

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7213238号

(P7213238)

(45)発行日 令和5年1月26日(2023.1.26)

(24)登録日 令和5年1月18日(2023.1.18)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P 21/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 K 38/39 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 16 (全42頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-522046(P2020-522046)

(86)(22)出願日 平成30年3月16日(2018.3.16)

(65)公表番号 特表2021-500352(P2021-500352  
A)

(43)公表日 令和3年1月7日(2021.1.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/022853

(87)国際公開番号 WO2019/078916

(87)国際公開日 平成31年4月25日(2019.4.25)

審査請求日 令和3年3月16日(2021.3.16)

(31)優先権主張番号 62/573,955

(32)優先日 平成29年10月18日(2017.10.18)

(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 インスティテュート アット  
ネーションワイド チルドレンズ ホスピ  
タルアメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5 ,  
コロンバス, チルドレンズ ドライブ  
7 0 0 , ルーム ダブリュー 1 7 2

(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】 筋ジストロフィーを治療するための筋特異的マイクロジストロフィンのアデノ随伴ウイル  
スベクター送達

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

i) 配列番号3のヌクレオチド236からヌクレオチド4842を含む組換えAAVベクターの治療有効量、及びii) 配列番号6のヌクレオチド120から2091を含む組換えAAVベクターの治療有効量を含む筋ジストロフィーの治療用組成物。

## 【請求項2】

i) 配列番号3のヌクレオチド236からヌクレオチド4842を含む組換えAAVベクターの治療有効量、及びii) 配列番号6のヌクレオチド120から2091を含む組換えAAVベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の筋力又は筋量を増加させるための組成物。

## 【請求項3】

i) 配列番号3のヌクレオチド236からヌクレオチド4842を含むi) 組換えAAVベクターの治療有効量、及びii) 配列番号6のヌクレオチド120から2091を含む組換えAAVベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の線維化を低減又は予防するための組成物。

## 【請求項4】

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項5】

前記組換えAAVベクターのうちの少なくとも1つが、血清型AAVrh.74、AA

V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2 又は A A V 1 3 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

筋肉内注射又は静脈内注射用に製剤化された、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

全身送達用に製剤化された、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

注射、注入又は移植による非経口投与用に製剤化される、請求項 7 に記載の組成物。

10

【請求項 9】

筋ジストロフィーの治療用医薬を調製するための、i) 配列番号 3 のヌクレオチド 2 3 6 からヌクレオチド 4 8 4 2 を含む組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) 配列番号 6 のヌクレオチド 1 2 0 から 2 0 9 1 を含む組換え A A V ベクターの治療有効量の使用。

【請求項 1 0】

筋ジストロフィー罹患対象における筋力又は筋量の増強用医薬を調製するための、i) 配列番号 3 のヌクレオチド 2 3 6 からヌクレオチド 4 8 4 2 を含む組換え A V ベクターの治療有効量、及び i i) 配列番号 6 のヌクレオチド 1 2 0 から 2 0 9 1 を含む組換え A A V ベクターの治療有効量の使用。

20

【請求項 1 1】

筋ジストロフィー罹患対象における線維化の低減又は予防用医薬を調製するための、i) 配列番号 3 のヌクレオチド 2 3 6 からヌクレオチド 4 8 4 2 を含む組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) 配列番号 6 のヌクレオチド 1 2 0 から 2 0 9 1 を含む組換え A A V ベクターの治療有効量の使用。

【請求項 1 2】

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 3】

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが、血清型 A A V r h . 7 4、A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2 又は A A V 1 3 である、請求項 9 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 1 4】

前記医薬が筋肉内又は静脈内投与用に製剤化される、請求項 9 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 5】

前記医薬が全身送達用に製剤化される、請求項 9 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記医薬が、注射、注入又は移植による非経口投与用に製剤化される、請求項 1 5 に記載の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) / 国立神経疾患・脳卒中研究所 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) によって交付された助成金第 NS 0 5 5 9 5 8 号に基づく連邦政府の支援を受けて行われた。連邦政府は本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

50

本願は、2017年10月18日に出願された米国仮特許出願第62/573,955号明細書に対する優先権を主張するものであり、その全体が参照により援用される。

#### 【0003】

電子的に提出された資料の参照による援用

本願は、本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を含み、この配列表は、その全体が参照により援用され、以下のとおり特定される：ファイル名：52822\_\_Seqlisting.txt；サイズ：39,851バイト、作成日；2018年3月13日。

#### 【0004】

本発明は、ミニチュア化したヒトマイクロジストロフィン遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどのベクターと、miR29を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどのベクターとを含む併用遺伝子療法を提供する。本発明はまた、この併用療法を用いて横隔膜及び心筋を含めた骨格筋にマイクロジストロフィン及びmiR29を発現させ、筋ジストロフィー罹患対象の筋線維を傷害から保護し、筋肉強度を増加させ、及び線維化を低減及び/又は予防する方法も提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0005】

歩行運動及び呼吸などの日常の活動、並びに全身代謝に筋量及び筋肉強度が重要であることは明白である。筋機能の不全は、筋脱力及び筋消耗によって特徴付けられる筋ジストロフィー(MD)を引き起こし、クオリティ・オブ・ライフに深刻な影響を及ぼす。最も十分に特徴付けられたMDは、ジストロフィン結合タンパク質複合体(DAPC)のメンバーをコードする遺伝子の突然変異によって生じる。これらのMDは、DAPCによる筋鞘-細胞骨格のつなぎ止めに伴う膜脆弱性によって生じる。デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、5000人に1人の新生男児に発症する最も破壊的な筋疾患の一つである。

#### 【0006】

DMDは、mRNAの減少及びジストロフィン結合タンパク質複合体(DAPC)に関連する427kd筋鞘タンパク質であるジストロフィンの欠如を招くDMD遺伝子の突然変異によって引き起こされる(Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987)。DAPCは、アクチン結合タンパク質であるジストロフィン、及びラミニン結合タンパク質である - ジストログリカンを通じて細胞外マトリックス(ECM)と細胞骨格との間の構造的結び付きを形成する筋鞘にある複数のタンパク質で構成される。これらの構造的結び付きが、収縮時の筋細胞膜を安定化させて収縮誘発性損傷を防ぐ働きをする。ジストロフィンが失われると、膜脆弱性によって筋鞘が破れてカルシウムが流入し、カルシウム活性化プロテアーゼが惹起され、分節状筋線維壊死が起こる(Straub et al., Curr Opin Neurol 10(2):168-75, 1997)。この無制御の筋変性・筋再生サイクルによって最終的に筋幹細胞集団が消耗し(Sacco et al., Cell, 2010, 143(7):p.1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009, 71:p.37-57)、進行性の筋脱力、筋内膜炎症、及び線維性瘢痕が生じる。

#### 【0007】

ジストロフィン又はマイクロジストロフィンによる膜安定化がないため、DMDでは無制御の組織傷害・修復サイクルが現れることになり、最終的に失われた筋線維が結合組織増殖を通じて線維性瘢痕組織に取って代わる。線維化は、コラーゲン及びエラスチンを含めたECMマトリックスタンパク質の過剰な沈着によって特徴付けられる。ECMタンパク質は主に、ストレス及び炎症にตอบสนองして活性化線維芽細胞が放出するTGFなどのサイトカインによって産生される。DMDの主な病理学的特徴は筋線維変性及び壊死であるが、病理学的帰結としての線維化も同等の影響を有する。線維化組織の過剰産生は筋再生を制限し、DMD患者の進行性筋脱力の一因である。ある研究では、初回DMD筋生検における線維化の存在が10年フォローアップ時の運動転帰の不良と高度に相関した(De

10

20

30

40

50

s g u e r r e e t a l . , J N e u r o p a t h o l E x p N e u r o l , 2 0 0 9 . 6 8 ( 7 ) : p . 7 6 2 - 7 ) 。 これらの結果は、線維化がDMD筋機能不全の主要な寄与因子であることを指し示しており、線維化が顕性化する前の早期介入の必要性が強調される。

#### 【 0 0 0 8 】

m d x マウスで試験されたほとんどの抗線維化療法は、T G F 経路の阻害によって線維化サイトカインシグナル伝達を遮断する働きをする。マイクロRNA ( m i R N A ) は、m R N A の 3 ' U T R 内の塩基との対合、翻訳の阻害、又はm R N A 分解の促進によって転写後レベルで遺伝子サイレンシングを媒介する約 2 2 ヌクレオチドの一本鎖RNAである。m i R N A の 5 ' 末端にある 7 b p のシード配列によってm i R N A が標的化される；標的とされる配列の残りの部分、並びにその二次構造により、更なる認識が提供される。m i R N A は筋疾患病理において重要な役割を果たし、問題の筋ジストロフィーの型に唯一依存する発現プロファイルを呈する ( E i s e n b e r g e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 7 . 1 0 4 ( 4 3 ) : p . 1 7 0 1 6 - 2 1 ) 。 増えつつある一連のエビデンスによれば、心臓、肝臓、腎臓、及び肺を含めた多くの臓器の線維化過程にm i R N A が関与することが示唆される ( J i a n g e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 7 . 1 0 4 ( 4 3 ) : p . 1 7 0 1 6 - 2 1 ) 。 最近になって、m i R - 2 9 の下方制御が心筋繊維化の一因であることが示され ( C a c c h i a r e l l i e t a l . , C e l l M e t a b , 2 0 1 0 . 1 2 ( 4 ) : p . 3 4 1 - 5 1 ) 、及びm i R - 2 9 の発現低下がヒトDMD患者の筋肉と遺伝的に関連付けられた ( E i s e n b e r g e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 0 7 . 1 0 4 ( 4 3 ) : p . 1 7 0 1 6 - 2 ) 。 m i R - 2 9 ファミリーは、2つのバイシストロニックm i R N A クラスターから発現する3つのファミリーメンバーからなる。m i R - 2 9 a はm i R - 2 9 b ( m i R - 2 9 b - 1 ) と共発現し；m i R - 2 9 c はm i R - 2 9 b の第2のコピー ( m i R - 2 9 b - 2 ) と共発現する。m i R - 2 9 ファミリーは保存されたシード配列を共有し、m i R - 2 9 a 及びm i R - 2 9 b は各々、m i R - 2 9 c と僅か1塩基だけ異なる。更に、m i R - 2 9 プラスミド ( m i R - 2 9 a 及びm i R - 2 9 b - 1 のクラスター) をm d x マウス筋肉に電気穿孔すると、E C M 成分であるコラーゲン及びエラスチンの発現レベルが低下し、治療後 2 5 日以内に筋切片のコラーゲン沈着が著しく減少した ( C a c c h i a r e l l i e t a l . , C e l l M e t a b , 2 0 1 0 . 1 2 ( 4 ) : p . 3 4 1 - 5 1 ) 。

#### 【 0 0 0 9 】

アデノ随伴ウイルス ( A A V ) は複製欠損バルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは、1 4 5 ヌクレオチドの逆方向末端反復配列 ( I T R ) を含む約 4 . 7 k b 長である。A A V には複数の血清型がある。A A V 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は既知である。例えば、A A V 血清型 2 型 ( A A V 2 ) ゲノムのヌクレオチド配列は、S r i v a s t a v a e t a l . , J V i r o l , 4 5 : 5 5 5 - 5 6 4 ( 1 9 8 3 ) に提示され、R u f f i n g e t a l . , J G e n V i r o l , 7 5 : 3 3 8 5 - 3 3 9 2 ( 1 9 9 4 ) によって訂正されたとおりである。他の例として、A A V - 1 の完全ゲノムがG e n B a n k 受託番号N C \_ 0 0 2 0 7 7 に提供され；A A V - 3 の完全ゲノムがG e n B a n k 受託番号N C \_ 1 8 2 9 に提供され；A A V - 4 の完全ゲノムがG e n B a n k 受託番号N C \_ 0 0 1 8 2 9 に提供され；A A V - 5 ゲノムがG e n B a n k 受託番号A F 0 8 5 7 1 6 に提供され；A A V - 6 の完全ゲノムがG e n B a n k 受託番号N C \_ 0 0 1 8 6 2 に提供され；A A V - 7 及びA A V - 8 ゲノムの少なくとも一部がG e n B a n k 受託番号A X 7 5 3 2 4 6 及びA X 7 5 3 2 4 9 にそれぞれ提供され ( A A V - 8 に関しては米国特許第 7 , 2 8 2 , 1 9 9 号明細書及び同第 7 , 7 9 0 , 4 4 9 号明細書も参照のこと) ；A A V - 9 ゲノムがG a o e t a l . , J . V i r o l . , 7 8 : 6 3 8 1 - 6 3 8 8 ( 2 0 0 4 ) に提供され；A A V - 1 0 ゲノムがM o l . T h e r . , 1 3 ( 1 ) : 6 7 - 7 6 ( 2 0 0 6 ) に提供され；及びA A V - 1 1 ゲノムがV i r o



logy, 330(2):375-383(2004)に提供されている。AAVrh.74血清型のクローニングについては、Rodino-Klapac., et al. Journal of translational medicine 5, 45(2007)に記載されている。ITR内には、ウイルスDNA複製(rep)、カプシド化/パッケージング及び宿主細胞染色体組み込みを指図するシス作用配列が含まれる。3つのAAVプロモーター(その相対マッピング位置からp5、p19、及びp40と呼ばれる)が、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ドライブする。2つのrepプロモーター(p5及びp19)が、単一のAAVイントロンの差次的スプライシング(例えば、AAV2ヌクレオチド2107及び2227における)と一緒に、rep遺伝子から4つのrepタンパク質(rep78、rep68、rep52、及びrep40)の産生をもたらす。repタンパク質は複数の酵素的特性を備え、最終的にはそれらがウイルスゲノムの複製に関与する。cap遺伝子はp40プロモーターから発現し、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部位及び非コンセンサス翻訳開始部位が、これらの3つの関連するカプシドタンパク質の産生に関与する。単一のコンセンサスポリアデニル化部位が、AAVゲノムのマッピング位置95に位置する。AAVのライフサイクル及び遺伝学については、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158:97-129(1992)にレビューされている。

10

AAVは、それを例えば遺伝子療法における細胞への外来DNAの送達用ベクターとして魅力的なものにするユニークな特徴を備えている。培養下の細胞のAAV感染は非細胞変性性であり、ヒト及び他の動物の自然感染は不顕性且つ無症候性である。更に、AAVは多くの哺乳類細胞を感染させるため、インビボで多くの異なる組織を標的化できる可能性をもたらされる。更に、AAVは分裂及び非分裂細胞にゆっくりと形質導入し、本質的にそうした細胞の全寿命にわたって、転写活性のある核エピソーム(染色体外エレメント)として存続し得る。AAVプロウイルスゲノムは、プラスミド中のクローニングされたDNAとして感染力があり、そのため組換えゲノムの構築が実現可能となる。更に、AAV複製、ゲノムカプシド化及び組み込みを指図するシグナルがAAVゲノムのITR内に含まれるため、このゲノムの内部約4.3kb(複製及び構造カプシドタンパク質、rep-capをコードする)の一部又は全てを、プロモーター、目的のDNA及びポリアデニル化シグナルを含む遺伝子カセットなど、外来DNAに置き換えることができる。rep及びcapタンパク質はイントランスポで提供されてもよい。AAVの別の顕著な特徴は、それが極めて安定した頑強なウイルスであることである。AAVは、アデノウイルスを不活性化するために用いられる条件(56~65℃で数時間)に容易に耐え、そのためAAVの低温保存は特に必須とはならない。AAVは凍結乾燥すらできる。最後に、AAV感染細胞は重感染に抵抗性でない。

20

30

複数の研究が、長期(1.5年超)にわたる筋肉での組換えAAV媒介性タンパク質発現を実証している。Clark et al., Hum Gene Ther, 8:659-669(1997); Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93:14082-14087(1996); 及びXiao et al., J Virol, 70:8098-8108(1996)を参照のこと。また、Chao et al., Mol Ther, 2:619-623(2000)及びChao et al., Mol Ther, 4:217-222(2001)も参照のこと。更に、筋肉は高度に血管化しているため、Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:5804-5809(1997)及びMurphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:13921-13926(1997)に記載されるとおり、組換えAAVの形質導入によって筋肉内注射後の体循環中にトランス遺伝子産物が出現している。更に、Lewis et al., J Virol, 76:8769-8775(2002)は、骨格筋線維が、正しい抗体グリコシル化、折り畳み、及び分泌に必要な細胞性因子を備えることを実証しており、筋肉が分泌タ

40

50

ンパク質療法薬の安定発現能を有することが指摘される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【文献】米国特許第7,282,199号明細書

米国特許第7,790,449号明細書

【非特許文献】

【0011】

【文献】Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987  
Straub et al., Curr Opin Neurol 10(2):168-75, 1997

10

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

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

Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009, 68(7):p.762-7

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

DMD及び他の筋ジストロフィーに罹患している患者の機能改善には、疾患初期に遺伝子を復元する必要がある。DMD罹患患者の筋肉強度を増加させ、且つ筋傷害を防ぐ治療が必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、筋線維を傷害から保護し、筋肉強度を増加させ、及び線維化を低減及び/又は予防するための、横隔膜及び心筋を含めた骨格筋に対するマイクロジストロフィン遺伝子を発現する遺伝子療法ベクター、例えばAAVに関する。

【0014】

本発明は、遺伝子療法ベクターを使用してマイクロジストロフィンを送達することによりDMDに見られる遺伝子欠損に対処する筋力増強及び/又は筋量増強療法及び手法を提供する。実施例2に示されるとおり、マイクロジストロフィン遺伝子療法による治療は、インビボでより高い筋力を生じさせた。更に、マイクロジストロフィン遺伝子療法の筋肉内及び全身送達により、マウスモデルにおいてインビボで筋肉にジストロフィンが送達されることが示された。

30

【0015】

一実施形態において、本発明は、筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列と、マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含むrAAVベクターを提供する。例えば、このヌクレオチド配列は機能性マイクロジストロフィンタンパク質をコードし、ここでヌクレオチドは、例えば、配列番号1と少なくとも、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、又は89%、より典型的には少なくとも90%、91%、92%、93%、又は94%及び更により典型的には少なくとも95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性であり、ここでタンパク質はマイクロジストロフィン活性を保持している。マイクロジストロフィンタンパク質は、筋収縮時に筋膜に安定性を付与し、例えばマイクロジストロフィンは筋収縮時に衝撃吸収材として働く。

40

【0016】

本発明はまた、ストリンジェントな条件下で配列番号1の核酸配列、又はその相補体(complement)とハイブリダイズする、且つ機能性マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列が機能性マイクロジスト

50

ロフィンタンパク質をコードする r A A V ベクターも提供する。

#### 【 0 0 1 7 】

用語「ストリンジェント」は、当該技術分野において一般にストリンジェントと理解される条件を指して使用される。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主として温度、イオン強度、及びホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決まる。ハイブリダイゼーション及び洗浄についてのストリンジェントな条件の例は、0.015 M 塩化ナトリウム、0.0015 M クエン酸ナトリウムで 65 ~ 68 又は 0.015 M 塩化ナトリウム、0.0015 M クエン酸ナトリウム、及び 50 % ホルムアミドで 42 である。S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 2 n d E d . , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , ( C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . 1 9 8 9 ) を参照のこと。よりストリンジェントな条件（より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、又は他の変性剤など）を用いることもできるが、ハイブリダイゼーション速度が影響を受けることになる。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが関係する例では、更なる例示的ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件として、6 × S S C 0.05 % ピロリン酸ナトリウム中 37 ( 14 塩基オリゴについて )、48 ( 17 塩基オリゴについて )、55 ( 20 塩基オリゴについて )、及び 60 ( 23 塩基オリゴについて ) での洗浄が挙げられる。

#### 【 0 0 1 8 】

ハイブリダイゼーション及び洗浄緩衝液中には、非特異的な及び / 又はバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減らすことを目的として他の薬剤が含まれてもよい。例は、0.1 % ウシ血清アルブミン、0.1 % ポリビニルピロリドン、0.1 % ピロリン酸ナトリウム、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム、Na D o d S O 4、( S D S )、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理済みサケ精子 DNA ( 又は他の非相補 DNA )、及び硫酸デキストランであり、しかし他の好適な薬剤もまた使用することができる。これらの添加剤の濃度及び種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を及ぼすことなく変更することができる。ハイブリダイゼーション実験は通常、p H 6 . 8 ~ 7 . 4 で行われるが、典型的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーション速度は p H にほとんど依存しない。A n d e r s o n e t a l . , N u c l e i c A c i d H y b r i d i s a t i o n : A P r a c t i c a l A p p r o a c h , C h . 4 , I R L P r e s s L i m i t e d ( O x f o r d , E n g l a n d ) を参照のこと。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を適合させて、異なる配列関連性の DNA がハイブリッドを形成可能となるように当業者が調整し得る。

#### 【 0 0 1 9 】

用語「筋特異的調節エレメント」は、筋組織における発現に特異的なコード配列の発現を制御するヌクレオチド配列を指す。こうした調節エレメントにはエンハンサー及びプロモーターが含まれる。本発明は、筋特異的調節エレメント M C K H 7 プロモーター、M C K プロモーター及び M C K エンハンサーを含むコンストラクトを提供する。

#### 【 0 0 2 0 】

一態様において、本発明は、筋特異的調節エレメントが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ ( M C K )、ランケート型 M C K ( t M C K )、ミオシン重鎖 ( M H C )、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / M C K エンハンサープロモーター ( M H C K 7 )、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋トロポニン i 遺伝子エレメント、低酸素誘導性核因子、ステロイド誘導性エレメント又はグルココルチコイド応答エレメント ( g r e ) である r A A V ベクターを提供する。

#### 【 0 0 2 1 】

例えば、筋特異的調節エレメントは M H C K 7 プロモーターヌクレオチド配列、配列番号 2 であるか、又は筋特異的調節エレメントは M C K ヌクレオチド配列、配列番号 4 であ

10

20

30

40

50

る。加えて、本発明の r A A V ベクターのいずれにおいても、筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列、例えば M H C K 7 又は M C K ヌクレオチド配列は、マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。例えば、M H C K 7 プロモーターヌクレオチド配列（配列番号 2）は、図 1 又は図 1 0 に提供されるコンストラクト（配列番号 3）に示されるとおり、ヒトマイクロジストロフィンコード配列（配列番号 1）に作動可能に連結されている。M C K プロモーター（配列番号 4）は、図 7 又は図 1 1 に提供されるコンストラクト（配列番号 5）に示されるとおり、ヒトマイクロジストロフィンコード配列（配列番号 1）に作動可能に連結されている。別の態様において、本発明は、配列番号 1 及び配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む r A A V ベクターを提供する。本発明はまた、配列番号 1 及び配列番号 4 のヌクレオチド配列を含む r A A V ベクターも提供する。

10

**【 0 0 2 2 】**

更なる態様において、本発明は、配列番号 3 又は配列番号 5 のヌクレオチド配列を含む r A A V ベクターを提供する。例えば、r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンベクターは、配列番号 3 の、図 1 0 に示されるヌクレオチド配列を含む。この r A A V ベクターは、M H C K 7 プロモーター、キメライントロン配列、ヒトマイクロジストロフィン遺伝子のコード配列、ポリ A、アンピシリン耐性及び p B R 3 2 2 複製起点 ( o r i g i n o r r e p l i c a t i o n ) を有する p G E X プラスミド骨格を含む。

**【 0 0 2 3 】**

本発明は、配列番号 1 のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列と配列番号 3 の M H C K 7 プロモーターヌクレオチド配列とを含む組換え A A V ベクターを提供する。この r A A V ベクターは A A V 血清型 A A V r h . 7 4 である。

20

**【 0 0 2 4 】**

本発明はまた、配列番号 3 の p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィンコンストラクトヌクレオチド配列を含む組換え A A V ベクターも提供する。この r A A V ベクターは A A V 血清型 A A V r h . 7 4 である。

**【 0 0 2 5 】**

本発明の r A A V ベクターは、血清型 A A V r h . 7 4、A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2 又は A A V 1 3 など、任意の A A V 血清型であってよい。

30

**【 0 0 2 6 】**

本発明はまた、本発明の r A A V ベクターのいずれかを含む医薬組成物（又は時に本明細書では単に「組成物」と称される）も提供する。

**【 0 0 2 7 】**

別の実施形態において、本発明は、r A A V ベクター粒子の作製方法を提供し、この方法は、本発明の任意の r A A V ベクターがトランスフェクトされた細胞を培養すること、及びトランスフェクト細胞の上清から r A A V 粒子を回収することを含む。本発明はまた、本発明の組換え A A V ベクターのいずれかを含むウイルス粒子も提供する。

**【 0 0 2 8 】**

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

40

**【 0 0 2 9 】**

本発明は、配列番号 1 のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列と配列番号 2 の M H C K 7 プロモーターヌクレオチド配列とを含む組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む筋ジストロフィーの治療方法を提供する。

**【 0 0 3 0 】**

本発明はまた、配列番号 3 の p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィンコンストラクトヌクレオチド配列を含む組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む筋ジストロフィーの治療方法も提供する。

**【 0 0 3 1 】**

50

「線維化」は、細胞外マトリックス（ECM）成分の過度の又は無秩序な沈着、並びに骨格筋、心筋、肝臓、肺、腎臓、及び脾臓を含めた傷害時の組織における異常な修復過程を指す。沈着するECM成分には、フィブロネクチン及びコラーゲン、例えば1型コラーゲン、2型コラーゲン又は3型コラーゲンが含まれる。

【0032】

別の実施形態において、本発明は、必要としている対象の線維化を予防又は低減する方法を提供し、この方法は、本発明の任意の組換えAAVベクターの治療有効量を投与することを含み、筋肉を標的とするヒトマイクロジストロフィンタンパク質並びに向上した心臓遺伝子デリバリー及び心臓における発現。例えば、本発明のrAAVのいずれかが、線維化を予防又は低減するため筋ジストロフィー罹患対象に投与され、例えばヒトマイクロジストロフィンタンパク質を発現する本発明のrAAVが、対象に線維化が認められる前に投与される。加えて、ヒトマイクロジストロフィン遺伝子を発現する本発明のrAAVは、筋ジストロフィー、例えばDMDに罹患している又はそれと診断された対象など、線維化を発症するリスクがある対象に投与される。本発明のrAAVは、筋ジストロフィー罹患対象に対し、そうした対象における新規の線維化を予防するため、又はそうした対象における線維化を低減するために投与される。

10

【0033】

本発明は、対象に線維化が認められる前に本発明のAAVベクターのいずれかを投与することを企図する。加えて、本発明のrAAVは、筋ジストロフィー、例えばDMDに罹患している又はそれと診断された対象など、線維化を発症するリスクがある対象に投与される。本発明のrAAVは、既に線維化を発症している筋ジストロフィー罹患対象に対し、そうした対象における新規の線維化を予防するために投与される。

20

【0034】

本発明はまた、ヒトマイクロジストロフィン遺伝子を発現する本発明のrAAVベクターのいずれかの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の筋力及び/又は筋量を増加させる方法も提供する。本方法は、マイクロジストロフィンを発現するrAAVを投与するステップを更に含み得る。

【0035】

本発明は、DMDと診断された患者に対し、対象に線維化が認められる前又は筋力が低下する前又は筋量が低下する前に本発明のAAVベクターのいずれかを投与することを企図する。

30

本発明はまた、既に線維化を発症している筋ジストロフィー罹患対象に対し、そうした対象における新規の線維化を予防するため本発明のrAAVのいずれかを投与することも企図する。本発明はまた、既に筋力が低下した又は筋量が低下した筋ジストロフィー罹患患者に対し、筋肉を更なる傷害から保護するため本発明のrAAVのいずれかを投与することも提供する。

【0036】

本発明の方法のいずれにおいても、対象は、DMD又は任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなど、筋ジストロフィーの罹患患者であり得る。

【0037】

40

別の態様において、マイクロジストロフィンタンパク質を発現するrAAVベクターは、MHCK7又はMCK以外の筋特異的調節エレメントに作動可能に連結されたマイクロジストロフィン遺伝子のコード配列を含む。例えば、筋特異的調節エレメントは、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF、tMCK（トランケート型MCK）、ミオシン重鎖（MHC）、C5-12（合成プロモーター）、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素誘導性核因子、ステロイド誘導性エレメント又はグルココルチコイド応答エレメント（GRE）である。

【0038】

50

本発明の方法のいずれにおいても、rAAVベクター又は組成物は筋肉内注射又は静脈内注射によって投与される。

【0039】

加えて、本発明の方法のいずれにおいても、rAAVベクター又は組成物は全身投与される。例えば、rAAVベクター又は組成物は、注射、注入又は移植による非経口投与 (parentally administration) である。

【0040】

別の実施形態において、本発明は、必要としている対象の線維化を低減するための本発明のrAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0041】

加えて、本発明は、筋ジストロフィー罹患患者の線維化を予防するための本発明の組換えAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0042】

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

【0043】

本発明は、筋ジストロフィーの治療用の配列番号1のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列と配列番号2のMHCK7プロモーター配列とを含む組換えAAVベクターを含む組成物を提供する。

【0044】

本発明は、筋ジストロフィーの治療用の配列番号3のpAAV・MHCK7・マイクロジストロフィンコンストラクトヌクレオチド配列を含む組換えAAVベクターを含む組成物を提供する。

【0045】

本発明はまた、筋ジストロフィー罹患対象の筋力及び/又は筋量を増加させるための本発明のrAAVベクターのいずれかを含む組成物も提供する。更なる実施形態において、本発明は、筋ジストロフィーの治療用の本発明のrAAVベクターのいずれかを含む組成物を提供する。

【0046】

本発明の組成物は筋肉内注射又は静脈内注射用に製剤化される。本発明の組成物はまた、注射、注入又は移植による非経口投与 (parentally administration) など、全身投与用にも製剤化される。

【0047】

加えて、本組成物のいずれも、DMD又は任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなど、筋ジストロフィーに罹患している対象への投与用に製剤化される。

【0048】

更なる実施形態において、本発明は、必要としている対象における線維化の低減用医薬を調製するための本発明のrAAVベクターのいずれかの使用を提供する。例えば、対象は、DMD又は任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなど、筋ジストロフィーに罹患している必要としている。

【0049】

別の実施形態において、本発明は、筋ジストロフィー罹患対象における線維化の予防用医薬を調製するための本発明のrAAVベクターのいずれかの使用を提供する。

【0050】

加えて、本発明は、筋ジストロフィー罹患対象における筋肉強度及び/又は筋量の増強用医薬を調製するための本発明の組換えAAVベクターの使用を提供する。

【0051】

本発明はまた、筋ジストロフィーの治療用医薬を調製するための本発明のrAAVベクターの使用も提供する。

【0052】

10

20

30

40

50

本発明は、筋ジストロフィーの治療用医薬を調製するための配列番号 1 のヒトマイクロジストロフィンヌクレオチド配列と配列番号 2 の M H C K 7 プロモーターヌクレオチド配列とを含む組換え A A V ベクターの使用を提供する。

【 0 0 5 3 】

本発明は、筋ジストロフィーの治療のための配列番号 3 の p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィンコンストラクトヌクレオチド配列を含む組換え A A V ベクターの使用を提供する。

【 0 0 5 4 】

本発明の使用のいずれにおいても、医薬は筋肉内注射又は静脈内注射用に製剤化される。加えて、本発明の使用のいずれにおいても、医薬は、注射、注入又は移植による非経口投与 ( p a r e n t a l a d m i n i s t r a t i o n ) など、全身投与用に製剤化される。

【 0 0 5 5 】

医薬のいずれも、D M D 又は任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーなど、筋ジストロフィーに罹患している対象への投与用に調製され得る。

【 0 0 5 6 】

本発明はまた、マイクロジストロフィンを発現する組換え A A V ベクターを投与すること、並びに m i R - 2 9 を発現する、及び m i R - 2 9 の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターを投与することを含む併用療法又は同時療法も提供する。

【 0 0 5 7 】

一実施形態において、本発明は、i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィーの治療方法を提供する。

【 0 0 5 8 】

別の実施形態において、本発明は、i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の筋力又は筋量を増加させる方法を提供する。

【 0 0 5 9 】

更なる実施形態において、本発明は、i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の線維化を低減又は予防する方法を提供する。

【 0 0 6 0 】

本発明はまた、i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を含む筋ジストロフィーの治療用組成物も提供する。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態において、本発明は、i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節され

10

20

30

40

50

る組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の筋力又は筋量を増加させるための組成物を提供する。

【 0 0 6 2 】

更なる実施形態において、本発明は、 i ) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される i ) 組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の線維化を低減又は予防するための組成物を提供する。

10

【 0 0 6 3 】

本発明はまた、筋ジストロフィーの治療用医薬を調製するための、 i ) マイクロジストロフィンを発現する組換え A A V ベクターであって、マイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する組換え A A V ベクターであって、 m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量の使用も提供する。

【 0 0 6 4 】

別の実施形態において、本発明は、筋ジストロフィー罹患対象における筋力又は筋量の増強用医薬を調製するための、 i ) マイクロジストロフィンを発現する組換え A A V ベクターであって、マイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する組換え A A V ベクターであって、 m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量の使用を提供する。

20

【 0 0 6 5 】

更なる実施形態において、本発明は、筋ジストロフィー罹患対象における線維化の低減又は予防用医薬を調製するための、 i ) マイクロジストロフィンを発現する組換え A A V ベクターであって、マイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する組換え A A V ベクターであって、 m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量の使用を提供する。

30

【 0 0 6 6 】

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、筋ジストロフィーはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【 0 0 6 7 】

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、マイクロジストロフィタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、 a ) ヌクレオチド配列の配列番号 1 と少なくとも 8 5 % 同一であり、且つ機能性マイクロジストロフィタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又は b ) 配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む。

40

【 0 0 6 8 】

加えて、本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、 m i R - 2 9 c を発現する組換え A A V ベクターは、 a ) 配列番号 8 及び配列番号 9 のヌクレオチド配列、 b ) 配列番号 7 のヌクレオチド配列、又は c ) 配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 6 9 】

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、筋特異的調節エレメントのうちの少なくとも 1 つは、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アク

50



チン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 *me f*、筋クレアチンキナーゼ ( *MCK* )、トランケート型 *MCK* ( *tMCK* )、ミオシン重鎖 ( *MHC* )、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / *MCK* エンハンサープロモーター ( *MHCK7* )、*C5-12*、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニン *c* 遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニン *c* 遺伝子エレメント、遅筋トロポニン *i* 遺伝子エレメント、低酸素誘導性核因子、ステロイド誘導性エレメント又はグルココルチコイド応答エレメント ( *gre* ) である。例えば、マイクロジストロフィンの発現を調節する筋特異的調節エレメントは配列番号 2 ( *MHCK7* ) を含み、及び / 又は *miR-29c* の発現を調節する筋特異的調節エレメントは配列番号 10 ( *CMV* ) を含む。

【 0070 】

10

例示的な併用又は同時療法の方法、組成物又は使用において、マイクロジストロフィンを発現する *AAV* ベクターは *i* ) 配列番号 1 のヌクレオチド配列 ( マイクロジス ) 及び *ii* ) 配列番号 2 のヌクレオチド配列 ( *MHCK7* ) を含み、又はマイクロジストロフィンを発現する *AAV* ベクターは配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む。

【 0071 】

例示的な併用又は同時療法の方法、組成物又は使用において、*miR-29c* を発現する *AAV* ベクターは *i* ) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列及び *ii* ) 配列番号 10 のヌクレオチド配列 ( *CMV* ) を含み、又は *miR-29c* を発現する *AAV* ベクターは配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む。

【 0072 】

20

別の例示的な併用又は同時療法の方法、組成物又は使用において、マイクロジストロフィンを発現する *AAV* ベクターは *i* ) 配列番号 1 のヌクレオチド配列 ( マイクロジス ) 及び *ii* ) 配列番号 2 のヌクレオチド配列 ( *MHCK7* ) を含み、ここで *miR-29c* を発現する *AAV* ベクターは *i* ) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列及び *ii* ) 配列番号 10 のヌクレオチド配列 ( *CMV* ) を含む。

【 0073 】

更なる併用又は同時療法の方法、組成物又は使用において、マイクロジストロフィンを発現する *AAV* ベクターは配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、*miR-29c* を発現する *AAV* ベクターは配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む。

【 0074 】

30

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、組換え *AAV* ベクターのうちの少なくとも 1 つは、血清型 *AAVrh.74*、*AAV1*、*AAV2*、*AAV4*、*AAV5*、*AAV6*、*AAV7*、*AAV8*、*AAV9*、*AAV10*、*AAV11*、*AAV12* 又は *AAV13* である。

【 0075 】

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、組換え *AAV* ベクターのうちの少なくとも 1 つ ( *least one* )、組成物又は医薬は、筋肉内注射又は静脈内注射によって投与される。

【 0076 】

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、組換え *AAV* ベクターのうちの少なくとも 1 つ又は組成物又は医薬は全身投与される。

40

【 0077 】

本発明の併用又は同時療法の方法、組成物又は使用のいずれにおいても、組換え *AAV* ベクターのうちの少なくとも 1 つ、組成物又は医薬は、注射、注入又は移植によって非経口投与される。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

( 項目 1 )

*i* ) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え *AAV* ベクターの治療有効量、及び *ii* ) *miR-29c* を発現する、及び *miR-29c* の発現が筋特異的調節エレ

50

メントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィーの治療方法。

(項目 2)

i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の筋力又は筋量を増加させる方法。

(項目 3)

i) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される i) 組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の線維化を低減又は予防する方法。

10

(項目 4)

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

マイクロジストロフィントタンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、

a) ヌクレオチド配列の配列番号 1 と少なくとも 8 5 % 同一であり、且つ機能性マイクロジストロフィントタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又は

20

b) 配列番号 1 のヌクレオチド配列

を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが、

a) 配列番号 8 及び配列番号 9 のヌクレオチド配列、

b) 配列番号 7 のヌクレオチド配列、又は

c) 配列番号 6 のヌクレオチド配列

を含む、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記筋特異的調節エレメントのうちの少なくとも 1 つが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ ( M C K )、トランケート型 M C K ( t M C K )、ミオシン重鎖 ( M H C )、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / M C K エンハンサープロモーター ( M H C K 7 )、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋トロポニン i 遺伝子エレメント、低酸素誘導性核因子、ステロイド誘導性エレメント又はグルココルチコイド応答エレメント ( g r e ) である、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 8)

マイクロジストロフィンの発現を調節する前記筋特異的調節エレメントが配列番号 2 ( M H C K 7 ) を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 9)

m i R - 2 9 c の発現を調節する前記筋特異的調節エレメントが配列番号 1 0 ( C M V ) を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列 ( マイクロジス ) 及び i i) 配列番号 2 のヌクレオチド配列 ( M H C K 7 ) を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1)

50

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 2 )

m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが i ) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列及び i i ) 配列番号 1 0 のヌクレオチド配列 ( C M V ) を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 3 )

m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 4 )

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが i ) 配列番号 1 のヌクレオチド配列 ( マイクロジス ) 及び i i ) 配列番号 2 のヌクレオチド配列 ( M H C K 7 ) を含み、m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが i ) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列及び i i ) 配列番号 1 0 のヌクレオチド配列 ( C M V ) を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 5 )

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 6 )

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが、血清型 A A V r h . 7 4 、 A A V 1 、 A A V 2 、 A A V 4 、 A A V 5 、 A A V 6 、 A A V 7 、 A A V 8 、 A A V 9 、 A A V 1 0 、 A A V 1 1 、 A A V 1 2 又は A A V 1 3 である、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 7 )

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが筋肉内注射又は静脈内注射によって投与される、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 8 )

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが全身投与される、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 9 )

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが、注射、注入又は移植によって非経口投与される、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 0 )

i ) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を含む筋ジストロフィーの治療用組成物。

( 項目 2 1 )

i ) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の筋力又は筋量を増加させるための組成物。

( 項目 2 2 )

i ) マイクロジストロフィンを発現する、及びマイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される i ) 組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 2 9 c を発現する、及び m i R - 2 9 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量を投

10

20

30

40

50

与することを含む、筋ジストロフィー罹患対象の線維化を低減又は予防するための組成物。  
(項目23)

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、項目20～22のいずれか一項に記載の組成物。

(項目24)

マイクロジストロフィンタンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、

a)ヌクレオチド配列の配列番号1と少なくとも85%同一であり、且つ機能性マイクロジストロフィンタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又は

b)配列番号1のヌクレオチド配列

を含む、項目20～23のいずれか一項に記載の組成物。

10

(項目25)

miR-29cを発現する前記組換えAAVベクターが、

a)配列番号8及び配列番号9のヌクレオチド配列、

b)配列番号7のヌクレオチド配列、又は

c)配列番号6のヌクレオチド配列

を含む、項目20～24のいずれか一項に記載の組成物。

(項目26)

前記筋特異的調節エレメントのうちの少なくとも1つが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子mef、筋クレアチンキナーゼ(MCK)、トランケート型MCK(tMCK)、ミオシン重鎖(MHC)、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー/MCKエンハンサープロモーター(MHCK7)、C5-12、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋トロポニンi遺伝子エレメント、低酸素誘導性核因子、ステロイド誘導性エレメント又はグルココルチコイド応答エレメント(ge)である、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

20

(項目27)

マイクロジストロフィンの発現を調節する前記筋特異的調節エレメントが配列番号2(MHCK7)を含む、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

(項目28)

miR-29cの発現を調節する前記筋特異的調節エレメントが配列番号10(CMV)を含む、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

30

(項目29)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換えAAVベクターがi)配列番号1のヌクレオチド配列(マイクロジス)及びii)配列番号2のヌクレオチド配列(MHCK7)を含む、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

(項目30)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換えAAVベクターが配列番号3のヌクレオチド配列を含む、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

(項目31)

miR-29cを発現する前記組換えAAVベクターがi)配列番号8又は配列番号9のヌクレオチド配列及びii)配列番号10のヌクレオチド配列(CMV)を含む、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

40

(項目32)

miR-29cを発現する前記組換えAAVベクターが配列番号6のヌクレオチド配列を含む、項目20～25のいずれか一項に記載の組成物。

(項目33)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換えAAVベクターがi)配列番号1のヌクレオチド配列(マイクロジス)及びii)配列番号2のヌクレオチド配列(MHCK7)を含み、miR-29cを発現する前記AAVベクターがi)配列番号8又は配列番号9の

50

ヌクレオチド配列及び i i ) 配列番号 10 のヌクレオチド配列 ( C M V ) を含む、項目 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

( 項目 34 )

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、m i R - 29 c を発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

( 項目 35 )

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが、血清型 A A V r h . 74、A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12 又は A A V 13 である、項目 20 ~ 34 のいずれか一項に記載の組成物。

10

( 項目 36 )

筋肉内注射又は静脈内注射用に製剤化された、項目 20 ~ 35 のいずれか一項に記載の組成物。

( 項目 37 )

全身送達用に製剤化された、項目 20 ~ 35 のいずれか一項に記載の組成物。

( 項目 38 )

注射、注入又は移植による非経口投与用に製剤化される、項目 37 に記載の組成物。

( 項目 39 )

筋ジストロフィーの治療用医薬を調製するための、i ) マイクロジストロフィンを発現する組換え A A V ベクターであって、マイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 29 c を発現する組換え A A V ベクターであって、m i R - 29 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量の使用。

20

( 項目 40 )

筋ジストロフィー罹患対象における筋力又は筋量の増強用医薬を調製するための、i ) マイクロジストロフィンを発現する組換え A V ベクターであって、マイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 29 c を発現する組換え A A V ベクターであって、m i R - 29 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量の使用。

30

( 項目 41 )

筋ジストロフィー罹患対象における線維化の低減又は予防用医薬を調製するための、i ) マイクロジストロフィンを発現する組換え A A V ベクターであって、マイクロジストロフィンの発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量、及び i i ) m i R - 29 c を発現する組換え A A V ベクターであって、m i R - 29 c の発現が筋特異的調節エレメントヌクレオチド配列によって調節される組換え A A V ベクターの治療有効量の使用。

( 項目 42 )

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、項目 39 ~ 41 のいずれか一項に記載の使用。

40

( 項目 43 )

マイクロジストロフィントタンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、

a ) ヌクレオチド配列の配列番号 1 と少なくとも 85 % 同一であり、且つ機能性マイクロジストロフィントタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又は

b ) 配列番号 1 のヌクレオチド配列

を含む、項目 39 ~ 42 のいずれか一項に記載の使用。

( 項目 44 )

m i R - 29 c を発現する前記組換え A A V ベクターが、

50

a) 配列番号 8 及び配列番号 9 のヌクレオチド配列、

b) 配列番号 7 のヌクレオチド配列、又は

c) 配列番号 6 のヌクレオチド配列

を含む、項目 3 9 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 4 5)

前記筋特異的調節エレメントのうちの少なくとも 1 つが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ (M C K)、トランケート型 M C K (t M C K)、ミオシン重鎖 (M H C)、ハイブリッド - ミオシン重鎖エンハンサー / M C K エンハンサープロモーター (M H C K 7)、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋トロポニン i 遺伝子エレメント、低酸素誘導性核因子、ステロイド誘導性エレメント又はグルココルチコイド応答エレメント (g r e) である、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 4 6)

マイクロジストロフィンの発現を調節する前記筋特異的調節エレメントが配列番号 2 (M H C K 7) を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 4 7)

m i R - 2 9 c の発現を調節する前記筋特異的調節エレメントが配列番号 1 0 (C M V) を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 4 8)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列 (マイクロジス) 及び i i) 配列番号 2 のヌクレオチド配列 (M H C K 7) を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 4 9)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 5 0)

m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが i) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列及び i i) 配列番号 1 0 のヌクレオチド配列 (C M V) を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 5 1)

m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 5 2)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列 (マイクロジス) 及び i i) 配列番号 2 のヌクレオチド配列 (M H C K 7) を含み、m i R - 2 9 c を発現する前記 A A V ベクターが i) 配列番号 8 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列及び i i) 配列番号 1 0 のヌクレオチド配列 (C M V) を含む、項目 3 9 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 5 3)

マイクロジストロフィンを発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 3 のヌクレオチド配列を含み、m i R - 2 9 c を発現する前記組換え A A V ベクターが配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む、項目 3 9 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 5 4)

前記組換え A A V ベクターのうちの少なくとも 1 つが、血清型 A A V r h . 7 4、A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2 又は A A V 1 3 である、項目 3 9 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 5 5)

10

20

30

40

50

前記医薬が筋肉内又は静脈内投与用に製剤化される、項目39～54のいずれか一項に記載の使用。

(項目56)

前記医薬が全身送達用に製剤化される、項目39～54のいずれか一項に記載の使用。

(項目57)

前記医薬が、注射、注入又は移植による非経口投与用に製剤化される、項目56に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】pAAV・MHCK7・マイクロジストロフィンコンストラクトを示す。このコンストラクトでは、cDNA発現カセットにAAV2逆方向末端反復配列(ITR)が隣接する。このコンストラクトはインフレーション欠失(R4～R23)によって特徴付けられ、一方で、ヒンジ1、2及び4(H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>及びH<sub>3</sub>)及びシステインリッチドメインは残り、138kDaタンパク質を産生する。マイクロジストロフィタンパク質(3579bp)の発現はMHCK7プロモーター(795bp)によってガイドされる。イントロン及び5'UTRはプラスミドpCMV(Clonotech)に由来する。マイクロジストロフィンカセットはATG開始のすぐ前にコンセンサスコザックを有し、mRNA終結用の小さい53bp合成ポリAシグナルを有した。ヒトマイクロジストロフィンカセットは、Harper et al. (Nature Medicine 8, 253-261 (2002))によって以前記載されたとおりの(R4～R23/71～78)ドメインを含んだ。

10

【図2】AAVrh74・MHCK7コンストラクトの筋肉内送達後のジストロフィタンパク質発現を実証する。mdxマウスの前脛骨筋に $1 \times 10^{11}$ vgを注射した(n=5匹/群)。6週間後、筋肉を採取し、ジストロフィン発現に関してジストロフィン用のN末端抗体で染色し、及びヘマトキシリン・エオシン染色した。

【図3】図3A～図3Cは、AAVrh74・MHCK7コンストラクトの筋肉内注射後の骨格筋筋力測定及びマイクロジストロフィン発現の定量化を提供する。(A)mdxマウスの前脛骨筋にAAVrh74・MHCK7コンストラクトによって $1 \times 10^{11}$ vg(n=5)を注射した。6週間後、前脛骨筋を採取し、インビボ筋力測定に供した。投薬コホートは未治療mdx対照と比べて筋力産生が有意に高かった。

30

【図4】図4A～図4Cは、全身投与後の骨格筋横隔膜及び心筋線維の広範な形質導入を実証する。(A)mdxマウスを6週齢で尾静脈から $6 \times 10^{12}$ vg( $2 \times 10^{14}$ vg/kg)のAAVrh74・MHCK7・マイクロジスによって12週間の治療に従い全身治療した。(B)マイクロジストロフィン染色が、各組織中のマイクロジストロフィンを発現する筋線維の割合の定量化を示すことを実証する。(C)低用量及び高用量(予定臨床用量)における横隔膜で測定された比筋力を示す。低用量では有意差は認められなかった；しかしながら、高用量では有意な改善があった。

【図5】AAVrh74・MHCK7・マイクロジスコンストラクトの全身送達後のジストロフィタンパク質発現を実証する。mdxマウス(n=5)を6週齢で尾静脈から $6 \times 10^{12}$ vgのAAVrh74・MHCK7・マイクロジスによって全身治療し、12週間の治療後に全ての筋肉を採取し、ジストロフィン及びDAPC成分( - サルコグリカンが示される)の復元に関して染色した。

40

【図6】図6A～図6Dは、AAVrh74・MHCK7の毒性/安全性を実証する。以下の筋組織：前脛骨筋(TA)、腓腹筋(GAS)、四頭筋(QD)、腰筋(PSO)、三頭筋(TRI)、及び横隔膜(DIA)に関してヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色を実施し、毒性を分析した(図6A)。毒性は認められなかった。有効性の指標として、中心に位置する核(CN)を有する筋線維の数を定量化した(図6B)。CNは筋変性・再生サイクルの指標となり、従ってCNの減少は治療効果を実証する。(図6C)は、治療によって総線維数が変化しないことを実証する。(D)にはクレアチンキナーゼの量が提供され、高用量における改善が示される。対応のないt検定を用いて差を検出し

50

た ( $p < 0.05$ ) ; データは平均値  $\pm$  SEMとして報告する。

【図7】pAAV・MCK・マイクロジストロフィンプラスミドコンストラクトを示す。

【図8】rAAVrh74・MCK・マイクロジストロフィン(ヒト)効力アッセイの結果を提供する。mdxマウスの前脛骨筋に  $3 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、又は  $1 \times 10^{11}$  vgを注射した ( $n = 3$  匹/群)。4週間後、筋肉を採取し、N末端Dys3抗体でジストロフィン発現に関して染色した。発現と用量との間には線形相関があり、 $3 \times 10^9$  vgでは発現は極めて低く(無効レベル)、 $1 \times 10^{11}$  vgでは89%の発現であった。

【図9】図9A~図9Cは、ヒトマイクロジストロフィンが筋力産生及び伸張性収縮誘発性傷害からの保護を改善することを実証する。(A)長趾伸筋(EDL)及びTAのジストロフィンタンパク質免疫染色は、rAAVrh74・MCK・マイクロジス(ヒト)を大腿動脈から注射した後のmdx筋線維における発現を示す。モック感染筋も同じ方法で染色しており、曝露時間は対応させる。(B)rAAVrh74・MCKマイクロジスでは、モック治療mdx筋と比べて正規化比筋力が有意に増加した ( $P < 0.05$  対mdx)。(C)rAAVrh74・MCK・マイクロジス(ヒト)を感染させたmdx筋を遺伝子導入後12週間の時点で反復伸張性収縮時の筋力低下に関してモック感染対側mdx・EDL筋及びWT(WT C57BL/10)EDL筋と比較した。rAAVrh74・MCK・マイクロジストロフィン(マイクロジス)治療はモック治療mdx筋と比較して筋力喪失を有意に防いだ ( $P < 0.001$  対mdx)。誤差はSEMである。

【図10-1】核酸配列(配列番号3 rAAVrh74・MHCK7・マイクロジストロフィン)を提供する。

【図10-2】同上。

【図10-3】同上。

【図10-4】同上。

【図11-1】核酸配列(配列番号5) rAAVrh74・MCK・マイクロジストロフィンを提供する。

【図11-2】同上。

【図11-3】同上。

【図11-4】同上。

【図12-1】rAAVベクターscAAVrh74・CMV・miR29c及び天然miR-30骨格中のmiR-29cのヌクレオチド配列及び予測されるヘアピン構造のヌクレオチド配列の概略図を提供する。

【図12-2】同上。

【図13】図13A~図13Cは、早期併用療法が筋力を復元し、収縮誘発性損傷を防ぐことを実証する。強縮後の絶対(A)及び正規化比筋力(B)の測定から、未治療mdx/utrn<sup>+/+</sup>筋及びマイクロジストロフィン療法単独と比較した併用療法による筋力増強が実証された ( $*p < 0.05$ )。一元配置ANOVA (C)次に反復伸張性収縮後の筋力喪失に関して筋肉を評価した。マウスをmiR-29c/マイクロジストロフィンで同時に、及びマイクロジストロフィン単独で治療すると、未治療mdx/utrn<sup>+/+</sup>筋(赤色)と比較して筋力喪失からの保護が示された。二元配置ANOVA ( $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ )。データは全て、平均値  $\pm$  SEMを表す (D)筋線維(緑色)及びコラーゲン含有量(赤色)を実証する代表的シリウスレッド染色像。

【図14】図14A~図14Fは、AAV・CMV・miR-29c/MHCK7・マイクロジストロフィン併用療法の治療が線維化及びECM発現の低減に有効であることを実証する。(A)シリウスレッド染色は、両方の治療コホートにおけるコラーゲン染色の減少を示す。(B)qRT-PCRにより、治療コホートにおけるmiR-29c転写物レベルの増加が確認される(全ての群について  $n = 2 \sim 3$  匹)一元配置ANOVA。半定量的qRT-PCRは、対側肢及びMHCK7・マイクロジストロフィンの単独療法と比較したAAV・CMV・miR-29c/AAV・MHCK7・マイクロジストロフィン治療筋肉におけるCol1A1及びCol3A1(C、D)、Fbn(E)及びTgfb1(F)レベルの減少を示し、Col1A1及びCol3A1は有意である。C~F ( $n =$

10

20

30

40

50



2 ~ 3 匹 / 群) 一元配置 ANOVA。データは全て、平均値  $\pm$  SEM を表す (\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ )。

【図 15】図 15 A ~ 図 15 D は、AAV . CMV . miR - 29c / MHCK7 . マイクロジストロフィン併用療法の治療により線維直径が増加したことを実証する。(A) 治療後 gas (腓腹筋) 重量は、WT 又は未治療筋肉と比較して有意差を示さなかった。(B) miR - 29c / マイクロジストロフィン併用治療は平均線維サイズの増加を実証した。mdx / utr n<sup>+</sup> / - 対照を miR - 29c / マイクロジストロフィン治療 mdx / utr n<sup>+</sup> / - と比較すると、平均直径が 29.02 から 33.61  $\mu$ m に増加した (n = 5 ~ 6 匹 / 群)、一元配置 ANOVA。(C) 同時送達により、野生型線維サイズ分布の方へのシフトが生じた。(D) miR - 29c / マイクロジストロフィン併用治療における 1 mm<sup>2</sup> 当たりの筋線維数については、未治療マウス又は WT マウスと差はなかった。C ~ F (n = 5 ~ 5 匹 / 群)、一元配置 ANOVA。データは全て、平均値  $\pm$  SEM を表す (\*\*\*  $p < 0.001$ 、\*\*\*\*  $p < 0.0001$ )。

【発明を実施するための形態】

【0079】

本発明は、ヒトマイクロジストロフィンを過剰発現する遺伝子療法ベクター、例えば rAAV ベクター並びに筋ジストロフィー患者の線維化を低減及び予防する方法を提供する。本発明はまた、miR - 29 を発現する遺伝子療法ベクターを、DMD 患者において欠失しているマイクロジストロフィンを発現する遺伝子療法ベクターと併用して投与することを含む、同時療法 (併用) 遺伝子療法の方法も提供する。

【0080】

最も若い DMD 診断年齢で採取された筋生検では、顕著な結合組織増殖が明らかになる。筋線維化は幾つもの形で有害である。それは結合組織関門を通じた筋内膜栄養素の正常な移行を減少させ、血流を減少させ、及び筋肉から血管由来栄養成分を欠乏させ、及び四肢拘縮によって機能的に早期歩行能喪失の一因となる。時間が経つにつれ、筋肉の顕著な線維化の結果として治療上の難題が増大する。これは、筋生検において連続的な時点で結合組織増殖を比較すると認めることができる。この過程は増悪し続け、歩行能喪失を招き、特に車椅子利用患者において制御不能に加速する。

【0081】

早期治療、線維化を低減するための並行する手法がなければ、エクソンスキッピング、終止コドンリードスルー、又は遺伝子置換療法の利益をそもそも完全に実現できるとは考えにくい。小分子又はタンパク質補充戦略でさえも、筋線維化の低減手法がなければ失敗するものと思われる。線維化が既に存在する高齢 mdx マウスを AAV . マイクロジストロフィンで治療した先行研究では、本発明者らが完全な機能的復元を実現できなかったことが実証された (Liu, M., et al., Mol Ther 11, 245 - 256 (2005))。また、DMD 心筋症の進行に伴い心室壁の癒痕化及び線維化が起こることも公知である。マイクロ RNA 送達は、免疫障壁がなく、送達が比較的容易であるため、特に画期的である。マイクロ RNA は小さく (約 200 bp)、従って遺伝的欠陥を修正し又はそれを回避するための治療用カセットと共に AAV にパッケージングすることができる。

【0082】

本明細書で使用されるとき、用語「AAV」は、アデノ随伴ウイルスの一般的な略語である。アデノ随伴ウイルスは一本鎖 DNA パルボウイルスであり、同時感染するヘルパーウイルスによって特定の機能が提供される細胞内においてのみ成長する。現在、特徴付けられている AAV の血清型は 13 種ある。AAV の一般的な情報及びレビューについては、例えば、Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169 - 228、及び Berns, 1990, Virology, pp. 1743 - 1764, Raven Press, (New York) を参照することができる。しかしながら、様々な血清型が構造的にも機能的にも、更には遺伝子レベルでさえも非常に近似した関係にあることは周知であり、そのためこれらの同じ原理を別の

AAV血清型に適用可能であろうことは十分に予想される（例えば、Blacklowe, 1988, pp. 165 - 174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; 及びRose, Comprehensive Virology 3: 1 - 61 (1974)を参照のこと）。例えば、全てのAAV血清型が、相同rep遺伝子によって媒介される極めて類似した複製特性を呈するように見え；及び全てが、AAV2で発現するもののような3つの関連するカプシドタンパク質を担持している。関連性の程度は、ヘテロ二重鎖分析解析によってゲノムの長さに沿った血清型間の広範な交差ハイブリダイゼーション；及び「逆方向末端反復配列」(ITR)に対応する末端の類似した自己アニールセグメントの存在が明らかになることにより更に示唆される。同様の感染力パターンもまた、各血清型の複製機能が同様の調節管理下にあることを示唆している。

10

#### 【0083】

「AAVベクター」は、本明細書で使用されるとき、AAV末端反復配列(ITR)が隣接する1つ以上の目的のポリヌクレオチド(又はトランス遺伝子)を含むベクターを指す。かかるAAVベクターは、rep及びcap遺伝子産物をコードし且つそれを発現するベクターをトランスフェクトした宿主細胞に存在するとき、複製し、及び感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。

#### 【0084】

「AAVビリオン」又は「AAVウイルス粒子」又は「AAVベクター粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質とカプシド化したポリヌクレオチドAAVベクターとで構成されるウイルス粒子を指す。この粒子が異種ポリヌクレオチド(即ち、哺乳類細胞に送達しようとするトランス遺伝子など、野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド)を含む場合、これは典型的には、「AAVベクター粒子」又は単に「AAVベクター」と称される。従って、AAVベクター粒子内にはAAVベクターが含まれるため、AAVベクター粒子の作製は必然的にかかるベクターの作製を含む。

20

#### 【0085】

##### AAV

本発明の組換えAAVゲノムは、本発明の核酸分子と、核酸分子に隣接する1つ以上のAAV ITRとを含む。rAAVゲノム中のAAV DNAは、限定はされないが、AAV血清型AAVrh.74、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12及びAAV-13を含め、組換えウイルスを送達し得る任意のAAV血清型由来であってよい。シュードタイプrAAVの作製が、例えば、国際公開第01/83692号パンフレットに開示されている。他の種類のrAAV変異体、例えばカプシド突然変異を有するrAAVもまた企図される。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900 - 1909 (2014)を参照のこと。上記の背景の節で指摘したとおり、様々なAAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列が当該技術分野において公知である。骨格筋特異的発現を促進するためには、AAV1、AAV6、AAV8又はAAVrh.74を使用し得る。

30

#### 【0086】

本発明のDNAプラスミドは、本発明のrAAVゲノムを含む。このDNAプラスミドが、rAAVゲノムを感染性ウイルス粒子となるようアSEMBLするため、AAVのヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルス、E1欠失アデノウイルス又はヘルペスウイルス)の感染許容性細胞に移される。パッケージングされるAAVゲノム、rep及びcap遺伝子、及びヘルパーウイルス機能が細胞に提供されるrAAV粒子の作製技法は、当該技術分野において標準的である。rAAVの作製には、単一の細胞(本明細書ではパッケージング細胞と称される)の中に以下の成分:rAAVゲノム、rAAVゲノムと別個の(即ち、そこにはない)AAV rep及びcap遺伝子、及びヘルパーウイルス機能が存在する必要がある。AAV rep及びcap遺伝子は、限定はされないが、AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV

40

50

- 7、AAVrh.74、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12及びAAV-13を含め、組換えウイルスを誘導し得る任意のAAV血清型由来であってよく、且つrAAVゲノムITRと異なるAAV血清型由来であってよい。シュードタイプrAAVの作製については、例えば、国際公開第01/83692号パンフレット（参照により全体として本明細書に援用される）に開示されている。

#### 【0087】

パッケージング細胞の作成方法は、AAV粒子作製に必要な成分全てを安定に発現する細胞株を作り出すことである。例えば、AAV rep及びcap遺伝子を欠いているrAAVゲノム、rAAVゲノムと別個のAAV rep及びcap遺伝子、及びネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能マーカーを含むプラスミド（又は複数のプラスミド）が細胞のゲノムに組み込まれる。AAVゲノムは、GCテール法（Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 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）又は直接的に、平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666）などの手順によって細菌プラスミドに導入されている。次にパッケージング細胞株にアデノウイルスなどのヘルパーウイルスを感染させる。この方法の利点は、細胞を選択可能であり、大規模なrAAV作製に好適なことである。好適な方法の他の例では、プラスミドよりむしろアデノウイルス又はバキュロウイルスを利用してrAAVゲノム及び/又はrep及びcap遺伝子がパッケージング細胞に導入される。

#### 【0088】

rAAV作製の一般的原理については、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; 及びMuzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129)にレビューされている。様々な手法が、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., Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828 (1989); 米国特許第5,173,414号明細書; 国際公開第95/13365号パンフレット及び対応する米国特許第5,658,776号明細書; 国際公開第95/13392号パンフレット; 国際公開第96/17947号パンフレット; PCT/US98/18600号明細書; 国際公開第97/09441号パンフレット（PCT/US96/14423号明細書）; 国際公開第97/08298号パンフレット（PCT/US96/13872号明細書）; 国際公開第97/21825号パンフレット（PCT/US96/20777号明細書）; 国際公開第97/06243号パンフレット（PCT/FR96/01064号明細書）; 国際公開第99/11764号パンフレット; Perrin et al. Vaccine 13:1244-1250 (1995); Paul et al. Human Gene Therapy 4:609-615 (1993); Clark et al. Gene Therapy 3:1124-1132 (1996); 米国特許第5,786,211号明細書; 米国特許第5,871,982号明細書; 及び米国特許第6,258,595号明細書に記載されている。前述の文献は、特にrAAV作製に関連するこれらの文献の節を強調しつつ、本明細書によって全体として参照により本明細書に援用される。

#### 【0089】

従って、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。一実施形態において、パッケージング細胞は、HeLa細胞、293細胞及びPerC.6細胞

10

20

30

40

50

(コグネイト293株)などの安定形質転換癌細胞であってもよい。別の実施形態において、パッケージング細胞は、低継代293細胞(アデノウイルスのE1で形質転換されたヒト胎児腎細胞)、MRC-5細胞(ヒト胎児線維芽細胞)、WI-38細胞(ヒト胎児線維芽細胞)、Vero細胞(サル腎細胞)及びFRhL-2細胞(アカゲザル胎仔肺細胞)など、形質転換癌細胞でない細胞である。

#### 【0090】

本発明の組換えAAV(即ち、感染性カプシド化rAAV粒子)はrAAVゲノムを含む。例示的实施形態において、両方のrAAVのゲノムがAAV rep及びcap DNAを欠いており、即ち、ゲノムのITR間にAAV rep又はcap DNAはない。本発明の核酸分子を含むように構築し得るrAAVの例は、国際特許出願第PCT/US2012/047999号明細書(国際公開第2013/016352号パンフレット)(全体として参照により本明細書に援用される)に示される。

10

#### 【0091】

rAAVは、カラムクロマトグラフィー又は塩化セシウム勾配によるなど、当該技術分野において標準的な方法によって精製し得る。ヘルパーウイルスからのrAAVベクターの精製方法は当該技術分野において公知であり、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号明細書及び国際公開第98/09657号パンフレットに開示される方法が含まれる。

20

#### 【0092】

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、rAAVと薬学的に許容可能な担体とを含む。本組成物はまた、希釈剤及び補助剤などの他の成分も含み得る。許容可能な担体、希釈剤及び補助剤は、被投与者にとって非毒性であり、好ましくは用いられる投薬量及び濃度で不活性で、緩衝液及びブルロニック(登録商標)などの界面活性剤が含まれる。

#### 【0093】

本発明の方法において投与されるrAAVの力価は、例えば、詳細なrAAV、投与方法、治療目標、個体、及び標的となる1つ又は複数の細胞型に応じて異なることになり、当該技術分野において標準的な方法によって決定し得る。rAAVの力価は、1ml当たり約 $1 \times 10^6$ 、約 $1 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^8$ 、約 $1 \times 10^9$ 、約 $1 \times 10^{10}$ 、約 $1 \times 10^{11}$ 、約 $1 \times 10^{12}$ 、約 $1 \times 10^{13}$ ~約 $1 \times 10^{14}$  DNアーゼ耐性粒子(DRP)又はそれ以上の範囲であり得る。投薬量はまた、ウイルスゲノム(vg)単位で表されてもよい。

30

#### 【0094】

標的細胞にrAAVを形質導入するインビボ又はインビトロでの方法が、本発明により企図される。インビボ方法は、本発明のrAAVを含む有効用量、又は有効な複数用量の組成物をそれを必要としている動物(ヒトを含む)に投与するステップを含む。障害/疾患の発症前にこの用量が投与される場合、投与は予防的である。障害/疾患の発症後にこの用量が投与される場合、投与は治療的である。本発明の実施形態において、有効用量は、治療下の障害/疾患状態に関連する少なくとも1つの症状を緩和する(消失させる又は低減する)用量、障害/疾患状態への進行を減速させる又は防止する用量、障害/疾患状態の進行を減速させる又は防止する用量、疾患の程度を減じる用量、疾患の(部分的な又は全面的な)寛解をもたらす用量、及び/又は生存を延長させる用量である。本発明の方法による予防又は治療に企図される疾患の例は、FSHDである。

40

#### 【0095】

併用療法又は同時療法もまた本発明により企図される。併用は、本明細書で使用される時、同時に行われる治療及び逐次的に行われる治療の両方を含む。本発明の方法と標準的な医学的治療(例えば、コルチコステロイド)との併用が、新規療法との併用と同じく特に企図される。

50

## 【 0 0 9 6 】

組成物の有効用量の投与は、限定はされないが、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、鼻腔、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、又は腔を含め、当該技術分野において標準的な経路によることができる。1つ又は複数の投与経路及び本発明の r A A V の A A V 成分（詳細には、A A V I T R 及びカプシドタンパク質）の1つ又は複数の血清型は、当業者により、治療下の感染及び／又は疾患状態並びにマイクロジストロフィンタンパク質を発現させようとする標的細胞／1つ又は複数の組織を考慮して選択され、及び／又は適合されてもよい。

## 【 0 0 9 7 】

本発明は、本発明の r A A V 及び組成物の有効用量の局所投与及び全身投与を提供する。例えば、全身投与は循環系への投与であり、体全体が影響を受けることになる。全身投与には、胃腸管を通じた吸収などの経腸投与、及び注射、注入又は移植を通じた非経口投与（parental administration）が含まれる。

10

## 【 0 0 9 8 】

詳細には、本発明の r A A V の実際の投与は、r A A V 組換えベクターを動物の標的組織内に輸送するであろう任意の物理的方法を用いることにより達成されてもよい。本発明に係る投与には、限定はされないが、筋肉内、血流中への、及び／又は肝臓内への直接の注射が含まれる。単に r A A V をリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁すれば、筋組織発現に有用な媒体を提供するには十分であることが実証されており、r A A V と共投与し得る担体又は他の成分に関して制限は知られていない（しかし r A A V がある場合には普通に、D N A を分解する組成物は避けなければならない）。r A A V のカプシドタンパク質は、r A A V が筋肉などの詳細な目的の標的組織を標的とするように修飾されてもよい。例えば、国際公開第 0 2 / 0 5 3 7 0 3 号パンフレット（この開示は参照により本明細書に援用される）を参照のこと。医薬組成物は、注射用製剤として、又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。筋肉内注射用及び経皮輸送用の両方の数多くの製剤がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用することができる。r A A V は、投与及び取り扱いを容易にするための任意の薬学的に許容可能な担体と共に使用することができる。

20

## 【 0 0 9 9 】

本明細書に開示される方法において投与される r A A V の用量は、例えば、詳細な r A A V 、投与方法、治療目標、個体、及び標的となる1つ又は複数の細胞型に応じて異なることになり、当該技術分野において標準的な方法によって決定し得る。投与される各 r A A V の力価は、1 m l 当たり約  $1 \times 10^6$ 、約  $1 \times 10^7$ 、約  $1 \times 10^8$ 、約  $1 \times 10^9$ 、約  $1 \times 10^{10}$ 、約  $1 \times 10^{11}$ 、約  $1 \times 10^{12}$ 、約  $1 \times 10^{13}$ 、約  $1 \times 10^{14}$  から、又は約  $1 \times 10^{15}$  D N A アーゼ耐性粒子（D R P ）又はそれ以上に及ぶ範囲であり得る。投薬量はまた、ウイルスゲノム（v g ）単位で表されてもよい（即ち、それぞれ、 $1 \times 10^7$  v g、 $1 \times 10^8$  v g、 $1 \times 10^9$  v g、 $1 \times 10^{10}$  v g、 $1 \times 10^{11}$  v g、 $1 \times 10^{12}$  v g、 $1 \times 10^{13}$  v g、 $1 \times 10^{14}$  v g、 $1 \times 10^{15}$ ）。投薬量はまた、体重 1 キログラム（k g ）当たりのウイルスゲノム（v g ）の単位で表されてもよい（即ち、それぞれ、 $1 \times 10^{10}$  v g / k g、 $1 \times 10^{11}$  v g / k g、 $1 \times 10^{12}$  v g / k g、 $1 \times 10^{13}$  v g / k g、 $1 \times 10^{14}$  v g / k g、 $1 \times 10^{15}$  v g / k g）。A A V 力価の決定方法は、C l a r k e t a l . , H u m . G e n e T h e r . , 1 0 : 1 0 3 1 - 1 0 3 9 ( 1 9 9 9 ) に記載されている。

30

40

## 【 0 1 0 0 】

詳細には、本発明の r A A V の実際の投与は、r A A V 組換えベクターを動物の標的組織内に輸送するであろう任意の物理的方法を用いることにより達成されてもよい。本発明に係る投与には、限定はされないが、筋肉内、血流中への、及び／又は肝臓内への直接の注射が含まれる。単に r A A V をリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁すれば、筋組織発現に有用な媒体を提供するには十分であることが実証されており、r A A V と共投与し得る担体又は他の成分に関して制限は知られていない（しかし r A A V がある場合には普通に、D

50

NAを分解する組成物は避けなければならない)。rAAVのカプシドタンパク質は、rAAVが筋肉などの詳細な目的の標的組織を標的とするように修飾されてもよい。例えば、国際公開第02/053703号パンフレット(この開示は参照により本明細書に援用される)を参照のこと。医薬組成物は、注射用製剤として、又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。筋肉内注射用及び経皮輸送用の両方の数多くの製剤がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用することができる。rAAVは、投与及び取り扱いを容易にするための任意の薬学的に許容可能な担体と共に使用することができる。

#### 【0101】

筋肉内注射の目的上、ゴマ油若しくはピーナッツ油などの補助剤中又はプロピレングリコール水溶液中の溶液を、並びに滅菌水溶液も、利用することができる。かかる水溶液は必要に応じて緩衝されてもよく、液体希釈剤は初めに生理食塩水又はグルコースで等張性にされてもよい。遊離酸(DNAが酸性リン酸基を含む)又は薬理学的に許容可能な塩としてのrAAVの溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース(hydroxypropylcellulose)などの界面活性剤と好適に混合した水中に調製することができる。rAAVの分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール及びこれらの混合物中並びに油中に調製することができる。通常の貯蔵及び使用条件下では、こうした調製物は、微生物の増殖を防ぐため保存剤を含有する。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技法により容易に入手可能である。

#### 【0102】

注射液としての使用に好適な医薬担体、希釈剤又は賦形剤には、滅菌水性溶液又は分散液及び滅菌注射用溶液若しくは分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。いずれの場合にも、その形態は無菌でなければならず、且つ易通針性が存在する程度に流動性でなければならない。それは製造及び貯蔵条件下で安定していなければならず、且つ細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護されていなければならない。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、液状ポリエチレングリコールなど)、これらの好適な混合物、及び植物油を含有する溶媒又は分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合に必要な粒径の維持、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、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、チメロサルなどによってもたらしすることができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類又は塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。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を使用することにより、注射用組成物の持続的吸収をもたらしすることができる。

#### 【0103】

滅菌注射用溶液は、適切な溶媒中に必要な量のrAAVを適宜上記に列挙される種々の他の成分と共に配合し、続いて過滅菌することにより調製される。概して、分散液は、基礎分散媒及び上記に列挙されるものからの他の必要な成分を含有する滅菌媒体中に滅菌活性成分を配合することにより調製される。滅菌注射用溶液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分+任意の追加的な所望の成分の粉末を予め滅菌ろ過されたその溶液から生じさせる真空乾燥及び凍結乾燥法である。

#### 【0104】

rAAVによる形質導入はまた、インビトロで行われてもよい。一実施形態において、対象から所望の標的筋細胞が取り出され、rAAVで形質導入されて、対象に再導入される。或いは、同系又は異種筋細胞を使用することもでき、ここで細胞は、対象に不適切な免疫応答を生じさせることのないものである。

#### 【0105】

好適な形質導入方法、及び形質導入細胞を対象に再導入する方法は、当該技術分野において公知である。一実施形態において、細胞は、rAAVを例えば適切な培地中で筋細胞と合わせて、目的のDNAを有する細胞をサザンブロット及び/又はPCRなどの従来技

10

20

30

40

50

法を用いてスクリーニングすることによるか、又は選択可能なマーカーを用いることにより、インビトロで形質導入することができる。次に形質導入された細胞は、医薬組成物として製剤化し、その組成物を、筋肉内、静脈内、皮下及び腹腔内注射によるか、又は平滑筋及び心筋への例えばカテーテルを使用した注射によるなど、様々な技法によって対象に導入することができる。

#### 【0106】

細胞を本発明の rAAV によって形質導入すると、マイクロジストロフィンタンパク質の持続的発現が起こる。従って本発明は、マイクロジストロフィンタンパク質を発現する rAAV を動物、好ましくはヒトに投与/送達する方法を提供する。こうした方法は、組織（限定はされないが、筋肉などの組織、肝臓及び脳などの器官、及び唾液腺などの腺を含む）を1つ以上の本発明の rAAV によって形質導入することを含む。形質導入は、組織特異的調節エレメントを含む遺伝子カセットで行われてもよい。例えば、本発明の一実施形態は、限定はされないが、myoD 遺伝子ファミリーなど、アクチン及びミオシン遺伝子ファミリーに由来するもの（Weintraub et al., Science, 251: 761 - 766 (1991) を参照）、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 MEF-2（Cserjesi and Olson, Mol Cell Biol 11: 4854 - 4862 (1991)）、ヒト骨格筋アクチン遺伝子（Muscat et al., Mol Cell Biol, 7: 4089 - 4099 (1987)）、心筋アクチン遺伝子に由来する調節エレメント、筋クレアチンキナーゼ配列エレメント（Johnson et al., Mol Cell Biol, 9: 3393 - 3399 (1989) を参照）及びマウスクレアチンキナーゼエンハンサー（mCK）エレメント、骨格筋速筋トロポニンC 遺伝子、遅筋心筋トロポニンC 遺伝子及び遅筋トロポニンI 遺伝子に由来する調節エレメント：低酸素誘導性核因子（Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680 - 5684 (1991)）、ステロイド誘導性エレメント及びグルココルチコイド応答エレメント（GRE）を含むプロモーター（Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603 - 5607 (1993) を参照）、及び他の調節エレメントを含めた筋特異的調節エレメントが指向する筋細胞及び筋組織を形質導入する方法を提供する。

#### 【0107】

筋組織は、生命維持に必要な重要器官でなく、且つ到達し易いため、インビボDNA送達の魅力的な標的である。本発明は、形質導入された筋線維からのマイクロジストロフィンの持続的発現を企図する。

#### 【0108】

「筋細胞」又は「筋組織」とは、あらゆる種類の筋肉（例えば消化管、膀胱、血管又は心臓組織の例えば骨格筋及び平滑筋）に由来する細胞又は細胞群が意味される。かかる筋細胞は、筋芽細胞、ミオサイト、筋管、心筋細胞及び心筋芽細胞など、分化細胞であっても、又は未分化細胞であってもよい。

#### 【0109】

用語「形質導入」は、本発明の複製欠損 rAAV を介した、レシピエント細胞によるマイクロジストロフィンの発現をもたらすインビボ又はインビトロのいずれかでのレシピエント細胞へのマイクロジストロフィンのコード領域の投与/送達を指して使用される。

#### 【0110】

従って、本発明は、マイクロジストロフィンをコードする rAAV の有効用量（又は複数用量、本質的に同時に投与されるもの、又は間隔を置いて与えられる複数用量）をそれを必要としている患者に投与する方法を提供する。

#### 【実施例】

#### 【0111】

##### 実施例 1

pAAV.MHCK7. マイクロジストロフィンコンストラクトの作成

pAAV.MHCK7. マイクロジストロフィンプラスミドは、AAV2 逆方向末端反

復配列 ( I T R ) が隣接するヒトマイクロジストロフィン c D N A 発現カセットを含む ( 図 1 を参照 ) 。このマイクロジスコンストラクトはインフレームロッド欠失 ( R 4 ~ R 2 3 ) によって特徴付けられたが、一方、ヒンジ 1、2 及び 4 及びシステインリッチドメインは残り、138 k D a タンパク質を産生する。マイクロジストロフィンタンパク質 ( 3 5 7 9 b p ) の発現は M H C K 7 プロモーター ( 7 9 5 b p ) によってガイドされた。イントロン及び 5 ' U T R はプラスミド p C M V ( C l o n t e c h ) に由来する。マイクロジストロフィンカセットは A T G 開始のすぐ前にコンセンサスコザックを有し、m R N A 終結用の小さい 5 3 b p 合成ポリ A シグナルを有した。ヒトマイクロジストロフィンカセットは、Harper et al. ( Nature Medicine 8 , 2 5 3 - 2 6 1 ( 2 0 0 2 ) ) によって以前記載されたとおりの ( R 4 ~ R 2 3 / 7 1 ~ 7 8 ) ドメインを含んだ。相補 DNA はヒト使用にコドン最適化され、GenScript ( P i s c a t a w a y , N J ) によって合成された ( Mol Ther 1 8 , 1 0 9 - 1 1 7 ( 2 0 1 0 ) ) 。このベクターに含まれる唯一のウイルス配列は、ウイルス DNA 複製及びパッケージングの両方に必要な A A V 2 の逆方向末端反復配列であった。マイクロジストロフィンカセットは、m R N A 終結用の小さい 5 3 b p 合成ポリ A シグナルを有する。

【 0 1 1 2 】

先行研究により、M H C K 7 プロモーターを使用した心臓での発現 ( Salva et al. Mol Ther 1 5 , 3 2 0 - 3 2 9 ( 2 0 0 7 ) ) 並びに A A V r h 7 4 が骨格筋、横隔膜、及び心筋での発現を実現すること ( Sondergaard et al. Annals of clinical and Transl Neurology 2 , 2 5 6 - 2 7 0 ( 2 0 1 5 ) ) が確認されており、図 1 のコンストラクトの配列を A A V r h . 7 4 ビリオンにカプシド化した。A A V r h . 7 4 血清型の分子クローンはアカゲザルリンパ節からクローニングされたもので、これについては、Rodino-Klapac et al. Journal of Translational medicine 5 , 4 5 ( 2 0 0 7 ) に記載されている。

#### 【 0 1 1 3 】

#### 実施例 2

r A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィンを使用した筋肉内発現研究

筋肉内注射によるヒトマイクロジストロフィンコンストラクト ( r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィン ; 実施例 1 に記載される ) で発現研究を行った。m d x マウス ( ジストロフィンを発現しない自然発生 D m d <sup>m d</sup> x 変異マウス ) の前脛骨筋に  $1 \times 10^{11}$  v g のカセットを注射した ( n = 5 匹 / 群 ) 。6 週間後、筋肉を採取し、ジストロフィン ( D y s 3 ) 発現に関してジストロフィン用の N 末端抗体で染色し、及びヘマトキシリン・エオシン ( H E ) 染色した。図 2 は、未治療筋肉と比較して  $1 \times 10^{11}$  v g 用量での広範な遺伝子発現及び中心に位置する核の減少を示す。更に、マイクロジストロフィンコンストラクトによる治療後に平均線維 / フレームの増加を伴う中心核形成の低下が認められた。r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . マイクロジストロフィンコンストラクトの発現レベルを定量化すると、約 7 3 % であった。

#### 【 0 1 1 4 】

マイクロジストロフィンの局在及び発現レベルを測定することに加えて、カセットの筋肉内注射後に骨格筋筋力を測定した、n の測定及び定量化。p A A V . M H C K 7 . マイクロジストロフィンコンストラクトの筋肉内発現は、未治療の対照と比較して有意に高い絶対筋力及び比筋力の産生をもたらした ( それぞれ、図 3 A 及び図 3 B ) 。

#### 【 0 1 1 5 】

#### 実施例 3

m d x マウスへの r A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . マイクロジスの全身送達

m d x マウスのコホートに  $2 \times 10^{12}$  v g (  $8 \times 10^{13}$  v g / k g ) 又は高用量 ( 予定臨床用量 )  $6 \times 10^{12}$  v g (  $2 \times 10^{14}$  v g / k g ) のいずれかの r A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . マイクロジスを 6 週齢で尾静脈から注射した。12 週間の治療後、全ての筋肉を採取し、ジストロフィン及び D A P C 成分の復元に関して染色した。全身注射 (



尾静脈)したマウスはあらゆる筋肉の全体にわたって高いジストロフィン染色レベルを示した。図4Aは、 $6 \times 10^{12}$  vg ( $2 \times 10^{14}$  vg/kg) 全身投与後の骨格筋、横隔膜及び心筋線維の広範な形質導入を表す。図4Bは、各組織におけるマイクロジストロフィンを発現する筋線維の割合の定量化を示す。最後に横隔膜を機能改善に関して試験した(図4C)。低用量では有意差は認められなかった;しかしながら、高用量では有意な改善があった。重要なことに、図5は、マイクロジストロフィン送達後にDAPCの他の成分が完全に復元されたことを実証している。 - サルコグリカン(B-SG)を示す。

【0116】

ベクターを表1に従い静脈内(i.v.)注射によってmdxマウスの尾静脈に投与することにより、AAVrh.74.MHCK7.マイクロジスの毒性/安全性を判定する。前脛骨筋(TA)、腓腹筋(GAS)、四頭筋(QD)、腰筋(PSO)、三頭筋(TRI)、及び横隔膜(DIA)を含む分析した筋組織のいずれにも、毒性のエビデンスはなかった(図6A及び図6B)。高用量 $6 \times 10^{12}$  vg ( $2 \times 10^{14}$  vg/kg)では、中心に位置する核の数が減少した。歴史的に、未治療年齢対応mdxマウスにおける骨格筋の中心核形成は、平均して約80%である。最後に、小標本サイズ(n=3匹)からの予備的データは、高用量治療マウスの血清中のCK放出レベル(U/L)の低下を実証している(D)。対応のないt検定を用いて差を検出した( $p < 0.05$ );データは平均値 $\pm$ SEMとして報告する。

【0117】

【表1】

表1. マウスにおけるrAAVrh.74.MHCK7.マイクロジスの毒性/安全性研究の概要

コホート 番号	試験薬剤	用量 (vg/kg)	治療 0 日目	追跡 1 日目	犠牲エンド ポイント	
					6 週目	延長
(1) 低用量	AAVrh.74.M HCK7.マイクロ ロジス	8.0 x10 <sup>13</sup>	mdx マウスの 尾静脈への 単回 <i>i.v.</i> 注射	24 時間 体重, 臨床所見	5M	+2
(2) 高用量	AAVrh.74.M HCK7.マイクロ ロジス	2.0 x10 <sup>14</sup>			5M	+2
(3) 対照	媒体(LRS)	0			5M	+2
全マウス						N = 21

【0118】

実施例4

pAAV.MCK.マイクロジストロフィンコンストラクトの作成

コドン最適化ヒトマイクロジストロフィンcDNA配列をドライブするMCK発現カセットをAAVクローニングベクターpsub201に挿入することにより、pAAV.MCK.マイクロジストロフィンプラスミドを構築した(Samulski et al., J. Virol. 61(10):3096-3101)。このコンストラクトには、筋特異的遺伝子発現をドライブするため筋特異的調節エレメントが含まれた。この調節エレメントは、351bp MCKコアプロモーター(近位)に融合したマウスMCKコアエンハンサー(206bp)を含んだ。コンストラクトは、コアプロモーターの後に、効率的な転写開始のための53bp内因性マウスMCKエクソン1(非翻訳)、続いてSV40後期16S/19Sスプライスシグナル(97bp)及び小さい5'UTR(61bp)を

含む。イントロン及び5' UTRはプラスミドpCMV (Clontech)に由来した。マイクロジストロフィンカセットはATG開始のすぐ前にコンセンサスコザックを有し、mRNA終結用の小さい53bp合成ポリAシグナルを有する。ヒトマイクロジストロフィンカセットは、Harper et al. Nat. Med. 8(3): 253-61, 2002によって以前記載されたとおりの(R4~R23/71~78)ドメインを含む。

#### 【0119】

pAAV.MCK.マイクロジストロフィンプラスミドは、AAV2逆方向末端反復配列(ITR)が隣接するヒトマイクロジストロフィンcDNA発現カセットを含んだ(図7を参照)。この配列をAAVrh.74ビリオンにカプシド化した。AAVrh.74血清型の分子クローンはアカゲザルリンパ節からクローニングされたもので、これについては、Rodino-Klapac et al. Journal of Tran. Med. 45(2007)に記載されている。

#### 【0120】

##### 実施例5

rAAV.MCK.マイクロジストロフィンを使用した効力及び用量分析

筋肉内注射によるヒトマイクロジストロフィンコンストラクト(rAAV.MCK.マイクロジストロフィン; 実施例1に記載される)で発現研究を行った。mdxマウス(ジストロフィンを発現しない自然発生Dmd<sup>mdx</sup>変異マウス)の前脛骨(TA)筋に $3 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、又は $1 \times 10^{11}$ vgを注射した(n=3匹/群)。4週間後、筋肉を採取し、N末端Dys3に特異的な抗体を用いてジストロフィン発現に関して染色し、及びヘマトキシリン・エオシン(HE)染色した。図8は発現と用量との間の線形相関を示し、 $3 \times 10^9$ vgでは発現は極めて低く(無効レベル)、 $1 \times 10^{11}$ vgでは89%の発現であった。

#### 【0121】

##### 実施例6

mdxマウスへのrAAV.MCK.マイクロジストロフィンの血管送達

分離式肢灌流モデルのモデルを使用して(Rodino-Klapac et al., J. Trans. Med. 5(45): 1-11, 2007)、mdxマウス(n=10匹)に大腿動脈から $1 \times 10^{11}$ vgのrAAVrh.74.MCK.マイクロジストロフィンを注射し、実施されたアウトカム分析を行った。遺伝子導入の3ヵ月後、下肢筋を採取し、有効性研究により、筋力及び伸張性収縮誘発性傷害に対する抵抗性の両方の有意な改善が実証された(図9)。

#### 【0122】

長趾伸(EDL)筋及びTA筋におけるジストロフィタンパク質免疫染色は、rAAVrh.74-MCK-マイクロジス治療後のmdx筋線維における発現を示す(図9A)。モック感染筋も同じ方法で染色しており、曝露時間は対応させる。図9Bは、rAAVrh.74-MCK-マイクロジスにより、モック治療mdx筋と比べて正規化比筋力が有意に増加したことを実証している( $P < 0.05$  対mdx)。加えて、rAAVrh.74-MCK-マイクロジス(ヒト)を感染させたmdx筋を遺伝子導入後12週間の時点で反復伸張性収縮時の筋力低下に関してモック感染対側mdx EDL筋(青色)及び野生型(WT C57Bl/10)EDL筋と比較した(図9C)。rAAVrh.74-MCK-マイクロジストロフィン(マイクロジス)治療はモック治療mdx筋と比較して筋力喪失を有意に防いだ( $P < 0.001$  対mdx)。

#### 【0123】

##### 実施例7

同時送達AAVrh.74.MHCK7.マイクロジストロフィン+AAVrh.74.CMV.miR29C

miR-29c/マイクロジストロフィン併用遺伝子療法手法が線維化の低減に一層有益となり得るかどうかを決定するため、4週齢mdx/utrn<sup>+</sup>マウスが、各 $5 \times 1$

10

20

30

40

50

0<sup>11</sup>vgのAAVrh74・MHCK7・マイクロジストロフィン及びrAAVrh74・CMV・miR-29cの筋肉内注射を左腓腹筋に受けた。rAAVrh74・MHCK7・マイクロジストロフィン、及びrAAVrh74・MHCK7・マイクロジストロフィン単独。マウスは注射後12週間の時点で分析した（これは初期治療と見なされる）。

#### 【0124】

pAAVrh74・MHCK7・マイクロジストロフィンプラスミドは、図10に示されるとおり、AAV2逆方向末端反復配列（ITR）が隣接したヒトマイクロジストロフィンcDNA発現カセットを含み、実施例1に詳細に記載される。AAVrh74ビリオンにカプシド化したのは、この配列である。

10

#### 【0125】

pAAV・CMV・miR29Cプラスミドは、AAV2逆方向末端反復配列（ITR）が隣接したmiR-30ステムループ骨格におけるmir29c cDNAを含む。AAVrh74ビリオンにカプシド化したのは、この配列である。加えて、miR-29c標的配列中にある数個のヌクレオチドを変更して、shRNA-miR(luc)にあるようなこの部位におけるワトソン・クリック対合を模倣した。shRNA-luc設計によれば、ヘアピンは、その長さ全体にわたって完全に相補的でなければならない。更に、パッセンジャー鎖を多く変更するほど、ステムによってmiRNAを認識する可能性のあるmiR-29プロセッシングを制御する任意の内因性機構が消失する可能性が高くなる。図12に示されるとおり、ガイド鎖の19番目の塩基をシトシンに改変することにより、天然mi-29c配列において切断部位の前にあるヌクレオチドを模倣し、対合が保たれるように他方の鎖上の対応する塩基を変更した。

20

#### 【0126】

強縮後の絶対（図13A）及び正規化比（図13B）の測定では、未治療mdx/utrn<sup>+</sup>/筋及びマイクロジストロフィン療法単独と比較して併用療法での筋力の増加が実証された（\*p<0.05）。次に筋肉を反復伸張性収縮後の筋力喪失に関して評価した。マウスをmiR-29c/マイクロジストロフィンで同時に、及びマイクロジストロフィン単独で治療すると、未治療mdx/utrn<sup>+</sup>/筋と比較して筋力喪失からの保護が示された（図13C）。筋線維（緑色）及びコラーゲン含有量（赤色）を実証する代表的シリウスレッド染色像を図13Dに示す。

30

#### 【0127】

注射12ヵ月後にGAS筋を分析して、シリウスレッド染色及び続くImageJによる定量化によりコラーゲン蓄積を評価した。シリウスレッド染色は、両方の治療コホートにおけるコラーゲン染色の減少を示す（図14A）。更なるアウトカムには、miR-29c及びコラーゲン転写物レベルが含まれた。qRT-PCRにより、治療コホートにおけるmiR-29c転写物レベルの増加が確認される（全群についてn=2~3匹）一元配置ANOVA（図14B）。

#### 【0128】

ピクロシリウスレッド染色によって観察されたコラーゲンの減少を更に検証するため、筋肉に関して半定量的qRT-PCRを実施して、Col1A、Col3A及びまた別のECM成分であるフィブロネクチン（Fbn）の転写物レベルを定量化した。qRT-PCR分析から、同時治療後のCol1A及びCol3Aの低下が見出された（図14C及び図14D）。この分析により、Fbnは同時治療コホートにおいてのみ有意に減少したことが明らかになった（図14E）。

40

#### 【0129】

TGF- $\beta$ 1は、以前、ジストロフィー筋において上方制御されることが示されており、線維化カスケードの惹起において役割を果たしている可能性がある。TGF- $\beta$ 1は、miR-29cを下方制御する既知の線維化促進サイトカインであり、コラーゲンの増加及び筋線維形成を伴う筋芽細胞から筋線維芽細胞への変換に関与する。qRT-PCR分析は、未注射の筋肉及びいずれか一方の治療単独と比較して同時治療した筋肉でTGF-

50

1 レベルが低かったことを示している ( 図 1 4 F )。

#### 【 0 1 3 0 】

A A V . C M V . m i R - 2 9 c / M H C K 7 . マイクロジストロフィン併用療法が筋線維直径に及ぼす効果もまた調べた。図 1 5 に示されるとおり、併用療法では線維直径が増加した。図 1 5 A 及び図 1 5 B は、M H C K 7 . マイクロジストロフィン治療後筋肉 g a s ( 腓腹筋 ) 重量が W T 又は未治療筋肉と比較して有意差を示さないが、一方、m i R - 2 9 c / マイクロジストロフィン併用治療は平均線維サイズの増加を実証したことを実証している。m d x / u t r n <sup>+</sup> / - 対照を m i R - 2 9 c / マイクロジストロフィン治療 m d x / u t r n <sup>+</sup> / - と比較すると、平均直径が 2 9 . 0 2 から 3 3 . 6 1 μ m に増加した ( n = 5 ~ 6 匹 / 群 )。図 1 5 C は、併用療法が m d x / u t r n <sup>+</sup> / - マウスにおいて野生型線維サイズ分布の方へのシフトを生じさせたことを実証している。図 1 5 D は、m i R - 2 9 c / マイクロジストロフィン併用治療における 1 m m <sup>2</sup> 当たりの筋線維の数について、未治療マウス又は W T マウスと差がなかったことを示している。

10

#### 【 0 1 3 1 】

抗線維化療法として r A A V . m i R - 2 9 c を使用した初期の結果からは、線維化の重要な寄与因子であるコラーゲンレベルの減少に伴い有益な効果があることが示唆される。更に、マイクロジストロフィンと併用して膜安定性を改善すると、m i R 2 9 上方制御が筋力を正常化した。

#### 【 0 1 3 2 】

##### 参考文献

20

- 1 . H o f f m a n , E . P . , B r o w n , R . H . , J r . & K u n k e l , L . M . D y s t r o p h i n : t h e p r o t e i n p r o d u c t o f t h e D u c h e n n e m u s c u l a r d y s t r o p h y l o c u s . C e l l 5 1 , 9 1 9 - 9 2 8 ( 1 9 8 7 ) .
- 2 . S t r a u b , V . & C a m p b e l l , K . P . M u s c u l a r d y s t r o p h i e s a n d t h e d y s t r o p h i n - g l y c o p r o t e i n c o m p l e x . C u r r O p i n N e u r o l 1 0 , 1 6 8 - 1 7 5 ( 1 9 9 7 ) .
- 3 . S a c c o , A . , e t a l . S h o r t t e l o m e r e s a n d s t e m c e l l e x h a u s t i o n m o d e l D u c h e n n e m u s c u l a r d y s t r o p h y i n m d x / m T R m i c e . C e l l 1 4 3 , 1 0 5 9 - 1 0 7 1 ( 2 0 1 0 ) .
- 4 . W a l l a c e , G . Q . & M c N a l l y , E . M . M e c h a n i s m s o f m u s c l e d e g e n e r a t i o n , r e g e n e r a t i o n , a n d r e p a i r i n t h e m u s c u l a r d y s t r o p h i e s . A n n u R e v P h y s i o l 7 1 , 3 7 - 5 7 ( 2 0 0 9 ) .
- 5 . Z h o u , L . & L u , H . T a r g e t i n g f i b r o s i s i n D u c h e n n e m u s c u l a r d y s t r o p h y . J N e u r o p a t h o l E x p N e u r o l 6 9 , 7 7 1 - 7 7 6 ( 2 0 1 0 ) .
- 6 . D e s g u e r r e , I . , e t a l . E n d o m y s i a l f i b r o s i s i n D u c h e n n e m u s c u l a r d y s t r o p h y : a m a r k e r o f p o o r o u t c o m e a s s o c i a t e d w i t h m a c r o p h a g e a l t e r n a t i v e a c t i v a t i o n . J N e u r o p a t h o l E x p N e u r o l 6 8 , 7 6 2 - 7 7 3 ( 2 0 0 9 ) .
- 7 . D i P r i m i o , N . , M c P h e e , S . W . & S a m u l s k i , R . J . A d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s f o r t h e t r e a t m e n t o f m u s c l e d i s e a s e s : t o w a r d c l i n i c a l t r i a l s . C u r r O p i n M o l T h e r 1 2 , 5 5 3 - 5 6 0 ( 2 0 1 0 ) .
- 8 . M e n d e l l , J . R . , e t a l . S u s t a i n e d a l p h a - s a r c o g l y c a n g e n e e x p r e s s i o n a f t e r g e n e t r a n s f e r i n l i m b - g i r d l e m u s c u l a r d y s t r o p h y , t y p

30

40

50

- e 2D. *Ann Neurol* 68, 629 - 638 (2010).
9. Mendell, J. R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* 66, 290 - 297 (2009).
10. Mendell, J. R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 192 - 201 (2015). 10
11. Carnwath, J. W. & Shotton, D. M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* 80, 39 - 54 (1987).
12. Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A. & Sloper, J. C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 53 - 70 (1988).
13. Cullen, M. J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 77, 69 - 81 (1988). 20
14. Dupont-Versteegden, E. E. & McCarter, R. J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 15, 1105 - 1110 (1992).
15. Stedman, H. H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536 - 539 (1991). 30
16. Deconinck, A. E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717 - 727 (1997).
17. Grady, R. M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729 - 738 (1997). 40
18. Love, D. R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55 - 58 (1989).
19. Tinsley, J. M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360, 591 - 593 (1992).
20. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4, 1441 - 1444 (1998).
21. Squire, S., et al. Prevention of patholo 50

gy in mdx mice by expression of utrophin: a analysis using an inducible transgenic expression system. Hum Mol Genet 11, 3333-3344 (2002).

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

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

10

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

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

20

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

27. Rodino-Klapac, L. R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. J Transl Med 5, 45 (2007).

30

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

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

40

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

31. Liu, M., et al. Adeno-associated virus-mediated micro-dystrophin expression prote

50

cts young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11, 245 - 256 (2005).

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

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

10

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

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

20

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

37. Rodino-Klapac, L.R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of translational medicine* 5, 45 (2007).

30

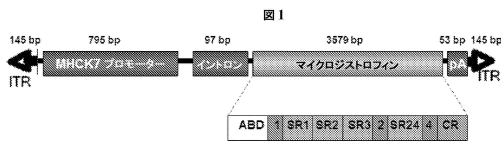
38. Bulfield et al., X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(4): 1189 - 1192.

39. Sicinski et al., The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989 30; 244(4912): 1578 - 80

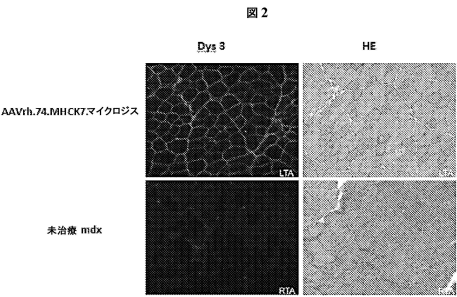
40

【図面】

【図 1】

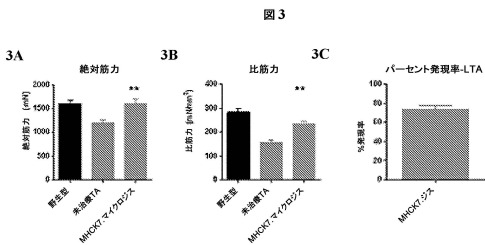


【図 2】

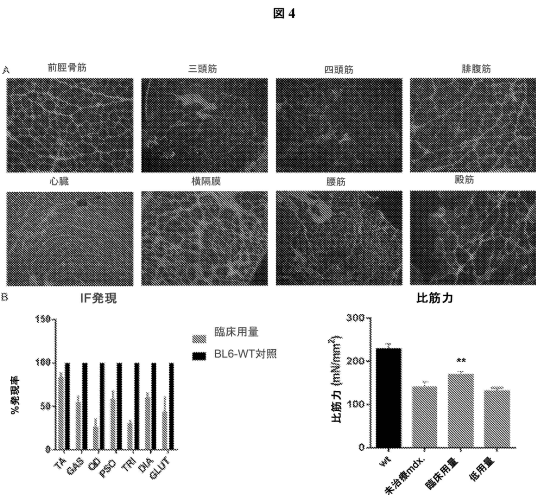


10

【図 3】



【図 4】



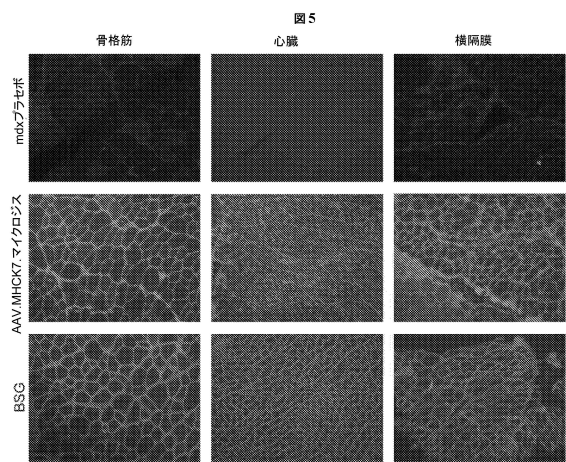
30

40

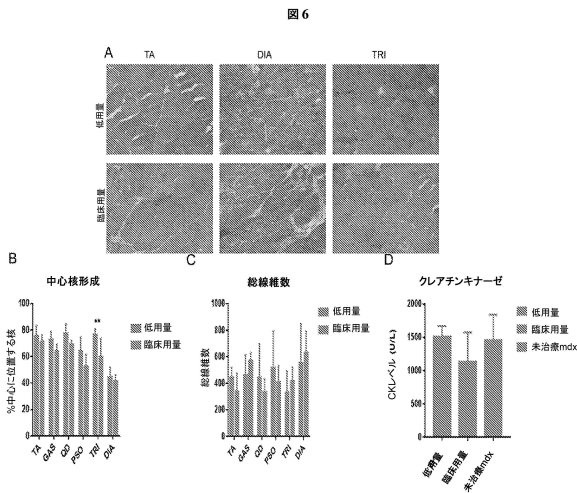
50



【 図 5 】



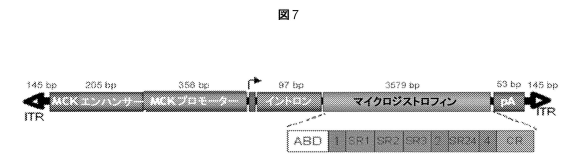
【 図 6 】



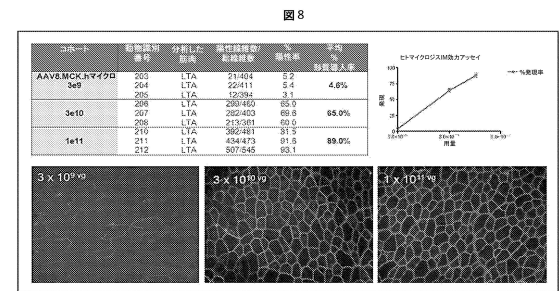
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】



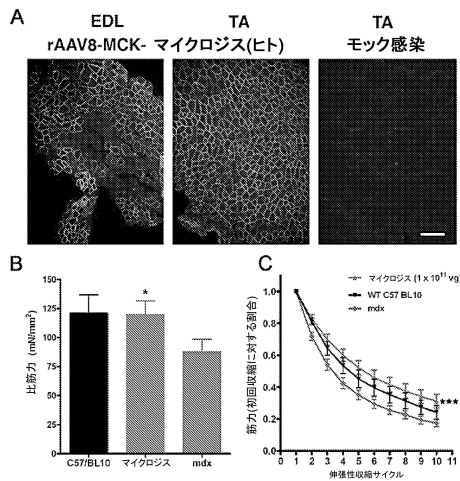
30

40

50

【 図 9 】

图 9



【 図 1 0 - 1 】

图 10

配列番号3

rAAVrh74.MHCK7.マイクロジストロフィン

主な特徴:

## MHCK7プロモーター

## キメライントロン配列

ヒトマイクロジストロフィン配列

ポリAテール

アンピシリン耐性

pBR322複製起点(origin or replication)を有するpGEXプラスミド骨格

[illegible]

10

20

【 図 1 0 - 2 】

ATGCTCGTAAGACACACATAGGCCACAGGGCCGAAATTTCAATGACGCTGGAAAGTGTGAAGGATCAATCTTCCAA  
CCTAGATGGCCATATATGATGAGCTGACAGCTCAGGAGGGCGCTGGCATCTCTCTCAGCTGGGCTCTCA  
ACACGATGGCCACGGGAATCAGTGGAGGACAGGCAAGAGTCAGGAGCATGAACTGCTGAACAG  
CCGCTGGGAATGTCTGAGAGTGTGCTAGTATGTGGAAAGCAGCTCAACCTGCACCGGGTGTGATGGACCTGCAG  
AACAGCAAAAGTGAAGAGCTGAAGCATGCTGTGACAAAGATGAGGAAGCAAGCAAGGAATGAGGAGAAGAG  
GCCATGGGACCGACCTGTGGAGGATCTGAAGAGACAAGTGTGCAGCAGATAAAGTGTCTGCAGGAGATCTGGA  
ACAGAGGACAGTGTGGGTAAGATCTCTGCACATATGTGTGGTGTGGACAGCAATCTAAGTGGAATGACCGA  
ACCGCGCTCTGGAGAGAACTGAAGTGTGCTGGGAGACAGGTGGGACCAAAATTTCCGGTGAGGACAGGAG  
ATGGTGGTGCTGTGCAGCAACTCTGCTGAATAGTGCAGAGCTGACCCAGAGCATGTCTTTTATGGT  
GGCTGAGCGAGAAAGAGGACCGCTGAACAAGATCCACACAACCGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTG  
TAGCTCTGCAGAAATGCTGCTGTGTGAGGCGATGTCTGGAAAAAGAGCAGAGCATGTGGCAACATGTATAG  
CTCGAAGAACGAGCTCTGAGCCACTGAGCAATGAAGCAAGAGCGTACCCAGCAAGACAGAGCGTGGCTGGATAGA  
TTTCCGCGCTGTGTCGAGCAACTGTGTGCAGAAATGAGGAAGAAATACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGAACCA  
AACCCGACTAGCTTGCAGCCACAGCAACGGTAGGAAACCGTGACCAACCTGACACAGGCGGAAACAGATCTGTG  
TGAAGATCTGCCGAGGAAGCTGCAACTGCAACTCTCCGAGAGGAAGAAATCACTTGAGCGCTGACCGAGCT  
GCAGAACCACTGACAGAACTGACCTGACCTGAGGACGAGGCGGAAGTCTAAGGGGCTTGGCAGCGTGT  
GGCGATCTGTGATTGATTCCTGTGAGGACCACTGGAAGAGGTGAAGGCTGTGAGAGGCGAAATGCTCCACT  
GAAGGAGGAAGTGATGATGAACCATTTGGCTAGACAGCTGACACAACTGGGCATCAAGCTGACGAGGATCA  
TAATGAGCACACTGGAGGACCTGAATACAGGTGGAAGCTGTGCAGTGCTGTGGAAGAGCCGGTGGG  
CGACTGATGAGGCGCCATCGGCACTCAGGACAGGACAGCAGCACTTTGTAGCACAACCTGTGCAGGGGCTGTG  
GGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAGGCGGCTCTATTAATCAGAGACAGCAACCTCTTGGGCACTGT  
TAAGATGACAGAACTGACCACTGCTGTGGGCTGTGCAAGCACTGAGGTTAGGCTTACGCTTACCGGCTCATAG  
CTGTGACGAGCTGCAAGAGGCTCTGTGCTGATGTCTGCTCTGTCCGCGCTGCAGTGCAGCTGATGATCA  
ATAATCTGAAGCAGAACATCAGCAACATGGATATCTGCAGATCTCAAACTGCTGACCACTATCTCAGCAGG  
CTGAGCAGGACGACCAACCAACTGGTGAAGATGCTCTTGTGGTGAATGTGCTTGAAGTGGTGTGTGTAAGCT  
GTATGACATCTGGGCGACGGCGGAGTCAAGTGCTGAGTTTGAAGATGGGAATTTCTCCGTGTGAAGCGCT  
CTAGTGGAGCAAGTACAGATGCTGTCTCAAGCAGGTGCTGATGAGCACTGGATTTTGTACCAAGCGCCGCTGT  
GGAATCTGTCTGATGATGATGATCAGATTTCTAGCAGACGCTGGAGAGGTGGCTAGTTTGCAGGAGATCTAACT  
CGAACCTGAGCTGGCAGCTTTTTCAGTTTGCAATAACAACTGAATCAGAGCTGTCTTCTCTGGATTG  
GTGCGCTGTGAAGACAGACAGCATGTGTGGTCTGTGTCTGTGCACAGAGTGTGCTGCCGCAACATGCGCAAG  
CACCAGGCTAAATGCAAACTGTGCAAGGAATGCTCCATTTCCGCTTCTGCTCAGGAAGTCTGAAACATTTTAAC  
TAGCATATTTTCCAGAGCTGCTTCTTTCTGGGAAGATGTGCCAACAGGACACAGTGCATCACTTATGGTGGTA  
ATATGGAACCTCAACTCATCTGGCAAGATGTGCGGATTTTGCCAAAGCTGTGAAGAATAGTTTGGGATCA  
AGAGTGTCTTGGCAACACCCCCGATGGGATGTCTGTAATGCTGCAGACAGTCTGGAAGAGACAAATGTGA  
GACGCTACAATGTGAGCGCGCAATGAAGATCTCTGTTTATGATAGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
GAGATGTGTGCTGAGTGAATAGTCATGAGGCGTATCATTAACAGGAACCCCTAGTAGGAGGTGTGGC  
ATCTCCTCTCTGCTGCTGCTGCTACTGAGGCGTGGCGCAAGAGTGGCGACCGCTGGGCTGCTGCCGG  
CGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGGCACTGGGTAATAGCGAAGAGCGCCGACCGATGCGCTTCTTCCAA  
ATGTTGCGGCACTGAATGGCGAATGGAAGTTGCAGAGATGTAGCGTCAAGATAGGTAATTTTCATGAGCGTTT  
TCTTCGTTGCAATGGTGGCGGTAATTTCTTGGAATATACCAAGCAAGCGCAATGTGAGTTTCTTCTACTCAG  
CGAAGTGAATTTATTAATCAAGAAGATTTGGACACAGAGTTTATTTGGTGATGGCAGCATCTTACTCG  
GTGCGTCACTGATTAATAAACCACTTCAGGATTTGGGTCAGGCTTCTTGTCTTAAATCTTCTTAATCGGCT

【 図 1 0 - 3 】

CTGTTT AGCTCCGCTCTGATTCTAAGCGAAGAAAGCAAGCTTACGTGCTGCTCAAGACGAGCAATGATGACGGCCG  
TTAGCGCGCGCACTTAAGCGCGCGCGGCTGTGTGGTACGCGAGCGAGCTGACCTGACCTGCGGCGGAGC  
GCGCCGCTCTCTGCTTCTTCTCTCTCTTCTGCGCAAGCTGCGCGAGTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGAGGCG  
CCCTTAGGGTGGCTGATTAGTATTGAGTTACGCGCACTCGAACCGCAAAAACCTGATTAGTAGGATGGTTCTACGATAG  
GGGCGCATCCGCTGATAGACGGCTTTTGGCCCTTGACGTTGGAGTCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCCCA  
AGCTGGAACCAACTCAACCTACTCCGCTCTGCTTTGATTGATTATAGGAAGGATTTGGCAATTTAGGATTTGGTT  
AAAAAATGAGCTGATTAACAAAAAATTAACCGGAATTTAAACAAAATTAAGCTTACAAATTAATTAATTTGCTCT  
ATACAATCTCTGTTTGGGGCTTTCTGATTACAAACGGGGTACATATGTTGACATGCTAGTTTACGATTAC  
GCTTACGATGTTCTGCTGCTCGACAGTCTCAGGCAATGACCTGATAGCTTTCTAGAGAGACTCTCAAAAATAG  
CTACCTCTCCGTCGAATTTATCAGTAGAAGCGTTGAATATAGCTATGATGGTTTACTGCTCTCGCGGCT  
TCTACCGGTTGAATCTTACTACCACTACTCAGCAATGATCTTAAATATATGATGAGGTTCTAAAAATTTTAT  
CTTCGTTGAAATAAAGGCTCTCCGCAAAAGTATACAGGCTATAGGATTTGGTTGTCACACAGATTAGGCT  
ATGCTCGAGGCTCTGCTGCTAAATTTGCTAAATCTTTCGCTTGGCTGATGATTGATTGGATTTGGAAGTCTGT  
ATGGCGGTTTCTCTTACCGCTCTGCGGTAATGACACCGGATATGGTGACCTCTGACATACTCTCTCTGAT  
GCGCATAGTTAAGCAGCCCTCGACACCGCGCAACCGCGTACGCGGCTCGAGCGGCTGTTCTGCTCGCGCAT  
CGGCTACAGACAAGCTGTACGCTCTCCGGAGCGTCGATGTTCAGTATGATGCTCTACCTCATCAACGAAGCGAG  
GAGCAATAAAGGCGCTGTTGATACGCTTATTTATAGGATTTGATCAGATAAATAGGTTTCTTGACGATCAGG  
GGACCTTTCCGGGAAATGTCGGCGCAAGCCCTATTTGTTTATTTCTAAATCAATCAAAATAGCTCCGCTCAT  
GAGCAATAACATCTGATAATGCTCTAAATAATTTGAAAGAAAGGAAGTATGAGTATCAAGTTTCGGTGCGGC  
CTTATTCCTTTTTCGGGCATTTTGCTTCTGTTTGGTCAACCGAAGACGCTGGTGAAGTAAGAAAGATGCTGA  
GATCATTTGGGTGCGAGAGTGGTTACATGCAAGCTGGATCTCAACGCGCGTAAGATCTTGAGAGTTTTCGCC  
GAAGAAGCTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTCGCGGCTATTTCCGCTATGAGCGCGGG  
AAGACAGCACTCCGTTCCGCGTACACTACTTTTCAGATAGTCTTGGTGATGATCAACAGTCAACGACAAAAGCAT  
TACGAGTGGTCACTGATGATAAGAAATATGCGAGTCTGCCATAAGCTGATGATGATGATCACTTCGGCGCACTTCT  
CTGACACGATCGGAGGACGAAGGAGCTAACCGTTTTTGCACATAGGGGATCATGTAATCGCTTAT  
CTTGGGAACCGGAGCTGAATGAGCACTATCAACCAAGCAGAGCTGACACCGATGCTGATGATGATGCAAC  
AAGCTTTCGCGAAACTATGATGGGCAACTTCTGATGCTTCGGCGCAACATTAATAGATGGATGGAGGCG  
GATAAGTTTCGAGGACCACTCTTCGCTCGCGGCTTCGGCTGGCTGTTTATGTCGATAAATCTGGAGCGGTG  
AGCTGGGCTTCTGGGATATCTGACGACTCGGGGCAAGGATGAGCGCTTTCGAGTATGATGATTCTACAGCA  
GGGGATCAGGCACTATGATGATGACGAATATAGAGATGATGCTGAGATAGAGTCTTCTCACTGATTAAGCTAT  
AGCTGACAGCAAGTTGATCATATATCTTAGATGATTGTTAAACCTGTTTAAATTTAAAGCTATAGGTGA  
AGATCTTTTGTAAATCTCATGACAAAACCTTACAGCTGAGTTTCTGTCCACTGAGCGTCAGAGCCCTAGGAA  
AAGATCAAAAGGATCTTGTAGATCTCTTCTTTCGCGGTAATCTGCTGCTGCAAAACCAAGAACCGCGTACC  
ACGGTGGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGTCAACCACTTTTCCGAAGAGCACTGGCTTCAAGAGAGCGAGGCG  
CAAAATGATGCTCTTGTAGTGAAGCGGTAGTGGCCAACTCTCAAGAACTCTGTAGACAGCAAGCACTACTCTG  
TCTGTAATCTCTTACCAAGTGGCTGTCGAGTGGCAAGTGGCTGTCTACCGGGTGGGACTGACAGCATAG  
TTACCGGATAAGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA  
CACCGAAGTGAGATCACTGATCTGAGTATGTGAAGAAGCGACGCTCCGGAAGGGAGAAAGCGGACGAGT  
ACCTGATAGCGCGAGGCTGCGAAGCAGAGAGCGACGAGGAGGATCCAGGGAGAAACCGCTGGTATCTTAT  
AGTCTCTCGGGTTTCCGCACTCTGACTGATGAGCTGATTTTGATGCTGCTGACAGTGGGCGGAGCTATGGA  
AAAGCGCTGACCAACCGCGGCTTTACGGTTCTTGGCTTCTTGGCTGCTTCTGACATGTTCTCTGCTGTTT

30

40

【 図 1 0 - 4 】

CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGC  
GCAGCGAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

【 図 1 1 - 1 】

图 11

配列番号5

rAAVrh74.MCK. マイクロジストロフィン

主な特徴:  
MCKプロモーター  
キメライントロン配列  
ヒトコドン最適化マイクロジストロフィン配列 -  
ポリAテール

アンピシリン耐性  
pBR322複製起点(origin or replication)を有するpGEXプラスミド骨格

GCCCAATACGCAAAACCGCTCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAACGACGTGGCGCGTCGCTCGCTCACTGA  
 GGCCCGCCGGGCAACCGCGGGCTGGCGGCACCTTTGGTCGCGCGGCTCATGTCGAGCGAGCGAGCGCGACGA  
 GAGGGAGTGAAGCACTTCATCACTAGGGGTTCTGTGATGAATGATTAACCGGCACTCAATTAATCATGAGCA  
 CATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAAGGAGGCAAGCGCTGGGACACCCGAGATGCTTG  
 GTTATATAATCAACGACAGATGTGGTGCTCCCCCCCCCAACCTTATGCTAGAGCTACCCCCACCCCGGTGGC  
 TGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGGGAAGCTGCTCTAATAATAACCTCTCTCTGTGGGCTGTGGGGGCT  
 CTAGAGGCGAGCTGTAAACAGGCTGTGGGGGACAGGGTTATACGTTGCTGGAGGCTCAAAAGATTATCTATTCCA  
 TGTTCCGGGCGAAGGGGCGAGCTGTCCCCCGGCGAGTGAAGCTCAGCACTTATTAGGAACCATGAGCAAGTCAG  
 CTCTTGGGGGACGCCATCAAAAGGCTACGGGCTGGGCAAGTGTACAGTCTGGGTCTGGGCTGGGACAGGTGCC  
 GGGCAAGAGCTGAAGAGTCACTTGCTCTCAGGGGCGGCTCTGGGGAGCAAGGCTCTTGCTGAGTCAACAGCT  
 GTAGGCTCTCTATATAACCGAGGGGACAGGGGCTGCCCCGGGTACACCACCTCCACGACGACAGACAGACA  
 CTAGAAGCAGCCGACCTCAGTGAATGTAGTCTCTTCTTACTTCTAGGTCGGGATCTCTGCTGGTGTGTCGAA  
 TCAAGAGTGGCTGCTCAGTGGAGTTGGCTCTTACTTCTAGGCTGTACAGGCTGTTACTCTCTCTAAAGAGT  
 CGGAATTTGTACCCGCGCGCCAGCCACTCTGTGTGTGGGAGAGGTGGAGAGTTGTTATGAAGGGAGGACAGCTG  
 CAGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTAGTTCAGCAAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTT  
 TTGCCAGCTCAGAGTGGGACAGCGCTGTGAACCTGTGAACAGGCTGAGTGTCGGCAGAGCTGCCAAAGTG  
 AAGGGGACAGCTAAGGTGTCACGCCCTGACAGCTGTGAACAACTGTGAGAGTGCTGAGAACCAACCAAGTG  
 GATCTGTTGAATTTGGCAGTACTGATATCTGTGACGGGAACCAAACTGACATCGGCTGATCTGGAACAT  
 TATTCTCTGACGTGCGAGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCTGCGACGACCACTTCTACGAGAG  
 ATCTCTGCTCTGTGGTGGCGGACAGACCCCAACTCTCCCGAGTGGAACGTGATTAACCTCACTCACTGAG  
 AGCAGCGGGCTGGCCCTGAAGATGCTGATCAACGACCAACAGCGCTGATCTGTGAGCTGAATAGCTGGTGTG

10

20

【 図 1 1 - 2 】

[illegible]

【 図 1 1 - 3 】

[illegible]

30

40

【図 1 1 - 4】

GTGACCGTCTCCGGGAGCTGCTAGTGTGTGACAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCCTC  
GTGATACGCTATTTTATAGTTTAAATGTCATGATAAATAGTGTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA  
TGTGCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCTAAATACATCAAAATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATA  
AATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATGAGTATTCACATTTCCGTTGTCGCTTATCCCTTTTTGCGG  
CATTTTGGCTTCTGTTTGTGTCACCCGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACG  
AGTGGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGTAAAGATCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCAATG  
ATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCGCTATTACGCGCGGCAAGAGCAATCGTCCGC  
GCATACACTATTCTAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGT  
AAGAGAATTATGACGTGCGCATACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATTACTTCTGACACGATCGSAGG  
ACCGAAGGAGCTACCGCTTTTGTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGATCGTTGGGAACCGAGCT  
GAATGAAGCACTACCAACAGCAGCGGTGACACACGATGCTGTAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATT  
AATGCGGAACACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGAGGCGGATAAAGTTGACAGGAC  
ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGG  
ATCATTTGACGACTGGGCGGAGATGGTAAGCCCTCCGCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACT  
ATGGATGAACGAATAGACAGATCGTGAATAGTGCCCTACTGATTAGCATTTGTAAGCTGTAGCAACAGT  
TACTCATATATACTTTAGATTGATTAAACTTCATTTTAAATTAAGAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAAT  
CTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTCTGCTTCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAGGACTT  
CTTGAGCTCTTTTTCTCGCGGCTATTCTGCTGCTTGTGCAACAAAAAACACCGCTACCGCGGTGTGTTGTTG  
CTGGATCAAGAGCTACCACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAAGACGAGCGAGATACCAATCTGCTCTTC  
TAGTTAGCGCTAGTTAGCGCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTGCTCTGCTAATCTGTGTA  
CCAGTGGCTGCTGCGAGTGGCATAGTCTGTCTACCGGGTTGAGTCAAGACGATGATACCGGATAAGGCG  
CAGCGGCTGGGCTGAACCGGCGATTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGCTTACACGGAATGAGATG  
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCA  
GGGTCGGAACGAGGAGCGCAGCAGGAGGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGCTCGGGTT  
CGCCCACTCTGACTTGAGCTCGAATTTTGTGATGCTGTCAGGGGGGCGAGCCATGGAAGAAAGCGCAGCAAC  
CGCGCTCTTTTACGCTTCTCGGCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCACTGTTCTTCTGCGCTATCCCTGATTTCTGTG  
GATAACGTTATACCGGGTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCGCAGCGCAACGACCGAGCGAGCGAGTCACTG  
AGCGACCAAGCGGAAGAC

【図 1 2 - 1】

図 12

pAAV.CMV.miR29C配列(配列番号6)

主な特徴:

CMVプロモーター: 120-526

Ef1αプロモーター: 927-1887, 1380-1854

miR-29c: 1257-1284

一斉シード配列を有するshRNA-miR29-c: 1088-1375

ポリA: 1896-2091

CAGCAGCTGCGCGCTCGCTGCTCACTGAGCGCGCGCGGCAAGCCGGCGTGGGCGACCTTTGGTGGCCCG  
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGGCAAGAGGAGTGGGTTAACTCGTTACATAACTACGGTAATGGCCCG  
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCTTACGCTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCGAATAGGGA  
CTTTCCATTGACGCTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC  
AAGTACGCCCTTATGACGTCAATGACGCTAAATGGCCGCTGACATTTGCCAGTACATGACCTTATGGGAC  
TTTCTACTTGGCAGTACATGAGTATGATGCTGCTATTAACATGATGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGG  
GCGTGGATGACGGTTGATCTACGGGATTTTCAAGTCTCACCCCAATGACGCTCAATGGGAGTTGTTTGGCAC  
CAAACTAACCGGAGCTTTCCAAATGTGTAACAACTCGCCCAATGACGCAAAATGGGCGGTAGCGGTGTACGG  
TGGGAGGTATATAAGCAGAGCTGTTTATGTAACCGTCAAGTCCGTGAGAGCGCATCCACGCTGTTTACGCC  
TCCATAGAACACACCGGACCGATCCAGCTCCGAGCTACGAGATCCGCTACTCAGGAACGTAAGAAACGAGA  
AAGTTAACTGGTAAGTTAGTCTTTTGTCTTTTATTCAGGTCGCGGATCGGTGGTGGTCAAAATCAAGAACTG  
CTCCTCAGTGGATGTTGCTTACTTACTTACGCTGACGGAAGTGTACTCTGCTCAAAAGCTGCGGAATGTGAC  
CGGGGCGGATCCACGGCTCTTTTCCGCAACGGGTTTCCGCGCAGAAACAGSAAAGTGGCTGTGTGTTCCCG  
CGGCGCGGACGCGGGGCGGCTGCTGCTCCAGCGCACATGTTCCGCGAGCGGGGCTGCGAGCGCGCGCCACCGAG  
AATCGAGCGGGGAGTCTCAAGCTGGCGGCCCTGTTGAATGAGGCTCTGAGTCTTACAGAAATCGTTGCTGCTG  
ACATCTGGAAACACTTCTGGGATTAATCTTCCAGTGTAAACCAACGAAAGCTCGAGAAGTATGATTCGCTGT  
GACAGTGAGCGCAACCGATTTCAATGTGCTGATAGATGAAGCGACAGATCTAGACCACTTTGAAATCGGTTA  
TGCTCATCTCGGAATTCAGGGGCTCTTATGAGGCAATTAATCTTGTACTTAAACCTGGAATCTGCTATC  
TCTTGATCATTTGGCGCGCTGCTCTGCTGCTGCGCTCGCGCGCGCTGATCTGCGCCGCTGCGGCGGAG  
GCTGCGCGGCTCGGACACGTTTGGCTGAGCGGAAAGATGCGCGCTTCCGCGCGCTGCTGCGAGGAGCTCAAAAT  
GGAGGACGCGCGCTCGGAGAGCGGGGCGGTGAGTCAACCAACGAAAGAAAGGCGCTTTCCGCTCTACGC  
CGTGGCTTATGAGTCAACGAGTACCGGGCGCGCTGAGGACCTCGATTAGTTCTGAGCTTTTGGAGTACG  
TCTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGAGTTTCCCAACCTGAGTGGGTGGAGAGTGAAGTTAGG  
CCAGTCTGGCACTTGAATGATTTCTTGGAAATTTGCGCTTTTGAATTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATCTCAAGCTCAG  
ACAGTGGTCAAGATTTTCTTCCATTTTCAAGTGTGCTGGAAGAGCTAGGCTACCGGACCTGAGTCTGAGCTCA  
AGCTCGGGGATCGAGCATGATAAGATACATGATGATGTTTGGCAAAACCAACCACTGAGTGAAGTGAAGTGA  
TGTCTTATTTGAAATTTGATGCTGATTTGCTTTATTTGATCACTATAGCTGCAATTAACCAAGTTAACAACAA  
CAATTTGATCTTATTTATTTGTTTTCAGGTTTTCAGGGGAGGTTTGGGAGGTTTTTCTACTAGTACATGGCTAGAT  
AAGTACATGGCGGTTAATCATTAACCAAGGAAACCTGATGAGGATTTGGCAGCTCCCTCTCTGCGCGCTC  
GCTGCTCACTGAGCGCGGGGACCAAGGTCGCCGACCGCGGCTTTCCGCGGCGGCTCACTGAGGCGAG  
CGAGCGCGCGAGTGGCGTAAAGCAAGGAGCGCGCGACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGAGCGCTGAATGG  
CGAATGGATTTCAAGCATGAGCTCAAAATGAGGATTTTCCATGAGCGTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCG  
GTAATATTGTTCTGATATTACCGCAAGGCCGATAGTTGAGTTCTTCTACTAGGCAAGTGTATTTACTAAT  
CAAGAAGATTTGCGCAACGTTAATTTGCGTATGGACAGACTTTTACTCGTGGCTCACTGATATAAA

10

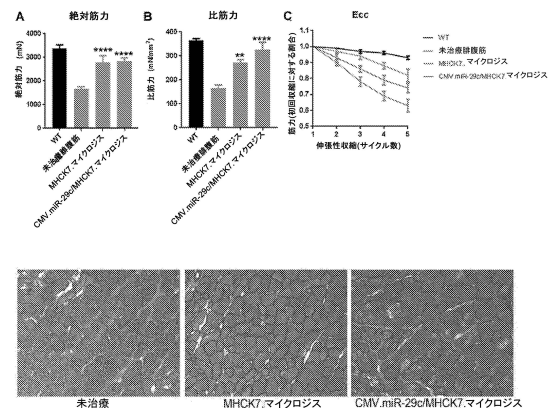
20

【図 1 2 - 2】

ACACTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCTGCTCAAAATCCCTTAAATCGGCTCTGTTAGCTCCGCTCTGATT  
CTAACGAGGAAGACAGCTTATACGTGCTGCTCAAGCAAC  
CATAGTACCGCGCTTGAAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGTTACGCGCAGCGTACGCTACACTG  
CAGCGGCCCTAGCGCCGCTCTTCTGCTTCTTCCCTCTTCTGCGCACGTTTCCGCGGCTTCCCGCTCAAGCTGT  
AAATCGGGGCTCCCTTATAGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACTCGACCCCAAAACCTGATTAAGTGTAT  
GGTTTACGATGTGGGCGATCGCCGTATAGAGCGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTCTTAAATAGTG  
GACTCTTGTTCAAACTGGGAACACACTACCGCTATCTGCTGCTATCTTTGATTATAAGGATTTCCGCAATT  
CGGCTATTGTTTAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAATTAACCGGAATTTAAACAAAATTAAGGTTTACAAT  
TAAATATTCTTCAACTCTCTCGTTTGTGGGCTTTCTGATTAACCGGGGTACATATGATGACATGCTA  
GTTTACGATACCGGTCATCGATCTCTGTTGCTCCGAGTCTCAGGCAATGACCTGATAGCTTTGATAGAGAC  
TCTCAAAATAGCTACCTCTCCGCGATGCTTACGCTAGAGCGTGAATATCAATTTGATGGTATTTGACT  
GTCTCGGCGCTTCTACCGGTTTGAATCTTAACTACACATTAACGAGTTCGATTTAAATATATAGGGTCT  
AAAAATTTTATCTGCTGCTTGAATTAAGGCTTCTCCGCAAAAGTATTACAGGCTGATAATGTTTGGTACAC  
CGATTTAGCTTTAGCTCTGAGGCTTATGCTTAAATTTGCTAATTTTGCCTTGTCTGTATGATTTATGATGTT  
GGAATCTGAGTGGTATTTCTTCTTACGCTCTGCGGTATTTACACCGCATGCTGACACTCTCASTACAA  
TCTGCTCTGATGCGGATAGTTAAGCAGCCCGACACCGCGCAACCGCGCTGACGCGGCTGACGCGGCTGCT  
GCTCCGCGCATCGCTTACAGCAAGCTGTGACGCTCTCCGGAAGTGTGATGTCAGAGGTTTTCACGCTATCA  
CGAAGCGCGGAGCAGAAAGGCGCTGATGACGCTATTTTATAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTCTT  
AGAGCTCAGGTGGCACTTTCCGGGAAATGTCGCGGAAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATCAAAATG  
TATCGCTCATGAGACATAAACCTGATAAATGCTCAATAATTTGAAAAGGAAGATGAGTATTCAACATT  
TCGCTGTCGCTTATTTCCCTTTTTCGCGCATTTTGCCTCTCTGTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAA  
AAGATCTGAGATGAGTGGTGGTGACGAGTGGGTGATCATGAACTGATCTCAACAGCGGTAAAGTCTTGAGA  
GTTTTCGCGCGCAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTTGGCGCGGTATTATCCGTTAT  
GACCGCGGCAAGGCACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTACAGCTCACA  
GAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATATGCAAGTGTGCCATTAACATGATGATAACACTGGG  
GCCAATCTTCTGACACAGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACATGGGGGATCTGACT  
CTGCGCTTGTGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCAATACCAACGAGCAGCGCTGACACACGATGCTGTA  
GCAATGGCAACACGTTGCGCAACATTAATGCTGGCAACTACTTACTGAGCTTCCGCGCAACATTAATGAGCT  
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCTCGGCTGGCTGGTTTATTTGCTGATAAAT  
CTGGAGCGGCTGAGCGTGGCTGCGGTTATTTGACGACTGGGGGCAAGTGTAAAGCCCTCCGCTATGCTAG  
TTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGA  
TTAAGCATTTGTAAGTCTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAACCTTCAATTTTAAATTA  
GGATCTAGTGAAGATCTTTTGAATACTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCA  
GACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCTTTTCTGCGCGTAACTGCTGCTTGGCAACAAAAA  
ACACCGCTACCGCGGTTGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC  
AGAGCGCAGATACCAATATCTGCTCTAGTTGAGCGTATGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG  
CTACATACCTGCTCTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGGTGTCTTACCGGGT  
CTGCAAGACGATGTTACCGGATAAGCGGACGCGTGGGCTGAACGGGGGTTGTTGTCACACAGCCGATCTGG  
AGCGCAAGCACTACCGCACTGAGTACTACAGCTGAGTACTGAGAAAGCGCCAGCTTCCGGAAGGAGGA  
AAGCGGACAGGATATCGGTAAGCGGAGGTTGGAAAGGAGGAGCGACGAGGAGCTTCCAGGGGGAAC  
GCGTGTATCTTATAGTCTGCTGGGTTTTCGCCACTCTGACTTGAGCGTGAATTTTGTGATGCTGCTGAGGGG  
GCGGAGCTATGAAAAACGCGACGCGGCTTTTACGTTCTGCGCTTTTGTGCTGGCTTTTGTCTCAGT  
TTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTTGATTAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCGCAG  
CGAAGACCGAGCGCAGGAGTCACTGAGCGAGGAGGAGCGGAAAGCGCCCAATACGCAACCGCTCTCCCG  
CGGTTGGCGATTTCAATAG

【図 1 3】

図 13

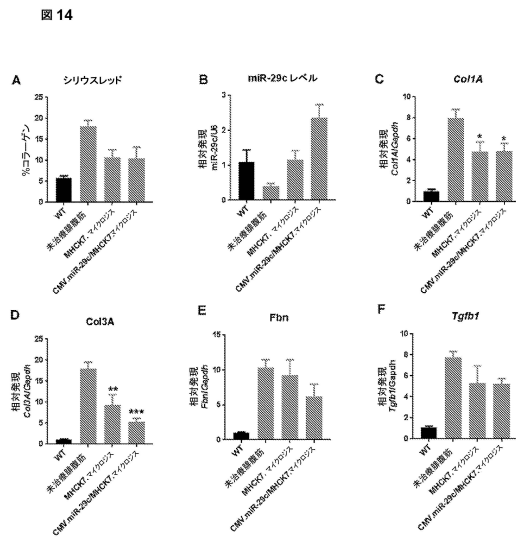


30

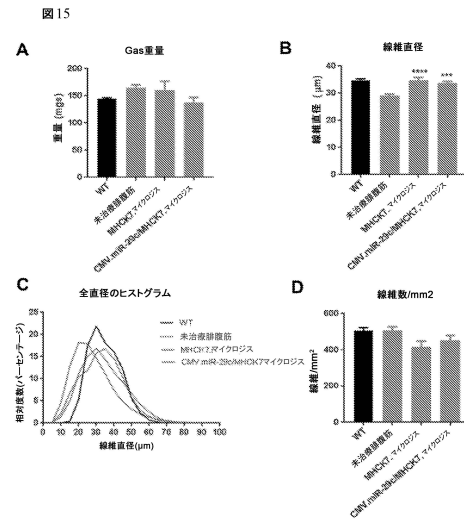
40

50

【図 14】



【図 15】



【配列表】

0007213238000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	38/39	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
		C 0 7 K	14/47	

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ロディノ - カラパック , ルーズ

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 1 2 5 , イー . グローブポート , ビックスビー リッジ ドライブ 4 9 1 2

(72)発明者 メンデル , ジェリー アール .

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 3 5 , コロンバス , コッパーフィールド ドライブ 8 1 7 6

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 JCI Insight. 20170504; 2(9): e93309, doi: 10.1172/jci.insight.93309

Mol Ther. 2007 Feb;15(2):320-9. doi: 10.1038/sj.mt.6300027

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K、A 6 1 P、C 1 2 N、C 0 7 K

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

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