

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7635139号
(P7635139)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47
A 6 1 K	35/34 (2015.01)	A 6 1 K	35/34
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04
請求項の数 15 (全32頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-557188(P2021-557188)	(73)特許権者	503197304
(86)(22)出願日	令和2年3月25日(2020.3.25)		ジェネトン
(65)公表番号	特表2022-526526(P2022-526526		フランス・9 1 0 0 0・エヴリ・クール
	A)		クーロンヌ・リュ・ドゥ・ランテルナシ
(43)公表日	令和4年5月25日(2022.5.25)		オナル1・ビス
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/058372	(73)特許権者	507002516
(87)国際公開番号	WO2020/193636		アンスティチュート、ナシオナル、ドゥ
(87)国際公開日	令和2年10月1日(2020.10.1)		、ラ、サンテ、エ、ドゥ、ラ、ルシエル
審査請求日	令和5年1月6日(2023.1.6)		シュ、メディカル
(31)優先権主張番号	19305377.4		INSTITUT NATIONAL D
(32)優先日	平成31年3月25日(2019.3.25)		E LA SANTE ET DE LA R
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		E C H E R C H E M E D I C A L E
			フランス・7 5 0 1 3・バリ・リュ・ド
			ゥ・トルビアク・1 0 1
		(73)特許権者	503119487
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オーバーラップ A A V ベクターを使用する大きいサイズのクアシジストロフィンの産生

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】
配列番号2の配列又はそれと少なくとも90%の同一性を有する配列を有する、クアシジストロフィン(QD)。

【請求項 2】
配列番号20の配列を有する、請求項 1 に記載のクアシジストロフィン。

【請求項 3】
配列番号3の配列又はそれと少なくとも90%の同一性を有する配列を有する、クアシジストロフィン。

【請求項 4】
請求項1から3のいずれか一項に記載のクアシジストロフィンをコードする核酸。

【請求項 5】
配列番号4の配列又はそれと少なくとも70%の同一性を有する配列を含むか又はそれからなる、請求項4に記載の核酸。

【請求項 6】
配列番号5又は配列番号22の配列を含むか又はそれからなる、請求項5に記載の核酸。

【請求項 7】
2つのAAVベクターを含む二重AAVベクター系であって、
- 第1のAAVベクターは、5'及び3'AAV ITRの間に、クアシジストロフィンのN末端部分をコードする第1の核酸配列を含み、

- 第2のAAVベクターは、5'及び3'AAV ITRの間に、クアシジストロフィンのC末端部分をコードする第2の核酸配列を含み、

第1及び第2の核酸配列は、請求項1から3のいずれか一項に記載のクアシジストロフィンの組換えによる産生を許容するオーバーラップ領域を含む、二重AAVベクター系。

【請求項8】

第1の核酸配列が、配列番号6又は配列番号23の配列を有し、第2の核酸配列が、配列番号7の配列を有する、請求項7に記載の二重AAVベクター系。

【請求項9】

第1の核酸配列が、配列番号8の配列を有し、第2の核酸配列が、配列番号9の配列を有する、請求項7に記載の二重AAVベクター系。

【請求項10】

請求項7から9のいずれか一項に記載の二重AAVベクター系で形質導入された細胞。

【請求項11】

筋肉細胞である、請求項10に記載の細胞。

【請求項12】

薬学的に許容される担体中に、請求項7から9のいずれか一項に記載の二重AAVベクター系又は請求項10若しくは11に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項13】

請求項7から9のいずれか一項に記載の二重AAVベクター系、請求項10若しくは11に記載の細胞又は請求項12に記載の組成物を含む、医薬。

【請求項14】

請求項7から9のいずれか一項に記載の二重AAVベクター系、請求項10若しくは11に記載の細胞又は請求項12に記載の組成物を含む、筋ジストロフィーを処置するための医薬。

【請求項15】

請求項7から9のいずれか一項に記載の二重AAVベクター系、請求項10若しくは11に記載の細胞又は請求項12に記載の組成物を含む、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)を処置するための医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ジストロフィー疾患、特にデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)又はベッカー型筋ジストロフィー(BMD)の処置又は防止において有用な遺伝子療法用ベクターに関する。

【0002】

本出願は、オーバーラップAAVベクターの使用が、重要な機能性ドメインを提示する大量の活性な短縮されたジストロフィンの産生を可能にすることを報告する。

【背景技術】

【0003】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、最も高頻出の進行性筋肉変性疾患であり、3,500～5000人の男子新生児のうちおよそ1人が罹患する。DMDは、X染色体に配置されるジストロフィンをコードする遺伝子における欠失又は突然変異によって引き起こされる。ジストロフィンとは、ジストロフィン-糖タンパク質複合体のアセンブリに必要であり、筋肉線維の細胞骨格と細胞外マトリックスとの間の機械的及び機能的な連結を提供する。機能的なジストロフィンが存在しないことは、線維変性、炎症、壊死及び瘢痕や脂肪組織での筋肉の置き換えを引き起こし、結果として、10歳代から30歳代の間に、進行性の筋衰弱並びに呼吸不全及び心不全による若年での死亡の原因となる(Moser, H., Hum Genet、1984. 66(1): 17～40)。

【0004】

この疾患のより軽度の形態は、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)と呼ばれ、これは、遅延性の発症、後に車椅子の支えが必要になること、及び比較的長い寿命によってDMDと

10

20

30

40

50

区別される。BMDは通常、リーディングフレームを維持する突然変異に相当する(Muntoni Fら、Lancet Neurol、2003、2(12): 731~40)。

【0005】

DMD(Rodino-Klapac、L.R.ら、Curr Neurol Neurosci Rep、2013、13(3): 332)又はBMDに利用可能なケアも有効な処置もない。従来の療法は、支持療法に限定されており、これは、兆候及び症状を部分的に軽減するが、疾患メカニズムを直接標的とすることもなければ、表現型を元に戻すこともない。

【0006】

現在、インビボの遺伝子療法、細胞移植療法、DMDのナンセンス突然変異及びエクソスキッピングの薬理学的なレスキュー、又はジストロフィン遺伝子のリーディングフレームを修復するための遺伝子編集戦略等の、DMDのために開発中の数種の治療戦略がある。これらの戦略の全ては、効率、異なる筋肉群を標的化すること、送達の最適化、導入遺伝子の長期発現、及び起こり得る免疫応答等の克服すべき問題を有する(Jarminら、Expert Opin Biol Ther、2014、14(2): 209~30)。

【0007】

DMDのための異なる遺伝子移入アプローチは、ジストロフィンの機能欠損を補い、単一の薬物療法を使用して全ての患者を処置する可能性を提供することを目的とする。筋肉変性を防止するためには、ジストロフィタンパク質の正常なレベルの約30%が必要となる可能性が高い。

【0008】

ジストロフィン遺伝子は、ヒトゲノムにおける最も大きい公知の遺伝子であり、ヒトにおいて2.5Mbを超える範囲であるか、又はX染色体全体の約2%を占める。これは、3685アミノ酸の427kDのジストロフィタンパク質をコードする79個のエクソン(全長cDNA: 11,1kb)からなる。ジストロフィタンパク質は、4つの構造的な領域によって定義される(図1A)。これらは、NH₂末端におけるアクチン結合ドメイン(エクソン1~8)、中央のロッドドメイン(24個のスペクトリン様反復R1~24及び4個のヒンジ領域H1~4;エクソン9~62)、システインリッチ(CR)ドメイン(エクソン63~69)、及びカルボキシ末端(CT)ドメイン(エクソン70~79)である。

【0009】

cDNAのサイズは、公知の遺伝子療法用ベクター系の中、特に、AAV血清型の親和性に応じて様々な筋肉群への効率的な遺伝子移入と併用する有望な候補の1つであるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター中に収めるには大きすぎる。AAVベクターは、分裂する(筋線維及び心筋細胞)及び分裂しない(成熟筋管)筋肉細胞の両方において長期の遺伝子形質導入を示す可能性を有する。

【0010】

実際に、AAVの主な限界は、そのカーゴ容量が、親のウイルスゲノムのサイズである約5kbに制限されると考えられる点である(Wu Z.ら、Mol Ther.、2010、18(1): 80~86; Lai Y.ら、Mol Ther.、2010、18(1): 75~79; Wang Y.ら、Hum Gene Ther Methods、2012、23(4): 225~33)。より大きいベクターゲノムは、短縮されたパッケージ化されたゲノムを生じ、これはゲノムのヘテロジニアスな集団であり、粒度分布が広範になり、発現効率はより低かった(Wu Z.ら、Mol Ther.、2010、18(1): 80~86)。

【0011】

AAVのDNAパッケージングの限定(5kb)を克服するために、数種の調査グループが、合成の短縮された、ただし機能的なジストロフィン(MD、「マイクロジストロフィン」又は「ミニジストロフィン」としても公知)を操作することを試みた。一連のマイクロジストロフィンは、タンパク質のより臨床的に重要な領域を含有するように最適化された、短縮されたジストロフィンをコードするように設計された。このような領域は、一般的にジストロフィンのN末端及びシステインリッチドメイン内に存在すると考えられてきた。

【0012】

マイクロジストロフィンは、C末端ドメインを含まない24個のスペクトリン様反復の最

10

20

30

40

50

初の3つ及び最後を含有し(R4-R23/CT)、これはMD1と命名され(図1Bを参照)、ジストロフィンを回復させ、シントロフィンとジストロブレピンを共存させる高度に機能的な活性を示すが、mdxマウスモデルにおいて筋線維鞘でnNOSを補充することができなかった(Yueら、Mol Ther、2006. 14(1): 79~87)。

【0013】

ジストロフィーのCXMDjイヌにおける、筋特異的なspc512プロモーター(AAV8-spc512-cMD1)によって駆動される発現を用いた、配列最適化されたイヌMD1マイクロジストロフィンをコードするAAV2/8ベクターを用いた試験(Kooら、J. Gene Med.2011.13:497)が有望であることが証明された。局所領域への送達は、四肢筋系における高いレベルのマイクロジストロフィン発現、及び組織学的及び機能的なパラメーターの著しい改善を誘導する。免疫抑制がない全身性静脈内投与は、骨格筋において著しく持続的なレベルのマイクロジストロフィンをもたらし、2年より長くジストロフィー症状を低減させる(Le Guinerら、Nat Commun.2017.8:16105)。ベクター投与の毒性又は有害な免疫の結果は観察されていない。

【0014】

しかしながら、筋機能における、欠失した領域のF-アクチンとの関連性、例えばR16-R17のnNOS結合部位及び/又はR8-R9のPar1b結合部位及び/又はR10-R17の結合部位のF-アクチンとの関連性は、疑問のままである。

【0015】

代替戦略として、組換え事象を利用し、二重AAVベクター系を使用してクアシジストロフィンを産生することが提唱されている。当技術分野で公知のように、二重AAV系の2つのベクターは、オーバーラップベクター、トランススプライシングAAVベクター、又はハイブリッドトランススプライシングAAVベクターであってもよい(例えばPryadkinaら、Molecular Therapy、2015、2、15009を参照)。

【0016】

この戦略に基づき、図1Cで例証されるように、Kodippiliら(Human Gene Therapy、2018、29 (3)、299~311)は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)のイヌモデルにおいて二重AAV9ベクターの対を使用してイヌ H2-R15ミニジストロフィン(配列番号1)の発現を報告した。より正確には、第1のベクターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ジストロフィン遺伝子のN末端に融合したflagタグ、並びに H2-R15ミニジストロフィン遺伝子の5'半分(N末端ドメイン、ヒンジ1及び3、並びにスペクトリン様反復R1-R3、R16-R20及びR21の一部を含む)を含有する。第2のベクターは、 H2-R15ミニジストロフィン遺伝子の3'半分(ヒンジ3の一部、スペクトリン様反復R20-R24、ヒンジ4、システインリッチドメイン及びC末端ドメインを含む)、C末端に融合したGFPタグ及びSV40ポリアデニル化シグナルを含有する。375ヌクレオチドのジストロフィン遺伝子断片(ヒンジ3の後半部分からR21の最初の部分)は、両方のベクターで共通であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【文献】WO2016/177911

【文献】PCT/EP2019/053061

【文献】US7,282,199

【文献】WO2005/033321

【文献】US6,156,303

【文献】WO2003/042397

【文献】EP18305399.0

【文献】US7,282,199

【非特許文献】

【0018】

【文献】Moser, H., Hum Genet、1984. 66(1): 17~40

10

20

30

40

50

- 【文献】Muntoni Fら、Lancet Neurol、2003. 2(12): 731 ~ 40
- 【文献】Rodino-Klapac、L.R.ら、Curr Neurol Neurosci Rep、2013. 13(3): 332
- 【文献】Jarminら、Expert Opin Biol Ther、2014. 14(2): 209 ~ 30
- 【文献】Wu Z.ら、Mol Ther.、2010、18(1): 80 ~ 86
- 【文献】Lai Y.ら、Mol Ther.、2010、18(1): 75 ~ 79
- 【文献】Wang Y.ら、Hum Gene Ther Methods、2012、23(4): 225 ~ 33
- 【文献】Wu Z.ら、Mol Ther.、2010、18(1): 80 ~ 86
- 【文献】Yueら、Mol Ther、2006. 14(1): 79 ~ 87
- 【文献】Kooら、J. Gene Med.2011.13:497
- 【文献】Le Guinerら、Nat Commun.2017.8:16105 10
- 【文献】Pryadkinaら、Molecular Therapy、2015、2、15009
- 【文献】Kodippiliら(Human Gene Therapy、2018、29 (3)、299 ~ 311)
- 【文献】Dumontら、Nat Med、2015、21(12):1455 ~ 63
- 【文献】Ervasti、Biochim Biophys Acta、2007、1772(2):108 ~ 17
- 【文献】Yueら(Mol Ther、2006. 14(1): 79 ~ 87)
- 【文献】Kodippiliら(Human Gene Therapy、2018、29 (3)、299 ~ 311)
- 【文献】Foster H.ら、Mol Ther、2008. 16(11):p.1825 ~ 32
- 【文献】Decrouyら、Gen Ther、1997. 4(5): 401 ~ 8
- 【文献】Coleyら、Human Molecular genetics、2016. 25(1): 130 ~ 45
- 【文献】Kooら、J Gene Med、2011. 13(9): 497 ~ 506 20
- 【文献】Le Guinerら、Mol Ther.、2014. 22(11): 1923 ~ 35
- 【文献】Larcherら(Plos One、2014、9(10)、e110371
- 【文献】Laiら、J. Clin. Invest.、2009. 119:624 ~ 635
- 【文献】Yamashitaら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、2010. 391: 812 ~ 817
- 【文献】E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」
- 【文献】Zheng Fanら(2012、Molecular Therapy 20(2)、456 ~ 461
- 【文献】「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第4版(Sambrook、2012);
- 【文献】「Oligonucleotide Synthesis」(Gait、1984)
- 【文献】「Culture of Animal Cells」(Freshney、2010)
- 【文献】「Methods in Enzymology」 「Handbook of Experimental Immunology 30
」(Weir、1997)
- 【文献】「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(Miller及びCalos、1987)
- 【文献】「Short Protocols in Molecular Biology」(Ausubel、2002)
- 【文献】「Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting」、(Babar、2011)
- 【文献】「Current Protocols in Immunology」(Coligan、2002)
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0019】
- いずれにしても、当技術分野において、それでもなお高いレベルの活性なクアシジストロフィンを産生する必要性がある。 40
- 【課題を解決するための手段】
- 【0020】
- 本発明は、二重AAVベクター系を使用して、クアシジストロフィンと呼ばれるより短いが機能的なジストロフィンポリペプチドを発現させることによって、致命的なデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、加えてベッカー型筋ジストロフィー(BMD)を軽減又は治すことを目的とする。
- 【0021】
- 出願人が知る限り、本発明は、遺伝学的ツール、すなわちR16-R17のnNOS結合部位とR8-R9のPar1b結合部位の両方を提示する大量の大きい活性なクアシジストロフィンの産 50

生を可能にする二重AAVベクター系を初めて報告する。これは、ジストロフィー疾患を処置するための新しい治療ツールを提供する。

【0022】

ここ数年にわたり、DMDの病状が、筋線維の脆さに加えて、筋肉の再生を損ない筋肉の衰弱を引き起こす筋肉幹細胞の機能不全によって引き起こされることが実際に解明されてきた。DMD関連の筋肉衰弱における衛星細胞の機能不全の影響は比較的近年の発見であり、ジストロフィンの主要な結合部位及び主要な分子機能を保存することによって、AAV-ジストロフィン送達に基づく現在の戦略を圧倒的に改良することができる。

【0023】

Par1bは、Marksとしても公知であり、これは、ジストロフィンと会合し、衛星細胞の極性を調節することにより非対称分裂を確実にするセリン-スレオニンキナーゼである(Dumontら、Nat Med、2015、21(12):1455~63)。ジストロフィンの欠如は、筋形成性の前駆体の適した生成に必要なPar1bの下方調節と非対称分裂の損失を引き起こす。それゆえに、クアシジストロフィンにおけるPar1b結合部位(R8-R9)の維持は、筋形成性の前駆体の生成及び効率的な筋肉再生のために衛星細胞極性及び非対称分裂を確実にするのに重要である。

10

【0024】

またnNOS(神経型一酸化窒素合成酵素)のための結合部位を保存することも重要なようであり、これは、サイトゾルの膜貫通タンパク質であるnNOSのジストロフィン媒介アセンブリは、骨格筋における血流調節を制御するための重要な事象である筋線維鞘におけるNO産生に必要であることが公知であるためである(Ervasti、Biochim Biophys Acta、2007、1772(2):108~17)。

20

【0025】

定義

冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、本明細書において、その冠詞の文法上の目的語の1つ又は1つより多く(すなわち、少なくとも1つ)を指すものとして使用される。一例として、「エレメント(an element)」は、1つのエレメント又は1つより多くのエレメントを意味する。

【0026】

「約」又は「およそ」は、本明細書で使用される場合、例えば量、時間経過の期間等の測定可能な値に言及される場合、開示された方法を実行するのに変動が適切になるように、特定の値からの、 $\pm 20\%$ 又は $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、更により好ましくは $\pm 1\%$ 、更により好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。

30

【0027】

範囲:この開示にわたり、本発明の様々な態様は、範囲の様式で示すことができる。これが理解されるものとする範囲の様式での記載は、単に便宜上及び簡潔さのためであり、本発明の範囲への融通のきかない限定として解釈されるべきではない。したがって、範囲の記載は、具体的に開示された全ての可能な部分範囲に加えてその範囲内の個々の数値を含むとみなされるべきである。例えば、1~6等の範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲、例えば1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6等、加えて、その範囲内の個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、及び6を含むとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

40

【0028】

「単離された」は、天然状態から移されている、又は取り出されていることを意味する。例えば、生きた動物中に天然に存在する核酸又はペプチドは、「単離されていない」が、その天然状態の共存する物質から部分的又は完全に分離された同じ核酸又はペプチドは、「単離されている」。単離された核酸又はタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することもでき、又は例えば宿主細胞等の非天然環境で存在することもできる。

【0029】

本発明の文脈において、以下の通常存在する核酸塩基の略語が使用される。「A」は、

50

アデノシンを指し、「C」は、シトシンを指し、「G」は、グアノシンを指し、「T」は、チミジンを指し、「U」は、ウリジンを指す。

【0030】

別段の規定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型であり、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。またタンパク質又はRNA又はcDNAをコードするヌクレオチド配列という語句は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が一部の型においてイントロンを含有し得る程度にイントロンを含む場合もある。

【0031】

「コード(encoding)」は、ポリヌクレオチド、例えば遺伝子、cDNA、又はmRNAにおけるヌクレオチドの具体的な配列の固有の特性であって、ヌクレオチドの定義された配列(すなわち、rRNA、tRNA及びmRNA)又はアミノ酸の定義された配列のいずれか、及びその結果生じる生物学的な特性を有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーや巨大分子の合成のためのテンプレートとして役立つものを指す。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳が、細胞又は他の生物系においてタンパク質を産生する場合、タンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常、配列表に提供されるコード鎖と、遺伝子又はcDNAの転写のためのテンプレートとして使用される非コード鎖の両方が、タンパク質又はその遺伝子又はcDNAの他の産物をコードすると称することができる。

【0032】

用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用される場合、ヌクレオチドの鎖と定義される。更に、核酸は、ヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で使用される核酸及びポリヌクレオチドは、置き換え可能である。当業者は、核酸が、モノマーの「ヌクレオチド」に加水分解することが可能なポリヌクレオチドであるという一般知識を有する。モノマーのヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解することが可能である。本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドとしては、これらに限定されないが、当技術分野において利用可能なあらゆる手段、これらに限定されないが、組換え手段、すなわち、通常のクローニング技術やPCR等を使用する組換えライブラリー又は細胞ゲノムからの核酸配列のクローニング等によって得られる、更に、合成手段によって得られる全ての核酸配列が挙げられる。

【0033】

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合により共有結合で連結されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質又はペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有していなければならない、タンパク質又はペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数については、制限はない。ポリペプチドとしては、ペプチド結合によって互いに合体した2つ又はそれより多くのアミノ酸を含むあらゆるペプチド又はタンパク質が挙げられる。この用語は、本明細書で使用される場合、一般的に当技術分野では例えばペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも称される短鎖と、それより長い鎖、すなわち一般的に当技術分野では多くのタイプがあるタンパク質と称されるものの両方を指す。例えば、「ポリペプチド」としては、なかでも生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、改変されたポリペプチド、誘導体、アナログ、融合タンパク質が挙げられる。ポリペプチドとしては、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、又はそれらの組合せが挙げられる。

【0034】

「同一な」は、2つのポリペプチド間又は2つの核酸分子間の配列類似性又は配列同一性を指す。2つの比較される配列の両方における位置が同じ塩基又はアミノ酸単量体サブユニットによって占められている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンによって占められている場合、これらの分子は、その位置において相同又は同一である。2つの配列間の相同性/同一性のパーセントは、2つの配列に共通する一致する位

10

20

30

40

50

置の数を、比較される位置の数で割った値に100をかける関数である。例えば、2つの配列における10個の位置のうち6個が一致する場合、2つの配列は、60%同一である。一般的に、比較は、2つの配列をアライメントして最大の相同性/同一性を得たときになされる。

【0035】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞の内部に送達するのに使用できる組成物である。多数のベクターが当技術分野において公知であり、例としては、これらに限定されないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性又は両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミド、及びウイルス等が挙げられる。したがって、用語「ベクター」は、自律複製型プラスミド又はウイルスを含む。この用語はまた、核酸の細胞への移行を容易にする非プラスミド及び非ウイルス化合物、例えば、ポリリシン化合物、リポソーム等も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、これらに限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられる。

10

【0036】

「発現ベクター」は、発現させるヌクレオチド配列に作動的に連結された発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用性エレメントを含み、発現のための他のエレメントは、宿主細胞によって、又はインピトロの発現系中に供給されてもよい。発現ベクターとしては、当技術分野において公知の全てのもの、例えば、組換えポリヌクレオチドを取り込んでいる、コスミド、プラスミド(例えば、裸の、又はリポソームに含有される)及びウイルス(例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)が挙げられる。

20

【0037】

用語「プロモーター」は、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特異的な転写を開始させるのに必要な、細胞の合成機構、又は導入された合成機構によって認識されるDNA配列と定義される。

【0038】

用語「プロモーター/調節配列」は、本明細書で使用される場合、プロモーター/調節配列に作動可能に連結した遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を意味する。一部の場合において、この配列は、コアプロモーター配列であってもよく、他の例において、この配列はまた、遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列及び他の調節エレメントを含んでいてもよい。プロモーター/調節配列は、例えば、遺伝子産物を組織特異的な方式で発現するのであり得る。

30

【0039】

「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか又は特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されると、細胞のほとんどの、又は全ての生理学的条件下で細胞中での遺伝子産物の産生を引き起こすヌクレオチド配列である。

【0040】

「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするか又は特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されると、実質的にプロモーターに対応する誘導物質が細胞中に存在する場合のみ、細胞中での遺伝子産物の産生を引き起こすヌクレオチド配列である。

40

【0041】

「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするか又は遺伝子によって特定されるポリヌクレオチドと作動可能に連結されると、細胞が、プロモーターに対応する組織型の細胞である場合に優先的に、細胞中での遺伝子産物の産生を引き起こすヌクレオチド配列である。

【0042】

用語「患者」、「対象」、「個体」等は、本明細書において同義的に使用され、インピトロ又はインサイチュウかどうかにかかわらず、本明細書に記載される方法に適したあらゆる動物、又はそれらの細胞を指す。特定の非限定的な実施形態において、患者、対象又は

50

個体は、ヒトである。

【0043】

「疾患」は、動物はホメオスタシスを維持できず、疾患が改善されない場合、動物の健康状態は悪化し続ける動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、動物はホメオスタシスを維持できるが、動物の健康状態が、障害がないと予想される場合より好ましくない健康状態である。障害は、未処置のままでも、必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすわけではない。

【0044】

疾患又は障害の症状の重症度、患者がこのような症状を経験する頻度、又はその両方が低下する場合、疾患又は障害は「軽減」又は「改善」される。これはまた、疾患又は障害の進行を止めることも含む。疾患又は障害の症状の重症度、患者がこのような症状を経験する頻度、又はその両方がなくなった場合、疾患又は障害は「治癒」する。

10

【0045】

「治療的」処置は、病状の兆候を呈示する対象に、そのような兆候を減らすか又はなくす目的で施される処置である。

【0046】

「疾患又は障害を処置する」は、本明細書で使用される場合、対象が経験する疾患又は障害の少なくとも1つの兆候又は症状の頻度又は重症度を低下させることを意味する。疾患及び障害は、本明細書において、処置の文脈で同義的に使用される。

【0047】

20

化合物の「有効量」は、化合物が投与される対象に有益な作用を提供するのに十分な化合物の量である。語句「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、疾患又は状態を防止又は処置する(その発症を遅延させる、又は防止する、その進行を防止する、阻害する、減少させる、又は回復させる)、加えてこのような疾患の症状を軽減するのに十分又は有効な量を指す。送達媒体の「有効量」は、化合物と効果的に結合するか又はそれを送達するのに十分な量である。

【発明を実施するための形態】

【0048】

第1の態様によれば、本発明は、クアシジストロフィン(QD)、有利には機能的なクアシジストロフィン、より有利にはヒト起源のクアシジストロフィンに関する。

30

【0049】

本出願の範囲において、クアシジストロフィンは、天然又は野生型ジストロフィンより短いペプチド又はタンパク質を意味する。本発明の文脈で、用語「マイクロジストロフィン」、「ミニジストロフィン」及び「クアシジストロフィン」は、同じ意味を有する。本発明によるタンパク質は、以前に記載されたマイクロジストロフィン、例えばYueらによって記載されたもの(MD1)より大きいため、本出願の他所では用語「クアシジストロフィン」を使用することとする。

【0050】

具体的な実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンは、全長ジストロフィンのサイズ(例えば、ヒト型の場合、3685アミノ酸)の、35%より大きい、40%より大きい、45%より大きい、50%より大きい、55%より大きい、又はさらには60%より大きいサイズを有する。好ましい実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンは、全長ジストロフィンのサイズの、61.1%より大きい、62%より大きい、63%より大きい、64%より大きい、又はさらには65%より大きいサイズを有する。ヒト型に関して、これは、本発明によれば、クアシジストロフィンは、有利には2361より多くのアミノ酸を含有し、それでもなお有利には2400より多くのアミノ酸、例えば2406aa(WL2)又は2427aa(WL1)を含有することを意味する。

40

【0051】

ジストロフィンの構造は十分に立証されており(図1Aを参照)、その活性な断片が開示されている。当技術分野において理解されていると予想されるように、活性な断片は、全長

50

配列の生物学的機能の少なくとも一部を保持する全長配列の1つ又は複数の部分である。

【0052】

「機能的な」短縮されたジストロフィン又はクアシジストロフィンは、対応するペプチド又はタンパク質が、野生型ジストロフィンタンパク質の機能の少なくとも一部を発揮することができること、更に、天然ジストロフィンの非存在に関連する症状の1つ又は複数、特に、線維変性、炎症、壊死、瘢痕や脂肪組織での筋肉の置き換え、筋衰弱、呼吸不全及び心不全、加えて若年での死亡を少なくとも部分的に軽減することができることを意味する。

【0053】

本発明によるクアシジストロフィンは、先行技術のマイクロジストロフィンに関して開示された特性、特に、Yueら(Mol Ther、2006、14(1): 79~87)又はKodippiliら(Human Gene Therapy、2018、29(3)、299~311)によって開示されたものの少なくとも1つを(程度の差はあっても)提示することが好ましい。

10

【0054】

好ましい特性は、なかでも、以下の通りである：

- 少なくとも1つのDAP(「ジストロフィン関連タンパク質」と、特にシントロフィン、ジストロブレピン、nNOS及び/又はPAR-1bタンパク質と結合すること；
- 筋線維鞘におけるDAP複合体の補充；
- 微小管ネットワークのレスキュー；
- ダメージからの筋肉保護；
- タンパク質の全体的な構造及びスペクトリン反復(R)ドメインの構成の保存；
- 筋肉の構造及び機能の回復。なかでも特に重要なのは骨格筋であるが、心筋及び横隔膜も重要である；
- より一般的には、筋肉の機能、歩行、心臓機能、呼吸機能、生存、生活の質及び/又は期待の改善。

20

【0055】

当技術分野で公知のように、前記特性は、インビトロにおいて、ジストロフィンを発現する様々な細胞で、例えばiPS由来ヒトDMD筋原細胞で試験してもよいし、エクスピボにおいて、様々な動物モデルから単離した筋肉線維で試験してもよいし、又はインビボにおいて、動物モデルをベースとして、又はDMD又はBMDに罹っている患者でも試験してもよいし。動物モデルは、例えば、mdxマウス(Foster H.ら、Mol Ther、2008、16(11): p.1825~32)、mdx^{4cv}マウス(Decrouyら、Gen Ther、1997、4(5): 401~8)、D2.B10-mdx/Jマウス(Coleyら、Human Molecular genetics、2016、25(1): 130~45)、CXMDjイヌ(Kooら、J Gene Med、2011、13(9): 497~506)又はGRMDイヌ(Le Guinerら、Mol Ther.、2014、22(11): 1923~35)である。マウスモデルは、マイクロジストロフィンをコードする新しい構築物を試験するのに一般的に使用される。しかしながら、マウスは、免疫反応なしでそれほど重度ではない疾患の形態を提示するため、このモデルは欠点がある。他の動物モデルは、ヒトにおける遺伝子療法製品の治療上の可能性を予測するためにより信頼できると考えられているイヌである。Larcherら(Plos One、2014、9(10)、e110371)によって開示されたようなラットモデルは、心筋症を提示するため、これも非常に興味深い。

30

40

【0056】

上述したように、全長ジストロフィン(図1A)は、異なるドメインによって特徴付けられる：

- アクチンに結合するN末端ドメイン(CH1CH2)；
- 4つのヒンジドメイン(H1~H4)；
- 24個のスペクトリン様反復又はロッドドメイン(R1-R24)；
- システインリッチ(CR)ドメイン；
- C末端(CT)ドメイン。

【0057】

50

一実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィン、全長ジストロフィンと比較して、有利には少なくとも1つのスペクトリン様反復(R)が欠如している少なくとも1つのドメインを有する。

【0058】

一態様によれば、本発明のクアシジストロフィンは、特にF-アクチン、nNOSタンパク質及びPAR-1bタンパク質に対して少なくとも1つの主要なタンパク質結合部位を含有する。有利には、目的のクアシジストロフィンは、nNOS及び/又はPAR1bの結合部位を含有する。nNOSの結合部位は、ロッドドメインの反復16及び17(R16、R17)に存在することが示され(Laiら、J. Clin. Invest.、2009. 119:624~635)、一方でジストロフィン反復8及び9(R8、R9)のPAR1bへの結合は、インビトロで実証された(Yamashitaら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、2010. 391: 812~817)。好ましい実施形態によれば、目的のクアシジストロフィンは、R16~17及び/又はR8~9ロッドドメインを含有する。

10

【0059】

この態様によれば、本発明は、R8、R9、R16及びR17ロッドドメインを含むクアシジストロフィンに関する。

【0060】

別の態様によれば、本発明のクアシジストロフィンは、R4、R5、R6及びR7ロッドドメインが欠如している又は除去されたN末端部分(R4-R7)を特徴とする。

【0061】

言い換えれば、本発明によるクアシジストロフィンは、そのN末端から以下の順番で、以下の通り定義されるN末端部分を有する：

20

- アクチンに結合するN末端ドメイン(CH1CH2)；
- H1ヒンジドメイン；
- R1、R2及びR3ロッドドメイン；
- H2ヒンジ；
- R8及びR9ロッドドメイン。

【0062】

このようなクアシジストロフィンは、そのN末端部分において、構造CH1CH2H1R1R2R3H2R8R9を提示する。

【0063】

好ましい実施形態によれば、このようなクアシジストロフィンは更に、R16及びR17ロッドドメインを含有する。

30

【0064】

特定の実施形態によれば、本発明のクアシジストロフィンは、少なくとも先行技術のMD1マイクロジストロフィン(図1B)のスペクトリン様反復、すなわちR1-R2-R3及びR24を含有する。

【0065】

有利には、本発明によるクアシジストロフィンは、MD1マイクロジストロフィンと比較して、さらなるロッド(R)ドメインを含有し、有利には、少なくとも、R14、R15、R20、R21、R22及びR23からなる群から選択されるものを含有する。好ましい実施形態によれば、クアシジストロフィンは更に、R22-R23を含有し、場合によってはR14-R15又はR20-R21を含有する。

40

【0066】

具体的な実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンは、以下のロッドドメインを欠如している：

- R4-R7、R10-R15及びR18-R19。言い換えれば、このようなクアシジストロフィンは、R1-R3、R8-R9、R16-R17及びR20-R24を含有するか；又は
- R4-R7、R10-R13及びR18-R21。言い換えれば、このようなクアシジストロフィンは、R1-R3、R8-R9、R14-R17及びR22-R24を含有する。

【0067】

50

有利には、本発明によるクアシジストロフィンには更に、以下を含有する：

- 配列番号2又は3のアミノ酸1～252に対応する完全なN末端ドメイン；
- それぞれ配列番号2又は配列番号20のアミノ酸1822～2102、又は配列番号3のアミノ酸1801～2081に対応する、完全なシステインリッチ(CR)ドメイン；
- 部分的な、又は全長C末端ドメイン、有利には、それぞれ配列番号2若しくは配列番号20のアミノ酸2103～2427、又は配列番号3のアミノ酸2082～2406に対応する全長C末端ドメイン。可能性のある部分的なC末端ドメインは、WO2016/177911で開示されたもののよう、MD1、MD2、MD3又はMD4の短縮されたC末端ドメインである；
- 場合によっては、H1、H2、H3及びH4から、有利には少なくともH1、H2及びH4から、場合によってはH1、H2、H3及びH4からなる群から選択される、少なくとも1つのヒンジ(H)ドメイン。

10

【0068】

具体的な実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンは、

- R4-R7 R10-R15 R18-R19クアシジストロフィン(更にWL1と名付けられる)、有利には配列番号2のクアシジストロフィン；又は
- R4-R7 R10-R13 R18-R21クアシジストロフィン(更にWL2と名付けられる)、有利には配列番号3のクアシジストロフィンである。

【0069】

1つの好ましい実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンは、 R4-R7 R10-R15 R18-R19又は R4-R7 R10-R13 R18-R21クアシジストロフィンである。別の好ましい実施形態によれば、本発明のクアシジストロフィンは、配列番号2又は配列番号3の配列からなるか又はそれを含む。

20

【0070】

一実施形態によれば、クアシジストロフィンは、そこに開示されたクアシジストロフィンと、特に配列番号2又は配列番号3の配列のクアシジストロフィンと、「実質的に同一」であり、すなわち、それと、約60%同一、好ましくは約70%同一、より好ましくは約80%同一、より一層好ましくは約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又はより一層好ましくは約99%同一である。

【0071】

具体的な実施形態によれば、本発明による R4-R7 R10-R15 R18-R19クアシジストロフィンは、そのコード配列中に2つの以下の突然変異(配列番号2と比較して)：

- 49位にアルギニンの代わりにセリン(R S)；及び/又は
- 748位にフェニルアラニンの代わりにセリン(F S)

のうち少なくとも1つを内包する。

30

【0072】

具体的な実施形態によれば、本発明の R4-R7 R10-R15 R18-R19クアシジストロフィンは、配列番号20からなるか又はそれを含む。

【0073】

さらなる態様によれば、本発明は、上記で定義されるクアシジストロフィンをコードする核酸配列に関する。

40

【0074】

一実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィン(quasisdystrophin)をコードする核酸配列は、配列番号4を含むか又はそれからなる。

【0075】

別の実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンをコードする核酸配列は、配列番号4の配列と「実質的に同一」であり、すなわち、それと、約60%同一、好ましくは約70%同一、より好ましくは約80%同一、より一層好ましくは約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又はより一層好ましくは約99%同一である。

【0076】

50

好ましい実施形態によれば、本発明による核酸配列は、配列番号5又は配列番号22を含むか又はそれからなる。

【0077】

別の実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンをコードする核酸配列は、配列番号21を含むか又はそれからなる。

【0078】

別の実施形態によれば、本発明によるクアシジストロフィンをコードする核酸配列は、配列番号21の配列と「実質的に同一」であり、すなわち、それと、約60%同一、好ましくは約70%同一、より好ましくは約80%同一、より一層好ましくは約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又はより一層好ましくは約99%同一である。

10

【0079】

好ましい実施形態によれば、本発明のクアシジストロフィンは、いわゆる二重AAVベクター系を使用して産生される。

【0080】

本発明による発現系は、典型的には、2つのAAVベクターで構成される。インピボにおける2つのAAVベクターに共通するオーバーラップ領域に基づく組換えの後、その結果得られたクアシジストロフィン(quasidistrophin)が大量に産生される。それゆえに、クアシジストロフィンをコードする核酸配列は、2つの部分に、すなわちそのN末端部分をコードする5'配列と、そのC末端部分をコードする3'配列とに分けられる。5'配列の3'末端及び3'配列の5'末端は、相同組換えが起こり得るように相同であるか、又は同一でもある。

20

【0081】

さらなる態様によれば、本発明は、2つのAAVベクターを含む二重AAVベクター系であって、

第1のAAVベクターは、5'及び3'AAV ITRの間に、クアシジストロフィンのN末端部分をコードする第1の核酸配列を含み、

第2のAAVベクターは、5'及び3'AAV ITRの間に、クアシジストロフィンのC末端部分をコードする第2の核酸配列を含み、

第1及び第2の核酸配列は、組換えによる本発明のクアシジストロフィンの産生を許容するオーバーラップ領域を含む、AAVベクター系に関する。

【0082】

30

本出願の範囲において、以下で説明されるように、用語「オーバーラップ領域」(又は「オーバーラップ配列」)及び「相同性を有する領域」(又は「配列相同性を有する領域」)は、同じ意味を有し、同義的に使用される。

【0083】

言い換えれば、この発明は、本発明の機能的なクアシジストロフィンの発現を可能にする相補的構築物を有する、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、好ましくは全体で2つのAVVベクターを含む組成物に関する。

【0084】

本出願の範囲において、用語「組成物」は、「会合」、「組合せ」又は「発現系」で置き換えることができる。これは、相同組換えが起こり、次いで活性なタンパク質を産生できるように、2つのAAVベクターと一緒に機能し、接触した状態にならないことを意味する。しかしながら、それらは、単一の組成物の状態で、又は場合によっては使用前に混合された2つの別個の組成物の状態で見出すことができる。

40

【0085】

具体的な実施形態によれば、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、

i) AAVの5'ITR(逆方向末端反復)配列;

ii) プロモーターによって制御される遺伝子部分;

iii) AAVの3'ITR配列

を含む。

【0086】

50

加えて、第2のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、
iv) AAVの5' ITR(逆方向末端反復)配列;
v) 遺伝子部分、有利にはそれに続いてポリアデニル化シグナル;
vi) AAVの3' ITR配列

を含む。

【0087】

これらの2つのAAVベクターは、組換えのときに機能単位を形成することになる相補配列を有する。当業者公知の通り、組換えは、細胞のDNA修復経路によるAAVベクターのそれぞれに存在する相同配列の認識によって起こる。

【0088】

それゆえに、2つのAAVベクターの遺伝子部分は、以下の必要条件:

- 第1及び第2のAAVベクターの遺伝子部分が一緒に、本発明のクアシジストロフィン、好ましくはヒト起源のクアシジストロフィンをコードするオープンリーディングフレームを含むこと;
- 第1及び第2のAAVベクターの遺伝子部分の両方が、相同組換え後、前記オープンリーディングフレームの再構築を可能にする相同性を有する領域を含むことを満たす必要がある。

【0089】

「二重AAV系」は、2つのAAVベクターで構成されるベクター系であって、その系において、各ベクターが、細胞に送達される本発明のクアシジストロフィンをコードする配列の一部を有し、前記クアシジストロフィンをコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が、第1及び第2の核酸配列の間の相互作用によって細胞に再構築される、ベクター系を意味する。本発明によれば、本発明の二重ベクター系は、(相同)組換えを可能にする配列を含むベクター、すなわちオーバーラップベクターをインプリメントする。それゆえに、クアシジストロフィタンパク質は、各AAVベクターに導入されたジストロフィン遺伝子の一部のそれぞれに、適切なオーバーラップ領域を追加することによる、相同組換えのインプリメンテーションによって再構築される。

【0090】

本発明によれば、系の各アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、「発現カセット」又は「インサート」とも称される発現構築物を含む。本出願の範囲において、前記「インサート」は、有利には、AAVゲノムの5'及び3' ITR(「逆方向末端反復」)配列の間に配置された核酸配列と定義される。

【0091】

当技術分野における一般的な知見によれば、インサートのサイズは、野生型AAVゲノムの長さを大きく超えるべきではない。例えば、AAV2は、それぞれ145bpの2つのITR配列を含有し、4682bpのゲノム(ITR配列を含む)を有する。

【0092】

特定の実施形態において、各AAVベクターに導入されたクアシジストロフィンの一部をコードする核酸配列は、5kb未満、例えば4.9kb未満、4.8kb未満、4.7kb未満、4.6kb未満又は4.5kb未満の長さを有する。

【0093】

有利には、AAVパッケージングのサイズの制約を限定するために、前記核酸配列は、エクソンに対応する。言い換えれば、それらは、好ましくはcDNA断片である。

【0094】

有利には、2つのAAVを組み合わせることにより形成されたリーディングフレームは、上記で開示されたように、クアシジストロフィン(MD)、有利には機能的なクアシジストロフィン、より有利にはヒト起源のクアシジストロフィンをコードする。

【0095】

好ましい実施形態によれば、特許請求される二重AAVベクター系を用いて産生されるクアシジストロフィンは、少なくとも2000アミノ酸(aa)、有利には少なくとも2100aa、2

10

20

30

40

50

200aa、2300aa、2400aa又は2500aaを含有する。別の実施形態によれば、特許請求されるAAVベクターを用いて産生されるマイクロジストロフィン、3000アミノ酸(aa)以下、有利には2900aa、2800aa、2700aa、2600aa、2550aa又は2500aa以下を含有する。好ましい実施形態において、特許請求される二重AAVベクター系を用いて産生されるクアシジストロフィンは、2400から2500aaの間を含有し、すなわち、全長ジストロフィンのサイズの約70%に相当するサイズを有する。

【0096】

本発明による二重ベクター系において、第1及び第2の核酸配列は、分子間の相同組換えを促進するための配列相同性を有する領域を提示し、このようにして、二重AAV系の2つのベクター、すなわちそれぞれクアシジストロフィンのN末端部分及びC末端部分をコードする核酸配列を組み換えることにより、大きいクアシジストロフィン導入遺伝子が生成される。このオーバーラップ系をインプリメントする特定の実施形態において、配列相同性を有する領域の長さは、結果得られるインサート(5'及び3'-ITR配列、及びあらゆる発現制御配列を含む)のサイズが、AAVベクター内へのキャプシド化のためのサイズ限定に適合する限りは、大幅に変更が可能である。当業者はこのサイズ限定をよく理解しており、この知見に従って、第1及び第2の核酸配列の両方のサイズ、それゆえに配列相同性を有する領域のサイズを適合させることができる。それゆえに、特定の実施形態において、配列相同性を有する領域は、4599ヌクレオチド未満、例えば4500、4000、3500、3000、2500、2000、1500又は1000ヌクレオチド未満の長さを有するジストロフィン遺伝子のポリヌクレオチド配列である。他の特定の実施形態において、配列相同性を有する領域は、少なくとも100ヌクレオチドの長さ、例えば少なくとも100、200、300、400、500、600、700又は800ヌクレオチドの長さを有するクアシジストロフィン配列のポリヌクレオチド配列である。さらなる特定の実施形態において、配列相同性を有する領域は、100から1000ヌクレオチドの間、詳細には500から1000ヌクレオチドの間、例えば700から900ヌクレオチドの間、有利には750から850ヌクレオチドの間を含む長さを有するジストロフィン遺伝子のポリヌクレオチド配列である。

【0097】

別の実施形態によれば、前記相同性を有する領域は、少なくとも1つの完全スペクトリン様ドメイン(R)、有利には2つの完全スペクトリン様ドメイン(R)を含有し、場合によってはさらなる2つの短縮されたヒンジドメイン(H)、任意選択で1つのヒンジドメイン(H)を含む。それらは、場合によっては天然ジストロフィンにおける連続するドメインに対応する。有利には、それらは、天然ジストロフィンの中央部分に配置され、例えばR14とR21との間に配置される。

【0098】

具体的な実施形態によれば、オーバーラップ領域は、

- 短縮されたR16、R17、H3及び短縮されたR20、又は
- 短縮されたR14、R15、R16及び短縮されたR17;又は
- 短縮されたH3、R20及びR21

をコードする配列に対応する。

【0099】

1つの特定の実施形態において、第1の核酸配列は、ジストロフィンのN末端ドメイン、H1、R1-R3、H2、R8、R9、R16、R17、H3及び短縮されたR20をコードしていてもよく、第2の核酸配列は、短縮されたR16、R17、H3、R20-R24、H4、CRドメイン及びジストロフィン(上記で開示されたように全長又は短縮された、有利には全長)のC末端ドメインをコードする。

【0100】

具体的な実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号6又は配列番号23を含むか又はそれからなり、第2の核酸配列は、配列番号7を含むか又はそれからなる。配列番号12の配列の800bpのオーバーラップ領域は、配列番号6(又は配列番号23)のヌクレオチド3779~4578及び配列番号7のヌクレオチド173~972に対応する。

【0101】

別の実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号6(又は配列番号23)のヌクレオチド646～4578を含み、第2の核酸配列は、配列番号7のヌクレオチド173～4323を含む。

【0102】

具体的な実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号8を含むか又はそれからなり、第2の核酸配列は、配列番号9を含むか又はそれからなる。800bpのオーバーラップ領域は、配列番号8のヌクレオチド3798～4597及び配列番号9のヌクレオチド193～992に対応する。さらなる実施形態によれば、800bpのオーバーラップ領域は、配列番号10、配列番号11又は配列番号12の配列を有する。

【0103】

別の実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号8のヌクレオチド665～4597を含み、第2の核酸配列は、配列番号9のヌクレオチド193～4343を含む。

【0104】

他の特定の実施形態において、第1の核酸配列は、ジストロフィンのN末端ドメイン、H1、R1-R3、H2、R8、R9、R14、R15、R16及び短縮されたR17をコードしていてもよく、第2の核酸配列は、短縮されたR14、R15、R16、R17、R22-R24、H4、CRドメイン、及びジストロフィン(上記で開示されたように全長又は短縮された、有利には全長)のC末端ドメインをコードする。

【0105】

具体的な実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号13を含むか又はそれからなり、第2の核酸配列は、配列番号14を含むか又はそれからなる。800bpのオーバーラップ領域は、配列番号13のヌクレオチド3701～4500及び配列番号14のヌクレオチド182～981に対応する。さらなる実施形態によれば、800bpのオーバーラップ領域は、配列番号15、配列番号16又は配列番号17の配列を有する。

【0106】

別の実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号13のヌクレオチド646～4500を含み、第2の核酸配列は、配列番号14のヌクレオチド182～4347を含む。

【0107】

さらなる特定の実施形態において、第1の核酸配列は、ジストロフィンのN末端ドメイン、H1、R1-R3、R16、R17、R18、R19、H3、R20及びR21をコードしていてもよく、第2の核酸配列は、短縮されたH3、R20-R24、H4、CRドメイン及びジストロフィン(上記で開示されたように全長又は短縮された、有利には全長)のC末端ドメインをコードする。

【0108】

具体的な実施形態によれば、第1の核酸配列は、配列番号18を含むか又はそれからなり、第2の核酸配列は、配列番号19を含むか又はそれからなる。375bpのオーバーラップ領域は、配列番号18のヌクレオチド4091～4465及び配列番号19のヌクレオチド193～567に対応する。

【0109】

クアシジストロフィンをコードする核酸配列は、有利にはヒト起源であるが、イヌ、ラット、マウス又は非ヒト霊長類配列であってもよい。一実施形態において、核酸配列は、それが投与されることになる生物を起源とし、有利には、ヒトへの投与の場合、ヒト配列である。

【0110】

本発明によれば、配列相同性を有する領域、すなわちオーバーラップ領域は、組換えのために最適化された配列であってもよい。このような配列としては、対応する野生型配列(配列番号9のヌクレオチド193～992)から最適化された配列番号10、配列番号11又は配列番号12に示される配列、又は対応する野生型配列(配列番号14のヌクレオチド182～981)から最適化された配列番号15、配列番号16又は配列番号17に示される配列が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0111】

公知の方式で、mRNAレベル(組換え及び転写)及び/又はタンパク質レベル(翻訳)を増加させるように、タンパク質をコードする配列を最適化する様々な方法がある。本出願の範囲において、本発明の二重AAVベクター系のベクターにおける配列は、有利には、組換えを増加させるために、場合によっては、インビボにおけるクアシジストロフィンポリペプチドの発現を増加させるために、最適化される。

【0112】

実施において、以下の配列:

- ジストロフィンのN末端部分をコードする第1の核酸配列;
- ジストロフィンのC末端部分をコードする第2の核酸配列;及び/又は
- 第1及び第2の核酸配列の間のオーバーラップ領域

10

が最適化されてもよい。

【0113】

特定の実施形態において、ジストロフィンのオーバーラップしていない配列と組換えの領域の両方が最適化される。配列最適化としては、コドン最適化、GC含量の増加、CpGアイランドの数の減少、代替オープンリーディングフレーム(ARF)の数の減少、並びに/又はスプライスドナー及びスプライスアクセプター部位の数の減少を含む核酸配列におけるいくつかの変化を挙げることができる。遺伝子コードの縮重のために、異なる核酸分子が同じタンパク質をコードする場合もある。また、異なる生物の遺伝子コードが、他のものに対して同じアミノ酸をコードする数種のコドンのうち1つの使用に偏っていることが多いことも周知である。得られたコドン最適化されたヌクレオチド配列が、コドン最適化されていない配列と比較して相対的に高いレベルで、このような所与の細胞の環境でより高い可能性で発現されるように、コドン最適化を介して、所与の細胞の環境に存在するコドンバイアスを活用した変化がヌクレオチド配列中に導入される。本発明の好ましい実施形態において、このような機能的なクアシジストロフィンをコードする配列最適化されたヌクレオチド配列は、同じタンパク質をコードするコドン最適化されていないヌクレオチド配列と比較して、ヒト細胞におけるその発現及び安定性が改善されるように、例えばヒト特異的コドン出現頻度バイアスを活用することによってコドン最適化される。特定の実施形態において、クアシジストロフィンの配列全体、すなわちオーバーラップしていない、及びオーバーラップ領域は、標的又は宿主細胞による、有利にはヒトにおけるその産生を改善するために最適化される。

20

30

【0114】

別の態様によれば、本発明はまた、本発明による二重AAVベクター系の第1のAAVベクター又は第2のAAVベクターに対応するAAVベクターにも関する。

【0115】

各AAVベクターは、有利には上記で定義された通り、ジストロフィン遺伝子の関連部分(それぞれN末端及びC末端部分)をコードする核酸配列を含むだけでなく、遺伝子全体の組換え及び再構築の後に前記クアシジストロフィンの適した発現に必要な全ての配列も含む。

【0116】

一実施形態によれば、第1及び第2のAAVベクターの第1及び第2の核酸配列は、調節配列の制御下に置かれる。有利には、第1の核酸配列の前にプロモーターがあり、任意選択で、それに続いてイントロンがあり、第2の核酸配列の前にポリアデニル化シグナルがある。

40

【0117】

このようなプロモーターは、天然又は合成(人工)プロモーターであってもよいし、誘導性又は構成的であってもよい。

【0118】

一実施形態において、プロモーターは、ユビキタスプロモーターであるか、又は低い組織特異性を有する。一例として、発現ベクターは、ホスホグリセリン酸キナーゼ1(PGK)、EF1、ACTA1、 α -アクチン、デスミン、全てのMCKバリエーション、心臓トロポニン及びCM

50

Vプロモーターを内包していてもよい。

【0119】

好ましい実施形態において、プロモーター配列は、発現レベルに関して、また組織特異性に関しても、その制御下に置かれた核酸配列の発現を適切に支配するために選択される。

【0120】

一実施形態において、発現ベクターは、筋肉特異的なプロモーターを含む。このようなプロモーターは、骨格筋、横隔膜、場合によっては心筋、加えて衛星細胞におけるロバストな発現を可能にする。当業者に公知の好適なプロモーターの例は、例えばデスミンプロモーター、筋肉クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーター、短縮されたクレアチンキナーゼプロモーター、例えばCK6、CK7又はCK8プロモーター、Synプロモーター、MyoD、Myf5、Vcam、Pax3及びPax7衛星細胞プロモーターである。別のプロモーターは、合成プロモーターC5~12(spC5~12)である。また2つ又はそれより多くの転写調節エレメントからの配列を含むハイブリッドプロモーターを使用することも可能である(例えばPCT/EP 2019/053061を参照)。

10

【0121】

有利には、第1の核酸配列は、筋特異的プロモーターの制御下に置かれる。言い換えれば、第1のAAVベクターは、ジストロフィンのN末端部分をコードする核酸配列に作動可能に連結されている筋特異的プロモーターを更に含む。

【0122】

当技術分野で公知のように、一方又は他方のAAVベクターに導入され得る他の可能性のある調節配列の非限定的なリストは、

20

- 有利には機能的なマイクロジストロフィンをコードする配列の3'における、ポリアデニル化シグナル;
- 転写安定化のための配列、例えばイントロン;
- エンハンサー配列;
- 例えばそれが毒性の可能性がある場合、機能的なジストロフィンをコードする配列の発現が求められていない非標的組織における前記配列の発現を阻害することができるmiRNA標的配列

である。

【0123】

30

一態様によれば、イントロンは、ヒトベータグロビンb2(又はHBB2)イントロン、FIXイントロン及びニワトリベータ-グロビンイントロンからなる群から選択され、前記イントロンは、任意選択で改変されたイントロン、例えば改変されたHBB2イントロン、改変されたFIXイントロン、又は改変されたニワトリベータ-グロビンイントロンである。

【0124】

別の実施形態によれば、ポリアデニル化シグナルは、ヒトベータグロビンポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化(pA)シグナル、又は別の天然に存在する、若しくは人工ポリアデニル化シグナルのなかから選択される。

【0125】

40

具体的な実施形態によれば、本発明による二重AAVベクター系は、以下のエレメント:

- 有利には配列番号6のヌクレオチド173~506(又は配列番号23)に対応する、spC5-12プロモーター;
 - 有利には配列番号6のヌクレオチド507~639(又は配列番号23)に対応する、キメライントロン、及び
 - 有利には配列番号7のヌクレオチド4324~4545に対応する、SV40pAシグナル
- の少なくとも1つ、有利にはそれらの全てを含有する。

【0126】

クローニング目的及びウイルス粒子の産生のために、発現構築物は、クアシジストロフィンの選択、複製及び産生に好適なプラスミド中に挿入することができる。

50

【0127】

本発明によれば、発現構築物を含有するウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。

【0128】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、様々な障害の処置のための強力な遺伝子送達ツールになりつつある。AAVベクターは、それらを理想的に遺伝子療法に適したものにすることで、多数の特徴、例えば、病原性の欠如、軽度な免疫原性、及び安定で効率的な方式で有糸分裂後の細胞及び組織を形質導入する能力等を有する。AAVベクター内に含有される特定の遺伝子の発現は、AAV血清型、プロモーター、及び送達方法の適切な組合せを選択することによって、1つ又は複数のタイプの細胞に特異的に標的化することができる。

10

【0129】

一実施形態において、コード配列は、AAVベクター内に含有される。100種より多くの天然に存在するAAVの血清型が公知である。AAVキャプシドにおける多くの天然バリエーションが存在しており、ジストロフィーの病理に特に適した特性を有するAAVの同定及び使用を可能にする。AAVウイルスは、従来の分子生物学的技術を使用して操作することができ、それにより、核酸配列の細胞特異的な送達、免疫原性の最小化、安定性及び粒子の寿命の調整、効率的な分解、核への正確な送達のためにこれらの粒子を最適化することが可能になる。

【0130】

上述したように、AAVの使用は、AAVが比較的非毒性であるために、DNAの外因性送達の一般的な様式であり、効率的な遺伝子移入を提供し、具体的な目的のために容易に最適化することができる。ヒト又は非ヒト霊長類(NHP)から単離され、よく特徴付けられたAAVの血清型のなかでも、ヒト血清型2は、遺伝子移入ベクターとして開発された最初のAAVである。他の現在使用されるAAV血清型としては、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11及びAAV12が挙げられる。加えて、非天然の操作されたバリエーション及びキメラ又はハイブリッドAAVもまた有用であり得る。

20

【0131】

ベクターへのアセンブリのための所望のAAV断片は、vp1、vp2、vp3及び高度可変領域を含むcapタンパク質、rep78、rep68、rep52、及びrep40を含むrepタンパク質、並びにこれらのタンパク質をコードする配列を含む。これらの断片は、様々なベクター系及び宿主細胞において容易に利用することができる。

30

【0132】

このような断片は、単独で、他のAAV血清型配列又は断片と組み合わせて、又は他のAAV又は非AAVウイルス配列からのエレメントと組み合わせて使用することができる。本明細書で使用される場合、人工AAV血清型としては、これらに限定されないが、天然に存在しないキャプシドタンパク質を有するAAVが挙げられる。このような人工キャプシドは、あらゆる好適な技術によって、選択されたAAV配列(例えば、vp1キャプシドタンパク質の断片)を、異なる選択されたAAV血清型、同じAAV血清型の連続しない部分、非AAVウイルス源、又は非ウイルス源から得ることができる異種配列と組み合わせて使用して生成することができる。人工AAV血清型は、これらに限定されないが、キメラAAVキャプシド、組換えAAVキャプシド、又は「ヒト化」AAVキャプシドであり得る。したがって例示的なAAV、又は人工AAVとしては、なかでも、AAV2/8(US7,282,199)、AAV2/5(国立衛生研究所(National Institutes of Health)より入手可能)、AAV2/9(WO2005/033321)、AAV2/6(US6,156,303)、AAVrh8(WO2003/042397)、及びrh74-AAV9(EP18305399.0)が挙げられる。一実施形態において、本明細書に記載される組成物及び方法において有用なベクターは、最低限でも、選択されたAAV血清型キャプシド、例えば、AAV8キャプシド、又はそれらの断片をコードする配列を含有する。別の実施形態において、有用なベクターは、最低限でも、選択されたAAV血清型repタンパク質、例えば、AAV8 repタンパク質、又はそれらの断片をコードする配列を含有する。任意選択で、このようなベクターは、AAV cap及びrepタンパク質の両方を含有していてもよい。AAV rep及びca

40

50

pの両方が提供されるベクターにおいて、AAV rep及びAAV cap配列はどちらも、1つの血清型起源であってもよく、例えば、全てのAAV8起源であってもよい。代替として、rep配列が、cap配列を提供するものとは異なるAAV血清型からのものであるベクターを使用してもよい。一実施形態において、rep及びcap配列は、別個の源(例えば、別個のベクター、又は宿主細胞及びベクター)から発現される。別の実施形態において、これらのrep配列は、フレーム内で異なるAAV血清型のcap配列に融合して、キメラAAVベクター、例えばAAV2/8(US7,282,199)を形成する。

【0133】

一実施形態によれば、前記第1及び第2のAAVベクターのそれぞれは、AAV由来のキャプシド、例えば、AAV1、AAV2、バリエーションAAV2、AAV3、バリエーションAAV3、AAV3B、バリエーションAAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、バリエーションAAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV2G9、AAV10、例えばAAVcy10及びAAVrh10、AAVrh74、AAVdj、AAV-Anc80、AAV-LK03、AAV2i8、及びブタAAV、例えばAAVpo4及びAAVpo6キャプシドを有するAAVベクター、又はキメラキャプシド、詳細には、AAV8、AAV9、AAVrh74、AAV2i8キャプシド若しくはAAV9-rh74キメラキャプシド、詳細にはAAV8、AAV9若しくはAAVrh74キャプシド、より詳細にはAAV8若しくはAAV9キャプシドを有するAAVベクターである。

【0134】

本発明で使用されるAAVベクターにおいて、AAVゲノムは、有利には一本鎖(ss)核酸である。

【0135】

当技術分野で公知のように、組換えウイルス粒子は、例えば293HEK細胞の三重トランスフェクション、単純疱疹ウイルス系、及びパキウロウイルス系によって、又は特異的な細胞株を使用して得ることができる。有利には、ウイルス粒子は、293HEK細胞の三重トランスフェクションによって得られる。

【0136】

ベクターのタイターは、通常、ウイルスゲノム/ml(vg/ml)として表される。

【0137】

本発明はまた、上記で開示された二重AAVベクター系で形質導入された細胞、特に筋肉細胞にも関する。

【0138】

別の態様によれば、本発明は、同じ疾患又は別の疾患の処置を目的とした、上記で開示された二重AAVベクター系及び場合によっては他の活性分子(他の遺伝子療法製品、化学分子、ペプチド、タンパク質等)、を含む組成物、有利には治療用組成物又は医薬に関する。

【0139】

本発明は次いで、二重AAVベクター系又は前記系の第1若しくは第2のAAVベクターを含む医薬組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の治療剤(本発明の核酸又はベクター)、及び薬学的に許容される担体を含む。具体的な実施形態において、用語「薬学的に許容される」は、連邦又は州政府の規制当局によって承認されていること、又は動物やヒトにおける使用に関して、米国若しくは欧州薬局方、又は他の一般的に認められた薬局方に列挙されていることを意味する。用語「担体」は、希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指し、治療剤はそれと共に投与される。このような製剤用担体は、滅菌された液体、例えば水及び油、例えば石油、動物、植物由来又は合成起源のもの、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等であり得る。医薬組成物が静脈内投与される場合、水が好ましい担体である。生理食塩水及び水性デキストロース及びグリセロール溶液は、液体担体として、詳細には注射用溶液のための液体担体としても採用することができる。好適な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が挙げられる。

【0140】

組成物はまた、必要に応じて、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含有していてもよい。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、持続放出配合物等の形態をとることができる。好適な製剤用担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。このような組成物は、治療有効量の治療剤を、好ましくは精製された形態で、対象への適した投与のための形態が提供されるように好適な量の担体と共に含有すると予想される。

【0141】

好ましい実施形態において、組成物は、慣例的な手順に従って、ヒトへの静脈内投与に適合させた医薬組成物として製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤、及び注射部位の痛みを解放するために局所麻酔剤、例えばリドカインを含んでいてもよい。

10

【0142】

一実施形態において、本発明による組成物は、ヒトにおける投与に好適である。組成物は、好ましくは液体の形態であり、有利には生理食塩水組成物、より有利にはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)組成物又は乳酸リンゲル溶液の形態である。

【0143】

ジストロフィー疾患の処置において有効と予想される本発明の治療剤(すなわち核酸又はベクター)の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、最適な投薬量範囲の予測を助けるために、インビボ及び/又はインビトロのアッセイが任意選択で採用されてもよい。配合物で採用される正確な用量はまた、投与経路、体重及び疾患の深刻さにも依存することになり、専門家の判断及び各患者の環境に従って決定すべきである。

20

【0144】

上記で開示されたAAVベクター又は組成物は、それを必要とする対象に投与されることになる医薬として、特に遺伝子療法製品として使用することができる。別の態様によれば、本発明は、医薬の調製のための上記で開示されたAAVベクター又は組成物の使用に関する。

【0145】

好適な投与は、標的組織、特に骨格筋、並びに場合によっては横隔膜及び心臓への治療有効量の遺伝子療法製品の送達を許容するものであるべきである。本発明の文脈で、遺伝子療法製品が、クアシジストロフィンをコードする核酸配列を含むウイルスベクターである場合、治療用量は、対象のキログラム(kg)当たりの投与されるクアシジストロフィン配列を含有するウイルス粒子の量(ウイルスゲノムに対するvg)と定義される。

30

【0146】

利用可能な投与経路は、外用(局所)、経腸(全体にわたる作用、ただし消化(GI)管を介して送達される)、又は非経口(全身性作用、ただし消化管以外の経路によって送達される)である。本明細書で開示される組成物の好ましい投与経路は、非経口であり、その例としては、筋肉内投与(すなわち筋肉への)及び全身投与(すなわち循環系への)が挙げられる。この文脈において、用語「注射」(又は「灌流」又は「輸注」)は、血管内、詳細には静脈内(IV)、及び筋肉内(IM)投与を包含する。注射は通常、シリンジ又はカテーテルを使用して実行される。

40

【0147】

一実施形態において、組成物の全身送達は、局所的な処置部位の近くに、すなわち弱った筋肉のすぐ近くの静脈又は動脈に組成物を投与することを含む。特定の実施形態において、本発明は、全身性作用を生じる組成物の局所送達を含む。この投与経路は、通常、「局部(局所領域的な)輸注」、「分離四肢灌流による投与」又は「高圧経静脈四肢灌流」と呼ばれ、筋ジストロフィーにおける遺伝子送達方法としてうまく使用されてきた(Zheng Fanら(2012, Molecular Therapy 20(2)、456~461)。

【0148】

本発明による好ましい投与方法は、全身投与である。全身注射は、心臓や横隔膜を含む対象の体の筋肉全体に到達させるための全身の注射、次いで、これらの全身性の、それで

50

もなお治療不能の疾患の実際の処置への道を開くものである。特定の実施形態において、全身送達は、組成物が対象の全身にわたり利用可能になるように、対象に組成物を送達することを含む。

【0149】

好ましい実施形態によれば、全身投与は、子宮内投与も含めて、血管への組成物の注射、すなわち血管内(静脈内又は動脈内)投与を介して行われる。一実施形態によれば、組成物は、静脈注射によって、末梢静脈を介して投与される。代替として、全身投与は、筋肉内注射を介して行われる。

【0150】

全身に送達される場合、本発明の二重AAVベクター系を含有する組成物は、好ましくは 10^{15} vg/kg未満か又はそれに等しい用量で、又はさらには 10^{14} vg/kg、有利には 10^{12} vg/kg ~ 10^{14} vg/kgの間、より有利には 5×10^{12} vg/kg ~ 10^{14} vg/kgの間、例えば1、2、3、4、5、6、7、8又は 9×10^{13} vg/kgの用量で投与される。例えば1、2、3、4、5、6、7、8若しくは 9×10^{12} vg/kgの用量、又はそれより一層低い用量も、起こり得る毒性及び/又は免疫反応を回避するために予期することができる。当業者に公知の通り、効率の観点で申し分のない結果を考慮して、できる限り低い用量が好ましい。

10

【0151】

具体的な実施形態において、処置は、組成物の単回投与を含む。

【0152】

一実施形態において、AAVベクターの存在及び/又はクアシジストロフィンの発現、加えて関連する治療上の利益は、1カ月まで、又は3カ月若しくは6カ月まで、又はさらには1年、2年、5年、10年、若しくはそれより更に長く、対象の生涯にわたり、観察される。

20

【0153】

本発明によれば、対象は、好ましくはヒトであるが、マウス、ラット、非ヒト霊長類又はイヌであってもよい。

【0154】

「ジストロフィー疾患」は、本発明の文脈において、ジストロフィン遺伝子の欠陥に関連する疾患を意味する。この欠陥は、発現の低レベル又は発現の非存在、オープンリーディングフレームにおける未成熟停止コドンの導入、又は不活性なタンパク質の産生を引き起こす欠失又は突然変異であり得る。好ましいジストロフィー疾患は、ジストロフィン遺伝子の突然変異が原因のデュシェンヌ及びベッカー型筋ジストロフィー(DMD/BMD)である。前記突然変異は、ジストロフィン発現の非存在若しくは低レベル、又は部分的若しくは完全に不活性な、場合によっては短縮されたタンパク質の産生をもたらす可能性がある。

30

【0155】

本発明の組成物によって利益を得る可能性がある対象は、筋ジストロフィーと診断された、又はこのような筋ジストロフィーを発症させるリスクがある全ての患者を含む。次いで処置される対象は、例えばジストロフィン遺伝子のシーケンシング等の当業者に公知のあらゆる方法による、ジストロフィン遺伝子における突然変異又は欠失の同定に基づいて、及び/又は当業者公知のあらゆる方法によるジストロフィンの発現又は活性のレベルの評価を介して選択することができる。それゆえに、前記対象は、すでにジストロフィー疾患の症状を呈示する対象と、前記疾患を発症するリスクがある対象の両方を含む。一実施形態において、前記対象は、すでにジストロフィー疾患の症状を呈示する対象を含む。別の実施形態において、前記対象は、外来患者及び早期の非通院患者である。

40

【0156】

一実施形態によれば、本発明は、ジストロフィー疾患の処置において使用するための、上記で開示された二重AAVベクター系又は前記AAVベクターを含む組成物に関する。別の実施形態によれば、本発明は、ジストロフィー疾患を処置するための医薬を調製するための、上記で開示されたAAVベクター又は前記AAVベクターを含む組成物の使用に関する。

【0157】

言い換えれば、本発明は、対象におけるジストロフィー疾患を処置するための方法であ

50

って、上記で開示された二重AAVベクター系又は前記系を含む組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0158】

このような二重AAVベクター系及び前記系を含む組成物は、特に、遺伝子療法、詳細には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)又はベッカー型筋ジストロフィー(BMD)に罹っている対象の処置を意図している。第1の目標は、安全な(非毒性の)処置を提供することである。さらなる目的は、疾患の発症を延期する、スローダウンする、又は防止することを可能にする、場合によっては臨床的なレベルで容易にモニターできる患者の表現型を改善することを可能にする効率的な処置を提供することである。対象において、本発明によるAAVベクター及び組成物は、

- 筋肉の機能を改善するために使用することができ、なかでも特に重要なのは骨格筋であるが、心筋及び横隔膜も重要であり;
- 歩行を改善するために使用することができ;
- 心臓機能を改善するために使用することができ;
- 呼吸機能を改善するために使用することができ;
- 生存期間を延長するために、より一般的には生活の質及び期待を改善するために、使用することができる。

【0159】

本発明の実施は、別段の指定がない限り、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術を採用し、これらは十分に当業者の理解の範囲内である。このような技術は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第4版(Sambrook、2012);「Oligonucleotide Synthesis」(Gait、1984);「Culture of Animal Cells」(Freshney、2010);「Methods in Enzymology」 「Handbook of Experimental Immunology」(Weir、1997);「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(Miller及びCalos、1987);「Short Protocols in Molecular Biology」(Ausubel、2002);「Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting」、(Babar、2011);「Current Protocols in Immunology」(Coligan、2002)等の文献で十分に説明されている。これらの技術は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの産生に適用可能であり、したがって本発明の作製及び実施において考慮することができる。特定の実施形態にとって特に有用な技術は、この後のセクションで論じることとする。

【0160】

本明細書において引用されるありとあらゆる特許、特許出願、及び公報の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる。

【0161】

さらなる説明がなくとも、当業者は、前記の説明と以下の例証となる実施例を使用して本発明の化合物を作製及び利用し、特許請求される方法を実施することが可能であると考えられる。

【実施例】

【0162】

実験例

以下の実験例及び添付された図面を参照することによって、本発明を更に詳細に説明する。これらの実施例は、単に例証のために提供され、限定することを意図しない。

【図面の簡単な説明】

【0163】

【図1】ジストロフィンの異なる形態のスキームを示す図である:A/全長ジストロフィンのスキーム;B/Yueらによって開示されているMD1マイクロジストロフィンのスキーム;C/Ko dippliらによって開示されている H2-R15クアシジストロフィン(配列番号1)のスキーム(DD);D/本発明による R4-R7 R10-R15 R18-R19クアシジストロフィン(配列番号2)のスキーム(WL1);E/本発明による R4-R7 R10-R13 R18-R21クアシジストロフ

イン(配列番号3)のスキーム(WL2)。

【図2A】ジストロフィンの異なる形態の産生レベルの分析を示す図である。A/抗ジストロフィン抗体を用いたウェスタンブロッティング。3月齢のmdxマウスのTA筋肉に 1×10^{10} vgのAAVを注射した。TA筋肉を注射の30日後に回収し、ウェスタンブロッティングのために、ジストロフィンに対する抗体(DysB)を用いて処理した。パネル6~8(Opt)は、それぞれAAV2/9-hMD1(パネル9:138kDa)、ヒト対照試料(FL:パネル2:427kDa)及びmdx(KO:パネル3及び4)を用いて得られたものと比較した、本発明による二重AAVベクター系を用いて得られたタンパク質WL1(280kDa)のレベルを示す。年齢を適合させたmdx及びC57BL/10からの対照筋肉に生理食塩水のみを注射した。

【図2B】ジストロフィンの異なる形態の産生レベルの分析を示す図である。B及びC/1~2月齢のWTマウスのTA筋肉に $1 \sim 3 \times 10^{10}$ vgのAAVを注射した。TA筋肉を注射の30日後に収集し、ウェスタンブロッティングのために、ジストロフィンに対する抗体(DysB及びDys2)及び α -アクチニンレベルに対する抗体(α -アクチニンレベルを正規化群として使用した)を用いて処理した。異なる構築物から発現されたタンパク質レベルの比較: - WL1wt(配列番号8+9から発現された):上のプロットにおけるパネル1~3; - WL2wt(配列番号13+14から発現された):上のプロットにおけるパネル4~6; - WL1Opt(配列番号6+7から発現された):上のプロットにおけるパネル7~9; - PBS:上のプロットにおけるパネル10; - DD(配列番号18+19から発現された):下のプロットにおけるパネル1~3; - WL1Opt(配列番号6+7から発現された):下のプロットにおけるパネル4~6; - PBS:下のプロットにおけるパネル7。

【図2C】ジストロフィンの異なる形態の産生レベルの分析を示す図である。B及びC/1~2月齢のWTマウスのTA筋肉に $1 \sim 3 \times 10^{10}$ vgのAAVを注射した。TA筋肉を注射の30日後に収集し、ウェスタンブロッティングのために、ジストロフィンに対する抗体(DysB及びDys2)及び α -アクチニンレベルに対する抗体(α -アクチニンレベルを正規化群として使用した)を用いて処理した。

【図3】TA筋肉におけるジストロフィンの発現及び分布の評価を示す図である。1月齢のDba2_Mdxマウスに以下のいずれかを静脈内注射した: - 配列番号6を内包する5'AAVベクター及び配列番号7を内包する3'AAVベクター(7匹のマウスが注射された;WBではn=3の代表的なマウス); - 配列番号6のみを内包する5'AAVベクター(2匹のマウスが注射された;WBではn=1の代表的なマウス); - 配列番号7のみを内包する3'AAVベクター(2匹のマウスが注射された;WBではn=1の代表的なマウス); - ベクターなし、すなわちPBS(5匹のマウスが注射された;WBではn=2の代表的なマウス) TA筋肉を注射の70日後に回収し、ウェスタンブロッティング又は凍結切片化のために処理した。A/抗ジストロフィン抗体(Dys N-ter及びDys C-ter)及び α -アクチニン抗体を用いたウェスタンブロッティング(WB)。予測されるサイズ=280kDa;全長ジストロフィン=427kDa。B/Dys N-ter抗体での凍結切片における免疫標識化。各図画では陽性線維のパーセンテージが記載される。

【図4A】図3と同様に処置されたTA筋肉におけるジストロフィンの治療作用の評価を示す図である。ヘマトキシリン、フロキシシ、サフラン(HPS)を用いた切片の染色。

【図4B-1】図3と同様に処置されたTA筋肉におけるジストロフィンの治療作用の評価を示す図である。TMEM8C(左上)の発現レベル。

【図4B-2】図3と同様に処置されたTA筋肉におけるジストロフィンの治療作用の評価を示す図である。CD11b(右上)の発現レベル。

【図4B-3】図3と同様に処置されたTA筋肉におけるジストロフィンの治療作用の評価を示す図である。フィブロネクチン(下)の発現レベル。

【図5】抗ジストロフィン抗体(Dys N-ter及びDys C-ter)及び α -アクチニン抗体を用いたウェスタンブロッティングによって図3と同様に処置されたマウスの心臓におけるジストロフィン発現の評価を示す図である。

【図6】TA(前脛骨筋)及びDIA(横隔膜)におけるジストロフィンの発現及び分布の評価を示す図である。Dba2_Mdxマウスに以下のいずれかを静脈内注射した: - 配列番号6を内包する5'AAVベクター及び配列番号7を内包する3'AAVベクター(5'mut+3'又は二重Dys

10

20

30

40

50

mut);5匹のマウスが注射された; - 配列番号23を内包する5'AAVベクター及び配列番号7を内包する3'AAVベクター(5'cor+3'又は二重Dys cor);5匹のマウスが注射された; 比較のために、注射されていない(NI)Db a2_Mdxマウス(n=3)及びDb a2_WTマウスを実験に含めた。注射の3週間後にTA及びDA筋肉を回収し、ウェスタンブロッティング又は凍結切片化のために処理した。A/抗ジストロフィン抗体(Dys2)及び -アクチニン抗体(試料を正規化するのに使用された)を用いたウェスタンブロッティング(WB)。予測されるサイズ=280kDa;全長ジストロフィン=427kDa;L=ラダー;HL=高分子量のラダー、T+=陽性対照。 B/Dys2抗体での凍結切片における免疫標識化。各図画では陽性線維のパーセンテージが記載される。

【図7】図6と同様に処置された筋肉におけるジストロフィンの治療作用の評価を示す図である:TMEM8C(左上)、CD11b(右上)及びフィブロネクチン(下)の発現レベル。

10

【0164】

材料及び方法

インビボでの遺伝子移入。この研究では、異なるマウスモデルを使用した:野生型C57BL/10及びC57BL/6J;mdx及びDb a2_Mdx(D2.B10-mdx/J)。全てのマウスの処置を、Ev ry動物施設のCERFEにおける倫理委員会によって承認されたプロトコルに従って、適切な生物学的封じ込め下で行った。3つのプラスミド構築物のプロトコルを使用して、アデノ随伴ウイルスベクターを産生した。 殺した後、組織(TA筋肉及び心臓)を収集し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で瞬間凍結し、-80 で貯蔵した。

【0165】

20

ウェスタンブロット。総タンパク質を組織試料から抽出した。タンパク質抽出物をゲルのNuPAGE(商標)で分離し、次いでニトロセルロース膜に移した。次いで膜をOdysseyブロッティング緩衝液及びPBSでブロックし、次いで十分な抗体(抗ジストロフィンDysB又はDys2抗体、ウサギアルファ-アクチニン(Life Technologies))及び二次抗マウス又は抗ウサギ-コンジュゲート(680又は800)抗体でハイブリダイズした。

【0166】

免疫組織化学TA筋肉凍結切片を、マウスオンマウス(Mouse on Mouse;M.O.M)キット(Vector Labs)を使用して染色した。一次抗体を4 で一晩インキュベートし、続いてPBS-0.1% tweenで3回洗浄し、ヤギ抗マウス又はヤギ抗ウサギ二次抗体Alexa 594(Life Technologies)と共にインキュベートした。ジストロフィンに対する抗体(Dys2、1:100、マウスモノクローナル、Novocastra)を使用した。

30

【0167】

HPS染色。TA筋肉凍結切片を、ヘマトキシリン(核染色)、フロキシシン(細胞質内染色)及びサフラン(コラーゲン)を使用して染色した。

【0168】

ジストロフィープロファイルのPCR定量化。TMEM8C(線維再生を測定するため/TGE Mm00481256_m1、ThermoFisher)、CD11b(炎症を測定するため/TGE Mm00434455_m1)及びフィブロネクチン(線維症を測定するため/TGE Mm01256744_m1)の発現を、RT-定量PCR(RTqPCR)によって凍結切片から収集したcDNAで定量化した。

【0169】

40

結果:

1)AAVベクターの構築

様々な組換えAAV2/8又はAAV2/9ベクターを構築して、ジストロフィン産生に関するそれらの相対的な効率を評価した:

【0170】

【表 1】

Table 1:試験されたジストロフィンのリスト

名称	ジストロフィン (MW)	コード配列	調節配列
FL (図1A)	全長ジストロフィン(427 kDa)	-	-
MD1 (図1B)	マイクロジストロフィン (138 kDa)	Yueらを参照	Yueらを参照
DD (図1C)	ミニジストロフィン (280 kDa) (配列番号1)	5'AAV: 配列番号18 3'AAV: 配列番号19	Kodippiliらを参照
WL1 wt (図1D)	クアシジストロフィン (280 kDa) (配列番号2)	オーバーラップAAVベクター:: 5'AAV: 配列番号8 3'AAV: 配列番号9	spC5-12プロモーター、 キメライントロン及び SV40pA
WL1 Opt 又は hDysOpt 又は T+ (図1D)	クアシジストロフィン (280 kDa) (配列番号20)	オーバーラップAAVベクター:: 5'AAV (5'mut): 配列番号 6 3'AAV: 配列番号7	spC5-12プロモーター、 キメライントロン及び SV40pAシグナル
WL1 C又は (図1D)	クアシジストロフィン (280 kDa) (配列番号2)	オーバーラップAAVベクター:: 5'AAV (5'c又は): 配列番号 23 3'AAV: 配列番号7	spC5-12プロモーター、 キメライントロン及び SV40pAシグナル
WL2 wt (図1E)	クアシジストロフィン (280 kDa) (配列番号3)	オーバーラップAAVベクター:: 5'AAV: 配列番号13 3'AAV: 配列番号14	spC5-12プロモーター、 キメライントロン及び SV40pAシグナル

【0171】

2)筋肉内(IM)送達後のジストロフィンプロファイルの分析

本発明による二重ベクター系から産生されたタンパク質の筋肉における形質導入及び発現のレベルを評価するために、ベクターのインビボの分析を実行した。1月齢のジストロフィン欠損(mdx)マウスに 1×10^{10} vgのAAVベクターを筋肉内注射した。前脛骨筋(TA)筋肉を注射の30日後に回収し、ウェスタンブロッティングのために、ジストロフィンに対する抗体(DysB)を用いて処理した(図2A):パネル6~8(Opt)は、それぞれAAV2/9-hMD1(パネル9:138kDa)、ヒトジストロフィン(FL:パネル2:427kDa)及びmdx(KO:パネル3及び4)を用いて得られたものと比較した、本発明による二重AAVベクター系を用いて得られたタンパク質WL1OPT(280kDa)のレベルを示す。年齢を適合させたmdx及びC57BL/10からの対照筋肉に生理食塩水のみを注射した。示した通り、これらのデータは、本発明による短縮されたジストロフィンは、二重AAVベクター系に基づいて効率的に産生できることを確認する。

【0172】

さらなる実験を実行して、異なる二重AAVベクター系を評価した。1月齢のwtマウスに $1 \sim 3 \times 10^{10}$ vgのAAVベクターを筋肉内注射した。前脛骨筋(TA)筋肉を注射の30日後に回収

し、ウェスタンブロッティングのために、ジストロフィンに対する抗体(Dys2及びDysB)及び α -アクチニンを用いて処理した。図2B及びCは、StudioLightソフトウェアを使用して α -アクチニンで正規化した後の、得られたタンパク質レベルの定量化を示す。

【0173】

図2Bは、本発明によるクアシジストロフィン(WL1Opt)が、WL1wt及びWL2wtより高い有意なレベルで、更に先行技術(DD)による構築物を用いて得られたものより優れたレベルで産生されることを明らかにする結果を示す。

【0174】

それゆえに、機能的な評価のために最も有望であると同定された前記構築物を使用してさらなる実験を実行した。

【0175】

3)血管内(IV)注射後のジストロフィンプロファイルの分析

A/WL1Optの使用

IM分析の後、血管内(IV)注射のためにWL1Optを選択した。4週齢のDba_2Mdxマウスに、血管内注射(5×10^6 vg/マウス)によって調製物を与えた(5'+3'の場合、 $n=7$;5'単独の場合、 $n=2$;3'単独の場合、 $n=2$;PBSの場合、 $n=5$)。遺伝子移入の70日後にエンドポイント分析を実行した。

【0176】

3-1 筋肉において

静脈注射の後、本発明による二重AAVベクター系に基づくクアシジストロフィン産生が確認された(図3A)。

【0177】

TA筋肉切片の免疫組織化学分析(図3B)は、膜におけるジストロフィンの標識化を示し、マウス間で発現レベルにある程度の不均質性があるが、本発明によるクアシジストロフィンの適した発現を確認する。

【0178】

静脈注射によって投与された本発明によるクアシジストロフィンの治療作用を評価するために、TA切片をHPSで染色したところ、組織の全体的な状態、特に炎症、線維再生、線維症が明らかになった。wt及びmdxマウスと比較した場合、本発明のクアシジストロフィンを発現する欠損マウスは、中間プロファイルを示す(図4A)。この観察は、関連マーカーの測定によって確認された(図4Bを参照)。改善は、各基準についてwt及びmdxマウスで観察されたレベル間で、処置された動物におけるレベルで観察することができる。

【0179】

3-2 心臓において

上記で報告されたような筋肉におけるその有益な作用の他にも、本発明によるトランスジェニッククアシジストロフィンも注射されたマウスの心臓で発現される(図5を参照)。

【0180】

B/WL1Corの使用

WL1のコドン最適化が、WL1ORF(R49S及びF748S)における2つの突然変異をもたらしたことが認められた。それゆえに、5'AAVベクター(配列番号6)における対応する配列を修正した(790位のAGCをAGGに変換し、2887位のTCTをTTCに変換した)。

【0181】

次いで、WL1Cor(配列番号22)に対応する新(cor)二重Dysベクター系(突然変異が修正された;5'cor+3')と、WL1Opt(配列番号5)に対応する旧(mut)二重Dysベクター系(5'mut+3', $n=5$)の両方の構築物を使用して実験を繰り返した。

【0182】

図6A/6Bで示されるように、静脈注射後の早期段階でも(3週間)、前脛骨筋及び横隔膜筋において、両方の二重AAVベクター系を用いて適したクアシジストロフィン産生が観察された。

【0183】

10

20

30

40

50

発現のレベルに関して、新(cor)二重Dysベクター系(突然変異が修正された;5'cor+3')、すなわち天然クアシジストロフィンをコードする最適化された型は、有望な結果をもたらすと考えられる。

【 0 1 8 4 】

そのように産生されたクアシジストロフィンの治療作用に関して、図7は、両方の構築物が、処置されたマウスの類似のプロファイル、すなわち再生、炎症及び線維症に関する関連マーカーの改善をもたらすことを確認する。

10

20

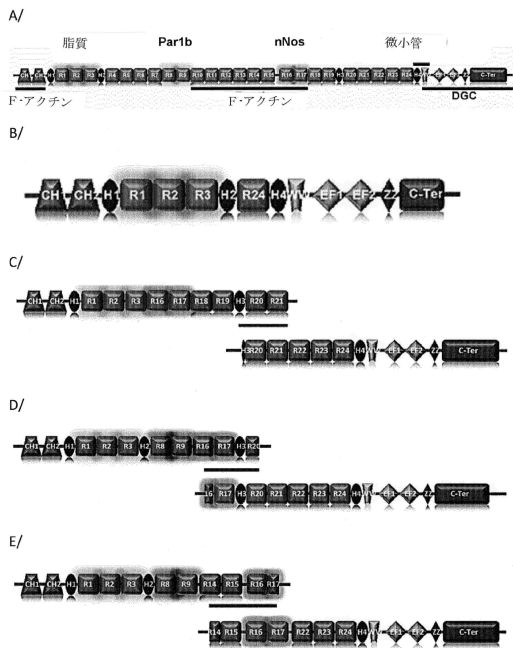
30

40

50

【図面】

【図 1】



【 図 3 】

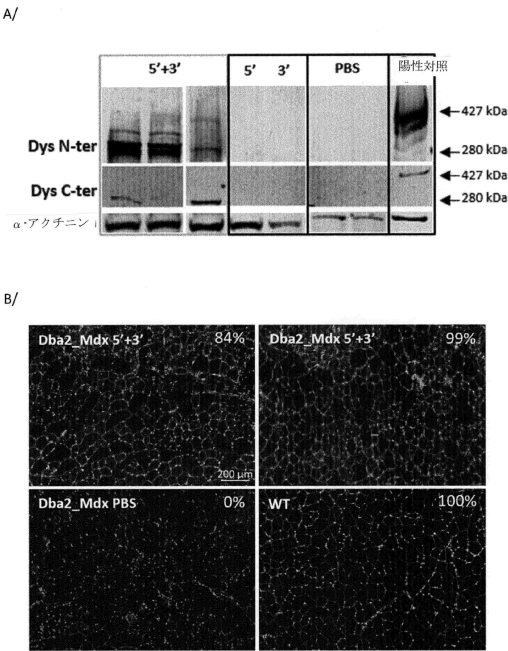


Figure 3

【 図 4 A 】

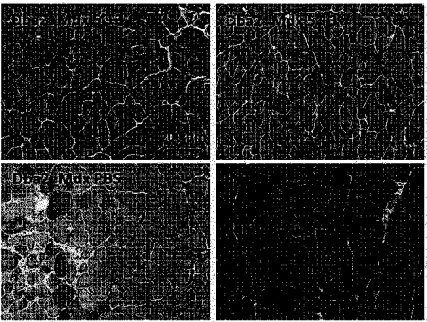


Figure 4A

【 図 4 B - 1 】

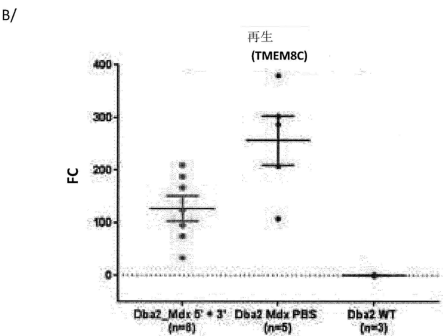


Figure 4B

【 図 4 B - 2 】

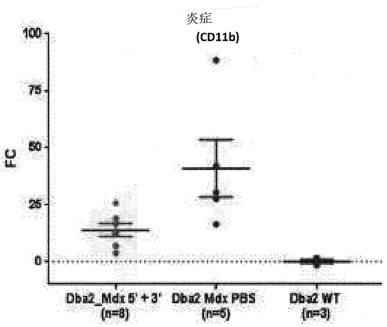


Figure 4B

10

20

30

40

50

【図 4 B - 3】

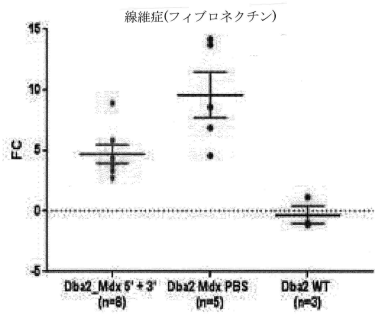


Figure 4B

【図 5】

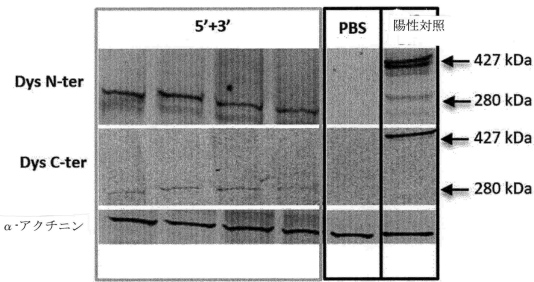
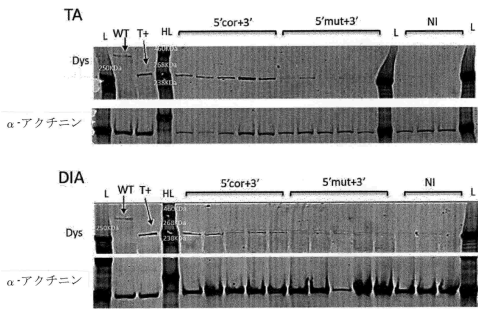


Figure 5

10

【図 6】

A/



B/

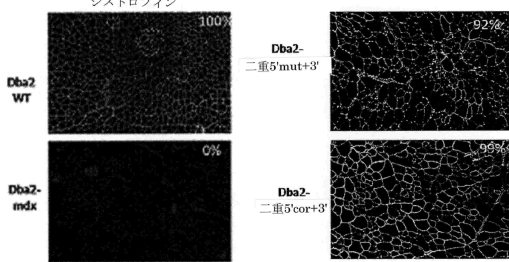


Figure 6

【図 7】

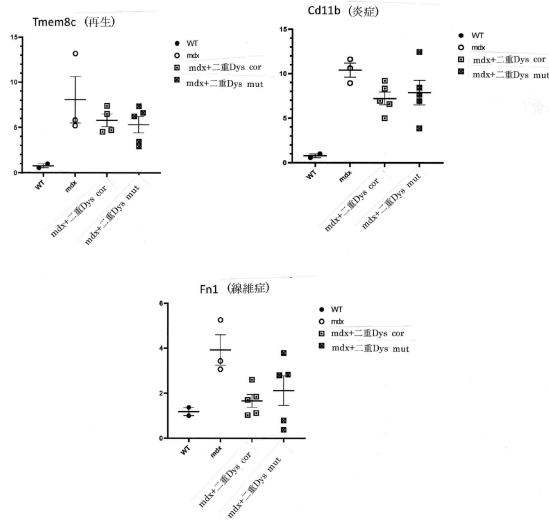


Figure 7

20

30

【配列表】

0007635139000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		Z N A
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	

ユニヴェルシテ・デヴリ・ヴァル・デソヌ

フランス・9 1 0 0 0・エヴリ・クールクーロンヌ・ブルヴァール・フランソワ・ミッテラン・
2 3

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 イザベル・リシャル

フランス・9 1 1 0 0・コルベイル・エッソンヌ・シュマン・デュ・セジェベ・1 1 3

(72)発明者 ウィリアム・ロスタル

フランス・9 1 6 0 0・サヴィニー・シュル・オルジュ・プラス・モンジュ・1

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 1 6 2 5 2 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 0 3 3 7 4 (J P , A)

KODIPPILI, K et al. , Dual AAV Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy with a 7-kb Mini-Dystrophin Gene in the Canine Model , Human Gene Therapy , 2018年 , Vol. 29, No. 3 , pp. 299-311

YAMASHITA, K et al. , The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b , Biochemical and Biophysical Research Communications , 2010年 , Vol. 391 , pp. 812-817

PRYADKINA, M et al. , A Comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2kb Dysferlin coding sequence , Molecular Therapy - Methods & Clinical Development , 2015年 , Vol. 2 , 15009

DELALANDE, O et al. , Dystrophin's central domain forms a complex filament that becomes disorganized by in-frame deletions , Journal of Biological Chemistry , 2018年 , Vol. 293, No. 18 , pp. 6637-6646

RUMEUR, EL , Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies , Bosnian Journal and Basic Medical Sciences , 2015年 , Vol. 15, No. 3 , p. 14-20

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

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