

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和6年10月15日(2024.10.15)

【国際公開番号】WO2022/076556

【公表番号】特表2023-545731(P2023-545731A)

【公表日】令和5年10月31日(2023.10.31)

【年通号数】公開公報(特許)2023-205

【出願番号】特願2023-521337(P2023-521337)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/54(2006.01)

C 1 2 N 15/864(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 5/077(2010.01)

A 0 1 K 67/027(2024.01)

A 6 1 K 35/76(2015.01)

A 6 1 P 21/00(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 35/12(2015.01)

【F I】

C 1 2 N 15/54 Z N A

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/077

A 0 1 K 67/027

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 21/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 35/12

【手続補正書】

【提出日】令和6年10月4日(2024.10.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えアデノウイルス随伴(AAV)ベクターであって、そのゲノム内に、5'から3'の方向に、

a) 5' AAV末端逆位配列(ITR)；

b) 筋肉特異的プロモーター；

c) イントロン配列；

d) 配列番号2または配列番号407に示されるヌクレオチド配列を有し、前記筋肉特異的プロモーターと動作可能に連結した、ヒトフクチン関連タンパク質(FKRP)をコ

10

20

30

40

50

ードする核酸；

e) F K R Pをコードする前記核酸と動作可能に連結したポリAシグナル配列；

f) 3' A A V I T R

を含む、組換えアデノウイルス随伴(A A V)ベクター。

【請求項2】

前記5' I T Rが、I T R 2 mである、請求項1に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項3】

前記3' I T Rが、I T R 2である、請求項1から2のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項4】

前記筋肉特異的プロモーターが、S y n 1 0 0 (配列番号3)である、請求項1から3のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項5】

前記イントロン配列が、V H 4 - I g - イントロン3 (配列番号4)またはその誘導体である、請求項1から4のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項6】

前記ポリAシグナル配列が、配列番号5である、請求項1から5のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項7】

前記筋肉特異的プロモーター、イントロン配列、F K R Pをコードする核酸、およびポリAシグナル配列が、配列番号1内に含まれる、請求項1から6のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項8】

血清型がA A V 9である、請求項1から7のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項9】

請求項1から8のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクターを含む医薬組成物。

【請求項10】

ジストログリカノパチー障害を有する対象を処置するための、請求項1から8のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクターを含む組成物、または請求項9に記載の医薬組成物であって、前記組成物または前記医薬組成物が前記対象に全身投与され、それにより、前記対象の筋組織における機能的F K R Pの発現を増加させるものであることを特徴とする、組成物または医薬組成物。

【請求項11】

前記ジストログリカノパチー障害が、肢帯型筋ジストロフィー2 Iである、請求項10に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項12】

単回用量が前記対象に投与されることを特徴とする、請求項10から11に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項13】

投与が静脈内注入によるものである、請求項10から12に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項14】

投与される前記用量が、約 1×10^{13} v g / k g から約 6×10^{13} v g / k g まで (例えば、約 3×10^{13} v g / k g) である、請求項10から13のいずれか一項に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項15】

前記対象において、投与後に、以下：

a) 前記対象の骨格筋および/もしくは心筋における - D G の機能的グリコシル化が実質的に増加すること；

10

20

30

40

50

b) 前記対象の血清クレアチンキナーゼレベルが実質的に低下すること；
 c) 前記対象の骨格筋におけるコラーゲン沈着が実質的に減少すること；
 d) 前記対象の筋組織（例えば、ヒラメ筋、横隔膜および/またはEDL）の *in vivo* 筋力分析が有意に向上すること；
 e) 前記対象の1回換気量が実質的に増加すること；ならびに/または
 f) 前記対象がトレッドミル試験において有意に長い距離を走ることができること
 のうちの1つまたは複数が生じる、請求項10から14に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項16】

前記対象が成体である、請求項10から15に記載の組成物または医薬組成物。

10

【請求項17】

ヒトフクチン関連タンパク質（FKRP）をコードする合成核酸であって、

a) 前記核酸の CpG 部位含量が、配列番号6の CpG 部位含量と比べて減少している；

b) その GC 含量が、配列番号6の GC 含量と比べて10%よりも大きく減少している；および/または

c) 前記核酸が、配列番号2に対して少なくとも80%の同一性を有する、合成核酸。

【請求項18】

前記コード配列の CpG 部位含量が、配列番号6の CpG 部位含量と比べて少なくとも50%減少している、請求項17に記載の核酸。

20

【請求項19】

前記コード配列の CpG 部位含量が、配列番号6の CpG 部位含量と比べて少なくとも75%、80%、85%、90%、95%減少している、請求項17から18に記載の核酸。

【請求項20】

前記コード配列の CpG 部位含量が、0%である、請求項17から19に記載の核酸。

【請求項21】

前記 GC 含量が、配列番号6の GC 含量と比べて15%よりも大きく減少している、請求項17に記載の合成核酸。

30

【請求項22】

配列番号2に対して少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、請求項17に記載の合成核酸。

【請求項23】

配列番号2または配列番号407に示される配列を有する、請求項17に記載の合成核酸。

【請求項24】

プロモーターと作動可能に連結している、請求項17から23に記載の合成核酸。

【請求項25】

前記プロモーターが、筋肉特異的プロモーターである、請求項24に記載の合成核酸。

40

【請求項26】

前記プロモーターが、合成プロモーターである、請求項24から25のいずれか一項に記載の合成核酸。

【請求項27】

前記プロモーターが、Syn100である、請求項24から26のいずれか一項に記載の合成核酸。

【請求項28】

前記プロモーターが、表1~4に列挙されているプロモーターから、または、表8~12から選択される、請求項23から26のいずれか一項に記載の合成核酸。

50

【請求項 29】

前記プロモーターが、クレアチンキナーゼ (CK) プロモーター、ニワトリ - アクチンプロモーター (CB) である、請求項 24 から 25 のいずれか一項に記載の合成核酸。

【請求項 30】

エンハンサー配列をさらに含む、請求項 17 から 29 のいずれか一項に記載の合成核酸。

【請求項 31】

前記エンハンサー配列が、CMVエンハンサー、筋肉クレアチンキナーゼエンハンサー、および/またはミオシン軽鎖エンハンサーを含む、請求項 30 に記載の合成核酸。

【請求項 32】

a) 5' および 3' AAV 末端逆位配列 (ITR) ;
b) 前記 5' ITR と 3' ITR との間に配置される、筋肉特異的プロモーターと動作可能に連結したヒトフクチン関連タンパク質 (FKRP) をコードするコード配列であって

i) CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて減少している ;

ii) GC 含量が、配列番号 6 の GC 含量と比べて 10% よりも大きく減少している ; および/または

iii) 配列番号 2 に対して少なくとも 80% の同一性を有する、

コード配列

を含む核酸。

【請求項 33】

前記筋肉特異的プロモーターと前記コード配列との間に配置されるイントロン配列をさらに含む、請求項 32 に記載の核酸。

【請求項 34】

前記イントロン配列が、VH4 - Ig - イントロン 3 (配列番号 4) またはその誘導体である、請求項 33 に記載の核酸。

【請求項 35】

前記コード配列の下流に配置される少なくとも 1 つのポリ A シグナル配列をさらに含む、請求項 32 から 34 に記載の核酸。

【請求項 36】

前記ポリ A シグナル配列が、配列番号 5 である、請求項 35 に記載の核酸。

【請求項 37】

前記 5' ITR が、ITR 2 m である、請求項 32 から 36 に記載の核酸。

【請求項 38】

前記 3' ITR が、ITR 2 である、請求項 32 から 37 に記載の核酸。

【請求項 39】

前記コード配列の前記 GC 含量が、配列番号 6 の GC 含量と比べて 15% よりも大きく減少している、請求項 32 から 38 に記載の核酸。

【請求項 40】

前記コード配列が、配列番号 2 に対して少なくとも 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する、請求項 32 から 40 に記載の核酸。

【請求項 41】

前記コード配列の CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて少なくとも 50% 減少している、請求項 32 から 40 に記載の核酸。

【請求項 42】

前記コード配列の CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% 減少している、請求項 32 から 41 に記載の核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 43】

前記コード配列の CpG 部位含量が、0%である、請求項 32 から 42 に記載の核酸。

【請求項 44】

前記コード配列が、配列番号 2 である、請求項 32 から 43 に記載の核酸配列。

【請求項 45】

請求項 17 から 44 のいずれか一項に記載の合成核酸を含むベクター。

【請求項 46】

ウイルスベクターである、請求項 45 に記載のベクター。

【請求項 47】

組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 46 に記載のベクター。 10

【請求項 48】

前記 AAV ベクターが、表 6 に列挙されている任意の血清型由来である、請求項 47 に記載のベクター。

【請求項 49】

前記 AAV ベクターが、AAV9 ベクターである、請求項 47 または請求項 48 に記載のベクター。

【請求項 50】

組換えアデノウイルス随伴 (AAV) ベクターであって、そのゲノム内に、

a) 5' AAV 末端逆位配列 (ITR) および 3' AAV ITR ;

b) 前記 5' ITR と 3' ITR との間に配置される、ヒトフクチン関連タンパク質 (FKRP) をコードする核酸であって、

i) CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて減少している ;

ii) GC 含量が、配列番号 6 の GC 含量と比べて 10% よりも大きく減少している ;
および / または

iii) 配列番号 2 に対して少なくとも 80% の同一性を有し、

筋肉特異的プロモーターと動作可能に連結している、

核酸

を含む、組換えアデノウイルス随伴 (AAV) ベクター。

【請求項 51】

前記 AAV ゲノムが、5' から 3' の方向に、 30

a) 前記 5' ITR、

b) 前記筋肉特異的プロモーター、

c) イントロン配列、

d) FKRP をコードする前記核酸 ; および、

e) 前記 3' ITR

を含む、請求項 50 に記載の組換え AAV ベクター。

【請求項 52】

前記筋肉特異的プロモーターが、MCK プロモーター、dMCK プロモーター、tMCK プロモーター、enh358MCK プロモーター、CK6 プロモーターおよび Syn100 プロモーター、表 1 ~ 4 または 8 ~ 12 に列挙されている任意のプロモーター、なら 40
びにその誘導体からなる群から選択される、請求項 50 から 51 のいずれかに記載の組換え AAV ベクター。

【請求項 53】

FKRP をコードする前記核酸の CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて減少している、請求項 50 から 52 のいずれかに記載の組換え AAV ベクター。

【請求項 54】

FKRP をコードする前記核酸の CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて少なくとも 50% 減少している、請求項 50 から 53 のいずれかに記載の組換え AAV ベクター。

【請求項 55】

F K R Pをコードする前記核酸のC p G部位含量が、配列番号6のC p G部位含量と比べて少なくとも75%、80%、85%、90%、95%減少している、請求項50から53のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

【請求項56】

F K R Pをコードする前記核酸のC p G部位含量が、0%である、請求項50から55のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

【請求項57】

F K R Pをコードする前記核酸のG C含量が、配列番号6のG C含量と比べて10%よりも大きく減少している、請求項50から56のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

10

【請求項58】

F K R Pをコードする前記核酸が、配列番号2に対して少なくとも80%の同一性を有する、請求項50から57のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

【請求項59】

F K R Pをコードする前記核酸が、配列番号2に示される配列を有する、請求項50から58に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項60】

前記F K R Pポリペプチドをコードする前記核酸に対して3'側、かつ前記3' I T R配列に対して5'側に配置される少なくとも1つのポリAシグナル配列をさらに含む、請求項50から59のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

20

【請求項61】

前記ポリAシグナル配列が、配列番号5である、請求項60に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項62】

前記I T Rが、挿入、欠失または置換を含む、請求項50から61のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

【請求項63】

前記I T R内の1つまたは複数のC p G部位が除去されている、請求項50から62に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項64】

30

前記5' I T Rが、I T R 2 mである、請求項50から63のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項65】

前記3' I T Rが、I T R 2である、請求項50から64のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項66】

前記イントロン配列が、V H 4 - I g - イントロン3 (配列番号4) またはその誘導体である、請求項50から65のいずれか一項に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項67】

キメラA A Vベクター、一倍体A A Vベクター、ハイブリッドA A Vベクターまたは倍数体A A Vベクターである、請求項50から66のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

40

【請求項68】

表6に列挙されている任意のA A V血清型のものである、請求項50から66のいずれかに記載の組換えA A Vベクター。

【請求項69】

前記血清型がA A V 9である、請求項68に記載の組換えA A Vベクター。

【請求項70】

表7から選択されるカプシドタンパク質または表6に列挙されているものからなる群の任意のA A V血清型、およびこれらの組合せを含む、請求項50から69のいずれかに記

50

載の組換え A A V ベクター。

【請求項 7 1】

請求項 5 0 から 7 0 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクターを、薬学的に許容される担体中に含む医薬組成物。

【請求項 7 2】

請求項 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸および/または請求項 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクターを含む形質転換された細胞。

【請求項 7 3】

請求項 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクター、および/または請求項 7 2 に記載の形質転換された細胞を含むトランスジェニック動物。

10

【請求項 7 4】

- ジストログリカン (- D G) のグリコシル化を増加させることを必要とする対象における - ジストログリカン (- D G) のグリコシル化を増加させるための、請求項 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクター、もしくは請求項 7 2 に記載の形質転換された細胞を含む組成物、または請求項 7 1 に記載の医薬組成物であって、前記組成物または前記医薬組成物が前記対象に投与され、前記対象において前記合成核酸が発現され、それにより、ヒト F K R P が産生され、- D G のグリコシル化が増加することを特徴とする、組成物または医薬組成物。

【請求項 7 5】

前記対象が、ジストログリカノパチー障害を有するまたはそれが発生するリスクがある、請求項 7 4 に記載の組成物または医薬組成物。

20

【請求項 7 6】

対象におけるジストログリカノパチー障害を処置するための、請求項 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクター、もしくは請求項 7 2 に記載の形質転換された細胞を含む組成物、または請求項 7 1 に記載の医薬組成物であって、前記組成物または前記医薬組成物が前記対象に投与され、前記対象において前記合成核酸が発現し、それにより、前記対象における前記ジストログリカノパチー障害を処置することを特徴とする、組成物または医薬組成物。

【請求項 7 7】

前記ジストログリカノパチー障害が、F K R P 異常に関連するものである、請求項 7 5 または 7 6 に記載の組成物または医薬組成物。

30

【請求項 7 8】

前記ジストログリカノパチー障害が、F K R P をコードする前記核酸の変異および/または - ジストログリカン (- D G) のグリコシル化不全を含む、請求項 7 5 から 7 7 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 7 9】

前記ジストログリカノパチー障害が、肢帯型筋ジストロフィー 2 I、先天性筋ジストロフィー (C M D 1 C)、ウォーカー - ワールブルグ症候群、筋眼脳病、またはこれらの任意の組合せである、請求項 7 5 から 7 8 に記載の組成物または医薬組成物。

40

【請求項 8 0】

ジストログリカノパチー障害を有する対象を処置するための、先行する請求項のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター、r A A V ゲノム、もしくは核酸配列を含む組成物、または医薬組成物であって、前記組成物または前記医薬組成物が前記対象に投与され、それにより、前記対象の筋組織における機能的 F K R P の発現を増加させることを特徴とする、組成物または医薬組成物。

【請求項 8 1】

単回用量が前記対象に投与されることを特徴とする、請求項 7 4 から 8 0 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 2】

50

投与が、全身性のものである、請求項 7 4 から 8 1 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 3】

投与が、静脈内注入によるものである、請求項 8 2 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 4】

投与後に、前記対象の骨格筋および / または心筋における - D G の機能的グリコシル化が実質的に増加する、請求項 7 4 から 8 3 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 5】

投与後に、前記対象の血清クレアチンキナーゼレベルが実質的に低下する、請求項 7 4 から 8 4 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 6】

投与後に、前記対象の骨格筋におけるコラーゲン沈着が実質的に減少する、請求項 7 4 から 8 5 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 7】

前記対象が、成体である、請求項 7 4 から 8 6 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 8 8】

前記対象が、若齢期個体である、請求項 7 4 から 8 6 に記載の組成物または医薬組成物

。

【請求項 8 9】

前記対象が、乳幼児期個体である、請求項 7 4 から 8 6 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 9 0】

前記対象が、投与前に有意な疾患病態を示している、請求項 7 4 から 8 9 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 9 1】

前記対象が、投与前に有意な疾患病態を示していない、請求項 7 4 から 8 9 に記載の組成物または医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 0】

本発明の態様は、対象におけるジストログリカノパチー障害を処置する方法であって、対象に、上記および本明細書に記載の核酸、上記および本明細書に記載のベクター（例えば、r A A V）、上記および本明細書に記載の医薬組成物、ならびに / または上記および本明細書に記載の形質転換された細胞を治療有効量で投与するステップを含み、前記対象において合成核酸が発現され、それにより、対象におけるジストログリカノパチー障害を処置する、方法にも関する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 5 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 5 5】

クレアチンキナーゼは、骨格筋が損傷を受けると放出される。クレアチンキナーゼのレベルから進行中の L G M D 疾患病態が読み取れる。P 4 4 8 L マウスにおける血清クレアチンキナーゼを分析した。図 6 に結果が示されている。空ビヒクルを受けた B L 6 マウスは、正常なクレアチンキナーゼレベルを示すものである。空ビヒクルを受けた P 4 4 8 L マウスは、疾患状態のクレアチンキナーゼレベルを示すものである。驚いたことに、任意の用量の A A V 9 - F K R P を受けた全ての P 4 4 8 L マウスで、血清クレアチンキナー

10

20

30

40

50

ゼが正常化の点まで低下した。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0465

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0465】

さらに、心疾患および肺疾患の進行を調査するために、心機能および呼吸器機能に関する生理学的評価を評価する。下肢のMRI評価を実施して、急性または慢性筋損傷および疾患進行（例えば、筋肉浮腫、脂肪置換、および消耗）を評価する。レシピエント対象の筋肉、横隔膜および心臓組織を標的とし、FKRP発現、 α -ジストログリカン含量、グリコシル化 α -ジストログリカン含量、コラーゲン含量を筋生検分析によって分析する。血清クレアチンキナーゼならびに他のプロテオミクスおよびメタボロミクスバイオマーカーも分析する。

10

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0588

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0588】

配列番号406の塩基対1295～3633（配列番号408）は、左側のITR（LITRm - 自己相補的）から右側のITR配列までを含むrAAVの配列である。一部の実施形態では、配列番号408を含むrAAVは、配列番号408のSyn100プロモーターが表1～4または表8～12から選択される合成筋肉プロモーターおよび/もしくはシス調節エレメント、またはそれらの任意の断片もしくはそれらの任意の組合せのいずれかで置き換えられた、配列番号3に記載のSyn100プロモーターを含む。

20

30

40

50

【化 9】

cctggc tgcagcatca gccagaaaac tccagagcca gaggaccag
 2041 aagggcctct gctgctggac cttagagtac agtgcttgtc agagagtttg aggcctttga
 2101 caatgctgtg cctgagctgg tggacagctt cctgcagcaa gatcctgctc agcctgtggt
 2161 ggtggctgct gatacaactgc cttatcctcc actggctctg cctagaatcc ccaatgttag
 2221 actggccctc ctgcagcctg ctctggatag acctgctgct gcttccagac ctgagacata
 2281 tgtggccact gagtttgtgg ccctggtgcc tgatggtgcc agagctgaag ctctggcct
 2341 gctggaaaga atggttgagg ccctgagagc tggatctgcc agactggttg ctgctcctgt
 2401 ggctacagcc aatcctgcca gatgtctggc cctgaatgtg tccctgagag aatggacagc
 2461 cagatatggt gctgccccag ctgctcctag atgtgatgct cttgatgggg atgctgtggt
 2521 cctgctgaga gccagggatc tgttcaatct gtctgccccca ctggccagac ctgtgggac
 2581 atctctgttt ctgcagacag ctctgagagg ctgggctgtg cagctgctgg atctcacctt
 2641 tgctgctgca agacagcctc ctctggccac agctcatgcc agatggaagg ctgagagaga
 2701 gggcagagct agaagggtg ctctgctcag agcactgggc atcagactgg tgccttggga
 2761 aggtggcaga cttgagtggg ttggctgcaa caaagaaacc accagatgct ttggcacagt
 2821 tgtgggagac acccctgctt acctgtatga ggaaagatgg accccacctt gctgtctgag
 2881 agccctgagg gaaacagcta gatatgttgt tggagtgctt gaggctgctg gtgtcagata
 2941 ctggctggaa ggtggaagtc tgctgggagc tgctaggcat ggggacatca tcccttggga
 3001 ctatgatgtg gacctgggca tctacctgga agatgtgggc aattgtgaac agctgagagg
 3061 ggctgaagct ggctctgttg tggatgagag aggccttctc tgggagaaaag ctgttgaggg
 3121 gaacttcttc agagtgcagt actctgagag caaccacctc catgtggatc tgtggccatt
 3181 ctaccccaga aatggggtca tgacaaagga cacctggctg gaccacagac aggatgtgga
 3241 attocctgag cactttctgc agcctctggt gccactgcct tttgctggat ttgtggctca
 3301 ggcccctaac aactacagaa gattcctgga actgaagttt ggccctgggg tcatagagaa
 3361 ccctcagtac cctaactctg cactgctgag cctgactgga tctggctgat gactcagacg

10

20

【化 10】

3421 gcctaataaa gagctcagat gcatcgatca gagtgtgttg gttttttgtg tggtttaaac
 3481 gggcccgag gaacccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgag ctgctctgct
 3541 cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt
 3601 gagcgagcga ggcgcagag agggagtggc caa (配列番号 408)

30

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

組換えアデノウイルス随伴 (AAV) ベクターであって、そのゲノム内に、5' から 3' の方向に、

a) 5' AAV 末端逆位配列 (ITR) ;

b) 筋肉特異的プロモーター ;

c) イントロン配列 ;

d) 配列番号 2 または配列番号 407 に示されるヌクレオチド配列を有し、前記筋肉特異的プロモーターと動作可能に連結した、ヒトフクチン関連タンパク質 (FKRP) をコードする核酸 ;

e) FKRP をコードする前記核酸と動作可能に連結したポリ A シグナル配列 ;

f) 3' AAV ITR

を含む、組換えアデノウイルス随伴 (AAV) ベクター。

40

(項目 2)

前記 5' ITR が、ITR 2 m である、項目 1 に記載の組換え AAV ベクター。

50

(項目 3)

前記 3' I T R が、I T R 2 である、項目 1 から 2 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 4)

前記筋肉特異的プロモーターが、S y n 1 0 0 (配列番号 3) である、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5)

前記イントロン配列が、V H 4 - I g - イントロン 3 (配列番号 4) またはその誘導体である、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6)

前記ポリ A シグナル配列が、配列番号 5 である、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 7)

前記筋肉特異的プロモーター、イントロン配列、F K R P をコードする核酸、およびポリ A シグナル配列が、配列番号 1 内に含まれる、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 8)

血清型が A A V 9 である、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 9)

項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクターを含む医薬組成物。

(項目 1 0)

ジストログリカノパチー障害を有する対象を処置するための方法であって、前記対象に、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター、および / または項目 9 に記載の医薬組成物を治療有効量で全身投与して、それにより、前記対象の筋組織における機能的 F K R P の発現を増加させるステップを含む、方法。

(項目 1 1)

前記ジストログリカノパチー障害が、肢帯型筋ジストロフィー 2 I である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記対象に単回用量を投与する、項目 1 0 から 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

投与が静脈内注入によるものである、項目 1 0 から 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

投与される前記用量が、約 1×10^{-13} v g / k g から約 6×10^{-13} v g / k g まで (例えば、約 3×10^{-13} v g / k g) である、項目 1 0 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5)

前記対象において、投与後に、以下：

a) 前記対象の骨格筋および / もしくは心筋における - D G の機能的グリコシル化が実質的に増加すること；

b) 前記対象の血清クレアチンキナーゼレベルが実質的に低下すること；

c) 前記対象の骨格筋におけるコラーゲン沈着が実質的に減少すること；

d) 前記対象の筋組織 (例えば、ヒラメ筋、横隔膜および / または E D L) の i n v i t r o 筋力分析が有意に向上すること；

e) 前記対象の 1 回換気量が実質的に増加すること；ならびに / または

f) 前記対象がトレッドミル試験において有意に長い距離を走ることができること
のうちの 1 つまたは複数が生じる、項目 1 0 から 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記対象が成体である、項目 1 0 から 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

10

20

30

40

50

ヒトフクチン関連タンパク質 (F K R P) をコードする合成核酸であって、
a) 前記核酸の C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて減少している；
b) その G C 含量が、配列番号 6 の G C 含量と比べて 1 0 % よりも大きく減少している
；および / または
c) 前記核酸が、配列番号 2 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する、
合成核酸。

(項目 1 8)

前記コード配列の C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて少なくとも
5 0 % 減少している、項目 1 7 に記載の核酸。

(項目 1 9)

前記コード配列の C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて少なくとも
7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 減少している、項目 1 7 から 1 8 に記載の核酸
。

(項目 2 0)

前記コード配列の C p G 部位含量が、0 % である、項目 1 7 から 1 9 に記載の核酸。

(項目 2 1)

前記 G C 含量が、配列番号 6 の G C 含量と比べて 1 5 % よりも大きく減少している、項
目 1 7 に記載の合成核酸。

(項目 2 2)

配列番号 2 に対して少なくとも 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8
7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9
7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する、項目 1 7 に記載の合成核酸。

(項目 2 3)

配列番号 2 または配列番号 4 0 7 に示される配列を有する、項目 1 7 に記載の合成核酸。

(項目 2 4)

プロモーターと作動可能に連結している、項目 1 7 から 2 3 に記載の合成核酸。

(項目 2 5)

前記プロモーターが、筋肉特異的プロモーターである、項目 2 4 に記載の合成核酸。

(項目 2 6)

前記プロモーターが、合成プロモーターである、項目 2 4 から 2 5 のいずれか一項に記
載の合成核酸。

(項目 2 7)

前記プロモーターが、S y n 1 0 0 である、項目 2 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の
合成核酸。

(項目 2 8)

前記プロモーターが、表 1 ~ 4 に列挙されているプロモーターから、または、表 8 ~ 1
2 から選択される、項目 2 3 から 2 6 のいずれか一項に記載の合成核酸。

(項目 2 9)

前記プロモーターが、クレアチンキナーゼ (C K) プロモーター、ニワトリ - アクチ
ンプロモーター (C B) である、項目 2 4 から 2 5 のいずれか一項に記載の合成核酸。

(項目 3 0)

エンハンサー配列をさらに含む、項目 1 7 から 2 9 のいずれか一項に記載の合成核酸。

(項目 3 1)

前記エンハンサー配列が、C M V エンハンサー、筋肉クレアチンキナーゼエンハンサー
、および / またはミオシン軽鎖エンハンサーを含む、項目 3 0 に記載の合成核酸。

(項目 3 2)

a) 5 ' および 3 ' A A V 末端逆位配列 (I T R) ；
b) 前記 5 ' I T R と 3 ' I T R との間に配置される、筋肉特異的プロモーターと動作可
能に連結したヒトフクチン関連タンパク質 (F K R P) をコードするコード配列であって
。

—

10

20

30

40

50

- i) CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて減少している；
- ii) GC 含量が、配列番号 6 の GC 含量と比べて 10% よりも大きく減少している；および/または
- iii) 配列番号 2 に対して少なくとも 80% の同一性を有する、
コード配列
を含む核酸。
 (項目 3 3)
- 前記筋肉特異的プロモーターと前記コード配列との間に配置されるイントロン配列をさらに含む、項目 3 2 に記載の核酸。
 (項目 3 4)
- 前記イントロン配列が、VH4 - Ig - イントロン 3 (配列番号 4) またはその誘導体である、項目 3 3 に記載の核酸。
 (項目 3 5)
- 前記コード配列の下流に配置される少なくとも 1 つのポリ A シグナル配列をさらに含む、項目 3 2 から 3 4 に記載の核酸。
 (項目 3 6)
- 前記ポリ A シグナル配列が、配列番号 5 である、項目 3 5 に記載の核酸。
 (項目 3 7)
- 前記 5' ITR が、ITR 2 m である、項目 3 2 から 3 6 に記載の核酸。
 (項目 3 8)
- 前記 3' ITR が、ITR 2 である、項目 3 2 から 3 7 に記載の核酸。
 (項目 3 9)
- 前記コード配列の前記 GC 含量が、配列番号 6 の GC 含量と比べて 15% よりも大きく減少している、項目 3 2 から 3 8 に記載の核酸。
 (項目 4 0)
- 前記コード配列が、配列番号 2 に対して少なくとも 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する、項目 3 2 から 4 0 に記載の核酸。
 (項目 4 1)
- 前記コード配列の CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて少なくとも 50% 減少している、項目 3 2 から 4 0 に記載の核酸。
 (項目 4 2)
- 前記コード配列の CpG 部位含量が、配列番号 6 の CpG 部位含量と比べて少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% 減少している、項目 3 2 から 4 1 に記載の核酸。
 (項目 4 3)
- 前記コード配列の CpG 部位含量が、0% である、項目 3 2 から 4 2 に記載の核酸。
 (項目 4 4)
- 前記コード配列が、配列番号 2 である、項目 3 2 から 4 3 に記載の核酸配列。
 (項目 4 5)
- 項目 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の合成核酸を含むベクター。
 (項目 4 6)
- ウイルスベクターである、項目 4 5 に記載のベクター。
 (項目 4 7)
- 組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、項目 4 6 に記載のベクター。
 (項目 4 8)
- 前記 AAV ベクターが、表 6 に列挙されている任意の血清型由来である、項目 4 7 に記載のベクター。
 (項目 4 9)

10

20

30

40

50

前記 A A V ベクターが、A A V 9 ベクターである、項目 4 7 または項目 4 8 に記載のベクター。

(項目 5 0)

組換えアデノウイルス随伴 (A A V) ベクターであって、そのゲノム内に、

- a) 5' A A V 末端逆位配列 (I T R) および 3' A A V I T R ;
- b) 前記 5' I T R と 3' I T R との間に配置される、ヒトフクチン関連タンパク質 (F K R P) をコードする核酸であって、
 - i) C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて減少している；
 - i i) G C 含量が、配列番号 6 の G C 含量と比べて 1 0 % よりも大きく減少している；

および / または

i i i) 配列番号 2 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有し、
筋肉特異的プロモーターと動作可能に連結している、
核酸

を含む、組換えアデノウイルス随伴 (A A V) ベクター。

(項目 5 1)

前記 A A V ゲノムが、5' から 3' の方向に、

- a) 前記 5' I T R、
- b) 前記筋肉特異的プロモーター、
- c) イントロン配列、
- d) F K R P をコードする前記核酸；および、
- e) 前記 3' I T R

を含む、項目 5 0 に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 2)

前記筋肉特異的プロモーターが、M C K プロモーター、d M C K プロモーター、t M C K プロモーター、e n h 3 5 8 M C K プロモーター、C K 6 プロモーターおよび S y n 1 0 0 プロモーター、表 1 ~ 4 または 8 ~ 1 2 に列挙されている任意のプロモーター、ならびにその誘導体からなる群から選択される、項目 5 0 から 5 1 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 3)

F K R P をコードする前記核酸の C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて減少している、項目 5 0 から 5 2 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 4)

F K R P をコードする前記核酸の C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて少なくとも 5 0 % 減少している、項目 5 0 から 5 3 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 5)

F K R P をコードする前記核酸の C p G 部位含量が、配列番号 6 の C p G 部位含量と比べて少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 減少している、項目 5 0 から 5 3 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 6)

F K R P をコードする前記核酸の C p G 部位含量が、0 % である、項目 5 0 から 5 5 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 7)

F K R P をコードする前記核酸の G C 含量が、配列番号 6 の G C 含量と比べて 1 0 % よりも大きく減少している、項目 5 0 から 5 6 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 8)

F K R P をコードする前記核酸が、配列番号 2 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する、項目 5 0 から 5 7 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 5 9)

F K R P をコードする前記核酸が、配列番号 2 に示される配列を有する、項目 5 0 から

10

20

30

40

50

5 8 に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 0)

前記 F K R P ポリペプチドをコードする前記核酸に対して 3' 側、かつ前記 3' I T R 配列に対して 5' 側に配置される少なくとも 1 つのポリ A シグナル配列をさらに含む、項目 5 0 から 5 9 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 1)

前記ポリ A シグナル配列が、配列番号 5 である、項目 6 0 に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 2)

前記 I T R が、挿入、欠失または置換を含む、項目 5 0 から 6 1 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

10

(項目 6 3)

前記 I T R 内の 1 つまたは複数の C p G 部位が除去されている、項目 5 0 から 6 2 に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 4)

前記 5' I T R が、I T R 2 m である、項目 5 0 から 6 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 5)

前記 3' I T R が、I T R 2 である、項目 5 0 から 6 4 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

20

(項目 6 6)

前記イントロン配列が、V H 4 - I g - イントロン 3 (配列番号 4) またはその誘導体である、項目 5 0 から 6 5 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 7)

キメラ A A V ベクター、一倍体 A A V ベクター、ハイブリッド A A V ベクターまたは倍数体 A A V ベクターである、項目 5 0 から 6 6 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 6 8)

表 6 に列挙されている任意の A A V 血清型のものである、項目 5 0 から 6 6 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

30

(項目 6 9)

前記血清型が A A V 9 である、項目 6 8 に記載の組換え A A V ベクター。

(項目 7 0)

表 7 から選択されるカプシドタンパク質または表 6 に列挙されているものからなる群の任意の A A V 血清型、およびこれらの組合せを含む、項目 5 0 から 6 9 のいずれかに記載の組換え A A V ベクター。

(項目 7 1)

項目 5 0 から 7 0 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクターを、薬学的に許容される担体中に含む医薬組成物。

(項目 7 2)

項目 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸および / または項目 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクターを含む形質転換された細胞。

40

(項目 7 3)

項目 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸、項目 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクター、および / または項目 7 2 に記載の形質転換された細胞を含むトランスジェニック動物。

(項目 7 4)

- ジストログリカン (- D G) のグリコシル化を増加させることを必要とする対象における - ジストログリカン (- D G) のグリコシル化を増加させる方法であって、前記対象に、項目 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸、項目 4 5 から 7 0 のいずれ

50

か一項に記載のベクター、項目 7 1 に記載の医薬組成物、および / または項目 7 2 に記載の形質転換された細胞を治療有効量で投与するステップを含み、前記対象において前記合成核酸が発現され、それにより、ヒト F K R P が産生され、 - D G のグリコシル化が増加する、方法。

(項目 7 5)

前記対象が、ジストログリカノパチー障害を有するまたはそれが発生するリスクがある、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 6)

対象におけるジストログリカノパチー障害を処置する方法であって、前記対象に、項目 1 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の核酸、項目 4 5 から 7 0 のいずれか一項に記載のベクター、項目 7 1 に記載の医薬組成物、および / または項目 7 2 に記載の形質転換された細胞を治療有効量で投与するステップを含み、前記対象において前記合成核酸が発現し、それにより、前記対象における前記ジストログリカノパチー障害を処置する、方法。

10

(項目 7 7)

前記ジストログリカノパチー障害が、F K R P 異常に関連するものである、項目 7 5 または 7 6 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記ジストログリカノパチー障害が、F K R P をコードする前記核酸の変異および / または - ジストログリカン (- D G) のグリコシル化不全を含む、項目 7 5 から 7 7 に記載の方法。

20

(項目 7 9)

前記ジストログリカノパチー障害が、肢帯型筋ジストロフィー 2 I、先天性筋ジストロフィー (C M D 1 C)、ウォーカー - ワールブルグ症候群、筋眼脳病、またはこれらの任意の組合せである、項目 7 5 から 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

ジストログリカノパチー障害を有する対象を処置するための方法であって、前記対象に、先行する項目のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター、前記 r A A V ゲノム、核酸配列、および / または医薬組成物のいずれかを治療有効量で投与して、それにより、前記対象の筋組織における機能的 F K R P の発現を増加させるステップを含む、方法。

(項目 8 1)

前記対象に単回用量を投与する、項目 7 4 から 8 0 に記載の方法。

30

(項目 8 2)

投与が、全身性のものである、項目 7 4 から 8 1 に記載の方法。

(項目 8 3)

投与が、静脈内注入によるものである、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 4)

投与後に、前記対象の骨格筋および / または心筋における - D G の機能的グリコシル化が実質的に増加する、項目 7 4 から 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

投与後に、前記対象の血清クレアチンキナーゼレベルが実質的に低下する、項目 7 4 から 8 4 に記載の方法。

40

(項目 8 6)

投与後に、前記対象の骨格筋におけるコラーゲン沈着が実質的に減少する、項目 7 4 から 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記対象が、成体である、項目 7 4 から 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記対象が、若齢期個体である、項目 7 4 から 8 6 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記対象が、乳幼児期個体である、項目 7 4 から 8 6 に記載の方法。

50

(項目 9 0)

前記対象が、投与前に有意な疾患病態を示している、項目 7 4 から 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記対象が、投与前に有意な疾患病態を示していない、項目 7 4 から 8 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50