

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7676111号  
(P7676111)

(45)発行日 令和7年5月14日(2025.5.14)

(24)登録日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N	15/864 (2006.01)
A 6 1 K	35/76 (2015.01)
A 6 1 K	48/00 (2006.01)
A 6 1 P	21/00 (2006.01)
A 6 1 P	21/04 (2006.01)
	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
	A 6 1 K 35/76
	A 6 1 K 48/00
	A 6 1 P 21/00
	A 6 1 P 21/04 Z N A
	請求項の数 15 (全67頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-550767(P2019-550767)	(73)特許権者	515289842
(86)(22)出願日	平成30年3月16日(2018.3.16)		リサーチ インスティチュート アット
(65)公表番号	特表2020-513811(P2020-513811		ネイションワイド チルドレンズ ホスピ
	A)		タル
(43)公表日	令和2年5月21日(2020.5.21)		アメリカ合衆国 オハイオ 43205 ,
(86)国際出願番号	PCT/US2018/022881		コロンバス , チルドレンズ ドライブ
(87)国際公開番号	WO2018/170408		700 , ルーム ダブリュー 172
(87)国際公開日	平成30年9月20日(2018.9.20)	(74)代理人	100078282
審査請求日	令和3年3月15日(2021.3.15)		弁理士 山本 秀策
審判番号	不服2023-2403(P2023-2403/J1)	(74)代理人	100113413
審判請求日	令和5年2月13日(2023.2.13)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	62/473,148	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成29年3月17日(2017.3.17)		弁理士 飯田 貴敏
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 筋ジストロフィーを治療するための筋肉特異的マイクロジストロフィンのアデノ随伴ウイルスベクター送達

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

5'から3'の方向で、末端逆位配列(IRT)、MHC7筋肉特異的制御エレメント、キメライントロン配列、配列番号1のヌクレオチド配列、配列番号3のヌクレオチド4787~4842に示される合成ポリAシグナル、およびIRTを、この順で含む組換えAAVrh74ベクター。

## 【請求項2】

前記キメライントロン配列が、配列番号3のヌクレオチド1046~1195に示される、請求項1に記載の組換えAAVrh74ベクター。

## 【請求項3】

請求項1または2に記載の組換えAAVrh74ベクターと、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

## 【請求項4】

筋ジストロフィーの治療を必要とする対象における筋ジストロフィーの治療における使用のための、請求項1または2に記載の組換えAAVrh74ベクターを含む組成物、または請求項3に記載の組成物。

## 【請求項5】

筋ジストロフィーを患っている対象における線維症を軽減または予防するための、請求項1または2に記載の組換えAAVrh74ベクターを含む組成物、または請求項3に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記対象が、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを患っている、請求項4または5に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記組成物が、筋肉内注射または静脈内注射により投与されることを特徴とする、請求項4～6のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記組成物が全身投与されることを特徴とする、請求項4～6のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記組成物が、注射、注入、または移植により投与されることを特徴とする、請求項8に記載の組成物。

10

**【請求項 10】**

筋ジストロフィーの治療を必要とする対象における筋ジストロフィーを治療するための医薬の製造のための、請求項1または2に記載の組換え A A V r h 7 4 ベクターまたは請求項3に記載の組成物の使用。

**【請求項 11】**

筋ジストロフィーを患っている対象における線維症を軽減または予防するための医薬の製造のための、請求項1または2に記載の組換え A A V r h 7 4 ベクターまたは請求項3に記載の組成物の使用。

20

**【請求項 12】**

前記対象が、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを患っている、請求項1～10または1～11に記載の使用。

**【請求項 13】**

前記医薬が、筋肉内注射または静脈内注射のために製剤化されている、請求項1～10～12のいずれか一項に記載の使用。

**【請求項 14】**

前記医薬が、全身投与のために製剤化されている、請求項1～10～12のいずれか一項に記載の使用。

**【請求項 15】**

前記医薬が、注射、注入、または移植による非経口投与のために製剤化されている、請求項1～14に記載の使用。

30

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、国立衛生研究所／国立神経疾患・脳卒中研究所によって授与された助成金番号 N S 0 5 5 9 5 8 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

この出願は、2017年3月17日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 4 7 3 , 1 4 8 号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

**【0002】**

電子的に提出された資料の参照による組み込み

本出願は、本開示の別個の部分として、以下のように識別されるコンピューター可読形式の配列表を含み、その全体が参照により組み込まれる：ファイル名：5 1 4 7 5 \_ S e q \_ l i s t i n g . t x t ; サイズ：2 9 , 5 1 9 バイト、作成：2 0 1 8 年 3 月 1 3 日。

**【0003】**

本発明は、小型化ヒトマイクロジストロフィン遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス（A A V ）ベクターなどの遺伝子治療用ベクター、ならびにこれらのベクターを使用して横隔膜および心筋を含む骨格筋でマイクロジストロフィンを発現し、筋ジストロフィーを患っている対象において、筋纖維を損傷から保護し、筋力を増加させ、線維症を軽減および

50

/ または予防する方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

運動および呼吸などの日常活動、ならびに全身代謝のための筋肉量と筋力の重要性は明確である。筋肉機能の欠損は、筋力の低下と消耗を特徴とし、生活の質に深刻な影響を及ぼす筋ジストロフィー (MD) を生じさせる。最もよく特性評価されたMDは、ジストロフィン結合タンパク質複合体 (DAPC) のメンバーをコードする遺伝子の変異に起因する。これらのMDは、DAPCによる筋細胞膜・細胞骨格係留の喪失に関連する膜の脆弱性に起因する。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、5000人に1人の新生児男性が罹患する最も壊滅的な筋肉疾患のうちの1つである。

10

【0005】

DMDは、mRNAの減少と、ジストロフィン結合タンパク質複合体 (DAPC) に結合する427kDの筋細胞膜タンパク質であるジストロフィンの欠如をもたらすDMD遺伝子の変異によって引き起こされる (Hoffmann et al., Cell 51 (6) : 919-28, 1987)。DAPCは、筋細胞膜の複数のタンパク質で構成され、細胞外マトリックス (ECM) と、アクチン結合タンパク質であるジストロフィン、およびラミニン結合タンパク質であるアルファジストログリカンを介した細胞骨格との構造的な連結を形成する。これらの構造的な連結は、収縮中に筋肉細胞膜を安定させ、収縮による損傷から保護するように作用する。ジストロフィンの喪失により、膜の脆弱性は筋細胞膜の裂離とカルシウムの流入をもたらし、カルシウム活性化プロテアーゼと分節線維壊死を引き起こす (Straub et al., Curr Opin Neurol. 10 (2) : 168-75, 1997)。筋肉の変性と再生のこの制御不能のサイクルは、最終的に筋肉幹細胞集団を使い果たし (Sacco et al., Cell, 2010.143 (7) : p. 1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009.71 : p. 37-57)、進行性の筋力低下、筋内膜炎、および線維性瘢痕をもたらす。

20

【0006】

ジストロフィンまたはマイクロジストロフィンによる膜の安定化がなければ、DMDは組織損傷と修復の制御不能なサイクルを示し、最終的に、結合組織の増殖を通じて喪失した筋線維を線維性瘢痕組織に置き換える。線維症は、コラーゲンおよびエラスチンを含むECMマトリックスタンパク質の過剰な沈着を特徴とする。ECMタンパク質は、主に、ストレスおよび炎症に反応する活性化線維芽細胞によって放出されるTGFなどのサイトカインから生成される。DMDの主な病理学的特徴は筋線維の変性と壊死であるが、病理学的な結果としての線維症は同等の影響を及ぼす。線維組織の過剰産生は、筋肉の再生を制限し、DMD患者の進行性の筋力低下の一因となる。ある研究では、初期のDMD筋生検での線維症の存在は、10年間の追跡調査での運動転帰不良と高い相関があった (Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009.68 (7) : p. 762-7)。これらの結果は、線維症がDMD筋機能障害の主な原因であることを示しており、顕性線維症の前の早期介入の必要性を強調している。

30

【0007】

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは、145ヌクレオチドの末端逆位配列 (ITR) を含む約4.7kbの長さである。AAVの複数の血清型がある。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は公知である。例えば、AAV血清型2 (AAV2) ゲノムのヌクレオチド配列は、Ruffing et al., J Gen Virol, 75 : 3385-3392 (1994) によって修正されたSrivastava et al., J Virol, 45 : 555-564 (1983) に提示されている。他の例として、AAV-1の完全ゲノムは、GenBank受付番号NC\_002077に提示されており、AAV-3の完全ゲノムは、GenBank受付番号NC\_1829に提示されており、AAV-4の完全ゲノムは、GenBank受付番号NC\_001829に提示されており、AAV-5ゲノムは、GenB

40

50

ank 受理番号 A F 0 8 5 7 1 6 に提示されており、 A A V - 6 の完全ゲノムは、 G e n B a n k 受理番号 N C \_ 0 0 1 8 6 2 に提示されており、 A A V - 7 および A A V - 8 のゲノムの少なくとも一部は、それぞれ、 G e n B a n k 受理番号 A X 7 5 3 2 4 6 および A X 7 5 3 2 4 9 に提示されており ( A A V - 8 に関する米国特許第 7 , 2 8 2 , 1 9 9 および同第 7 , 7 9 0 , 4 4 9 もまた参照されたい) 、 A A V - 9 ゲノムは、 G a o e t a l . , J . V i r o l . , 7 8 : 6 3 8 1 - 6 3 8 8 ( 2 0 0 4 ) に提示されており、 A A V - 1 0 ゲノムは、 M o l . T h e r . , 1 3 ( 1 ) : 6 7 - 7 6 ( 2 0 0 6 ) に提示されており、 A A V - 1 1 ゲノムは、 V i r o l o g y , 3 3 0 ( 2 ) : 3 7 5 - 3 8 3 ( 2 0 0 4 ) に提示されている。 A A V r h . 7 4 血清型のクローニングは、 R o d i n o - K l a p a c . , e t a l . J o u r n a l o f t r a n s l a t i o n a l m e d i c i n e 5 , 4 5 ( 2 0 0 7 ) に記載されている。ウイルス D N A 複製 ( r e p ) 、カプシド形成 / パッケージング、および宿主細胞染色体組込みを指示する C i s 作用配列は、 I T R 内に含有される。3つの A A V プロモーター ( それらの相対マップ位置に対して p 5 、 p 1 9 、および p 4 0 と名付けられる ) は、 r e p および c a p 遺伝子をコードする2つの A A V 内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一の A A V イントロンの差異的スプライシング ( 例えば、 A A V 2 のヌクレオチド 2 1 0 7 および 2 2 2 7 における ) と相まって、2つの r e p プロモーター ( p 5 および p 1 9 ) により、 r e p 遺伝子から4つの r e p タンパク質 ( r e p 7 8 、 r e p 6 8 、 r e p 5 2 、および r e p 4 0 ) が生成される。 R e p タンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関する複数の酵素特性を有する。 c a p 遺伝子は、 p 4 0 プロモーターから発現され、3つのカプシドタンパク質 V P 1 、 V P 2 、および V P 3 をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連カプシドタンパク質の產生に関与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、 A A V ゲノムのマップ位置 9 5 に位置する。 A A V の生活環および遺伝学は、 M u z y c z k a , C u r r e n t T o p i c s i n M i c r o b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y , 1 5 8 : 9 7 - 1 2 9 ( 1 9 9 2 ) においてレビューされる。

#### 【 0 0 0 8 】

A A V は、例えば、遺伝子療法において、外来 D N A を細胞に送達するためのベクターとして魅力的にする固有の特徴を有する。培養中の細胞の A A V 感染は、非細胞変性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染は、サイレントかつ無症候性である。さらに、 A A V は、多くの哺乳動物細胞を感染させ、インビオで多くの異なる組織を標的化する可能性を可能にする。さらに、 A A V は、緩徐に分裂する細胞および非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性な核エピソーム ( 染色体外要素 ) として本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続し得る。 A A V プロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド中のクローニング D N A として感染性である。さらに、 A A V 複製、ゲノムカプシド形成および組込みを指示するシグナルが A A V ゲノムの I T R 内に含まれるので、ゲノムの内部約 4 . 3 k b ( 複製および構造カプシドタンパク質、 r e p - c a p をコードする ) のいくつかまたは全てを、プロモーター、目的の D N A およびポリアデニル化シグナルを含む遺伝子カセットのような外来 D N A と置換し得る。 r e p および c a p タンパク質は、トランスで提供され得る。 A A V の別の重要な特徴は、それが極めて安定した頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件 ( 5 6 ~ 6 5 で数時間 ) に容易に耐え、 A A V の低温保存の重要性を低くする。 A A V は、凍結乾燥され得る。最後に、 A A V 感染細胞は、重複感染に耐性を示さない。

#### 【 0 0 0 9 】

複数の研究により、筋肉における長期 ( 1 . 5 年を超える ) の組換え A A V 媒介タンパク質発現が実証されている。 C l a r k e t a l . , H u m G e n e T h e r , 8 : 6 5 9 - 6 6 9 ( 1 9 9 7 ) ; K e s s l e r e t a l . , P r o c N a t . A c a d S c . U S A , 9 3 : 1 4 0 8 2 - 1 4 0 8 7 ( 1 9 9 6 ) ; および X i a o e t a l . , J . V i r o l . , 7 0 : 8 0 9 8 - 8 1 0 8 ( 1 9 9 6 ) を参照されたい。 C h a o e t a l . , M o l T h e r . , 2 : 6 1 9 - 6 2 3 ( 2 0 0 0 ) and C h a

10

20

30

40

50

o et al., Mol Ther, 4: 217 - 222 (2001) もまた参照されたい。さらに、筋肉は高度に血管化されているため、Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804 - 5809 (1997)、および Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13921 - 13926 (1997) に記載されているように、組換えAAV形質導入により、筋肉内注射後の体循環において導入遺伝子産物が出現する。さらに、Lewis et al., J Virol, 76: 8769 - 8775 (2002) は、骨格筋線維が抗体の正しいグリコシル化、フォールディング、および分泌に必要な細胞因子を持っていることを実証し、筋肉が分泌タンパク質治療薬を安定して発現できることを示している。

DMD およびその他の筋ジストロフィーに苦しむ患者の機能改善には、疾患の初期段階での遺伝子修復が必要である。筋力を増加させ、DMD に苦しむ患者の筋肉損傷から保護する治療が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【文献】Hoffmann et al., Cell, 51 (6): 919 - 28, 1987

【文献】Straub et al., Curr Opin Neurol, 10 (2): 168 - 75, 1997

【文献】Sacco et al., Cell, 2010. 143 (7): p. 1059 - 71

【文献】Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 37 - 57

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、横隔膜および心筋を含む骨格筋に対する、筋線維を損傷から保護し、筋力を増加させ、線維症を軽減および / または予防するための、マイクロジストロフィン遺伝子を発現する遺伝子用治療ベクター、例えばAAVを対象とする。

【0012】

本発明は、DMD で観察される遺伝子欠損に対処するために遺伝子用治療ベクターを使用してマイクロジストロフィンを送達することにより、筋力を増加させるおよび / または筋肉量を増加させる治療およびアプローチを提供する。実施例 2 に示すように、マイクロジストロフィン遺伝子治療による治療は、インビボでより大きな筋力をもたらした。さらに、筋肉内および全身へのマイクロジストロフィン遺伝子治療の送達は、マウスモデルにおいてインビボで筋肉へのジストロフィンの送達を示した。

【0013】

一実施形態では、本発明は、筋肉特異的制御エレメントのヌクレオチド配列と、マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列と、を含む、rAAVベクターを提供する。例えば、ヌクレオチド配列は機能的マイクロジストロフィンタンパク質をコードし、ヌクレオチドは、配列番号 1 に対して、例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または 89%、より一般的には少なくとも 90%、91%、92%、93%、または 94%、さらにより一般的には少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性であり、タンパク質はマイクロジストロフィン活性を保持する。マイクロジストロフィンタンパク質は、筋肉収縮時に筋肉膜に安定性を提供し、例えば、マイクロジストロフィンは、筋肉収縮時にショックアブソーバーとして機能する。

【0014】

本発明はまた、ヌクレオチド配列が、ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の核酸配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む機能的マイクロジストロフィンタンパク

10

20

30

40

50

質、またはその相補体 (complements) をコードし、機能的マイクロジストロフィンタンパク質をコードする rAAVベクターも提供する。

【0015】

一実施形態では、rAAVベクターは、rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンと呼ばれる非複製の、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) である。このベクターゲノムには、MHCK7プロモーター/エンハンサーの制御下にあるAAV2末端逆位配列 (ITR)、マイクロジストロフィン、SV40イントロン (SD/SA)、および合成ポリアデニル化 (ポリA) シグナルを含む、遺伝子発現に必要な最小限の要素が含まれている。ベクターゲノムおよび発現カセットの概略図を図1に示す。AAVrh74血清型は、IV投与後の骨格筋および心筋における効率的な遺伝子導入を達成するため10に使用できる。

【0016】

「ストリンジエントな」という用語は、ストリンジエントとして当該技術分野において一般に理解される条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションストリンジエントは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のためのストリンジエントな条件の例は、0.015Mの塩化ナトリウム、65~68の0.0015Mのクエン酸ナトリウムまたは0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、および42の50%ホルムアミドである。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989) を参照されたい。よりストリンジエントな条件 (より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤など) も使用できるが、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受ける。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが関係する場合、追加のストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の例には、37 (14塩基オリゴの場合)、48 (17塩基オリゴの場合)、55 (20塩基オリゴの場合)、および60 (23塩基オリゴの場合) での6×SSC、0.05%ピロリン酸ナトリウムでの洗浄が含まれる。

【0017】

非特異的および/またはバックグラウンドハイブリダイゼーションを低減する目的で、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液に他の薬剤を含めることができる。例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、NaDODSO4、(SDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA (または他の非相補的DNA)、および硫酸デキストランが挙げられるが、他の適切な薬剤も使用できる。これらの添加物の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジエントに実質的に影響を与えることなく変更できる。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8~7.4で行われるが、典型的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーションの速度はpHにほとんど依存しない。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England) を参照されたい。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を考慮して、異なる配列類似性のDNAがハイブリッドを形成することを可能にするために、当業者によって調整され得る。

【0018】

「筋肉特異的制御エレメント」という用語は、筋肉組織での発現に特異的なコード配列の発現を調節するヌクレオチド配列を指す。これらの制御エレメントには、エンハンサーとプロモーターが含まれる。本発明は、筋肉特異的制御エレメントMCKH7プロモーター、MCKプロモーターおよびMCKエンハンサーを含む構築物を提供する。

【0019】

「動作可能に連結された」という用語は、調節エレメントヌクレオチド配列、例えばブ

10

20

30

40

50

口モータースクレオチド配列の、前記調節エレメントによる前記スクレオチド配列の発現を付与する配置を指す。

【0020】

一態様では、本発明は、前記筋肉特異的制御エレメントが、ヒト骨格アクチン遺伝子エレメント、心臓アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子（M E F）、筋肉クレアチニーゼ（M C K）、短縮型M C K（t M C K）、ミオシン重鎖（M H C）、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / M C K エンハンサー プロモーター（M H C K 7）、C 5 - 12、マウスクレアチニーゼエンハンサー因子、速筋骨格筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋心臓トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋トロポニン i 遺伝子エレメント、低酸素誘導性核内因子、ステロイド誘導性エレメント、または糖質コルチコイド応答エレメント（G R E）である、r A A V ベクターを提供する。

10

【0021】

例えば、筋肉特異的制御エレメントはM H C K 7 プロモーター スクレオチド配列の配列番号 2 であるか、または、筋肉特異的制御エレメントはM C K スクレオチド配列の配列番号 4 である。さらに、本発明の r A A V ベクターのいずれかにおいて、筋肉特異的制御エレメント スクレオチド配列、例えばM H C K 7 またはM C K スクレオチド配列は、マイクロジストロフィンタンパク質をコードするスクレオチド配列に動作可能に連結されている。例えば、M H C K 7 プロモーター スクレオチド配列（配列番号 2 ）は、図 1 または図 10 に提示される構築物（配列番号 3 ）に記述されるように、ヒトマイクロジストロフィンコード配列（配列番号 1 ）に動作可能に連結されている。別の例では、M C K プロモーター（配列番号 4 ）は、図 7 または図 11 に提示される構築物（配列番号 5 ）に記述されるように、ヒトマイクロジストロフィンコード配列（配列番号 1 ）に動作可能に連結されている。別の態様において、本発明は、配列番号 1 および配列番号 2 のスクレオチド配列を含む r A A V ベクターを提供する。本発明はまた、配列番号 1 および配列番号 4 のスクレオチド配列を含む r A A V ベクターを提供する。

20

【0022】

さらなる態様では、本発明は、配列番号 3 または配列番号 5 のスクレオチド配列を含む r A A V ベクターを提供する。例えば、r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンベクターは、配列番号 3 のスクレオチド配列を含み、図 10 に示されている。この r A A V ベクターは、M H C K 7 プロモーター、キメライントロン配列、ヒトマイクロジストロフィン遺伝子のコード配列、ポリ A、アンピシリン耐性、および p B R 3 2 2 複製起点を有する p G E X プラスミド骨格を含む。

30

【0023】

本発明は、配列番号 1 のヒトマイクロジストロフィンスクレオチド配列および配列番号 3 のM H C K 7 プロモーター スクレオチド配列を含む、r A A V ベクターを提供する。この r A A V ベクターは、A A V 血清型 A A V r h . 7 4 である。

【0024】

本発明はまた、配列番号 3 の p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィン構築物のスクレオチド配列を含む、r A A V ベクターを提供する。この r A A V ベクターは、A A V 血清型 A A V r h . 7 4 である。

40

【0025】

本発明の r A A V ベクターは、血清型 A A V r h . 7 4 、 A A V 1 、 A A V 2 、 A A V 4 、 A A V 5 、 A A V 6 、 A A V 7 、 A A V 8 、 A A V 9 、 A A V 1 0 、 A A V 1 1 、 A A V 1 2 、 または A A V 1 3 などの任意の A A V 血清型であり得る。

【0026】

本発明はまた、本発明の r A A V ベクターのいずれかを含む医薬組成物（または、本明細書ではしばしば、単に「組成物」と呼ばれる）も提供する。

【0027】

別の実施形態では、本発明は、本発明のいずれかの r A A V ベクターでトランスフェクトされた細胞を培養することと、トランスフェクトされた細胞の培養上清から r A A V 粒

50

子を回収することと、を含む、rAAVベクター粒子の產生方法を提供する。本発明はまた、本発明の組換えAAVベクターのいずれかを含むウイルス粒子を提供する。

【0028】

本発明は、ヒトマイクロジストロフィンを発現する本発明の組換えAAVベクターのいずれかの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィーの治療方法を提供する。

【0029】

本発明は、筋ジストロフィーを治療する方法であって、配列番号1のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列および配列番号2のMHC7プロモーターヌクレオチド配列を治療有効量の含む組換えAAVベクターを投与することを含む、方法を提供する。

【0030】

本発明はまた、筋ジストロフィーを治療する方法であって、配列番号3のpAAV.MHCK7.マイクロジストロフィン構築物のヌクレオチド配列を含む治療有効量の組換えAAVベクターを投与することを含む、方法を提供する。

10

【0031】

「線維症」とは、骨格筋、心筋、肝臓、肺、腎臓、および胰臓を含む、細胞外マトリックス(ECM)成分の過剰または無秩序な沈着および損傷時の組織の異常な修復プロセスを指す。沈着するECM成分には、フィブロネクチンおよびコラーゲン、例えばコラーゲン1、コラーゲン2、またはコラーゲン3が含まれる。

【0032】

本発明はまた、筋ジストロフィーを患っている対象において線維症を軽減または予防する方法であって、本発明の任意の組換えAAVベクターの治療有効量を投与することを含む、方法を提供する。

20

【0033】

別の実施形態では、本発明は、それを必要とする対象の線維症を予防する方法であって、本発明の任意の組換えAAVベクターの治療有効量を投与することを含む、方法を提供する。例えば、本発明のrAAVのいずれも、筋ジストロフィーを患っている対象に投与して線維症を予防することができ、例えば、本発明のヒトマイクロジストロフィンタンパク質を発現するrAAVは、対象で線維症が観察される前に投与される。さらに、本発明のヒトマイクロジストロフィン遺伝子を発現するrAAVは、筋ジストロフィー、例えばDMDを患っているかまたは診断されたものなど、線維症を発症するリスクのある対象に投与することができる。本発明のrAAVは、筋ジストロフィーを患っている対象に投与して、これらの対象の新規の線維症を予防することができる。

30

【0034】

本発明は、対象において線維症が観察される前に、本発明のAAVベクターのいずれかを投与することを企図する。さらに、本発明のrAAVは、筋ジストロフィー、例えばDMDを患っているかまたは診断されたものなど、線維症を発症するリスクのある対象に投与することができる。本発明のrAAVは、筋ジストロフィーを患っており、既に線維症を発症している対象に投与して、これらの対象の新規の線維症を予防することができる。

【0035】

本発明はまた、筋ジストロフィーを患っている対象において筋力および/または筋肉量を増加させる方法であって、本発明の任意のヒトマイクロジストロフィンを発現するrAAVベクターの治療有効量を投与することを含む、方法を提供する。これらの方法は、マイクロジストロフィンを発現するrAAVを投与するステップをさらに含むことができる。

40

【0036】

本発明は、対象において線維症が観察される前、または筋力が減少する前、または筋肉量が減少する前に、DMDと診断された患者に本発明のAAVベクターのいずれかを投与することを企図する。

【0037】

本発明はまた、これらの対象の新規の線維症を予防するため、またはこれらの患者の線維症を軽減するために、既に線維症を発症している筋ジストロフィーを患っている対象に

50

本発明のAAVを投与することを企図する。本発明はまた、筋肉をさらなる損傷から保護するために、すでに筋力が低下している、または筋肉量が低下している筋ジストロフィーを患っている患者に、本発明のrAAVのいずれかを投与することを提供する。

【0038】

本発明の方法のいずれにおいても、対象は、DMDまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーを患っている可能性がある。

【0039】

別の態様では、マイクロジストロフィンタンパク質を発現するrAAVベクターは、MHC7またはMCK以外の筋肉特異的制御エレメントに動作可能に連結されたマイクロジストロフィン遺伝子のコード配列を含む。例えば、筋肉特異的制御エレメントは、ヒト骨格アクチン遺伝子エレメント、心臓アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF、短縮型MCK(tMCK)、ミオシン重鎖(MHC)、C5-12(合成プロモーター)、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー因子、速筋骨格筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋心臓トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素(hypozia)誘導性核内因子、ステロイド誘導性エレメント、または糖質コルチコイド応答エレメント(GRE)である。

10

【0040】

本発明の方法のいずれにおいても、rAAVベクターまたは組成物は、筋肉内注射または静脈内注射により投与することができる。

【0041】

さらに、本発明の方法のいずれにおいても、rAAVベクターまたは組成物は、全身投与することができる。例えば、rAAVベクターまたは組成物は、注射、注入、または移植による非経口投与であり得る。

20

【0042】

別の実施形態では、本発明は、それを必要とする対象の線維症を軽減するための本発明のrAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0043】

さらに、本発明は、筋ジストロフィーを患っている患者の線維症を予防するための本発明の組換えAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0044】

30

本発明は、筋ジストロフィーを治療するための本発明の組換えAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0045】

本発明は、筋ジストロフィーの治療のための、配列番号1のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列と、配列番号2のMHC7プロモーター配列とを含む組換えAAVベクターを含む組成物を提供する。

【0046】

本発明は、筋ジストロフィーの治療のための、配列番号3のヌクレオチド配列を含むpAAV.MHCK7.マイクロジストロフィン構築物を含む組換えAAVベクターを含む組成物を提供する。

40

【0047】

本発明はまた、筋ジストロフィーを患っている対象の筋力および/または筋肉量を増加させるための本発明のrAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。さらなる態様において、本発明は、筋ジストロフィーの治療のための本発明のrAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0048】

本発明の組成物は、筋肉内注射または静脈内注射のために製剤化することができる。本発明の組成物はまた、注射、注入、または移植による非経口投与などの全身投与のために製剤化される。

【0049】

50

さらに、任意の組成物は、DMDまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーを患っている対象への投与のために製剤化することができる。

【0050】

さらなる実施形態では、本発明は、それを必要とする対象において線維症を軽減するための薬剤の調製のための本発明のrAAVベクターのいずれかの使用を提供する。例えば、必要とする対象は、DMDまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーを患っている可能性がある。

【0051】

別の実施形態では、本発明は、筋ジストロフィーを患っている対象の線維症を予防するための薬剤の調製のための本発明のrAAVベクターの使用を提供する。

10

【0052】

さらに、本発明は、筋ジストロフィーを患っている対象の筋力および/または筋肉量を増加させるための薬剤の調製への本発明の組換えAAVベクターの使用を提供する。

【0053】

本発明はまた、筋ジストロフィーの治療のための薬剤の調製のための本発明のrAAVベクターの使用を提供する。

【0054】

本発明は、筋ジストロフィーの治療のための薬剤の調製のための、配列番号1のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列と配列番号2のMHC7プロモーターヌクレオチド配列とを含む組換えAAVベクターの使用を提供する。

20

【0055】

本発明は、筋ジストロフィーの治療のための、配列番号3のpAAV.MHC7.マイクロジストロフィン構築物のヌクレオチド配列を含む組換えAAVベクターの使用を提供する。

【0056】

本発明の使用のいずれにおいても、薬剤は筋肉内注射または静脈内注射用のために製剤化することができる。さらに、本発明の使用のいずれにおいても、薬剤は、注射、注入、または移植による非経口投与などの全身投与のために製剤化される。

【0057】

薬剤のいずれも、DMDまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーを患っている対象への投与のために調製することができる。

30

本願発明は、例えば、以下の項目を提供する

(項目1)

筋肉特異的制御エレメントのヌクレオチド配列と、マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列と、を含む、組換えAAVベクター。

(項目2)

前記マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、

a) 配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも85%同一であり、機能的マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列、または

b) 配列番号1のヌクレオチド配列、を含む、項目1に記載の組換えAAVベクター。

40

(項目3)

前記筋肉特異的制御エレメントが、ヒト骨格アクチン遺伝子エレメント、心臓アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子(MEF)、筋肉クレアチニナーゼ(MCK)、短縮型MCK(tMCK)、ミオシン重鎖(MHC)、ハイブリッド-ミオシン重鎖エンハンサー/MCKエンハンサー/プロモーター(MHCK7)、C5-12、マウスクレアチニナーゼエンハンサー因子、速筋骨格筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋心臓トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋トロポニンi遺伝子エレメント、低酸素誘導性核内因子、ステロイド誘導性エレメント、または糖質コルチコイド応答エレメント(GRE)である、項目1または2に記載の組換えAAVベクター。

(項目4)

50

前記筋肉特異的制御エレメントが、筋肉クレアチンキナーゼ（MCK）またはハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / MCKエンハンサー/プロモーター（MHCCK7）である、項目1～3のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

（項目5）

前記筋肉特異的制御エレメントが、配列番号4のヌクレオチド配列を含む筋肉クレアチンキナーゼ（MCK）、または配列番号2のヌクレオチド配列を含むハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / MCKエンハンサー/プロモーター（MHCCK7）である、項目1～4のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

（項目6）

配列番号1および2のヌクレオチド配列を含む、項目1～5のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

10

（項目7）

配列番号3のヌクレオチド配列を含む、項目1～6のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

（項目8）

配列番号1のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列および配列番号2のMHCCK7プロモーター配列を含む、組換えAAVベクター。

（項目9）

配列番号3のpAAV.MHCCK7.マイクロジストロフィン構築物のヌクレオチド配列を含む、組換えAAVベクター。

20

（項目10）

配列番号1および4のヌクレオチド配列を含む、項目1～5のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

（項目11）

配列番号5のヌクレオチド配列を含む、項目1～5または10のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

（項目12）

前記ベクターが、血清型AAVrh.74、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはAAV13である、項目1～11のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

30

（項目13）

前記筋肉特異的制御エレメントのヌクレオチド配列が、マイクロジストロフィンヌクレオチド配列に動作可能に連結されている、項目1～12のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

（項目14）

項目1～13のいずれか1項に記載の組換えAAVベクターと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

（項目15）

筋ジストロフィーを患っている対象において筋力または筋肉量を増加させる方法であって、治療有効量の、項目1～13のいずれか1項に記載の組換えAAVベクターまたは項目14に記載の組成物を投与することを含む、方法。

40

（項目16）

筋ジストロフィーを患っている対象において線維症を軽減または予防する方法であって、治療有効量の、項目1～13のいずれか1項に記載の組換えAAVベクターまたは項目14に記載の組成物を投与することを含む、方法。

（項目17）

筋ジストロフィーを治療する方法であって、治療有効量の、項目1～13のいずれか1項に記載の組換えAAVベクターまたは項目14に記載の組成物を投与することを含む、方法。

（項目18）

50

筋ジストロフィーを治療する方法であって、配列番号 1 のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列および配列番号 2 の M H C K 7 プロモーターヌクレオチド配列を含む、治療有効量の組換え A A V ベクターを投与することを含む、方法。

(項目 19)

筋ジストロフィーを治療する方法であって、配列番号 3 の p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィン構築物のヌクレオチド配列を含む、治療有効量の組換え A A V ベクターを投与することを含む、方法。

(項目 20)

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、項目 15 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 21)

前記組換え A A V ベクターまたは前記組成物が、筋肉内注射または静脈内注射により投与される、項目 15 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 22)

前記組換え A A V ベクターまたは前記組成物が全身投与される、項目 15 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 23)

前記組換え A A V ベクターまたは前記組成物が注射、注入、または移植により非経口投与される、項目 22 に記載の方法。

20

(項目 24)

筋ジストロフィーを患っている対象において筋力または筋肉量を増加させるための、項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組換え A A V ベクターを含む組成物。

(項目 25)

筋ジストロフィーの治療のための、項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組換え A A V ベクターを含む組成物。

(項目 26)

筋ジストロフィーの治療のための、配列番号 1 のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列および配列番号 2 の M H C K 7 プロモーター配列を含む組換え A A V ベクターを含む組成物。

30

(項目 27)

筋ジストロフィーの治療のための、配列番号 3 の p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィン構築物ヌクレオチド配列を含む組換え A A V ベクターを含む組成物。

(項目 28)

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、項目 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 29)

筋肉内注射または静脈内注射のために製剤化された、項目 24 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 30)

前記組換え A A V ベクターまたは前記組成物が全身投与される、項目 24 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 31)

前記組換え A A V ベクターまたは前記組成物が、注射、注入、または移植による非経口投与である、項目 30 に記載の方法。

(項目 32)

筋ジストロフィーを患っている対象において筋力または筋肉量を増加させるための薬剤の調製のための、項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組換え A A V ベクターまたは項目 14 に記載の組成物の使用。

(項目 33)

筋ジストロフィーの治療のための薬剤の調製のための、項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に

50

記載の組換えAAVベクターまたは項目14に記載の組成物の使用。

(項目34)

筋ジストロフィーを患っている対象において線維症を軽減または予防するための薬剤の調製のための、項目1～13のいずれか1項に記載の組換えAAVベクターまたは項目14に記載の組成物の使用。

(項目35)

筋ジストロフィーの治療のための薬剤の調製のための、配列番号1のヒトマイクロジストロフィンスクレオチド配列および配列番号2のMHC7プロモータースクレオチド配列を含む、組換えAAVベクターの使用。

(項目36)

筋ジストロフィーの治療のための、配列番号3のpAAV.MHC7.マイクロジストロフィン構築物のスクレオチド配列を含む、組換えAAVベクターの使用。

(項目37)

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、項目32～36のいずれか1項のいずれか1項に記載の使用。

(項目38)

前記薬剤が筋肉内または静脈内投与のために製剤化される、項目32～37のいずれか1項に記載の使用。

(項目39)

前記薬剤が全身送達のために製剤化される、項目32～37のいずれか1項に記載の使用。

(項目40)

前記薬剤が、注射、注入、または移植による非経口投与のために製剤化される、項目39に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】pAAV.MHC7.マイクロジストロフィン構築物を図示する。この構築物では、cDNA発現カセットにAAV2末端逆位配列(ITS)が隣接している。構築物はインフレームロッド欠失(R4～R23)を特徴とし、ヒンジ1、2、および4(H1、H2、およびH4)ならびにシステインリッチドメインが138kDaタンパク質を產生することを維持する。マイクロジストロフィンタンパク質(3579bp)の発現は、MHC7プロモーター(795bp)によって誘導される。イントロンおよび5'UTRは、プラスミドpCMV(ClonTech)に由来する。マイクロジストロフィンカセットは、ATG開始の直前にコンセンサスのコザックがあり、mRNA終了のための小さな53bpの合成ポリAシグナルを有していた。Harper et al. (Nature Medicine 8, 253-261 (2002))によって以前に記載されたように、ヒトマイクロジストロフィンカセットは、(R4～R23/71～78)ドメインを含んでいた。

【図2】AAVrh74.MHC7構築物の筋肉内送達後のジストロフィンタンパク質の発現を実証する。mdxマウスの前脛骨筋に1×10<sup>11</sup>vg(1群あたりn=5)を注射した。6週間後、筋肉を採取し、ジストロフィン発現についてジストロフィンのN末端抗体ならびにヘマトキシリンおよびエオシン染色で染色した。

【図3A】AAVrh74.MHC7構築物の筋肉内注射後の骨格筋力測定とマイクロジストロフィン発現の定量化を提供する。(A)mdxマウスの前脛骨筋にAAVrh74.MHC7構築物を1×10<sup>11</sup>vg(n=5)で注入した。6週間後、前脛骨筋を採取し、インビボ力測定を行った。投与されたコホートは、未処理のmdx対照よりも顕著に大きな力の発生を示した。

【図3B】AAVrh74.MHC7構築物の筋肉内注射後の骨格筋力測定とマイクロジストロフィン発現の定量化を提供する。(A)mdxマウスの前脛骨筋にAAVrh74.MHC7構築物を1×10<sup>11</sup>vg(n=5)で注入した。6週間後、前脛骨筋を

10

20

30

40

50

採取し、インビボ力測定を行った。投与されたコホートは、未処理の  $m d \times$  対照よりも顕著に大きな力の発生を示した。

【図3 C】AAVrh74.MHCK7構築物の筋肉内注射後の骨格筋力測定とマイクロジストロフィン発現の定量化を提供する。(A)  $m d \times$  マウスの前脛骨筋にAAVrh74.MHCK7構築物を $1 \times 10^{11} \text{ vg}$  ( $n = 5$ )で注入した。6週間後、前脛骨筋を採取し、インビボ力測定を行った。投与されたコホートは、未処理の  $m d \times$  対照よりも顕著に大きな力の発生を示した。

【図4 A】AAVrh.74.MHCK7.micro-dys構築物の全身投与後の骨格、横隔膜、および心筋線維の広範な形質導入を実証する。(A)  $M d \times$  マウスは、12週間の治療後に、6週齢で尾静脈を介して、 $6 \times 10^{12} \text{ vg}$  ( $2 \times 10^{14} \text{ vg} / \text{kg}$ )のAAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィンで全身的に治療された。(B)マイクロジストロフィンの染色は、各組織でマイクロジストロフィンを発現している筋線維の割合の定量化を示している。(C)低および高(臨床的)用量で横隔膜において測定された比力を示す。低用量では顕著な差は見られなかったが、高用量では顕著な改善があった。

【図4 B】AAVrh.74.MHCK7.micro-dys構築物の全身投与後の骨格、横隔膜、および心筋線維の広範な形質導入を実証する。(A)  $M d \times$  マウスは、12週間の治療後に、6週齢で尾静脈を介して、 $6 \times 10^{12} \text{ vg}$  ( $2 \times 10^{14} \text{ vg} / \text{kg}$ )のAAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィンで全身的に治療された。(B)マイクロジストロフィンの染色は、各組織でマイクロジストロフィンを発現している筋線維の割合の定量化を示している。(C)低および高(臨床的)用量で横隔膜において測定された比力を示す。低用量では顕著な差は見られなかったが、高用量では顕著な改善があった。

【図4 C】AAVrh.74.MHCK7.micro-dys構築物の全身投与後の骨格、横隔膜、および心筋線維の広範な形質導入を実証する。(A)  $M d \times$  マウスは、12週間の治療後に、6週齢で尾静脈を介して、 $6 \times 10^{12} \text{ vg}$  ( $2 \times 10^{14} \text{ vg} / \text{kg}$ )のAAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィンで全身的に治療された。(B)マイクロジストロフィンの染色は、各組織でマイクロジストロフィンを発現している筋線維の割合の定量化を示している。(C)低および高(臨床的)用量で横隔膜において測定された比力を示す。低用量では顕著な差は見られなかったが、高用量では顕著な改善があった。

【図5】AAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィン構築物の全身送達後のジストロフィンタンパク質の発現を示している。 $M d \times$  マウス ( $n = 5$ )は、6週齢から開始する尾静脈を介した $6 \times 10^{12} \text{ vg}$ のAAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィンで全身処理された。12週間の治療後、全ての筋肉を採取し、ジストロフィンとDAPC成分(ベータサルコグリカンを示している)の回復について染色した。

【図6 A】AAVrh.74.MHCK7の毒性/安全性を実証する。ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色は、毒性を分析するために次の筋肉組織で行われた:前脛骨筋(TA)、腓腹筋(GAS)、大腿四頭筋(QD)、腰筋(PSO)、上腕三頭筋(TRY)、および横隔膜(DIA)(図6 A)。毒性は認められなかった。有効性の指標として、中心に配置された核(CN)を持つ筋線維の数を定量化した(図6 B)。CNは筋肉の変性と再生のサイクルを示しているため、CNの減少は治療効果を実証する。(図6 C)纖維の総数は処理によって変化しないことを実証する。クレアチンキナーゼの量は(D)に示されており、高用量での改善を示している。独立したt検定を使用して差異を特定し( $p < 0.05$ )、データを平均 $\pm$ SEMとして報告する。

【図6 B】AAVrh.74.MHCK7の毒性/安全性を実証する。ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色は、毒性を分析するために次の筋肉組織で行われた:前脛骨筋(TA)、腓腹筋(GAS)、大腿四頭筋(QD)、腰筋(PSO)、上腕三頭筋(TRY)、および横隔膜(DIA)(図6 A)。毒性は認められなかった。有効性の指標として、中心に配置された核(CN)を持つ筋線維の数を定量化した(図6 B)。CNは筋

10

20

30

40

50

肉の変性と再生のサイクルを示しているため、CNの減少は治療効果を実証する。（図6C）纖維の総数は処理によって変化しないことを実証する。クレアチンキナーゼの量は（D）に示されており、高用量での改善を示している。独立したt検定を使用して差異を特定し（p < 0.05）、データを平均±SEMとして報告する。

【図6C】AAVrh.74.MHCCK7の毒性／安全性を実証する。ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色は、毒性を分析するために次の筋肉組織で行われた：前脛骨筋（TA）、腓腹筋（GAS）、大腿四頭筋（QD）、腰筋（PSO）、上腕三頭筋（TRI）、および横隔膜（DIA）（図6A）。毒性は認められなかった。有効性の指標として、中心に配置された核（CN）を持つ筋線維の数を定量化した（図6B）。CNは筋肉の変性と再生のサイクルを示しているため、CNの減少は治療効果を実証する。（図6C）纖維の総数は処理によって変化しないことを実証する。クレアチンキナーゼの量は（D）に示されており、高用量での改善を示している。独立したt検定を使用して差異を特定し（p < 0.05）、データを平均±SEMとして報告する。

【図6D】AAVrh.74.MHCCK7の毒性／安全性を実証する。ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色は、毒性を分析するために次の筋肉組織で行われた：前脛骨筋（TA）、腓腹筋（GAS）、大腿四頭筋（QD）、腰筋（PSO）、上腕三頭筋（TRI）、および横隔膜（DIA）（図6A）。毒性は認められなかった。有効性の指標として、中心に配置された核（CN）を持つ筋線維の数を定量化した（図6B）。CNは筋肉の変性と再生のサイクルを示しているため、CNの減少は治療効果を実証する。（図6C）纖維の総数は処理によって変化しないことを実証する。クレアチンキナーゼの量は（D）に示されており、高用量での改善を示している。独立したt検定を使用して差異を特定し（p < 0.05）、データを平均±SEMとして報告する。

【図7】pAAV.MCK.マイクロジストロフィンプラスミド構築物を示す。

【図8】rAAVrh74.MCKマイクロジストロフィン（ヒト）効力アッセイの結果を提供する。mdxマウスの前脛骨筋に、 $3 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、または $1 \times 10^{11}$ vg（群当たりn = 3）を注射した。4週間後、筋肉を採取し、N末端のDys3抗体でジストロフィンの発現について染色した。 $3 \times 10^9$ vgでの非常にわずかな発現（効果なしのレベル）と $1 \times 10^{11}$ vgでの89%の発現による、発現と用量の間には線形相関があった。

【図9A】ヒトマイクロジストロフィンは、力の発生と、異常収縮による損傷からの保護を改善することを示している。（A）長指伸筋（EDL）およびTAにおけるジストロフィンタンパク質の免疫染色は、大腿動脈を介したrAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン（ヒト）注射後のmdx筋線維における発現を示している。模擬感染した筋肉は同一の方法で染色され、暴露時間は一致している。（B）rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィンは、模擬処理されたmdx筋肉と比較して、正常化した比力を有意に増加させた（P < 0.05対mdx）。（C）rAAVrh.74-MCK-Micro-dys（ヒト）に感染したmdx筋肉を、遺伝子導入後12週間での反復性の伸張性収縮中の力低下について、模擬感染した反対側のmdx EDL筋肉およびWT（WT C57BL/10）EDL筋肉と比較した。rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン（Micro-dys）処理は、模擬処理されたmdx筋肉と比較して、力の損失に対して有意に保護された（P < 0.001対mdx）。誤差はSEMである。

【図9B】ヒトマイクロジストロフィンは、力の発生と、異常収縮による損傷からの保護を改善することを示している。（A）長指伸筋（EDL）およびTAにおけるジストロフィンタンパク質の免疫染色は、大腿動脈を介したrAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン（ヒト）注射後のmdx筋線維における発現を示している。模擬感染した筋肉は同一の方法で染色され、暴露時間は一致している。（B）rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィンは、模擬処理されたmdx筋肉と比較して、正常化した比力を有意に増加させた（P < 0.05対mdx）。（C）rAAVrh.74-MCK-Micro-dys（ヒト）に感染したmdx筋肉を、遺伝子導入後12週間での反復性

10

20

30

40

50

の伸張性収縮中の力低下について、模擬感染した反対側の m d x E D L 筋肉および W T ( W T C 5 7 B 1 / 1 0 ) E D L 筋肉と比較した。 r A A V r h . 7 4 - M C K - マイクロジストロフィン ( M i c r o - d y s ) 処理は、模擬処理された m d x 筋肉と比較して、力の損失に対して有意に保護された ( P < 0 . 0 0 1 対 m d x ) 。誤差は S E M である。

【図 9 C】ヒトマイクロジストロフィンは、力の発生と、異常収縮による損傷からの保護を改善することを示している。( A ) 長指伸筋 ( E D L ) および T A におけるジストロフィンタンパク質の免疫染色は、大腿動脈を介した r A A V r h . 7 4 - M C K - マイクロジストロフィン ( ヒト ) 注射後の m d x 筋線維における発現を示している。模擬感染した筋肉は同一の方法で染色され、暴露時間は一致している。( B ) r A A V r h . 7 4 - M C K - マイクロジストロフィンは、模擬処理された m d x 筋肉と比較して、正常化した比力を有意に増加させた ( P < 0 . 0 5 対 m d x ) 。( C ) r A A V r h . 7 4 - M C K - M i c r o - d y s ( ヒト ) に感染した m d x 筋肉を、遺伝子導入後 1 2 週間での反復性的伸張性収縮中の力低下について、模擬感染した反対側の m d x E D L 筋肉および W T ( W T C 5 7 B 1 / 1 0 ) E D L 筋肉と比較した。 r A A V r h . 7 4 - M C K - マイクロジストロフィン ( M i c r o - d y s ) 処理は、模擬処理された m d x 筋肉と比較して、力の損失に対して有意に保護された ( P < 0 . 0 0 1 対 m d x ) 。誤差は S E M である。

【図 1 0 - 1】核酸配列 ( 配列番号 3 、 r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン ) を提示する。

【図 1 0 - 2】核酸配列 ( 配列番号 3 、 r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン ) を提示する。

【図 1 0 - 3】核酸配列 ( 配列番号 3 、 r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン ) を提示する。

【図 1 0 - 4】核酸配列 ( 配列番号 3 、 r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン ) を提示する。

【図 1 1 - 1】核酸配列 ( 配列番号 5 ) r A A V r h 7 4 . M C K . マイクロジストロフィンを提示する。

【図 1 1 - 2】核酸配列 ( 配列番号 5 ) r A A V r h 7 4 . M C K . マイクロジストロフィンを提示する。

【図 1 1 - 3】核酸配列 ( 配列番号 5 ) r A A V r h 7 4 . M C K . マイクロジストロフィンを提示する。

【図 1 1 - 4】核酸配列 ( 配列番号 5 ) r A A V r h 7 4 . M C K . マイクロジストロフィンを提示する。

【図 1 2 A】は、非ヒト靈長類への A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンの全身送達に対する免疫応答を提示する。( A ) A A V カプシドおよびマイクロジストロフィンペプチドプールに対する E L I S p o t 応答。 C o n A は陽性対照であり、 D M S O は陰性対照である。 A A V r h 7 4 には 3 つのプールがあり、マイクロジストロフィンに特異的な 4 つのペプチドプールがあった。( B ) ベクターカプシドに対する循環中和抗体の E L I S A 陽性力価。靈長類から隔週に血清を分離し、抗体価を分析した。報告された力価は、応答の比が 2 以上である最後の希釈に対応する。

【図 1 2 B】は、非ヒト靈長類への A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンの全身送達に対する免疫応答を提示する。( A ) A A V カプシドおよびマイクロジストロフィンペプチドプールに対する E L I S p o t 応答。 C o n A は陽性対照であり、 D M S O は陰性対照である。 A A V r h 7 4 には 3 つのプールがあり、マイクロジストロフィンに特異的な 4 つのペプチドプールがあった。( B ) ベクターカプシドに対する循環中和抗体の E L I S A 陽性力価。靈長類から隔週に血清を分離し、抗体価を分析した。報告された力価は、応答の比が 2 以上である最後の希釈に対応する。

【図 1 3 A】 r h e s u s m a c a q u e における A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンの全身送達を実証する。左側の筋肉の抗 F L A G 免疫蛍光染色は、堅

10

20

30

40

50

牢なマイクロジストロフィンの発現を実証した。

【図13B】*rhesus macaque*におけるAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンの全身送達を実証する。左側の筋肉の抗FLAG免疫蛍光染色は、堅牢なマイクロジストロフィンの発現を実証した。

【図14】rAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンによる全身治療の導入遺伝子発現に対する効果を実証する。心臓、横隔膜、腰筋、および前脛骨筋(TA)における、N末端ジストロフィン抗体を使用したマイクロジストロフィンの免疫蛍光染色は、中用量(6e12vg; 2e14vg/kg)および高用量(1.2e13vg; 6e14vg/kg)で処理した注射後3ヶ月の動物における堅牢な発現を実証する。20倍の画像が示される。

【図15】rAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンによる全身治療の導入遺伝子発現に対する効果を実証する。腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋、および殿筋における、N末端ジストロフィン抗体を使用したマイクロジストロフィンの免疫蛍光染色は、中用量(6e12vg; 2e14vg/kg)および最高用量(1.2e13vg; 6e14vg/kg)で処理した注射後3ヶ月の動物における堅牢な発現を実証する。20倍の画像が示される。

【図16】rAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンによる全身治療の筋肉病変に対する効果を実証する。(A) C57BL/6 WT、mdx、およびrAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィン処理マウス(中用量2e14vg/kg; 高用量-6e14vg/kg)の横隔膜、前脛骨筋、腓腹筋、および大腿四頭筋のH&E染色、(B)平均纖維サイズの定量化により、全ての組織にわたる纖維サイズの正常化が実証された。\*\*\*\*p<0.001、一元配置分散分析；データは平均±SEMとして報告される。20倍の画像が示される。

【図17】rAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンによる全身治療の筋肉病変に対する効果を実証する。(A) C57BL/6 WT、mdx、およびrAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィン処理マウス(中用量2e14vg/kg; 高用量-6e14vg/kg)の上腕三頭筋、殿筋、および腰筋のH&E染色、(B)平均纖維サイズの定量化により、用量依存的により大きな纖維が実証された。\*\*\*\*p<0.001、一元配置分散分析；データは平均±SEMとして報告される。20倍の画像が示される。

【図18】中心核形成に対するrAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンによる全身処理の効果を実証する。用量漸増は、全ての骨格筋および横隔膜の中心核形成の減少を示している。二元配置分散分析を使用して、差異を特定した(p<0.05)。データは平均±SEMで報告される。

【図19】コラーゲン沈着に対するrAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンによる全身処理の効果を実証する。用量漸増は、横隔膜のコラーゲン蓄積(%)の減少を示している。\*p<0.05、一元配置分散分析；データは平均±SEMとして報告される。20倍の画像が示される。

【図20】横隔膜の力欠損の矯正を示す。3か月または6か月の処理後、横隔膜筋片を採取して比力を測定した(断面積に対して標準化)。処理は力をWTレベルに回復させた。

\*p<0.05。一元配置分散分析を使用して、mdx-LRマウスとの差異を特定した。

【図21】TAの力欠損の矯正を示す。(A)3~6ヶ月の処理後、比力(TA重量に対して標準化)を測定するためにTA筋肉を採取した(左右両方)。処理は力をWTレベルに回復させた。(B)伸張性収縮の厳密なプロトコールの後、処理はTA筋肉を疲労から救済した。\*p<0.05。一元配置分散分析を使用して、mdx-LRマウスとの差異を特定した。

【図22】rAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンのIV送達後の3匹のmdxマウスからの様々な組織の平均vgコピーの分布を提示する。

【図23】ssAAVrh74・MHC K7・マイクロジストロフィンを全身注射したマウスの血清化学および年齢が一致した対照群の血清化学は、分析された全ての化学物質の

正常値を示す、独立したC R O ( Charles River Laboratories ) によって分析された。異常な値は、処理で正常化されたM D Xビヒクリ処理動物 [ M D X - L R ( 乳酸リングル液 ) ] で認められたA S T およびA L T の上昇のみであった。A S T とA L T はD M D で上昇することが知られている。A L T = アラニンアミノ基転移酵素、A L P / K = アルカリホスファターゼ、A S T = アスパラギン酸アミノ基転移酵素、B U N = 血中尿素窒素、B / C = 血液 / クレアチニン比、C R E A T = クレアチニン、G L U = グルコース、T P = 総タンパク質、T B I L = 総ビリルビン、D B I L = 直接ビリルビン

【図24】r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンを全身注射したm d xマウスの筋肉および臓器の生体内分布ウェスタンプロットを提示する。

10

【図25】p N L R E P 2 - C a p r h 7 4 A A Vヘルパープラスミドマップを提示する。

【図26】A d H e l p e r プラスミドp H E L P を提示する。

【発明を実施するための形態】

【0059】

本発明は、ヒトマイクロジストロフィンを過剰発現する遺伝子用治療ベクター、例えばr A A Vベクター、ならびに筋ジストロフィー患者の線維症を軽減および予防する方法を提供する。D M D の診断の最も早い年齢で採取された筋生検は、顕著な結合組織の増殖を明らかにする。筋線維症は複数の点で有害である。それは、結合組織閑門を介した筋内膜の栄養素の通常の通過を減らし、血流を減らし、筋肉から血管由来の栄養成分を奪い、四肢拘縮による歩行の早期喪失の機能的な一因となる。経時的に、筋肉の顕著な線維化の結果として、治療の課題が増加する。これは、連続した時点での結合組織の増殖を比較する筋生検で観察できる。このプロセスは悪化を続け、特に車椅子依存の患者では、歩行の喪失をもたらし、制御不能を加速する。

20

【0060】

線維症を軽減するための並行アプローチを含む早期治療なしでは、エクソンスキッピング、ストップコドンリードスルー、または遺伝子置換療法の利点が完全に達成される可能性は低いであろう。低分子またはタンパク質置換戦略でさえ、筋線維症を軽減するアプローチなしでは失敗する可能性がある。A A V . マイクロジストロフィンで治療した既存の線維症を有する高齢m d xマウスでの以前の研究では、完全な機能回復を達成できないことが示された ( L i u , M . , e t a l . , M o l T h e r 1 1 , 2 4 5 - 2 5 6 ( 2 0 0 5 ) )。D M D 心筋症の進行は、心室壁の瘢痕化と線維化を伴うことも知られている。

30

【0061】

本明細書で使用される場合、「A A V」という用語は、アデノ随伴ウイルスの一般的な略語である。アデノ随伴ウイルスは、ある特定の機能が同時感染ヘルパーウイルスによって提供される細胞内でのみ成長する一本鎖D N A パルボウイルスである。現在、特性評価されているA A Vの血清型は13個存在する。A A Vの一般的な情報および概説は、例えば、C a r t e r , 1 9 8 9 , H a n d b o o k o f P a r v o v i r u s e s , V o l . 1 , p p . 1 6 9 - 2 2 8 、およびB e r n s , 1 9 9 0 , V i r o l o g y , p p . 1 7 4 3 - 1 7 6 4 , R a v e n P r e s s , ( N e w Y o r k ) に見出すことができる。しかしながら、様々な血清型が遺伝子レベルでさえも構造的および機能的の両方で非常に密接に関連していることがよく知られているため、これらの同じ原理が追加のA A V血清型に適用可能であることが十分に予想される。( 例えば、B l a c k l o w e , 1 9 8 8 , p p . 1 6 5 - 1 7 4 o f P a r v o v i r u s e s a n d H u m a n D i s e a s e , J . R . P a t t i s o n , e d . 、およびR o s e , C o m p r e h e n s i v e V i r o l o g y 3 : 1 - 6 1 ( 1 9 7 4 ) を参照されたい )。例えば、全てのA A V血清型は、相同r e p 遺伝子によって媒介される非常に類似した複製特性を明らかに呈し、これらは全て、A A V 2 で発現されたもの等の3つの関連カプシドタンパク質を有する。関連性の程度は、ゲノムの長さに沿った遺伝子型間の広範な交差ハイブリ

40

50

ダイゼーション、および「逆方向末端反復配列」( I T R )に対応する末端における類似の自己アニーリングセグメントの存在を明らかにするヘテロ二本鎖分析によってさらに示唆される。類似の感染性パターンは、各血清型における複製機能が類似の調節制御下にあることも示唆する。

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される「 A A V ベクター」とは、 A A V 末端反復配列 ( I T R ) に隣接している 1 つ以上の目的とするポリヌクレオチド ( またはトランス遺伝子 ) を指す。かかる A A V ベクターは、 r e p および c a p 遺伝子産物をコードおよび発現するベクターでトランスフェクトされた宿主細胞中に存在する場合に、感染ウイルス粒子に複製およびパッケージングされ得る。

10

#### 【 0 0 6 3 】

「 A A V ビリオン 」 または 「 A A V ウイルス粒子 」 または 「 A A V ベクター粒子 」 とは、少なくとも 1 つの A A V カプシドタンパク質およびカプシドに包まれたポリヌクレオチド A A V ベクターから成るウイルス粒子を指す。粒子が異種ポリヌクレオチド ( すなわち、哺乳類細胞に送達されるトランス遺伝子等の野生型 A A V ゲノム以外のポリヌクレオチド ) を含む場合、それは、典型的には、「 A A V ベクター粒子 」 または単に「 A A V ベクター 」 と称される。したがって、かかるベクターが A A V ベクター粒子内に含有されるため、 A A V ベクター粒子の產生には、必然的に A A V ベクターの產生が含まれる。

#### 【 0 0 6 4 】

A A V

20

本発明の組換え A A V ゲノムは、本発明の核酸分子および核酸分子に隣接する 1 つ以上の A A V I T R を含む。 r A A V ゲノムの A A V D N A は、 A A V 血清型 A A V r h . 7 4 、 A A V - 1 、 A A V - 2 、 A A V - 3 、 A A V - 4 、 A A V - 5 、 A A V - 6 、 A A V - 7 、 A A V - 8 、 A A V - 9 、 A A V - 1 0 、 A A V - 1 1 、 A A V - 1 2 、および A A V - 1 3 を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスを誘導できる任意の A A V 血清型に由来し得る。偽型 r A A V の產生は、例えば W O 0 1 / 8 3 6 9 2 に開示されている。他のタイプの r A A V 变異体、例えば、カプシド変異を有する r A A V も企図される。例えば、 Marsic et al . , Molecular Therapy , 2 2 ( 1 1 ) : 1 9 0 0 - 1 9 0 9 ( 2 0 1 4 ) を参照されたい。上述の背景技術のセクションに記載されるように、様々な A A V 血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野において公知である。骨格筋特異的発現を促進するために、 A A V 1 、 A A V 6 、 A A V 8 または A A V r h . 7 4 を使用することができる。

30

#### 【 0 0 6 5 】

本発明の D N A プラスミドは、本発明の r A A V ゲノムを含む。 D N A プラスミドは、感染性ウイルス粒子中に r A A V ゲノムを組み立てるために、 A A V のヘルパーウイルス ( 例えば、アデノウイルス、 E 1 欠損アデノウイルス、またはヘルペスウイルス ) による感染を許容できる細胞に導入される。パッケージングされるべき A A V ゲノム、 r e p および c a p 遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される、 r A A V 粒子を產生する技術は、当該技術分野において標準的である。 r A A V の產生は、以下の成分、 r A A V ゲノム、 r A A V ゲノムから分離した ( すなわち、その中に存在しない ) A A V r e p および c a p 遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が、単一細胞 ( 本明細書でパッケージング細胞と表される ) 内に存在することを必要とする。 A A V の r e p および c a p 遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意の A A V 血清型に由来してもよく、 r A A V ゲノム I T R とは異なる A A V 血清型、例えば、 A A V - 1 、 A A V - 2 、 A A V - 3 、 A A V - 4 、 A A V - 5 、 A A V - 6 、 A A V - 7 、 A A V r h . 7 4 、 A A V - 8 、 A A V - 9 、 A A V - 1 0 、 A A V - 1 1 、 A A V - 1 2 、および A A V - 1 3 を含むがこれらに限定されない血清型に由来してもよい。偽型 r A A V の生成は、例えば、 W O 0 1 / 8 3 6 9 2 に開示され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

#### 【 0 0 6 6 】

パッケージング細胞を生成する方法は、 A A V 粒子の產生に必要な全ての成分を安定し

50

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

#### 【0067】

rAAV 产生の一般的原理は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539、および Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158: 97-129 に概説されている。様々なアプローチは、Ratschinski et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984)、Hermanonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6466 (1984)、Tratschinski et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985)、McLaughlin et al., J. Virol., 62: 1963 (1988)、および Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 7: 349 (1988)、Samulski et al., J. Virol., 63: 3822-3828 (1989)、米国特許第 5,173,414 号、WO 95/13365、ならびに対応する米国特許第 5,658,776 号、WO 95/13392、WO 96/17947、PCT/US98/18600、WO 97/09441 (PCT/US96/14423)、WO 97/08298 (PCT/US96/13872)、WO 97/21825 (PCT/US96/20777)、WO 97/06243 (PCT/FR96/01064)、WO 99/11764、Perrin et al. Vaccine 13: 1244-1250 (1995)、Paul et al. Human Gene Therapy 4: 609-615 (1993)、Clark et al. Gene Therapy 3: 1124-1132 (1996)、米国特許第 5,786,211 号、米国特許第 5,871,982 号、および米国特許第 6,258,595 号に記載されている。前述の文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、rAAV 产生に関する文書の部分を特に強調する。

#### 【0068】

したがって、本発明は、感染性 rAAV を产生するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、HeLa 細胞、293 細胞、および PER C. 6 細胞（同種 293 株）などの安定して形質転換された癌細胞であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換された癌細胞ではない細胞、例えば、低継代 293 細胞（アデノウイルスの E1 で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、MRC-5 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、WI-38 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Vero 細胞（サル腎細胞）、および FRHL-2 細胞（アカゲザル胎児肺細胞）である。

#### 【0069】

本発明の組換え AAV（すなわち、感染性カプシド化 rAAV 粒子）は、rAAV ゲノムを含む。例示的な実施形態では、rAAV のゲノムは、AAV の rep と cap の両方の DNA を欠いており、すなわち、rAAV のゲノムの ITR 間に AAV の rep または cap の DNA が存在しない。本発明の核酸分子を含むように構築され得る rAAV の例

は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 2 / 0 4 7 9 9 9 号 ( W O 2 0 1 3 / 0 1 6 3 5 2 ) に記載されている。

#### 【 0 0 7 0 】

例示的な実施形態では、本発明 ( i n v e i t o n ) の組換え A A V ベクターは、 A A V ベクタープラスミド p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィン、 p N L R e p 2 - C a p r h 7 4 、および p H e l p を使用する三重トランスフェクション法 ( X i a o e t a l . , J V i r o l 7 2 , 2 2 2 4 - 2 2 3 2 ( 1 9 9 8 ) ) によって產生され、 p A A V には、 A A V 2 末端逆位配列 ( I T R ) が隣接するマイクロジストロフィン遺伝子発現力セットが含まれている。 A A V r h 7 4 ピリオンにカプシド化されるのはこの配列である。プラスミドには、マイクロジストロフィン配列と、遺伝子発現を駆動する M H C K 7 エンハンサーおよび筋肉特異的プロモーターのコアプロモーターエレメントが含まれている。発現力セットには、高レベルの遺伝子発現を促進する S V 4 0 イントロン ( S D / S A ) も含まれており、効率的な転写終結のためにウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルが使用される。

#### 【 0 0 7 1 】

p N L R E P 2 - C a p r h 7 4 は、血清型 r h 7 4 由來の 4 つの野生型 A A V 2 r e p タンパク質と 3 つの野生型 A A V V P カプシドタンパク質をコードする A A V ヘルパープラスミドである。 p N L R E P 2 - C a p r h 7 4 プラスミドの概略図は、エラー ! 参照元が見つかりません。 2 5 に示される。

#### 【 0 0 7 2 】

p H E L P アデノウイルスヘルパープラスミドは 1 1 , 6 3 5 b p で、 A p p l i e d V i r o m i c s から入手した。このプラスミドには、 A A V 複製に重要なアデノウイルスゲノムの領域、すなわち E 2 A 、 E 4 O R F 6 、および V A R N A が含まれている ( アデノウイルス E 1 機能は 2 9 3 細胞によって提供される ) 。このプラスミドに存在するアデノウイルス配列は、アデノウイルスゲノムの約 4 0 % に過ぎず、アデノウイルスの末端反復配列などの複製に重要なシスエレメントを含んでいない。したがって、このような生産システムから感染性アデノウイルスが生成されることは予想されない。 p H E L P プラスミドの概略図を図 2 6 に示す。

#### 【 0 0 7 3 】

r A A V は、当該技術分野で標準の方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によって精製され得る。ヘルパーウイルスから r A A V ベクターを精製するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、 C l a r k e t a l . , H u m . G e n e T h e r . , 1 0 ( 6 ) : 1 0 3 1 - 1 0 3 9 ( 1 9 9 9 ) 、 S c h e n p p a n d C l a r k , M e t h o d s M o l . M e d . , 6 9 4 2 7 - 4 4 3 ( 2 0 0 2 ) 、米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 8 号、および W O 9 8 / 0 9 6 5 7 に開示される方法を含む。

#### 【 0 0 7 4 】

別の実施形態では、本発明は、本発明の r A A V を含む組成物を企図する。本発明の組成物は、 r A A V および薬学的に許容される担体を含む。組成物はまた、希釈剤およびアジュバントなどの他の成分を含んでもよい。許容される担体、希釈剤、およびアジュバントは、受容者に対して無毒であり、好ましくは、採用される用量および濃度で不活性であり、緩衝液およびブルロニックなどの界面活性剤を含む。

#### 【 0 0 7 5 】

本発明の方法で投与される r A A V の力価は、例えば、特定の r A A V 、投与方法、治療目標、個体、および標的とされる細胞型 ( 複数可 ) に応じて変動し、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。 r A A V の力価は、 m l あたり、約  $1 \times 1 0 ^ 6$  、約  $1 \times 1 0 ^ 7$  、約  $1 \times 1 0 ^ 8$  、約  $1 \times 1 0 ^ 9$  、約  $1 \times 1 0 ^ {1 0}$  、約  $1 \times 1 0 ^ {1 1}$  、約  $1 \times 1 0 ^ {1 2}$  、約  $1 \times 1 0 ^ {1 3}$  、約  $1 \times 1 0 ^ {1 4}$  から、またはそれ以上の D N a s e 耐性粒子 ( D R P ) の範囲であってもよい。投薬量は、ウイルスゲノム ( v g ) の単位で表されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0076】

インビポまたはインビトロで、標的細胞にrAAVを形質導入する方法が、本発明によって企図される。インビポ方法は、本発明のrAAVを含む組成物の有効用量または有効な複数用量を、それを必要とする動物（ヒトを含む）に投与するステップを含む。用量が、障害／疾患の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が、障害／疾患の発症後に投与される場合、投与は治療的である。本発明の実施形態では、有効用量は、治療すべき障害／疾患の状態に関連する少なくとも1つの症状を緩和（排除もしくは軽減）する用量であり、障害／疾患の状態への進行を緩徐化もしくは予防する用量であり、疾患の範囲を縮小する用量であり、疾患の寛解（部分的もしくは完全な）をもたらす用量であり、ならびに／または生存を延長させる用量である。本発明の方法による予防または治療が企図される疾患の例はDMDDである。

10

## 【0077】

併用療法も本発明により企図される。本明細書で使用されるとき、組み合わせは、同時治療と逐次の治療の両方を含む。本発明の方法と標準的な医学的治療（例えば、コルチコステロイド）との組み合わせは、新規治療との組み合わせと同様に特に企図されている。

## 【0078】

組成物の有効用量の投与は、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、鼻、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、または膣を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で標準的な経路によるもので得る。本発明のrAAVのAAV成分（特に、AAV-ITRおよびカプシドタンパク質）の投与経路（複数可）および血清型（複数可）は、感染および／または治療される疾患状態ならびにマイクロジストロフィンタンパク質を発現する標的細胞／組織（複数可）を考慮して当業者により選択および／または適合され得る。

20

## 【0079】

本発明は、本発明のrAAVおよび組成物の有効用量の局所投与および全身投与を提供する。例えば、全身投与とは、全身が影響を受けるように循環系に投与することである。全身投与には、消化管を介した吸収などの経腸投与、および注射、注入、または移植による非経口投与が含まれる。

## 【0080】

特に、本発明のrAAVの実際の投与は、rAAV組換えベクターを動物の標的組織に輸送する任意の物理的方法を使用することにより達成され得る。本発明による投与には、筋肉への注射および血流への注射が含まれるが、これらに限定されない。単にリン酸緩衝生理食塩水にrAAVを再懸濁することは、筋肉組織での発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、担体またはrAAVと共に投与できる他の成分に既知の制限はない（DNAを分解する組成物は、rAAVを伴う通常の方法では回避すべきである）。rAAVのカプシドタンパク質は、rAAVが筋肉などの目的の特定の標的組織を標的とするように修飾されてもよい。例えば、その開示が参考により本明細書に組み込まれるWO02/053703を参照されたい。医薬組成物は、注射可能な製剤として、または経皮輸送により筋肉に送達される局所製剤として調製することができる。筋肉内注射と経皮輸送の両方のための多数の製剤がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用することができる。rAAVは、投与および取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用できる。

30

## 【0081】

本明細書に開示される方法で投与されるrAAVの用量は、例えば、特定のrAAV、投与方法、治療目標、個体、および標的とされる細胞型（複数可）に応じて変動し、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。投与される各々のrAAVの力価は、m1あたり、約 $1 \times 10^6$ 、約 $1 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^8$ 、約 $1 \times 10^9$ 、約 $1 \times 10^{10}$ 、約 $1 \times 10^{11}$ 、約 $1 \times 10^{12}$ 、約 $1 \times 10^{13}$ 、約 $1 \times 10^{14}$ から、または約 $1 \times 10^{15}$ まで、またはそれ以上のDNase耐性粒子（DRP）の範囲であってもよい。投薬量は、ウイルスゲノム（vg）の単位で表されてもよい（すなわち、それぞれ、 $1 \times 10^7$ vg、 $1 \times 10^8$ vg、 $1 \times 10^9$ vg、 $1 \times 10^{10}$ vg、 $1 \times 10^{11}$ vg、

40

50

$1 \times 10^{12} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{15} \text{ v g}$ ）。投薬量は、体重1キログラム(kg)あたりのウイルスゲノム(vg)の単位で表されてもよい(すなわち、それぞれ、 $1 \times 10^{10} \text{ vg/kg}$ 、 $1 \times 10^{11} \text{ vg/kg}$ 、 $1 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、 $1 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、 $1 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、 $1 \times 10^{15} \text{ vg/kg}$ )。AAVを滴定する方法は、Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039(1999)に記載されている。

#### 【0082】

特に、本発明のrAAVの実際の投与は、rAAV組換えベクターを動物の標的組織に輸送する任意の物理的方法を使用することにより達成され得る。本発明による投与には、筋肉への注射および血流への注射が含まれるが、これらに限定されない。単にリン酸緩衝生理食塩水にrAAVを再懸濁することは、筋肉組織での発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、担体またはrAAVと共に投与できる他の成分に既知の制限はない(DNAを分解する組成物は、rAAVを伴う通常の方法では回避すべきである)。rAAVのカプシドタンパク質は、rAAVが筋肉などの目的の特定の標的組織を標的とするように修飾されてもよい。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれるWO02/053703を参照されたい。医薬組成物は、注射可能な製剤として、または経皮輸送により筋肉に送達される局所製剤として調製することができる。筋肉内注射と経皮輸送の両方のための多数の製剤がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用することができる。rAAVは、投与および取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用できる。

#### 【0083】

筋肉内注射の目的のために、ゴマ油または落花生油などのアジュバントの溶液、または水性プロピレングリコールの溶液、ならびに滅菌水溶液を使用することができる。そのような水溶液は、必要に応じて緩衝化することができ、液体希釈剤は最初に生理食塩水またはグルコースで等張にされる。遊離酸(DNAは酸性リン酸基を含む)または薬理学的に許容される塩としてのrAAVの溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水で調製できる。rAAVの分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびに油中で調製できる。通常の保存および使用条件下においては、これらの製剤は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。これに関連して、使用される滅菌水性媒体はすべて、当業者に周知の標準的な技術により容易に入手可能である。

#### 【0084】

注射用途に適した薬学的な担体、希釈剤、または賦形剤には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、形態は滅菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度に流動性でなければならない。製造および保管の条件下で安定していなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散剤の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期の吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらすことができる。

#### 【0085】

滅菌されている注射可能な溶液は、必要な量のrAAVを適切な溶媒に、必要に応じて上記に列挙した他のさまざまな成分とともに組み込み、その後濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散剤は滅菌した活性成分を、基礎的な分散媒および上に列挙さ

10

20

30

40

50

れるものからの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルへと混合することによって調製される。滅菌されている注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、それは、活性成分プラス予め滅菌濾過したそれらの溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす。

【 0 0 8 6 】

r A A V による形質導入は、インビトロで行うこともできる。一実施形態では、所望の標的筋肉細胞を対象から取り出し、r A A V で形質導入し、対象に再導入する。代替的に、同系または異種の筋肉細胞は、それらの細胞が対象において不適切な免疫応答を生成しない場合に使用できる。

【 0 0 8 7 】

対象への形質導入および形質導入細胞の再導入のための適切な方法は、当該技術分野で公知である。一実施形態では、細胞は、例えば適切な培地で r A A V を筋肉細胞と組み合わせ、サザンプロットおよび / または P C R などの従来の技術を使用して、または選択可能なマーカーを使用して目的の D N A を持つ細胞をスクリーニングすることにより、インビトロで形質導入することができる。次いで、形質導入された細胞を医薬組成物に製剤化し、組成物を、筋肉内、静脈内、皮下、および腹腔内注射による、または例えばカテーテルを使用した平滑筋および心筋への注射によるなど、様々な技術により対象に導入することができる。

【 0 0 8 8 】

本発明の r A A V による細胞の形質導入は、マイクロジストロフィンタンパク質の持続的発現をもたらす。したがって、本発明は、マイクロジストロフィンタンパク質を発現する r A A V を動物、好ましくはヒトに投与 / 送達する方法を提供する。これらの方法は、本発明の 1 つ以上の r A A V を組織（筋肉などの組織、肝臓や脳などの臓器、唾液腺などの腺を含むが、これらに限定されない）に形質導入することを含む。組織特異的制御エレメントを含む遺伝子カセットを用いて形質導入を実施してもよい。例えば、本発明の一実施形態は、my o D 遺伝子ファミリー (Weintraub et al., Science, 251: 761 - 766 (1991) を参照されたい) などのアクチンおよびミオシン遺伝子ファミリーに由来するもの、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 M E F - 2 (C serjesi and Olson, Mol Cell Biol 11: 4854 - 4862 (1991) ) 、ヒト骨格アクチン遺伝子 (Muscat et al., Mol Cell Biol, 7: 4089 - 4099 (1987) ) 、心臓アクチン遺伝子、筋肉クレアチニーゼ配列エレメント (Johnson et al., Mol Cell Biol, 9: 3393 - 3399 (1989) を参照されたい) 、およびマウスクレアチニーゼエンハンサー (m C K ) エレメントに由来する制御エレメント、速筋骨格筋トロポニン C 遺伝子、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子エレメント、および遅筋トロポニン I 遺伝子、低酸素誘導性核内因子 (Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680 - 5684 (1991) ) に由来する制御エレメント、グルココルチコイド応答エレメント (G R E) (Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603 - 5607 (1993) を参照されたい) を含むステロイド誘導性エレメントおよびプロモーター、ならびにその他の制御エレメントを含むが、これらに限定されない筋肉特異的制御エレメントによって誘導される筋肉細胞および筋肉組織を形質導入する方法を提供する。

【 0 0 8 9 】

筋肉組織は生命維持に必須な臓器ではなく、アクセスしやすいため、インビオ D N A 送達の魅力的な標的である。本発明は、形質導入された筋線維からのマイクロジストロフィンの持続的発現を企図する。

【 0 0 9 0 】

「筋肉細胞」または「筋肉組織」とは、あらゆる種類の筋肉（例えば、消化管、膀胱、血管、または心臓組織に由来する骨格筋および平滑筋）に由来する細胞または細胞群を意味する。そのような筋肉細胞は、筋芽細胞、筋細胞、筋管、心筋細胞、および心筋芽細胞

10

20

30

40

50

など、分化または未分化であり得る。

【0091】

「形質導入」という用語は、レシピエント細胞によるマイクロジストロフィンの発現をもたらす、本発明の複製欠損 rAAVを介した、インビボまたはインビトロのいずれかでの、レシピエント細胞へのマイクロジストロフィンのコード領域の投与 / 送達を指すように使用される。

【0092】

したがって、本発明は、マイクロジストロフィンをコードする rAAV の有効用量（または、本質的に同時に投与される用量もしくは間隔を置いて投与される用量）を、それを必要とする患者に投与する方法を提供する。

10

【実施例】

【0093】

実施例 1

pAAV.MHCK7.マイクロジストロフィン構築物の生成

pAAV.MHCK7.マイクロジストロフィンプラスミドには、AAV2末端逆位配列 (ITR) が隣接するヒトマイクロジストロフィン cDNA 発現カセットが含まれている（図1を参照されたい）。マイクロジストロフィン構築物は、インフレームロッド欠失 (R4 ~ R23) を特徴とし、ヒンジ1、2、および4、ならびにシステインリッチドメインが138kDaタンパク質を産生することを維持する。マイクロジストロフィンタンパク質 (3579bp) の発現は、MHCK7プロモーター (795bp) によって誘導された。pAAV.MCK.マイクロジストロフィンプラスミドからMCKプロモーターを除去し、MHCK7プロモーターを挿入することにより、プラスミドを構築した。コアプロモーターの後、53bpの内因性マウスマCKエクソン1（非翻訳）が効率的な転写開始のために存在し、その後にSV40後期16S/19Sスプライスシグナル (97bp) および小さな5'UTR (61bp) が続く。イントロンおよび5'UTRは、プラスミドpCMV (Clontech) に由来する。マイクロジストロフィンカセットは、ATG開始の直前にコンセンサスのコザックがあり、mRNA終了のための小さな53bpの合成ポリAシグナルを有していた。Harper et al. (Nature Medicine 8, 253-261 (2002)) によって以前に記載されたように、ヒトマイクロジストロフィンカセットは、(R4 ~ R23 / 71 ~ 78) ドメインを含んでいた。相補的DNAは、ヒトでの使用のためにコドン最適化され、GenScript (Piscataway, NJ) によって合成された (Mol Ther 18, 109-117 (2010))。このベクターに含まれる唯一のウイルス配列は、ウイルスDNAの複製とパッケージングの両方に必要なAAV2の末端逆位配列であった。マイクロジストロフィンカセットは、mRNA終結のための小さな53bpの合成ポリAシグナルを有する。

20

【0094】

以前の研究では、MHCK7プロモーター (Salva et al. Mol Ther 15, 320-329 (2007)) を使用する心臓での発現が立証され、AAVrh74が骨格筋、横隔膜、および心筋での発現を達成した (Søndergaard et al. Annals of clinical and translational Neurology 2, 256-270 (2015))。図1の構築物の配列は、AAVrh.74ビリオンにカプシド化された。AAVrh.74血清型の分子クローニングはrhesus macaqueのリンパ節からクローニングされ、Rodino-Klapac et al. Journal of Translational medicine 5, 45 (2007) に記載されている。

30

表1は、プラスミドpAAV.MHCK7.マイクロジストロフィン（配列番号3）の分子の特徴を示す。

40

50

## 【表1】

表1. プラスミドpAAV. MHCK7. マイクロジストロフィンの分子の特徴				
タイプ	開始	終了	名称	説明
領域	7	116	5' ITR	野生型AAV 2末端逆位配列
領域	236	1036	MHCK7	マウスミオシン重鎖複合体-Eボックス筋肉 クレアチンキナーゼ融合エンハンサー/プロ モーター
領域	1046	1195	キメライント ロン	ヒト $\beta$ -グロビン遺伝子の5'供与部位と1 g G重鎖可変領域の分岐点および3'スプラ イス受容部位
遺伝子	1206	4786	h u D y s c DNA	ヒトマイクロジストロフィンcDNA
領域	4787	4842	ポリA	合成ポリA
領域	4933	5042	3' ITR	野生型AAV 2末端逆位配列
遺伝子	6808	7668	AmpR	$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子
領域	7823	8442	オリ	プラスミド複製起点

10

20

30

## 【0095】

## 実施例2

## rAAV. MHCK7. マイクロジストロフィンを使用した筋肉内発現研究

発現研究は、筋肉内注射により、ヒトマイクロジストロフィン構築物 (rAAV r h 7 4. MHCK7. マイクロジストロフィン；実施例1に記載) で実施された。md x マウス (ジストロフィンを発現しない自発的なDmdm<sup>d</sup> x 変異体マウス) の前脛骨筋に 1 x 1 0<sup>11</sup> v g のカセット (群あたり n = 5) を注射した。6週間後、筋肉を採取し、ジストロフィン発現についてジストロフィンのN末端抗体で (Dys3) ならびにヘマトキシリ

30

ンおよびエオシン (HE) 染色で染色した。図2は、未処理の筋肉と比較して 1 x 1 0<sup>11</sup> v g の用量での拡散した遺伝子発現と中心に配置された核の減少を示す。さらに、平均繊維/フレームの増加に伴う中心核形成の減少が、マイクロジストロフィン構築物での処理後に観察された。rAAV r h 7 4. MHCK7. マイクロジストロフィン構築物の発現

レベルは約 73 % と定量化された。

## 【0096】

マイクロジストロフィンの局在と発現レベルの測定に加えて、カセットの筋肉内注射後の骨格筋力を測定した。pAAV. MHCK7. マイクロジストロフィン構築物の筋肉内発現により、未処理の対照と比較して、絶対的な力および比力の生成が大幅に増加した (それぞれ、図3Aおよび3B)。

## 【0097】

## 実施例3

rAAV r h . 7 4 . MHCK7. マイクロジストロフィンのmd x マウスへの全身送達  
md x マウスのコホートに、6週齢で、2 x 1 0<sup>12</sup> v g (8 x 1 0<sup>13</sup> v g / kg) または高用量 (計画された臨床用量) 6 x 1 0<sup>12</sup> v g (2 x 1 0<sup>14</sup> v g / kg) のいずれかの rAAV r h . 7 4 . MHCK7. マイクロジストロフィンを尾静脈を介して注射した。12週間の治療後、全ての筋肉を採取し、ジストロフィンとDAPC成分の回復について染色した。全身注射 (尾静脈) マウスは、全ての筋肉にわたってジストロフィンの高レベルの染色を示した。図4Aは、6 x 1 0<sup>12</sup> v g (2 x 1 0<sup>14</sup> v g / kg) の全身投与後の骨格、横隔膜、および心筋線維の広範な形質導入を表している。図4Bは、各組織でマイクロジストロフィンを発現している筋線維の割合の定量化を示している。最後に、

40

50

横隔膜の機能改善を試験した(図4C)。低用量では顕著な差は見られなかつたが、高用量では顕著な改善があつた。重要なことに、図5は、D A P Cの他の成分がマイクロジストロフィンの送達後に完全に復元されたことを示している。示されているのはベータサルコグリカン(B-SG)である。

#### 【0098】

AAV r h . 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンの毒物学 / 安全性は、表2に従つてm d xマウスの尾静脈への静脈内(i.v.)注射によりベクターを投与することにより評価された。次を含む分析された筋肉組織のいずれにおいても毒性の証拠はなかつた: 前脛骨筋(TA)、腓腹筋(GAS)、大腿四頭筋(QD)、腰筋(PSO)、上腕三頭筋(TRI)、および横隔膜(DIA)(図6Aおよび6B)。中心に配置された核の数は、高用量 $6 \times 10^{12}$  v g ( $2 \times 10^{14}$  v g / k g)で減少した。歴史的に、未処理の年齢適合m d xマウスの骨格筋の中心核形成は、平均で約80%である。最後に、小さい試料サイズ(n=3)からの予備データは、高用量(D)処理マウスの血清におけるCK放出レベル(U/L)の減少を実証する。独立したt検定を使用して差異を特定し( $p < 0.05$ )、データを平均±SEMとして報告する。

#### 【表2】

表2. マウスにおけるr AAV r h . 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンの毒性学/安全性研究の概要。

コホート番号	研究薬剤	用量	治療	追跡	犠牲のエンドポイント	
		(v g / kg)	0日目	1日目	6週目	追加
(1)	低用量	AAV r h . 7 4 . M H C K 7 . M i c r o - d y s	$8.0 \times 10^{12}$	m d xマウスの尾静脈への単回静脈注射	24時間体重、臨床観察	5M +2
(2)	高用量	AAV r h . 7 4 . M H C K 7 . M i c r o - d y s	$2.0 \times 10^{14}$			5M +2
(3)	対照	ビヒクル(LRS)	0			5M +2
合計マウス						N=21

#### 【0099】

##### 実施例4

##### p A A V . M C K . マイクロジストロフィン構築物の生成

p A A V . M C K . マイクロジストロフィンプラスミドは、コドン最適化ヒトマイクロジストロフィンcDNA配列を駆動するMCK発現カセットをAAVクローニングベクタ-p sub 201(Samulski et al., J. Virol. 61(10):3096-3101)に挿入することにより構築された。筋肉特異的な遺伝子発現を駆動するために、筋肉特異的な調節エレメントが構築物に含まれていた。この調節エレメントは、351bpのMCKコアプロモーター(近位)に融合したマウスマCKコアエンハンサー(206bp)で構成されていた。コアプロモーターの後、構築物には、効率的な転写開始のための53bpの内因性マウスマCKエクソン1(非翻訳)が含まれ、その後にSV40後期16S/19Sスプライスシグナル(97bp)および小さな5'UTR(61bp)が続く。イントロンおよび5'UTRは、プラスミドpCMV(Clontech)に由来した。マイクロジストロフィンカセットは、ATG開始の直前にコンセンサスのコザックがあり、mRNA終了のための小さな53bpの合成ポリAシグナルを有してい

10

20

30

40

50

る。Harper et al. Nat. Med. 8 (3) : 253-61, 2002 によって以前に記載されたように、ヒトマイクロジストロフィンカセットは、(R4~R23 / 71~78)ドメインを含んでいる。

#### 【0100】

pAAV.MCK.マイクロジストロフィンプラスミドには、AAV2末端逆位配列(ITT)が隣接するヒトマイクロジストロフィンcDNA発現カセットが含まれていた(図7を参照されたい)。この配列はAAVrh.74ビリオンにカプシド化された。AAVrh.74血清型の分子クローンはrhesus macaqueのリンパ節からクローン化され、Rodino-Klapac et al. Journal of Trans. Med. 45 (2007) に記載されている。

10

#### 【0101】

##### 実施例5

##### rAAV.MCK.マイクロジストロフィンを使用した効力と用量の分析

発現研究は、筋肉内注射により、ヒトマイクロジストロフィン構築物(rAAV.MCK.マイクロジストロフィン；実施例1に記載)で実施された。mdxマウス(ジストロフィンを発現しない自発的なDmdm<sup>d</sup>変異体マウス)の前脛骨(TA)筋に3×10<sup>9</sup>、3×10<sup>10</sup>、または1×10<sup>11</sup>vgのカセット(群あたりn=3)を注射した。4週間後、筋肉を採取し、ジストロフィン発現についてN末端Dys3に特異的な抗体を使用してならびにヘマトキシリンおよびエオシン(HE)染色で染色した。図8は、3×10<sup>9</sup>vgでの非常にわずかな発現(効果なしのレベル)と1×10<sup>11</sup>vgでの89%の発現による、発現と用量の間には線形相関を示す。

20

#### 【0102】

##### 実施例6

##### rAAV.MCK.マイクロジストロフィンのmdxマウスへの血管送達

分離式肢灌流モデル(Rodino-Klapac et al., J. Trans. Med. 5 (45) : 1-11, 2007)を使用して、mdxマウス(n=10)に1×10<sup>11</sup>vgのrAAVrh.74.MCK.マイクロジストロフィンを大腿動脈から注射し、実施した結果の分析を実施した。遺伝子導入の3ヵ月後、下肢の筋肉が採取され、有効性の研究により、力と伸張性収縮誘発損傷に対する抵抗性の両方で大幅な改善が示された(図9)。

30

#### 【0103】

長指伸筋(EDL)筋肉およびTA筋肉におけるジストロフィンタンパク質の免疫染色は、大腿動脈を介したrAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン処理後のmdx筋線維における発現を示している(図9A)。模擬感染した筋肉は同一の方法で染色され、暴露時間は一致していた。図9Bは、rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィンは、模擬処理されたmdx筋肉と比較して、正常化した比力を有意に増加させたことを実証する(P<0.05対mdx)。さらに、rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン(ヒト)に感染したmdx筋肉を、遺伝子導入後12週間で、反復的伸張性収縮中の力低下について、模擬感染した反対側のmdx EDL筋肉(青)および野生型(WT C57BL/10)EDL筋肉と比較した(図9C)。rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン(Micro-dys)処理は、模擬処理されたmdx筋肉と比較して、力の損失に対して有意に保護することが見い出された(P<0.001対mdx)。

40

#### 【0104】

##### 実施例7

##### 靈長類研究

マウスにおける前臨床所見を臨床パラダイムに適用するため、非ヒト靈長類(NHP)が、将来の臨床試験の安全性と有効性を評価するために全身投与された。AAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィン.FLAGの2×10<sup>14</sup>vg総用量の、頭部静脈を介して静脈内送達された効果を、非ヒト靈長類で研究した。この用量は、マウスに与

50

えられた全身用量に比例し(動物の体重に基づいて)、マウスに与えられた中用量(6.0 × 10<sup>12</sup> v g 総用量)に対応した。

【0105】

ベースラインの化学および酵素結合免疫吸着スポットアッセイ(ELISPOT)分析を含む免疫学的研究を実施して、AAVrh.74カプシドおよびマイクロジストロフィンに対するT細胞、ならびに抗AAV抗体力値を測定した。AAVrh.74カプシドタンパク質(Genemed Synthesis, San Antonio, TX)のためには、それぞれが18アミノ酸長で11残基オーバーラップする34~36ペプチドを含む3つのペプチドプールを使用した。マイクロジストロフィン.FLAGタンパク質(Genemed Synthesis)を含む4つのペプチドプールは、それぞれ18アミノ酸長で、11残基重複している。コンカナバリンA(ConA)(Sigma、1 μg/mL)を陽性対照として、0.25%ジメチルスルホキシド(DMSO)を陰性対照として使用した。これらの研究は、研究全体で2週間ごとに繰り返された。治療後3ヶ月で、完全な組織剖検を得るために動物を安樂死させた。免疫学的アッセイでは、ELISPOTによるカプシドまたは導入遺伝子に対する予期しない応答は示されず(図12A)、ELISAによるAAVrh.74カプシドに対する予期しない抗体応答も示されなかった(図12B)。

【0106】

さらに、以下の表3に示すように、完全な全血球数および化学パネルにより、肝酵素のわずかな上昇が認められたが、これは介入または治療の必要なしに正常化してベースラインに戻った。

【表3】

表3

血液化学	ベースライン	24時間	2週間	4週間	6週間	8週間	12週間
13-176	ベースライン	24時間	2週間	4週間	6週間	8週間	12週間
総タンパク質 (6.4~7mg/dL)	7	7	6.7	6.6	6.6	6.6	6.7
ビリルビン、合計 (0.15~0.23mg/dL)	0.2	0.4	0.3	0.2	0.3	0.4	0.4
ALT (31~50U/L)	39	38	75	104	182	172	65
AST (19~38U/L)	35	63	50	92	98	121	64
アルカリホスファターゼ (504~821U/L)	417	396	332	383	598	608	578
GGT	77	77	120	106	131	156	134
CK	109	504	164	183	137	126	123

10

20

30

40

50

## 【0107】

研究期間中、他の予期しない化学値はなかった。最後に、全ての骨格筋の完全な分析により、FLAG特異抗体による免疫蛍光染色と、ジストロフィンに対するマウスモノクローナル抗体を使用したウェスタンプロット検出により、筋線維での広範な発現が示された(図14A、B)。

## 【0108】

データは、AAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィン・FLAGの全身送達が、非ヒト靈長類の全ての骨格筋にわたって広範囲に発現する安全性と有効性を確立したことを示している。

## 【0109】

実施例8

## 有効性を実証する前臨床研究

mdxマウスの骨格および心筋の欠損の処理におけるrAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィンの全身送達の有効性を実証するために、前臨床研究が実施された。実施例1に記載される筋肉および心臓特異的プロモーターMHCCK7により駆動されるコドン最適化ヒトマイクロジストロフィン導入遺伝子を含むAAVrh74ベクターをこの研究に使用した。

## 【0110】

mdx(ジストロフィンヌル)マウスの尾静脈を介したrAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィンの全身注射は、用量反応研究に使用された。この研究の結果は、mdxマウスへの全身注射が用量依存的に四肢および横隔膜で測定された組織学的および機能的結果を正常化するのに効果的であることを実証した。さらに、委員会認定の獣医病理学者による正式な組織病理学調査の後、重要なベクター関連毒性は報告されなかった。

## 【0111】

この研究のためのベクターは、研究グレードの条件下で、HEK293細胞の三重トランسفエクション法を利用して、ナショナルワイド・チルドレンズ病院のウイルスベクターコアによって作成された。生産後のベクターの特性評価には、スーパーコイル標準、エンドトキシンレベル測定(EU/mL)および無菌性評価を伴う、qPCRによる力値決定が含まれる。生成されたベクターをSDS-PAGEで分析し、予想されるrAAVとのバンドパターンの一貫性を検証した。ベクターは、マイクロジストロフィン構築物、発現を駆動する筋肉特異的MHCCK7プロモーター、コンセンサスコザック配列(CCAC)、SV40キメライントロン、合成ポリアデニル化部位(5'3'bp)を含むプラスミドを使用して作成された(エラー! 参照ソースが見つかりません。)。マイクロジストロフィン発現カセットは、骨格および心臓組織の形質導入を強化するために、AAVrh74ベクターにパッケージ化されたAAV2-ITRの間にクローニングされた。

## 【0112】

rAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィン試験試料の効力決定は、mdxマウスへのベクターの筋肉内注射を行うことにより達成された。野生型マウスは陽性対照として機能し、無菌乳酸リンゲル液のmdxマウスへの注射は陰性対照として機能する。

10

20

30

40

50

## 【表4】

表4 : rAAV r h 74, MHCK7, マイクロジストロフィン研究デザインの概要

送達経路	動物系統	総用量 (v g)	マウス数	処理のエン ドポイント	分析
I M (効力)	mdx	1E+11	3	1か月	I F、H&E
I V (有効性)	mdx	2E+12	5	3か月	I F、H&E、Diaph Phys
I V (有効性)	mdx	6E+12	8	3か月	I F、H&E、Diaph Phys、TA Phys s、Path、生体内分 布、ウェスタンプロット
I V (有効性)	mdx	1.2E+13	8	3か月	I F、H&E、Diaph Phys、TA Phys s、Path、生体内分 布、ウェスタンプロット
I V (有効性)	C57BL/6	6E+12	5	3か月	I F、H&E、Diaph Phys、TA Phys s、Path
I V (有効性)	mdx	6E+12	5	6か月	I F、H&E、Diaph Phys、TA Phys s、Path
I V (有効性)	mdx	—	8	3か月	I F、H&E、Diaph Phys、Path
I V (有効性)	C57BL/6	—	6	3か月	I F、H&E、Diaph Phys、Path

I F : 免疫蛍光 ; H&E : ヘマトキシリン&エオシン染色 ; Diaph/TA Phys : 橫隔  
膜およびTA筋肉の比力の測定 ; Path : 正式な組織病理学 ; '—' : 未注射

注射された動物は全て、生後4～5週間で処理され、注射後3または6ヶ月で剖検された。対照  
マウスは、生後4ヶ月および生後7ヶ月で剖検された。

## 【0113】

表4に示されている動物に、示された年齢(4～5週齢)で全身送達のための尾静脈注  
射を投与した。筋肉内注射で正確な投与を行うために、動物をイソフルラン吸入により簡  
単に麻酔した。下後肢の前脛骨筋への直接注射により用量を投与した。全身送達による正  
確な投与には麻酔は必要なかった。用量は、尾静脈を通して血管系により投与された。ベ  
クター用量全体を血管に正確に置くように注意した。投与が行われた後、動物は自発運動  
が回復するまで加熱パッド上に置かれ、その後ケージに戻された。各動物の観察は、研究  
の全期間にわたって毎週行われた。

## 【0114】

表4に記載されている適切な年齢で、マウスにケタミン/キシラジン混合物(200m  
g/kg/200mg/kg)を過剰投与した。血液を心臓穿刺で採取し、全血を全血球計  
算(CBC)分析のために送って、血清をCharles Rivers Laboratoryが分析するまで-80°で保存した。その後、組織を収集し、独立した獣医組織病  
理学者による分析と社内での分析のために送った。

## 【0115】

10

20

30

40

50

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンを  $1 \times 10^{11} \text{ v g}$  の総用量でジストロフィンヌルマウスに筋肉内送達すると、注入された T A 筋肉で約 70 % のジストロフィンが発現した。ベクター投与マウスの免疫蛍光イメージングにより、マイクロジストロフィン遺伝子の発現が確認された。

【 0 1 1 6 】

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンによる全身処理後のジストロフィン発現の回復

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン試験試料の効力決定は、注射後 3 か月および 6 か月の時点で全身に送達されたときの導入遺伝子発現およびベクターの有効性を評価するために、低、中、および高用量 ( $2.0 \times 10^{12} \text{ v g}$  総用量;  $6.0 \times 10^{12} \text{ v g}$  総用量;  $1.2 \times 10^{13} \text{ v g}$  総用量) での用量漸増で、m d x マウス (遺伝子型: C 5 7 B L / 1 0 S c S n - D M D m d x / J ) における全身注射を行うことによって達成された。マウスに生後 4 ~ 5 週間で注射し、注射後 3 ヶ月と 6 ヶ月の両方で完全な剖検を実施した。群あたりの平均動物体重に基づいて、これらの用量は  $8 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{kg}$ 、 $2 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{kg}$  および  $6 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{kg}$  に等しい。等量の乳酸リングル液の注射が陰性対照として機能した。C 5 7 B L / 6 マウスへの乳酸リングル液の同量の注射は、陽性対照として機能した。安全性は、 $6.0 \times 10^{12} \text{ v g}$  総用量の用量で W T マウスに全身注射 (W T T X - 中用量群と呼ばれる) を行うことによって決定された。骨格筋、前脛骨筋 (T A)、腓腹筋 (G A S)、大腿四頭筋 (Q U A D)、殿筋 (G L U T)、腰筋、上腕三頭筋 (T R I)、横隔膜 (D I A)、および心臓の免疫蛍光染色を実施して、ジストロフィンの回復を判定し、r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンのウイルスベクターの有効性を確認した。  
10

【 0 1 1 7 】

分析のために、骨格筋 (T A、Q U A D、G L U T、T R I) が心臓および横隔膜とともに抽出された。毒物学および体内分布の研究のために臓器も摘出された。マイクロジストロフィン導入遺伝子の発現は、3 ~ 6 ヶ月の処理後も高いままであった。これは、筋肉組織病理学の改善と機能の改善が伴い、オフターゲット臓器での有害作用はなかった。

【 0 1 1 8 】

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン全身処理 m d x マウスのジストロフィー表現型の反転

骨格筋、横隔膜、および心臓のヘマトキシリン & エオシン (H & E) 染色を行って、各用量において注射後 12 週間で安樂死を伴う、 $2 \times 10^{12} \text{ v g}$  総用量 (低用量; n = 1)、 $6 \times 10^{12} \text{ v g}$  の総用量 (中用量; n = 8)  $1.2 \times 10^{13} \text{ v g}$  の総用量 (高用量; n = 8) での r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンの全身注射後のジストロフィー病理の反転と改善を判定した。注射後 24 週間で、中用量 ( $6 \times 10^{12} \text{ v g}$  総用量) で処理した動物の 2 番目のコホートを、ジストロフィンの病理の反転と改善について評価した (n = 5)。  
30

【 0 1 1 9 】

ヒトのマイクロジストロフィンタンパク質の免疫蛍光染色を使用して、マイクロジストロフィンベクターを注射した全てのジストロフィンヌルマウスにおいて、6 つの骨格筋 (T A、G A S、Q U A D、G L U T、腰筋、T R I) の左右両側、ならびに横隔膜および心臓のマイクロジストロフィン導入遺伝子発現を判定した。これは、ジストロフィンの回復を判定し、各用量において注射後 12 週間で安樂死を伴う、 $2 \times 10^{12} \text{ v g}$  総用量 (低用量; n = 2)、 $6 \times 10^{12} \text{ v g}$  の総用量 (中用量; n = 8)  $1.2 \times 10^{13} \text{ v g}$  の総用量 (高用量; n = 8) での r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンのウイルスベクターの有効性を確保するために、実施された。  
40

【 0 1 2 0 】

発現および形質導入効率を評価するために、3 つの投与コホート全ておよび各筋肉の左右両側からの画像を定量化に利用した。各筋肉の 4 つの 20 倍画像を撮影し、各画像のマイクロジストロフィン陽性線維の割合を決定して、各筋肉の平均形質導入パーセントを求

10

20

30

40

50

めた。図14および15は、中用量( $6 \times 10^{12} \text{ v g}$ ;  $2 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )および高用量( $1.2 \times 10^{13} \text{ v g}$ ;  $6 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )の処理マウスの代表的な画像を示す。乳酸リングル液を注射し、年齢を一致させたジストロフィンヌルマウスを陰性対照に含め、乳酸リングル液を注射した野生型マウスを陽性対照に含めた。心臓は、分析した全ての動物で75%以上を示した。

#### 【0121】

未処理動物の筋肉は、脂肪浸潤、中心核形成、線維症、および壊死の焦点領域を含む広範なミオパチーを示した。におけるH & E染色エラー！参照元が見つかりません。16およびエラー！参照ソースが見つかりません。17は、正常なWTマウスと比較したときのジストロフィンヌルマウスのこのジストロフィー表現型と、中用量( $6 \times 10^{12} \text{ v g}$ ;  $2 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )または高用量( $1.2 \times 10^{13} \text{ v g}$ ;  $6 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )での治療後の筋肉病理の改善を示している。組織学的パラメーターの定量化により、中心核形成の減少(図18)および平均纖維径の正規化(エラー！参照ソースが見つかりません。16および17)処理マウスでは、全ての筋肉が、用量依存的である。シリウスレッド染色は、未処理(mdx L R)コホートと比較して、中用量と高用量のコホートの両方で横隔膜のコラーゲン沈着の減少を示した(図19)。

10

#### 【0122】

rAAVrh74 . MHC K7 .マイクロジストロフィンによる全身処理の機能的評価

マイクロジストロフィン遺伝子導入が疾患を有する筋肉に機能的強度の利益を提供するかどうかを判断するために、mdxマウス、WTマウス、および3つの用量レベルでのベクター投与マウスの横隔膜と前脛骨筋の両方の機能特性を評価した。用量漸増には、低用量( $8 \times 10^{13} \text{ v g / kg}$ )、中用量( $2 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )、および高用量( $6 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )が含まれた。 $6 \times 10^{12} \text{ v g}$ 総用量(中用量)でrAAVrh74 . MHC K7 .マイクロジストロフィンを全身注射した動物では、TAの伸張性収縮後の比力と力出力の減少のエクスピボ評価を使用したrAAVrh74 . MHC K7 .マイクロジストロフィンによる全身処理の機能評価を注射後24週間に利用した。さらに、横隔膜での比力の出力は、同一の動物で評価された。

20

#### 【0123】

上述の図で概説したように、組織病理学は、中用量および高用量での中心核形成、コラーゲン沈着、および纖維サイズの改善により、より正常化された環境を示した。rAAVrh74 . MHC K7 .マイクロジストロフィンの尾静脈送達は、横隔膜における比力出力の段階的改善(中間用量群での176 . 9 mN / mm<sup>2</sup>対高用量群での227 . 78 mN / mm<sup>2</sup>)につながった。また、長期処理したコホートは、注射(中用量 $2 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ )後6か月のマウスを表し、横隔膜比力出力の長期で偏差がなかった(176 . 9 mN / mm<sup>2</sup>対194 . 9 mN / mm<sup>2</sup>)(エラー！参照ソースが見つかりません。20)。

30

#### 【0124】

さらに、WTマウスと比較して、mdxマウスの前脛骨筋の機能的欠損が観察された。Md xマウスは、WTマウスと比較して力の出力が50%減少(171 . 3 mN / mm<sup>2</sup>対291 . 65 mN / mm<sup>2</sup>)および伸張性収縮後の力のより大きな損失(mdxの32%の損失、WTの5%の損失)を示した。rAAVrh74 . MHC K7 .マイクロジストロフィンの中用量レベルの全身送達により、前脛骨筋で65 . 5%のジストロフィンおよび235 . 4 mN / mm<sup>2</sup>に改善された比力出力の回復がもたらされ、筋肉が、力の25%のみの減少で、繰り返しの伸張性収縮の損傷から保護された(図21)。WT中用量グループは、ベクター処理後の毒性の欠如と機能的結果の測定値の維持を示すために、野生型の処理されたコホートを表している。

40

#### 【0125】

##### 概要

筋肉内注射による生体力値の最初の実証後、骨格筋、横隔膜、および心臓に形質導入しながら、血管送達によりマイクロジストロフィンの同等または増加した回復が達成された

50

。有効性は、炎症の減少、変性線維の減少、および前脛骨筋と横隔膜の伸張性収縮から保護することによる機能回復の改善による、用量依存的なジストロフィー機能の反転を実証した。ベクターの機能的な利点には、横隔膜とTAの力の生成における野生型レベルの段階的な改善が含まれる。

【0126】

実施例9

rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンによる全身処理の毒性と体内分布  
rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンの全身注射を与えられたmdxマウスからの臓器および組織は、ベクターDNAの特定の配列を検出するためのリアルタイム定量PCRのために収集された。収集された全ての臓器および組織から抽出されたタンパク質をウェスタンプロットで分析し、オフターゲット臓器のマイクロジストロフィンを検出した。

【0127】

試験試料は、4～5週齢で静脈内経路により、低用量( $2 \times 10^{12}$ vg;  $8 \times 10^{13}$ vg/kg)、中用量( $6 \times 10^{12}$ vg;  $8 \times 10^{14}$ vg/kg)、および高用量( $1.2 \times 10^{13}$ vg;  $6 \times 10^{14}$ vg/kg)の3つの用量レベルで与えられた。ベクターの安全性を評価するために、筋肉組織の凍結切片および前述のマウスの同一のコホートから採取した全ての主要臓器でH&E染色を実施した。また、中用量のベクターで全身処理したC57BL/6WTマウスからの臓器と筋肉も含まれていた。乳酸リングル液処理mdxおよびWTマウスも組織病理学分析に含まれていた。これらの切片は、第三者の委員会認定の獣医病理学者によって毒性について正式に調査され、どのマウスのいずれの試料でも有害作用は検出されなかった。結果を以下に要約する。

【0128】

群の詳細と研究デザインを以下の4に示す。

【表5】

表5: rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィン安全性試験デザイン

送達経路	動物系統	総用量(vg)	マウスの数	処理のエンドポイント	病理学レポート番号
IV	mdx	$2 \times 10^{12}$	5	3か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.1
IV	mdx	$6 \times 10^{12}$	7	3か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.1/001.2
IV	mdx	$1.2 \times 10^{13}$	8	3か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.2
IV	C57BL/6	$6 \times 10^{12}$	5	3か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.2
IV	mdx	$6 \times 10^{12}$	5	6か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.3
IV	mdx	--	8	3か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.2
IV	C57BL/6	--	6	3か月	AAVrh74-mdx- MOUSE-001.2

【0129】

ベクター形質導入組織の病理組織学的調査

rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンの静脈内注射は、検査されたいずれの骨格筋でも筋線維の顕微鏡的变化をまったく誘発しなかった。さらに、組織学的に評価された組織のいずれにも治療関連の病変は見られなかった。注目されたいずれの変化も、処理マウスと対照マウスの両方で見られ、偶発的な所見とみなされた。まとめると、これらのデータは、この試験試料が試験対象によって十分に許容されたことを示している。さらに、年齢を一致させた未処理のmdxマウスからの参照標本と比較して、rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィンの投与は、処理されたmdxマウスの筋線維萎縮を減少させたため、試験試料がmdxの欠乏に関連するミオパチーの程度を改善できることを示している。

【0130】

10

20

30

40

50

ベクターで全身処理された疾患を有する  $m d \times$  マウスの調査に加えて、rAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィンは、 $m d \times$  マウスにおける上述の研究で確立された最小有効用量 (MED) である  $6 \times 10^{12} \text{ vg}$  の総用量 ( $2 \times 10^{14} \text{ vg} / \text{kg}$ ) と同一の用量で5匹のC57BL/6WTマウスに全身送達された。これにより、健康なWTマウスでの試験試料の静脈内送達の研究が可能になり、処理のみによって何らかの有害作用が生じるかどうかをより明確に決定することができた。ここで同様に、心臓と横隔膜を含むさまざまな骨格筋、および他の5つの臓器が採取され、各組織のH&E切片が独立した獣医病理学者によって正式に調査された。

### 【0131】

#### ベクターゲノム生体内分布

リアルタイムの定量的PCRアッセイ (qPCR) を使用して、試験試料特異的なDNA配列の存在を調べた。生体内分布解析は、用量レベルごとに3匹のベクター投与  $m d \times$  動物から収集した組織試料で実施した。陽性シグナルは、検出されたゲノムDNA  $1 \mu\text{g}$ あたり100以上の一一本鎖DNAコピーであった。剖検時に組織を採取し、MHCCK7プロモーターの配列に特異的なベクター特異的プライマープローブセットを使用した。以下の図22および表6は、rAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィン注射マウスの各組織試料で検出されたベクターゲノムコピーを示している。

### 【表6】

表6：用量レベルごとに3匹のベクター投与  $m d \times$  マウスの臓器および筋肉のベクターゲノムコピーネ。値は  $\text{vg} / \mu\text{g}$  ゲノムDNAで示されている。

組織	$2.00 \times 10^{12}$	$6.00 \times 10^{12}$	$1.20 \times 10^{13}$
	(平均 $\text{vg}$ コピー/ $\mu\text{g}$ )	(平均 $\text{vg}$ コピー/ $\mu\text{g}$ )	(平均 $\text{vg}$ コピー/ $\mu\text{g}$ )
Hrt	$2.84 \times 10^4$	$7.65 \times 10^5$	$5.35 \times 10^6$
Lng	$3.14 \times 10^4$	$2.52 \times 10^5$	$1.49 \times 10^6$
Liv	$4.36 \times 10^4$	$1.11 \times 10^7$	$1.80 \times 10^7$
Kid	$1.96 \times 10^4$	$3.27 \times 10^5$	$1.06 \times 10^6$
Spl	$5.69 \times 10^4$	$5.27 \times 10^5$	$5.78 \times 10^5$
Gon	$5.74 \times 10^4$	$3.68 \times 10^4$	$3.50 \times 10^5$
Dia	$2.22 \times 10^4$	$3.55 \times 10^5$	$2.32 \times 10^6$
Pso	$1.28 \times 10^5$	$1.60 \times 10^5$	$1.57 \times 10^6$
Tri	$1.60 \times 10^5$	$5.45 \times 10^5$	$2.50 \times 10^6$
Qd	$2.66 \times 10^6$	$6.57 \times 10^5$	$2.29 \times 10^6$
Gas	$1.69 \times 10^5$	$5.80 \times 10^5$	$2.93 \times 10^6$
TA	$5.86 \times 10^5$	$1.25 \times 10^5$	$1.32 \times 10^6$

### 【0132】

rAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィン転写物は、収集された全ての組織においてさまざまなレベルで検出されました。予想通り、最高レベルは骨格筋と心臓で見られた。最低レベルは生殖腺、肺、腎臓、および脾臓で検出された。これらのデータは、試験試料がベクター投与マウスの調査された全ての組織に効率的に送達されたことを示している。

### 【0133】

上述のqPCRの結果が示すように、rAAVrh74・MHCCK7・マイクロジストロフィンの静脈内送達により、ほとんどの組織においてベクター転写物がさまざまなレベ

10

20

30

40

50

ルで分布し、最高レベルは肝臓、心臓、および大腿四頭筋（中用量）、ならびに肝臓、心臓、および腓腹筋（高用量）において起きた。したがって、研究のこの部分の目的は、これらの組織におけるヒトマイクロジストロフィン導入遺伝子のタンパク質発現を決定し、筋肉特異的MHCCK7プロモーターの機能性を確実にすることであった。ウェスタンプロットティングを使用して、組織試料でのマイクロジストロフィン発現を検出した。

#### 【0134】

タンパク質の発現とベクターの生体内分布もqPCRとウェスタンプロットティングを使用して評価し（図23）、これらのデータは、オフサイト臓器のベクターの正常レベルと、高用量で処理した肝臓でのマイクロジストロフィンタンパク質の最小の検出を示している。これらの結果は、肝臓の病理学者によって決定された無毒性と相關していた。さらに、独立したCRO（Charles River Laboratories）によって血清化学が分析され、分析された全ての化学にわたって正常値が示された。肝臓酵素ASTには3つの異常値があり、そのうち2つはmdx-LR群で、1つは中用量群で示された（図23）。動物のサブセットはクレアチンキナーゼ分析（CK）を受けたが、試料は生理学的評価の前後に分析された。血清の分析は、試験試料の送達後の毒性の欠如を裏付けている。

10

#### 【0135】

マイクロジストロフィンタンパク質の発現は、全ての骨格筋試料と心臓試料においてさまざまな量で観察された（図24）。しかしながら、肝臓の高用量コホートで検出されたタンパク質は最小限であった。これは良性の結果であると考えられており、肝臓における存在は肝臓の平滑筋での発現によるものである可能性がある。重要なことには、肝臓における独立した病理学者の報告が示す組織病理学的な有害作用はなかった。

20

#### 【0136】

##### 概要

病理組織学的調査により、mdx-LRコホートは、評価された7つの骨格筋全ておよび心臓の右心室壁に影響を及ぼす広範なミオパチーを示したと結論付けられた。組織病理学レビューの主要な発見には、顕著な広範囲の筋線維萎縮（正常な筋線維サイズの30～75%）、最小限から軽度の単核細胞炎症、間質腔の増加、および細胞質ミネラル沈着の増加が含まれた。横隔膜は、単核細胞浸潤および筋線維萎縮の最も顕著な変化を示した。心臓は、心室心筋に最小の単核細胞蓄積の小さな焦点を示した。ベクター投与コホートでは、全ての骨格組織と心臓のミオパチーが大幅に減少した。病理組織学的所見における減少は用量依存的であり、高用量群では変性と炎症が実質的に少なかった。WT処理コホートおよびベクター投与mdxコホートで実証されているように、rAAVrh74.MHCCK7.マイクロジストロフィンによるベクター処理による有害作用はなかった。処理に関係なく、マウスが肝細胞細胞質の軽度の空胞化を示したmdxおよびWTマウスの肝臓および肺に偶発的な所見があった。したがって、試験試料は安全かつ有効であり、保護効果は用量依存的であった。

30

##### 引用文献

1. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr. & Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928 (1987).
2. Straub, V. & Campbell, K. P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10, 168-175 (1997).
3. Sacco, A., et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* 143, 1059-1071 (2010).
4. Wallace, G. Q. & McNally, E. M. Mechanisms of

40

50

muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71, 37-57 (2009).

5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 771-776 (2010).

6. Desguerre, I., et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 762-773 (2009).

7. DiPrimio, N., McPhee, S. W. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 12, 553-560 (2010).

8. Mendell, J. R., et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* 68, 629-638 (2010).

9. Mendell, J. R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* 66, 290-297 (2009).

10. Mendell, J. R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 192-201 (2015).

11. Carnwath, J. W. & Shotton, D. M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* 80, 39-54 (1987).

12. Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A. & Sloper, J. C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 53-70 (1988).

13. Cullen, M. J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 77, 69-81 (1988).

14. Dupont-Versteegden, E. E. & McCarter, R. J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 15, 1105-1110 (1992).

15. Stedman, H. H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352

10

20

30

40

50

, 536-539 (1991).

16. Deconinck, A. E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717-727 (1997).

17. Grady, R. M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729-738 (1997).

18. Love, D. R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-58 (1989). 10

19. Tinsley, J. M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360, 591-593 (1992).

20. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4, 1441-1444 (1998).

21. Squire, S., et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: a 20 analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* 11, 3333-3344 (2002).

22. Rafael, J. A., Tinsley, J. M., Potter, A. C., Deconinck, A. E. & Davies, K. E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 19, 79-82 (1998).

23. Zhou, L., et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* 264, 106-111 (2008). 30

24. Gutpell, K. M., Hrinivich, W. T. & Hoffman, L. M. Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS one* 10, e0117306 (2015).

25. Rodino-Klapac, L. R., et al. Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Human molecular genetics* 22, 4929-4937 (2013). 40

26. Nevo, Y., et al. The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy. *PLoS one* 6, e18049 (2011).

27. Rodino-Klapac, L. R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duc 50

henne muscular dystrophy. *J Transl Med* 5, 45 (2007).

28. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65, 1441-1449 (1989).

29. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged microdystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 109-117 (2010). 10

30. Grose, W.E., et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PloS one* 7, e39233 (2012).

31. Liu, M., et al. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11, 245-256 (2005). 20

32. Harper, S.Q., et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nature medicine* 8, 253-261 (2002).

33. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged microdystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 18, 109-117 (2010). 30

34. Salva, M.Z., et al. Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther* 15, 320-329 (2007).

35. Sondergaard, P.C., et al. AAV. Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Annals of clinical and translational neurology* 2, 256-270 (2015).

36. De, B.P., et al. High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses. *Mol Ther* 13, 67-76 (2006). 40

37. Rodino-Klapac, L.R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of trans* 50



a g c c t g g c t c a g g g a t a t g a g c g c a c c a g t a g t c c a a a  
 a c c a c g g t t c a a g t c c t a c g c t 9 0 0  
 t a t a c c c a g g c t g c c t a c g t g a c a a c t a g c g a c c c t a c  
 t a g a t c c c c c t t t c c a t c c c a g 9 6 0  
 c a c c t g g a g g c c c c a g a g g a c a a g a g c t t t g g g t c c a g  
 c c t g a t g g a a a g c g a g g t g a a t 1 0 2 0  
 c t g g a t c g g t a c c a g a c a g c c c t g g a g g a g g t g c t g a g  
 c t g g c t g c t g a g t g c t g a a g a c 1 0 8 0  
 a c a c t g c a g g c c c a g g g c g a a a t t t c c a a t g a c g t g g a  
 a g t g g t g a a g g a t c a g t t c c a c 1 1 4 0 10  
 a c a c a c g a g g g c t a t a t g a t g g a c c t g a c a g c t c a c c a  
 g g g g c g c g t g g g c a a t a t c c t g 1 2 0 0  
 c a g c t g g g c t c t a a a c t g a t c g g c a c c g g g a a a c t g a g  
 t g a g g a c g a g g a a a c a g a a g t g 1 2 6 0  
 c a g g a g c a g a t g a a c a c a g c t g a a c a g c c g c t g g g a g t g  
 t c t g a g a g t g g c t a g t a t g g a g 1 3 2 0  
 a a g c a g t c c a a c c t g c a c c g g g t g c t g a t g g a c c t g c a  
 g a a c c a g a a a c t g a a a g a g c t g 1 3 8 0  
 a a c g a c t g g c t g a c a a a g a c t g a g g a a c a a g g a a  
 g a t g g a g g a g g a g c c a c t g g g a 1 4 4 0 20  
 c c c g a c c t g g a g g a t c t g a a g a g a c a g g t g c a g c a g c a  
 t a a g g t g c t g c a g g a g g a t c t g 1 5 0 0  
 g a a c a g g a g c a g g t g c g g g t g a a c t c c c t g a c a c a t a t  
 g g t g g t g g t g g t g g a c a g g a t c t 1 5 6 0  
 a g t g g a g a t c a c g c c a c c g c c g c c c t g g a g g a c a g c t  
 g a a g g t g c t g g g g a c a g g a c g g t g g 1 6 2 0  
 g c c a a c a t t t g c c g g t g g a c c g a g g a c a g g t g c t  
 g c t g c a g g a c a t c c t g c t g a a a 1 6 8 0  
 t g g c a g a g g c t g a c c g a g g a g c a g t g t c t g t t t a g t g c  
 t t g g c t g a g c g a g a a a g a g a g g a c 1 7 4 0 30  
 g c c g t g a a c a g a t c c a c a c a a c c g g c t t t a a g g a t c a  
 g a a c g a a a t g c t g t c a g c c t g 1 8 0 0  
 c a g a a a c t g g c t g t g c t g a a g g c c g a t c t g g a a a a a a  
 g a a g c a g a g c a t g g g c a a a c t g 1 8 6 0  
 t a t a g c c t g a a a c a g g a c c t g c t g a g g c a c c c t g a a g a a  
 c a a g a g c g t g a c c c a g a a g a c a 1 9 2 0  
 g a a g c c t g g c t g g a t a a c t t t g c c c c g c t g c t g g a c a a  
 c c t g g t g c a g a a a c t g g a g a a a 1 9 8 0  
 a g t a c a g c t c a g a t c t c a g g c t g t g a c c a c a a c c c a  
 g c c t a g c c t g a c c c a g a c a a c c 2 0 4 0 40  
 g t g a t g g a a a c c g t g a c c a c c g t g a c a a c c c g c g a a c a  
 g a a t c c t g g t g a a a c a t g c c c a g 2 1 0 0  
 g a a g a g c t g c c a c c t c c c c a g a a g a a g a a a c  
 c c t g g a g c g g c t g c a g g a g g c t g 2 1 6 0  
 c a g g a a g c c a c t g a c g a a c t g g a c c t g a a g c t g a g g c a  
 g g c c g a a g t g a t t a a g g g g t c t 2 2 2 0  
 t g g c a g c c t g t g g g c g a t c t g c t g a t t g a t t c c c t g c a  
 g g a c c a c c t g g a a a g g t g a a g 2 2 8 0  
 g c t c t g a g a g g c g a a a t t g c t c c a c t g a a g g a a c g t  
 g a g t c a t g t g a a c g a t c t g g c t 2 3 4 0 50

a g a c a g c t g a c a a c a c t g g g c a t c c a g c t g a g c c c a t a  
 c a a t c t g a g g c a c a c t g g g a g g a c 2 4 0 0  
 c t g a a t a c c a g g t g g a a g c t g c t g c a g g t g g c t g t g g a  
 a g a c c g g g t g c g g c a g c t g c a t 2 4 6 0  
 g a g g c c c a t c g c g a c t t c g g a c c a g c c a g c c a g c a c t t  
 t c t g a g c a c a t c c g t g c a g g g g 2 5 2 0  
 c c c t g g g a g a g g g c c a t t t c t c c c a a c a a g g t g c c c t a  
 c t a t a t t a a t c a c g a g a c c c a g 2 5 8 0  
 a c c a c t t g t t g g g a c c a t c c c a a g a t g a c a g a a c t g t a  
 c c a g t c c c t g g c c g a t c t g a a c 2 6 4 0 10  
 a a c g t g a g g t t t a g c g c t t a c a g a a c c g c t a t g a a g c t  
 g a g a c g g c t g c a g a a g g g c c c t g 2 7 0 0  
 t g c c t g g a t c t g c t g t c c c t g t c c g c c g c c t g c g a t g c  
 c c t g g a t c a g c a t a t c t g a a g 2 7 6 0  
 c a g a a c g a t c a g c c a a t g g a t a t c c t g c a g a t c a t c a a  
 c t g c c t g a c c a c t a t c t a c g a c 2 8 2 0  
 a g g c t g g a g c a g g a g c a c a a c a a c c t g g t g a a c g t g c c  
 t c t g t g c g t g g a t a t g t g c c t g 2 8 8 0  
 a a c t g g c t g c t g a a c g t g t a t g a c a c t g g g c g c a c c g g  
 c c g g a t c a g a g t g c t g a g t t t 2 9 4 0 20  
 a a a a c t g g g a t t a t c t c c c t g t g t a a g g c c c a c c t g g a  
 g g a c a a g t a c a g g t a c c t g t t c 3 0 0 0  
 a a g c a g g t g g c t a g t a g c a c t g g a t t t g a c c a g c g  
 c c g c c t g g g a c t g c t g c a t 3 0 6 0  
 g a t a g t a t c c a g a t t c c t a g a c a g c t g g g a g a g g t g g c  
 t a g t t c g g a g g a t c t a a c a t c 3 1 2 0  
 g a a c c c a g c g t g c g c a g c t g t t c c a g t t t g c c a a t a a  
 c a a a c c t g a a a t c g a g g c t g c t 3 1 8 0  
 c t g t t c c t g g a t t g g a t g c g c c t g g a a c c a c a g a g c a t  
 g g t g t g g c t g c c t g t g c t g c a c 3 2 4 0 30  
 a g a g t g g c t g c c g c c g a a a c t g c c a a g c a c c a g g c t a a  
 a t g c a a c a t c t g c a a g g a a t g t 3 3 0 0  
 c c c a t t a t c g g c t t t c g c t a c a g g a g t c t g a a a c a t t  
 t a a c t a c g a t a t t t g c c a g a g c 3 3 6 0  
 t g c t t c t t t t c c g g a a g a g t g g c c a a a g g a c a c a a g a t  
 g c a c t a c c c t a t g g t g g a a t a t 3 4 2 0  
 t g c a c c c c a a c t a c a t c t g g c g a a g a t g t g c g c g a t t  
 t g c c a a g g t g c t g a a g a a t a a g 3 4 8 0  
 t t t c g g a c t a a g a g g t a c t t c g c c a a g c a c c c c g c a t  
 g g g g t a t c t g c c a g t g c a g a c a 3 5 4 0 40  
 g t g c t g g a a g g a g a c a a t a t g g a g a c c g a t a c a a t g t g  
 a 3 5 7 9  
 < 2 1 0 > 2  
 < 2 1 1 > 8 1 0  
 < 2 1 2 > DNA  
 < 2 1 3 > アデノ随伴ウイルス  
 < 4 0 0 > 2  
 g t t t a a a c a a a g c t t g c a t g t c t a a g c t a g a c c c t t c a g  
 a t t a a a a a t a a c t g a g g t a a g g 6 0  
 g c c t g g g t a g g g a g g t g g t g t g a g a c g c t c c t g t c t c 50

t c c t c t a t c t g c c c a t c g g c c c 1 2 0  
 t t t g g g g a g g a a t g t g c c c a a g g a c t a a a a a a a g g  
 c c a t g g a g c c a g a g g g c g a g g 1 8 0  
 g c a a c a g a c c t t t c a t g g g c a a a c c t t g g g g c c c c t g c t  
 g t c t a g c a t g c c c a c t a c g g g 2 4 0  
 t c t a g g c t g c c c a t g t a a g g a g g c a a g g c c t g g g g a c a  
 c c c g a g a t g c c t g g t t a a t t 3 0 0  
 a a c c c a g a c a t g t g g c t g c c c c c c c c c c c c c a a c a c c t  
 g c t g c c t c t a a a a a t a a c c c t g 3 6 0  
 t c c c t g g t g g a t c c c c t g c a t g c g a a g a t c t t c g a a c a 10  
 a g g c t g t g g g g g a c t g a g g g c a 4 2 0  
 g g c t g t a a c a g g c t t g g g g g c c a g g g c t t a t a c g t g c c  
 t g g g a c t c c c a a a g t a t t a c t g 4 8 0  
 t t c c a t g t t c c c g g c g a a g g g c c a g c a g c t g t c c c c g c c a  
 g c t a g a c t c a g c a c t t a g t t a 5 4 0  
 g g a a c c a g t g a g c a a g t c a g c c c t t g g g g c a g c c c a t a  
 c a a g g c c a t g g g g c t g g g c a a g 6 0 0  
 c t g c a c g c c t g g g t c c g g g g t g g g c a c g g t g c c c g g g c  
 a a c g a g c t g a a a g c t c a t c t g c 6 6 0  
 t c t c a g g g g c c c c t c c c t g g g g a g c a g c c c c t c c t g g c t 20  
 a g t c a c a c c c t g t a g g c t c c c t c 7 2 0  
 t a t a a a c c c a g g g g c a c a g g g c t g c c c t c a t t c t a c  
 c a c c a c c t c c a c a g c a c a g a c a 7 8 0  
 g a c a c t c a g g a g c c a g g c g c g c c c 8 1 0  
 < 2 1 0 > 3  
 < 2 1 1 > 8 6 1 1  
 < 2 1 2 > DNA  
 < 2 1 3 > アデノ随伴ウイルス  
 < 4 0 0 > 3  
 g c c c a a t a c g c a a a c c g c c t c t c c c c g c g c g t t g g c c g 30  
 a t t c a t t a a t g c a g c t g g c g c g 6 0  
 c t c g c t c g c t c a c t g a g g g c c g c c c g g g c a a a g c c c g g g  
 c g t c g g g c g a c c t t t g g t c g c c 1 2 0  
 c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g  
 g c c a a c t c c a t c a c t a g g g g t t 1 8 0  
 c c t t g t a g t t a a t g a t t a a c c c g c c a t g c t a a t t a t c t  
 a c g t a g c c a t g t c t a g a g t t a 2 4 0  
 a a c a a g c t t g c a t g t c t a a g c t a g a c c c t t c a g a t t a a  
 a a a t a a c t g a g g t a a g g g c c t g 3 0 0  
 g g t a g g g g a g g t g t g a g a c g c t c c t g t c t c t c c t c 40  
 t a t c t g c c c a t c g g c c c t t t g g 3 6 0  
 g g a g g a g g a a t g t g c c c a a g g a c t a a a a a a a a g g c c a t g  
 g a g c c a g a g g g g c g a g g g c a a c 4 2 0  
 a g a c c t t t c a t g g g c a a a c c t t g g g g c c c t g c t c t a  
 g c a t g c c c a c t a c g g g t c t a g 4 8 0  
 g c t g c c c a t g t a a g g a g g c a a g g c c t g g g g a c a c c c g a  
 g a t g c c t g g t t a t a a t t a a c c c 5 4 0  
 a g a c a t g t g g c t g c c c c c c c c c a a c a c c t g c t g c  
 c t c t a a a a a t a a c c c t g t c c c t 6 0 0  
 g g t g g a t c c c c t g c a t g c g a a g a t c t t c g a a c a a g g c t 50

g t g g g g g a c t g a g g g c a g g c t g 6 6 0  
 t a a c a g g c t t g g g g g c c a g g g c t t a a c g t g c c t g g g a  
 c t c c c a a a g t a t t a c t g t t c c a 7 2 0  
 t g t t c c c g g c g a a g g g c c a g g c t g t c c c c c g c c a g c t a g  
 a c t c a g c a c t t a g t t a g g a a c 7 8 0  
 c a g t g a g c a a g t c a g c c c t t g g g g c a g c c c a t a c a a g g  
 c c a t g g g g c t g g g c a a g c t g c a 8 4 0  
 c g c c t g g g t c c g g g g t g g g c a c g g t g c c c g g g c a a c g a  
 g c t g a a a g c t c a t c t g c t c t c a 9 0 0  
 g g g g c c c c t c c c t g g g g a c a g c c c c t c c t g g c t a g t c a 10  
 c a c c c t g t a g g c t c c t c t a t a t 9 6 0  
 a a c c c a g g g g c a c a g g g g c t g c c c t c a t t c t a c c a c c a  
 c c t c c a c a g c a c a g a c a g a c a c 1 0 2 0  
 t c a g g a g c c a g c c a g c g g c g c g c c c a g g t a a g t t a g t  
 c t t t t g t c t t t t a t t t c a g g t 1 0 8 0  
 c c c g g a t c c g g t g g t g c a a a t c a a a g a a c t g c t c c  
 t c a g t g g a t g t t g c t t a c t t 1 1 4 0  
 c t a g g c c t g t a c g g a a g t g t t a c t t c t g c t c t a a a a g c  
 t g c g g a a t t g t a c c c g c g g c c g 1 2 0 0  
 c c a c c a t g c t g t g g t g g g a g g g t g g a g g a t t g t t a t 20  
 g a a a g g g a g g g a c g t g c a g a a g a 1 2 6 0  
 a g a c t t t t a c c a a g t g g g t g a a c g c t c a g t t c a g c a a a  
 t t t g g g a a g c a g c a c a t c g a g a 1 3 2 0  
 a t c t g t t t t c c g a c c t g c a g g a t g g g a g a c g g c t g c t g  
 g a t c t g c t g g a a g g a c t g a c t g 1 3 8 0  
 g c c a g a a g c t g c c c a a a g a g a a g g g g a g g c a c t a g g g t g  
 c a c g c c c t g a a c a a c g t g a a c a 1 4 4 0  
 a a g c t c t g a g a g t g c t g c a g a a c a a c a a c g t g g a t c t g  
 g t g a a t a t t g g c a g t a c t g a t a 1 5 0 0  
 t c g t g g a c g g g a a c c a c a a a c t g a c a c t g g g c c t g a t c 30  
 t g g a a c a t t a t t c t g c a c t g g c 1 5 6 0  
 a g g t g a a a a a t g t g a t g a a g a a c a t c a t g g c c g g g c t g  
 c a g c a g a c c a a t t c c g a g a a g a 1 6 2 0  
 t c c t g c t g t c t t g g g t g c g g c a g a g c a c c c g c a a c t a t  
 c c c c a g g t g a a c g t g a t t a a c t 1 6 8 0  
 t c a c t a c a t c c t g g a g c g a c g g g c t g g g c c c t g a a t g c t  
 c t g a t t c a c a g c c a c a g g c c t g 1 7 4 0  
 a t c t g t t c g a c t g g a a t a g c g t g g t g t g c c a g c a g t c t  
 g c c a c a c a g c g c c t g g a a c a t g 1 8 0 0  
 c c t t c a a t a t c g c t c g g t a c c a g c t g g g g a t c g a a a a a 40  
 c t g c t g g a c c c a g a g g a t g t g g 1 8 6 0  
 a c a c t a c a t a c c c a g a t a a a a a g t c t a t t c t g a t g t a c  
 a t t a c t a g c c t g t t c c a g g t g c 1 9 2 0  
 t g c c a c a g c a g g t g t c t a t t g a a g c c a t t c a g g a g g t g  
 g a a a t g c t g c c c c g c c c c c c a 1 9 8 0  
 a a g t g a c t a a a g a g g a g c a t t t c a g c t g c a t c a t c a g  
 a t g c a t t a c a g c c a g c a g a t t a 2 0 4 0  
 c c g t g a g c c t g g c t c a g g g a t a t g a g c g c a c c a g t a g t  
 c c a a a a c c a c g g t t c a a g t c c t 2 1 0 0  
 a c g c t t a t a c c c a g g c t g c c t a c g t g a c a a c t a g c g a c 50

c c t a c t a g a t c c c c c t t t c c a t 2 1 6 0  
 c c c a g c a c c t g g a g g g c c c a g a g g a c a a g a g c t t t g g g  
 t c c a g c c t g a t g g a a a g c g a g g 2 2 2 0  
 t g a a t c t g g a t c g g t a c c a g a c a g c c c t g g a g g a g g t g  
 c t g a g c t g g c t g c t g a g t g c t g 2 2 8 0  
 a a g a c a c a c t g c a g g g c c a g g g c g a a a t t t c c a a t g a c  
 g t g g a a g t g g t g a a g g a t c a g t 2 3 4 0  
 t c c a c a c a c a c g a g g g c t a t a t g a t g g a c c t g a c a g c t  
 c a c c a g g g g c g c g t g g g c a a t a 2 4 0 0  
 t c c t g c a g c t g g g c t c t a a a c t g a t c g g c a c c g g g a a a 10  
 c t g a g t g a g g a c g a g g a a a c a g 2 4 6 0  
 a a g t g c a g g a a g c a g a t g a a c c t g c t g a a c a g c c g c t g g  
 g a g t g t c t g a g a g t g g c t a g t a 2 5 2 0  
 t g g a g a a g c a g t c c a a c c t g c a c c g g g t g c t g a t g g a c  
 c t g c a g a a c c a g a a a c t g a a a g 2 5 8 0  
 a g c t g a a c g a c t g g c t g a c a a a g a c t g a g g a a a c g c a c a  
 a g g a a g a t g g a g g a g g a g c c a c 2 6 4 0  
 t g g g a c c c g a c c t g g a g g a t c t g a a g a g a g a c a g g t g c a g  
 c a g c a t a a g g t g c t g c a g g a g g 2 7 0 0  
 a t c t g g a a c a g g a g c a g g t g c g g g t g a a c t c c c t g a c a  
 c a t a t g g t g g t g g t g g t g g a c g 2 7 6 0  
 a a t c t a g t g g a g a t c a c g c c a c c g c c g c c t g g a g g a a  
 c a g c t g a a g g t g c t g g g g g a c c 2 8 2 0  
 g g t g g g c c a a c a t t t g c c g g t g g a c c g a g g t g g  
 g t g c t g c a g g a c a t c c t g c 2 8 8 0  
 t g a a a t g g c a g a g g c t g a c c g a g g a g c a g t g t c t g t t  
 a g t g c t t g g c t g a g c g a g a a a g 2 9 4 0  
 a g g a c g c c g t g a a c a a g a t c c a c a a c c g g c t t t a a g  
 g a t c a g a a c g a a a t g c t g t c t a 3 0 0 0  
 g c c t g c a g a a a c t g g c t g t g c t g a a g g g c c g a t c t g g a g 30  
 a a a a a g a a g c a g a g c a t g g g c a 3 0 6 0  
 a a c t g t a t a g c c t g a a a c a g g a c c t g c t g a g c a c c c t g  
 a a g a a c a a g a g c g t g a c c c a g a 3 1 2 0  
 a g a c a g a a g c c t g g c t g g a t a a c t t t g c c c g c t g c t g g  
 g a c a a c c t g g t g c a g a a a c t t g g 3 1 8 0  
 a g a a a a g t a c a g c t c a g a t c t c t c a g g c t g t g a c c a c a  
 a c c c a g c c t a g c c t g a c c c a g a 3 2 4 0  
 c a a c c g t g a t g g a a a c c c g t g a c a a c c c g c  
 g a a c a g a t c c t g g t g a c a a c c c g c  
 c c c a g g a a g a g c t g c c a c c t c c c c a g a a g a a g 40  
 a g a a c c c t g g a g c g g c t g c a g g 3 3 6 0  
 a g c t g c a g g a a g c c a c t g a c g a a c t g g a c c t g a a g c t g  
 a g g c a g g c c g a a g t g a t t a a g g 3 4 2 0  
 g g t c t t g g c a g c c t g t g g g c g a t c t g c t g a t t g a t t c c  
 c t g c a g g a c c a c c t g g a a a a g g 3 4 8 0  
 t g a a g g c t c t g a g a g g c g a a a t t g c t c c a c t g a a g g a g  
 a a c g t g a g t c a t g t g a a c g a t c 3 5 4 0  
 t g g c t a g a c a g c t g a c a a c a c t g g g c a t c c a g c t g a g c  
 c c a t a c a a t c t g g a g c a c a c t g g 3 6 0 0  
 a g g a c c t g a a t a c c a g g t g g a a g c t g c t g c a g g t g g c t 50

g t g g a a g a c c g g g t g c g g c a g c 3 6 6 0  
 t g c a t g a g g c c c a t c g c g a c t t c g g a c c a g c c a g  
 c a c t t t c t g a g c a c a t c c g t g c 3 7 2 0  
 a g g g g c c c t g g g a g a g g g c c a t t t c t c c c a a c a a g g t g  
 c c c t a c t a t a t t a a t c a c g a g a 3 7 8 0  
 c c c a g a c c a c t t g t t g g g a c c a t c c c a a g a a t g a c a g a a  
 c t g t a c c a g t c c c t g g c c g a t c 3 8 4 0  
 t g a a c a a c g t g a g g t t a g c g c t t a c a g a a a c c g c t a t g  
 a a g c t g a g a c g g c t g c a g a a g g 3 9 0 0  
 c c c t g t g c c t g g a t c t g c t g t c c c t g c c c g c c t g c 10  
 g a t g c c c t g g a t c a g c a t a a t c 3 9 6 0  
 t g a a g c a g a a a c g a t c a g c c a a t g g a t a t c c t g c a g a t c  
 a t c a a c t g c c t g a c c a c t a t c t 4 0 2 0  
 a c g a c a g g c t g g a g c a g g a g c a c a a c a a c t g g t g a a c  
 g t g c c t c t g t g c g t g g a t a t g t 4 0 8 0  
 g c c t g a a c t g g c t g c t g a a c g t g t a t g a c a c t g g g c g c  
 a c c g g c c g g a t c a g a g t g c t g a 4 1 4 0  
 g t t t t a a a a c t g g g a t t a t c t c c c t g t g t a a g g c c c a c  
 c t g g a g g a c a a g t a c a g g t a c c 4 2 0 0  
 t g t t c a a g c a g g t g g c t a g t a g c a c t g g a t t t g t g a c  
 c a g c g c c g c c t g g a c t g c t g c 4 2 6 0  
 t g c a t g a t a g t a t c c a g a t t c c t a g a c a g c t g g g a g a g  
 g t g g c t a g t t t c g g a g g a t c t a 4 3 2 0  
 a c a t c g a a c c c a g c g t g c g c a g c t g t t t c c a g t t t g c c  
 a a t a a c a a a c c t g a a a t c g a g g 4 3 8 0  
 c t g c t c t g t t c c t g g a t t g g a t g c g c c t g g a a c c a c a g  
 a g c a t g g t g t g g c t g c c t g t g c 4 4 4 0  
 t g c a c a g a g t g g c t g c c g c a a a c t g c c a a g c a c c a g  
 g c t a a a t g c a a c a t c t g c a a g g 4 5 0 0  
 a a t g t c c c a t t a t c g g c t t t c g c t a c a g g a g t c t g a a a  
 c a t t t a a c t a c g a t a t t g c c 4 5 6 0  
 a g a g c t g c t t c t t t c c g g a a g a g t g g c c a a a g g a c a c  
 a a g a t g c a c t a c c c t a t g g t g g 4 6 2 0  
 a a t a t t g c a c c c c a a c t a c a t c t g g c g a a g a t g t g c g c  
 g a t t t g c c a a g g t g c t g a a g a 4 6 8 0  
 a t a a g t t t c g g a c t a a g a g g t a c t t c g c c a a g c a c c c  
 c g c a t g g g g t a t c t g c c a g t g c 4 7 4 0  
 a g a c a g t g c t g g a a g g a g a c a a t a t g g a g a c c g a t a c a  
 a t g t g a g c g g c c g a a t a a a a g 4 8 0 0  
 a t c t t t a t t t c a t t a g a t c t g t g t g t g g t t t t t g t 40  
 g t g t c t a g a g c a t g g c t a c g t a 4 8 6 0  
 g a t a a g t a g c a t g g c g g g t t a a t c a t t a a c t a c a a g g a  
 a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c 4 9 2 0  
 a c t c c c t c t c t g c g c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g  
 g c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c 4 9 8 0  
 c c g g g c t t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g a g c g  
 g c g c c a g c t g g c g t a a t a g c g a 5 0 4 0  
 a g a g g c c c g c a c c g a t c g c c c t t c c c a a g t t g c g c a  
 g c c t g a a t g g c g a a t g g a a g t t 5 1 0 0  
 c c a g a c g a t t g a g c g t c a a a a t g t a g g t a t t c c a t g a 50

g c g t t t t c c t g t t g c a a t g g c 5 1 6 0  
 t g g c g g t a a t a t t g t t c t g g a t a t t a c c a g c a a g g c c g  
 a t a g t t g a g t t c t t c t a c t c a 5 2 2 0  
 g g c a a g t g a t g t t a t t a c t a a t c a a a g a a g t a t t g c g a  
 c a a c g g t t a a t t t g c g t g a t g g 5 2 8 0  
 a c a g a c t c t t t t a c t c g g t g g c c t c a c t g a t t a t a a a a  
 a c a c t t c t c a g g a t t c t g g c g t 5 3 4 0  
 a c c g t t c c t g t c t a a a a t c c c t t a a t c g g c c t c c t g t  
 t t a g c t c c c g c t c t g a t t c t a a 5 4 0 0  
 c g a g g a a a g c a c g t t a t a c g t g c t c g t c a a a g c a a c c a 10  
 t a g t a c g c g c c c t g t a g c g g c g 5 4 6 0  
 c a t t a a g c g c g g c g g g t g t g g t t a c g c g c a g c g t g  
 a c c g c t a c a c t t g c c a g c g c c c 5 5 2 0  
 t a g c g c c c g c t c c t t c g c t t t c t c c c t t c t c 5 5 8 0  
 g t c a a g c t c t a a a t c g g g g g c t c c c t t a g g g t t c c g a  
 t t a g t g a t t a c g g c a c c t c g 5 6 4 0  
 a c c c c a a a a a a c t t g a t t a g g t g a t g g t t c a c g t a g t  
 g g g c c a t c g c c c t g a t a g a c g g 5 7 0 0  
 t t t t t c g c c c t t g a c g t t g g a g t c c a c g t t c t t a a t  
 a g t g g a c t c t t g t t c c a a a c t g 5 7 6 0  
 g a a c a a c a c t c a a c c c t a t c t c g g t c t a t t c t t t g a t  
 t t a t a a g g g a t t t g c c g a t t t 5 8 2 0  
 c g g c c t a t t g g t t a a a a a a a g a g c t g a t t t a a c a a a a a  
 t t t a a c g c g a a t t t a a a a a a a 5 8 8 0  
 t a t t a a c g t t t a c a a t t t a a a t a t t g c t t a t a c a a t c  
 t t c c t g t t t t g g g c t t t t c t 5 9 4 0  
 g a t t a t c a a c c g g g g t a c a t a t g a t t g a c a t g c t a g t t  
 t t a c g a t t a c c g t t c a t c g a t t 6 0 0 0  
 c t c t t g t t t g c t c c a g a c t c t c a g g c a a t g a c c t g a t a 30  
 g c c t t t g t a g a g a c c t c t c a a a 6 0 6 0  
 a a t a g c t a c c c t c t c c g g c a t g a a t t a t c a g c t a g a a  
 c g g t t g a a t a t c a t a t t g a t g g 6 1 2 0  
 t g a t t g a c t g t c t c c g g c t t t c t c a c c c g t t t g a a t  
 c t t t a c c t a c a c a t t a c t c a g g 6 1 8 0  
 c a t t g c a t t t a a a a t a t a t g a g g g t t c t a a a a a t t t t  
 a t c c t t g c g t t g a a a t a a a a g g c 6 2 4 0  
 t t c t c c c g c a a a g t a t t a c a g g g t c a t a a t g t t t t g  
 g t a c a a c c g a t t t a g c t t a t g 6 3 0 0  
 c t c t g a g g c t t a t t t g c t t a a t t c t t t g c  
 c t t g c c t g t a t g a t t t a t t g g a 6 3 6 0  
 t g t t g g a a g t t c c t g a t g c g g t a t t t t c t c c t t a c g c a  
 t c t g t g c g g t a t t t t c t c a c c g c 6 4 2 0  
 a t a t g g t g c a c t c t c a g t a c a a t c t g c t c t g a t g c c g c  
 a t a g t t a a g c c a g c c c c g a c a c 6 4 8 0  
 c c g c c a a c a c c c g c t g a c g c g c c c t g a c g g g c t t g t c t  
 g c t c c c g g c a t c c g c t t a c a g a 6 5 4 0  
 c a a g c t g t g a c c g t c t c c g g g a g c t g c a t g t g t c a g a g  
 g t t t c a c c g t c a t c a c c g a a a 6 6 0 0  
 c g c g c g a g a c g a a a g g g c c t c g t g a t a c g c c t a t t t t 50

at aggttaatgt catgataata 6660  
 atggtttctt agacgtcagg tggcacttt cggggaaa  
 tg tgcgcggaac ccctatttgt 6720  
 ttattttctt aaatacattc aaatatgtat ccgctcat  
 ga gacaataacc ctgataaatg 6780  
 cttcaataat attgaaaaag gaagagatgt agtattca  
 ac atttccgtgt cgcccttatt 6840  
 ccctttttg cggcatttg ccctccctgtt tttgctca  
 cc cagaaacgct ggtgaaagta 6900  
 aaagatgctg aagatcagt gggtgacaga gtgggtta 10  
 ca tcgaactggatctcaacagc 6960  
 ggttaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttt  
 tc caatgatgag cactttaaa 7020  
 gttctgctat gtggcgccgt attatcccgat attgacgc  
 cg ggcaagagca actcggtcgc 7080  
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactc  
 ac cagtcacaga aaagcatctt 7140  
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgc  
 ca taaccatgag tgataaacact 7200  
 gcgcccaact tacttctgac aacgatcggaa ggaccgaa  
 gg agctaaccgc ttttttgac 7260  
 aacatggggg atcatgtAAC tcgccttgat cgttggaa  
 ac cggagctgaa tgaagccata 7320  
 ccaaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaat  
 gg caacaacggtt gcgcaaaacta 7380  
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaaca  
 at taatagactg gatggaggcg 7440  
 gataaagttt caggaccact tctgcgcctcg gccccttcc  
 gg ctggctggtt tattgctgat 7500  
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcat 30  
 tg cagcactggg gccagatgg 7560  
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggag  
 tc aggcaactat ggatgaacga 7620  
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaa  
 gc attggtaact gtcagaccaa 7680  
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttca  
 tt tttaatttaa aaggatctag 7740  
 gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccc  
 tt aacgtgagtt ttctgttccac 7800  
 tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttc  
 tt gagatccttt tttctgccc 7860  
 gtaatctgct gcttgc当地 aaaaaaaccacccgctacc  
 ag cgggtggttt gttgc当地 7920  
 caagagctac caactcttt tccgaaggta actggctt  
 ca gcaagagcga gataccaaat 7980  
 actgtccctt tagtgtagcc gttagttaggc caccactt  
 ca agaactctgt agcacccgctg 8040  
 acataacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgc  
 tg ccagtgccgat taagtcgtgt 8100  
 cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataa 50

gg c g c a g c g g t c g g g c t g a a c g 8 1 6 0  
 g g g g g t t c g t g c a c a c a g c c c a g c t t g g a g c g a a c g a c  
 c t a c a c c g a a c t g a g a t a c c t a 8 2 2 0  
 c a g c g t g a g c t a t g a g a a a g c g c c a c g c t t c c c g a a g g  
 g a g a a a g g c g g a c a g g t a t c c g 8 2 8 0  
 g t a a g c g g c a g g g t c g g a a c a g g a g a g c g c a c g a g g g a  
 g c t t c c a g g g g g a a a c g c c t g g 8 3 4 0  
 t a t c t t t a t a g t c c t g t c g g g t t t c g c c a c c t c t g a c t  
 t g a g c g t c g a t t t t g t g a t g c 8 4 0 0  
 t c g t c a g g g g g g c g g a g c c t a t g g a a a a a c g c c a g c a a 10  
 c g c g g c c t t t t t a c g g t t c c t g 8 4 6 0  
 g c c t t t t g c t g c c t t t g c t c a c a t g t t c t t t c c t g c  
 g t t a t c c c c t g a t t c t g t g g a t 8 5 2 0  
 a a c c g t a t t a c c g g g t t t g a g t g a g c t g a t a c c g c t c g  
 c c g c a g c c g a a c g a c c g a g c g c 8 5 8 0  
 a g c g a g t c a g t g a g c g a c c a a g c g g a a g a g c 8 6 1 1  
 < 2 1 0 > 4  
 < 2 1 1 > 5 6 4  
 < 2 1 2 > DNA  
 < 2 1 3 > アデノ随伴ウイルス 20  
 < 4 0 0 > 4  
 c a g c c a c t a t g g g t c t a g g c t g c c c a t g t a a g g a g g c a  
 a g g c c t g g g g a c a c c c g a g a t g 6 0  
 c c t g g t t a t a a t t a a c c c a g a c a t g t g g c t g c t c c c c c  
 c c c c c a a c a c c t g c t g c c t g a g 1 2 0  
 c c t c a c c c c a c c c c g g t g c c t g g g t c t t a g g c t c t g t  
 a c a c c a t g g a g g a g a a g c t c g c 1 8 0  
 t c t a a a a a t a a c c c t g t c c c t g g t g g g c t g t g g g g a c  
 t g a g g g c a g g c t g t a a c a g g c t 2 4 0  
 t g g g g g c c a g g c t t a t a c g t g c c t g g g g a c t c c c a a a g 30  
 t a t t a c t g t t c c a t g t t c c c g g 3 0 0  
 c g a a g g g c c a g c t g t c c c c g c c a g c t a g a c t c a g c a c  
 t t a g t t a g g a a c c a g t g a g c a 3 6 0  
 a g t c a g c c c t t g g g g c a g c c c a t a c a a g g c c a t g g g g c  
 t g g g c a a g c t g c a c g c c t g g g t 4 2 0  
 c c g g g g g t g g g c a c g g t g c c c g g g c a a c g a g c t g a a a g c  
 t c a t c t g c t c t c a g g g g c c c c t 4 8 0  
 c c c t g g g g a c a g c c c c t c c t g g c t a g t c a c a c c t g t a  
 g g c t c c t c t a t a t a a c c c a g g g 5 4 0  
 g c a c a g g g g c t g c c c c c g g g t c a c 5 6 4 40  
 < 2 1 0 > 5  
 < 2 1 1 > 8 4 0 9  
 < 2 1 2 > DNA  
 < 2 1 3 > アデノ随伴ウイルス  
 < 4 0 0 > 5  
 g c c c c a a t a c g c a a a c c g c c t c t c c c c g c g c g t t g g c c g  
 a t t c a t t a a t g c a g c t g g c g c g 6 0  
 c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g c c c g g g c a a a g c c c c g g g  
 c g t c g g g c g a c c t t t g g t c g c c 1 2 0  
 c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c a g a g a g g g a g g g a g t g 50

g c c a a c t c c a t c a c t a g g g g t t 1 8 0  
 c c t t g t a g t t a a t g a t t a a c c c g c c a t g c t a a t t a t c t  
 a c g t a g c c a t g t c t a g a c a g c c 2 4 0  
 a c t a t g g g t c t a g g c t g c c c a t g t a a g g a g g c a a g g c c  
 t g g g a c a c c c g a g a t g c c t g g 3 0 0  
 t t a t a a t t a a c c c a g a c a t g t g g c t g c t c c c c c c c c c c  
 a a c a c c t g c t g c c t g a g c c t c a 3 6 0  
 c c c c c a c c c c g g t g c c t g g g t c t t a g g c t c t c t g t a c a c c  
 a t g g a g g a g a a g c t c g c t c t a a 4 2 0  
 a a a t a a c c c t g t c c c t g g t g g g c t g a g g 10  
 g c a g g c t g t a a c a g g c t t g g g g g a c t g a g g  
 g c c a g g g c t t a t a c g t g c c t g g g a c t c c c a a a g t a t t a  
 c t g t t c c a t g t t c c c g g c g a a g 5 4 0  
 g g c c a g c t g t c c c c c g c c a g c t a g a c t c a g c a c t t a g t  
 t t a g g a a c c a g t g a g c a a g t c a 6 0 0  
 g c c c t t g g g g c a g c c c a t a c a a g g c c a t g g g g c t g g g c  
 a a g c t g c a c g c c t g g g t c c g g g 6 6 0  
 g t g g g c a c g g t g c c c c g g g c a a c g a g c t g a a a g c t c a t c  
 t g c t c t c a g g g g c c c c t c c c t g 7 2 0  
 g g g a c a g c c c c t c c t g g c t a g t c a c a c c c t g t a g g c t c  
 c t c t a t a a c c c a g g g g c a c a 7 8 0  
 g g g g c t g c c c c c g g g g t c a c c a c c a c c t c c a c a g c a c a g  
 a c a g a c a c t c a g g a g c c a 8 4 0  
 g c c a g g t a a g t t a g t c t t t t t t t t c a g g t  
 c c c g g a t c c g g t g g t g c a a 9 0 0  
 a t c a a a g a a c t g c t c c t c a g t g g a t g t t g c c t t a c t t  
 c t a g g c c t g t a c g g a a g t g t t a 9 6 0  
 c t t c t g c t c t a a a a g c t g c g g a t t g t a c c c g c g g c c g  
 c c a c c a t g c t g t g g t g g g a g g a 1 0 2 0  
 g g t g g a g g a t t g t a t g a a a g g g a g g a c g t g c a g a a g a 30  
 a g a c t t t t a c c a a g t g g g t g a a 1 0 8 0  
 c g c t c a g t t c a g c a a a t t t g g a a g c a g c a c a t c g a g a  
 a t c t g t t t t c c g a c c t g c a g g a 1 1 4 0  
 t g g g a g a c g g c t g c t g g a t c t g c t g g a a g g a c t g a c t g  
 g c c a g a a g c t g c c c a a a a g a g a a 1 2 0 0  
 g g g g a g g c a c t a g g g t g c a c g c c c t g a a c a a c g t g a a c a  
 a a g c t c t g a g a g t g c t g c a g g a a 1 2 6 0  
 c a a c a a c g t g g a t c t g g t g a a t a t t g g c a g t a c t g a t a  
 t c g t g g a c g g g a a c c a c a a a c t 1 3 2 0  
 g a c a c t g g g c c t g a t c t g g a a c a t t a t t c t g c a c t g g c  
 a g g t g a a a a a t g t g a t g a a g g a a 1 3 8 0  
 c a t c a t g g c c g g g c t g c a g c a g a c c a a t t c c g a g a a g a  
 t c c t g c t g t c t t g g g t g c g g g c a 1 4 4 0  
 g a g c a c c c g c a a c t a t c c c c a g g t g a a c g t g a t t a a c t  
 t c a c t a c a t c c t g g a g c g a c g g 1 5 0 0  
 g c t g g c c c t g a a t g c t c t g a t t c a c a g c c a c a g g c c t g  
 a t c t g t t c g a c t g g a a t a g c g t 1 5 6 0  
 g g t g t g c c a g c a g t c t g c c a c a c a g c g c c t g g a a c a t g  
 c c t t c a a t a t c g c t c g g t a c c a 1 6 2 0  
 g c t g g g g a t c g a a a a a c t g c t g g a c c c a g a g g a t g t g g 50

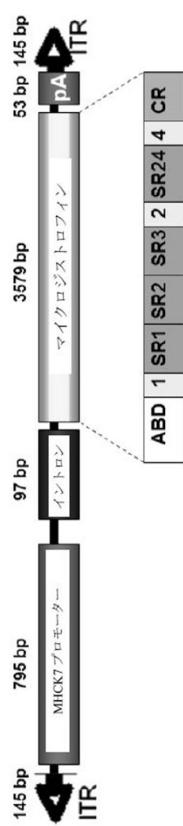
a c a c t a c a t a c c c a g a t a a a a a 1 6 8 0  
 g t c t a t t c t g a t g t a c a t t a c t a g c c t g t t c c a g g t g c  
 t g c c a c a g c a g g t g t c t a t t g a 1 7 4 0  
 a g c c a t t c a g g a g g t g g a a a t g c t g c c c c g c c c c c c a  
 a a g t g a c t a a a g a g g a g c a t t t 1 8 0 0  
 t c a g c t g c a t c a t c a g a t g c a t t a c a g c c a g c a g a t t a  
 c c g t g a g c c t g g c t c a g g g a t a 1 8 6 0  
 t g a g c g c a c c a g t a g t c c a a a c c a c g g t t c a a g t c c t  
 a c g c t t a t a c c c a g g c t g c c t a 1 9 2 0  
 c g t g a c a a c t a g c g a c c c t a c t a g a t c c c c c t t t c c a t 10  
 c c c a g c a c c t g g a g g c c c c a g a 1 9 8 0  
 g g a c a a g a g c t t t g g g t c c a g c c t g a t g g a a a g c g a g g  
 t g a a t c t g g a t c g g t a c c a g a c 2 0 4 0  
 a g c c c t g g a g g a g g t g c t g a g c t g g c t g c t g a g t g c t g  
 a a g a c a c a c t g c a g g c c c a g g g 2 1 0 0  
 c g a a a t t t c c a a t g a c g t g g a a g t g g t g a a g g a t c a g t  
 t c c a c a c a c a c g a g g g c t a t a t 2 1 6 0  
 g a t g g a c c t g a c a g c t c a c c a g g g g c g c g t g g g c a a t a  
 t c c t g c a g c t g g g c t c t a a a c t 2 2 2 0  
 g a t c g g c a c c g g g a a a c t g a g t g a g g a c g a g g a a c a g 20  
 a a g t g c a g g a g c a g a t g a a c c t 2 2 8 0  
 g c t g a a c a g c c g c t g g g a g t g t c t g a g a g t g g c t a g t a  
 t g g a g a a g c a g t c c a a c c t g c a 2 3 4 0  
 c c g g g t g c t g a t g g a c c t g c a g a a c c a g a a a c t g a a a g  
 a g c t g a a c g a c t g g c t g a c a a a 2 4 0 0  
 g a c t g a g g a a c g c a c a a g g a a g a t g g a g g a g g a g c c a c  
 t g g g a c c c g a c c t g g a g g a t c t 2 4 6 0  
 g a a g a g a c a g g g t g c a g c a t a a g g t g c t g c a g g a g g  
 a t c t g g a a c a g g a g c a g g t g c g 2 5 2 0  
 g g t g a a c t c c c t g a c a c a t a t g g t g g t g g t g g t g g a c g 30  
 a a t c t a g t g g a g a t c a c g c c a c 2 5 8 0  
 c g c c g c c c t g g a g g a a c a g c t g a a g g t g c t g g g g a c c  
 g g t g g g c c a a c a t t t g c c g g t g 2 6 4 0  
 g a c c g a g g a c a g g t g g g t g c t g c t g c a g g a c a t c c t g c  
 t g a a a t g g c a g a g g c t g c t g a c c g a 2 7 0 0  
 g g a g c a g t g t c t g t t a g t g c t t g g c t g a g c g a g a a a g  
 a g g a c g c c g t g a a c a a g a t c c a 2 7 6 0  
 c a c a a c c g g c t t t a a g g a t c a g a a c g a a a t g c t g t c t a  
 g c c t g c a g a a a c t g g c t g t g c t 2 8 2 0  
 g a a g g c c g a t c t g g a g a a a a a g a a g c a g a g c a t g g g c a 40  
 a a c t g t a t a g c c t g a a a a c a g g a 2 8 8 0  
 c c t g c t g a g c a c c c t g a a g a a c a a a g a g c g t g a c c c a g a  
 a g a c a g a a g c c t g g c t g g a t a a 2 9 4 0  
 c t t t g c c c g c t g c t g g g a c a a c t g g t g c a g a a a c t g g  
 a g a a a a g t a c a g c t c a g a t c t c 3 0 0 0  
 t c a g g c t g t g a c c a c a a c c c a g c c t a g c c t g a c c c a g a  
 c a a c c g t g a t g g a a a c c g t g a c 3 0 6 0  
 c a c c g t g a c a a c c c g c g a a c a g a t c c t g g t g a a a c a t g  
 c c c a g g a a g a g c t g c c a c c t c c 3 1 2 0  
 a c c t c c c c a g a a g a g a a c c c t g g a g c g g c t g c a g g 50

a g c t g c a g g a a g c c a c t g a c g a 3 1 8 0  
 a c t g g a c c t g a a g c t g a g g c a g g c c g a a g t g a t t a a g g  
 g g t c t t g g c a g c c t g t g g g c g a 3 2 4 0  
 t c t g c t g a t t g a t t c c c t g c a g g a c c a c t g g a a a a a g g  
 t g a a g g c t c t g a g a g g c g a a a t 3 3 0 0  
 t g c t c c a c t g a a g g a g a a c g t g a g t c a t g t g a a c g a t c  
 t g g c t a g a c a g c t g a c a a c a c t 3 3 6 0  
 g g g c a t c c a g c t g a g g c c a t a c a a t c t g a g c a c a c t g g  
 a g g a c c t g a a t a c c a g g t g g a a 3 4 2 0  
 g c t g c t g c a g g t g g a a g a c c g g g t g c g g c a g c 10  
 t g c a t g a g g c c c a t c g c g a c t t 3 4 8 0  
 c g g a c c a g c c a g c c a c t t t c t g a g g c a c a t c c g t g c  
 a g g g g c c c t g g g a g a g g g c c a t 3 5 4 0  
 t t c t c c c a a c a a g g t g c c c t a c t a t t a a t c a c g a g a  
 c c c a g a c c a c t t g t g g g a c c a 3 6 0 0  
 t c c c a a g a t g a c a g a a c t g t a c c a g t c c c t g g c c g a t c  
 t g a a c a a c g t g a g g t t a g c g c 3 6 6 0  
 t t a c a g a a c c g c t a t g a a g c t g a g a c g g c t g c a g a a g g  
 c c c t g t g c c t g g a t c t g c t g t c 3 7 2 0  
 c c t g t c c g c c g c c t g c g a t g c c t g a c g c a t a a t c 20  
 t g a a g c a g a a c g a t c a g c c a a t 3 7 8 0  
 g g a t a t c c t g c a g a t c a t c a a c t g c c t g a c c a c t a t c t  
 a c g a c a g g c t g g a g c a g g a g c a 3 8 4 0  
 c a a c a a c c t g g t g a a c g t g c c t c t g t g c g t g g a t a t g t  
 g c c t g a a c t g g c t g c t g a a c g t 3 9 0 0  
 g t a t g a c a c t g g g c g c a c c g g c c g g a t c a g a g t g c t g a  
 g t t t a a a a c t g g a t t a t c t c 3 9 6 0  
 c c t g t g t a a g g c c c a c c t g g a g g a c a a g t a c a g g t a c c  
 t g t t c a a g c a g g t g g c t a g t a g 4 0 2 0  
 c a c t g g a t t t g t g a c c a g c g c c t g g g a c t g c t g c 30  
 t g c a t g a t a g t a t c c a g a t t c c 4 0 8 0  
 t a g a c a g c t g g g a g g a g g g t g g c t a g t t t c g g a g g a t c t a  
 a c a t c g a a c c c a g c g t g c g c a g 4 1 4 0  
 c t g t t t c c a g t t t g c c a a t a a c a a a c c t g a a a t c g a g g  
 c t g c t c t g t t c c t g g a t t g g a t 4 2 0 0  
 g c g c c t g g a a c c a c a g a g g c a t g g t g t g g c t g c c t g t g c  
 t g c a c a g a g t g g c t g c c g c c g a 4 2 6 0  
 a a c t g c c a a g c a c c a g g c t a a a t g c a a c a t c t g c a a g g  
 a a t g t c c c a t t a t c g g c t t t c g 4 3 2 0  
 c t a c a g g a g t c t g a a a c a t t t a a c t a c g a t a t t t g c c 40  
 a g a g c t g c t t c t t t c c g g a a g 4 3 8 0  
 a g t g g c c a a a g g a c a c a a g a t g c a c t a c c c t a t g g t g g  
 a a t a t t g c a c c c a a c t a c a t c 4 4 4 0  
 t g g c g a a g a t g t g c g c g a t t t g c c a a g g t g c t g a a g a  
 a t a a g t t t c g g a c t a a g a g g t a 4 5 0 0  
 c t t c g c c a a g c a c c c c c g c a t g g g g t a t c t g c c a g t g c  
 a g a c a g t g c t g g a a g g a g a c a a 4 5 6 0  
 t a t g g a g a c c g a t a c a a t g t g a g c g g c c g c a a t a a a a g  
 a t c t t a t t t c a t t a g a t c t g 4 6 2 0  
 t g t g t t g g t t t t g t g t g t c t a g a g c a t g g c t a c g t a 50

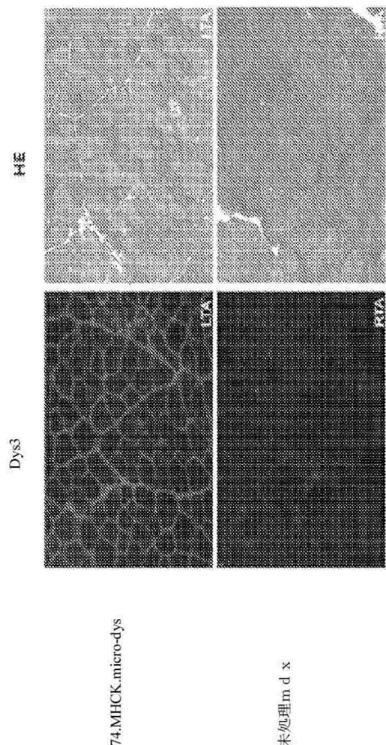
ga t a a g t a g c a t g g c g g g t t a a 4 6 8 0  
 t c a t t a a c t a c a a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c  
 a c t c c c t c t c t g c g c g c t c g c t 4 7 4 0  
 c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c g c c c g a c g c  
 c c g g g c t t t g c c c g g g c g c c t 4 8 0 0  
 c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c c a g c t g g c g t a a t a g c g a  
 a g a g g c c c g c a c c g a t c g c c c t 4 8 6 0  
 t c c c a a c a g t t g c g c a g c c t g a a t g g c g a a t g g a a g t t  
 c c a g a c g a t t g a g c g t c a a a a t 4 9 2 0  
 g t a g g t a t t t c c a t g a g c g t t t t t c c t g t t g c a a t g g c 10  
 t g g c g g t a a t a t t g t t c t g g a t 4 9 8 0  
 a t t a c c a g c a a g g c c g a t a g t t t g a t c a c t c a  
 g g c a a g t g a t g t t a t t a c t a a t 5 0 4 0  
 c a a a g a a g t a t t g c g a c a c g g t t a a t t t g c g t g a t g g  
 a c a g a c t c t t t t a c t c g g t g g c 5 1 0 0  
 c t c a c t g a t t a t a a a a a c a c t t c t c a g g a t t c t g g c g t  
 a c c g t t c c t g t c t a a a a t c c c t 5 1 6 0  
 t t a a t c g g c c t c c t g t t t a g c t c c c g c t c t g a t t c t a a  
 c g a g g a a a g c a c g t t a t a c g t g 5 2 2 0  
 c t c g t c a a a g c a a c c a t a g t a c g c g c c c t g t a g c g g c g  
 c a t t a a g c g c g g c g g g t g t g g t 5 2 8 0  
 g g t t a c g c g c a g c g t g a c c g c t a c a c t t g c c a g c g c c c  
 t a g c g c c c g c t c c t t c g c t t t 5 3 4 0  
 c t t c c c t t c c t t c t c g c c a c g t t c g c c c g g c t t t c c c c  
 g t c a a g c t c t a a a t c g g g g g c t 5 4 0 0  
 c c c t t t a g g g t t c c g a t t a g t g a t t a c g g c a c c t c g  
 a c c c c a a a a a a c t t g a t t a g g g 5 4 6 0  
 t g a t g g t t c a c g t a g t g g g c a t c g c c c t g a t a g a c g g  
 t t t t c g c c c t t t g a c g t t g g a 5 5 2 0  
 g t c c a c g t t c t t a a t a g t g a c t c t t g t t c c a a a c t g 30  
 g a a c a a c a c t c a a c c t a t c t c 5 5 8 0  
 g g t c t a t t c t t t g a t t t a a g g g a t t t g c c g a t t t  
 c g g c c t a t t g g t t a a a a a a t g a 5 6 4 0  
 g c t g a t t a a a a a a t t a a c g c g a a t t t a a c a a a a a  
 t a t t a a c g t t a a c a t t a a a t 5 7 0 0  
 a t t t g c t t a t a c a a t c t t c c t g t t t t t g g g g c t t t t c t  
 g a t t a t c a a c c g g g t a c a t a t 5 7 6 0  
 g a t t g a c a t g c t a g t t t a c g t a c a t a t 5 8 2 0  
 a g g c a a t g a c c t g a t a g c c t t t g t a g a g a c c t c t c a a a  
 a a t a g c t a c c c t c t c c g g c a t g 5 8 8 0  
 a a t t t a t c a g c t a g a a c g g t t g a a t a t c a t a t g a t g g  
 t g a t t g a c t g t c t c c g g c c t t 5 9 4 0  
 t c t c a c c c g t t t g a a t c t t a c c t a c a c a t t a c t c a g g  
 c a t t g c a t t a a a t a t a t g a g 6 0 0 0  
 g g t t c t a a a a a t t t t a t c c t t g a a a t a a a g g c  
 t t c t c c c g c a a a a g t a t t a c a g 6 0 6 0  
 g g t c a t a a t g t t t t g g t a c a a c c g a t t a g c t t t a t g  
 c t c t g a g g c t t t a t t g c t t a a t 6 1 2 0  
 t t t g c t a a t t c t t g c c t t g c c t g t a t g a t t t a t t g g a 50

t g t t g g a a g t t c c t g a t g c g g t 6 1 8 0  
 a t t t t c t c c t a c g c a t c t g t g c g g t a t t c a c a c c g c  
 a t a t g g t g c a c t c t c a g t a c a a 6 2 4 0  
 t c t g c t c t g a t g c c g c a t a g t t a a g c c a g c c c c g a c a c  
 c c g c c a a c a c c c g c t g a c g c g c 6 3 0 0  
 c c t g a c g g g c t t g t c t g c t c c c g g c a t c c g c t t a c a g a  
 c a a g c t g t g a c c g t c t c c g g g a 6 3 6 0  
 g c t g c a t g t g t c a g a g g t t t c a c c g t c a t c a c c g a a a  
 c g c g c g a g a c g a a a g g g c c t c g 6 4 2 0  
 t g a t a c g c c t a t t t t a t a g g t t a t g t c a t g a t a a t a 10  
 a t g g t t t c t t a g a c g t c a g g t g 6 4 8 0  
 g c a c t t t c g g g g a a t g t g c g c g g a a c c c c t a t t g t  
 t t a t t t t c t a a a t a c a t t c a a 6 5 4 0  
 a t a t g t a t c c g c t c a t g a g a c a t a a c c c t g a t a a a t g  
 c t t c a a t a a t t g a a a a a g g a 6 6 0 0  
 a g a g t a t g a g t a t t c a a c a t t t c c g t g t c g c c c t t a t t  
 c c c t t t t g c g g c a t t t g c c 6 6 6 0  
 t t c c t g t t t t g c t c a c c c a g a a c g c t g g t g a a a g t a  
 a a a g a t g c t g a a g a t c a g t t g g 6 7 2 0  
 g t g c a c g a g t g g g t t a c a t c g a a c t g g a t c t c a a c a g c  
 g g t a a g a t c c t t g a g a g t t t c 6 7 8 0  
 g c c c c g a a g a a c g t t t c c a a t g a t g a g c a c t t t a a a  
 g t t c t g c t a t g t g g c g g t a t 6 8 4 0  
 t a t c c c g t a t t g a c g c c g g g c a a g a g c a a c t c g c  
 c g c a t a c a c t a t t c t c a g a a t g 6 9 0 0  
 a c t t g g t t g a g t a c t c a c c a g t c a c a g a a a a g c a t c t t  
 a c g g a t g g c a t g a c a g t a a g a g 6 9 6 0  
 a a t t a t g c a g t g c t g c c a t a a c a t g a g t g a t a a c a c t  
 g c g g c c a a c t t a c t t c t g a c a a 7 0 2 0  
 c g a t c g g a g g a c c g a a g g a g g c t a a c c g c t t t t t g c a c  
 a a c a t g g g g g a t c a g t a a c t c 7 0 8 0  
 g c c t t g a t c g t t g g g a a c c g g a g c t g a a t g a a g c c a t a  
 c c a a a c g a c g a g c g t g a c a c c a 7 1 4 0  
 c g a t g c c t g t a g c a a t g g c a a c a c g t t g c g c a a a c t a  
 t t a a c t g g c g a a c t a c t t a c t c 7 2 0 0  
 t a g c t t c c c g g c a a c a a t t a a t a g a c t g g a t g g a g g c g  
 g a t a a a g t t g c a g g a c c a c t t c 7 2 6 0  
 t g c g c t c g g c c c t t c c g g c t g g c t g g t t t a t t g c t g a t  
 a a a t c t g g a g c c g g t g a g c g t g 7 3 2 0  
 g g t c t c g c g g t a t c a t t g c a g c a c t g g g g c c a g a t g g t  
 a a g c c c t c c c g t a t c g t a g t t a 7 3 8 0  
 t c t a c a c g a c g g g g a g t c a g g c a a c t a t g g a t g a a c g a  
 a a a t a g a c a g a t c g c t g a g a t a g 7 4 4 0  
 g t g c c t c a c t g a t t a a g c a t g g t a a c t g t c a g a c c a a  
 g t t t a c t c a t a t a t a c t t a g a 7 5 0 0  
 t t g a t t a a a a c t t c a t t t t a a t t a a a a a g g a t c t a g  
 g t g a a g a t c c t t t t t g a t a a t c 7 5 6 0  
 t c a t g a c c a a a t c c c t t a a c g t g a g t t t t c g t t c c a c  
 t g a g c g t c a g a c c c c g t g a g a a a 7 6 2 0  
 a g a t c a a a g g a t c t t c t t g a g a t c c t t t t t t c t g c g c 50

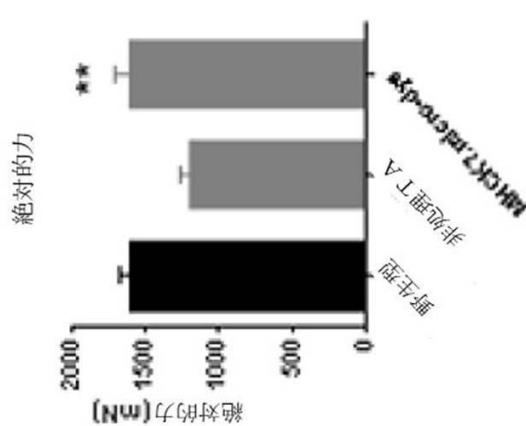
g t a a t c t g c t g c t t g c a a a c a a 7 6 8 0  
 a a a a a c c a c c g c t a c c a g c g g t g g t t t g t t t g c c c g g a t  
 c a a g a g c t a c c a a c t c t t t t c 7 7 4 0  
 c g a a g g t a a c t g g c t t c a g c a g a g c g c a g a t a c c a a a t  
 a c t g t c c t t c t a g t g t a g c c g t 7 8 0 0  
 a g t t a g g c c a c c a c t t c a a g a a c t c t g t a g c a c c g c g t  
 a c a t a c c t c g c t c t g c t a a t c c 7 8 6 0  
 t g t t a c c a g t g g c t g c c a g t g g c g a t a a g t c g t g t  
 c t t a c c g g g t t g g a c t c a a g a c 7 9 2 0  
 g a t a g t t a c c g g a t a a g g c g c a g c g g t c g g g c t g a a c g 10  
 g g g g g t t c g t g c a c a c a g c c c a 7 9 8 0  
 g c t t g g a g c g a a c g a c c t a c a c c g a a c t g a g a t a c c t a  
 c a g c g t g a g c t a t g a g a a a g c g 8 0 4 0  
 c c a c g c t t c c c g a a g g g a g a a a g g c g g a c a g g t a t c c g  
 g t a a g c g g c a g g g t c g g a a c a g 8 1 0 0  
 g a g a g c g c a c g a g g g a g c t t c c a g g g g g g a a a c g c c t g g  
 t a t c t t t a t a g t c c t g t c g g g t 8 1 6 0  
 t t c g c c a c c t c t g a c t t g a g c g t c g a t t t t t g t g a t g c  
 t c g t c a g g g g g g c g g a g c c t a t 8 2 2 0  
 g g a a a a a c g c c a g c a a c g c g g c t t t t a c g g t t c c t g 20  
 g c c t t t t g c t g g c c t t t t g c t c 8 2 8 0  
 a c a t g t t c t t t c c t g c g t t a t c c c c t g a t t c t g t g g a t  
 a a c c g t a t t a c c g g t t t g a g t 8 3 4 0  
 g a g c t g a t a c c g c t c g c c g c a g c c g a a c g a c c g a g c g c  
 a g c g a g t c a g t g a g c g a c c a a g 8 4 0 0  
 c g g a a g a g c 8 4 0 9

【図面】  
【図 1】

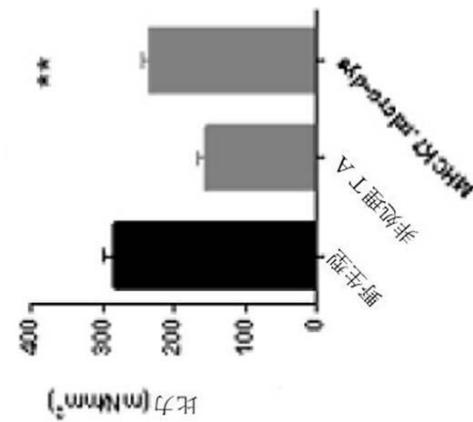
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

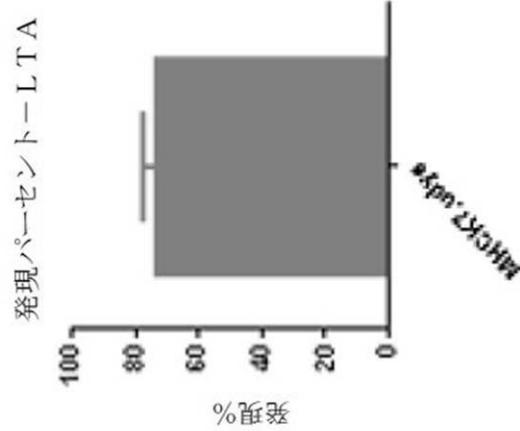
20

30

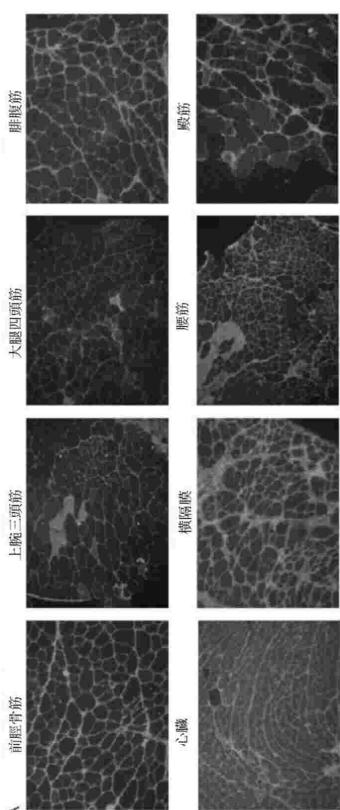
40

50

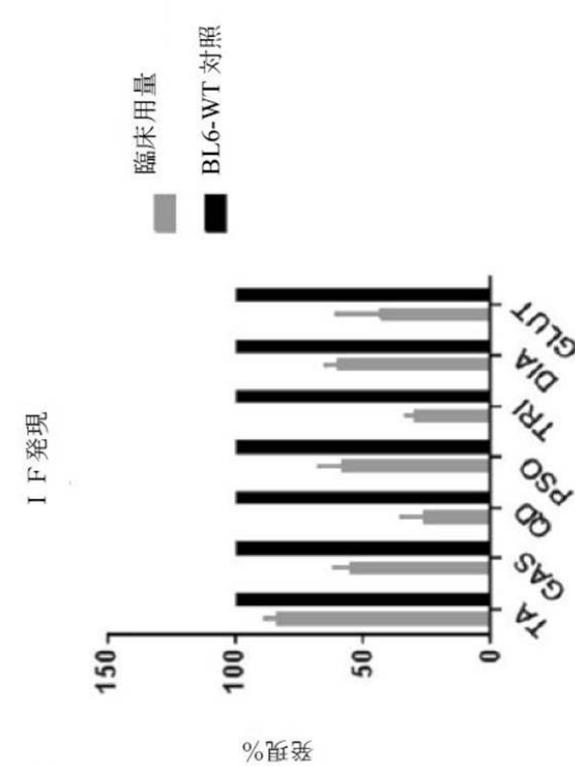
【図 3 C】



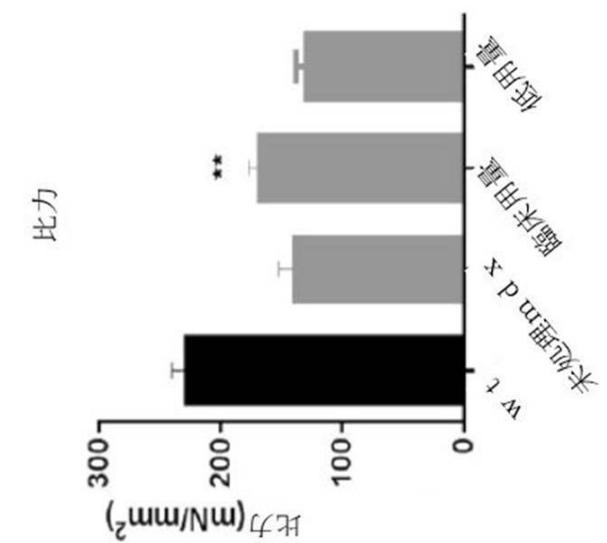
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

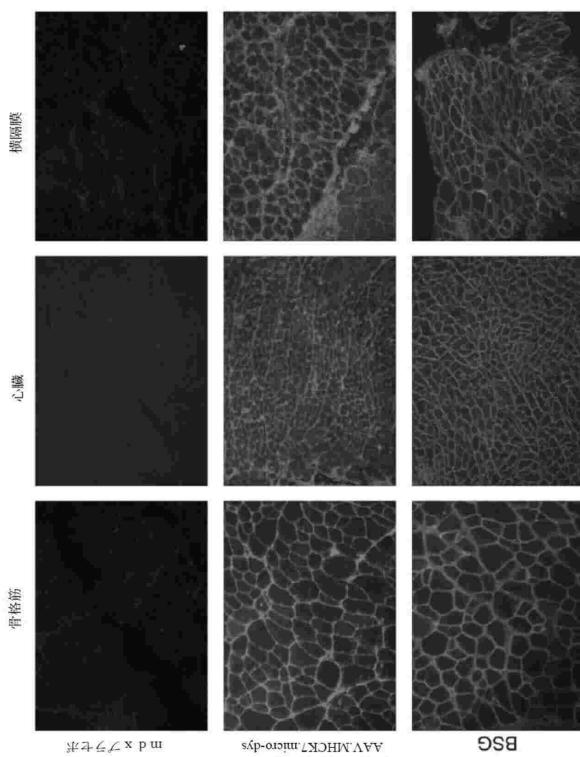
20

30

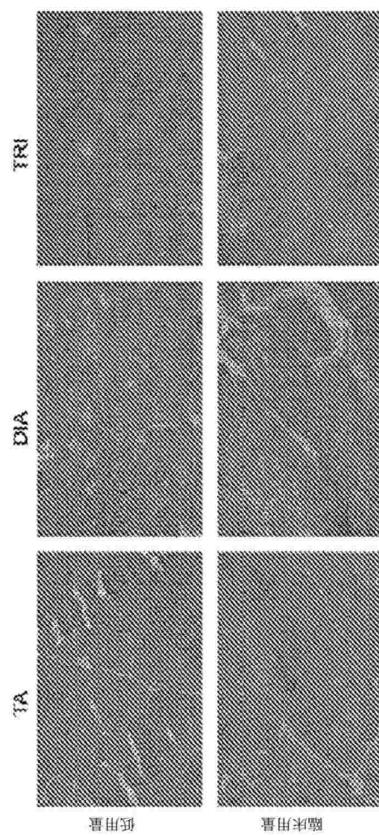
40

50

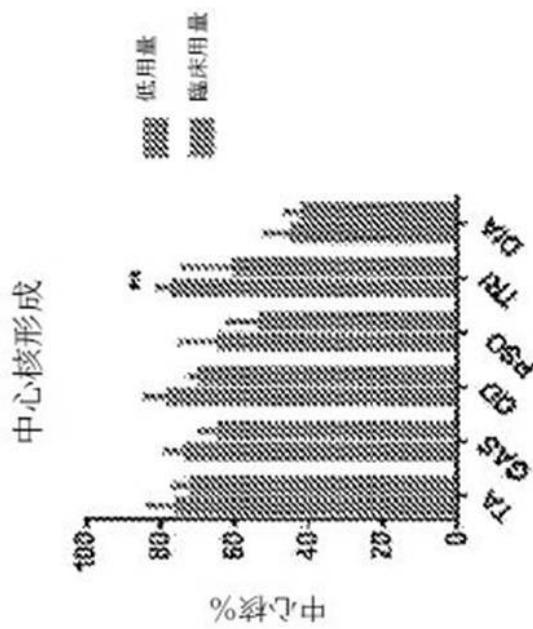
【図 5】



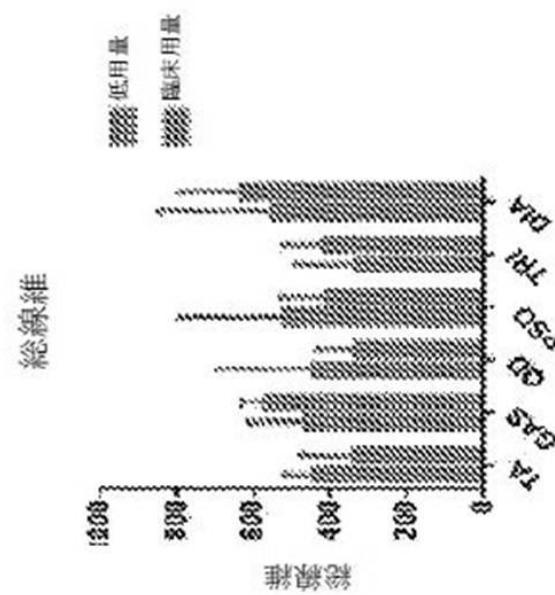
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



10

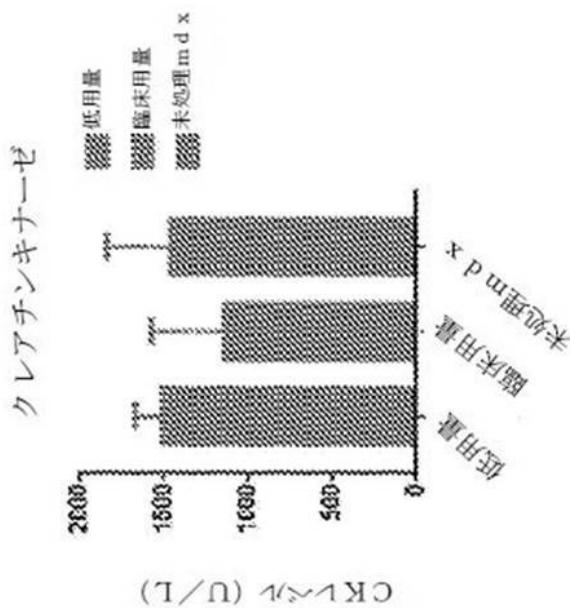
20

30

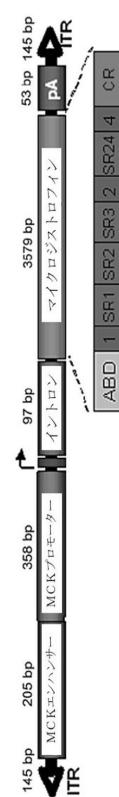
40

50

【図 6 D】

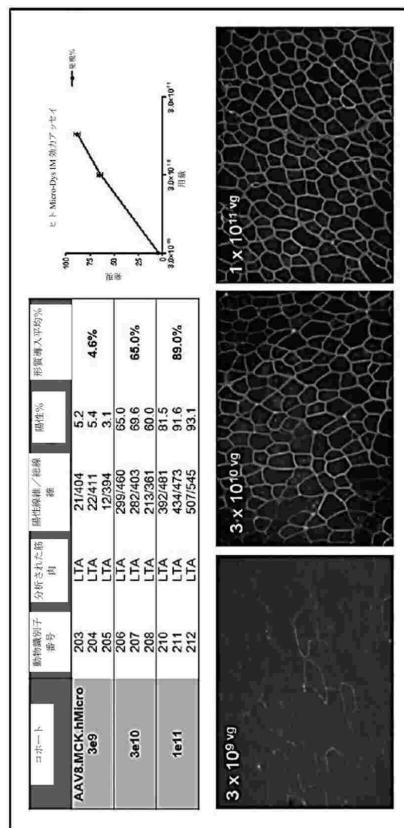


【図 7】

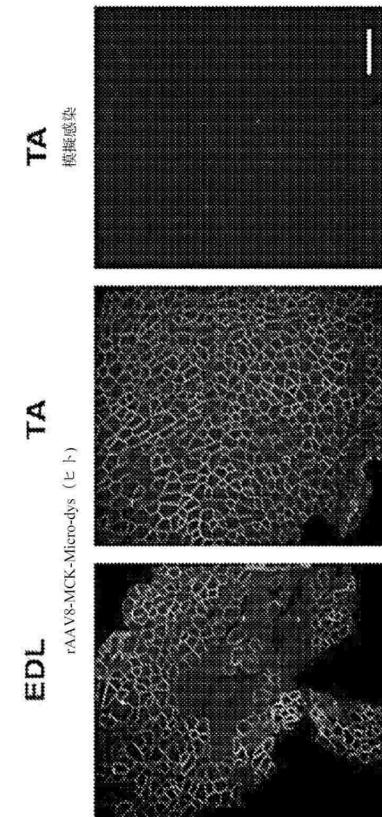


10

【図 8】



【図 9 A】



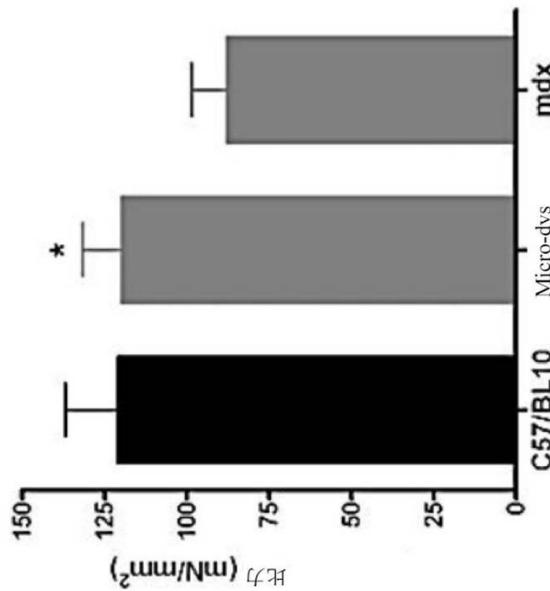
20

30

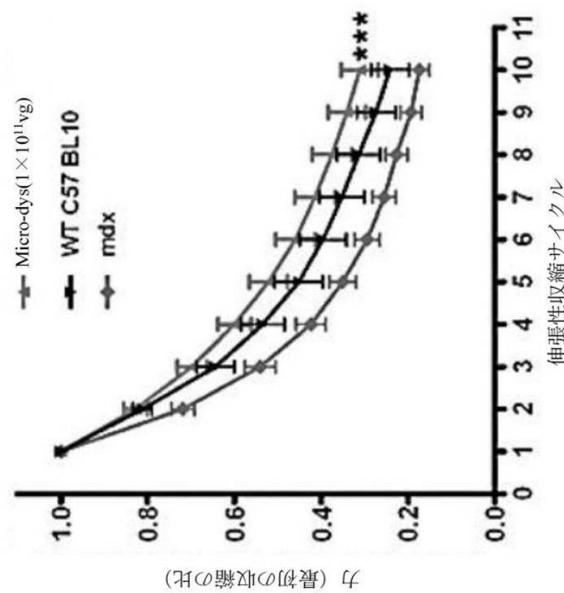
40

50

【図9B】



【図9C】



【図 10-1】

### 配列番号 3

### rAAVrh74 MHCK7 マイクロジストロフィン

### 主な特徴：

### MHCK7 プロモーター

### キメライントロン配列

## ヒトマイクロジストロフィン配列

## 【図10-2】

### 【図 10-3】

### 【図10-4】

GGGGTTCTGCCACCTCTGACTCTGAGCTCTGAACTTGTATGCTCTGCAAGGGGGGGCGGAGCTATGG  
AAAAACGGCCAAACGGCCGGCTTCTTACGGCTCTGGCCCTTCTGGCCCTTCTGCTCACATGTTCTT  
CTCTGGTATCTCTTACGGCTGGATAACCTGATACCGGGTTGAGTGGAGCTGATACCGCTCGCC  
CAGCGCAAGCGGCCAGCGCAGGGTCACTGAGCGGACCAAGCGGAAGAGC

### 【図 1.1 - 1】

## 配列番号 5

主な特徴：  
MCXプロモーター  
キメライントロン配列  
ヒトCDS最適化マイクロジストロフィン配列  
ポリAテール  
アンビシジン耐性  
pBR322 複製起點を有する p GEXプラスミド骨格

### 【図 1.1 - 2】

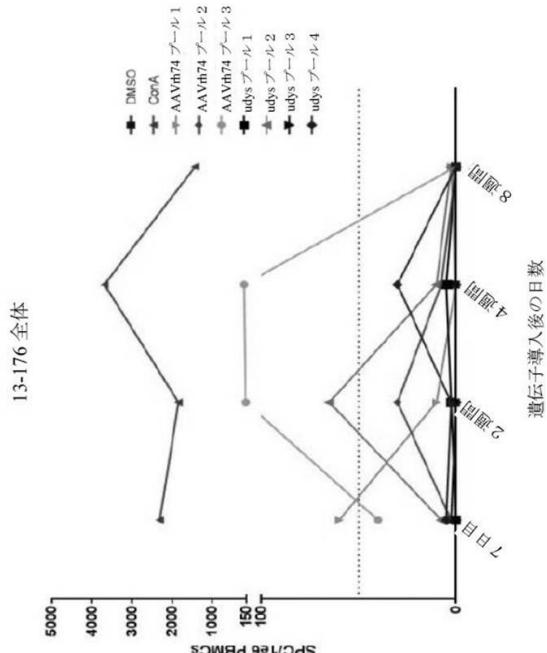
### 【図 1-1-3】

ACGGCTCCCTGCGGTGATATGTCGCTGACATGGCTGTCGAACTGTATGACACTGGGGCACCGG  
CCGGATCAGACTGGCTGAGTTAAACCTGGGATACTCCTCGTGTGAAAGGCCAACCTGGGAGAACAA  
TACAGGCTTCTGCTCAACCGGGCTGGCTGAGCTGAGGTTTGTGAGCAGGCGGGCTGGATCTGC  
TGCTGATGAGTATCTCAGGATCTCTAGACAGCTGGGGAGGGTGTGATCTGGGAGGATCATAC  
GAAACCCAGGGTGGCGAGCTGGTTCTGAGTTGCTTAACTACAAACCTGAACTGGGCTGCTGTC  
TGGATTGATGCCCTGGAACACAGGGCATGGTGTGCTGCCCTGTGTCGACAGACTGGCTGG  
CGGAAACTGCCCAGGACAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGCGCTTATCGGCTTGGCTA  
CAGGAGCTGAAACATTTAACTACGATATTGGCCAGGCTCTTTCGGGAAGAGTGGCCAAA  
GGACACAAGATGCACTACCCATGGTGAATATTGACCCCAAATCACATGGGAGATGTGGCG  
ATTTCGCAAGGTGCTGAGAAATAATGTTGGACTAAAGGGTACTTCGCGAACACCCCCGATGGG  
GTATCTGGCGAGTGGAGCAGTGTGCGGAAGGACAAATATGGAGGACGATAATGTGAGCGGGCC  
ATAAAAGATCTTATTTCTAGTATGCTGTGTTTTTGTTGTGCTGAGATCGCTGAGCTG  
GAAAGTACTGGCGGTTAATCAACTAACAGGAACCTAGTGTAGGATGGTGGCCATG  
CTCTGGCGCTGCTGCTGCTACTGGCGGGCGACCAAAAGTGTGGCCAGCGCCGGCTTGGCG  
GGCCGCCCTAGTGGCACAGGGCGCAGCTGGCGTAAAGCGGAAGAGGGCCGACCCGATCG  
CTTCCCACAGTGTGGCGAGCTGTAATGGCAATGGGAAGTTCGACAGGATTGCGCTCAAATGTAG  
GTATTTCTAGGAGCTTCTCTGTCGATGGCTGGGGTAATATTGTCGATTAACAGCAAG  
GGCGATAGTTGAGITCTCTACTCAGGCAAGTGATGTTAACTAATCAAAGAATTTGCGAAC  
GGTTAAATTGGCTGATGGCACAGCTTCTTACTGGTGGCTACTGATTAATAAAACACTTCAAG  
ATTCTGGCGTACCTGGCTCTGCTAAATCTTAACTGGCTCCCTTGTGAGCTCCGCTCTGATTTA  
ACGAGGAAGACGCTTACATGTCGTCGTCGAAACCAACTAGTACGCGGCTGTGAGCGGCAATTAA  
GGCGGGGGGTGTGGTTACCGGGCAGCTGGCGACCTGGCTATCTGGCGCTTACGCGGGCT  
CTTGGCTCTTCTCTCTTCTCTTCTGGCGACCTGGCGCTTCTGGCGCTAACGCTTAAATGGGGCT  
CCCTTAAAGGGTTCGGATTAGTGTGATTCAGGGACACTGGCGACCCAAAACACTGATTAGGGTGTGTT  
CACGCTAGTGGGACCTGGCGCTGATAGCGGTTTTCGGCTTACGCTGGGAGTCCACGCTTCTTAA  
ATGTTGACTCTGTCCTAACACTGGAAACACACTAACCTTACGGCTTATCTGGCTTAACTTGGTATTAAAGG  
ATTTCGGCAATTGGCGCTATGGTTAAAGGATGAGCTGATTTAACAAAATTAACCGGAAATTAA  
CAAATAATTAAAGCTTACAAATTAAATTTGGCTTATACATCTTCTGGCTTGGGGCTTCTGATTA  
TCACGGGGGTACATGATGGAGCATGCTGGTTTACGATTCAGGGCTACGTTCTGTTGCT  
AGACTCTCAGGCAATGACCTGTAGCTGCTTGTAGAGACCTCTCAAAATAGTACCTCTCCGGCATG  
ATTATTCAGTCAAGGCTGTTAATGATCATATGTTGAGCTGTTGACTGCTGGCTTCTCAGGCT  
GTTGAACTCTTACCTACATTACAGGCTTGGCTTAAATATGAGGGCTTCAAATTA  
TCTCTGGCTGAAATAAGGCTTCTCCGAAAGTATTACAGGGCTATAATGTTTGGTACAACAGG  
ATTAGCTTATGCTGCTGAGGCTTATTGCTTAATTCTGCTTCTGGCTGTGATGATTATT

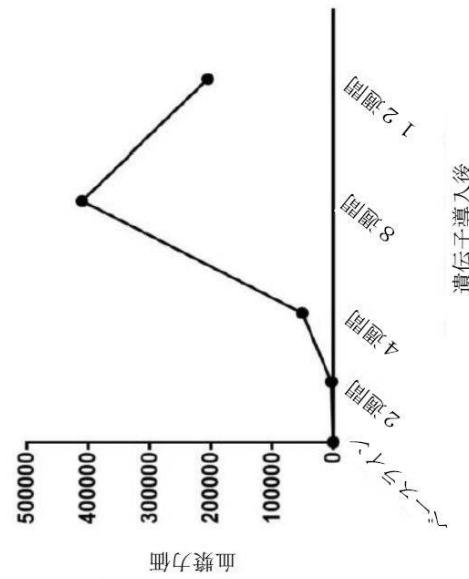
【図 1.1 - 4】

GGATGTTGGAAGTCTGATCGGTATTTCTCTACGCTCTGGCTTACCGCATAATG  
GTGCACTCTAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCTAGTTAACGCCAGCCCCACCCGCCA  
CTGAGCCGGCCCTGAGGGCTTGTCTGCTGCCGATCTACGACAACTGTGAGCTGCTTGG  
GAGCTGCTATGTCAGGGTTTACCGCTTACGCCGAAAGCCGGACGAGAACGGCTCTGAT  
ACGCTTATTTATAGGTTATGCTAGTATAATGGTTTCTAGACGCTAGTGGCTTCTTGG  
GAAATGTCGGGCAAGCTTCTTCTAGTATTTCTAAATCATCAAAATGTTATGCTCGCTATGAGAC  
ATAAACCTGATAAACTGCTTCAATAATGAAAGAAAGGAGATGAGATTCTAACATTCCGTTG  
GCCCTTATTCCTTCTGCGCTTCTGCTTCTACCCGAAAGACGCTGGTAAAGTA  
AAAGATGCTGAAGATCAGTGGTGCACAGSTGGTACATCGAACTTGTATCAGCCTGTAAG  
ATCTCTGAGAGTTTGGCCCGAAGAACGTTTCTTCAATGATGAGCACTTAAAGTCTGTTATGTTGG  
CGGGTATATTCCGTTAGTACGCCGGCAAGACCACTGGTGCCTGCACTACACTTCTCAGAA  
GACTTGTGTTGAGTACTCACCTGACAGAAAGACTCTGAGTGGCATGAGTAAAGATTAA  
GCAGTGTGCCCTATACTGAGTATAACACTGGCCCAACTTCTGACAACTGTCGGAGGAC  
GAAGGCTTACGGCTTCTTGGCACAATGGGGCTATGTTACCTCTGTTGTCGGGAA  
GAGCTGAATGAAAGCTACAACAGCAGGGCTGACACCGATGCTCTTGTACATTGCAACAG  
TTCGCAAAACTTAAACTGGCAACTTACTCTAGCTTCTGGCTGCCAACATTAAAGTACTGTTATGGA  
GGCGATAAAGTTCGAGGACACTTCTGGCTGGCCCTTCTGGCTGCTGGTTTATGCTGATAAA  
TCTGGAGCCGGTGAAGCTGGTCTCCGGTATCTTGTACGACTGGGCCAGATGGTAAAGCCCTC  
CGTATCTGAGTATCTACGACGGGGAGTCAGGCAACTTGTGATGAGCAAAATGAGCAGATCTGCT  
GAGATAGTGGCTCTACTGTTAAAGCACTGGTAACTGTCAGCCAGTTTCTATATACCTTACCTGAT  
TGTATTAAACCTTATTTTAAAGGAGTCTAGGTGAAGATCTTCTGATATCTCATGACAA  
ATACTCTTAACTGGTGGTTCTGCTGCTGCCAACAAAAGAACCCGCTTACAGGGTCTT  
GAGATCTGGCTTCTGGCTGAACTGGCTGCTGGCTGCTGGCTGCTGGCTGCTGGCTGCT  
TGTGTCGGCTGATCAAAGCTTACCAACCTTCTGGCTGAAAGGTAACCTGCTTACAGCAGGGCAGATAC  
CAAATACTGCTCTTCTAGTAGGGCTAGTAACTGCCAACCTTCAAGAACTCTGTTAGCCTGCTACA  
TACCTCTGCTGCTGTAATCTGTTACAGTGGCTGCTGGCTGCTGGCTGATAGCTGTTCTACGGGTT  
GGACTCAAGACGATGATTTCTGGTAAAGCCGAGCTGGCTGGCTGCTGCTGGCTGCTGGCT  
AGCCGAGCTGGAGGGCAAGCTTACCCGAACTGGTACAGGATACCTACAGCTGCTGAGCTTATGAGAAAGGG  
CAACGCTTCTGGCTGAAAGGGAAAGCCGGACAGGATACCTGGCTGAGCTGCTGGCTGAGGAG  
CGCCAGGGAGGGCTTACGGGGAAACGCTTGTGTTTCTTACTGCTGCTGGCTTCTGGCT  
GAGTCTGGCTGATTTGGTAAAGGGGGGGGGGGGGCTTGTGAGGAGCAACGAGCAG  
GGGGCTTCTTACGGCTTCTGGCTTCTGGCTTCTGGCTGCTGCTGCTGGCTGCT  
TCTCTGGTAAACCGTATTACCGGTTTGTAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAGCG  
CGCAGCAGTCTGAGCTGGCTGAGCAGCAACGCGGAAGAGC

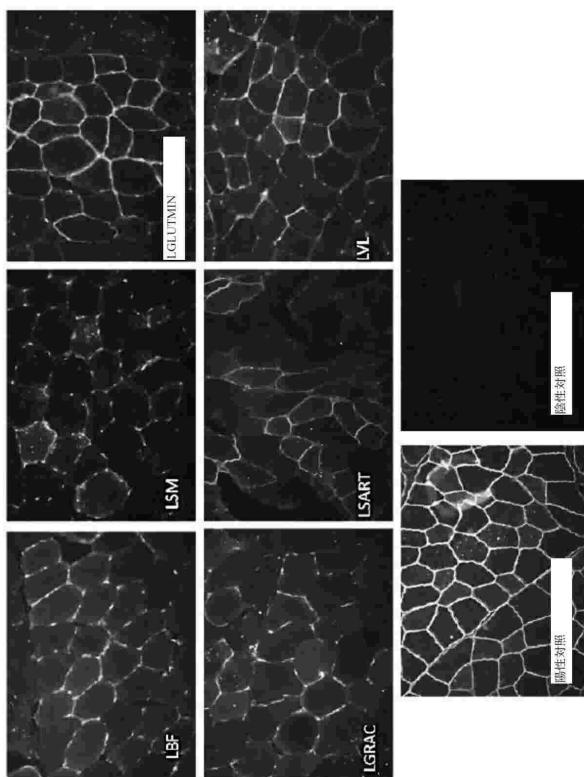
【図 1 2 A】



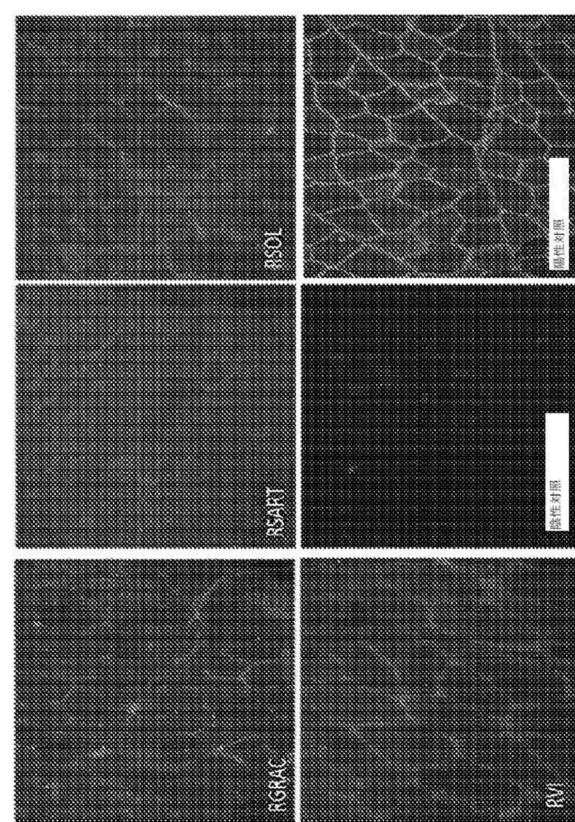
【図12B】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



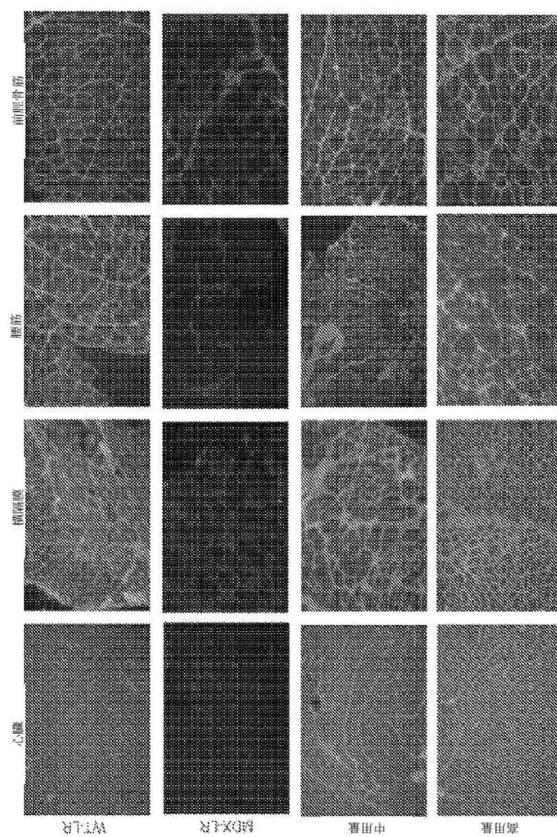
10

20

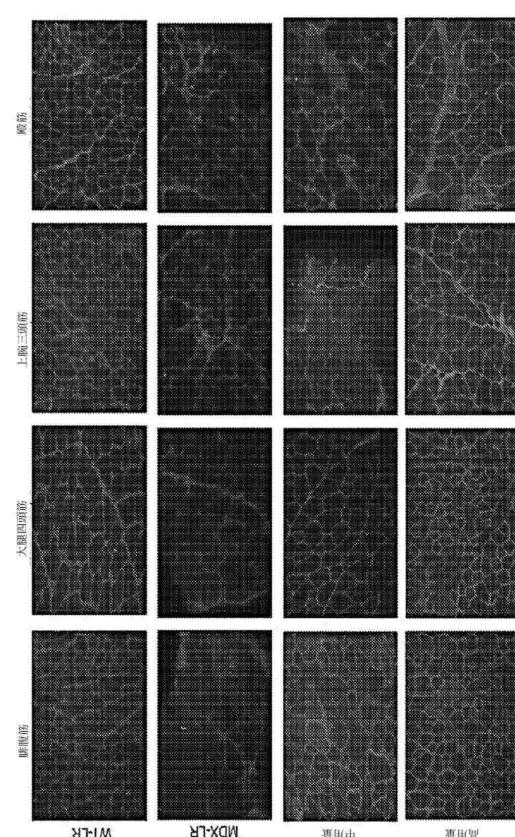
30

40

【図 1 4】

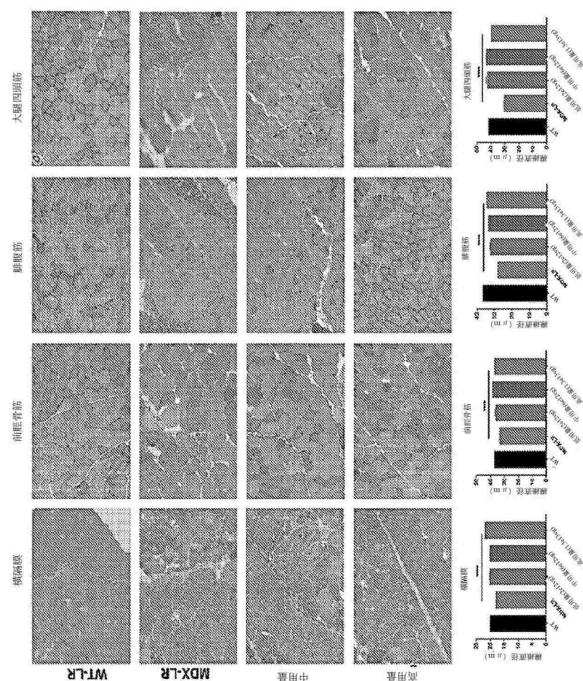


【図 1 5】

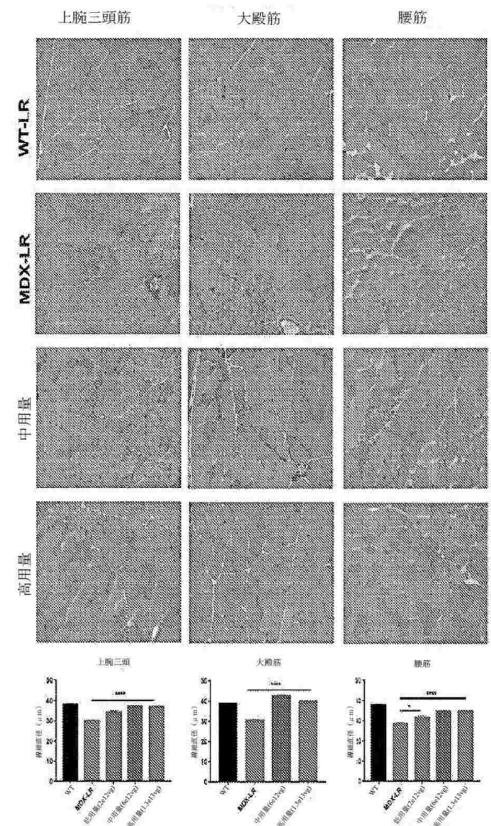


50

【図16】



【図17】



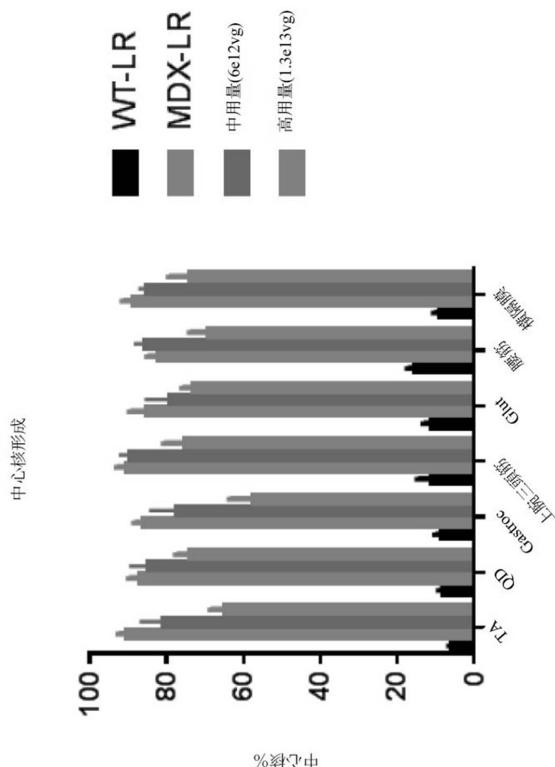
10

20

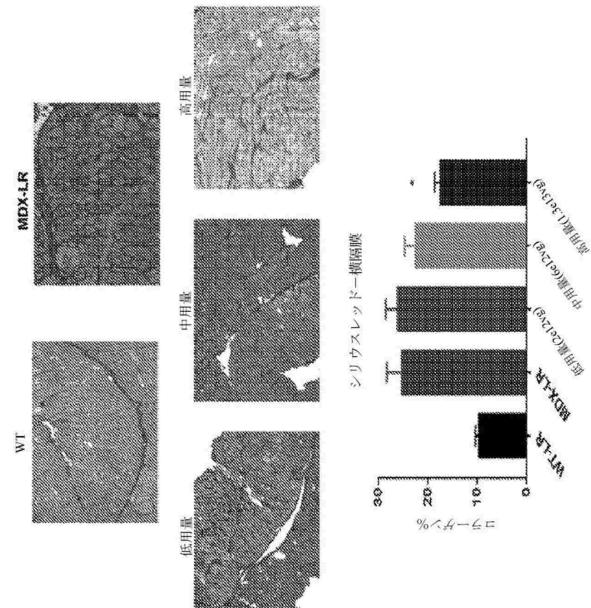
30

40

【図18】

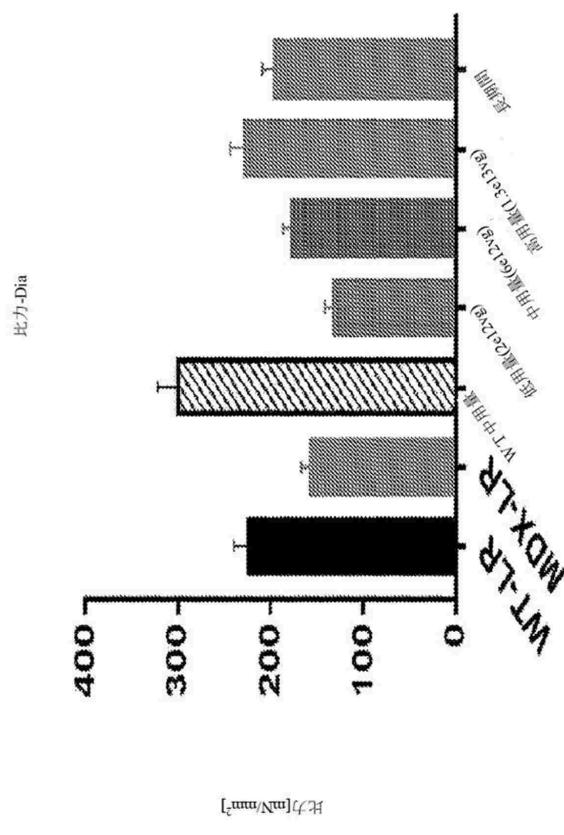


【図19】

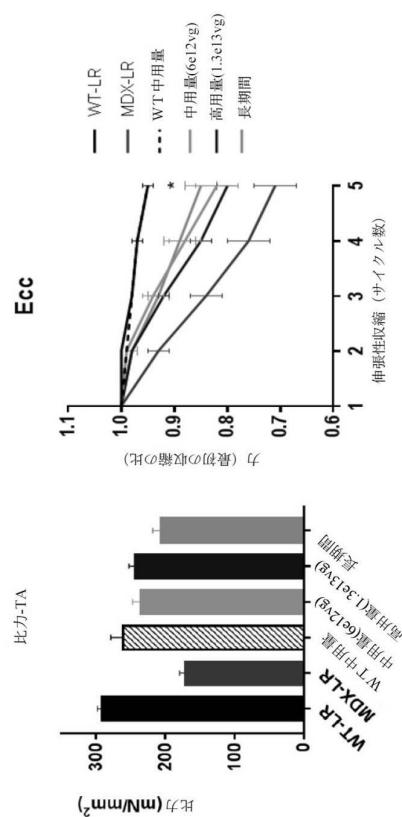


50

【図 2 0】



【図 2 1】



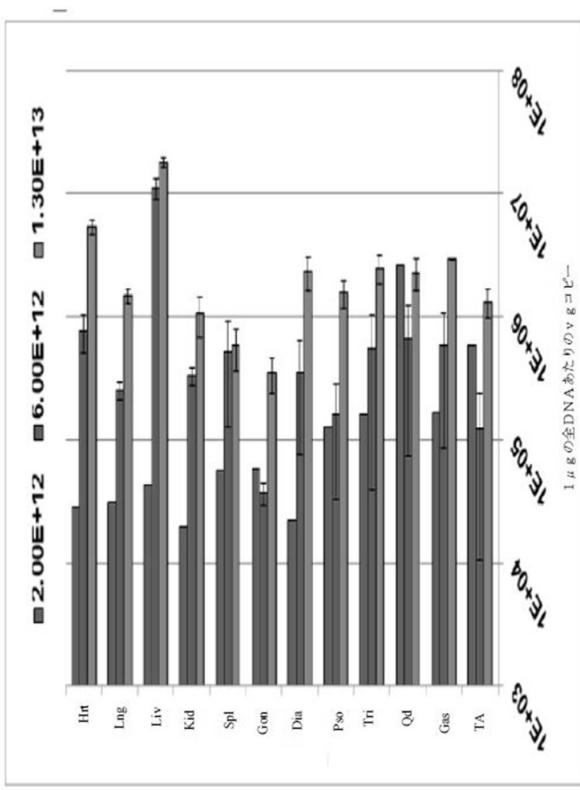
10

20

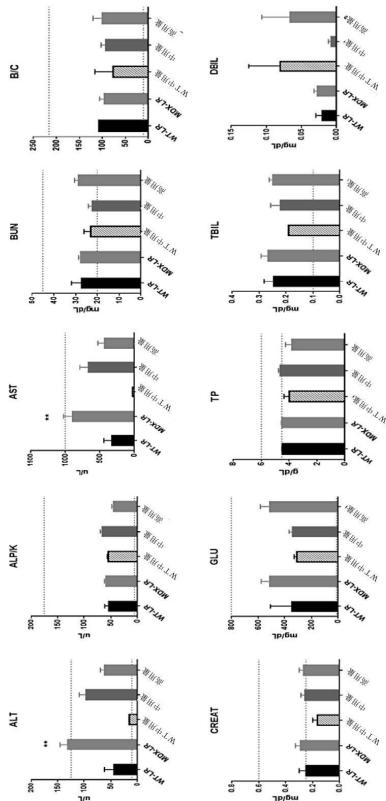
30

40

【図 2 2】

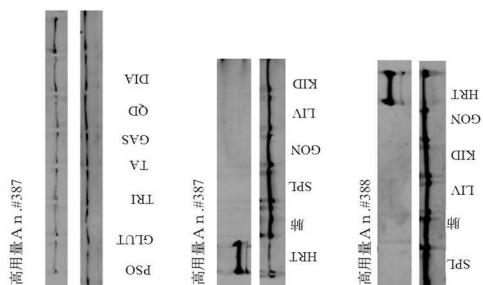


【図 2 3】

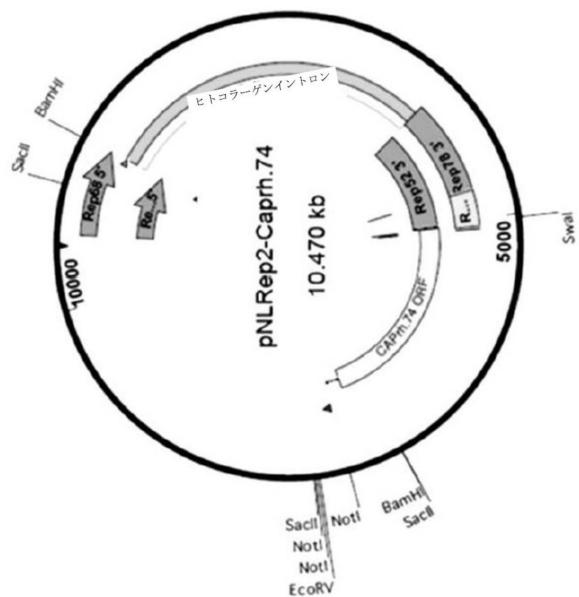


50

【図24】



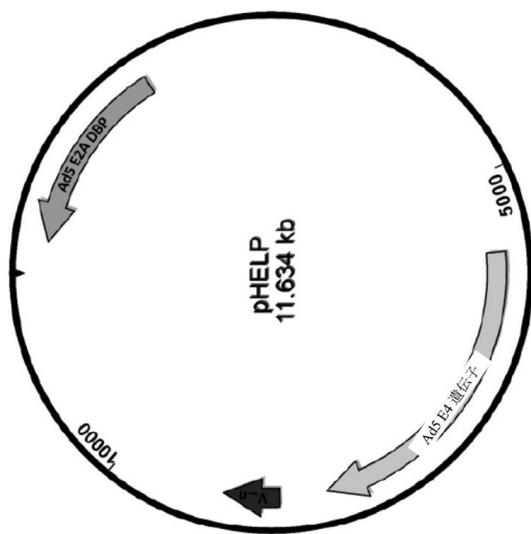
【図25】



10

20

### 【図26】



30

40

## 【配列表】

0007676111000001.app

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
C 1 2 N 15/12 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 0 5  
C 1 2 N 15/12

## (74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

## (72)発明者 ロディノ・カラパック, ルイーズ

アメリカ合衆国 オハイオ 43125, イー. グローブポート, ピックスビー リッジ ドライブ 4912

## (72)発明者 メンデル, ジェリー アール.

アメリカ合衆国 オハイオ 43235, コロンバス, コッパーフィールド ドライブ 8176

## 合議体

審判長 中村 浩

審判官 田中 耕一郎

審判官 深草 亜子

## (56)参考文献 国際公開第2015/197869号 (WO, A1)

特表2017-505126号公報 (JP, A)

特表2015-503924号公報 (JP, A)

特表2015-509711号公報 (JP, A)

Annals of Clinical and Translational Neurology, 2015, Vol.2, No.3, pp.256-270

Molecular Therapy, 2007, Vol.15, No.2, pp.320-329

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C12N15/00

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq