(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6966463号
(P6966463)
(45)発行日　令和3年11月17日(2021.11.17)　(24)登録日　令和3年10月25日(2021.10.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 7/01	(2006.01)	C12N	7/01	ZNA
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12	
A61K 35/76	(2015.01)	A61K	35/76	
A61P 21/04	(2006.01)	A61P	21/04	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111

請求項の数 19　(全 22 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-544786(P2018-544786)
(86)(22)出願日　平成29年2月24日(2017.2.24)
(65)公表番号　特表2019-511916(P2019-511916A)
(43)公表日　令和1年5月9日(2019.5.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/019422
(87)国際公開番号　WO2017/147467
(87)国際公開日　平成29年8月31日(2017.8.31)
審査請求日　令和2年2月21日(2020.2.21)
(31)優先権主張番号　62/300,500
(32)優先日　平成28年2月26日(2016.2.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　515289842
リサーチ　インスティチュート　アット　ネイションワイド　チルドレンズ　ホスピタル
アメリカ合衆国　オハイオ　４３２０５，コロンバス，　チルドレンズ　ドライブ　７００，　ルーム　ダブリュー１７２
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換えウイルス産物及びＤＵＸ４エクソンスキッピングを誘導するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを含む組換えアデノ随伴ウイルスであって、前記１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡは、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含み、前記組換えアデノ随伴ウイルスは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠き、コードされた前記ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導する、組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項２】

請求項１に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む、組成物。

【請求項３】

細胞においてＤＵＸ４エクソンスキッピングを誘導するための、請求項１に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む組成物であって、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含む前記組換えアデノ随伴ウイルスで前記細胞を形質導入するために、前記組成物が前記細胞と接触させられることを特徴とする、組成物。

【請求項４】

ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を、それを必要とする対象に送達するための組成物であって、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを含む組換えアデノ随伴ウイルスを含み、前記１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡは、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレ

オチド配列を含み、前記組換えアデノ随伴ウイルスは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠き、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導し、前記組成物が前記対象に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項５】

それを必要とする対象の顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための組成物であって、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを含む組換えアデノ随伴ウイルスを含み、前記１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡは、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含み、前記組換えアデノ随伴ウイルスは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠き、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導し、前記組成物が前記対象に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項６】

配列番号１に記載のポリヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項７】

配列番号２に記載のポリヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項８】

配列番号１および配列番号２に記載のポリヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項９】

前記アデノ随伴ウイルスが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３またはＡＡＶｒｈ７４である、請求項１に記載の組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項１０】

前記アデノ随伴ウイルスが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３またはＡＡＶｒｈ７４である、請求項２～５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１１】

用量が、筋肉内、静脈内、皮下、または、腹腔内に投与される、請求項２～５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１２】

１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを含む組換えアデノ随伴ウイルスであって、前記１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡは、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含み、コードされた前記ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導する、組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項１３】

請求項１２に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む、組成物。

【請求項１４】

細胞においてＤＵＸ４エクソンスキッピングを誘導するための、請求項１２に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む組成物であって、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含む前記組換えアデノ随伴ウイルスで前記細胞を形質導入するために、前記組成物が前記細胞と接触させられることを特徴とする、組成物。

【請求項１５】

ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を、それを必要とする対象に送達するための組成物であって、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを含む組換えアデノ随伴ウイルスを含み、前記１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡは、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含み、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導し、前記組成物が前記対象に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項１６】
それを必要とする対象の顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療するための組成物であって、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを含む組換えアデノ随伴ウイルスを含み、前記１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡは、配列番号１および／または配列番号２に記載のヌクレオチド配列を含み、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導し、前記組成物が前記対象に投与されることを特徴とする、組成物。
【請求項１７】
前記アデノ随伴ウイルスが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３またはＡＡＶｒｈ７４である、請求項１２に記載の組換えアデノ随伴ウイルス。
【請求項１８】
前記アデノ随伴ウイルスが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＡＶ１３またはＡＡＶｒｈ７４である、請求項１３～１６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９】
用量が、筋肉内、静脈内、皮下、または、腹腔内に投与される、請求項１３～１６のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１６年２月２６日に出願された先の米国仮特許出願第６２／３００，５００号の利益を主張するものであり、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本発明は、ヒト染色体４ｑ３５上のダブルホメオボックス遺伝子であるＤＵＸ４遺伝子のスプライシングプロファイルを変化させる方法に関するものである。本発明の組換えアデノ随伴ウイルスは、Ｕ７ベースの小型核ＲＮＡをコードするＤＮＡを送達して、ＤＵＸ４エクソンスキッピング及び短縮形態のＤＵＸ４の発現を誘導する。この方法は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー等の筋ジストロフィーの治療に適用される。
電子的に提出された資料の参照による組み込み
【０００３】
本出願は、開示の別個の部分として、コンピュータ可読形式の配列表（ファイル名：５０３９２ＰＣＴ＿ＳｅｑＬｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ、７，００３バイト、ＡＳＣＩＩテキストファイル）を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００４】
筋ジストロフィー（ＭＤ）は、遺伝性疾患群である。該群は、運動を制御する骨格筋の進行性の衰弱及び変性によって特徴付けられる。いくつかの形態のＭＤは幼年期または小児期に発症するが、中年以降まで発症しないものもある。この障害は、筋力低下（いくつかの形態のＭＤは心筋にも影響を及ぼす）の分布及び程度、発病年齢、進行速度、ならびに遺伝パターンに関して異なる。
【０００５】
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）は、顔、肩、及び四肢の筋肉の進行性及び非対称性の衰弱を特徴とする複雑な常染色体優性遺伝疾患である。症状は、成人期に典型的に起こり、ほとんどの患者は３０才までに臨床的特徴を示す。患者の約５％が乳幼児または若年者として症状を発症し、彼らは概してより重症である。　　臨床症状は、軽度（ある程度制限された筋力低下）から重度（車椅子依存）まで様々であり得る。歴史的

に、ＦＳＨＤは、３番目に一般的なＭＤに分類され、全世界で２万人の個体の１人に発症している。しかしながら、最近のデータは、ＦＳＨＤがヨーロッパで最も一般的なＭＤであることを示し、世界的な発生率が過小評価されている可能性があることを示唆している。

【０００６】

典型的なＦＳＨＤの症例（ＦＳＨＤ１Ａ、これまでＦＳＨＤと称されてきた）は、ヒト染色体４ｑ３５上の３．３キロベース（ｋｂ）のＤ４Ｚ４反復配列のコピー数を減少させるヘテロ接合性染色体欠失に関連している。簡潔に言えば、正常な個体は、両方の４ｑ３５対立遺伝子上に１１～１００個のタンデム反復Ｄ４Ｚ４のコピーを有するのに対し、ＦＳＨＤ患者は、１つの正常な対立遺伝子と、１～１０個の反復配列を含む１つの収縮した対立遺伝子とを有する。加えて、ＦＳＨＤに関連するＤ４Ｚ４の収縮は、特定の疾患許容性染色体４ｑ３５バックグラウンド（４ｑＡと呼ばれる）で起こらなければならない。重要なことに、ＦＳＨＤ関連欠失の結果として、遺伝子が完全に失われるか、または構造的に変異することはない。代わりに、ＦＳＨＤに関連する遺伝的変化は、筋肉を損傷する毒性ＤＵＸ４遺伝子の発現を引き起こす。ＦＳＨＤ２（ＦＳＨＤ１Ｂとしても知られている）は、ＦＳＨＤ１と表現型的に同一であり、ＤＵＸ４の発現と関連し、４ｑＡ染色体バックグラウンドを必要とする。ＦＳＨＤ２は、Ｄ４Ｚ４反復配列の収縮には関連していないが、代わりに、通常４ｑＡでＤＵＸ４遺伝子座の抑制に関与するクロマチン調節因子であるＳＭＣＨＤ１遺伝子の突然変異によって引き起こされる。突然変異したＳＭＣＨＤ１タンパク質は、ヘテロクロマチンを４ｑＡ　ＤＵＸ４対立遺伝子に付加することに関与できず、それによってＤＵＸ４遺伝子の発現を可能にする。

【０００７】

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

【０００８】

ＦＳＨＤの病因におけるＤＵＸ４の役割は、以下のように説明することができる。第１

に、同一のコード領域を有するＤ４Ｚ４、及びＤ４Ｚ４反復配列は、いくつかの類似したマイクロＲＮＡを含む、より小さいセンス及びアンチセンス転写物を有する。過剰発現されたＤＵＸ４転写物及び約５０ｋＤａの全長ＤＵＸ４タンパク質は、ＦＳＨＤ患者からの生検及び細胞株に見出される。これらのデータは、ＦＳＨＤの病因の転写抑制解除モデルと一致する。加えて、偽遺伝子とは異なり、タンデムに並んだＤ４Ｚ４反復配列は、少なくとも１１の異なる胎盤哺乳動物種（非胎盤動物にはＤ４Ｚ４反復配列がない）において保存されており、ＤＵＸ４のＯＲＦ内で最大の配列保存が起こるため、Ｄ４Ｚ４反復配列及びＤＵＸ４は機能的に重要である可能性が高い。第２に、過剰発現されたＤＵＸ４は、組織培養細胞及びインビボで下等生物を発生させる胚性前駆細胞に対して毒性を示す。この毒性は、少なくとも部分的に、ＤＵＸ４トランスフェクト細胞におけるカスパーゼ－３の活性化によって示唆されるアポトーシス促進機構、及び２細胞段階でＤＵＸ４　ｍＲＮＡを注入された発育停止アフリカツメガエル胚におけるＴＵＮＥＬ陽性核の存在によって生じる。これらの知見は、カスパーゼ－３を含むいくつかのアポトーシス促進性タンパク質がＦＳＨＤ患者の筋肉に存在することを示す研究と一致する。アポトーシスを刺激することに加えて、ＤＵＸ４は、筋形成を負に制御し得る。ヒトＤＵＸ４は、潜在的にＰＡＸ３及び／またはＰＡＸ７を妨害することによってインビトロでマウスＣ２Ｃ１２筋芽細胞の分化を阻害し、ゼブラフィッシュ胚またはアフリカツメガエル胚の前駆細胞に送達されると、発育停止及びいくつかの筋肉マーカーの染色低下を引き起こす。最後に、異常なＤＵＸ４機能は、ＦＳＨＤ患者の筋肉に見られる潜在的に重要な分子変化に直接関連する。具体的には、全長ヒトＤＵＸ４は、約５０ｋＤａのダブルホメオドメイン転写因子をコードし、その唯一の既知の標的であるＰｉｔｘ１が、ＤＵＸ４を過剰発現するＦＳＨＤ患者の筋肉内で上昇した。これらのデータは、ＤＵＸ４が、正常な筋肉の完全性を維持することと矛盾する多数の下流分子変化を触媒することを支持する。

【０００９】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）を用いたスプライシングの調節は、過去２０年間、多くの疾患、とりわけデュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）の潜在的な治療法として開発されてきた。これには、前臨床及び臨床試験が含まれる（Ｗｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，２０：９９２－１０００（２０１４）及びＭｅｎｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．，７４：６３７－４７（２０１３）。この疾患は、ＡＯＮが筋線維に浸透するのを助ける多孔性の筋膜と関連しているため、ＤＭＤはこの種の治療に適していると考えられる。ＦＳＨＤには膜異常は認められず、効率的なＡＯＮ送達を達成することは困難であり得る。したがって、任意のヌクレオチドベースの治療と同様に、治療薬の送達は大きな障壁である。ＡＡＶベースのＵ７－ｓｎＲＮＡ遺伝子療法アプローチは、これらの潜在的な送達問題を回避するのに役立つことが本明細書において企図される。Ｕ７－ｓｎＲＮＡは通常、ヒストンプレｍＲＮＡ　３’末端プロセシングに関与するが、エクソンスキッピングのために修飾されている。Ｕ７－ｓｎＲＮＡシステムには３つの主要な特徴がある：（１）標的細胞における修飾ｓｎＲＮＡの発現を駆動するＵ７プロモータ、（２）スプライシング接合部、分岐点、またはスプライシングエンハンサと塩基対形成するように設計されたｓｎＲＮＡ骨格に挿入されるＡＯＮ、（３）抑制性リボ核タンパク質を標的プレｍＲＮＡに補充し、スプライシングを防止する修飾配列（ｓｍＯＰＴと呼ばれる）（Ｓｃｈｕｍｐｅｒｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．ａｎｄ　Ｍｏｌ．Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，６１：２５６０－２５７０（２００４））。最後に、ＡＯＮ及びＵ７－ｓｎＲＮＡが、筋ジストロフィーの大動物モデルにおいてインビボでの使用に安全であることが証明されたことは注目に値する（ＬｅＧｕｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２２：１９２３－１９３５（２０１４））。

【００１０】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、複製不全のパルボウイルスであり、その一本鎖ＤＮＡゲノムは、約４．７ｋｂ長であり、１４５ヌクレオチドの逆位末端反復配列（ＩＴＲ）を２つ含む。ＡＡＶの複数の血清型が存在する。ＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、既知である。例えば、ＡＡＶ－１の完全ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿

００２０７７において提供され、ＡＡＶ－２の完全ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１４０１及びＳｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，４５：５５５－５６４（１９８３）において提供され、ＡＡＶ－３の完全ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿１８２９において提供され、ＡＡＶ－４の完全ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００１８２９において提供され、ＡＡＶ－５ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０８５７１６において提供され、ＡＡＶ－６の完全ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００ １８６２において提供され、ＡＡＶ－７及びＡＡＶ－８ゲノムの少なくとも一部は、それぞれ、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＸ７５３２４６及びＡＸ７５３２４９において提供され、ＡＡＶｒｈ７４ゲノム、ＡＡＶ－９ゲノムは、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８：６３８１－６３８８（２００４）において提供され、ＡＡＶ－１０ゲノムは、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１３（１）：６７－７６（２００６）において提供され、ＡＡＶ－１１ゲノムは、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３３０（２）：３７５－３８３（２００４）において提供され、ＡＡＶ－１２のゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＤＱ８１３６４７．１において提供され、ＡＡＶ－１３のゲノムはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＥＵ２８５５６２．１において提供される。ウイルスＤＮＡ複製（ｒｅｐ）、カプシド形成／パッケージング、及び宿主細胞染色体組み込みを指示するシス作用配列が、ＡＡＶ ＩＴＲに含まれる。３つのＡＡＶプロモータ（相対的なマップ位置のためにｐ５、ｐ１９、及びｐ４０と命名された）は、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をコードする２つのＡＡＶ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ＡＡＶイントロンの差異的スプライシング（ヌクレオチド２１０７及び２２２７における）に関連する２つのｒｅｐプロモータ（ｐ５及びｐ１９）により、ｒｅｐ遺伝子から４つのｒｅｐタンパク質（ｒｅｐ７８、ｒｅｐ６８、ｒｅｐ５２、及びｒｅｐ４０）が生成される。Ｒｅｐタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を有する。ｃａｐ遺伝子は、ｐ４０プロモータから発現され、３つのカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３をコードする。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、３つの関連するカプシドタンパク質の生成を担う。単一のコンセンサスポリアデニル化部位は、ＡＡＶゲノムのマップ位置９５に位置する。ＡＡＶの生活環及び遺伝学は、Ｍｕｚｙｃｚｋａ、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５８：９７－１２９（１９９２）において検討されている。

【００１１】

ＡＡＶは、例えば遺伝子療法において外来ＤＮＡを細胞に送達するためのベクターとして魅力的な特有の特徴を有する。培養中の細胞のＡＡＶ感染は非細胞変性であり、ヒト及び他の動物の自然感染は不顕性かつ無症候性である。さらに、ＡＡＶは多くの哺乳動物細胞に感染し、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性がある。さらに、ＡＡＶは分裂細胞及び非分裂細胞に徐々に形質導入し、本質的にそれらの細胞の寿命の間、転写的に活性な核エピソーム（染色体外因子）として存続することができる。ＡＡＶプロウイルスゲノムは、プラスミドにクローニングされたＤＮＡとして挿入され、組換えゲノムの構築を実現可能にする。さらに、ＡＡＶ複製及びゲノムカプシド形成を指示するシグナルがＡＡＶゲノムのＩＴＲ内に含まれるため、（複製カプシドタンパク質及び構造カプシドタンパク質（ｒｅｐ－ｃａｐ）をコードする）ゲノムの内部約４．３ｋｂの一部または全てが外来ＤＮＡで置換され得る。ＡＡＶベクターを作製するために、ｒｅｐタンパク質及びｃａｐタンパク質はトランスで提供されてもよい。ＡＡＶの別の重要な特徴は、それが極めて安定かつ丈夫なウイルスであるということである。ＡＡＶは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件（５６℃～６５℃で数時間）に容易に耐えるため、ＡＡＶの低温保存はそれほど重要ではない。ＡＡＶは、凍結乾燥することさえできる。最後に、ＡＡＶに感染した細胞は、重複感染に耐性を示さない。

当該技術分野では、ＦＳＨＤを含む筋ジストロフィーの治療に対する必要性が依然として存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１２】
【非特許文献１】Ｗｕｅｂｂｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｐａｔｈｏｌ．，３（４）：３８６－４００（２０１０）
【非特許文献２】Ｗａｌｌａｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１７（Ｓｕｐｐｌ．１）：Ｓ１５１（２００９
【非特許文献３】Ｗｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１７（Ｓｕｐｐｌ．１）：Ｓ２００（２００９）
【非特許文献４】Ｎｅｇｕｅｍｂｏｒ　ａｎｄ　Ｇａｂｅｌｌｉｎｉ，Ｅｐｉｇｅｎｏｍｉｃｓ，２（２）：２７１－２８７（２０１０）
【非特許文献５】Ｗｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，２０：９９２－１０００（２０１４
【非特許文献６】Ｍｅｎｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．，７４：６３７－４７（２０１３）
【非特許文献７】Ｓｃｈｕｍｐｅｒｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．ａｎｄ　Ｍｏｌ．Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，６１：２５６０－２５７０（２００４）
【非特許文献８】ＬｅＧｕｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２２：１９２３－１９３５（２０１４）
【非特許文献９】Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，４５：５５５－５６４（１９８３）
【非特許文献１０】Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７８：６３８１－６３８８（２００４）
【非特許文献１１】Ｍｕｚｙｃｚｋａ、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５８：９７－１２９（１９９２）
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明は、全長の毒性ＤＵＸ４タンパク質の発現を防止または低減するための方法及び生成物を提供する。この方法は、ＤＵＸ４遺伝子に特異的なＵ７ベースの小型核ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）を筋細胞等の細胞に送達することを含む。ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡは、例えば、エクソンスキッピングを誘導することにより、細胞内でＤＵＸ４の非毒性の短いアイソフォームの発現を誘導することができる。方法及び生成物の使用は、例えば、ＦＳＨＤの予防または治療に適応される。本発明のいくつかの実施形態は、ＡＡＶの特有の特性を利用して、ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするＤＮＡを筋細胞に送達する。本発明の他の実施形態は、他のベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ウマ関連ウイルス、アルファウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス及びワクシニアウイルス等の他のウイルスベクター）を用いて、ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするポリヌクレオチドを送達する。
【００１４】
一態様では、本発明は、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導することができるＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡを提供する。別の態様では、本発明は、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするポリヌクレオチドを提供する。別の態様では、本発明は、ｒＡＡＶがｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするｒＡＡＶを提供する。いくつかの実施形態では、ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡは、ＤＮＡ構築物ｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１（配列番号１）またはＤＮＡ構築物ｈＵ７－ＥＸ１－ＳＤ（配列番号２）によってコードされる。
【００１５】
別の態様では、本発明は、ｒＡＡＶがｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするｒＡＡＶ（例えば、配列番号１または２に記

載のＤＮＡを含むｒＡＡＶ）を含む組成物を提供する。

【００１６】

さらに別の態様では、本発明は、細胞内でＤＵＸ４遺伝子のスプライシングを調節する方法を提供し、この方法は、細胞を、ｒＡＡＶがｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするｒＡＡＶ（例えば、配列番号１または２に記載のＤＮＡを含むｒＡＡＶ）と接触させることを含む。ＤＵＸ４スプライシングは、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、９５、または９９パーセント調節することができる。

【００１７】

さらに別の態様では、本発明は、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするＤＮＡを、それを必要とする対象に送達する方法を提供し、この方法は、対象に、ｒＡＡＶがｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするｒＡＡＶ（例えば、配列番号１または２に記載のＤＮＡを含むｒＡＡＶ）を投与することを含む。

【００１８】

さらに別の態様では、本発明は、筋ジストロフィー（ＦＳＨＤを含むが、これに限定されない）を予防または治療する方法を提供し、この方法は、ｒＡＡＶがｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠く、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするｒＡＡＶ（例えば、配列番号１または２に記載のＤＮＡを含むｒＡＡＶ）を投与することを含む。「治療する」には、筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ等）の１つ以上の症状の改善が含まれる。分子的、生化学的、組織学的及び機能的エンドポイントは、ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡの治療効果を実証する。本発明が意図する治療のエンドポイントには、限定されないが、罹患した筋肉における全長ＤＵＸ４タンパク質の減少または排除、筋繊維直径の増大、及び筋力の改善のうちの１つ以上が含まれる。

【００１９】

本発明の組換えＡＡＶゲノムは、例えば、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ（すなわち、ＤＵＸ４遺伝子配列に結合し、Ｕ７　ｓｎＲＮＡから発現されるｓｎＲＮＡ）をコードするポリヌクレオチドに隣接する１つ以上のＡＡＶ　ＩＴＲを含む。このポリヌクレオチドは、転写制御ＤＮＡ、特に標的細胞において機能的なプロモータＤＮＡに作動可能に連結されている。

【００２０】

本発明のｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ　ＤＮＡを欠いている。ｒＡＡＶゲノム中のＡＡＶ　ＤＮＡは、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、ＡＡＶ－７、ＡＡＶ－８、ＡＡＶｒｈ７４、ＡＡＶ－９、ＡＡＶ－１０、ＡＡＶ－１１、ＡＡＶ－１２及びＡＡＶ－１３を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスが誘導され得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよい。上記の背景技術の項で述べたように、種々のＡＡＶ血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野で既知である。

【００２１】

本発明のＤＮＡプラスミドは、本発明のｒＡＡＶゲノムを含む。ＤＮＡプラスミドは、感染性ウイルス粒子中にｒＡＡＶゲノムを構築するために、ＡＡＶのヘルパーウイルス（例えばアデノウイルス、Ｅ１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ＡＡＶゲノム、ｒｅｐ及びｃａｐ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、ｒＡＡＶ粒子を生成するための技術は、当該技術分野において標準的である。ｒＡＡＶの生成は、以下の構成成分が単一細胞（本明細書においてパッケージング細胞として示される）内に存在することを必要とする：ｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムから分離された（すなわち、その中には存在しない）ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能。ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のＡＡＶ血清型に由来してもよく、ＡＡＶ血清型ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡ

Ｖ－６、ＡＡＶ－７、ＡＡＶ－８、ＡＡＶｒｈ７４、ＡＡＶ－９、ＡＡＶ－１０、ＡＡＶ－１１、ＡＡＶ－１２、及びＡＡＶ－１３を含むがこれらに限定されない、ｒＡＡＶゲノムＩＴＲとは異なるＡＡＶ血清型に由来してもよい。偽型ｒＡＡＶの生成は、例えば、ＷＯ０１／８３６９２に開示されている。他の種類のｒＡＡＶ変異体、例えばカプシド変異を有するｒＡＡＶもまた企図される。例えば、Ｍａｒｓｉｃ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，２２（１１）：１９００－１９０９（２０１４）を参照されたい。

【００２２】

パッケージング細胞を作製する方法は、ＡＡＶ粒子生成に必要な全ての構成成分を安定に発現する細胞株を作製することである。例えば、ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠くｒＡＡＶゲノム、ｒＡＡＶゲノムから分離されたＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子、ならびにネオマイシン耐性遺伝子等の選択可能なマーカーを含むプラスミド（または複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれる。ＡＡＶゲノムは、ＧＣのテーリング（Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓ６．ＵＳＡ，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）等の手順によって細菌プラスミドに導入されてきた。次いで、パッケージング細胞株を、アデノウイルス等のヘルパーウイルスに感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、ｒＡＡＶの大規模な生成に好適であることである。好適な方法の他の例は、プラスミドではなくアデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いて、ｒＡＡＶゲノムならびに／またはｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子をパッケージング細胞内に導入する。

【００２３】

ｒＡＡＶ生成の一般的原理は、例えば、Ｃａｒｔｅｒ，１９９２，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１５３３－５３９及びＭｕｚｙｃｚｋａ，１９９２，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５８：９７－１２９）において検討されている。　種々のアプローチが、Ｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６４６６（１９８４）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１（１９８５）、ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６２：１９６３（１９８８）、及びＬｅｂｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，１９８８ Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７：３４９（１９８８）。Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６３：３８２２－３８２８）、米国特許第５，１７３，４１４号、ＷＯ９５／１３３６５及び対応する米国特許第５，６５８．７７６号、ＷＯ９５／１３３９２、ＷＯ９６／１７９４７、ＰＣＴ／ＵＳ９８／１８６００、ＷＯ９７／０９４４１（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１４４２３）、ＷＯ９７／０８２９８（ＰＣＴ／ＵＳ９６／１３８７２）、ＷＯ９７／２１８２５（ＰＣＴ／ＵＳ９６／２０７７７）、ＷＯ９７／０６２４３（ＰＣＴ／ＦＲ９６／０１０６４）、ＷＯ９９／１１７６４、Ｐｅｒｒｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｖａｃｃｉｎｅ １３：１２４４－１２５０、Ｐａｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：６０９－６１５、Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：１１２４－１１３２、米国特許第５，７８６，２１１号、米国特許第５，８７１，９８２号、及び米国特許第６，２５８，５９５号に記載されている。

【００２４】

したがって、本発明は、感染性ｒＡＡＶを産生するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、ＨｅＬａ細胞、２９３細胞、及びＰｅｒＣ．６細胞（同種の２９３株）等の安定して形質転換された癌細胞であってもよい。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換された癌細胞ではない細胞、例えば、低継代２９３細胞（アデノウイルスのＥ１で形質転換されたヒト胎児腎臓細胞）、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（サル腎臓細胞）及びＦＲｈＬ－２細胞（アカゲザル肺細胞）である。

【００２５】

本発明の組換えＡＡＶ（すなわち、感染性カプシド化ｒＡＡＶ粒子）は、ｒＡＡＶゲノムを含む。実施形態には、限定されるものではないが、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするゲノム、例えば、配列番号１に記載のＤＮＡもしくは配列番号２に記載のＤＮＡを含むか、または両方のＤＮＡを含むゲノムを含むｒＡＡＶが含まれる。ｒＡＡＶのゲノムは、ＡＡＶのｒｅｐ及びｃａｐ　ＤＮＡを欠いており、すなわち、ゲノムのＩＴＲ間にＡＡＶのｒｅｐまたはｃａｐ　ＤＮＡが存在しない。

【００２６】

ｒＡＡＶは、当該技術分野における標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によって精製されてもよい。ヘルパーウイルスからｒＡＡＶベクターを精製するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｃｌａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１０（６）：１０３１－１０３９（１９９９）、Ｓｃｈｅｎｐｐ　ａｎｄ　Ｃｌａｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，６９　４２７－４４３（２００２）、米国特許第６，５６６，１１８号、及びＷＯ９８／０９６５７に開示される方法を含む。

【００２７】

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

【００２８】

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

【００２９】

インビボまたはインビトロで、ｒＡＡＶで標的細胞に形質導入する方法が、本発明によって企図される。インビボ方法は、有効用量または有効な複数用量の本発明のｒＡＡＶを含む組成物を、それを必要とする対象（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、その投与は予防的である。用量が障害／疾患の発症後に投与される場合、その投与は治療的である。本発明の実施形態では、有効用量は、治療される障害／疾患の状態に関連する少なくとも１つの症状を緩和（排除または軽減）し、障害／疾患の状態への進行を遅らせるかもしくは予防し、障害／疾患の状態の進行を遅らせるかもしくは予防し、疾患の程度を軽減し、疾患の寛解（部分的または完全な）をもたらし、かつ／または生存を延長する用量である。本発明の方法を用いた予防または治療のために企図される疾患の例は、ＦＳＨＤである。

【００３０】

併用治療／療法もまた、本発明によって企図される。本明細書で使用される組み合わせには、同時治療または逐次治療の両方が含まれる。本発明の方法と標準的な医療処置（例えば、コルチコステロイド）との組み合わせが、新規療法との組み合わせと同様に、特に企図される。国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０１６３５２号に開示されている療法を用いた併用療法が特に企図される。下の段落［００６８］と一致して、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０１６３５２号は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００３１】

有効用量の組成物の投与は、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、経鼻、経肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、または膣を含むが、これらに限定されない当該技術分野において標準的な経路によるものであり得る。本発明のｒＡＡＶのＡＡＶ成分（特に、ＡＡＶ　ＩＴＲ及びカプシドタンパク質）の投与経路（複数可）及び血清型（複数可）は、治療される感染及び／もしくは疾患の状態、ならびにＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡを発現する標的細胞／組織（複数可）を考慮に入れて、当業者によって選択及び／または適合され得る。

【００３２】

特に、本発明のｒＡＡＶの実際の投与は、ｒＡＡＶ組換えベクターを対象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って達成され得る。本発明による投与には、筋肉、血流への注射、及び／または肝臓への直接注射が含まれるが、これらに限定されない。リン酸緩衝生理食塩水にｒＡＡＶを単に再懸濁することは、筋組織発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、ｒＡＡＶと同時投与することができる担体または他の構成成分について既知の制限はない（ただし、ＤＮＡを分解する組成物は、ｒＡＡＶを用いる通常の様式では回避されるべきである）。ｒＡＡＶのカプシドタンパク質は、ｒＡＡＶが筋肉等の目的の特定の標的組織を標的とするように修飾され得る。例えば、ＷＯ０２／０５３７０３を参照されたい。薬学的組成物は、注射可能な製剤として、または経皮輸送によって筋肉に送達される局所製剤として調製することができる。筋肉内注射及び経皮的輸送の両方のための多数の製剤が以前に開発されており、本発明の実施に使用することができる。ｒＡＡＶは、投与及び取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用することができる。

【００３３】

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

【００３４】

注射用途に好適な薬学的形態には、滅菌水性溶液または分散液、及び滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、形態は無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体でなければならない。それは製造及び保存の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌等の微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、それらの好適な混合物、及び植物油を含む溶媒または分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合は必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン

酸、チメロサール等によってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用により、注射用組成物の長期吸収をもたらすことができる。

【００３５】

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

【００３６】

ｒＡＡＶ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、所望の標的筋細胞が対象から取り出され、ｒＡＡＶで形質導入され、対象に再導入される。代替的に、それらの細胞が対象において不適切な免疫応答を惹起しない場合、同系または異種の筋細胞を使用することができる。

【００３７】

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

【００３８】

本発明のｒＡＡＶによる細胞の形質導入は、ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡの持続的な発現をもたらす。したがって、本発明は、ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡを発現するｒＡＡＶを対象、好ましくはヒトに投与／送達する方法を提供する。これらの方法には、本発明の１つ以上のｒＡＡＶで組織（筋肉等の組織、肝臓及び脳等の器官、ならびに唾液腺等の腺を含むが、これらに限定されない）に形質導入することが含まれる。形質導入は、組織特異的制御要素を含む遺伝子カセットを用いて行うことができる。例えば、本発明の一実施形態は、アクチン及びミオシン遺伝子ファミリー、例えば、ｍｙｏＤ遺伝子ファミリー（Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５１：７６１－７６６（１９９１）を参照されたい）、筋細胞特異的エンハンサ結合因子ＭＥＦ－２（Ｃｓｅｒｊｅｓｉ　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由来の制御要素、（Ｊｏｈｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ，９：３３９３－３３９９（１９８９）を参照されたい）及びマウスクレアチンキナーゼエンハンサ（ｍＣＫ）要素、骨格速収縮トロポニンＣ遺伝子、緩徐収縮心臓トロポニンＣ遺伝子、及び緩徐収縮トロポニンＩ遺伝子由来の制御要素：低酸素誘導核因子（Ｓｅｍｅｎｚａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８８：５６８０－５６８４（１９９１））、グルココルチコイド応答要素（ＧＲＥ）を含むステロイド誘導要素及びプロモータ（Ｍａｄｅｒ　ａｎｄ　Ｗｈｉｔｅ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：５６０３－５６０７（１９９３）を参照されたい）に由来するもの、及び他の制御要素を含むが、これらに限定されない、筋肉特異的制御要素によって誘導される筋細胞及び筋組織に形質導入する方法を提供する。

【００３９】

筋組織は、生命維持に不可欠な器官ではなく、かつ到達しやすいため、インビボでのＤ

ＮＡ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１つ以上のＵ７ベースのｓｎＲＮＡの持続的な発現を意図する。

【００４０】

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

【００４１】

「形質導入」という用語は、本発明の複製不全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１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡの投与／送達を指すために使用され、レシピエント細胞による１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡの発現をもたらす。

【００４２】

したがって、本発明は、有効用量（または本質的に同時に投与される用量、もしくは間隔をあけて投与される用量）の１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡをコードするｒＡＡＶを、それを必要とする患者（例えば、ＦＳＨＤ患者）に投与する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００４３】

【図１】ヌクレオチド１～３００が５’ＵＴＲであるヒトＤＵＸ４　ＤＮＡ配列（配列番号５）を示す。ヌクレオチド３０１～１５７５はＤＵＸ４オープンリーディングフレーム（タンパク質をコードする）であり、ヌクレオチド１～１５８２はエクソン１であり、ヌクレオチド１５４０～１５７１は７７９配列結合部位であり、ヌクレオチド１５７３～１６０７は７７８配列結合部位であり、ヌクレオチド１５８３～１７１８はイントロン１であり、ヌクレオチド１７１９～１８１１はエクソン２であり、ヌクレオチド１８１２～２１７４はイントロン２であり、ヌクレオチド２１７５～２３４７は、ポリＡ部位で終端するエクソン３配列である。

【００４４】

【図２Ａ】ＤＵＸ４遺伝子構造及びＵ７　ｓｎＲＮＡアンチセンス結合部位を示す。図２Ａ）４番染色体のＤＵＸ４遺伝子座。図２Ｂ）ＤＵＸ４転写物は３つのエクソン（長方形）から生じる。ＤＵＸ４コード領域が示されており、エクソン１の黒いボックスは２つのＤＮＡ結合ドメインを表す。イントロンは、下向きの線によって表され、ポリＡシグナルが同定されている。図２Ｃ）Ｕ７　ｓｎＲＮＡの構造、及びＢ）に示すＤＵＸ４－ＦＬ転写物中の各結合配列の相対的位置。

【図２Ｂ】同上。

【図２Ｃ】同上。

【００４５】

【図３Ａ】ＤＵＸ４細胞死及び発現アッセイの結果を示す。図２Ａ）短縮形態のＤＵＸ４（ＤＵＸ４－ｓ）ではなく、全長ＤＵＸ４（ＤＵＸ４－ＦＬ）が、カスパーゼ活性（蛍光出力）を測定するＡｐｏ－ＯＮＥカスパーゼ－３／７アッセイにおいてＨＥＫ２９３細胞のアポトーシス死を引き起こした。図２Ｂ）本明細書に記載のＵ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物でＨＥＫ２９３細胞を処理する実験では、配列７７８（ｈＵ７－ＥＸ１－ＳＤ）及び７７９（ｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１）が、全長ＤＵＸ４タンパク質の発現を減少させ（ウェスタンブロット）、配列７７９（ｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１）が、アポトーシスを測定するためのカスパーゼ－３／７アッセイの読み出しを用いてＨＥＫ２９３を死滅から有意に保護した。

【図３Ｂ】同上。

【発明を実施するための形態】

【００４６】

ＦＳＨＤの病因におけるＤＵＸ４の役割は、以下のように説明することができる。第１

に、Ｄ４Ｚ４反復配列は、偽遺伝子ではない。ＤＵＸ４遺伝子座は、同一のコード領域を有する１．７ｋｂ及び２．０ｋｂの全長ｍＲＮＡを産生し、Ｄ４Ｚ４反復配列はまた、いくつかの類似したマイクロＲＮＡを含む、より小さいセンス及びアンチセンス転写物を有する。過剰発現されたＤＵＸ４転写物及び約５０ｋＤａの全長ＤＵＸ４タンパク質は、ＦＳＨＤ患者からの生検及び細胞株に見出される。これらのデータは、ＦＳＨＤの病因の転写抑制解除モデルと一致する。加えて、偽遺伝子とは異なり、タンデムに並んだＤ４Ｚ４反復配列は、少なくとも１１の異なる胎盤哺乳動物種（非胎盤動物にはＤ４Ｚ４反復配列がない）において保存されており、ＤＵＸ４のＯＲＦ内で最大の配列保存が起こるため、Ｄ４Ｚ４反復配列及びＤＵＸ４は機能的に重要である可能性が高い。第２に、過剰発現されたＤＵＸ４は、組織培養細胞及びインビボで下等生物を発生させる胚性前駆細胞に対して毒性を示す。この毒性は、少なくとも部分的に、ＤＵＸ４トランスフェクト細胞におけるカスパーゼ－３の活性化によって示唆されるアポトーシス促進機構、及び２細胞段階でＤＵＸ４　ｍＲＮＡを注入された発育停止アフリカツメガエル胚におけるＴＵＮＥＬ陽性核の存在によって生じる。これらの知見は、カスパーゼ－３を含むいくつかのアポトーシス促進性タンパク質がＦＳＨＤ患者の筋肉に存在することを示す研究と一致する。アポトーシスを刺激することに加えて、ＤＵＸ４は、筋形成を負に制御し得る。ヒトＤＵＸ４は、潜在的にＰＡＸ３及び／またはＰＡＸ７を妨害することによってインビトロでマウスＣ２Ｃ１２筋芽細胞の分化を阻害し、ゼブラフィッシュ胚またはアフリカツメガエル胚の前駆細胞に送達されると、発育停止及びいくつかの筋肉マーカーの染色低下を引き起こす。最後に、異常なＤＵＸ４機能は、ＦＳＨＤ患者の筋肉に見られる潜在的に重要な分子変化に直接関連する。具体的には、全長ヒトＤＵＸ４は、約５０ｋＤａのダブルホメオドメイン転写因子をコードし、その唯一の既知の標的であるＰｉｔｘ１が、ＤＵＸ４を過剰発現するＦＳＨＤ患者の筋肉内で上昇した。これらのデータは、ＤＵＸ４が正常な筋肉の完全性を維持することと矛盾する多数の下流分子変化を触媒することを支持する。

【００４７】

ＦＳＨＤの転写抑制解除は、染色体４ｑサブテロメアから生じる毒性ＤＵＸ４転写因子（全長、長い形態）の発現の増加に関連する。この領域は、通常、ヘテロクロマチンに包埋されており、したがって抑制されている。

【００４８】

本明細書で企図される治療方法は、非毒性ＤＵＸ４（短縮）形態を好むようにＤＵＸ４スプライシングプロファイルを変化させる。これは、毒性のある全長ＤＵＸ４の生成を阻止するように設計されたアンチセンスエクソンスキッピング戦略を用いることによって達成される。

【実施例】

【００４９】

本発明の例示的な態様及び実施形態を、以下の実施例に従って例示する。

実施例１

ＤＵＸ４エクソンスキッピングのためのＵ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物

【００５０】

上記のように、ＦＳＨＤは、染色体４ｑサブテロメアからの毒性ＤＵＸ４転写因子の発現の増加と関連している。この領域は、通常、ヘテロクロマチンに包埋されており、したがって抑制されている：ＦＳＨＤでは、Ｄ４Ｚ４反復配列と呼ばれるクロマチンシーディング反復要素の欠失（ＦＳＨＤ１：症例の９５％）、またはクロマチン修飾遺伝子ＳＭＣＨＤ１の突然変異（ＦＳＨＤ２：５％）が、４ｑ領域を抑制解除してＤＵＸ４転写因子の発現を誘発するエピジェネティックな変化を引き起こす（図２Ａ及びＢ）。ＤＵＸ４の過剰発現モデルを用いて、我々は全長ＤＵＸ４（ＤＵＸ４－ＦＬ）がインビトロで細胞死を引き起こし、インビボで筋肉損傷を引き起こす一方で、ＤＵＸ４（ＤＵＸ４ｓ）の切断型天然アイソフォームは非毒性であることを見出した。

【００５１】

次いで、我々は、全長ＤＵＸ４のスプライシングを防止するか、またはそのポリアデニル化を阻害するためにＵ７ベースのｓｎＲＮＡを設計した（図２Ｃ）。Ｕ７　ｓｎＲＮＡは、通常、ヒストンプレｍＲＮＡ　３’末端プロセシングに関与するが、Ｓｍ／Ｌｓｍタンパク質結合部位を変異させることにより、Ｕ７　ｓｎＲＮＡを多目的スプライシング調節ツールにすることができる（Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｇｅｎｅｔ　９（１１）：ｅ１００３９４７）。我々は、（スプライスエンハンサ、スプライスドナーまたはスプライスアクセプターのマスキングにより）ＤＵＸ４－ＦＬアイソフォームのスプライシングをブロックするか、またはポリアデニル化を防止し、転写物を不安定化するように設計されたＵ７ベースのｓｎＲＮＡを作製した。ＤＵＸ４遺伝子は、３つのエクソンからなる：第１のエクソンは全長ＤＵＸ４　ＯＲＦをコードし、他の２つは非翻訳エクソンである。エクソン３は、ＦＳＨＤ許容筋肉においてのみ用いられる非標準ポリＡシグナルを含む。全長ＤＵＸ４　ＯＲＦは、２つのＤＮＡ結合ドメイン及びＣ末端トランス活性化ドメインを含むタンパク質をコードする。この全長タンパク質は、筋肉及び他の組織／細胞に対して毒性を示す。ＤＵＸ４－ｓ（短縮ＤＵＸ４）と呼ばれる、同じエクソン１のＯＲＦから生じる第２のアイソフォームが報告されているが（Ｓｎｉｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌｏｓ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，６（１０）：ｅ１００１１８１（２０１０）、このより短い型は、Ｃ末端トランス活性化ドメインをスプライシングするスプライス部位を含む。このより短い型は、非毒性である。

【００５２】

我々は、毒性の全長（ＦＬ）形態よりも良性の短縮形態（ＤＵＸ４ｓ）を好むようにＤＵＸ４スプライシングプロファイルを変化させるＵ７ベースのｓｎＲＮＡを設計した。２つのＵ７ベースのｓｎＲＮＡに、エクソン１／イントロン１接合部（以下の配列７７８及び７７９）のスプライスドナー及びスプライスエンハンサを標的化させ、ＤＵＸ４－ｓ生成を誘導した。配列７８０は、ＤＵＸ４転写物を不安定化するエクソン３に位置するポリＡシグナルをマスクするように設計された。我々はまた、ネガティブコントロールとして機能するＵ７ベースのｓｎＲＮＡ　７８１を設計した。これは非コードエクソン３スプライスアクセプター部位を標的とするため、ＤＵＸ－ＦＬスプライシング及び毒性に影響を及ぼすことは予測されない。図２を参照されたい。Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡを生成するために、ジストロフィンエクソンスキッピングに使用されるヒトＵ７　ｓｎＲＮＡ系にアンチセンス配列をクローニングした（Ｇｏｙｅｎｖａｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３０６（５７０２）：１７９６－１７９９（２００４））。

【００５３】

Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物をコードするＤＮＡを以下に示す。　　配列中、Ｕ７プロモータ配列は、二重下線で示され、ＤＵＸ４を標的とするアンチセンス配列は、太字で示され、ＳｍＯＰＴ配列（Ｈｎｒｎｐａ１の結合部位）は、下線で示され、ヒトＵ７　ｓｎＲＮＡ由来のヘアピンループ配列は、点線で示され、残りの配列は、Ｕ７転写物のループ構造である。

【００５４】

配列７７９：ｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１（配列番号１）（太字のアンチセンス配列は、ＤＵＸ４配列番号５のヌクレオチド１５４０～１５７１に結合する）

【化１】

5’TTTGCTAGCTACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCA
ACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTA
AGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAA
AAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCAG
AGCTCCTCCAGCAGAGCCCGGTATTCTTCCTCAATTTTTGGAGTAGGCTTTCTGGCTTTTTACCGGAAAGCCCC
TCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATG
CAGTTGTAAGCTTGGGGACTAGTTT3’

【００５５】

配列７７８：ｈＵ７－ＥＸ１－ＳＤ（配列番号２）（太字のアンチセンス配列は、ＤＵＸ４配列番号５のヌクレオチド１５７３～１６０７に結合する）

【化２】

5’TTTGCTAGCTACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCA
ACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTA
AGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAA
AAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCAG
CGAACCACCCGACCCCGTCCCAACCCCGCGTCCTAAATTTTTGGAGTAGGCTTTCTGGCTTTTTACCGGAAAGC
CCCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTG
ATGCAGTTGTAAGCTTGGGGACTAGTTT3’

【００５６】

配列７８１：ｈＵ７ＥＸ３－ＡＳ１（配列番号３）［なぜここではＵ７プロモータ配列が異なるのか？］（太字のアンチセンス配列は、ＤＵＸ４イントロン２／エクソン３スプライシング接合部の上のＤＵＸ４配列番号５に結合する）

【化３】

5’TTTGCTAGCTACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCA
ACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTA
AGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAA
AAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCAG
GCACGTCAGCCGGGGTGCGCACTGCGCGCAGGTCTAGTCAGGAAATTTTTGGAGTAGGCTTTCTGGCTTTTTAC
CGGAAAGCCCCTCTTATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGG
TGGTCTTGATGCAGTTGTAAGCTTGGGGACTAGTTT3’

【００５７】

配列７８０：ｈＵ７－ｐＡ－ＡＳ（配列番号４）（太字のアンチセンス配列は、ＤＵＸ４ポリＡシグナルの上のＤＵＸ４配列番号５に結合する）

【化４】

5’TTTGCTAGCTACTGCCGAATCCAGGTCTCCGGGCTTAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTGGCTGCTTTCTCA
ACCAATCAGCACCGAACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAATGTTCGCGAACTCTAGAAATGAATGACTTAAGTA
AGTTCCTTAGAATATTATTTTTCCTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTTGTTTATACAGTAATAGGAACAAGAA
AAAAGTCACCTAAGCTCACCCTCATCAATTGTGGAGTTCCTTTATATCCCATCTTCTCTCCAAACACATACGCAG
GGAGGGGGCATTTTAATATATCTCTGAACTAATTTTTGGAGTAGGCTTTCTGGCTTTTTACCGGAAAGCCCCTCT
TATGATGTTTGTTGCCAATGATAGATTGTTTTCACTGTGCAAAAATTATGGGTAGTTTTGGTGGTCTTGATGCAG
TTGTAAGCTTGGGGACTAGTTT3’

【００５８】

構築物をそれぞれｐＵＣ５７プラスミドベクター骨格中にクローニングした。

実施例２

Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物による細胞の処理

【００５９】

次いで、ＤＵＸ４を発現するｐＵＣ５７プラスミドベクター及び治療用Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を、個別にまたは組み合わせて、Ｌｉｐｆｅｃｔａｍｉｎｅ－２０００を用いてＨＥＫ２９３細胞に送達し、アポトーシス細胞死の評価、全長ＤＵＸ４遺伝子及び短縮ＤＵＸ４遺伝子の測定、ならびにＤＵＸ４活性化バイオマーカーを含む、いくつかの転帰尺度を検討した。

【００６０】

Ｌｏｗｒｙアッセイによって測定されたように、ｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１またはｈＵ７－ＥＸ１－ＳＤを用いたＤＵＸ４発現ＨＥＫ２９３細胞の処理は、全長ＤＵＸ４タンパク質の発現を減少させ、カスパーゼ－３／７アッセイによって測定されたように、ｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１は、ＨＥＫ２９３細胞をアポトーシス細胞死から有意に保護した（図２Ｂ）。

実施例３

Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を含むｒＡＡＶの生成

【００６１】

ＨＥＫ２９３細胞における３つのプラスミド（ｐＡｄｈｅｌｐｅｒ、ＡＡＶヘルパー、及びＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物（複数可）を含むｒＡＡＶゲノム）の同時トランスフェクションによりｒＡＡＶベクターを生成し、次いで、細胞採取、ベクター精製、滴定、及び品質管理アッセイを行った。

【００６２】

プラスミド：ｐＡｄｈｅｌｐｅｒは、アデノウイルス遺伝子Ｅ２Ａ、Ｅ４　ＯＲＦ６、及びＶＡ　Ｉ／ＩＩを含み、ＡＡＶヘルパープラスミドは、ＡＡＶ　ｒｅｐ２及びｃａｐ６を含み（例えば、ＡＡＶ血清型６調製物の場合、カプシド遺伝子はｃａｐ６と呼ばれる）、ｒＡＡＶプラスミドは、ベクターにパッケージングされるＵ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物に隣接するＡＡＶ逆位末端反復（ＩＴＲ）配列を含む。

【００６３】

トランスフェクション：４：４：１の比（２０μｇのｐＡｄヘルパー：２０ｕｇのＡＡＶヘルパー：１プレートあたり５μｇのｒＡＡＶベクタープラスミド）で$CaPO_4$を使用して、２９３細胞（Ｃｏｒｎｉｎｇ　１０－Ｓｔａｃｋ）にプラスミドをトランスフェクトした。

【００６４】

細胞採取：トランスフェクション４８時間後、細胞を採取し、5×10^6細胞／ｍｌの密度で２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、１ｍＭ　$MgCl_2$、及び１５０ｍＭ　Ｎａ

Ｃｌ（Ｔ２０Ｍ１Ｎ１５０）に再懸濁した。細胞を４回の連続凍結／解凍サイクルによって溶解し、細胞溶解物の清澄化の前にベンゾナーゼヌクレアーゼ（ＡＩＣ、ストック：２５０Ｕ／μｌ）を加えて最終濃度９０Ｕ／ｍｌとした。

【００６５】

ベクター精製及び滴定：清澄化した溶解物を、以前に記載されているように（Ｘｉａｏ、Ｘ、ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ　７２：２２２４－３２）イオジキサノール段階勾配精製に供した。４０％イオジキサノール層（ｒＡＡＶを含む）を無塩希釈緩衝液（ｐＨは血清型に応じて異なる）で５倍に希釈し、Ｈｉ－Ｔｒａｐ　ＨＰ－Ｑ／Ｓカラムに適用した。ＮａＣｌ塩勾配で溶出して、ピーク１ｍｌ画分（典型的には３～５）をプールし、Ｔ２０Ｍ１Ｎ２００（ｐＨ８．０）で透析し、次いで滅菌濾過し、０．００１％Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８を補充した。ベクターを－８０℃で保存した。精製されたウイルスを、以前に記載されたようにＱ－ＰＣＲを用いてｖｇについて力価測定した（Ｓｃｈｎｅｐｐ　ａｎｄ　Ｃｌａｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，６９：４２７－４４３（２００２））。

実施例４

【００６６】

本明細書に記載のＵ７ベースのｓｎＲＮＡの効果は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを用いてＤＵＸ４遺伝子（コード領域＋２つの下流非翻訳エクソン）を筋肉で発現させたＦＳＨＤ動物モデルにおいて実証される。ＦＳＨＤモデルは、以下を含む治療の転帰尺度として有用な毒性の筋表現型を再現する：

組織病理－筋肉病変の急速な発症：２週間以内の中心核の存在、筋線維サイズのばらつきが大きい

分子／生化学－ＤＵＸ４発現：カスパーゼ－３発現１，４；下流のバイオマーカー発現（例えば、ＺＳＣＡＮ４）

機能－筋力低下（例えば、握力、比重）

【００６７】

我々の以前に公開された方法（Ｗａｌｌａｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．，６９：５４０－４４２（２０１１）及びＭｉｔｓｕｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．，２２：５６８－５７７（２０１２））を使用して、３つ全てのエクソンを含む全長ＤＵＸ４を発現するＡＡＶベクターを用いて、本明細書に記載の１つ以上のＵ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を含むｒＡＡＶを１：１及び１０：１の用量で動物に同時送達する。筋肉内注射の１、２、及び４週間後に、転帰（上記に列挙したもの、最初は追加の注射が可能なｎ＝５匹のマウスで計画された）を評価する。ＤＵＸ４及びＤＵＸ４－ｓの相対量も、リアルタイムＰＣＲアプローチを用いて評価する。

【００６８】

本発明を特定の実施形態に関して説明してきたが、当業者は変形例及び修正例を想到することを理解されたい。したがって、特許請求の範囲に見られるそのような制限のみが、本発明に課せられるべきである。

【００６９】

本出願で参照される全ての文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目１)

１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を含む組換えアデノ随伴ウイルスであって、前記組換えアデノ随伴ウイルスは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠き、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡは、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導することができる、組換えアデノ随伴ウイルス。

(項目２)

配列番号１に記載のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物、もしくは配列番号２に記載のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物、またはその両方を含む、項目１に記載の

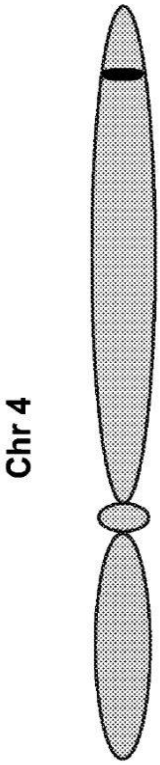
組換えアデノ随伴ウイルス。
(項目３)
項目１または２に記載の組換えアデノ随伴ウイルスを含む、組成物。
(項目４)
細胞においてＤＵＸ４エクソンスキッピングを誘導する方法であって、前記細胞を項目１または２に記載の組換えアデノ随伴ウイルスと接触させることを含む、方法。
(項目５)
細胞においてＤＵＸ４エクソンスキッピングを誘導する方法であって、前記細胞を項目３に記載の組成物と接触させることを含む、方法。
(項目６)
ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を、それを必要とする対象に送達する方法であって、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を含む組換えアデノ随伴ウイルスを前記対象に投与することを含み、前記組換えアデノ随伴ウイルスは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠き、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡは、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導することができる、方法。
(項目７)
前記ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、配列番号１の構築物、もしくは配列番号２に記載のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物、またはその両方である、項目６に記載の方法。
(項目８)
対象の顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療する方法であって、１つ以上のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物を含む組換えアデノ随伴ウイルスを前記対象に投与することを含み、前記組換えアデノ随伴ウイルスは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠き、コードされたＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡは、細胞内で非毒性ＤＵＸ４の短いアイソフォームの発現を誘導することができる、方法。
(項目９)
前記ＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物は、配列番号１の構築物、もしくは配列番号２に記載のＤＵＸ４　Ｕ７ベースのｓｎＲＮＡ構築物、またはその両方である、項目８に記載の方法。
(項目１０)
配列番号１に記載のｈＵ７－ＥＸ１－ＡＳ１　ＤＮＡを含む、ポリヌクレオチド。
(項目１１)
配列番号２に記載のｈＵ７－ＥＸ１－ＳＤ　ＤＮＡを含む、ポリヌクレオチド。

【図１】

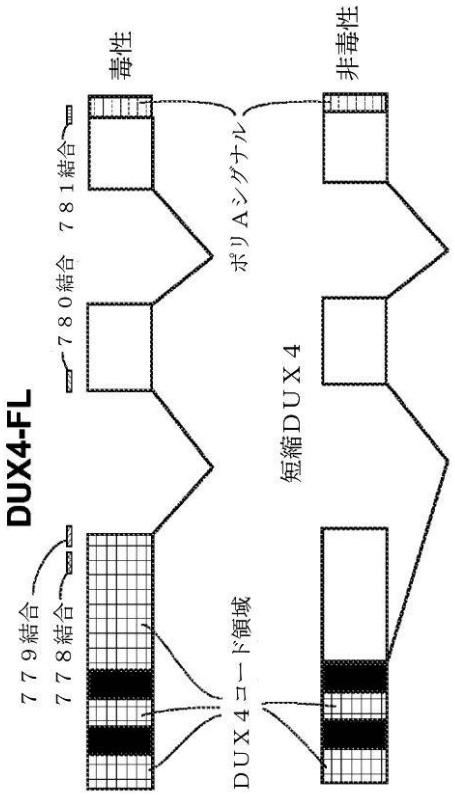
配列番号５

```
CCACCCCCCCCCCCCACCACCACCACCACCACCACCCCGCCGGCCGGCCCCAGGCCTCGA    60
CGCCCTGGGTCCCTTCCCGGGGTGGGGCGGGCTGTCCCAGGGGGGCTCACCGCCATTCATG   120
AAGGGGTGGAGCCTGCCTGCCTGTGGGCCTTTACAAGGGCGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT    180
GTCCGGGCAGGCCTCCTGGCTGCACCTGCCGCAGTGCACAGTCCGGCTGAGGTGCACGGG    240
AGCCCGCCGGCCTCTCTCTGCCCGCGTCCGTCCGTGAAATTCCGGCCGGGGCTCACCGCG    300
ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGGACGG    360
CGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCTTTGAGCGG    420
AACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATCGGCATTCCGGAG    480
CCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCCAGCTGAGGCAGCACCGGCGG    540
GAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCCAGAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCC    600
GTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGC    660
ATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAGAGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATC    720
TGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCA    780
GGCGGCCTGTGCAGCGCGGCCCCCGGCGGGGGTCACCCTGCTCCCTCGTGGGTCGCCTTC    840
GCCCACACCGGCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGG    900
GCTCTCCCACAGGGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCC    960
AGCCAGGCCGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTCGCC   1020
TACGCCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCCACCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCT   1080
CCGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCC   1140
TGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCCGCAGGGCCAAGGGGTGCTTGCG   1200
CCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGTCGCCGGG   1260
GCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCCGGACGCC   1320
TCCGCCTCCGCCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGGCGCCCTCCCAGGCGCTCCAG   1380
GAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGC   1440
CCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAG   1500
GCCTCGGAAGAGGCCGCCTCGCTGGAAGCACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTG   1560
CTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGTTGGGACGGGGTCGGGTGGTTCGGGGCAGGGCCGTG   1620
GCCTCTCTTTCGCGGGGGAACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCCGCCCC   1680
CTCCACCGGGCTGACCGGCCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACT   1740
CCACACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCCCAGAGCCGGCCCA   1800
GGTACCAGCAGGTGGGCCGCCTACTGCGCACGCGCGGGTTTGCGGGCAGCCGCCTGGGCT   1860
GTGGGAGCAGCCCGGGCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGCCCACCCCGCCCGCCTGACC   1920
GCCCCCTCCCCACCCCCCACCCCCCACCCCCGGAAAACGCGTCGTCCCCTGGGCTGGGTG   1980
GAGACCCCCGTCCCGCGAAACACCGGGCCCCGCGCAGCGTCCGGGCCTGACTCCGCTCCG   2040
GCGGCTCGCCTCCTGTGTGCCCCCGCGCCACCGTCGCCCGCCCGCCCGGGCCCCTGCAGC   2100
CTCCCAGCTGCCAGCGCGGAGCTCCTGGCGGTCAAAAGCATACCTCTGTCTGTCTTTGCC   2160
CGCTTCCTGGCTAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCT   2220
GGCCTCTCTGTGCCCTTGTTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCCCACCTTCC   2280
GACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATA   2340
TATTAAA                                                        2347
```

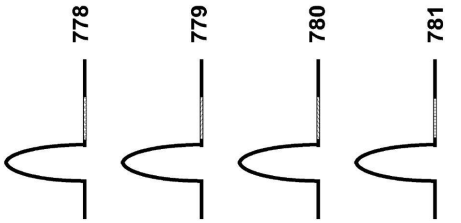
【図２Ａ】



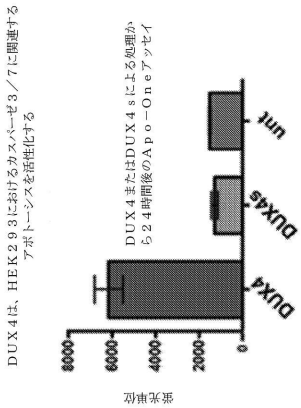
【図２Ｂ】



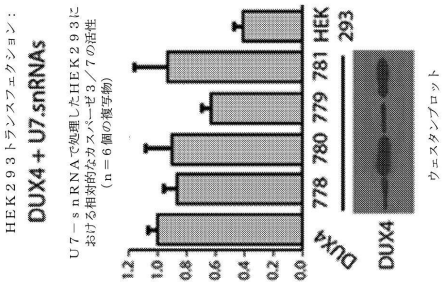
【図２Ｃ】



【図３Ａ】



【図３Ｂ】



【配列表】
0006966463000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI

Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ｃ１２Ｎ	*15/864*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハーパー, スコット クエントン
アメリカ合衆国 オハイオ ４３０６５, パウエル, ブライアーベント ブールバード ３８４

(72)発明者 ウェイン, ニコラス セバスチャン
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０４, コロンバス, ロモーナ プレイス １２０７

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 特表２０１４－５１３９２８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５２１７９１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／０１６３５２（WO，Ａ１）
WALLACE, L. M. et al., MOLECULAR THERAPY, 2012年, vol. 20, no. 7, p. 1417-1423

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ Ａ６１Ｋ Ａ６１Ｐ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）