ随伴ウイルスベクターを含む。

【0033】

別の実施形態において、送達媒体は、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質が、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するようなマイクロジストロフィン遺伝子を発現させる。

20

【0034】

さらに別の実施形態において、送達媒体は、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質が、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するようなマイクロジストロフィン遺伝子を発現させる。

【0035】

さらに別の実施形態において、送達媒体は、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質が、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するようなマイクロジストロフィン遺伝子を発現させる。

【0036】

別の実施形態において、送達媒体は、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質が、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するようなマイクロジストロフィン遺伝子を発現させる。

30

【0037】

本開示の一部の実施形態において、本明細書に記載されている医薬組成物は、制御力セットがCK8プロモーターであり、CK8プロモーターが配列番号19の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するような制御力セットを含む。

【0038】

本開示の特定の実施形態において、本明細書に記載されている医薬組成物は、制御力セットがCK8プロモーターであり、CK8プロモーターが配列番号19の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するような制御力セットを含む。

40

【0039】

本開示の一部の実施形態において、本明細書に記載されている医薬組成物は、制御力セットがcTnTプロモーターであり、cTnTプロモーターが配列番号1の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するような制御力セットを含む。

【0040】

本開示の特定の実施形態において、本明細書に記載されている医薬組成物は、制御力セットがcTnTプロモーターであり、cTnTプロモーターが配列番号1の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するような制御力セットを含む。

【0041】

本開示の一部の実施形態において、本医薬組成物は、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、

50

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、およびエメリードレイフス型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減するよう構成される。

【0042】

本開示の特定の実施形態において、本医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減するよう構成される。

【0043】

本開示の一部の実施形態において、本医薬組成物は、サルコペニア、心臓疾患および悪液質のうちの少なくとも1つの病理学的影響または症状を低減するよう構成される。 10

【0044】

本開示の特定の実施形態において、本医薬組成物は、配列番号16の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを含む。特定の実施形態において、AAVベクターまたはrAAVベクターの血清型は、血清型6、血清型8および血清型9のうちの少なくとも1つから選択される。

【0045】

本開示の一部の実施形態において、本医薬組成物は、タンパク質が配列番号4のアミノ酸配列を含むようなタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを含む。特定の実施形態において、AAVベクターまたはrAAVベクターの血清型は、血清型6、血清型8および血清型9のうちの少なくとも1つから選択される。 20

【0046】

本開示の特定の実施形態において、本医薬組成物は、配列番号18の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを含む。一部の実施形態において、AAVベクターまたはrAAVベクターの血清型は、血清型6、血清型8および血清型9のうちの少なくとも1つから選択される。

【0047】

本開示の特定の実施形態において、本医薬組成物は、タンパク質が配列番号5のアミノ酸配列を含むようなタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを含む。一部の実施形態において、AAVベクターまたはrAAVベクターの血清型は、血清型6、血清型8および血清型9のうちの少なくとも1つから選択される。 30

【0048】

本開示の一部の実施形態において、筋ジストロフィーの処置または予防的処置への使用に適した医薬組成物は、配列番号16または配列番号18の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子と、AAVベクターまたはrAAVベクターの血清型が血清型6、血清型8および血清型9のうちの少なくとも1つから選択されるようなアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターとを含む。 40

【0049】

本開示の特定の実施形態において、筋ジストロフィーの処置または予防的処置に適した医薬組成物は、配列番号16または配列番号18の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子と、AAVベクターまたはrAAVベクターの血清型が血清型6、血清型8および血清型9のうちの少なくとも1つから選択されるようなアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターとを含む。

【0050】

本開示の特定の実施形態において、筋ジストロフィーを有する対象を処置するための方法は、機能可能に制御力セットと連結されたマイクロジストロフィン遺伝子を含む治療有 50

効量の医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0051】

一実施形態において、制御力セットは、CK8プロモーターおよび心筋トロポニンT(cTnT)プロモーターから成る群から選択される。

【0052】

別の実施形態において、制御力セットは、横紋筋細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルが、非筋肉細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも100倍高くなるようにマイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成される。

【0053】

本開示の特定の実施形態において、本明細書に記載されている医薬組成物は、対象においてマイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成された組換えアデノ随伴ウイルスベクターをさらに含む。

【0054】

一実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0055】

別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0056】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0057】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0058】

一実施形態において、制御力セットは、CK8プロモーターであり、CK8プロモーターは、配列番号19の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。

【0059】

別の実施形態において、制御力セットは、CK8プロモーターであり、CK8プロモーターは、配列番号19の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。

【0060】

さらに別の実施形態において、制御力セットは、cTnTプロモーターであり、cTnTプロモーターは、配列番号1の核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。

【0061】

さらに別の実施形態において、制御力セットは、cTnTプロモーターであり、cTnTプロモーターは、配列番号1の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。

【0062】

一実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の筋肉の収縮性が向上するように、対象の1つまたは複数の筋肉においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

【0063】

別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の骨格筋のうちの少なくとも1つの比筋力発揮能力が正常な比筋力発揮能力の少なくとも40%の範囲内まで増加させられるように、対象の1つまたは複数の骨格筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

【0064】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、基準拡張終末期容積の不足が正常な拡張終末期容積の少なくとも40%の範囲内まで回復するように、対象の1つまたは複数の心筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

10

20

30

40

50

## 【0065】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ジストロフィン糖タンパク質複合体への神経型一酸化窒素合成酵素の局在化が対象において向上するように、マイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

## 【0066】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーは、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帶型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、およびエメリードレイフス型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される。

10

## 【0067】

特定の実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される。

## 【0068】

本開示の一部の実施形態において、本医薬組成物は、筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減する。

## 【0069】

特定の実施形態において、筋ジストロフィーの病理学的影響または症状は、筋痛、筋力低下、筋肉疲労、筋萎縮、線維症、炎症、骨格筋の平均筋線維直径の増加、心筋症、6分間歩行試験時間の減少、歩行の減少、および心ポンプ失調のうちの少なくとも1つから選択される。

20

## 【0070】

一部の実施形態において、本明細書に記載される方法は、筋ジストロフィーを有する対象を特定することを含む。

## 【0071】

特定の実施形態において、対象は、哺乳動物である。

## 【0072】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

## 【0073】

本開示の一部の実施形態において、筋ジストロフィー発症するリスクのある対象に予防的処置を行うための方法は、機能可能に制御力セットと連結されたマイクロジストロフィン遺伝子を含む治療有効量の医薬組成物を対象に投与することを含む。

30

## 【0074】

一実施形態において、制御力セットは、CK8プロモーターおよび心筋トロポニンT (cTnT) プロモーターから成る群から選択される。

## 【0075】

さらに別の実施形態において、制御力セットは、横紋筋細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルが、非筋肉細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも100倍高くなるようにマイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成される。

40

## 【0076】

特定の実施形態において、本医薬組成物は、対象においてマイクロジストロフィン遺伝子を発現させるよう構成された組換えアデノ随伴ウイルスベクターをさらに含む。

## 【0077】

特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

## 【0078】

別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

## 【0079】

50

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0080】

さらに別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

【0081】

特定の実施形態において、制御カセットは、CK8 プロモーターであり、CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する。

【0082】

別の実施形態において、制御カセットは、CK8 プロモーターであり、CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。

10

【0083】

さらに別の実施形態において、制御カセットは、cTnT プロモーターであり、cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する。

【0084】

さらに別の実施形態において、制御カセットは、cTnT プロモーターであり、cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。

【0085】

特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の筋肉の収縮性が向上するように、対象の1つまたは複数の筋肉においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

20

【0086】

別の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の骨格筋のうちの少なくとも1つの比筋力発揮能力が正常な比筋力発揮能力の少なくとも40 % の範囲内まで増加させられるように、対象の1つまたは複数の骨格筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

【0087】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、基準拡張終末期容積の不足が正常な拡張終末期容積の少なくとも40 % の範囲内まで回復するように、対象の1つまたは複数の心筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

30

【0088】

特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ジストロフィン糖タンパク質複合体への神経型一酸化窒素合成酵素の局在化が対象において向上するように、マイクロジストロフィンタンパク質を発現する。

【0089】

特定の実施形態において、筋ジストロフィーは、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、およびエメリードレイフス型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される。

40

【0090】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される。

【0091】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている医薬組成物は、筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を発症するリスクを減少させる。

【0092】

一実施形態において、筋ジストロフィーの病理学的影響または症状は、筋痛、筋力低下、筋肉疲労、筋萎縮、線維症、炎症、骨格筋の平均筋線維直径の増加、心筋症、6分間歩行試験時間の減少、歩行の減少、および心ポンプ失調のうちの少なくとも1つから選択さ

50

れる。

【0093】

本開示の一部の実施形態において、本明細書に記載される方法は、筋ジストロフィーを発症するリスクのある対象を特定することをさらに含む。

【0094】

一実施形態において、対象は、哺乳動物である。

【0095】

別の実施形態において、対象はヒトである。

【0096】

本開示の他の特徴および利点が、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。 10

【0097】

本明細書中で開示される実施形態は、添付の図面と併せて、以下の説明および添付の特許請求の範囲から完全にさらに十分に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1A】本明細書中で開示される切断型ジストロフィン構築物の実施形態のタンパク質構造図である。N T、アミノ末端ドメイン；H、ヒンジ；R、スペクトリン様リピート；n N O S B D、神経型一酸化窒素合成酵素結合ドメイン；C R、システインリッチドメイン；C T、カルボキシル末端ドメイン；S y n、シントロフィン結合ドメイン；D b B D、ジストロブレビン結合ドメイン；何も記されていない領域はR 15とR 16との間の20個のアミノ酸を示す；a a、アミノ酸；およびk D a、キロダルトン。 20

【図1B】ジストロフィー $m d \times 4^c v$ マウスに $5 \times 10^{10}$ ベクターゲノム(v g)のr A A V / C M V -  $\mu$  D y sを一方の前脛骨(T A)筋に注射した結果を示すウエスタンプロットの写真であり、反対側の筋肉は内的な未処置対照の役割を果たす。試験したすべての構築物の発現を、T A筋ライセートのウエスタンプロット分析によって野生型および未処置 $m d \times 4^c v$ 対照とともに処置の4週後に検証した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G A P D H)は、内的ローディングコントロールの役割を果たす。

【図1C】それぞれ処置の4週または12週後のジストロフィン発現および中心核形成に関するT A断面からの筋線維の定量化を示すグラフである(各時点に対してコホート当たりN = 3 ~ 5、平均値 $\pm$ S . E . M .)。 $\mu$  D y s H 3は、性能の比較基準の役割を果たす。 $\mu$  D y s 6および $\mu$  D y s 7は、広く普及しているサイトメガロウイルス(C M V)プロモーターを使用してA A V発現ベクターにクローン化されるには大き過ぎたため、効率的なパッケージングおよびインビオ評価を可能にするためにC M Vプロモーターを筋特異的C K 8プロモーターで置き換えた。したがって、 $\mu$  D y s H 3を、C K 8制御発現力セットを用いて再評価した。記号は、野生型マウスに基づく有意性を指す。\*はP < 0 . 0 5、\*\*はP < 0 . 0 1、\*\*\*はP < 0 . 0 0 1、#はP < 0 . 0 0 0 1である。 30

【図1D】それぞれ処置の4週または12週後のジストロフィン発現および中心核形成に関するT A断面からの筋線維の定量化を示すグラフである(各時点に対してコホート当たりN = 3 ~ 5、平均値 $\pm$ S . E . M .)。 $\mu$  D y s H 3は、性能の比較基準の役割を果たす。 $\mu$  D y s 6および $\mu$  D y s 7は、広く普及しているサイトメガロウイルス(C M V)プロモーターを使用してA A V発現ベクターにクローン化されるには大き過ぎたため、効率的なパッケージングおよびインビオ評価を可能にするためにC M Vプロモーターを筋特異的C K 8プロモーターで置き換えた。したがって、 $\mu$  D y s H 3を、C K 8制御発現力セットを用いて再評価した。記号は、野生型マウスに基づく有意性を指す。\*はP < 0 . 0 5、\*\*はP < 0 . 0 1、\*\*\*はP < 0 . 0 0 1、#はP < 0 . 0 0 0 1である。 40

【図2】処置の6か月後の代表的な腓腹筋断面を示す一連の顕微鏡写真である。示したとおり、ジストロフィンおよびD A P I染色核を左列に示し、-ジストログリカンおよびD A P Iを中心列に示し、神経型一酸化窒素合成酵素(n N O S)を右列に示す。各行は

、野生型マウス、処置 $md \times 4^{cv}$ マウスおよび未処置 $md \times 4^{cv}$ マウスのコホートの代表的な結果を示す。スケールバーは $200 \mu m$ である。ジストロフィン糖タンパク質複合体(DGC)メンバーの動員は、 $\mu Dys$ 構築物内の結合ドメインに一般に依存する。14日齢のジストロフィー $md \times 4^{cv}$ マウスに、 $1 \times 10^{13} \text{ vg}$ のrAAV6/CK8- $\mu Dys$ を後眼窩静脈叢より注射した。処置の3か月および6か月後、DGCメンバーに関して骨格筋を免疫染色した。

【図3A】処置の3か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。新規の $\mu Dys$ 構築物の性能を判定するために腓腹筋(図3Aおよび3B)および横隔膜筋(図3Cおよび3D)を評価した。ジストロフィン発現および中心に核のある筋線維に関して筋肉断面を定量した。ジストロフィン発現を示す筋線維および/または中心核形成を示す筋線維のレベルをパーセンテージとして表わす(図3Aおよび3C)。腓腹筋細片に関してインサイチュ(図3B)および横隔膜細片に関してインピトロ(図3D)比筋力発揮を測定した。各コホートに関するn値を図3Dの棒に列挙する。括弧でくくられていない記号に関して、野生型に基づき、\*は $P < 0.05$ 、\*\*は $P < 0.01$ 、\*\*\*は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 2で処置したマウスに基づき、^は $P < 0.05$ 、^^は $P < 0.01$ 、^^^は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 5で処置したマウスに基づき、#は $P < 0.05$ 、##は $P < 0.01$ 、###は $P < 0.001$ である。

【図3B】処置の3か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。新規の $\mu Dys$ 構築物の性能を判定するために腓腹筋(図3Aおよび3B)および横隔膜筋(図3Cおよび3D)を評価した。ジストロフィン発現および中心に核のある筋線維に関して筋肉断面を定量した。ジストロフィン発現を示す筋線維および/または中心核形成を示す筋線維のレベルをパーセンテージとして表わす(図3Aおよび3C)。腓腹筋細片に関してインサイチュ(図3B)および横隔膜細片に関してインピトロ(図3D)比筋力発揮を測定した。各コホートに関するn値を図3Dの棒に列挙する。括弧でくくられていない記号に関して、野生型に基づき、\*は $P < 0.05$ 、\*\*は $P < 0.01$ 、\*\*\*は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 2で処置したマウスに基づき、^は $P < 0.05$ 、^^は $P < 0.01$ 、^^^は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 5で処置したマウスに基づき、#は $P < 0.05$ 、##は $P < 0.01$ 、###は $P < 0.001$ である。

【図3C】処置の3か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。新規の $\mu Dys$ 構築物の性能を判定するために腓腹筋(図3Aおよび3B)および横隔膜筋(図3Cおよび3D)を評価した。ジストロフィン発現および中心に核のある筋線維に関して筋肉断面を定量した。ジストロフィン発現を示す筋線維および/または中心核形成を示す筋線維のレベルをパーセンテージとして表わす(図3Aおよび3C)。腓腹筋細片に関してインサイチュ(図3B)および横隔膜細片に関してインピトロ(図3D)比筋力発揮を測定した。各コホートに関するn値を図3Dの棒に列挙する。括弧でくくられていない記号に関して、野生型に基づき、\*は $P < 0.05$ 、\*\*は $P < 0.01$ 、\*\*\*は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 2で処置したマウスに基づき、^は $P < 0.05$ 、^^は $P < 0.01$ 、^^^は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 5で処置したマウスに基づき、#は $P < 0.05$ 、##は $P < 0.01$ 、###は $P < 0.001$ である。

【図3D】処置の3か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。新規の $\mu Dys$ 構築物の性能を判定するために腓腹筋(図3Aおよび3B)および横隔膜筋(図3Cおよび3D)を評価した。ジストロフィン発現および中心に核のある筋線維に関して筋肉断面を定量した。ジストロフィン発現を示す筋線維および/または中心核形成を示す筋線維のレベルをパーセンテージとして表わす(図3Aおよび3C)。腓腹筋細片に関してインサイチュ(図3B)および横隔膜細片に関してインピトロ(図3D)比筋力発揮を測定した。各コホートに関するn値を図3Dの棒に列挙する。括弧でくくられていない記号に関して、野生型に基づき、\*は $P < 0.05$ 、\*\*は $P < 0.01$ 、\*\*\*は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 2で処置したマウスに基づき、^は $P < 0.05$ 、^^は $P < 0.01$ 、^^^は $P < 0.001$ である。 $\mu Dys$ 5で処置したマウスに基づき、#は $P < 0.05$ 、##は $P < 0.01$ 、###は $P < 0.001$ である。

10

20

30

40

50

【図4A】処置の6か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。図3A～3Dに記載されているとおりに腓腹筋(図4Aおよび4B)および横隔膜筋(図4Cおよび4D)を評価した。各コホートに関するn値を図4Dの棒に列挙する。野生型に基づき、\*はP<0.05、\*\*はP<0.01、\*\*\*はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>2で処置したマウスに基づき、^はP<0.05、^^はP<0.01、^^^はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>7で処置したマウスに基づき、#はP<0.05、##はP<0.01、###はP<0.001である。

【図4B】処置の6か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。図3A～3Dに記載されているとおりに腓腹筋(図4Aおよび4B)および横隔膜筋(図4Cおよび4D)を評価した。各コホートに関するn値を図4Dの棒に列挙する。野生型に基づき、\*はP<0.05、\*\*はP<0.01、\*\*\*はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>2で処置したマウスに基づき、^はP<0.05、^^はP<0.01、^^^はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>7で処置したマウスに基づき、#はP<0.05、##はP<0.01、###はP<0.001である。

【図4C】処置の6か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。図3A～3Dに記載されているとおりに腓腹筋(図4Aおよび4B)および横隔膜筋(図4Cおよび4D)を評価した。各コホートに関するn値を図4Dの棒に列挙する。野生型に基づき、\*はP<0.05、\*\*はP<0.01、\*\*\*はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>2で処置したマウスに基づき、^はP<0.05、^^はP<0.01、^^^はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>7で処置したマウスに基づき、#はP<0.05、##はP<0.01、###はP<0.001である。

【図4D】処置の6か月後における全身的処置の評価を示すグラフである。図3A～3Dに記載されているとおりに腓腹筋(図4Aおよび4B)および横隔膜筋(図4Cおよび4D)を評価した。各コホートに関するn値を図4Dの棒に列挙する。野生型に基づき、\*はP<0.05、\*\*はP<0.01、\*\*\*はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>2で処置したマウスに基づき、^はP<0.05、^^はP<0.01、^^^はP<0.001である。 $\mu$ Dy<sub>s</sub>7で処置したマウスに基づき、#はP<0.05、##はP<0.01、###はP<0.001である。

【図5A】骨格筋における伸張性収縮からの筋細胞膜の保護の程度を示すグラフである。図2および図4A～4Dに記載されているとおりに全身的に処置したマウスに長さを増加させる伸張性収縮をさせた。伸張性収縮に先立って発揮される等尺性最大筋力に関して腓腹筋細片(図5A)および横隔膜細片(図5B)を測定した。収縮を刺激する間、筋肉は、その最適線維長を超えて規定される距離で伸ばされた。距離は最適線維長( $L_0$ )を超えたパーセンテージとして報告する。 $L_0$ を45%を超えた野生型に基づいて、\*はP<0.05、\*\*はP<0.001、\*\*\*はP<0.0001である。 $L_0$ を45%を超えた $\mu$ Dy<sub>s</sub>2で処置したマウスに基づき、^^^はP<0.001、^^^はP<0.0001である。 $L_0$ を45%を超えた $\mu$ Dy<sub>s</sub>7で処置したマウスに基づき、はP<0.0001である。

【図5B】骨格筋における伸張性収縮からの筋細胞膜の保護の程度を示すグラフである。図2および図4A～4Dに記載されているとおりに全身的に処置したマウスに長さを増加させる伸張性収縮をさせた。伸張性収縮に先立って発揮される等尺性最大筋力に関して腓腹筋細片(図5A)および横隔膜細片(図5B)を測定した。収縮を刺激する間、筋肉は、その最適線維長を超えて規定される距離で伸ばされた。距離は最適線維長( $L_0$ )を超えたパーセンテージとして報告する。 $L_0$ を45%を超えた野生型に基づいて、\*はP<0.05、\*\*はP<0.001、\*\*\*はP<0.0001である。 $L_0$ を45%を超えた $\mu$ Dy<sub>s</sub>2で処置したマウスに基づき、^^^はP<0.001、^^^はP<0.0001である。 $L_0$ を45%を超えた $\mu$ Dy<sub>s</sub>7で処置したマウスに基づき、はP<0.0001である。

【図6】全身的に試験した新規の $\mu$ Dy<sub>s</sub>構築物が骨格筋においてリングバインデン表現型を誘導しないことを示す一連の顕微鏡写真である。14日齢のジストロフィー $\text{m}\text{d}\times^4$

10

20

30

40

50

<sup>c</sup> v マウスの後眼窩静脈叢に  $1 \times 10^{-1.3}$  v g を注射した。処置の 6 か月後に、腓腹筋の断面をジストロフィン、D A P I、および - サルコメアアクチンに関して免疫染色した。野生型マウス（パネル「a」）および  $\mu$  D y s H 3（パネル「b」）、 $\mu$  D y s 1（パネル「c」）、 $\mu$  D y s 2（パネル「d」）、 $\mu$  D y s 5（パネル「e」）、 $\mu$  D y s 6（パネル「f」）、 $\mu$  D y s 7（パネル「g」）で処置した  $m d \times 4$  <sup>c</sup> v マウスまたは未処置の  $m d \times 4$  <sup>c</sup> v マウス（パネル「h」）コホートの代表的な一断面を示す。 $m d \times 4$  <sup>c</sup> v バックグラウンドに関して R 4 - R 2 3 / C T を発現しているトランスジェニックマウスの腓腹筋（Harper, S. Q., et al., Nature Medicine 8, 253-261, (2002)を参照）（パネル「i」）も陽性対照として免疫染色した。矢じりは、筋線維の周りのリングバインデン形成の例に印をついている。スケールバーは 50  $\mu$  m である。

10

【図 7】本明細書中で開示される新規のマイクロジストロフィン構築物の実施形態のタンパク質構造図である。上側のタンパク質構造図は、多くの既知の機能的ドメイン：N T、アミノ末端アクチン結合ドメイン；H、ヒンジ；R、スペクトリン様リピート；n N O S B D、神経型一酸化窒素合成酵素結合ドメイン；C R、システインリッチドメイン；C T、カルボキシル末端ドメイン；D g B D、ジストログリカン結合ドメイン；S y n、シントロフィン結合ドメイン；D b B D、ジストロブレビン結合ドメイン；および何も記されていない領域は R 1 5 と R 1 6 との間の 20 個のアミノ酸を示す完全長ジストロフィンのものである。WW ドメインはヒンジ 4 内にある。マイクロジストロフィンタンパク質構造を左側に、タンパク質構造図の左側に呼称を示し、概略図の右側にドメイン構造が列挙される。

20

【図 8】未処置（U N；n = S）対低用量（L；n = 3）または高用量（H；n = 3）の A A V 6 - L 4 8 Q に関する 2 週目（左）および 3 週目（右）における左室（L V）駆出率を示す 2 つのグラフである。

【図 9】示したとおり、A A V 6 - L 4 8 Q c T n C を注射したマウスの心臓組織（左）および未注射対照（右）に対する抗 c T n C ウエスタンプロットである。

【図 10】[図 10 A] ローディングコントロールとして G A P D H を用いた R 1 に関するウエスタンプロットである。[図 10 B] ローディングコントロールとして G A P D H を用いた R 2 に関するウエスタンプロットである。[図 10 C] トランスフェクション心筋細胞の H P L C [d A T P] を示すグラフである。

【図 11】2 つのグラフである。左のグラフは、R 1 R 2 を過剰発現するマウス対対照同腹子におけるパーセンテージ短縮率（F S）の増加を示す。右のグラフは、R 1 R 2 を過剰発現するマウス対対照同腹子における左室内径（L V I D）の変化を示す。d - 拡張期、s - 収縮期。

30

【図 12】[図 12 A] A T P および d A T P を用いたマウスの大動脈平滑筋収縮トレースである。[図 12 B] 図 12 A のデータの概要を示すグラフである。

【図 13】[図 13 A] R 1 および R 2 に関するウエスタンプロットである。[図 13 B] 図 13 A のウエスタンプロットに関するローディングコントロールとしての - チューブリンを示す。

【図 14】r A A V 6 - R 1 R 2 c T n T 4 5 5 を注射（ $4.5 \times 10^{-1.3}$ ）したマウスおよび対照マウスの骨格筋、肺、および心臓における R 1 および R 2 サブユニットの発現レベルに関する事前のウエスタンプロットの証拠を示す（パネル「A」）。図 14 はまた、注射しないマウス（パネル「B」）対 A A V 6 - アルカリホスファターゼを注射したマウス（パネル「C」）の 20 か月後の心臓組織に関するデータを提供し（Rafael, J. A., et al., The Journal of Cell Biology 134, 93-102 (1996)を参照）、これは、A A V 6 - R 1 R 2 c T n T 4 5 5 が安定した長期の R 1 R 2 過剰発現をもたらす可能性があることを示唆している。

40

【図 15】およそ 10 倍の範囲にわたり 3 か月齢のマウス（1 群当たり n = 6）に全身注射した  $1.5 \times 10^{-1.3}$ 、 $4.5 \times 10^{-1.3}$ 、および  $1.35 \times 10^{-1.4}$  の r A A V 6 - R 1 R 2 c T n T 4 5 5 ベクターゲノムまたは生理的食塩水（対照）の L V 機能に対する効果を示すグラフである。

50

【図16】未処置の梗塞ラットおよび未処置の偽手術されたラットと比較して心臓エコー検査によって測定される、梗塞後5日目にr A A V 6 - R 1 R 2を直接心臓注射したラットにおける短縮率の変化を示す2つのグラフである。

【図17】図16で評価されたラットの心臓のインビトロにおけるN e e l yワーキングハート測定を示すグラフである。y軸に力をg・cm/分の単位で示す。梗塞した（未処置）心臓の前負荷反応性の低下（心不全）およびベクターを与えられている梗塞心臓の前負荷反応性の、対照の梗塞していない心臓のレベルへの回復が観察され、これにより心機能の回復を実証する。

【図18】比較的低い活性を有すると仮定される配列の除去に基づくヒト-c T n T（エンハンサー+プロモーター）制御カセットの小型化を示す図である。

【図19】天然のヒト-c T n Tエンハンサー/プロモーターと比較した図18の欠失の転写試験を示すグラフであり、320bpバージョンが活性の約95%を保持している。

【図20】第2の小型化エンハンサーを付加することにより、天然のエンハンサー/プロモーター、320bpバージョンおよびニワトリc T n Tプロモーター/エンハンサーと比較して高められたヒト-c T n T 455の活性を示すグラフである（American Journal of Physiology - Cell Physiology 280, C556-C564 (2004)を参照）。

【図21】ジストロフィンスペクトリン様リピートの構造およびヒンジドメインとの並列の一連の略図である。上側左、個々のスペクトリン様リピートの互いに入り込んだフォールディングは、異なるアルファ-ヘリックスセグメントを強調して、3個の隣接するリピートがどのように一緒に折りたためるのかを見せるために示される（a、b、c；a'、b'、c'；およびa''、b''、c''は、3個の異なるスペクトリン様リピートのヘリックスドメインを示す）。上側右、未変性ジストロフィンおよびユートロフィンでは、一部のスペクトリン様リピートが、隣接するスペクトリン様リピートの通常の互いに入り込んだフォールディングを中断させるヒンジドメインによって分離される。上側右に示されるのは、スペクトリン様リピート18、19および20のフォールディングパターンおよびヒンジ3によるそれらの分離である。中段左、最適化したミニジストロフィンおよびマイクロジストロフィンは、スペクトリン様リピートドメインが通常のフォールディングパターンを保持するように配列される場合、一般に最高の機能活性を示し、非整数の単位のスペクトリン様リピートがミニジストロフィンまたはマイクロジストロフィンタンパク質中に存在する場合、例えば、ベッカー型筋ジストロフィー患者において全エクソンを除去する自然に生じる欠失が起こる場合に、この通常のフォールディングは崩壊している。この後者の状況は、中段右の略図に示され、これは、エクソン17～48を除去するゲノムの欠失を有する患者のジストロフィンの連結ドメインの予想される構造を表わす。下側の略図は、μD y s H 2（左）およびμD y s H 3（右）タンパク質において予想されるフォールディングパターンを示し、小型化ジストロフィンタンパク質の機能活性の予測できない性質も示す。μD y s H 2およびμD y s H 3は類似したフォールディングパターンを有するが、μD y s H 2は、md×マウスの骨格筋において発現するとリングバインデンの原因となるのに対し、μD y s H 3はリングバインデンの原因とならない（Banks, G. B., et al., PLoS Genetics 6, e1000958, (2010)を参照）。

【図22】抗ジストロフィン抗体を使用してジストロフィン発現に関して着色したmd×<sup>4</sup>c<sup>v</sup>マウスの筋肉の凍結切片のイメージである。

【発明を実施するための形態】

【0099】

本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を処置するための組成物および方法を特徴とする。特に、本開示は、筋ジストロフィー、DMD、サルコペニア、心不全および/または悪液質を有する対象を処置するためのミニジストロフィンタンパク質を生成するための方法に関する。下で詳細に記載されるとおり、本開示は、少なくとも部分的にジストロフィンタンパク質のタンパク質ドメイン（例えば、N末端ドメイン、H1ドメイン、SR1ドメイン、SR16ドメイン、SR17ドメイン、SR23ドメイン、SR24ドメイン、H4ドメイン、およびCRドメインを含むミニジストロフィンタンパク質

10

20

30

40

50

)の特定の組み合わせを含むミニジストロフィンタンパク質が、ジストロフィン機能を筋ジストロフィー、DMD、サルコペニア、心不全および/または悪液質を処置するのに十分なレベルまで回復させることができるという予想外の発見に基づく。

#### 【0100】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、およそ3500人に1人の男性を苦しめる劣性遺伝性筋消耗疾患である。DMD患者は、ジストロフィン遺伝子に突然変異をもち、結果としてジストロフィンタンパク質の異常な発現が生じるか、または発現しない。DMD患者は、骨格筋の進行性消耗および心機能不全を経験し、歩行の減少および主に心不全または呼吸器不全による早期の死亡につながる。現在利用可能な処置は、一般にDMDの病態を遅らせることしかできない(Emery, A. E. H. and Muntoni, F., *Duchenne Muscular Dystrophy*, Third Edition (Oxford University Press, 2003)を参照)。DMDに対する遺伝子治療アプローチが、エクソンスキッピングのように突然変異のクラスを直接標的とすること、またはウイルスベクターを介した送達により変異遺伝子を置換することのいずれかによってジストロフィーの動物モデルにおいて実証された(Koo, T. and Wood, M. J. *Human Gene Therapy* 24, (2013); Benedetti, S., et al., *The FEBS Journal* 280, 4263-4280, (2013); およびSeto, J. T., et al., *Current Gene Therapy* 12, 139-151 (2012)を参照)。組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターは、遺伝子治療のための可能性のある媒体であり、これは、既にDMDおよび肢帯型筋ジストロフィーの両方に対する臨床試験において試験されている(Mendell, J. R., et al., *The New England Journal of Medicine* 363, 1429-1437, (2010); Mendell, J. R., et al., *Annals of Neurology* 68, 629-638 (2010); およびHerson, S., et al., *Brain: A Journal of Neurology* 135, 483-492, (2012)を参照)。いくつかの血清型のアデノ随伴ウイルス(AAV)は、横紋筋に対して高い程度の指向性を示す(Seto, J. T., et al., *Current Gene Therapy* 12, 139-151 (2012)を参照)。

#### 【0101】

DMDに対するさらに新しい世代の治療構築物を設計および試験する前臨床試験は、およそ4.9kbサイズの一本鎖rAAVベクターゲノムによって制限される可能性がある(Dong, B., et al., *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 87-92, (2010)およびWu, Z., et al., *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 80-86, (2010)を参照)。単一のrAAVカプシドに筋特異的アイソフォームのジストロフィンのおよそ13.9kbの全cDNAをパッケージングすることはできないため、筋特異的アイソフォームのジストロフィンcDNAの小型化された合成版を使用することができる。ミニジストロフィンまたは完全長ジストロフィンコード配列を送達するための2つおよび3つのrAAVベクターゲノムのインピボ組換えが実証されたが(Odom, G. L., et al., *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 36-45, (2011); Lostal, W., et al., *Human Gene Therapy*, (2014); およびKoo, T., et al., *Human Gene Therapy* 25, 98-108, (2014)を参照)、完全長ジストロフィンを再構成するための複数のベクターの送達効率は最適状態には及ばない場合もあり、ベクターを送達するために必要とされるウイルスカプシドタンパク質の全用量を増加させる可能性がある。しかしながら、rAAVを介する有益な遺伝子治療が、遺伝子内にインフレーム欠失をもつ軽症のベッカー型筋ジストロフィー患者で発現するmRNAに部分的に基づく合理的に設計された小型版のジストロフィンcDNAを使用して達成された(Beggs, A. H., et al., *American Journal of Human Genetics* 49, 54-67 (1991); Koenig, M., et al., *American Journal of Human Genetics* 45, 498-506 (1989); Goldberg, L. R., et al., *Annals of Neurology* 44, 971-976, (1998); およびEngland, S. B., et al., *Nature* 343, 180-182 (1990)を参照)。さまざまなジストロフィントランケーションを発現するトランスジェニックの、ベクター処理されたジストロフィーマウスにおける研究が、機能的なマイクロジストロフィン(μDys)に存在している可能性のあるジストロフィン遺伝子のいくつかのエレメントを特定した(Harper, S. Q., et al., *Nature Medicine* 8, 253-261, (2002)を参照)。

## 【0102】

完全長横紋筋アイソフォームのジストロフィンは、収縮力を、筋細胞膜を通じて細胞外基質へと伝達することに関与している可能性がある。細胞内骨格と膜結合ジストロフィン糖タンパク質複合体 (DGC)との間の機械的連結の維持に加えて、ジストロフィンは、シグナル伝達タンパク質のための足場である可能性もある (Ozawa, E. in *Myology* (ed. Franzini-Armstrong C Engel A) 455-470 (McGraw-Hill, 2004); Winder, S. J. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 18, 617-629 (1997); および Campbell, K. P. and Kahl, S. D. *Nature* 338, 259-262, (1989)を参照)。ジストロフィンのアミノ末端ドメインはまた、細胞内骨格のF-アクチンフィラメントと結合することができる (Way, M., et al., *FEBS Letters* 301, 243-245 (1992); Hemmings, L., et al., *The Journal of Cell Biology* 116, 1369-1380 (1992); Fabbrizio, E., et al., *Biochemistry* 32, 10457-10463 (1993); および Pavalko, F. M. and Otey, C. A. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 205, 282-293 (1994)を参照)。中央のロッドドメインが最も大きく、24のスペクトリン様リピート (SR)から構成され、スペクトリン様リピートは、両側に少なくとも4個のヒンジサブドメインがあり、それらが点在している。ロッドドメインは、筋肉の収縮中に筋細胞膜の完全性を維持するためにジストロフィンに弾性および柔軟性をもたらすことができる (Winder, S. J. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 18, 617-629 (1997)を参照)。さまざまなSRは、細胞内骨格、筋細胞膜ならびにDGCのメンバーのための付加的な結合部位として働くことが可能な固有の領域を提供する (Rybalkova, I. N., et al., *The Journal of Cell Biology* 135, 661-672 (1996); Warner, L. E., et al., *Human Molecular Genetics* 11, 1095-1105 (2002); Metzinger, L., et al., *Human Molecular Genetics* 6, 1185-1191 (1997); Lai, Y., et al., *The Journal of Clinical Investigation* 119, 624-635, (2009)を参照)。特に、システインリッチドメインおよび隣接するヒンジ4領域は、-ジストログリカン結合ドメイン (Dg-BD)を形成する (Blake, D. J., et al., *Physiological Reviews* 82, 291-329, (2002); Ishikawa-Sakurai, M., et al., *Human Molecular Genetics* 13, 693-702, (2004)を参照)一方で、カルボキシ末端ドメインは、付加的なDGC構成要素のための足場である (Abmayr S, in *Molecular Mechanisms of Muscular Dystrophies* (ed. Winder, S. J.) 14-34 (Landes Biosciences, 2006)を参照)。

## 【0103】

部分的に機能的なマイクロジストロフィンは、収縮により引き起こされる損傷から筋細胞膜を保護することおよび力を発揮する能力を増加させることによって横紋筋におけるジストロフィーの病態を改善することができる。これらのパラメーターは、アミノ末端ドメインおよびDg-BDを介してF-アクチンフィラメントおよび-ジストログリカンと結合することによって達成することができる (Harper, S. Q., et al., *Nature Medicine* 8, 253-261, (2002); Warner, L. E., et al., *Human Molecular Genetics* 11, 1095-1105 (2002); Cox, G. A., et al., *Nature Genetics* 8, 333-339, (1994); Greenberg, D. S., et al., *Nature Genetics* 8, 340-344, (1994); Gardner, K. L., et al., *Gene Therapy* 13, 744-751, (2006); Corrado, K., et al., *The Journal of Cell Biology* 134, 873-884 (1996); および Rafael, J. A., et al., *The Journal of Cell Biology* 134, 93-102 (1996)を参照)。いずれかの特定の理論に縛られることなく、先の研究は、これらの2個のドメインが中心のロッドドメインの少なくとも4個のSRによって連結されなければならないが、少なくとも4個のSRを含む小型化ジストロフィンが構築され得る数々の方法が存在することを示している。SRのいくつかの組み合わせがジストロフィーの病態生理を改善することが示されたが、他の組み合わせは顕著な機能的能力を有するタンパク質をもたらさなかった (Harper, S. Q., et al., *Nature Medicine* 8, 253-261, (2002)および Abmayr S, in *Molecular Mechanisms of Muscular Dystrophies* (ed. Winder, S. J.) 14-34 (Landes Biosciences, 2006)を参照)。μDysの設計における特定のSRの選択により、付加的なDGC構成要素を筋細胞膜に戻すことができる。神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS)はシグナル伝達タンパク質であり、これは、筋肉の収縮活

10

20

30

40

50

動に応じた血管拡張に関与している可能性があり (Stamler, J. S. and Meissner, G. Physiological Reviews 81, 209-237 (2001) ; Brenman, J. E., et al., Cell 82, 743-752 (1995) ; Kobayashi, Y. M., et al., Nature 456, 511-515, (2008) ; およびTorelli, S., et al., Neuropathology and Applied Neurobiology 30, 540-545, (2004) を参照 ) 、 S R 1 6 および 1 7 の存在が n N O S の D G C との適切な結合に関与している可能性がある (28 Lai, Y. et al., The Journal of Clinical Investigation 119, 624-635, (2009) およびLai, Y., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 525-530, (2013) を参照 ) 。

#### 【 0 1 0 4 】

スペクトリン様リピート 2 0 ~ 2 4 ならびにヒンジ 4 内の配列は、ジストロフィンの微小管との適切な結合に関与している可能性があり、これは、骨格筋における細胞内構造およびトルク産生を維持するために重要な可能性がある (Prins, K. W. et al., The Journal of Cell Biology 186, 363-369, (2009) およびBelanto, J. J., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 5723-5728, (2014) を参照 ) 。それにもかかわらず、カルボキシ末端ドメインおよび大半の S R ドメインは、なくても横紋筋の健全な状態を極度に損なうことがないことがわかった (McCabe, E. R., et al., The Journal of Clinical Investigation 83, 95-99, (1989) ; Crawford, G. E., et al., The Journal of Cell Biology 150, 1399-1410 (2000) ; およびDunckley, M. G., et al., FEBS Letters 296, 128-134 (1992) を参照 ) 。

#### 【 0 1 0 5 】

今までに試験された最良のマイクロジストロフィンのいくつかは、D M D に関するジストロフィーマウスおよびイヌモデルに対して収縮により引き起こされる損傷から筋肉を保護し、一般にすべてではないが、比筋力発揮能力のいくらかを回復させることができる (Seto, J. T., et al., Current Gene Therapy 12, 139-151 (2012) およびWang, Z., et al., Frontiers in Microbiology 2, 201, (2011) を参照 ) 。 S R およびヒンジのさまざまな組み合わせをもつその他のマイクロジストロフィンは、ジストロフィー筋では十分に機能していない場合もあり、機能性の差に対する理由は明らかでない。しかしながら、いずれかの特定の理論に縛られることなく、これらは、マイクロジストロフィンの弾性、フォールディング、安定性および立体障害なく D G C の小部分を組み立てる能力に対する影響に関連している可能性もある。

#### 【 0 1 0 6 】

本開示は、概してマイクロジストロフィンに関する。マイクロジストロフィンは、機能するよう制御力セットと連結されてもよい。本開示はまた、筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全または悪液質を有する対象を処置する方法に関する。さらに、本開示は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全または悪液質を発症するリスクのある対象に予防的処置を行う方法に関する。筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全もしくは悪液質を有するか、またはそれを発症するリスクのある対象を処置するための方法は、マイクロジストロフィン遺伝子および送達媒体を含む医薬組成物を対象に投与すること含んでもよい。

#### 【 0 1 0 7 】

概して本明細書に記載されているとおりの実施形態は例となるものであることが容易に理解されるであろう。各種実施形態の以下のさらに詳細な説明は、本開示の範囲を限定することを意図せず、各種実施形態の単なる代表的なものである。さらに、本明細書中で開示される方法のステップまたは動作の順序は、本開示の範囲から逸脱することなく当業者によって変更されてもよい。言い換えると、実施形態の適切な操作のためにステップまたは動作の特定の順序が必要とされない限り、特定のステップまたは動作の順序または使用は変更されてもよい。

#### 【 0 1 0 8 】

別に明確に定義されていない限り、本明細書中で使用される技術用語は、当該技術分野において理解されるとおりの通常の意味を有する。理解しやすいように例を用いて以下の

10

20

30

40

50

用語を明確に定義する。

【0109】

本明細書中で使用される場合、「ペプチド」および「ポリペプチド」は、サブユニットアミノ酸の配列を指すその最も広い意味で使用されてもよい。本開示のペプチドまたはポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸（インビボにおいてL-アミノ酸に特異的なプロテアーゼに抵抗性であることがある）またはD-アミノ酸およびL-アミノ酸の組み合わせを含んでもよい。ペプチドおよびポリペプチドという用語は、同義に使用することができる。本明細書に記載されているペプチドおよびポリペプチドは、化学合成されても、または組換え発現されてもよい。ペプチドおよびポリペプチドは、所与の目的のために有用だと考えられる任意のその他の部分と結合されてもよい。そのような結合は、当業者によって理解されるような共有結合または非共有結合を含んでもよい。

10

【0110】

本明細書中で開示されるアミノ酸残基は、全般的なポリペプチド構造および/または機能を保持する、または実質的に保持する保存的置換によって改変されてもよい。本明細書中で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」とは、疎水性アミノ酸（すなわち、Ala、Cys、Gly、Pro、Met、Val、IleおよびLeu）が、他の疎水性アミノ酸で置換されてもよく、大きな側鎖を有する疎水性アミノ酸（すなわち、Phe、TyrおよびTrp）が、大きな側鎖を有する他の疎水性アミノ酸で置換されてもよく、正電荷側鎖を有するアミノ酸（すなわち、Arg、His、およびLys）が、正電荷側鎖を有する他のアミノ酸で置換されてもよく、負電荷側鎖を有するアミノ酸（すなわち、AspおよびGlu）が、負電荷側鎖を有する他のアミノ酸で置換されてもよく、極性無電荷側鎖を有するアミノ酸（すなわち、Ser、Thr、Asn、およびGln）が、極性無電荷側鎖を有する他のアミノ酸で置換されてもよいことを示す。

20

【0111】

対象の処置は、対象（例えば、患者）に有効量を与えること、または予防的処置および/または治療的処置を与えること含んでもよい。「有効量」は、対象に所望の生理的変化をもたらすことができる化合物の量である。有効量はまた、研究目的のために投与されてもよい。

【0112】

「予防的処置」は、処置が疾患または状態をさらに発症するリスクを減少させる、予防するおよび/または低減するため、あるいは疾患または状態を発症するリスクを減少させる、予防するおよび/または低減するために施されるような、疾患もしくは状態の徴候もしくは症状を示さない対象または疾患もしくは状態の初期の徴候もしくは症状のみを示す対象に施される処置を含む。したがって、予防的処置は、疾患または状態に対する予防処置として機能してもよい。

30

【0113】

「治療的処置」は、疾患または状態の症状または徴候を示す対象に施される処置を含み、治療的処置は、疾患または状態の症状または徴候を減少させるか、あるいは除去するために対象に施される。

【0114】

40

「治療有効量」は、予防的処置および/または治療的処置をもたらす量を含む。治療有効量はまた、疾患または状態を完全に予防するか、または治す必要はないが、発症の遅延あるいは疾患または状態の少なくとも1つの症状の緩和または改善などの部分的な利益をもたらしてもよい。

【0115】

投与に関して、有効量および治療有効量（本明細書において用量とも称される）は、インビトロアッセイおよび/または動物モデル試験の結果に基づいてまず推定することができる。例えば、細胞培養において求められたIC<sub>50</sub>を含む血中濃度範囲を達成するための用量が動物モデルに関して配合されてもよい。そのような情報は、目的とする対象において有用な用量をさらに正確に決定するために使用することができる。

50

## 【0116】

特定の対象に投与される実際の用量は、医師、獣医師または研究者が以下に限定されるものではないが、体重、状態の重症度、病気の種類、以前もしくは併用の治療的介入、対象の特発性疾患および/または投与経路を含む身体的および生理的要因などのパラメーターを考慮して決定することができる。

## 【0117】

用量は、 $1 \times 10^8$  ベクターゲノム / kg (vg / kg) から  $1 \times 10^{15}$  vg / kg 、 $1 \times 10^9$  vg / kg から  $1 \times 10^{14}$  vg / kg 、 $1 \times 10^{10}$  vg / kg から  $1 \times 10^{13}$  vg / kg 、または  $1 \times 10^{11}$  vg / kg から  $1 \times 10^{12}$  vg / kg まで変動してもよい。その他の非限定例において、用量は、約  $1 \times 10^8$  vg / kg 、約  $1 \times 10^9$  vg / kg 、約  $1 \times 10^{10}$  vg / kg 、約  $1 \times 10^{11}$  vg / kg 、約  $1 \times 10^{12}$  vg / kg 、約  $1 \times 10^{13}$  vg / kg 、約  $1 \times 10^{14}$  vg / kg または約  $1 \times 10^{15}$  vg / kg を含んでもよい。治療有効量は、処置計画の過程（すなわち、日、週、月など）において単回または複数用量を投与することによって達成されてもよい。

10

## 【0118】

本明細書中で開示の化合物の薬学的に許容される塩、互変異性体および異性体も使用されてもよい。例となる塩としては、これらに限定されるものではないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ベシル酸塩、ゲンチシネート (gentisinate) 、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルカルネート (glucaronate) 、糖酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩（すなわち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトアート)）を挙げることができる。

20

## 【0119】

本明細書に記載されている製剤は、以下に限定されないが、注射、注入、灌流、吸入、洗浄、および/または摂取によって投与することができる。投与の経路としては、これらに限定されるものではないが、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節腔内、前立腺内、胸膜内、気管内、鼻腔内、硝子体内、腔内、直腸内、局所、腫瘍内、筋肉内、小胞内、心膜内、臍帯内、眼内、粘膜、経口、皮下および/または結膜下を挙げることができる。その他の非限定例において、投与は、筋肉内注射、血管内注射、腹腔内注射または筋系へのベクターの送達に適したその他の任意の方法によって行うことができる。

30

## 【0120】

一部の実施形態において、注射用製剤は、Hanks液、リングル液、および/または生理的食塩水を含むが、それらに限定されない緩衝液中の水溶液として生成されてもよい。溶液は、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤に関連する薬剤を含んでもよい。あるいは、製剤は、使用前に適した媒体制御 (vehicle control) (例えば、滅菌バイロジエンフリー水) で構成するための凍結乾燥および/または粉末形態であってもよい。

40

## 【0121】

本明細書中で開示されるあらゆる製剤は、研究、予防的処置および/または治療的処置かにかかわらず、投与の利益より勝る可能性のある著しく有害な反応、アレルギー反応またはその他の都合の悪い反応をもたらさないものを含むその他の薬学的に許容される任意の担体（複数可）を有利に含んでもよい。例となる薬学的に許容される担体および製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Printing Company, 1990に開示されており、それらに関するその教示が参照により本明細書に組み込まれる。さらに、製剤は、生物学的基準および品質管理の米国FDAの部門および/またはその他の関連した米国および外国の規制当局によって要求される無菌性、発熱性、一般的な安全性および純度基準を満たすよう調製することができる。

50

## 【0122】

例となる一般に使用される薬学的に許容される担体は、これらに限定されるものではないが、增量剤または充填剤、溶媒または共溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メチオニン、およびビタミンE）、保存料、等張化剤、吸収遅延剤、塩、安定剤、緩衝剤、キレート剤（例えば、EDTA）、ゲル、結合剤、崩壊剤および/または滑沢剤を含んでもよい。

## 【0123】

例となる緩衝剤は、これらに限定されるものではないが、クエン酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、フマル酸緩衝剤、グルコン酸緩衝剤、シウ酸緩衝剤、乳酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、ヒスチジン緩衝剤、および/またはトリメチルアミン塩を含んでもよい。

10

## 【0124】

例となる保存料は、これらに限定されるものではないが、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ハロゲン化ベンザルコニウム、ヘキサメトニウムクロリド、アルキルパラベン（メチルもしくはプロピルパラベンなど）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサンノール、および/または3-ペンタノールを含んでもよい。

## 【0125】

例となる等張化剤は、以下に限定されるものではないが、三価以上の糖アルコール（例えば、グリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、および/またはマンニトール）を含む多価糖アルコールを含んでもよい。

20

## 【0126】

例となる安定剤は、これらに限定されるものではないが、有機糖、多価糖アルコール、ポリエチレングリコール、硫黄含有還元剤、アミノ酸、低分子量ポリペプチド、タンパク質、免疫グロブリン、親水性ポリマー、および/またはポリサッカライドを含んでもよい。

## 【0127】

製剤はまた、デポ剤であってもよい。一部の実施形態において、そのような長時間作用性製剤は、以下に限定されないが、植込み（例えば、皮下もしくは筋肉内）または筋肉内注射によって投与されてもよい。したがって、例えば、化合物は、適したポリマー材料および/もしくは疎水性材料（例えば、許容できる油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂とともに、あるいはやや可溶性の誘導体として（例えば、やや可溶性の塩として）製剤化されてもよい。

30

## 【0128】

さらに、さまざまな実施形態において、化合物は、少なくとも1つの化合物を含む固体ポリマーの半透性マトリックスなどの持続放出システムを使用して送達することができる。さまざまな持続放出材料が確立され、当業者によく知られている。持続放出カプセルは、その化学的性質に応じて、投与後、数週間から最大100日を超えて化合物を放出することができる。

## 【0129】

40

遺伝子治療方法は、特定のタンパク質を患者または対象に（例えば、持続性レベルで）送達するために使用することができる。これらの方法は、技術者が目的とする遺伝子をコードするDNAを直接患者もしくは対象（インビオ遺伝子治療）または患者、対象もしくはドナーから単離された細胞（エクスピオ遺伝子治療）に導入することを可能にする。導入されたDNAは、その後、患者もしくは対象自身の細胞または移植細胞に所望のタンパク質産物を產生するよう指示する。したがって、遺伝子送達は、毎日の注射の必要性を回避することができる。遺伝子治療はまた、治療のために技術者が特定の臓器または細胞標的（例えば、筋肉、肝臓、血液細胞、脳細胞など）を選択することを可能にする。

## 【0130】

DNAは、対象の細胞にいくつかの方法で導入することができる。リン酸カルシウム沈

50

殿およびリポソームによるトランスフェクションなどの化学的方法、ならびにエレクトロポレーションなどの物理的方法含むトランスフェクション方法がある。一般に、トランスフェクション方法は、インビオ遺伝子送達に適していない。組換えウイルスを使用する方法もある。現在のウイルスによる遺伝子送達方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0131】

遺伝子送達に使用してきたウイルスシステムの1つは、アデノ随伴ウイルス(AAV)である。AAVは、デpendoparvovirus(デpendoparvovirus)属に属するパルボウイルスである。AAVは、他のウイルスには見られないいくつかの魅力的な特徴を有する。第1に、AAVは、非分裂細胞を含む広い範囲の宿主細胞に感染することができる。第2に、AAVは、異なる種由来の細胞に感染することができる。第3に、AAVは、あらゆるヒトまたは動物疾患と関連しておらず、組込み時に宿主細胞の生物学的特性を変えないようである。実際に、ヒト母集団の80~85%がこのウイルスに曝露されていると推定される。最後に、AAVは、広い範囲の物理的および化学的条件において安定であり、これは、製造、保管および輸送要件に役立つ。

#### 【0132】

AAVゲノムは、4681のヌクレオチドを含む直線的な一本鎖DNA分子である。AAVゲノムは、一般に両末端に末端逆位配列(ITS)が隣接する内側の非反復ゲノムを含む。ITSは、およそ145塩基対(bp)の長さである。ITSは、DNA複製の開始点としておよびウイルスゲノムのためのパッケージングシグナルとしてなど複数の機能を有する。

#### 【0133】

ゲノムの内側の非反復部分は、AAV複製(rep)遺伝子およびカプシド(capsid)遺伝子として知られる2個の大きなオープンリーディングフレームを含む。rep遺伝子およびcapsid遺伝子は、ウイルスがウイルスゲノムを複製し、ビリオンにパッケージングするのを可能にするウイルスタンパク質をコードする。特に、それらの見かけの分子量に従って名づけられたRep78、Rep68、Rep52およびRep40の少なくとも4つのウイルスタンパク質のファミリーがAAVのrep領域から発現される。AAVのcapsid領域は、少なくとも3つタンパク質、VP1、VP2およびVP3をコードする。

#### 【0134】

AAVは、ヘルパー依存性ウイルスであり、すなわち、AAVは、AAVビリオンを形成するためにヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクチンニア)の共感染が必要である。ヘルパーウイルスの共感染がないと、AAVは、ウイルスゲノムが宿主細胞の染色体に挿入されるが、感染性ビリオンは産生されない潜伏状態を確立する。後のヘルパーウイルスの感染が組み込まれたゲノムを「レスキュー」し、それにより、AVVが、そのゲノムを複製し、感染性AAVビリオンにパッケージングするのを可能にする。AAVは異なる種由来の細胞に感染することができるが、ヘルパーウイルスは宿主細胞と同じ種のものでなければならない。したがって、例えば、ヒトAAVは、イヌアデノウイルスに共感染したイヌ細胞において複製することになる。

#### 【0135】

「遺伝子導入」または「遺伝子送達」は、外来DNAを宿主細胞に挿入するための方法またはシステムを含む。遺伝子導入は、組み込まれていない導入DNAの一過性の発現、染色体外複製、および導入レプリコン(例えば、エピゾーム)の発現または宿主細胞のゲノムDNAへの導入遺伝物質の組込みをもたらす。

#### 【0136】

「ベクター」は、以下に限定されるものではないが、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、人工染色体、ウイルス、ビリオンなどの任意の遺伝エレメントを含み、これは、適切な制御エレメントと結合されると複製することができ、細胞間で遺伝子配列を移すことができる。したがって、この用語は、クローニング媒体および発現

10

20

30

40

50

媒体ならびにウイルスベクターを含む。

【0137】

「AAVベクター」は、以下に限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、およびAAV9を含むアデノ随伴ウイルス血清型由来のベクターを含む。AAVベクターは、全体または一部が除去された1つまたは複数のAAV野生型遺伝子、例えば、*rep*遺伝子および/または*capsid*遺伝子を有してもよいが、機能的な隣接するITR配列を保持する。機能的なITR配列は、レスキュー、複製およびAAVビリオンのパッケージングのために必須である。したがって、AAVベクターは、本明細書においてはウイルスの複製およびパッケージング（例えば、機能的なITR）のためにシス位置に必要とされる少なくともそれらの配列を含むと定義される。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的レスキュー、複製およびパッケージングをもたらす限り、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって改変されてもよい。

【0138】

「組換えAAVベクター」または「rAAVベクター」は、AAV ITTRが両側に隣接した目的とする異種のヌクレオチド配列を被包するAAVタンパク質殻から構成される感染性で複製に欠陥のあるウイルスを含む。rAAVベクターは、AAVベクター、AAVヘルパー機能および付属の機能を含む適切な宿主細胞において生成される。この手法では、宿主細胞が、続く遺伝子送達のためにAAVベクター（目的とする組換えヌクレオチド配列を含む）を感染性の組換えビリオン粒子にパッケージングするために必要とされるAAVポリペプチドをコードすることができるようになる。

【0139】

本開示の第1の態様は、タンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含むヌクレオチド配列に関する。ヌクレオチド配列はまた、制御カセットも含んでよい。さらに、ヌクレオチド配列は、単離および/または精製されてもよい。

【0140】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、アミノ末端アクチシン結合ドメイン、ジストログリカン結合ドメイン、および/またはスペクトリン様リピートドメインを含んでもよい。スペクトリン様リピートドメインは、少なくとも4個のスペクトリン様リピートまたは少なくとも4個のスペクトリン様リピートの一部を含んでもよい。少なくとも4個のスペクトリン様リピートのうちの2個は、神経型一酸化窒素合成酵素結合ドメインを含んでもよい。言い換れば、少なくとも4個のスペクトリン様リピートは、スペクトリン様リピート16および17またはそれらの一部を含んでもよい。一部の実施形態において、少なくとも4個のスペクトリン様リピートは、スペクトリン様リピート1および24またはそれらの一部を含んでもよい。代替的実施形態において、少なくとも4個のスペクトリン様リピートは、その他の適したスペクトリン様リピートまたはそれらの一部（例えば、スペクトリン様リピート2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、および/または23）を含んでもよい。

【0141】

特定の実施形態において、スペクトリン様リピートドメインは、4個、5個、6個、7個、8個以上のスペクトリン様リピートまたはそれらの一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、5個のスペクトリン様リピートから8個のスペクトリン様リピートの間のスペクトリン様リピート（例えば、5個、6個、7個または8個スペクトリン様リピート）を含んでもよい。さらに特定の他の実施形態において、スペクトリン様リピートドメインは、別の適した数のスペクトリン様リピートまたはそれらの一部を含んでもよい。

【0142】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、ヒンジドメインまたはその一部をさらに含んでもよい。例えば、マイクロジスト

ロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、ヒンジ1ドメイン、ヒンジ2ドメイン、ヒンジ3ドメイン、ヒンジ4ドメインおよび/またはヒンジ様ドメインの少なくとも1つから選択されるヒンジドメインの少なくとも一部を含んでもよい(スペクトリン様リピート15(配列番号20)から下流の配列およびスペクトリン様リピート23(配列番号21)内の配列によってコードされるヒンジ様ドメインなど)。

【0143】

さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

10

【0144】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。一部の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにいくつかの他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

20

【0145】

特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

30

【0146】

さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくと

40

50

も 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 6 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

## 【 0 1 4 7 】

10

さらに、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の配列番号 1 1 ~ 1 8 の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、1つまたは複数の配列番号 3 ~ 1 0 のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、図 7 のタンパク質構造図に示される1つまたは複数のタンパク質の一部を含んでもよい(例えば、 $\mu$  D y s H 3 および  $\mu$  D y s 1 ~  $\mu$  D y s 1 6)。

## 【 0 1 4 8 】

一部の実施形態において、制御カセットは、C K 8 プロモーター、心筋トロポニン T (c T n T) プロモーターおよび/または別の適した制御カセットの少なくとも1つから選択されてもよい。特定の実施形態において、制御カセットは、C K 8 プロモーターであってもよく、C K 8 プロモーターは、配列番号 1 9 の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、制御カセットは、C K 8 プロモーターであってもよく、C K 8 プロモーターは、配列番号 1 9 の核酸配列と少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 6 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、制御カセットは、C K 8 プロモーターであってもよく、C K 8 プロモーターは、配列番号 1 9 の核酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

## 【 0 1 4 9 】

20

さまざまな実施形態において、制御カセットは、c T n T プロモーターであってもよく、c T n T プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、制御カセットは、c T n T プロモーターであってもよく、c T n T プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 6 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、制御カセットは、c T n T プロモーターであってもよく、c T n T プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

## 【 0 1 5 0 】

30

本開示の別の態様は、上記のとおりのヌクレオチド配列を含む医薬組成物に関する。一部の実施形態において、本医薬組成物は、送達媒体をさらに含んでもよい。例えば、本医

40

50

薬組成物は、制御カセットおよびタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含むヌクレオチド配列を含んでもよく、医薬組成物は、送達媒体をさらに含んでもよい。本医薬組成物のヌクレオチド配列は、単離および精製されたヌクレオチド配列であってもよい。

【0151】

さまざまな実施形態において、送達媒体は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを含んでもよい。AAVベクターは、血清型6のAAV (AAV6) であってもよい。同様に、rAAVベクターは、血清型6のrAAV (rAAV6) であってもよい。AAVベクターは、血清型8のAAV (AAV8) であってもよい。同様に、rAAVベクターは、血清型8のrAAV (rAAV8) であってもよい。AAVベクターは、血清型9のAAV (AAV9) であってもよい。同様に、rAAVベクターは、血清型9のrAAV (rAAV9) であってもよい。rAAVベクターは、AAV血清型6由来のカプシドタンパク質でシードタイピングしたAAV2ゲノム末端逆位配列 (ITR) (rAAV2/6) から構成されてもよい。AAVまたはrAAVのその他の適した血清型も、本開示の範囲内にある。

【0152】

一部の実施形態において、上記のとおり、送達媒体は、マイクロジストロフィン遺伝子を発現させてもよく、またはそれを発現させるよう構成されてもよい。さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

【0153】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。一部の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにいくつかの他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

【0154】

特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、

10

20

30

40

50

、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 1 8 の核酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

【 0 1 5 5 】

さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 6 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

10

20

【 0 1 5 6 】

また、上記のとおり、制御力セットは、C K 8 プロモーター、心筋トロポニン T ( c T n T ) プロモーターおよび／または別の適した制御力セットの少なくとも 1 つから選択されてもよい。特定の実施形態において、制御力セットは、C K 8 プロモーターであってもよく、C K 8 プロモーターは、配列番号 1 9 の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、制御力セットは、C K 8 プロモーターであってもよく、C K 8 プロモーターは、配列番号 1 9 の核酸配列と少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 6 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、制御力セットは、C K 8 プロモーターであってもよく、C K 8 プロモーターは、配列番号 1 9 の核酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

30

【 0 1 5 7 】

さまざまな実施形態において、制御力セットは、c T n T プロモーターであってもよく、c T n T プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、制御力セットは、c T n T プロモーターであってもよく、c T n T プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 6 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、制御力セットは、c T n T プロモーターであってもよく、c T n T プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と 1 0 0 %の配列同一性を有してもよい。

40

50

もよく、cTnTプロモーターは、配列番号1の核酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

【0158】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減するよう構成されてもよい。筋ジストロフィーは、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帶型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、および/または別の適した筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択されてもよい。一部の他の実施形態において、本医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび/またはベッcker型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つから選択される筋ジストロフィーの病理学的影響または症状を低減するよう構成されてもよい。特定の実施形態において、本医薬組成物は、サルコペニア、心臓疾患および/または悪液質のうちの少なくとも1つの病理学的影響または症状を低減するよう構成されてもよい。

10

【0159】

本開示の別の態様は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および/または悪液質を有する対象を処置するための方法に関する。本方法は、対象に制御力セットと連結されたマイクロジストロフィン遺伝子を含む医薬組成物を投与することを含んでもよい。本方法は、対象に治療有効量の医薬組成物を投与することを含んでもよい。さらに、マイクロジストロフィン遺伝子は、機能可能に制御力セットと連結されてもよい。

20

【0160】

一部の実施形態において、本方法は、対象に医薬組成物を投与することを含んでもよく、医薬組成物は、AAVベクター、rAAVベクターおよび/または別の適した送達媒体をさらに含む。送達媒体は、対象においてマイクロジストロフィン遺伝子を発現させてもよく、またはそれを発現させるよう構成されてもよい。

【0161】

上記のとおり、さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号16の核酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

30

【0162】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。一部の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにいくつかの他の実施形態において、マ

40

50

イクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

【0163】

特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号18の核酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

10

【0164】

さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有してもよい。さらにさまざまな他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列と100%の配列同一性を有してもよい。

20

【0165】

30

一部の実施形態において、制御カセットは、横紋筋細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルが、非筋肉細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも100倍高くなるようにマイクロジストロフィン遺伝子を発現させてもよく、または発現させるよう構成されてもよい。例えば、マイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルは、対象の肺細胞においてよりも対象の横紋筋細胞において少なくとも100倍高くてもよい。一部の他の実施形態において、制御カセットは、横紋筋細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルが、非筋肉細胞におけるマイクロジストロフィン遺伝子の発現のレベルよりも少なくとも50倍高いレベルから150倍高いレベルの間、少なくとも75倍高いレベルから125倍高いレベルの間または少なくとも90倍高いレベルから110倍高いレベルの間であるようにマイクロジストロフィン遺伝子を発現させてもよく、または発現させるよう構成されてもよい。

40

【0166】

上記のとおり、制御カセットは、CK8プロモーター、心筋トロポニンT(cTnT)プロモーターおよび/または別の適した制御カセットの少なくとも1つから選択されてもよい。特定の実施形態において、制御カセットは、CK8プロモーターであってもよく、CK8プロモーターは、配列番号19の核酸配列の一部を含んでもよい。特定の他の実施形態において、制御カセットは、CK8プロモーターであってもよく、CK8プロモーターは、配列番号19の核酸配列と少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、

50

0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、制御力セットは、CK8 プロモーターであってもよく、CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と 100 % の配列同一性を有してもよい。

#### 【0167】

さまざまな実施形態において、制御力セットは、cTnT プロモーターであってもよく、cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列の一部を含んでもよい。さまざまな他の実施形態において、制御力セットは、cTnT プロモーターであってもよく、cTnT プロモーターは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 76 %、少なくとも 77 %、少なくとも 78 %、少なくとも 79 %、少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有してもよい。さらに特定の他の実施形態において、制御力セットは、CK8 プロモーターであってもよく、CK8 プロモーターは、配列番号 19 の核酸配列と 100 % の配列同一性を有してもよい。

10

#### 【0168】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の筋肉の収縮性が向上するか、または増加するように対象の1つまたは複数の筋肉においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現してもよく、または発現するよう構成されてもよい。特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、1つまたは複数の骨格筋のうちの少なくとも1つの比筋力発揮能力が正常な比筋力発揮能力の少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 % または少なくとも 40 % の範囲内まで向上するか、または増加するように対象の1つまたは複数の骨格筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現してもよく、または発現するよう構成されてもよい。特定の他の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、基準拡張終末期容積の不足が、正常な拡張終末期容積の少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 % または少なくとも 40 % の範囲内まで回復するように対象の1つまたは複数の心筋においてマイクロジストロフィンタンパク質を発現してもよく、または発現するよう構成されてもよい。さまざまな実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、ジストロフィン糖タンパク質複合体への神経型一酸化窒素合成酵素の局在化が対象において向上するか、または増加するようマイクロジストロフィンタンパク質を発現してもよく、または発現するよう構成されてもよい。

20

#### 【0169】

一部の実施形態において、上記のとおり、本方法は、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、および / または別の適した筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つを有する対象を処置することを含んでもよい。一部の他の実施形態において、本方法は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび / またはベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つを有する対象を処置することを含んでもよい。

30

#### 【0170】

特定の実施形態において、本医薬組成物は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および / または悪液質の病理学的影响または症状を低減してもよく、または低減するよ

40

50

う構成されてもよい。筋ジストロフィーの病理学的影響または症状は、筋痛、筋力低下、筋肉疲労、筋萎縮、線維症、炎症、骨格筋の平均筋線維直径の増加、心筋症、6分間歩行試験時間の減少、歩行の減少、心ポンプ失調、および／または1つまたは複数のその他の適した病理学的影響または症状のうちの少なくとも1つから選択されてもよい。サルコペニアの病理学的影響または症状は、筋消耗および／または筋力低下のうちの少なくとも1つから選択されてもよい。心臓疾患の病理学的影響または症状は、心筋症、血行動態の低下、および／または不整脈のうちの少なくとも1つから選択されてもよい。悪液質の病理学的影響または症状は、筋消耗および／または筋力低下のうちの少なくとも1つから選択されてもよい。

## 【0171】

10

筋ジストロフィーを有する対象を処置する方法は、筋ジストロフィーを有する対象を特定することをさらに含んでもよい。同様に、サルコペニア、心臓疾患および／または悪液質を有する対象を処置する方法は、それぞれサルコペニア、心臓疾患および／または悪液質を有する対象を特定することをさらに含んでもよい。一部の実施形態において、対象は、哺乳動物であってもよい。特定の実施形態において、対象は、ヒトであってもよい。

## 【0172】

本開示の別の態様は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および／または悪液質を発症するリスクのある対象に予防的処置を行うための方法に関する。本方法は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および／または悪液質を有する対象を処置する方法に関して上記のとおりの医薬組成物を対象に投与すること含んでもよい。

20

## 【0173】

一部の実施形態において、本方法は、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帶型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、および／または別の適した筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つを発症するリスクのある対象を処置することを含んでもよい。一部の他の実施形態において、本方法は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび／またはベッカー型筋ジストロフィーのうちの少なくとも1つを発症するリスクのある対象を処置することを含んでもよい。

## 【0174】

30

特定の実施形態において、本医薬組成物は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および／または悪液質の病理学的影響または症状を発症するリスクを低減してもよく、または低減するよう構成されてもよい。筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および／または悪液質を発症するリスクのある対象を処置する方法は、それぞれ筋ジストロフィー、サルコペニア、心臓疾患および／または悪液質を発症するリスクのある対象を特定することをさらに含んでもよい。一部の実施形態において、対象は、哺乳動物であってもよい。特定の実施形態において、対象は、ヒトであってもよい。

## 【0175】

本開示の別の態様は、医薬組成物（例えば、マイクロジストロフィン遺伝子）の発現を向上させる、かつ／または標的とするエンハンサーおよび／またはプロモーターを含む制御力セットに関する。一部の実施形態において、医薬組成物の発現を向上させる、かつ／または標的とするためのエンハンサーまたはプロモーターは、遺伝子、ペプチド、ポリペプチドおよび／または調節性RNAの少なくとも一部を含んでもよい。医薬組成物の発現を標的とすることは、対象の特定の細胞タイプ、組織、および／または臓器における医薬組成物の発現を含んでもよい。例えば、cTnT455（配列番号1）は、心臓特異的な発現に使用することができる。

40

## 【0176】

特定の実施形態において、エンハンサーまたはプロモーターは、ペプチドを含む医薬組成物を発現させてもよく、発現させるよう構成されてもよい。さまざまな実施形態において、エンハンサーまたはプロモーターは、発生中の筋肉、損傷を受けた筋肉および／また

50

は病気の筋肉（すなわち、再生している可能性のある筋肉）においてペプチドを発現させてもよく、または発現させるよう構成されてもよい。ヒト c T n T 4 5 5 R C（配列番号1）は、安定状態の成熟骨格筋において転写活性がなくてもよい。

【0177】

上記のとおり、エンハンサーおよび／またはプロモーターは、機能するよう、すなわち、医薬組成物の発現を向上させる、かつ／または医薬組成物を標的とするため医薬組成物と連結されてもよい。さらに、本医薬組成物は、機能するよう1つ以上のエンハンサーおよび／またはプロモーターと連結されてもよい。一部の実施形態において、本明細書中において開示される医薬組成物の発現は、心筋を再生する助けとなる場合もある。例えば、ヒト c T n T 4 5 5 R C（配列番号1）は、傷ついた心筋および／または再生している心筋において医薬組成物の一過性の発現を向上させてもよく、またはそれを標的としてもよい。一部の実施形態において、本明細書中で開示される医薬組成物の発現は、心筋および／または心筋細胞の減少を予防する助けとなる場合もある。特定の実施形態において、本明細書中において開示される医薬組成物の発現は、骨格筋を再生する助けとなる場合もある。さまざまな実施形態において、本明細書中で開示される医薬組成物の発現は、骨格筋の壊死および／または消耗を予防する助けとなる場合もある。

【0178】

本開示の別の態様は、マイクロジストロフィン遺伝子を含むヌクレオチド配列に関し、マイクロジストロフィン遺伝子は、互いに直接連結された少なくとも2個のスペクトリン様リピートを含むタンパク質をコードしてもよい。一部の実施形態において、互いに直接連結された少なくとも2個のスペクトリン様リピートは、スペクトリン様リピート2（S R 2）と直接連結されたスペクトリン様リピート1（S R 1）、スペクトリン様リピート3（S R 3）と直接連結されたS R 2、スペクトリン様リピート16（S R 16）と直接連結されたS R 1、スペクトリン様リピート23（S R 23）と直接連結されたスペクトリン様リピート17（S R 17）、スペクトリン様リピート24（S R 24）と直接連結されたS R 17、および／またはS R 24と直接連結されたS R 23のうちの少なくとも1つから選択されてもよい。マイクロジストロフィン遺伝子はまた、アミノ末端アクチニン結合ドメインおよび／または-ジストログリカン結合ドメインを含むタンパク質をコードしてもよい。

【0179】

本開示の別の態様は、マイクロジストロフィン遺伝子を含むヌクレオチド配列に関し、マイクロジストロフィン遺伝子は、順番にヒンジ1ドメイン（H 1）、S R 1、S R 16、S R 17、S R 24、および／またはヒンジ4ドメイン（H 4）を含むタンパク質をコードしてもよい。一部の実施形態において、H 1は、S R 1と直接連結されてもよい。さまざまな実施形態において、S R 1は、S R 16と直接連結されてもよい。特定の実施形態において、S R 16は、S R 17と直接連結されてもよい。一部の実施形態において、S R 17は、S R 24と直接連結されてもよい。さまざまな実施形態において、S R 24は、H 4と直接連結されてもよい。

【0180】

一部の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子によってコードされるタンパク質は、順番にS R 2およびS R 3をさらに含んでもよく、S R 2およびS R 3は、S R 1とS R 16との間に配置されてもよい。さらに、S R 1は、S R 2と直接連結されてもよく、S R 2は、S R 3とさらに連結されてもよい。

【0181】

本開示の別の態様は、タンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子を含むヌクレオチド配列に関し、マイクロジストロフィン遺伝子は、順番にH 1、S R 1、S R 16、S R 17、S R 23、S R 24、および／またはH 4を含むタンパク質をコードしてもよい。一部の実施形態において、H 1は、S R 1と直接連結されてもよい、S R 1は、S R 16と直接連結されてもよい、S R 16は、S R 17と直接連結されてもよい、S R 17は、S R 23と直接連結されてもよい、S R 23は、S R 24と直接連結されてもよ

10

20

30

40

50

く、かつ／または S R 2 4 は、 H 4 と直接連結されてもよい。

【 0 1 8 2 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 6 の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子と、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターまたは組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクターとを含んでもよい医薬組成物に関する。一部の実施形態において、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 、血清型 9 または別の適した血清型のうちの少なくとも 1 つから選択されてもよい。

【 0 1 8 3 】

本開示の別の態様は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでもよいタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子と、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターとを含んでもよい医薬組成物に関する。特定の実施形態において、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 、血清型 9 または別の適した血清型のうちの少なくとも 1 つから選択されてもよい。

10

【 0 1 8 4 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 8 の核酸配列を含むマイクロジストロフィン遺伝子と、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターとを含んでもよい医薬組成物に関する。さまざまな実施形態において、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 、血清型 9 または別の適した血清型のうちの少なくとも 1 つから選択される。

【 0 1 8 5 】

本開示の別の態様は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含んでもよいタンパク質をコードするマイクロジストロフィン遺伝子と、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターとを含んでもよい医薬組成物に関する。一部の実施形態において、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 、血清型 9 または別の適した血清型のうちの少なくとも 1 つから選択される。

20

【 0 1 8 6 】

本開示の別の態様は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全、および／または悪液質の処置または予防的処置に使用するための医薬組成物に関する。一部の実施形態において、本医薬組成物は、マイクロジストロフィン遺伝子を含んでもよい。特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 1 6 または配列番号 1 8 の核酸配列と、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターとを含んでもよい。さまざまな実施形態において、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 、血清型 9 または別の適した血清型のうちの少なくとも 1 つから選択されてもよい。

30

【 0 1 8 7 】

本開示の別の態様は、筋ジストロフィー、サルコペニア、心不全、および／または悪液質の処置または予防的処置のための医薬組成物に関する。一部の実施形態において、本医薬組成物は、マイクロジストロフィン遺伝子を含んでもよい。特定の実施形態において、マイクロジストロフィン遺伝子は、配列番号 1 6 または配列番号 1 8 の核酸配列と、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターとを含んでもよい。さまざまな実施形態において、 A A V ベクターまたは r A A V ベクターの血清型は、血清型 6 、血清型 8 、血清型 9 または別の適した血清型のうちの少なくとも 1 つから選択されてもよい。

40

【 実施例 】

【 0 1 8 8 】

以下の実施例は、開示されている方法および組成物の説明のためのものである。本開示に照らして、当業者は、過度の実験を行うことなく、開示されている方法および組成物のこれら例および他の例の変形が可能であろうことを認識するであろう。

【 実施例 1 】

【 0 1 8 9 】

マイクロジストロフィンの開発

改善された性能を有するマイクロジストロフィンを開発するために、コード領域のおよそ 80 % を占めるジストロフィンの中心のロッドドメインのさまざまな構造的変更を評価

50

した。完全長タンパク質に存在する 24 のスペクトリン様リピート (S R ) のうちの 4 個から 6 個の間のスペクトリン様リピートならびに内部のヒンジドメインのあり、またはなしの固有の組み合わせを含む新規の構築物を形成した。これらの新規のマイクロジストロフィンを、ジストロフィー m d x マウスに r A A V により送達し、続いて 3 か月および 6 か月後に骨格筋の病態生理学的分析を行うことによって評価した。

#### 【0190】

μ D y s クローンのいくつかの種類を、ジストロフィン糖タンパク質複合体 (D G C) のより完全な回復を可能にすると同時に機能活性を増加させることに重点を置いて設計した。設計した μ D y s クローンを、m d x マウスの横紋筋において高度に機能的であり得る予め特徴づけられた H 2 - R 2 3 + H 3 / C T クローン、μ D y s H 3 と比較した (Banks, G. B., et al., PLoS Genetics 6, e1000958, (2010) を参照)。これらの構築物の設計は、この構築物を発現する筋肉の収縮性を改善し、D G C への神経型一酸化窒素合成酵素 (n N O S) の局在化を回復させるために少なくとも部分的に中心のロッドドメインに焦点を合わせた (Lai, Y., et al., The Journal of Clinical Investigation 119, 624-635, (2009) および Lai, Y., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 525-530, (2013) を参照)。機能的能力および 4 個、5 個または 6 個の S R を有するより大きな構築物を送達する能力も試験した。これらのより大きな μ D y s クローンの安定したパッケージングを可能にするために、筋肉クレアチニンキナーゼ遺伝子から改変された小さな遺伝子制御カセット (R C) を組み込んだ。この C K 8 R C は、筋肉に限定された高い発現を示すことができるが、この C K 8 R C は 500 b p s 未満のサイズである (Goncalves, M. A., et al., Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy 19, 1331-1341, (2011) および Martari, M., et al., Human Gene Therapy 20, 759-766, (2009) を参照)。

#### 【実施例 2】

#### 【0191】

##### マイクロジストロフィンクローンの設計

ロッドドメイン構造のバリエーションを試験するために 7 種の新規のマイクロジストロフィン (μ D y s ) クローンを設計した。7 種のマイクロジストロフィンクローンのそれぞれは、N 末端アクチン結合ドメイン (N - A B D ) およびジストログリカン結合ドメイン (D g B D ) に対するコード配列を保持するが、送達され、r A A V ベクターから発現され得る改善された機能特性を有する μ D y s クローンを形成することを目的として、各 μ D y s クローンは、S R とヒンジドメインの新規の組み合わせを含むものとした。μ D y s クローンのそれぞれを、以下に記載されるようにデュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D ) のマウスモデルにおいても試験した。μ D y s H 3 およびこれらの 7 種の新規の μ D y s 構築物のアミノ酸配列および核酸配列の配列番号を表 1 に列挙する。

#### 【0192】

#### 【表 1】

表 1:マイクロジストロフィン構築物配列

マイクロジストロフィン構築物	アミノ酸配列	核酸配列
μDysH3	配列番号 3	配列番号 11
μDys1	配列番号 6	配列番号 12
μDys2	配列番号 7	配列番号 13
μDys3	配列番号 8	配列番号 14
μDys4	配列番号 9	配列番号 15
μDys5	配列番号 4	配列番号 16
μDys6	配列番号 10	配列番号 17
μDys7	配列番号 5	配列番号 18

#### 【0193】

10

20

30

40

50

以前の研究は、 $\mu$  D y s クローン内のヒンジドメインの選択が、タンパク質の機能に影響を与える可能性があることを示唆している (Banks, G. B., et al., PLoS Genetics 6, e1000958, (2010)を参照)。代替のおよび / またはより短いヒンジドメインが、 $\mu$  D y s クローン、 $\mu$  D y s H 3 に使用されているヒンジ 3 ドメインを置換できるかどうかを評価した (同上を参照)。S R 1 6 および 1 7 を含めると、(例えば、D G C に n N O S を動員することによって) いくつかの $\mu$  D y s クローンの機能を改善することができることを示した。それに応じて、S R 1 6 および 1 7 もさまざまなヒンジドメインおよびその他の S R と関連して試験した。新しい接合部 (すなわち、完全長タンパク質中では通常互いに隣接していないドメインを一緒にさせる接合部) を作り出すことも最小限にした。さらに、5 個または 6 個の S R のいずれかの組み合わせを含めることによる $\mu$  D y s - クローンの機能に対する影響も評価した。 $\mu$  D y s H 3 クローンおよび完全長タンパク質と比較した 7 種の新規の $\mu$  D y s クローンの構造を、図 1 A に示す。

#### 【 0 1 9 4 】

ジストロフィン中の 2 つの領域を、ヒンジ 3 を置換するそれらの能力に関して試験した。ロッドドメインのヒンジ領域は、プロリンが豊富で、スペクトリン様リピートの三重らせんコイルドコイルを構成するアルファ - ヘリックスシグネチャーモチーフがない (Winder, S. J., et al., FEBS Letters 369, 27-33 (1995)を参照)。S R 2 3 は、アルファ - ヘリックス b と c との間にプロリンリッチリンカーを含む (例えば、図 2 1 を参照)。この配列 (S R 2 3 のアルファ - ヘリックス c を有する) が、それ自体によって ( $\mu$  D y s 1)、S R 1 6 ~ 1 7 と隣接することによって ( $\mu$  D y s 2) または H 3 と一緒になる ( $\mu$  D y s 4) のいずれかでヒンジドメインとして使用できるかどうか評価した。追加の構築物の 1 つは、ヒンジ 3 を完全な S R 2 3 で置き換えた ( $\mu$  D y s 5、図 1 A を参照)。S R 1 5 と S R 1 6 との間に位置する、前に示した 2 0 個のアミノ酸の挿入から成る第 2 のヒンジ様領域 (配列番号 2 0) も試験した ( $\mu$  D y s 6) (Winder, S. J., et al., FEBS Letters 369, 27-33 (1995)を参照)。追加の構築物を、これらのヒンジと関連して S R ドメインのさまざまな組み合わせを試験するために設計した。S R ドメインの文脈がそれらの機能に重要な可能性があることが示されたため、S R 2 0 の前半および S R 2 4 の後半から成るハイブリッド S R が $\mu$  D y s の機能 ( $\mu$  D y s 3) を改善するかどうか試験した。このハイブリッド S R は、通常ヒンジ 3 と隣接する S R 2 0 の部分を、ヒンジ 4 と合体する S R 2 4 の部分と合体させる (図 1 A を参照)。同様の考慮は上に示した $\mu$  D y s 6 構築物の設計にも影響を与え、S R 1 5 と S R 1 6 との間に位置する新規のヒンジを、S R 1 6 ~ 1 7 の n N O S 位置領域と隣接する通常の文脈で使用した。この後者の構築物も、類似の構築物と直接比較したが、これは、S R 1 5 と S R 1 6 との間の短いヒンジ様領域の代わりにヒンジ 3 を使用した (図 1 B を参照)。5 個または 6 個のいずれかの S R ドメインを含む $\mu$  D y s クローン 5 ~ 7 が、場合によってはタンパク質の全般的な機能を高めることも留意した (Harper, S. Q. et al., Nature Medicine 8, 253-261, (2002)を参照)。

#### 【 実施例 3 】

#### 【 0 1 9 5 】

部分的なスペクトリン様リピートの機能性はロッドドメイン構成により決まる可能性がある

C M V プロモーターによって制御される r A A V 6 ベクターを形成することによって $\mu$  D y s H 3 クローンと比較して、 $\mu$  D y s クローン 1 ~ 7 の最初の機能的なスクリーニングを行った。 $5 \times 1 0^{10}$  ベクターゲノム (v g) の用量を、5 ~ 6 週齢のジストロフィ - m d x<sup>4 c v</sup> 雄マウスの一方の前脛骨 (T A) 筋に筋肉注射し (Chapman, V. M., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86, 1292-1296 (1989)を参照)、反対側の筋肉は内的陰性対照の役割を果たす (構築物当たり N = 4 ~ 5 匹のマウス)。

#### 【 0 1 9 6 】

どれだけ良好に各構築物が発現されたか、発現が持続したかどうか、および構築物が進

10

20

30

40

50

行中の筋線維壊死を予防または低減できたかどうかを判定するために、ジストロフィンの発現および変性 / 再生の特徴である中心核形成を注射後 4 週目および 12 週目に判定した（図 1 C および 1 D を参照）。ウエスタンプロット分析によって示されるとおり、すべての構築物が予想したサイズの  $\mu$  D y s タンパク質を形成した（図 1 B を参照）。この週齢および注射された T A 筋当たりのベクター用量において、すべての処置  $m d \times 4^c v$  コホートは、野生型 C 57 B L / 6 マウスと比較して著しくジストロフィン - 陽性 (D y s +) 筋線維が少なかった ( $P < 0.001$ ) が、マイクロジストロフィン間で機能性の差が確認された。注射後 4 週目から 12 週目の間にジストロフィン陽性筋線維が減少したことによって証明されるように、構築物  $\mu$  D y s 3 および  $\mu$  D y s 4 は  $\mu$  D y s H 3 よりもよく機能しなかった。構築物  $\mu$  D y s - 1、2 および 5 は、注射後 12 週目まで  $\mu$  D y s H 3 よりも多く多くのジストロフィン陽性筋線維を示した（図 1 D を参照）。CK 8 プロモーターによって駆動される  $\mu$  D y s H 3 に対して  $\mu$  D y s 6 および  $\mu$  D y s 7 の最初のスクリーニングを行った。新規の両構築物は、注射後 12 週目まで  $\mu$  D y s H 3 と比較して同等のレベルの形質導入された (D y s +) 中心部に核のある (C N F +) 筋線維（図 1 D を参照）をもたらした。ジストロフィン発現および中心核形成の両方を示す筋線維を両方の時点で定量した（図 1 C および 1 D を参照）。D y s + および C N F + の筋線維のレベルは、処置したコホートにおいて注射後 4 週目から 12 週目までに減少したが、野生型の筋肉よりも高いレベルで残っていた。これがマイクロジストロフィン構築物の不良な機能性または最適な用量未満の結果なのかどうか最初のスクリーニングだけでは不確実なままであり、このため、さらなる評価のための全身投与を行うこととなった。

#### 【実施例 4】

##### 【0197】

新規の  $\mu$  D y s 構築物は呼吸器筋および後肢骨格筋における病態を和らげる  $\mu$  D y s - 1、2、3、4、5 および  $\mu$  D y s H 3 ベクターを再びクローン化して、CMV をより小さな筋特異的 CK 8 プロモーターで置き換え、それにより、より大きな 6 個の S R を含有する構築物 ( $\mu$  D y s 6 および 7) との直接的な比較を可能にする。全身的処置のために、 $10^{13} v g$  を後眼窩静脈叢への注射により 14 日齢の  $m d \times 4^c v$  雄マウスに大量急速送達した。未処置対照および野生型対照と一致する日齢の処置マウスを、注射後 3 か月または 6 か月のいずれかに評価した。この実験は、 $\mu$  D y s 構築物の発現をモニタし、それらがジストロフィーの病態生理を停止させることができる相対的な程度を評価するために設計した。 $\mu$  D y s 発現の持続性を腓腹筋凍結切片および横隔膜筋凍結切片の免疫蛍光染色によって判定した。D G C メンバー、-ジストログリカンおよび n N O S (適切な構築物に関する) の筋細胞膜への動員も検証した（図 2 を参照）。

##### 【0198】

注射後 3 か月目に、すべての処置群は、腓腹筋線維および横隔膜筋線維の両方の筋細胞膜において 60 % を超えるジストロフィンの発現があった。中心に核のあるジストロフィン陽性筋線維のパーセンテージは、野生型対照とは有意差がなかった（図 3 A および 3 C を参照）。この時点において、腓腹筋および横隔膜において  $\mu$  D y s 2 が、 $\mu$  D y s 5 と比較して著しく低いレベルで発現されたことを観察した（図 3 A および 3 C を参照）。 $\mu$  D y s 2 で処置したマウスはまた、 $\mu$  D y s 1、 $\mu$  D y s 5 および  $\mu$  D y s H 3 を注射した動物と比較して横隔膜において形質導入された筋線維が著しく少なかった（図 3 C を参照）。反対に、 $\mu$  D y s 5 を注射したマウスは、その他のすべての処置群と比較して腓腹筋において著しく多くの数の形質導入された筋線維を示した（図 3 A を参照）。同じ筋肉の形態的分析により、すべての処置群の中心に核のある筋線維のパーセンテージが著しく低下したことが証明された。横隔膜では、野生型群と処置群との間の中心に核のある筋線維のパーセンテージに有意差がなかった。しかしながら、 $\mu$  D y s 2 および  $\mu$  D y s H 3 を注射したマウスは、腓腹筋では野生型 (0 %) よりも有意に高いレベルの中心核形成 (それぞれ 19 % および 20 %、 $P < 0.001$ ) を示した。

##### 【0199】

機能的なジストロフィンがないと、D G C の構築が損なわれる可能性がある。これは、

機械力の伝達を低下させ、収縮により引き起こされる損傷の受けやすさを増加させる可能性がある (Emery, A. E. H. and Muntoni, F., *Duchenne Muscular Dystrophy*, Third Edition (Oxford University Press, 2003) および Ozawa, E. in *Myology* (ed. Franzini-Armstrong C Engel A) 455-470 (McGraw-Hill, 2004) を参照)。いくつかの rAAV- $\mu$ DySベクターの発現は、ジストロフィーの動物モデルにおける比筋力発揮および収縮により引き起こされる損傷に対する耐性を増加させる能力を証明した (Seto, J. T., et al., *Current Gene Therapy* 12, 139-151 (2012) を参照)。注射後 3 か月目にどの新規の  $\mu$ DyS構築物がこれらの測定規準を改善することができるか評価した (図 3 C および 3 D を参照)。

## 【0200】

10

それぞれ機械的特性のインサイチュ測定およびインビトロ測定のために腓腹筋細片および横隔膜筋細片を作製した。未処置ジストロフィー対照と比較して、すべての処置群において腓腹筋における比筋力発揮が増加した (図 3 B を参照)。 $\mu$ DyS1 および  $\mu$ DyS2 を注射したマウスのみが横隔膜筋細片における比筋力の増加を示した (未処置マウスにおける 98 kN/m<sup>2</sup> と比較して、それぞれ 156 kN/m<sup>2</sup> および 110 kN/m<sup>2</sup>) (図 3 D を参照)。さらに、新規のすべての  $\mu$ DyS構築物の発現が、収縮により引き起こされる損傷に対する耐性を増加させたが、互いに比較して有意差はなかった。ジストロフィーの病態は、注射後 3 か月目までに停止したようであったが、生理的能力は有意に改善されなかった。 $\mu$ DyS構築物の機能性をさらに評価するために、さらに長い時点を用いてもよい。

20

## 【実施例 5】

## 【0201】

長期発現は  $\mu$ DyS構築物の機能的矛盾を明かす

処置後 6 か月目まで、大半の処置群は、処置後 3 か月目の分析と比較してさまざまな程度ではあるがジストロフィンの発現の低下および中心核形成を呈する筋線維のパーセンテージの付随する増加を示した。しかしながら、ジストロフィン発現および中心核形成の両方を示す筋線維のパーセンテージは、野生型対照と有意差がなかった (図 4 A および 4 C を参照)。6 か月目に  $\mu$ DyS1、 $\mu$ DyS5、 $\mu$ DyS6、 $\mu$ DyS7 および  $\mu$ DySH3 を注射したマウスは、腓腹筋で 60% 以上および横隔膜で 74% 以上のジストロフィン陽性筋線維を示した。 $\mu$ DyS2 の形質導入レベルは、3 か月のうちに腓腹筋においておよそ 2 分の 1 に減少し (陽性筋線維が 63% から 31% に)、横隔膜では 20% 減少し、試験した構築物のうちその性能を最も悪くした (P < 0.001、図 4 A および 4 C を参照)。試験した 2 つの構築物を除いてすべての処置コホートに関して両筋肉において変性 / 再生の程度が増加した。 $\mu$ DyS1 に関する中心核形成は横隔膜では 3% のままであり、腓腹筋では  $\mu$ DySH3 が 20% から 8% に減少した (図 4 A および 4 C を参照)。

30

## 【0202】

処置後 6 か月目のデータで観察された形態的傾向にもかかわらず、比筋力発揮は、未処置対照の筋肉においてよりも依然として高かった。一構築物  $\mu$ DyS5 の注射は、腓腹筋 (225 対 226 kN/m<sup>2</sup>、図 4 B を参照) および横隔膜 (148 対 160 kN/m<sup>2</sup>、図 4 D を参照) の両方において力発揮レベルを野生型マウスの力発揮レベルに近づけた。6 個から 8 個の SR を含有するミニジストロフィンを用いた以前の研究に基づいて、6 個の SR を含有する  $\mu$ DyS構築物が最大の比筋力を発揮し、収縮により引き起こされる損傷に対して最大の保護を提供するであろうことが予想された (Harper, S. Q., et al., *Nature Medicine* 8, 253-261, (2002) を参照)。しかしながら、 $\mu$ DyS6 および  $\mu$ DyS7 で処置したマウスの腓腹筋における比筋力発揮は、未処置対照よりも有意に高かった (それぞれ、P < 0.01 および P < 0.0001) は、最高ではなかった (図 4 B および 4 D を参照)。その代わりに、 $\mu$ DyS5 を注射したマウスが最高レベルの比筋力発揮を示した。より大きな構築物は、収縮により引き起こされる損傷からの保護に対して必ずしも最良でなかった。例えば、腓腹筋において、 $\mu$ DyS6 を注射したマウスは、筋力不足が最大であったが、 $\mu$ DyS7 は収縮により引き起こされる損傷から最も高い保護

40

50

をもたらした（図5Aを参照）。しかしながら、横隔膜筋細片における収縮により引き起こされる損傷に対する耐性は、 $\mu$ Dy<sub>s</sub>6および $\mu$ Dy<sub>s</sub>7ならびに $\mu$ Dy<sub>s</sub>5および $\mu$ Dy<sub>s</sub>H3を発現するマウスで最も高かった（図5Bを参照）。各筋肉群間の $\mu$ Dy<sub>s</sub>6および $\mu$ Dy<sub>s</sub>7の間の比較結果ならびに腓腹筋内の筋力不足の有意差（P < 0.0001）は、特定の $\mu$ Dy<sub>s</sub>構築物の性能が制御発現力セットおよび評価した筋肉により影響を受ける可能性があることを示唆する（Harper, S. Q., et al., *Nature medicine* 8, 253-261, (2002)およびSalva, M. Z., et al., *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 320-329, (2007)を参照）。この点は、 $\mu$ Dy<sub>s</sub>2処置を用いても例示され、収縮により引き起こされる損傷の受けやすさは、未処置対照と比較して腓腹筋で低下したが、予想外にも横隔膜では悪化した（図5Aおよび5Bを参照）。

#### 【実施例6】

##### 【0203】

$r$ AAV6 + 心臓特異的プロモーターによる遺伝子送達

WTおよびL48Q cTnCに対するベクター（それぞれ $r$ AAV6 - WT cTnCおよび $r$ AAV6 - L48Q cTnC）を生成した。心臓特異的プロモーター（cTnT455）およびC末端のc-Mycタグを含有するrAAVゲノムを用いてプラスミドを生成することができる。CaPO<sub>4</sub>沈殿法によりcTnCバリアント導入遺伝子発現力セット（mCherry蛍光レポーターを伴う）をパッケージング／ヘルパープラスミドpDGM6とともにHEK293細胞にコトランスフェクションすることができる。ベクターを培養物から回収し、凍結融解することができ、その上清を回収することができる。親和性精製にはHITRAP（商標）ヘパリンカラム（GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES（商標）、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）を使用することができる。そのウイルスをショ糖濃度勾配（40%）により濃縮し、27,000 rpmで回転し（18時間、4°C）、ハンクス平衡塩溶液に再び可溶化することができる。ベクターゲノムは、サザンプロットハイブリダイゼーションで、SV40ポリアデニル化領域オリゴヌクレオチド<sup>3'2'</sup>P末端標識化プローブを使用しプラスミド標準と比較して決定し、qPCRによって確認することができる。

##### 【0204】

図8は、3匹のマウスそれぞれに低い（L；0.6 × 10<sup>12</sup>）および高い（H；1.2 × 10<sup>12</sup>）ウイルス粒子用量で全身注射した（眼内） $r$ AAV6 - L48Q cTnCの最初の使用を示す。心臓エコー検査は、未注射（UN）対照と比較して左室（LV）駆出率が注射の2週間後に約20%の増加、3週目に30~40%の増加を示した。対照アデノウイルスベクターの全身注射は、LV機能を変えなかった。1匹の $r$ AAV6 - L48Q cTnC - mycトランスフェクションマウス（および未注射対照）の筋原線維をSDS-PAGEによって分離し、ウエスタンプロットを抗cTnCを用いて調べた。mycタグがあるとcTnCの移動が遅くなり（図9を参照）、未変性cTnCに対するcTnC - mycの比を濃度測定により求め、約40%であった（アデノウイルスおよびトランスジェニック動物に見られるのと同様、以下参照）。

#### 【実施例7】

##### 【0205】

心機能に対するcTnCバリアントの急性および慢性効果

心機能に対するcTnCバリアントの急性および慢性効果は、 $r$ AAV6 - cTnCベクターおよびトランスジェニックマウスを使用して評価することができる。筋フィラメント機能の急性変化に対する反応を判定するために、正常な成体マウスに、心臓特異的プロモーター（cTnT455）を伴う $r$ AAV6 - cTnCバリアント（例えば、WT、L48Q、L57Qまたは161Q）の尾部静脈注射または眼窩注射によりトランスフェクションを行うことができる。成体になるまでMHCプロモーターを抑制することによって、L48Q cTnCおよび161Q cTnCトランスジェニックマウスを用いて平行実験を行うことができる。これらのcTnCバリアントの正常な心臓発生および心機能に

対する影響を判定するために、プロモーターの抑制がないマウスを用いて付加的な研究を行うことができる。機能の任意の変化の開始および進行を判定するために、1、2、3および6か月齢において心臓エコー検査による評価を行うことができる。一部の動物には、イソプロテレノールを用いた - アドレナリン刺激によりストレスを与えてよい。心臓エコー検査に続いて、一部の動物には、MILLAR（商標）カテーテルプロトコルを使用した血行動態測定を受けさせてもよく、他は安樂死させて、ワーキングハートプロトコルを行うため、あるいは完全なもしくは除膜した肉柱の調製、培養される心筋細胞または筋原線維の調製のために心臓を解剖してもよい。

【実施例8】

【0206】

rAAV6構築物を用いた組織特異的ターゲティング

rAAV6構築物中のさまざまな遺伝子プロモーターによって駆動されるアルカリホスファターゼを使用して組織特異性を評価した。表2（以下参照）は、2つの心臓特異的プロモーター（クレアチンキナーゼ7（CK7）および心筋トロポニンT（cTnT455））を非特異的なサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターと比較し、値はTAのCK7に対して正規化した。cTnT455は、心臓において高い発現をもたらすことができるが、他の組織ではほとんどまたは全く発現しない。この特異性は、非心臓組織におけるR1R2過剰発現の影響の可能性を低減することができる。

【0207】

dATPは、マウスの大動脈平滑筋力発揮に有意な効果がない。dATPが高いことによる全身的な効果の可能性を調査するために、dATPがマウスの大動脈平滑筋収縮に影響を及ぼすかどうかを判定した。図12Aは、除膜した筋肉細片における連続した収縮が、収縮基質としてのdATP対ATPで異ならなかったことを示し、複数の実験に関するデータの概要を図12Bに示す。さらに、対照測定により、dATPが、平滑筋ミオシンのアクチンとの結合を制御するミオシン軽鎖リン酸化のレベルを変化させなかったことが証明された。

【実施例9】

【0208】

心臓特異的ターゲティングのための組換えAAV6-R1R2

心臓のR1R2（および[dATP]）のレベルを急激に増加させるためにrAAV6ベクターを使用した。心臓特異的プロモーター（cTnT455）を含む組換えrAAVゲノムを用いてプラスミドを生成することができる。CaPO<sub>4</sub>沈殿法によってR1R2導入遺伝子発現カセットをHEK293細胞にパッケージング/ヘルパープラスミドpDGM6とともにコトランスフェクションすることができる。ベクターを培養物から回収し、凍結融解することができ、その上清を回収することができる。親和性精製にはHITRAP（商標）ヘパリンカラムを使用することができる（GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES（商標）、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）。そのベクターをショ糖濃度勾配（40%）により濃縮し、27,000 rpmで回転し（18時間、4）、ハンクス平衡塩溶液に再び可溶化することができる。ベクターゲノムは、ザンプロットハイブリダイゼーションで、SV40ポリアデニル化領域オリゴヌクレオチド<sup>3'2'</sup>P末端標識化プローブを使用しプラスミド標準と比較して決定し、qPCRによって確認することができる。

【0209】

10

20

30

40

## 【表2】

表2:CK7、CMV、およびcTnT455 プロモーターの比較

	CK7	CMV	cTnT455
前脛骨	1	3.1	0
心臓	1.9	5.1	1.6
肺	0.02	0.09	0.01
肝臓	0.02	0.09	0.004
大動脈	0.01	0.13	0.005

10

## 【0210】

心臓ターゲティング構築物の選択を、rAAV6構築物中のさまざまな遺伝子プロモーターによって駆動されるアルカリホスファターゼを使用して評価した。表2は、2つの横紋筋特異的なプロモーター（クレアチンキナーゼ7（CK7）および心筋トロポニンT（cTnT455））を非特異的サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターと比較し、値はTAのCK7に対して正規化した。cTnT455は、心臓において高い発現をもたらすことができるが、他の組織ではほとんどまたは全く発現しないため、非心臓組織におけるR1R2過剰発現の影響の可能性を低減する。図14Aは、これに関するウエスタンプロットの証拠を示し、rAAV6-R1R2cTnT455を注射した（4.5e<sup>13</sup>）マウスの心臓組織が対照マウス心臓と比較して高くR1およびR2サブユニットを発現した。なお、上側のバンドは非特異的染色であり、矢印は（分子量マーカーによって特定した）R1およびR2タンパク質を示す。肺におけるR1およびR2発現は、心臓と比較して極めて低く、骨格筋では変わらなかった。これは、注射しなかったマウス（パネル「B」）対rAAV6-アルカリホスファターゼ（パネル「C」）を注射したマウスの心臓組織に関する図14において証明され、このことは、rAAV6-R1R2cTnT455が安定した長期のR1R2過剰発現をもたらす可能性があることを示唆している。安定したrAAV6導入遺伝子発現はまた、ラットにおいて12週間以上、イヌにおいて少なくとも6か月以上持続することが示された。

20

## 【0211】

試験は、rAAV6-R1R2cTnT455注射用量、時間経過と、増加したLVポンプ機能の安定性、心臓組織のR1R2レベルおよび[dATP]との間の関係を判定することができる。図15は、3か月齢のマウス（1群当たりn=6）に注射したrAAV6-R1R2cTnT455ベクターゲノムの3つのベクター用量、すなわち、1.5×10<sup>13</sup>、4.5×10<sup>13</sup>および1.35×10<sup>14</sup>または生理的食塩水（対照）のLV機能に対する効果を示す。高用量での1週間後およびすべての用量での2週間後にLV短縮率（FS）が有意に増加し、6週間まで同等の効果があった。FSの増加の規模は25%～50%であり、これは、比較的低いベクター用量を用いて達成され得る効果を示す。

30

## 【実施例10】

## 【0212】

40

## トランスジェニックR1R2過剰発現マウス（TG-R1R2）

RRの両サブユニット（Rrm1およびRrm2）を過剰発現する二重トランスジェニックマウスを利用することができます。図13は、心筋における両サブユニットの過剰発現を示し、これらのTG-R1R2マウスの濃度測定計算値は野生型（WT）マウスの対応する値よりも33.7±7.6（Rrm1）および23.7±3.4（Rrm2）倍大きい。なお、Rrm2について、上側のバンド（\*）は非特異的である。WT組織において内在性Rrm2タンパク質は検出できないが、TG-R1R2マウスでは、それがバックグラウンドバンドの下のバンドとして現れる。心臓組織のdATPレベルはまだ評価していなかったが、骨格筋では[dATP]が10倍増加し、これは、酵素サブユニットの対応する3.3±2.1（Rrm1）および35.7±11.1（Rrm2）倍の増加を有

50

した。培養物中の d A T P のこの増加の規模は、アデノウイルス - R 1 R 2 を用いてトランسفエクションされた心筋細胞において確認されたものと類似している（図 10 を参照）。これらの T G - R 1 R 2 マウスの 6 ~ 8 か月齢における事前の心臓エコー検査（3 週にわたって測定した）は、短縮率（F S）の平均 5 0 % を超える増加および L V 拡張期末期径（L V I D d）の 1 5 % の減少を明らかにした。図 11 に示されるとおり、（W T 対照との）これらの差は、事前のアデノウイルス - R 1 R 2 注射実験に対する値と規模が類似している。

#### 【実施例 1 1】

##### 【0 2 1 3】

心機能に対する上昇した細胞の R 1 R 2 および [ d A T P ] の急性効果

10

（r A A V 6 - R 1 R 2 ベクターによる）急性の R 1 R 2 過剰発現は、マウスの心臓における [ d A T P ] を増加させる可能性があり、結果として収縮機能および拡張機能を高める。これは、1) より速い弛緩を伴う心筋細胞および筋原線維収縮の増加（部分的にクロスブリッジサイクル速度の増加のため）、2) エネルギー保持を損なうことがない基礎心代謝の増加、および 3) 活動電位持続時間の無変化または短縮（向上した C a <sup>2 +</sup> 隔離のため）として示される場合もある。

##### 【0 2 1 4】

正常な成体 F V B / N マウスに、（上記のとおりの）心臓特異的プロモーター c T n T 4 5 5 を伴う r A A V 6 - R 1 R 2 ベクター尾部静脈注射または眼窩注射によりトランسفエクションを行うことができ、対照として偽注射および c T n T 4 5 5 のみを含む r A A V 6 を用いた。注射後、心臓エコー検査を週に 1 回（6 週まで）実施して、さらなる評価のための最適（最高の効果）な時点を決定することができる。最初の調査は、心臓エコー検査によりインビボにおける心機能を特徴づけることができ、それにインサイチュでの血行動態測定またはエネルギー調査のためのランゲンドルフ灌流心およびポンプ性能を評価するためのワーキングハート装置を使用したエクスピボでの血行動態測定が続く。選択した時点において、他のマウスを安樂死させ、完全なもしくは除膜した肉柱の調製、単離心筋細胞、筋原線維調製、タンパク質分析、および（免疫）組織学のために心臓を解剖してもよい。これらの測定から、急性の R 1 R 2 過剰発現による心機能の変化に関する分子メカニズムがもたらされる可能性もある。

20

#### 【実施例 1 2】

##### 【0 2 1 5】

筋フィラメントおよび S R タンパク質プロファイリング

あらゆる条件下における収縮機能の変化、C a <sup>2 +</sup> トランジェント、S R スパーク活性、および / または C a <sup>2 +</sup> 負荷が、アイソフォーム、存在量、および筋フィラメントタンパク質（c T n 1、c T n T、M L C - 2、c M y B P - C、および T m）のリン酸化、S R タンパク質（P L B、R y R）、ならびに筋細胞膜タンパク質（N C X、P M C A、および L 型 C a <sup>2 +</sup> チャネル）と相互に関連している可能性がある。m R N A およびタンパク質発現の変化は、R T - P C R およびウエスタンプロット分析を使用して測定することができる。S R タンパク質画分を調製することができる。電気生理学的測定が変化を示す場合、特異抗体を用いてイオンチャネルを評価することができる。R 1 R 2 発現の分析は、ウエスタンプロット（図 10 を参照）または免疫組織化学的検査により行うことができる、実験のエンドポイントと関連づけられてもよい。c T n T 4 5 5 プロモーターの特異性は、骨格筋および肺などの非心臓組織における R 1 R 2 発現を測定することによって評価することができる。リン酸化は、P R O - Q（登録商標）D i a m o n d リン酸化タンパク質ゲル染色（S Y P R O（登録商標）R u b y タンパク質ゲル染色を用いて）およびウエスタンプロット分析を使用して概略を示すことができる。部位特異的セリンおよびトレオニン残基リン酸化に対して、質量分析を行うことができる。

40

##### 【0 2 1 6】

R 1 R 2 過剰発現および増加した [ d A T P ] は、分析の選択した時点における梗塞心臓の心機能を改善する可能性がある。高 C a <sup>2 +</sup> チャレンジ、- アドレナリン刺激、お

50

よび増加する前負荷に対する反応が改善される可能性がある。図16で評価した心臓のインビトロにおけるN e e l yワーキングハート測定は、梗塞した（未処置）心臓の前負荷反応性の低下（心不全）を示したが、ベクターを与えられている梗塞心臓の前負荷反応性は対照である梗塞していない心臓のレベルへ回復したことを示し、これにより心機能の回復を実証する。図17を参照すると、力がg・cm/分の単位で与えられる場合に、効果は、長期的な-アドレナリン刺激を減らすことによって生じた可能性がある（血漿ホルモンをモニタすることによって評価することができる）。これは、1)Ca<sup>2+</sup>トランジエント、2)筋フィラメント収縮および弛緩の大きさおよび速度、ならびに3)エネルギー-プロファイルの改善として複数の規模の分析に反映される可能性がある。-および-アドレナリンが関係する心筋細胞タンパク質のリン酸化における、処置された心臓と未処置の心臓との間に差が見られる可能性もある。

## 【実施例13】

## 【0217】

CK8- $\mu$ Dy5を運ぶAAV9ベクター

8週齢の $mdx^4c^v$ マウスのTA筋に $2.5 \times 10^{11}$ ベクターゲノムのCK8- $\mu$ Dy5発現力セットを運ぶAAV9ベクターを（筋肉）注射した。2週間後に、マウスを屠殺し、筋肉凍結切片を抗ジストロフィン抗体を使用してジストロフィン発現に関して着色した。図22に示されるとおり、注射した筋肉において $\mu$ Dy5タンパク質の広範な確固とした発現が観察された。

## 【0218】

20

AAV9ベクターは、AAV末端逆位配列（ITR）と連結された発現力セット（例えば、プロモーター、cDNA、およびポリ（A）部位）を含んでもよい。ITRは、AAV2由来のものであってもよい。AAV9ベクターは、AAV9由来のカプシドタンパク質を使用してベクターにパッケージングされた、発現力セットおよびITRを含むゲノムDNAを含んでもよい。配列番号22は、末端逆位配列（ITR）がついたCK8- $\mu$ Dy5カセットの例となる核酸配列である。そのような配列を使用してAAV6、AAV9などを形成してもよい。さまざまなイントロン、ポリ（A）部位、スペーサーなども配列に加えてよい。

## 【実施例14】

## 【0219】

30

## 動物実験

C57BL/6近交系で繁殖した雄の野生型マウスおよびジストロフィー $mdx^4c^v$ マウスをこの試験に使用した。ワシントン大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeに従って動物実験を行った。最初のスクリーニングのために、5~6週齢のジストロフィー $mdx^4c^v$ マウスのTA筋に $5 \times 10^{10} \text{vg}$ のrAAV6ベクターを投与した。偽処置として対照のマウスにハンクス平衡塩溶液を注射した。全身的な分析では、14日齢の $mdx^4c^v$ 雄に $10^{13} \text{vg}$ のrAAV6ベクターを後眼窩静脈叢への注射により静脈内投与した。さらなる評価のために、処置の3か月または6か月後のいずれかにおいてマウスを屠殺した。

## 【実施例15】

40

## 【0220】

## ベクタークローニングおよびウイルス産生

標準的なクローニング技術を使用してすべてのマイクロジストロフィン導入遺伝子を操作した（Chamberlain, J., PCR-mediated Mutagenesis, doi:10.1038/npg.els.0003766 (2004)を参照）。変異領域を、中心のロッドドメインの大部分に隣接するMfeI/XhoIまたはNheI/XhoI制限部位を使用してAAVベクターゲノム骨格プラスミド、pARAP4内の $\mu$ Dy5ヒンジ3（H2-R23/CT、+H3）にサブクローニングした（Banks, G. B., et al., PLoS Genetics 6, e1000958, (2010)を参照）。ウサギベータ-グロビン遺伝子のポリアデニル化シグナルを、 $\mu$ Dy5 cDNAカルボキシ末端の直後にサブクローニングした。サイトメガロウイルス最初期プロモーターおよび

50

エンハンサーから構成されるCMVプロモーターは、マイクロジストロフィンcDNAを発現させた。CMVプロモーターを置き換え、筋原細胞においてマイクロジストロフィンcDNAを発現させるために、CK8制御力セット(Goncalves, M. A., et al., Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy 19, 1331-1341, (2011)を参照)を、SphI/SacII部位にサブクローニングした。組換えAAV6ベクターは、以前に記載されたとおりに作製した(Gregorevic, P., et al., Nature Medicine 12, 787-789, (2006)を参照)。簡単にいえば、発現構築物を、pDMG6パッケージングプラスミドを用いてHEK293細胞にコトランスフェクションした後、3回、ヘパリンアフィニティクロマトグラフィー、および超遠心分離法の組み合わせによって回収および精製した。ジストロフィーマウスを処置する際に確実に等しい投薬するために、ウイルス調製物をサザンプロットおよび定量PCR分析、ならびにこの試験に使用した他の調製物との常時比較によって定量した。

【実施例16】

【0221】

組織学的分析

生理学的分析後に、マウスを剖検のために屠殺した。筋肉を水溶性グリコールおよび樹脂の最適切削温度製剤であるTISSUE-TEK(登録商標)O.C.T.コンパウンド(SAKURA FINETEK USA(商標)、トランス、カリフォルニア州)に包埋し、液体窒素冷却イソペンタン中で凍結した。およそ10μmの厚さの横断切片を免疫蛍光試験に使用した。リン酸カリウム緩衝生理食塩水(KPBS)中の2%ゼラチンおよび1%Tween-20において切片をプロッキングした。切片をリン酸カリウム緩衝生理食塩水(KPBS-G)中の0.2%ゼラチンで洗浄し、続いてK PBS-G中の2%の正常ヤギ血清中に希釈した一次抗体とのインキュベーションを行った。切片を、その後、K PBS-G中で3回すすいだ後に、二次抗体および4',6-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸塩であるDAPI(SIGMA-ALDRICH(登録商標)、セントルイス、ミズーリ州)とともにインキュベーションした。K PBS-G中でさらに3回洗浄した後、スライドを液体封入剤であるPROLONG(登録商標)GOLD ANTIFADE MOUNTANT(LIFE TECHNOLOGIES(商標)、グランドアイランド、ニューヨーク州)中に封入した。一次抗体には、ウサギポリクローナルN末端抗ジストロフィン抗体(Harper, S. Q., et al., Nature Medicine 8, 253-261, (2002)を参照)、緑蛍光色素であるALEXA FLUOR(登録商標)488-DYE(LIFE TECHNOLOGIES(商標))と結合したマウスモノクローナル抗ジストロフィン(MANEX1011Bクローン1C7、アイオワ大学のDevelopmental Studies Hybridoma Bank(DSHB)、アイオワシティー、アイオワ州)、アミン反応性色素であるDYLIGHT(商標)594(HERMO FISHER SCIENTIFIC(商標)、ロックフォード、イリノイ州)と結合したマウス抗-ジストログリカン(MANDAG2クローン7D11、DSHB)、ラット抗-2-ラミニン(クローン4H8-2、SIGMA-ALDRICH(登録商標)、セントルイス、ミズーリ州)、およびウサギ抗nNOS(Z-RNN3、LIFE TECHNOLOGIES(商標))が含まれた。二次抗体は、それぞれALEXA FLUOR(登録商標)660遠赤色色素またはALEXA FLUOR(登録商標)594赤蛍光色素(LIFE TECHNOLOGIES(商標))と結合したヤギ抗ウサギまたは抗ラットであった。イメージをDP(商標)ソフトウェア(OLYMPUS(商標)、センターバレー、ペンシルバニア州)を用いてOLYMPUS(商標)SZX16(商標)解剖蛍光顕微鏡により取り込んだ。

【実施例17】

【0222】

イムノプロッティング

最初のスクリーニングのマウスのTA筋を液体窒素中で瞬間凍結した後、ドライアイスで冷した乳鉢および乳棒によって粉碎した。筋肉をキナーゼアッセイ細胞溶解バッファー

10

20

30

40

50

(COMPLETE (商標) MINIプロテアーゼインヒビターカクテル錠 (ROCHE (商標)、インディアナポリス、インディアナ州) を加えた 1% Triton X-100、50 mM TRIS-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA) 中でホモジナイズした。PIERC E (商標) Coomassie Plus (Bradford) アッセイ (PIERC E (商標)、ロックフォード、イリノイ州) を使用してライセートのタンパク質濃度を測定した。40 µg のタンパク質を 100 mM のジチオスレイトールを加えた NUPAGE (登録商標) LDSサンプルバッファー (LIFE TECHNOLOGIES (商標)) に懸濁し、NUPAGE (登録商標) 4~12% Bis-Tris ポリアクリルアミドゲル (LIFE TECHNOLOGIES (商標)) に入れた。ゲルに流し、サンプルを AMERSHAM (商標) HYBOND (商標) P ポリビニリデンフルオライド膜 (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (商標)、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) に転写した後、プロットを PBS 中の 10% スキムミルクでプロッキングした。その後、プロットを PBS (PBST) 中の 5% スキムミルク、0.1% Tween-20 において一次抗体とともにインキュベーションした。PBST 中で 3 回洗浄した後、二次抗体を、PBST 中の 5% 脱脂乳においてインキュベーションした後、PBST 中で 4 回洗浄した。一次抗体には、マウス抗ジストロフィン (MANEX 1011B クローン 1C7、DSHB) およびローディングコントロールとしてウサギ抗グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (G 9545、SIGMA-ALDRICH (登録商標)) が含まれた。二次抗体には、ロバ抗ウサギまたはマウス (JACKSON IMMUNORESEARCH LABORATORIES (商標)、ウェストグローブ、ペンシルバニア州) が含まれた。プロットを PIERCE (商標) ECL Plus ウエスタンプロッティング基質 (THERMO FISH SCIENTIFIC (商標)) を用いて現像し、STORM (商標) 860 イメージングシステム (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (商標)) を使用してスキャンした。  
10  
20

#### 【実施例 18】

#### 【0223】

##### 骨格筋の機能分析

よく知られた変更を伴い以前に記載されたとおりに、力発揮および収縮により引き起こされる損傷の受けやすさに関してインサイチュ (腓腹筋) およびインビトロ (横隔膜) において筋肉をアッセイした (Banks, G. B., et al., Human Molecular Genetics 17, 3975-3986, (2008) および Gregorevic, P., et al., The American Journal of Pathology 161, 2263-2272, (2002) を参照)。最適筋線維長における等尺性最大筋力を測定した後、筋肉を刺激下 (モデル 701C (商標)、高出力二相性刺激装置、AURORA SCIENTIFIC (商標)) において一連の漸進的に増加する長さ変化に供した。それぞれ腓腹筋および横隔膜に対して 150 Hz および 180 Hz で刺激することによって最大等尺性強縮力を測定した。それぞれが、ピーク等尺性筋力を可能にするための 150 ms (腓腹筋) または 100 ms (横隔膜) のいずれかの固定された長さの刺激、続いて筋肉の物理的な伸長の間の連続した 200 ms (腓腹筋) または 300 ms (横隔膜) の刺激を含む伸張性収縮を 30 秒間隔で行った。収縮特性の過負荷および筋肉構造に対する損傷を助長するために最適長の 0~45% の一連の長さ変化、すなわちひずみを加えた。伸張性収縮の結果を次の伸張性収縮の直前に発揮されるピーク等尺性筋力として測定した。  
30  
40

#### 【0224】

マウスを 2, 2, 2-トリプロムエタノール (SIGMA-ALDRICH (登録商標)) で麻酔して、触刺激に対して無反応にし、その後、腓腹筋のインサイチュ分析のために準備した。足首を切開することによってアキレス腱を露出し、3-0 ブレードシルク (ETHICON (商標)、シンシナティ、オハイオ州) で縫合し、切断し、デュアルモード力変換器サーボモーター (モデル 305B-LR (商標)、AURORA SCIENTIFIC (商標)、オンタリオ、カリフォルニア州) のレバーアームに固定した。マウスを動けなくし、膝を通して挿入したステンレス鋼ピンによって、およびカスタマイズし  
50

たPLEXIGLAS(登録商標)ポリ(メチルメタクリラート)台に後肢をテープ留めすることによって装置に固定した。皮膚を通して膝と尻の間の領域にある腓骨神経の両側に挿入した2つの針電極により腓腹筋を刺激した。最適な筋線維長さを測定するのを助けるために三軸に対してサーボモーターの位置を操作した。データ取得も可能にするLABVIEW(商標)ソフトウェア(NATIONAL INSTRUMENTS(登録商標)、オースティン、テキサス州)によってサーボモーターを制御した。

【0225】

横隔膜のインビトロ調製物のために、腓腹筋分析後に麻酔したマウスを屠殺し、全横隔膜筋および周辺の胸郭を直ちに切除して、5%CO<sub>2</sub>・95%O<sub>2</sub>混合物でバーピングしたNaCl 121 mM、KCl 5 mM、CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM、MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM、NaHCO<sub>3</sub> 24 mM、グルコース 5.5 mMの溶液(pH 7.3)を含む酸素を送り込んだタイロード溶液を入れた皿に入れた(Lannergren, J., Bruton, et al., The Journal of Physiology 526 Pt 3, 597-611 (2000)を参照)。縦方向に並んだ完全長筋線維、中心腱の一部ならびに細片の遠位末端の肋骨の一部および肋間筋から構成された横隔膜細片を顕微鏡下で分離した。筋肉細片を中心腱において針が先についた外科用ブレードシルク(6-0、P1、ETHICON(商標))で縛り、肋骨部分を通して縫合し(5-0、ETHICON(商標))、その後、温度制御された水平な槽を備えたインサイチュマウス装置(モデル809A(商標)、AURORA SCIENTIFIC(商標))に固定した。装置の槽を上記のバーピングしたタイロード溶液で満たし、25℃に維持した。最適線維長を測定し、等尺性および伸張性収縮特性を、腓腹筋分析と類似の様式で、横隔膜筋に関して上で明記した条件を用いて評価した。それぞれ腓腹筋の塊または横隔膜細片に対する等尺性最大筋力を正規化することによって両筋肉群の比筋力を測定した。以下の方程式を使用した:比筋力 = 最大力 × 羽状角 × 筋長 × 1.04 密度 / 筋肉重量(Burkholder, T. J., et al., Journal of Morphology 221, 177-190, (1994)を参照)。羽状角は、筋肉の腱間で骨格筋線維の束自体が向く角度である。腓腹筋に関するこの角度は、以前の研究によって求められた(Banks, G. B., et al., PLoS Genetics 6, e1000958, (2010)を参照)。横隔膜筋細片を、筋線維が半腱様筋接合部から肋骨の筋腱間接合部の間で一直線に収縮するように分離した(Gregorevic, P., et al., The American Journal of Pathology 161, 2263-2272, (2002)を参照)。腓腹筋および横隔膜の羽状角は、それぞれ0.45および1と等しい。

【実施例19】

【0226】

cTnT 455制御力セットの構築

cTnT 455制御力セット(配列番号1、455は、RC中の塩基対の数を示す)を本明細書に記載されるとおりに構築した。DNAをヒト細胞から調製した。PCRプライマーを使用してラットおよびニワトリcTnT配列との配列類似性に基づいてcTnTエンハンサー/プロモーター領域を増幅した。野生型cTnTエンハンサー/プロモーターをヒト胎盤アルカリホスファターゼ(AP)cDNAと連結し、プラスミドDNAを生成した。cTnT-APプラスミドを、新生ラット心筋細胞および分化マウス骨格筋細胞にトランスフェクションした。

【0227】

野生型ヒトcTnT RC(配列番号2)は、心臓細胞および骨格筋細胞の両培養物において高い活性を有した。骨格筋におけるcTnTの発現は、初期には予期しないものであった。しかしながら、いずれかの特定の理論に縛られないが、骨格筋におけるcTnT発現は、初期の骨格筋発生中および筋肉再生中における心臓遺伝子発現の通常の活性化によるものである可能性がある。この特性は、場合によっては、一部の遺伝子治療用途、例えば、筋肉再生中のみにおける治療タンパク質の一過性の発現などに有益である可能性もある。

【0228】

その後、野生型cTnTエンハンサーを、非保存的塩基配列(ヒト、ラット、イヌ、お

10

20

30

40

50

よりニワトリ間の比較に基づいて)ならびに一部の保存配列モチーフを取り除くことによつて小型化し、続いて上記のとおりトランスフェクション試験を行つて、欠失が転写活性を低下させないことを確認した(図18および19を参照)。

#### 【0229】

さらに高い活性を得るために、複数の小型化cTnTエンハンサーのcTnTプロモーターへの付加が活性を高めるかどうかを試験した。これらの試験は、心臓および骨格筋培養物で行い、(1つの追加のエンハンサーを含む)cTnT455が最も活性があることがわかった(図20を参照)。

#### 【0230】

cTnT455がインビボにおいて活性であるかどうかを判定するために、cTnT455-AP構築物をrAAV6にパッケージングし、ベクターを後眼窩静脈叢からの全身送達によりマウスに投与した。4週間後に、マウスを安樂死させ、心筋ならびに骨格筋および非筋肉組織におけるRC発現レベルに関してアッセイを行つた。このデータは、cTnT455が心筋において高い転写活性を有し、骨格筋およびあらゆる非筋肉組織の両方では転写的にサイレントであることを示した(表2を参照、また、その全体が参照により本明細書に組み込まれる「Cell and Gene Based Methods to Improve Cardiac Function」という名称のPCT出願第PCT/US2012/039897号も参照)。

#### 【実施例20】

#### 【0231】

##### 統計分析

すべての結果を平均値±平均値の標準誤差として報告する。コホート間の差は、チューキーの事後多重比較検定を用いて一元配置および二元配置ANOVAを使用して求めた。すべてのデータ分析は、GRAPHPAD(商標)PRISM(商標)6ソフトウェア(サンディエゴ、カリフォルニア州)により行った。

#### 【0232】

当業者に理解されるであろうように、本明細書で開示されている各実施形態は、その特定の明記される要素、ステップ、成分または構成要素を含んでもよく、本質的にそれから成ってもよく、またはそれから成ってもよい。本明細書で使用される場合、移行語「含む(compriseまたはcomprises)」は、含むが、以下に限定されるものではない、を意味し、大量であっても不特定の要素、ステップ、成分または構成要素を含めることを可能にする。移行語句「から成ること」は、不特定のあらゆる要素、ステップ、成分または構成要素を排除する。移行語句「本質的に～から成ること」は、実施形態の範囲を特定の要素、ステップ、成分または構成要素および実質的に実施形態に影響を及ぼさない要素、ステップ、成分または構成要素に限定する。

#### 【0233】

別に指示がある場合を除いて、本明細書および特許請求の範囲において使用される成分の量、分子量などの特性、反応条件などを表わすすべての数は、すべての場合において用語「約」によって修飾されているものと理解されるべきである。したがつて、反対の指示がない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値的パラメーターは、本発明によって得ようとする所望の特性によって変化してもよい近似値である。特許請求の範囲に対する均等論の適応を限定しようとするものとしてではなく、少なくともそれぞれの数値的パラメーターは、少なくとも報告される有効数字の数に照らして、通常の丸め手法を適用することによって解釈されるべきである。さらに明確さが必要とされる場合、「約」という用語は、明記される数値または範囲と併せて使用されるとき、当業者がそれに適度に属するものと見なす意味を有する。すなわち、明記される値の±20%；明記される値の±19%；明記される値の±18%；明記される値の±17%；明記される値の±16%；明記される値の±15%；明記される値の±14%；明記される値の±13%；明記される値の±12%；明記される値の±11%；明記される値の±10%；明記される値の±9%；明記される値の±8%；明記される値の±7%；明記される値の±6%

10

20

30

40

50

；明記される値の±5%；明記される値の±4%；明記される値の±3%；明記される値の±2%、または明記される値の±1%の範囲内で明記される値または範囲よりもいくぶん大きいか、またはいくぶん小さいことを意味する。

【0234】

本発明の広い範囲を明記する数量的な範囲およびパラメーターが近似値であるにもかかわらず、特定の例に記載される数値は可能な限り正確に報告する。ただし、あらゆる数値は、それらのそれぞれの試験測定値に見出される標準偏差から必ず得られる一定の誤差を本質的に含む。

【0235】

本発明を説明する文脈において（とりわけ、添付の特許請求の範囲の文脈において）使用される「1つの（a、an）」、「前記（the）」という用語および同様のものは、本明細書において別の指示があるか、または文脈から明らかに矛盾する場合を除いて、単数および複数の両方を含むものと解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、単に範囲内にあるそれぞれ個別の値を個々に言及することの省略表現法としての役割を果たすことが意図される。本明細書において別の指示がある場合を除いて、それぞれ個別の値は、それが本明細書に個別に列挙されたかのごとく本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されているすべての方法は、本明細書において別の指示があるか、または別に文脈が明らかに否定している場合を除いて任意の適した順序で実施することができる。本明細書において示される任意のおよびすべての例または例示的表現（例えば、「など」）の使用は、単に本発明をさらに明確にすることが意図され、別に特許請求される本発明の範囲に制限を与えるものではない。本明細書にない言葉は、発明の実施に必須の特許請求されていない任意の要素を示すものと解釈されるべきである。

【0236】

本明細書中で開示される本発明の代替的な要素または実施形態の分類は、限定と解釈されるべきではない。それぞれの群のメンバーは、個別にまたはその群の他のメンバーもしくは本明細書に見出されるその他の要素との任意の組み合わせとして言及および特許請求されてもよい。群の1つまたは複数のメンバーは、利便性および/または特許性の理由から、群に含まれてもよく、またはグループから除去されることもあることが予想される。任意のそのような含めることまたは除去がある場合、本明細書は、添付の特許請求の範囲に使用されるすべてのマーカッシュ群の記載された説明を満たすように変更された群を含むものと見なされる。

【0237】

本発明者が知る、本発明を実施するための最良の形態を含む本発明の特定の実施形態が本明細書に記載されている。当然、記載されたこれらの実施形態に対する変形は、前述の説明を読めば当業者に明白になるであろう。本出願人は、当業者が適切な場合にそのような変形を用いることを予期し、本出願人は、本明細書において具体的に記載されるのと別の方法で実施される本開示の各種実施形態を意図する。それゆえに、本開示は、適用法によって許されるここに添付される特許請求の範囲に列挙される主題のすべての変形物および均等物を含む。さらに、本明細書に別に指示があるか、または別に文脈が明らかに否定している場合を除いて、それらのすべての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせが本開示に包含される。

【0238】

さらに、本明細書全体を通して特許および印刷刊行物を多数参照してきた。上記引用文献および印刷刊行物のそれぞれが、個別にその全体を参照によって本明細書に組み込む。

【0239】

本開示の実施形態は、本開示の原理を説明するためのものであることが理解されるべきである。利用されてもよい他の変形物は本開示の範囲内にある。よって、限定ではないが例として、本開示の代替的な構成が、本明細書の教示に従って利用されてもよい。それゆえに、本開示は、正確に示され、記載されるとおりのものに限定されない。

【0240】

10

20

30

40

50

本明細書において示される詳細は、例としてのものであり、本開示の好適な実施形態の説明的解説に過ぎず、本開示の各種実施形態の原理および概念上の態様の最も有用で容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示されている。

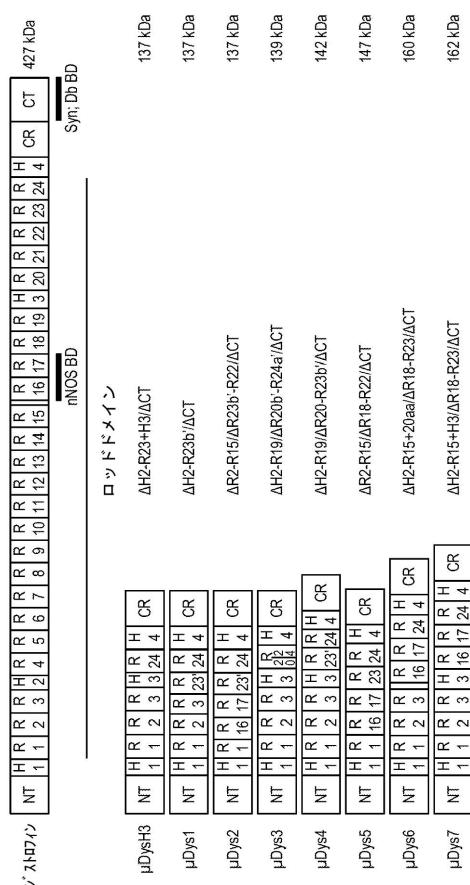
【 0 2 4 1 】

本開示において使用される定義および説明は、例においてはっきりと明白に変更されない、または意味の適用が任意の構成を無意味または本質的に無意味にしない限り、あらゆる今後の構成において優先されることを意味し、それが意図される。用語の構造がそれを無意味または本質的に無意味にするであろう場合、定義は、Webster's Dictionary, 3rd EditionまたはOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)などの当業者に既知の辞書から採用されなければならない。

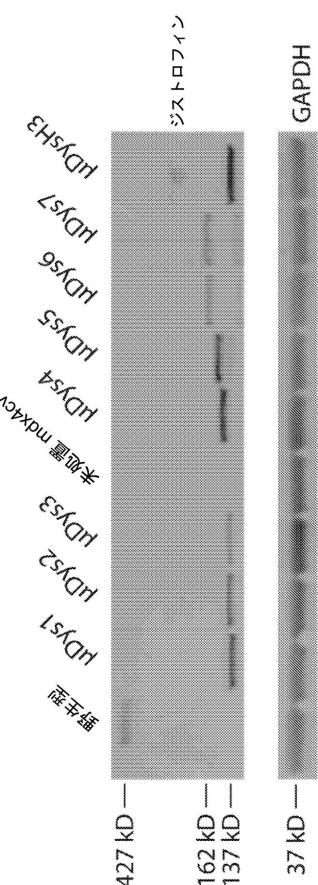
【 0 2 4 2 】

本発明の基となる原理から逸脱することなく上記の実施形態の細部に多くの変更を行えることが当業者には明白であろう。したがって、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ決定されるべきである。

( 1 A )



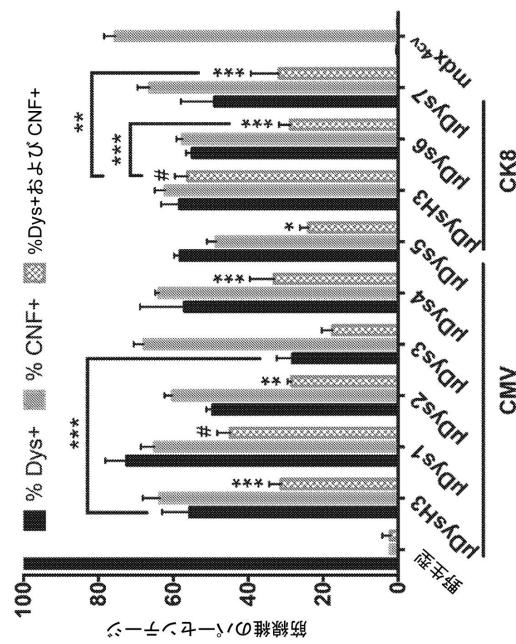
【 义 1 B 】



1A

1B

【図 1 C】



【図 1 D】

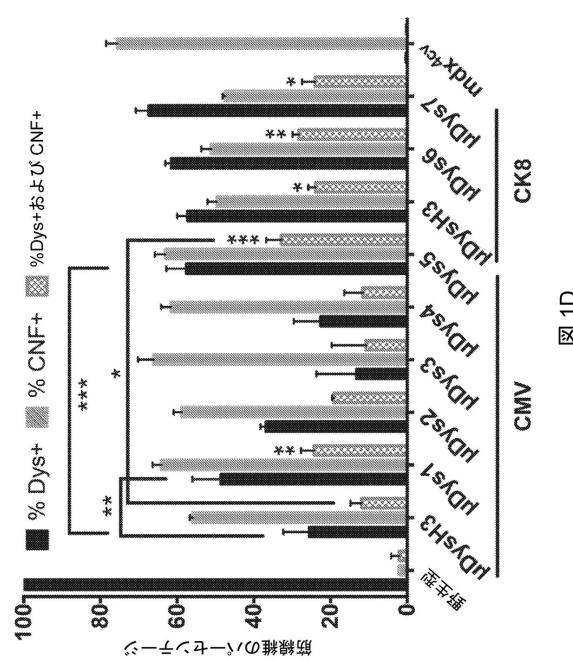


図 1C

図 1D

【図 2】

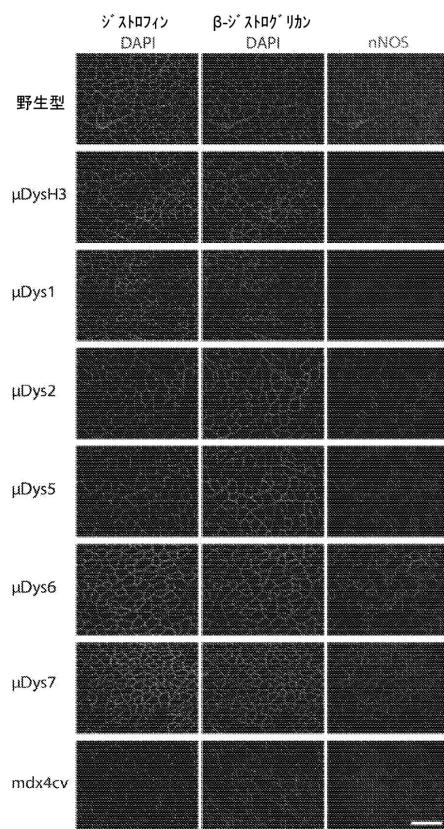


図 2

【図 3 A】

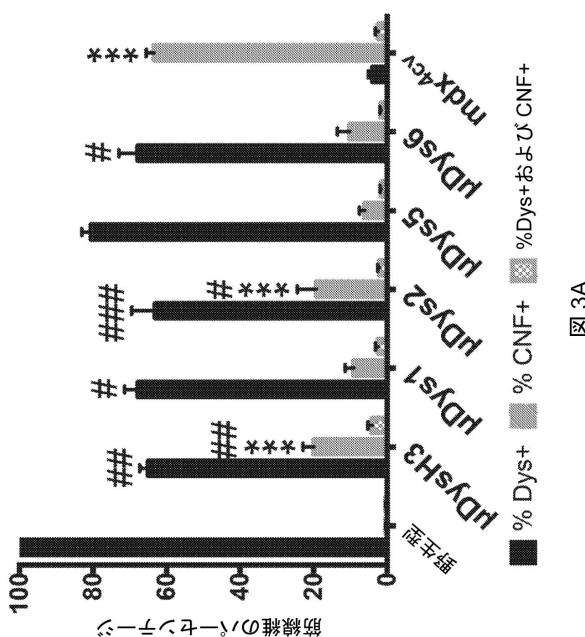
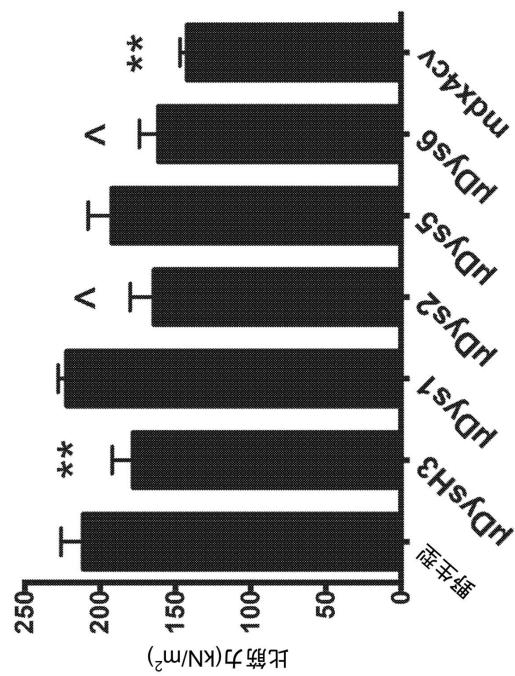


図 3A

【図3B】



【図3C】

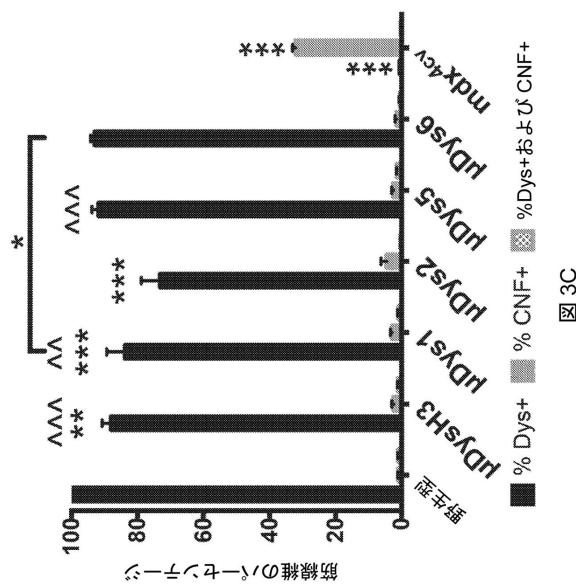


図3B

【図3D】

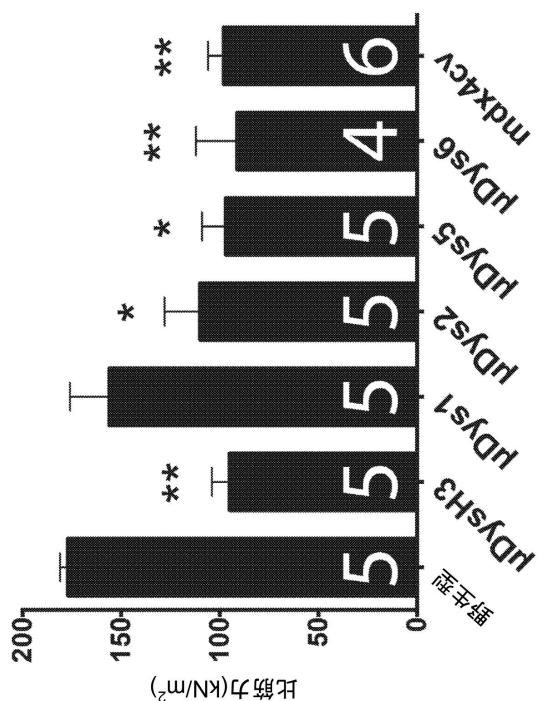


図3D

【図4A】

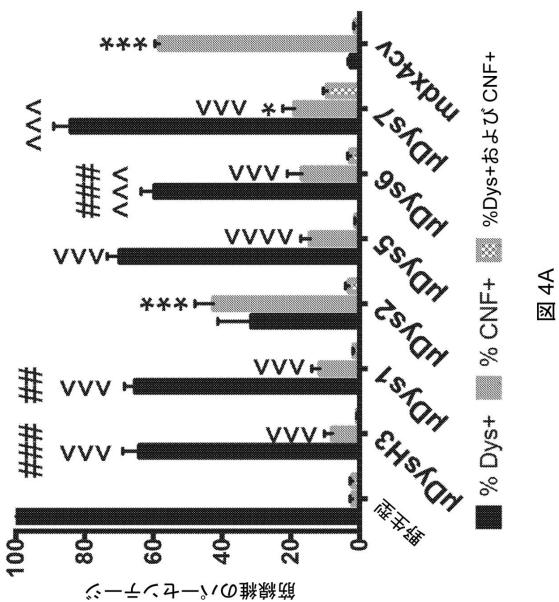
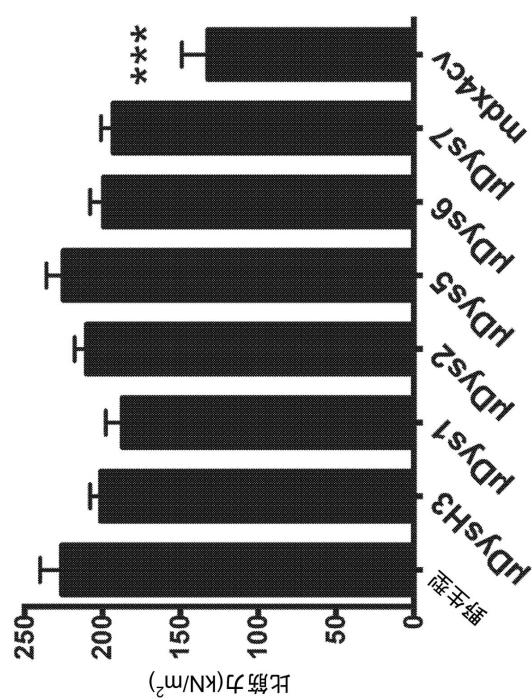


図4A

【図4B】



【図4C】

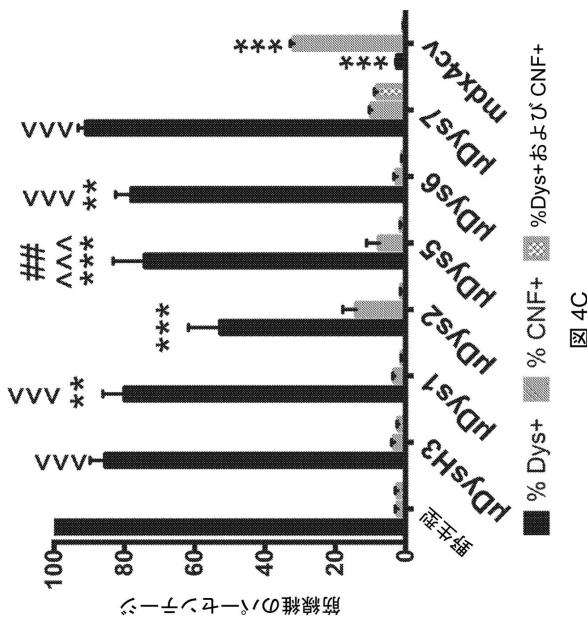
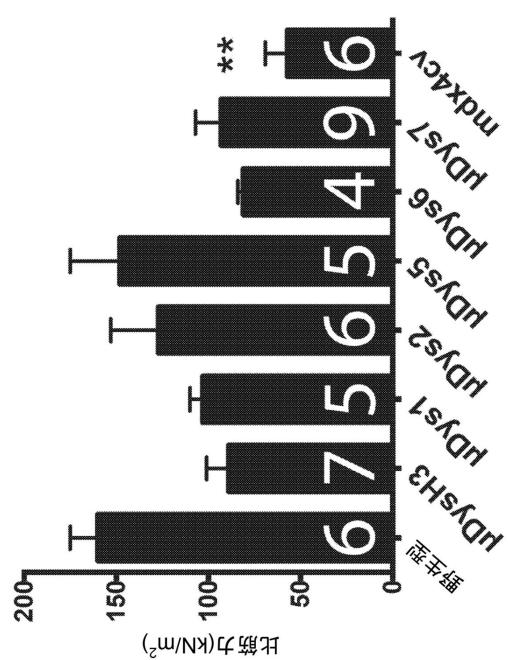


図4B

図4C

【図4D】



【図5A】

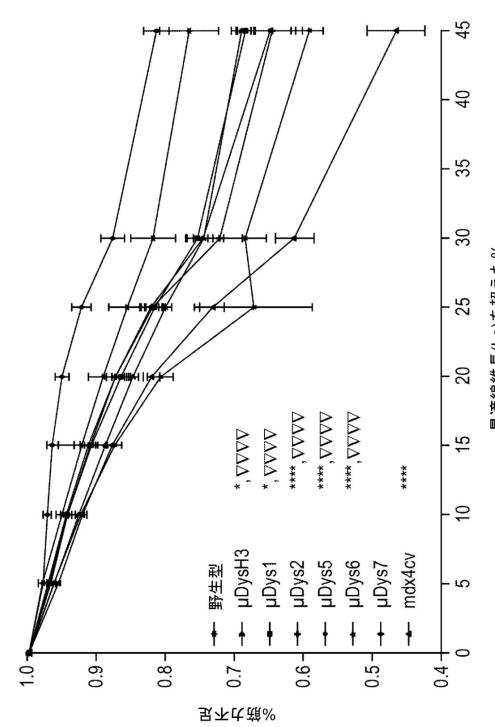
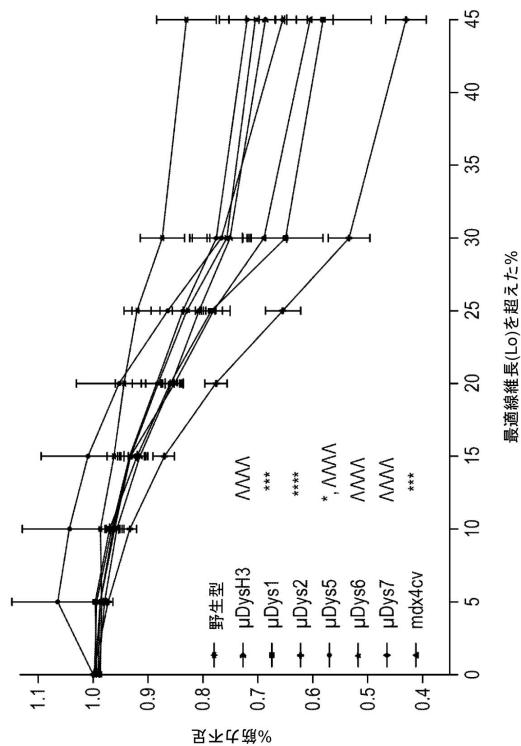


図5A

【図5B】



【図6】

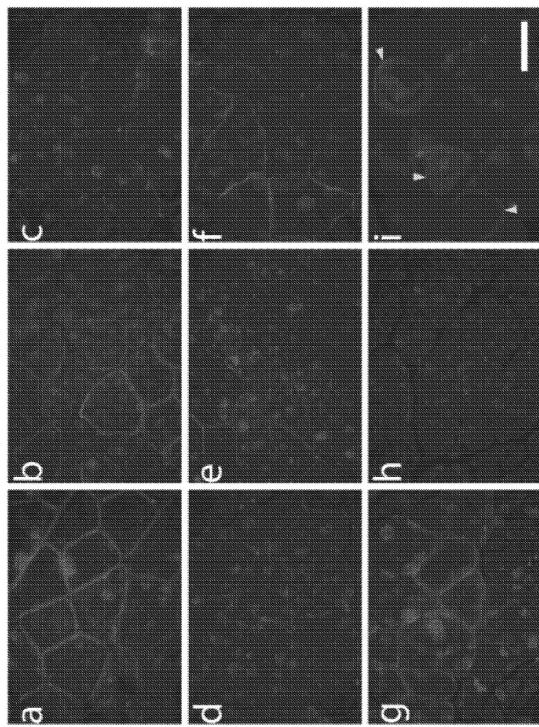


図6

図5B

【図7】

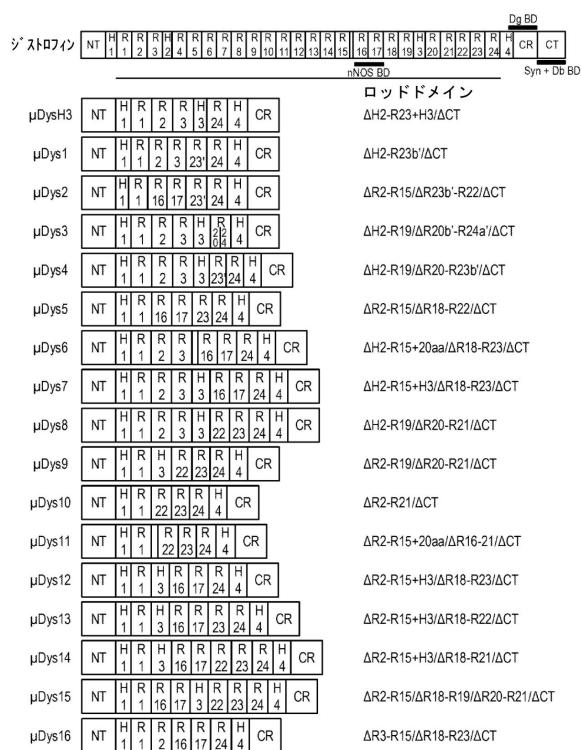


図7

【図8】

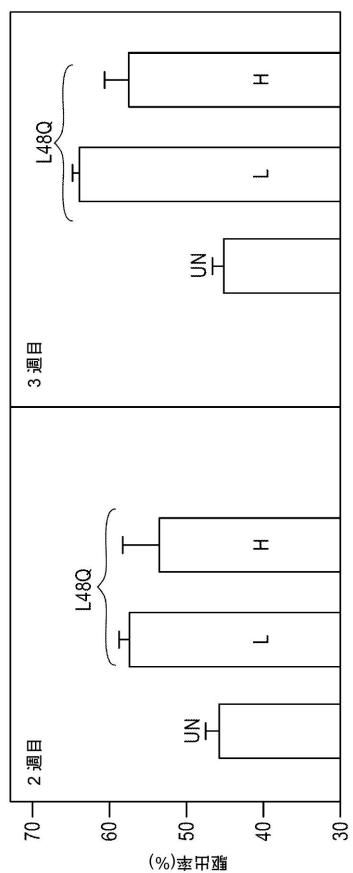


図8

【図 9】

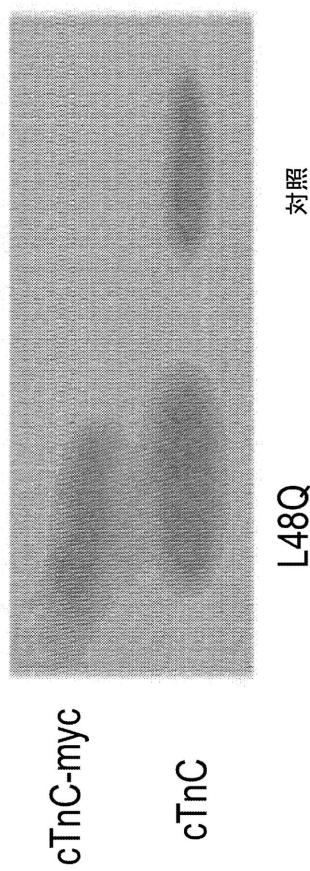


図 9

【図 10】

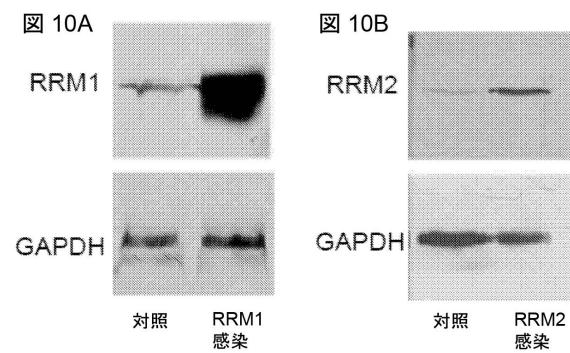
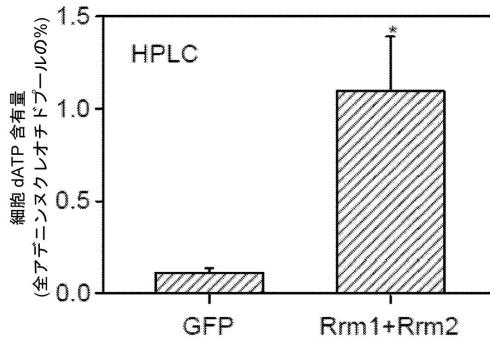


図 10C



【図 11】

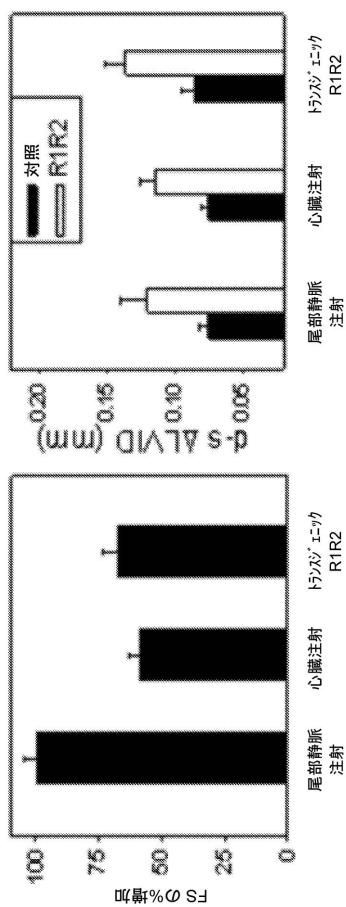


図 11

【図 12】

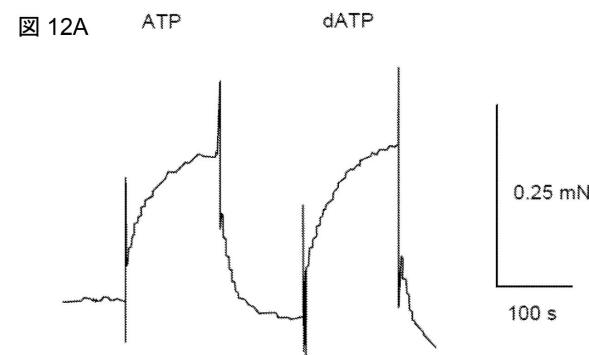
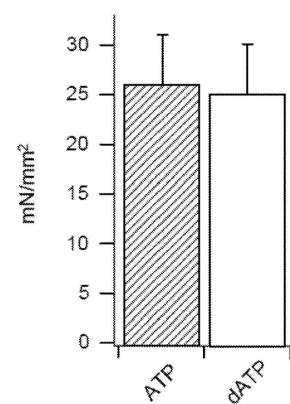
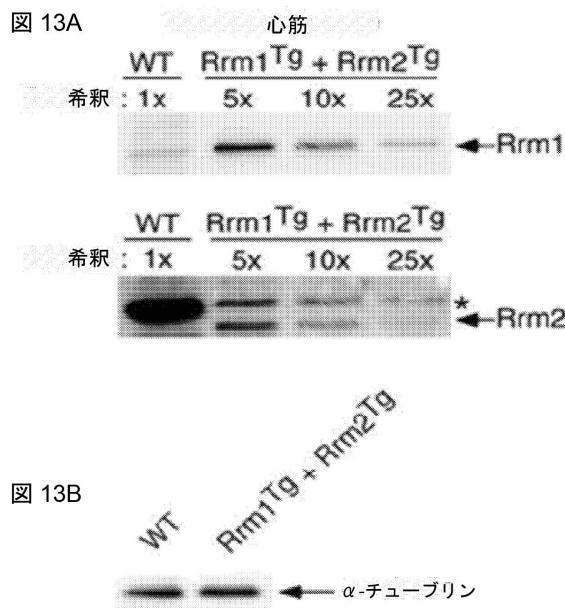


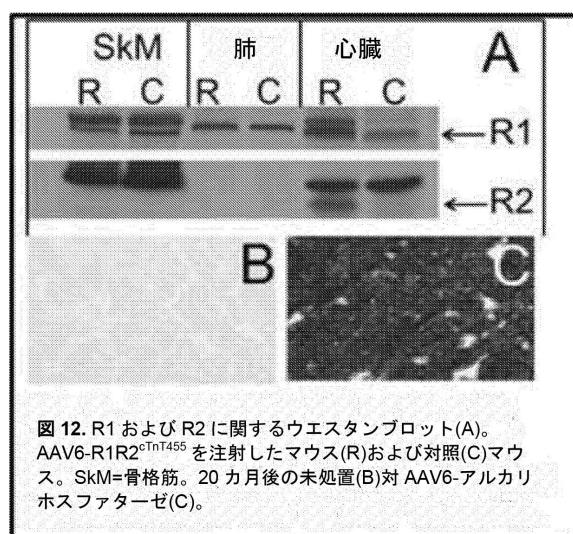
図 12B



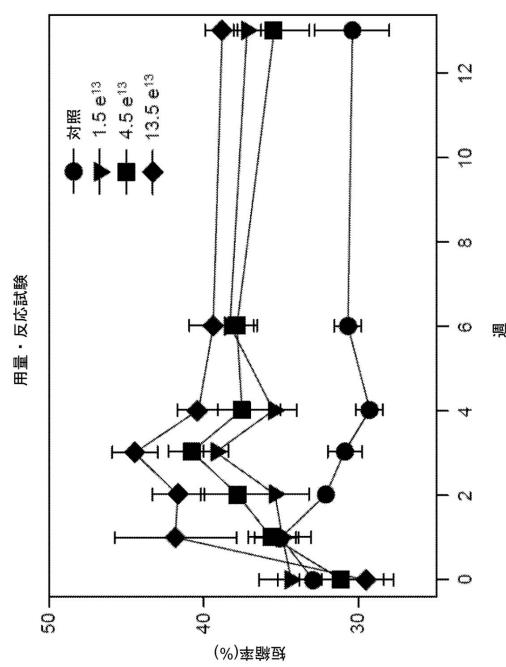
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【図 16】

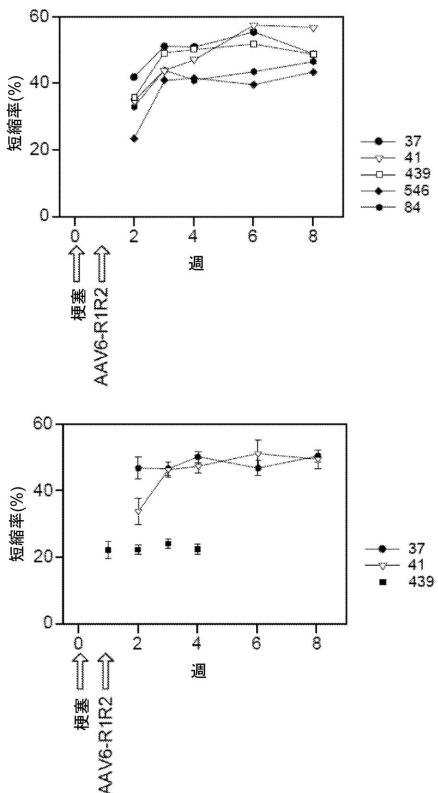


図 16

【図17】

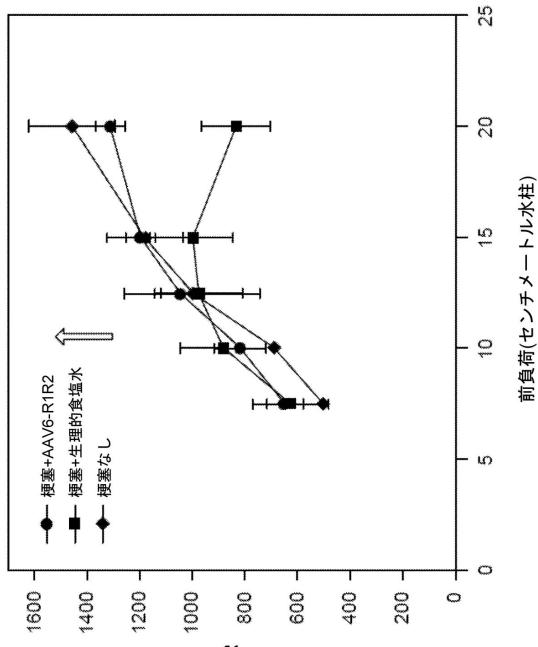


図17

【図18】

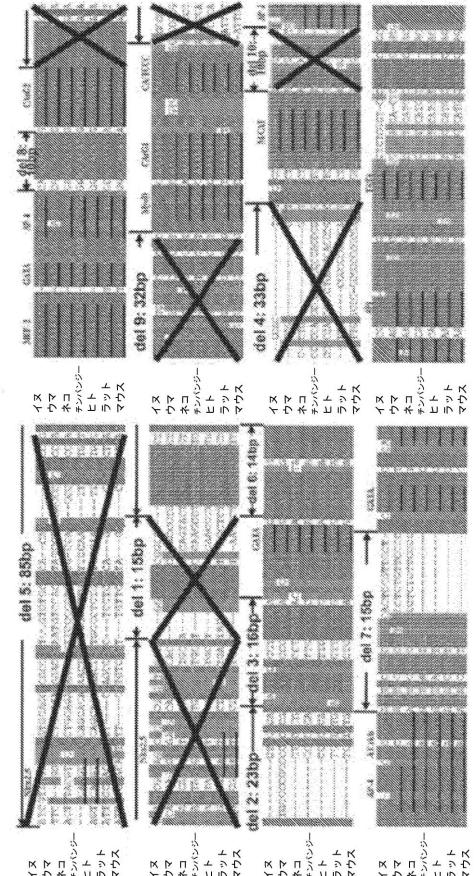


図18

【図19】

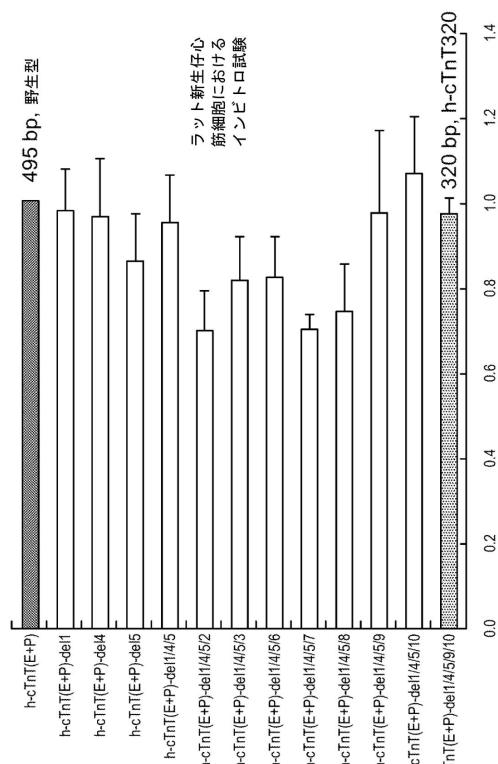


図19

【図20】

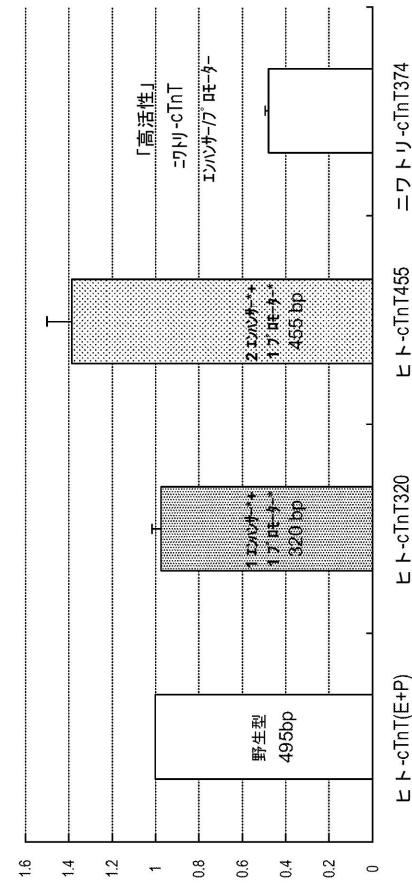
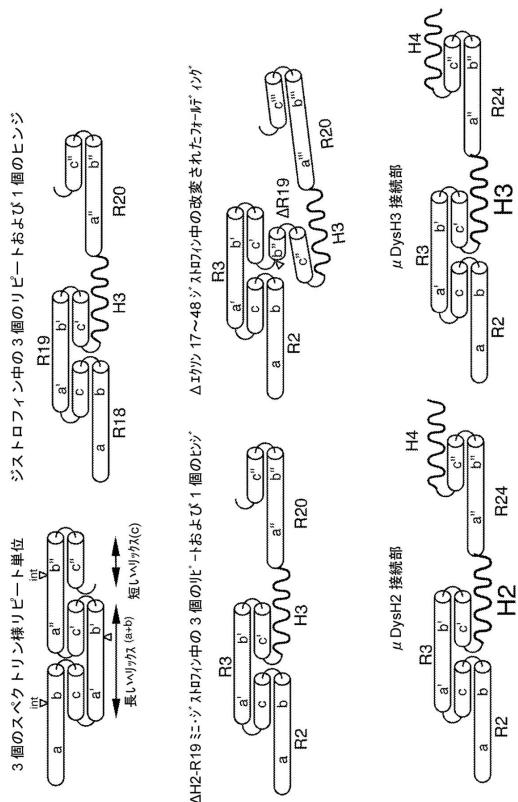


図20

【図 2 1】



【図 2 2】

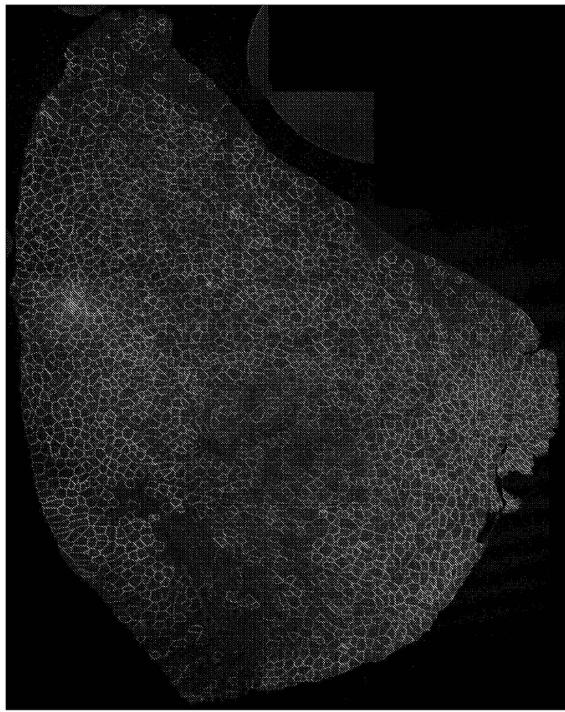


図 21

図 22

【配列表】

[0006832280000001.app](http://0006832280000001.app)

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47  
A 6 1 K 38/17 (2006.01) A 6 1 K 38/17

(74)代理人 100126354

弁理士 藤田 尚

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 チャンバーレイン, ジェフリー エス.

アメリカ合衆国 ワシントン州 98105, シアトル, ルーズベルト ウェイ エヌイー 45  
45, スイート 400, ユニバーシティ オブ ワシントン内

(72)発明者 ラモス, ジュリアン

アメリカ合衆国 ワシントン州 98105, シアトル, ルーズベルト ウェイ エヌイー 45  
45, スイート 400, ユニバーシティ オブ ワシントン内

(72)発明者 ハウシュカ, ステファン ディー.

アメリカ合衆国 ワシントン州 98105, シアトル, ルーズベルト ウェイ エヌイー 45  
45, スイート 400, ユニバーシティ オブ ワシントン内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2010-516252 (JP, A)

米国特許出願公開第2013/0136729 (US, A1)

米国特許出願公開第2014/0234255 (US, A1)

Molecular Therapy, 2011年, Vol.19, No.7, p.1331-1341

Human Gene Therapy, 2012年, Vol.23, p.98-103

Molecular Therapy, 2013年, Vol.21, No.4, p.750-757

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

CA / MEDLINE / BIOSIS / WPI / STN

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

G e n b a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d