

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7338970号

(P7338970)

(45)発行日 令和5年9月5日(2023.9.5)

(24)登録日 令和5年8月28日(2023.8.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

Z N A

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 38/45 (2006.01)

A 6 1 K 38/45

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 3/06

請求項の数 8 (全26頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-513504(P2018-513504)

(86)(22)出願日 平成28年9月16日(2016.9.16)

(65)公表番号 特表2018-527365(P2018-527365
A)

(43)公表日 平成30年9月20日(2018.9.20)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/052051

(87)国際公開番号 WO2017/049031

(87)国際公開日 平成29年3月23日(2017.3.23)

審査請求日 令和1年7月18日(2019.7.18)

審査番号 不服2021-15028(P2021-15028/J
1)

審査請求日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(31)優先権主張番号 62/220,107

(32)優先日 平成27年9月17日(2015.9.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(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】 G A L G T 2 遺伝子治療のための方法および物質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2 のヌクレオチド 5 3 - 2 7 6 2 からなる核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V)。

【請求項 2】

感染性である、請求項 1 に記載の核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V)。

【請求項 3】

血清型 A A V - 1、A A V - 2、A A V - 3、A A V - 4、A A V - 5、A A V - 6、
A A V - 7、A A V - 8、A A V - 9、A A V - 10、A A V - 11 または A A V r h . 7 4 である、請求項 1 または 2 に記載の r A A V。

10

【請求項 4】

前記 r A A V のゲノムにおける A A V D N A が、A A V r h . 7 4 由来である、請求項 1 または 2 に記載の r A A V。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の r A A V、および薬学的に許容されるキャリアーを含む組成物。

【請求項 6】

神経筋障害を罹患したまたはそのリスクのある対象者において神経筋障害を治療または防止するように製剤化されている、請求項 5 に記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記神経筋障害が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー筋ジストロフィー、先天型筋ジストロフィー（MDC）1A、1B、1Cおよび1D、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）1A、1B、1C、1D、1E、1F、1G、1H、2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2L、2M、2N、2Oおよび2Q、ベスレムミオパチー、ウーリッヒ先天型筋ジストロフィー、筋・眼・脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、ウォーカー・ワールブルク症候群、筋硬直性ジストロフィー、筋無力症症候群、先天型筋無力症、封入体ミオパチー、封入体筋炎、エメリー・ドレフュス型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、皮膚筋炎、中心核ミオパチー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、三好型ミオパチー、ミトコンドリアミオパチー、ネマリ

10

【請求項 8】

i) 筋肉内（IM）投与、分離式患肢注入もしくは分離式患肢灌流（ILP）投与、または静脈内（IV）投与のために製剤化されている、

ii) IM投与のために製剤化されている、

iii) IM投与のために製剤化されており、かつ約 3×10^{11} ~ 少なくとも約 5×10^{12} v g / 注射の前記 rAAV の用量を含む、

iv) 注入もしくはILP投与のために製剤化されている、

v) 注入もしくはILP投与のために製剤化されており、かつ約 2×10^{12} ~ 少なくとも約 4.8×10^{13} v g / kg / 肢の前記 rAAV の用量、または約 4×10^{12} ~ 少なくとも約 9.6×10^{13} の総用量を含む、

20

vi) IV投与のために製剤化されている、

vii) IV投与のために製剤化されており、かつ約 2×10^{14} ~ 少なくとも約 6×10^{15} v g / kg の前記 rAAV の用量を含む、あるいは

viii) 約 5×10^{13} v g / kg ~ 約 5×10^{15} v g / kg の前記 rAAV の用量を含む、

請求項 5 ~ 7 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】

30

【0001】

合衆国政府の権益に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所による表彰（U54 NS055959およびR01 AR049722）を受け、政府の助成によりなされた。政府は、本発明の一定の権利を有する。

【0002】

配列表の参照

本出願は、開示の別部分として、コンピュータ可読の配列表（ファイル名：49885 PCT_SeqListing.txt; 14,467 bytes - ASCII text file; 2016年9月15日作成）を含んでおり、この全体が本明細書に参照として組み込まれる。

40

【0003】

本開示は、GALGT2ポリヌクレオチドの組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）送達に関する。該開示は、rAAVおよび神経筋障害へのGALGT2遺伝子治療にrAAVを用いる方法を提供する。神経筋障害の例としては、それらに限定されるものではないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、先天型筋ジストロフィー1A、肢帯型筋ジストロフィー2Dがある。

【背景技術】

【0004】

筋ジストロフィー（MD）は、遺伝子病群に入る。該群は、動きを制御する骨格筋の進行性脆弱化および変性によって特徴づけられる。MDのいくつかの型は、幼児期または児

50

童期に発症するが、一方で他の型は、中年期またはその後になるまで出現しないこともある。障害は、筋力低下の分布や範囲（MDのいくつかの型は、心筋にも影響する）、発症年齢、進行の速さ、および遺伝様式の点で異なっている。

【0005】

MDのタイプの一つはデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）である。これは、新生男児5000人に1人に影響を及ぼす、もっとも一般的で深刻な児童期の筋ジストロフィーの形である。X-染色体の劣性遺伝に従う遺伝的性質である。DMDは、骨格筋や心筋また同様に消化管や網膜におけるジストロフィンタンパク質（427kDa）の非存在につながるDMD遺伝子の突然変異によって引き起こされる。ジストロフィンは、筋細胞膜を奇形な収縮から保護するばかりでなく、筋細胞膜に近接している多くの情報伝達タンパク質をつなぎとめている。DMDの臨床症状は、通常、典型的には診断検査へとつながる異常歩行と運動機能低下を伴い、3歳から5歳までの間に初めに気付かれる。DMDは、絶え間なく進行し、12歳までには歩行運動を失う。歴史的に、患者は、20歳代後半に呼吸器系合併症により死亡していたが、支持療法の改善により、特に夜間の換気補助の賢明なる使用により、10年ほど余命が伸びている。寿命の延びは、遅延された心筋症の合併症を伴った全面的な心機能低下を明らかにすることになった。このことが、更なる臨床的挑戦とこれまでには存在しなかった認知と医学的介入の必要性をもたらした。DMDは非進行認知機能障害も伴う。DMDに対する何百もの臨床的試みにも拘らず、依然としてコルチコステロイドによる処置が、一貫して有効性を示す唯一の処置のままとなっている。DMDに対する現行標準治療は、かなりの副作用を伴って歩行運動を数年間延長することができるものではあるが、プレドニゾンまたはデフラザコルトの使用を含んでおり、また生存に与える何らかの効果についての証拠は限定的である。

【0006】

MDの別の型は、先天型筋ジストロフィー1A（MCD1A）である。MCD1Aは、緊張低下、筋力低下、および筋消耗によって特徴づけられ、生誕時または幼児期に発症する神経筋障害群に属する。MCD1Aは、地域差はあるが、先天性筋ジストロフィーの30～40%にあたる。罹患率は1/30000と見積もられる。病理は、生誕時または生涯の初めの数か月に、手足および体幹の緊張低下および筋力低下を伴って現れる。呼吸器および採食障害も起こり得る。運動技能発が遅れまた限定される（手助けによって立ち、座りのみが可能である）。乳幼児は、早期の脊椎硬直、脊椎側弯症、および呼吸不全を示す。典型的な伸びた筋障害性顔貌となる顔症状があり、眼の眼筋麻痺がその後現われ得る。対象者の1/3以下ではあるが、てんかん発作が起こる可能性がある。知的発達は正常である。MCD1Aはラミニン-2鎖をコードするLAMA2遺伝子の突然変異によって引き起こされる。遺伝は、常染色体劣性である。現行の治療は、対処療法である。これは、理学療法士、作業療法士、および言語士を含む集学的取組から成り、各対象者の能力を最適化させるのを目的とする。発作や他の神経学的合併症は、特別な治療を要する。MCD1Aの予後については、感染した児童の多くは青年期に達することがないほど非常に厳しい。現在、予後は、慎重な集学的（特に、整形外科および呼吸器）制御によってのみ改善することができる。

【0007】

更にもう一つのMDの型は、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）である。LGMDは、まれな状態であり、発症する年齢や、筋力低下を起こす場所、心臓および呼吸器のかかわり、進行率や劇症率に関して異なる人々に、異なって現れる。LGMDは、児童期、思春期、青年期、またはその後に始まる。両性とも等しく患う。LGMDは、時の経過とともに上脚部および上腕部近くの筋肉の脆弱化を時に引き起こし、肩および下肢帯の脆弱化を引き起こす。脚部の脆弱化はしばしば、腕のそれより早く現われる。顔面筋は通常影響を受けない。状態の進行につれ、歩行の問題が起こり車いすを常時使用することが必要となる。肩と腕の筋肉が関連することにより、腕を頭より上にあげることや物体を持ち上げることなどが困難になる。LGMDのいくつかの型において、心臓や呼吸筋が、関わることもある。

【 0 0 0 8 】

少なくとも、19のLGMDの形があり、各形は、関連する遺伝子欠陥により分類される。

【表 1】

型	遺伝様式	遺伝子または染色体
LGMD 1 A	常染色体優性	ミオチン遺伝子
LGMD 1 B	常染色体優性	ラミンA/C 遺伝子
LGMD 1 C	常染色体優性	カペオリン遺伝子
LGMD 1 D	常染色体優性	染色体7
LGMD 1 E	常染色体優性	デスミン遺伝子
LGMD 1 F	常染色体優性	染色体7
LGMD 1 G	常染色体優性	染色体4
LGMD 1 H	常染色体優性	染色体3
LGMD 2 A	常染色体劣性	カルパイン-3 遺伝子
LGMD 2 B	常染色体劣性	ジスフェリン 遺伝子
LGMD 2 C	常染色体劣性	γ-サルコグルカン遺伝子
LGMD 2 D	常染色体劣性	α-サルコグルカン遺伝子
LGMD 2 E	常染色体劣性	β-サルコグルカン遺伝子
LGMD 2 F	常染色体劣性	δ-サルコグルカン遺伝子
LGMD 2 G	常染色体劣性	テレソニン遺伝子
LGMD 2 H	常染色体劣性	TRIM32
LGMD 2 I	常染色体劣性	FKRP 遺伝子
LGMD 2 J	常染色体劣性	チチン遺伝子
LGMD 2 K	常染色体劣性	POMT1 遺伝子
LGMD 2 L	常染色体劣性	フクチン遺伝子
LGMD 2 M	常染色体劣性	フクチン遺伝子
LGMD 2 N	常染色体劣性	POMT2 遺伝子
LGMD 2 O	常染色体劣性	OMGnT1 遺伝子
LGMD 2 Q	常染色体劣性	プレクチン遺伝子

10

20

【 0 0 0 9 】

LGMD用の特定テストが、現在、国立委託グループ（NCG）による国民診断計画を通じて受けることができる。

【 0 0 1 0 】

GALGT2 遺伝子（他に、B4GALNT2として知られている）は、1-4-N-アセチル-D-ガラクトサミン（GalNAc）グルコシルトランスフェラーゼ（糖転移酵素）をコードする。3つの異なる筋ジストロフィーモデル、すなわち、DMD、LGMD2D、とMDC1Aにおいて、GALGT2 過剰発現が研究されてきた（Xuら, Am. J. Pathol., 175:235-247 (2009); Xuら, Am. J. Pathol., 171:181-199 (2007); Xuら, Neuromuscul. Disord., 17:209-220 (2007); Martinら, Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 296:C476-488 (2009); およびNguyenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:5616-5621 (2002)）。骨格筋におけるGALGT2 過剰発現は、CT炭酸水素塩抗原（Neu5Ac/Glc-2-3[GalNAc-1-4]Gal-1-4GlcNAc-）を作るために、1-4-N-アセチル-D-ガラクトサミン（GalNAc）炭酸水素塩による-ジストログリカンのグリコシル化を誘発すると報告されてきた。GALGT2 グルコシルトランスフェラーゼとそれによって作られたCT炭酸水素塩は、ヒト成人、非人類霊長類、齧歯動物および、その他、これまで研究されてきた全ての哺乳類の骨格筋における神経筋と筋腱接合部に限られない（Martinら, J. Neurocytol., 32:915-929 (2003)）。骨格筋におけるGALGT2 の過剰発現は、ジストロフィン代替物（例えば、ウトロフィンやプレクチン1）およびラミニン2代替物（ラミニン5やアグリニン）などを含んでおり、種々の型の筋ジストロフィーにおいて失われているタンパク質の相同分子種または相同物である、常にはシナプスタンパク質のスキヤフォールドの異所性過剰発現を刺激することによって、シナプス外膜の異

30

40

50

所性グリコシル化を刺激すると報告されている (Xuら, 2009, 前述; Xuら, Am. J. Path. 2007, 前述; Xuら, Neuromuscul. Disord. 2007, 前述; Nguyenら, 前述; Chicoineら, Mol. Ther., 22: 713-724. (2014)。グループとして、GALGT2によるそのような代替物の誘導は、筋細胞膜の完全性を強化し、ジストロフィン 欠損筋と同様に野生型筋肉において筋損傷を防止すると報告されている (Martinら, 前述)。骨格筋におけるGALGT2過剰発現は筋の損傷を防止し、筋疾患を抑制すると報告されている。このことは、DMD用のmdxマウスモデルにおいて真実であり (Xuら, Neuromuscul. Disord. 2007, 前述; Martinら (2009), 前述; Nguyenら, 前述)、そこでは、繊維の半数のみが変換されたにすぎないにもかかわらず、ミクロ-ジストロフィン遺伝子導入の改善と等しい改善が述べられている (Martinら (2009), 前述)。とりわけ、GALGT2遺伝子導入が、先天型筋ジストロフィー1A用のdy^Wモデルにおいて (Xuら, Am. J. Path. 2007, 前述)、また肢帯型筋ジストロフィータイプ2D用のSgca-マウスモデルにおいて (Xuら, 2009, 前述) 予防できることが報告されている。

【0011】

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、複製不全のバルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは、末端逆位配列 (ITRs) の145のヌクレオチドを含む約4.7 kbの長さを有している。数多くのAAV血清型がある。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列はすでに知られている。例えば、AAV-1の完全なゲノムはGenBank登録番号NC_002077に提供されており、AAV-2の完全なゲノムはGenBank登録番号NC_001401とSrivastavaら, J. Virol., 45: 555-564 (1983) に提供されており、AAV-3の完全なゲノムはGenBank登録番号NC_1829に、AAV-4の完全なゲノムはGenBank登録番号NC_001829に、AAV-5ゲノムはGenBank登録番号AF085716に、AAV-6の完全なゲノムはGenBank登録番号NC_001862に、AAV-7とAAV-8ゲノムの少なくとも一部はそれぞれGenBank登録番号AX753246とAX753249に、AAV-9ゲノムはGaoら, J. Virol., 78: 6381-6388 (2004) に提供されており、AAV-10ゲノムはMol. Ther., 13 (1): 67-76 (2006) に、そしてAAV-11ゲノムはVirology, 330 (2): 375-383 (2004) に提供されている。AAV ITR内には、ウイルスDNA複製 (rep)、キャプシド形成/パッケージングと、宿主細胞への染色体組み込みを指示するシス作用配列が含まれている。3つのAAVプロモーター (相対的位置関係によりp5、p19、およびp40と名付けられている) は、repと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促す。一つのAAVイントロン (2107と2227ヌクレオチドに於ける) の弁別スプライシングと組み合わせられることにより、該2つのrepプロモーター (p5とp19) はrep遺伝子から4つのrepタンパク質 (rep78、rep68、rep52、およびrep40) の製造をみちびく。Repタンパク質は、究極的にウイルスゲノムの複製の責任を負うなど多くの酵素的性質を有している。Cap遺伝子はp40プロモーターから発現され、3つのカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードする。選択的スプライシングおよび非-コンセンサス転写開始部位は、3つのカプシドタンパク質の製造の責任を負っている。一つのコンセンサスポリアデニル化部位は、AAVゲノムの95番に位置する。Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992) にAAVのライフサイクルと遺伝的特徴の再調査が述べられている。

【0012】

AAVは、例えば遺伝子治療において、外来DNAを送達するためのベクターとして有望であるなどの特異な特徴を有している。培地での細胞のAAV感染は、非細胞変性的であり、ヒトやその他の動物の自然感染は、無変化で無症候性である。更に、AAVは、多

10

20

30

40

50

くの哺乳類の細胞に感染し、生体内の多くの異なる組織を標的にすることを可能にさせる。更に、AAVはゆっくり分裂細胞や非分裂細胞の形質を導入し、転写活性のある核エピソード（染色体外因子）として、これらの細胞の寿命を基本的に維持することができる。AAVプロウイルスゲノムは、組換え体ゲノムの構築を可能にするプラスミドの中でクローン化されたDNAとして、感染力がある。更に、AAV複製、ゲノムカプシド形成と統合を指示するシグナルがAAVゲノムのITR内に含まれていることによって、ほぼ4.3 kbの内部ゲノム（複製と構造カプシドタンパク質、rep-capをコードする）のいくつかまたは全てを外来性DNAに置き換えることができる。該repとcapタンパク質はトランス型として提供される。もう一つの重要なAAVの性質は、極端に安定で活発なウイルスであることである。その性質は、アデノウイルスを不活性化させるのに採用される条件（56 から65 に数時間）に容易に耐えることができ、それによって、AAVの低温保存をより容易にすることができる。AAVは、凍結乾燥さえすることができる。最後に、AAVに感染した細胞は、重感染への耐性はない。

【0013】

rh. 74と名付けられたAAVは種々のタンパク質を高度化するDNAを送達するために用いられてきた。デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対して、細胞毒性のあるT細胞GalNAcトランスフェラーゼ（転移酵素）のrh. 74発現についてXuら, Neuromuscular Disorders, 17: 209 - 220 (2007) およびMartinら, Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 296: 476 - 488 (2009) に述べられている。血管を通しての肢灌流によるAAVrh. 74の送達後に、AAVrh. 74のミクロジストロフィンFLAGタンパク質タグ融合のAAVrh. 74発現について、Rodino-Klapacら, Mol. Ther., 18(1): 109 - 117 (2010) に述べられている。

【0014】

筋ジストロフィーは、確とした治療法のない、個人、家庭、社会に重大な衝撃を与える一群の疾患である。コストは莫大である。個人は、生活感情的な緊張や自尊心を失わせることにつながる人生の質の低下に苦しむ。肢の機能の喪失による重度の肢体不自由者にとって、日々の生活活動は困難なものである。家族関係は、財政損失および困難な対人関係に苦しむ。罹患した患者の兄弟たちは、疎外されていると感じ、特に筋ジストロフィーが一方の親の責任であるならば、夫婦間の争いはしばしば離婚に至る。治療を求める負担は、多くの場合、生涯にわたる高度に集中した努力となり、それは人生のあらゆる側面を損ない、また苦難となる。家族の他には、社会が、特別教育、特別輸送および繰り返される呼吸道感染や心臓病の合併症を治療するための再入院において、筋ジストロフィー人口の肢体不自由者を居住させるための追加の施設が必要なため経済的な重荷を担うことになる。経済的負担の責任は、州および連邦政府の庁が分担しているが、これは、更に納税者の責任へとつながっている。

このように、これら限られるものではないが、DMD、MDC1A、およびLGMD2Dなどの筋ジストロフィーを含む神経筋障害に対する治療法が、当該分野に於いて強く必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【文献】Xuら, Am. J. Pathol., 175: 235 - 247 (2009)

Xuら, Am. J. Pathol., 171: 181 - 199 (2007)

Xuら, Neuromuscul. Disord., 17: 209 - 220 (2007)

Martinら, Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 296: C476 - 488 (2009)

Nguyenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5616 - 5621 (2002)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

rAAVrh74.MCK.GALGT2などの組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を

投与された対象者における神経筋障害を治療する方法であって、投与の経路が筋肉内経路でありかつ投与されたrAAVの用量が約 3×10^{11} vg/注入から 5×10^{12} vg/注入である、投与の経路が筋肉内経路でありかつ投与されたrAAVの用量が約 3×10^{11} vg/注入である、投与の経路が筋肉内経路でありかつ投与されたrAAVの用量が約 1×10^{12} vg/注入である、投与の経路が筋肉内経路でありかつ投与されたrAAVの用量が約 5×10^{12} vg/注入である、投与の経路が動脈内肢灌流でありかつ投与されたrAAVの用量が約 6×10^{12} vg/kg/肢から 4.8×10^{13} vg/kg/肢である、投与の経路が動脈内肢灌流でありかつ投与されたrAAVの用量が約 6×10^{12} vg/kg/肢である、投与の経路が動脈内肢灌流でありかつ投与されたrAAVの用量が約 1.2×10^{13} vg/kg/肢である、投与の経路が動脈内肢灌流でありかつ投与されたrAAVの用量が約 2.4×10^{13} vg/kg/肢である、投与の経路が動脈内肢灌流でありかつ投与されたrAAVの用量が約 4.8×10^{13} vg/kg/肢である、投与の経路が全身的静脈内投与でありかつ投与されたrAAVの用量が約 2×10^{14} vg/kgから約 6×10^{15} vg/kgである、投与の経路が全身的静脈内投与でありかつ投与されたrAAVの用量が約 4×10^{14} vg/kgから約 6×10^{15} vg/kgである、投与の経路が全身的静脈内投与でありかつ投与されたrAAVの用量が約 4×10^{14} vg/kgである、投与の経路が全身的静脈内投与でありかつ投与されたrAAVの用量が約 8×10^{14} vg/kgである、投与の経路が全身的静脈内投与でありかつ投与されたrAAVの用量が約 2×10^{15} vg/kgである、または投与の経路が全身的静脈内投与でありかつ投与されたrAAVの用量が約 6×10^{15} vg/kgである方法を本明細書において提供する。

【0017】

その治療法が考えられている神経筋障害の例としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー筋ジストロフィー、先天型筋ジストロフィー(MDC)1A、1B、1Cと1D、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)1A、1B、1C、1D、1E、1F、1G、1H、2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2L、2M、2N、2Oと2Q、ベスレムミオパチー、ウーリッヒ先天型筋ジストロフィー、筋・眼・脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、ウォーカー・ワールブルク症候群、筋硬直性ジストロフィー、筋無力症候群、先天型筋無力症、封入体ミオパチー、封入体筋炎、エメリー・ドレフュス型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、皮膚筋炎、中心核ミオパチー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、三好型ミオパチー、ミトコンドリアミオパチー、ネマリンミオパチー、埜中ミオパチー、重症筋無力症、および多発性筋炎がある。このように、筋ジストロフィーのその他の例には神経筋障害が考えられる。

【0018】

例えば、絶対筋力、偏心的筋肉の収縮の間の力減少、血清CK濃度、血清心筋トロポニン濃度；血清MMP9濃度；握力；肢トルク；肢可動性または柔軟性；歩行運動；6分間歩行テスト；膝関節屈筋または伸筋の強度；最大随意筋等尺性収縮；ノーススター歩行能力評価、肢T2強調MRI画像による筋肉量、脂肪減少または浮腫測定、筋収縮、肢関節角度、心機能（心拍数、心拍出量、左室内径短縮率、1回拍出量）、呼吸機能（呼吸数、血中酸素濃度、酸素補給の必要性を含む）、筋肉壊死、筋肉再生、筋消耗、筋肉炎症、筋肉石灰化、筋肉中央核形成、筋肉サイズまたは筋線維サイズ、寿命、および/またはジストロフィンまたはラミニン2タンパク質代用物発現（ウトロフィン(utrophin)、プレクチン1(plectin1)、ラミニン5(laminin alpha 5)、アグリニン(agrinn)）に於いて、該方法は、ヒト対象者において改善をもたらす。

【0019】

10

20

30

40

50

更に、 $rAAVrh74.MCK.GALGT2$ など $GALGT2$ ポリペプチドをコードする $rAAV$ を本明細書において提供する。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

その治療を必要とするヒト対象者における神経筋障害を治療する方法であって、前記方法は、ヒト対象者に、組換えアデノ随伴ウイルス ($rAAVrh74.MCK.GALGT2$) を投与するステップを含み、

前記投与経路が筋肉内経路で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 3×10^{11} v.g / 注入 ~ 約 5×10^{12} v.g / 注入であり、

前記投与経路が筋肉内経路で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 3×10^{11} v.g / 注入であり、

前記投与経路が筋肉内経路で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 1×10^{12} v.g / 注入であり、

前記投与経路が筋肉内経路で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 5×10^{12} v.g / 注入であり、

前記投与経路が動脈内肢灌流で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 6×10^{12} v.g / kg / 肢 ~ 約 4.8×10^{13} v.g / kg / 肢であり、

前記投与経路が動脈内肢灌流で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 6×10^{12} v.g / kg / 肢であり、

前記投与経路が動脈内肢灌流で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 1.2×10^{13} v.g / kg / 肢であり、

前記投与経路が動脈内肢灌流で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 2.4×10^{13} v.g / kg / 肢であり、

該投与経路が動脈内肢灌流で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 4.8×10^{13} v.g / kg / 肢であり、

前記投与経路が全身性静脈投与で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 2×10^{14} v.g / kg ~ 約 6×10^{15} v.g / kg であり、

前記投与経路が全身性静脈投与で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 4×10^{14} v.g / kg ~ 約 6×10^{15} v.g / kg であり、

前記投与経路が全身性静脈投与で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 4×10^{14} v.g / kg であり、

前記投与経路が全身性静脈投与で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 8×10^{14} v.g / kg であり、

前記投与経路が全身性静脈投与で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 2×10^{15} v.g / kg であり、または

前記投与経路が全身性静脈投与で、投与される前記 $rAAV$ の用量が約 6×10^{15} v.g / kg である、方法。

(項目2)

前記神経筋障害が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)、ベッカー筋ジストロフィー、先天型筋ジストロフィー (MDC) 1A、1B、1Cおよび1D、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 1A、1B、1C、1D、1E、1F、1G、1H、2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2L、2M、2N、2Oおよび2Q、ベスレムミオパチー、ウーリッヒ先天型筋ジストロフィー、筋・眼・脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、ウォーカー・ワールブルク症候群、筋硬直性ジストロフィー、筋無力症候群、先天型筋無力症、封入体ミオパチー、封入体筋炎、エメリー・ドレフュス型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、皮膚筋炎、中心核ミオパチー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、三好型ミオパチー、ミトコンドリアミオパチー、ネマリオンミオパチー、埜中ミオパチー、重症筋無力症、および多発性筋炎である、項目1に記載の方法。

(項目3)

10

20

30

40

50

前記神経筋障害が筋ジストロフィーである、項目 1 に記載の方法。

(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 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記筋ジストロフィーが先天型筋ジストロフィー 1 A である、項目 3 に記載の方法。

(項目 6)

前記筋ジストロフィーが肢帯型筋ジストロフィー 2 D である、項目 3 に記載の方法。

(項目 7)

前記ヒト対象者において、それによって、絶対筋力、偏心的筋肉の収縮の間の力減少、血清 C K 濃度、血清心筋トロポニン濃度、血清 M M P 9 濃度、握力、肢トルク、肢可動性または柔軟性、歩行運動、6 分間歩行テスト、膝関節屈筋または伸筋の強度、最大随意筋等尺性収縮、ノーススター歩行能力評価、肢 T 2 強調 M R I 画像による筋肉量、脂肪減少または浮腫測定、筋収縮、肢関節角度、心機能（心拍数、心拍出量、左室内径短縮率、1 回拍出量）、呼吸機能（呼吸数、血中酸素濃度、酸素補給の必要性を含む）、筋肉壊死、筋肉再生、筋消耗、筋肉炎症、筋肉石灰化、筋肉中央核形成、筋肉サイズまたは筋線維サイズ、寿命、およびジストロフィンまたはラミン 2 タンパク質代用物発現（ウトロフィン（utrophin）、プレクチン 1（plectin 1）、ラミン 5（laminin alpha 5）、アグリリン（agrin））における改善がある、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

配列番号：2 に表わされている G A L G T 2 遺伝子カセットを含む前記 r A A V . r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本開示は、神経筋障害を治療するための方法と製品を提供する。該方法は、A A V を遺伝子送達ベクターとして A A V を用いて、対象者の筋細胞に G A L G T 2 ポリヌクレオチドを送達することを含んでいる。対象者は、それに限られるものではないが、犬、猫、人などの哺乳類である。幾つかの実施形態において、対象者は、ヒト患者である。幾つかの実施形態において、対象者は、小児科のヒト患者である。

【0021】

一つの態様において、G A L G T 2 をコードする組換え体 A A V (r A A V) を、対象者に投与することを含む神経筋障害の治療のための方法が提供される。

【0022】

本明細書において神経筋障害と考えられているものは、限定はされないが、筋ジストロフィー（M D）である。本明細書において神経筋障害と考えられているものは、M D 以外の神経筋障害も含んでいる。このように、幾つかの実施形態において、本明細書で神経筋障害と考えられているものは、限定はされないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（D M D）、ベッカー筋ジストロフィー、先天型筋ジストロフィー（M D C）1 A、1 B、1 C および 1 D、肢帯型筋ジストロフィー（L G M D）1 A、1 B、1 C、1 D、1 E、1 F、1 G、1 H、2 A、2 B、2 C、2 D、2 E、2 F、2 G、2 H、2 I、2 J、2 K、2 L、2 M、2 N、2 O および 2 Q、ベスレムミオパチー、ウーリッヒ先天型筋ジストロフィー、筋・眼・脳病、福山型先天性筋ジストロフィー、ウォーカー・ワールブルク症候群、筋硬直性ジストロフィー、筋無力症症候群、先天型筋無力症、封入体ミオパチー、封入体筋炎、エメリー・ドレフュス型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、皮膚筋炎、中心核ミオパチー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、三好型ミオパチー、ミトコンドリアミオパチー、ネマリンミオパチー、埜中ミオパチー、重症筋無力症、および多発性筋炎がある。幾つかの実施形態において、M D は D M D である。幾つかの実施形態において、M D は M D C 1 A である。幾つかの実施形態において、M D は L G M D 2 D である。

【0023】

本明細書に記載された該方法のいずれかの実施形態において、対象者は、少なくとも 1

10

20

30

40

50

歳（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20歳）またはそれ以上である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、男性（雄）である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、女性（雌）である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、治療時点で独歩患者である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、治療が始まった時点で非独歩患者である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、然変異を明確化できる臨床的に許容された技術を持って、DMD遺伝子の突然変異が確認された者である。DMD表現型を発症させるジストロフィー遺伝子における突然変異は、対象者においてそれらの突然変異を特定する方法として、当該分野ではよく知られている。参照、例えば、The Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database, Leiden University Medical Center, The Netherlands, および Aartsma-Rusら, Hum. Mut., 30: 293-299 (2009)。
【0024】

10

本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、短指伸筋（EDB）の核磁気共鳴画像において、形質導入または遺伝子導入を可能とするほど十分な筋肉量を保持している。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、治療開始に先立ち、例えば、少なくとも4（例えば、5、6、7、8、9、10、11または12）週間、安定した用量の副腎皮質ステロイド療法（例えば、デフラザコルト、プレドニゾンまたはそれらのジェネリック薬）を受けている。ある実施形態において、対象者は、バックグラウンドステロイド治療中（例えば、断続的または慢性/継続的バックグラウンドステロイド治療）である。当業者は、そのような対象者はステロイド（または、コルチコステロイド）の使用が続けられる対象者で、本明細書に記載された遺伝子治療など、他の治療がその成功後に投与されることを理解するであろう。

20

【0025】

本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、活性なウイルス感染をしていない者である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、機能の脆弱化または喪失のない状態でDMD突然変異を持っていない。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、労作時呼吸困難、足浮腫、横たわった時の呼吸困難、肺基底部のラッセル音などの心筋症の症状を示していない。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、心エコー図による心駆出率が約40%以下である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、HIV感染（対象者は、おそらく免疫不全状態である）またはA、BまたはC型肝炎（対象者は、おそらくアミノ基転移酵素の上昇がある）の治療の際に血清学的にその証拠がある者ではない。

30

【0026】

本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、自己免疫疾患と診断されていない、それを患っていない、または現在その治療をしていない者である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、頑固な白血球減少症または白血球増加症ではなく（白血球数、 $3.5\text{ K} / \mu\text{L}$ 以上または $20.0\text{ K} / \mu\text{L}$ 以下）または絶対好中球数が $1.5\text{ K} / \mu\text{L}$ より高くない。

40

【0027】

本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、病気（例えば、ウイルス感染または自己免疫疾患）を併発していないか、または開業医の所見において不要な遺伝子導入のリスクを伴うような慢性的医薬治療を必要としない者である。

【0028】

本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、ELISA免疫測定法で1:400以上のrAAVrh74結合抗体力価を持たない者である。本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、対象者は、ELISA免疫測定法で1

50

: 50以下のrAAVrh74結合抗体力価を持たない。

【0029】

本明細書に記載された方法のいずれかの実施形態において、例えば、対象者の生物学的試料をELISA免疫測定法で決定するとき、抗-Sda抗体の検出可能な循環を持たない者である(Blood groups: P, I, Sda, and Pr. AAB (1991))。Sdagリカン、GALGT2によって作られるヒト血液型群構造である。該Sda血液型群抗体は、マウスの[GalNAc b1, 4[Neu5Ac a2, 3]Gal b1, 4GlcNAc -]におけるGALGT2によって作られるCTグリカンと同一である。該開示は、特定の理論や作用機構のいずれにも縛られることを望むものではないが、CTグリカンの存在または量はGALGT2を発現する細胞中で高められると予想され、対象者人口の0.2%と推測されるが、Sda抗体を持つ対象者はrAAVrh74-MCK-GALGT2による治療後に、抗体関連型組織拒絶反応のリスクがあるものと、本発明者は考えている。

10

【0030】

本明細書に記載された方法において用いられる、適した生物学的試料は、例えば、生体液のいずれかである。生物学的試料は、たとえば、対象者(例えば、ヒトなど哺乳類)から得られる試験片である。生物学的試料は、筋生検からのものであってよい。生物学的試料は、また尿、全血、その分画(例えば、血漿、血清)、唾液、精液、痰、脳脊髄液、粘液など生体液であってよい。生物学的試料は、望むならば、更に特定の興味の対象である被検物質(例えば、タンパク質)を含む分画に分画化されてもよい。例えば、全血試料は、血清または特定の型のタンパク質を含む分画に分画化されてよい。望むなら、生物学的は、二つの異なる流体の組み合わせなど、対象者からの異なる生物学的試料の組み合わせでもよい。

20

【0031】

本発明に適した生物学的試料は、対象者から採られた新鮮なまたは凍結された試料か、または診断、治療および/または既往歴を伴った保存試料でもよい。生物学的試料は、例えば、癌または感染病(例えば、ウイルス感染)を発症している者、発症していると疑われる者、発症リスクのある者など、対象者から得るものであってよい。生物学的試料を得るために適した方法であれば、いずれの方法も採用できるが、典型的な方法は、例えば、解放筋生検、放血、スワップ(例えば、口内スワップ)、洗浄、または穿刺吸引細胞診手順である。生物学的試料は、また骨髓または脾臓からも得られる。

30

【0032】

幾つかの実施形態において、タンパク質抽出物は、生物学的試料から調製してもよい。幾つかの実施形態において、タンパク質抽出物は、総タンパク質質分を含んでいる。タンパク質抽出方法は、当該分野でよく知られている。例えば、Roe "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", 2nd Edition, Oxford University Press (2001)を参照されたい。数多くの異なる多様なキットが、体液や組織からタンパク質を抽出するために用いることができ、また、例えば、BioRad Laboratories (Hercules, CA)、BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA)、Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、Pierce Biotechnology (Rockford, IL)、やInvitrogen Corp. (Carlsbad, CA)などから商業的に入手可能である。

40

【0033】

生物学的試料中で細胞の活性や完全性を保持する試料を得るためおよび/保存するための方法は、当業者によく知られている。例えば、生物学的試料は、更に一つ以上の添加剤、例えば適当な緩衝液および/またはプロテアーゼ阻害剤など阻害剤などと触れさせられるが、添加剤は、タンパク質構造を保持またはその変化(例えば、浸透圧またはpHの変化)を最小化する意味合いがある。このような阻害剤は、例えば、エチレンジアミン四酢

50

酸 (E D T A) , エチレングリコール四酢酸 (E G T A) などのキレート剤、フッ化フェニルメチルスルフォニル (P M S F) 、アプロチニンおよびロイペプチンなどプロテアーゼ阻害剤を含んでいる。全細胞を保存または他の取り扱い方に適した緩衝液と状態は、例えば、PollardおよびWalker, “Basic Cell Culture Protocols,” Volume 75 of Methods in Molecular Biology, Humana Press (1997)、Masters, “Animal cell culture: a practical approach,” Volume 232 of Practical Approach Series, Oxford University Press (2000)、およびJones “Human cell culture protocols,” Volume 2 of Methods in Molecular Medicine, Humana Press (1996) に述べられている。

10

【0034】

本明細書に記載された神経筋障害の治療の方法は、GALGT2ポリヌクレオチドによる筋細胞（例えば、骨格筋、平滑筋、または心筋細胞）の形質導入の結果をもたらす。本開示のrAAVを含む組成物の、対象者への有効量または有効反復投与量は、現に治療している神経筋障害と関連する筋肉の病理を防止するか、進行を遅らせるか、または改善する（除くまたは減らす）だけの用量である。筋肉の病理への効果は、1つ以上のこの分野での測定基準、例えば、絶対筋力、偏心的筋肉の収縮の間の力減少、血清CK濃度、血清心筋トロポニン濃度、血清MMP9濃度、握力、肢トルク、肢可動性または柔軟性、歩行運動、6分間歩行テスト、膝関節屈筋または伸筋の強度、最大随意筋等尺性収縮、ノーススター歩行能力評価、肢T2強調MRI画像による筋肉量、脂肪減少または浮腫測定、筋収縮、肢関節角度、心機能（心拍数、心拍出量、左室内径短縮率、1回拍出量）、呼吸機能（呼吸数、血中酸素濃度、酸素補給の必要性を含む）、筋肉壊死、筋肉再生、筋消耗、筋肉炎症、筋肉石灰化、筋肉中央核形成、筋肉サイズまたは筋繊維サイズ、寿命、およびジストロフィンまたはラミニン 2タンパク質代用物発現（ウトロフィン (utrophin)、プレクチン1 (plectin 1)、ラミニン 5 (laminin alpha 5)、アグリニン (agrin)) などによって測定される。例えば、Forbesら, Radiology, 269 (1): 198 - 207 (2013); Govoniら, Cell Mol. Life Sci., 70 (23): 4585 - 4602 (2013); ならびにChandrasekharanおよびMartin, Methods Enzymol., 479: 291 - 322 (2010) を参照されたい。神経筋障害の発現に先立って用量を投与された場合、投与は予防のためである。神経筋障害の発現の後、用量を投与された場合、投与は治療のためである。本明細書に記載された方法による対象者の治療は、それ故、神経筋障害を防止するため、その進展を遅らせるかまたは防止するため、その範囲を縮小させるため、寛解（部分的または全体的）の結果をもたらすためおよび/または寿命を延ばすために考えられている。

20

30

【0035】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載された方法のいずれかは、GALGT2導入遺伝子で形質導入された細胞中のGALGT2の発現レベルを検出または測定することを更に含んでいる。mRNAまたはタンパク質を測定する方法（例えば、ウェスタンブロッティングなどの免疫測定法）は、当分野でよく知られている。

40

【0036】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載された方法のいずれかは、GALGT2ポリヌクレオチドで形質導入された細胞上に発現されたCT抗原の量を検出または測定することを更に含んでいる (Chicoineら、前述)。

【0037】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載された方法のいずれかは、GALGT2ポリヌクレオチドで形質導入された細胞上に発現されたウトロフィンの量を検出または測定することを更に含んでいる (Chicoineら、前述)。

50

【 0 0 3 8 】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載された方法のいずれかは、中心核を有する繊維の数、この繊維は G A L G T 2 ポリヌクレオチドで形質導入されたものであるが、を検出または測定することを更に含んでいる。

【 0 0 3 9 】

それ故、上述の方法で考慮される r A A V の投与の経路は、限定はされないが、腹腔内 (I P)、筋肉内 (I M) および血管内 (例えば、動脈内肢灌流 (I L P) や静脈内 (I V)) 経路を含む。

【 0 0 4 0 】

本明細書に記載された方法により投与される r A A V の用量は、例えば、特定の r A A V、投与の方法、治療の到達点、個人、目的の細胞の種類に依っておりさまざまであり、当該分野の基準に従った方法により決定され得る。一つ以上の用量、例えば、一つ、二つ、三つ、またはそれ以上の用量が投与される。用量中の r A A V の力価は、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} から約 1×10^{15} またはそれ以上の耐 DNA 分解酵素粒子 (D R P) / m L である。服用量はウイルスゲノム (v g) の単位でも表すことができる (すなわち、それぞれ 1×10^7 v g、 1×10^8 v g、 1×10^9 v g、 1×10^{10} v g、 1×10^{11} v g、 1×10^{12} v g、 1×10^{13} v g、 1×10^{14} 、 1×10^{15} である)。A A V の力価測定法は C l a r k ら、H u m . G e n e T h e r . , 10 : 1 0 3 1 - 1 0 3 9 (1 9 9 9) に述べられている。

【 0 0 4 1 】

I M 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 3×10^{11} から約 5×10^{12} v g / 注入である。(本明細書におけるすべての範囲は、その範囲内の各値と、個々の範囲の上限下限の値を表すことを意図している。) I M 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 3×10^{11} v g / 注入である。I M 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 1×10^{12} v g / 注入である。I M 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 5×10^{12} v g / 注入である。

【 0 0 4 2 】

I L P 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 6×10^{12} から少なくとも約 4.8×10^{13} v g / k g である。(本明細書におけるすべての範囲は、その範囲内の各値と、個々の範囲の上限下限の値を表すことを意図している。) I L P 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 6×10^{12} v g / k g / 肢である。I L P 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 1.2×10^{13} v g / k g / 肢である。I L P 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 2.4×10^{13} v g / k g / 肢である。I L P 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 4.8×10^{13} v g / k g / 肢である。

【 0 0 4 3 】

全身的 I V 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 2×10^{14} から少なくとも約 6×10^{15} v g / k g である。全身的 I V 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 4×10^{14} から少なくとも約 6×10^{15} v g / k g である。(本明細書におけるすべての範囲は、その範囲内の各値と、個々の範囲の上限下限の値を表すことを意図している。) 全身的 I V 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 4×10^{14} v g / k g である。全身的 I V 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 8×10^{14} v g / k g である。全身的 I V 経路を投与経路とする上述の方法

のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 2×10^{15} v g / k g である。全身的 I V 経路を投与経路とする上述の方法のいくつかの実施形態において、投与される r A A V の用量は、約 6×10^{15} v g / k g である。

【 0 0 4 4 】

本明細書において治療を考慮される対象者はヒト患者である。本明細書において I M 送達による治療を考慮される対象者はヒト患者である。その様な患者としては、例えば、(i) 9 歳以上の患者、(i i) 男性患者、(i i i) 独歩患者または非 独歩患者、(i v) 然変異を明確化できる臨床的に許容された技術を持って、D M D 遺伝子の突然変異が確認された患者(v) 短指伸筋(E D B) の核磁気共鳴画像において、形質導入または遺伝子導入を可能とするほど十分な筋肉量を保持している患者、(v i) あらゆる人種の患者、(v i i) 全ての研究手順に協力できる能力を持つ患者、(v i i i) 適切であるか、性的に成熟および/または活動的である場合、信頼できる避妊法を実行する意思のある患者、および/または(i x) 遺伝子導入に先立ち少なくとも 1 2 週間、副腎皮質ステロイド療法(例えば、デフラザコルト、プレドニゾン、またはそれらのジェネリック薬)の安定した用量を服用している患者が含まれる。適さない患者としては、例えば、(i) 臨床的知見に基づいて活性ウイルスに感染している患者、(i i) 機能の脆弱化または喪失のない D M D 突然変異を有する患者、(i i i) 労作時呼吸困難、足浮腫、横たわった時の呼吸困難、肺基底部のラッセル音などの心筋症の症状を示す患者、(i v) 心エコー図による心駆出率が約 4 0 % 以下である患者、(v) H I V 感染または A、B または C 型肝炎の血清学的証拠がある者、(v i) 自己免疫疾患と診断されているまたはこれまでに診断されたことがある(または現在治療中である)患者、(v i i) 頑固な白血球減少または白血球増加(白血球数、 $3.5 \text{ K} / \mu\text{L}$ 以上または $20.0 \text{ K} / \mu\text{L}$ 以下)または $1.5 \text{ K} / \mu\text{L}$ 未満の絶対好中球数を持つ患者、(v i i i) 病気を併発しているか、または開業医の所見において不要な遺伝子導入のリスクを伴うような慢性的医薬治療を必要とする患者、(i x) E L I S A 免疫測定法で 1 : 4 0 0 以上の r A A V r h 7 4 結合抗体力価を持つ患者、または、(x) 抗 - S d a 抗体の循環を示す患者である。例示的治療プロトコルにおいて、D M D 患者は、各々の患者の一つの短指伸筋(E D B) にベクター r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 と各々の患者の他の一つの E D B に生理食塩水のみを両側注射を受ける。対象者は、 1×10^{12} v g (総用量) のベクター用量をうける。

【 0 0 4 5 】

上述および下述の方法における細胞形質導入の効率は、少なくとも約、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、または 9 5 % である。I V 肢灌流による送達を含む幾つかの実施形態において、形質導入効率は、r A A V を送達された組成物の量を増加させること、r A A V の送達前に事前洗浄を行うこと、および/または r A A V の留まる時間を増やすことで、増加させることができる。

【 0 0 4 6 】

他の態様において、r A A V ゲノムが提供される。投与された r A A V のゲノムは、転写制御配列の制御のもと G A L G T 2 ポリヌクレオチドを含んでいる。該 r A A V ゲノムは A A V r e p と c a p D N A を欠いている。r A A V ゲノム中の A A V D N A はその中で組換え体ウイルスが派生することができる A A V 血清型のいずれか、限定ではないが、A A V 血清型 A A V - 1、A A V - 2、A A V - 3、A A V - 4、A A V - 5、A A V - 6、A A V - 7、A A V - 8、A A V - 9、A A V - 1 0、A A V - 1 1 と A A V r h . 7 4 を含む A A V 血清型に由来する。これらの A A V 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、上記の背景技術に記載されているように当該分野ではよく知られている。幾つかの実施形態において、r A A V ゲノムにおける A A V D N A は A A V r h . 7 4 に由来する。A A V r h . 7 4 ゲノムのポリヌクレオチド配列は、配列番号：1 に提示されており、ここで、2 1 0 - 2 1 4 7 は R e p 7 8 遺伝子オープンリーディングフレームであり、8 8 2 - 2 0 8 は R e p 5 2 オープンリーディングフレームであり、2 0 7 9 - 2 0 8 1 は R e p 7 8 ストップ、2 1 4 5 - 2 1 4 7 は R e p 7 8 ストップ、1 7 9 7 - 1 8 0 0 はスプライス供与部位、2 0 9 4 - 2 0 9 7 はスプライス受容部位、2 1 2 1 - 2 1 2 4

はスプライス受容部位、174 - 181はp5プロモーター+1プレディクティド、145 - 151はp5 TATA box、758 - 761はp19プロモーター+1プレディクティド、732 - 738はp19 TATA box、1711 - 1716はp40 TATA box、2098 - 4314はVP1 Cap遺伝子オープンリーディングフレーム、2509 - 2511はVP2スタート、2707 - 2709はVP3スタートおよび4328 - 4333はpoly Aシグナルである。

【0047】

幾つかの実施形態において、rAAVゲノムの転写制御配列は、筋 - 特異制御エレメントであり、限られるものではないが、myoD遺伝子ファミリーなどのアクチンおよびミオシン遺伝子ファミリー (Weintraubら, Science, 251: 761 - 766 (1991)) を参照のこと)、筋細胞 - 特異エンハンサーバインディング因子MEF-2 (CserjesiおよびOlson, Mol. Cell. Biol., 11: 4854 - 4862 (1991))、ヒト骨格アクチン遺伝子から派生した制御エレメント (Muscatlら, Mol. Cell. Biol., 7: 4089 - 4099 (1987))、心アクチン遺伝子、筋クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーター (Johnsonら, Mol. Cell. Biol., 9: 3393 - 3399 (1989)) およびMCKエンハンサー、MHCK7プロモーター (ミオシン重鎖を組み込んだMCKプロモーターの改修版) (Salvaら, Mol. Ther., 15: 320 - 329 (2007))、デスミンプロモーター、骨格速筋トロポニンC遺伝子や遅心筋トロポニンC遺伝子や遅筋トロポニンI遺伝子から派生した制御エレメント、低酸素誘導因子 (Semenzaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5680 - 5684 (1991))、グルココルチコイド応答エレメント (GRE) を含むステロイド誘導エレメントおよびプロモーター (MaderおよびWhite, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5603 - 5607 (1993)) を参照のこと)、および他の制御エレメントを含んでいる。幾つかの実施形態において、転写制御エレメントはMCKプロモーターを含んでいる。幾つかの実施形態において、転写制御エレメントはMHCK7プロモーターを含んでいる。

【0048】

幾つかの実施形態において、rAAVゲノム中のGALGT2ポリヌクレオチドは、GenBank登録番号AJ517771に提示されているGALGT2 cDNAである (配列番号: 2のヌクレオチド1002 - 2522として提示)。幾つかの実施形態において、rAAVゲノム中のGALGT2ポリヌクレオチドは、GenBank登録番号AJ517771に提示されているGALGT2 cDNAであるかまたは80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のGALGT2 cDNAと配列同一性を持つ変異ポリヌクレオチドである。幾つかの実施形態において、該変異ポリヌクレオチドは、GenBank登録番号AJ517771に提示されているGALGT2 cDNAによってコードされるポリペプチドと同じGALGT2ポリペプチドをコードする。GenBank登録番号AJ517771に提示されているGALGT2 cDNAによってコードされるGALGT2ポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号: 3に提示されている。幾つかの実施形態において、該変異GALGT2ポリヌクレオチドは、GenBank登録番号AJ517771に提示されているGALGT2 cDNAによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号: 3) と較べると少なくとも一つのアミノ酸配列が変更されている変異GALGT2ポリペプチドをコードする。アミノ酸配列の変更は、たとえば、一つ以上のアミノ酸の置換、削除、または挿入、好ましくは保存的置換、である。該変異GALGT2ポリヌクレオチドは、ポリペプチドのグルコシルトランスフェラーゼ活性が保たれていれば、アミノ酸置換、削除、および挿入のいずれの組み合わせでもよい。一つの態様において、変異GALGT2ポリペプチドは、GenBank登録番号AJ517771に提示されているGALGT2 cDNAにコードされとアミノ酸配列 (配列番号: 3) と少なくとも60%、70%、80%、

10

20

30

40

50

80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または99.5%の配列同一性を持つように多くのアミノ酸変更がある。

【0049】

幾つかの実施形態において、rAAVゲノムは、MCK・ALGT2ゲノムであり、そのGALGT2遺伝子カセットの配列は配列番号：2に提示されており、以下に示される通りである。

【表2】

開始 ヌクレオチド	終了 ヌクレオチド	名前	詳細
53	230	5' ITR	野生型AAV2末端逆位配列
236	442	MCK エンハンサー	マウス筋クレアチンキナーゼエンハンサー
443	793	MCK 核プロモーター	マウス筋クレアチンキナーゼ核プロモーター
794	846	Mu MCK エクソン1	マウスMCK遺伝子のエクソン1の天然転写開始部位（非翻訳）
847	943	SV40 イントロン	SV40遅延16S/19Sスプライス供与部及び受容部位
944	1000	5' 非翻訳領域	プラスミドpCMVbからの5'非翻訳領域
1002	2522	ヒトGALGT2 cDNA	ヒトGALGT2 cDNA
2531	2579	SynpA	人工的ポリアルデニル化シグナル
2581	2762	3' ITR	野生型AAV2末端逆位配列

10

【0050】

更に他の態様において、配列番号：2に表わされているヌクレオチド配列を含む単離された核酸が提供される。幾つかの実施形態において、該単離された核酸は、配列番号：2に表わされているヌクレオチド配列から成る。

【0051】

更に提供されるのは、5'から3'への順で、(i)初めのAAV2末端逆位配列(ITR)、(ii)筋クレアチンキナーゼプロモーター配列、(iii)ヒトGALGT2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および(iv)第二のAAV2 ITR配列を含む単離された核酸であり、ここで該ヒトGALGT2ポリペプチドは、配列番号：3と少なくとも90%の同一性のアミノ酸配列、配列番号：3と100%の同一性アミノ酸配列、または配列番号：2のヌクレオチド1002-2522によってコードされているものである。

30

【0052】

上記核酸を含む組換えAAVは、配列番号：2と少なくとも90%の同一性のアミノ酸配列のヌクレオチド配列を含んでいるrAAVと同様と考えられる。

【0053】

開示されたrAAVゲノムを含むDNAプラスミドが提供される。該DNAプラスミドは、本明細書で考えられるrAAVゲノムを含んでいる。該DNAプラスミドは、rAAVゲノムを感染性ウイルス粒子に集合させるため、ヘルパーウイルスのAAV（例えば、アデノウイルス、E1-欠失アデノウイルス、またはヘルペスウイルス）への感染が容認できる細胞へ転移される。AAV粒子を製造する技術、この技術に於いてパッケージされるAAVゲノム、repとcap遺伝子、およびヘルパーウイルスの機能が細胞に提供されるのであるが、は当該分野で標準化されている。rAAVの製造は、次の成分が単一の細胞（本明細書では、パッケージング細胞と記されている）に存在することを必要とする、すなわちrAAVゲノム、rAAVゲノムと離れた（すなわち、その中に無い）AAV repとcap遺伝子、およびヘルパーウイルス機能である。AAV repとcap遺伝子は、そのために組換え体ウイルスが派生するAAV血清型のいずれかから得られ、また限られるものではないが、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11とAAVrh74を含む、rAAVゲノムITRと異なるAAV血清型から得られる。疑似タイプのrAAVの製造は、例えば、WO01/83692に開示されている。例えば

40

50

、カプシド変異のある r A A V などの他のタイプの r A A V 変種もまた考慮される。例えば、Marsicら, Molecular Therapy, 22(11):1900-1909(2014)を参照のこと。

【0054】

パッケージング細胞を製造する方法は、A A V 粒子製造に必要なすべての成分を安定的に発現する細胞株を創り出すことである。例えば、A A V rep と cap 遺伝子を欠損する r A A V ゲノム、r A A V ゲノムから分離した A A V rep と cap 遺伝子、耐ネオマイシン遺伝子などの選択可能なマーカーを含むプラスミド（または多くのプラスミド）が細胞のゲノムに統合される。A A V ゲノムは GC テーリングなどの手順（Samulskiら, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081）、制限酵素切断部位を含む人工リンカーを加えること（Laughlinら, 1983, Gene, 23:65-739）、または直接、平滑末端ライゲーション（SenapathyおよびCarter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666）によって細菌プラスミドに導入されてきた。パッケージング細胞株は、次に、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスに感染させられる。この方法の優位点は、細胞が選択可能であることと r A A V の大量生産に適していることである。他の適した方法の例では、プラスミドよりむしろアデノウイルスまたはバキュロウイルスを r A A V ゲノムおよび/または rep と cap 遺伝子をパッケージング細胞に導入するのに採用している。自己相補性ゲノムを持つ r A A V を製造する方法も該分野ではよく知られている。

【0055】

r A A V 製造の一般原則は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539やMuzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129に論じられている。種々の取り組みが、Ratschinら, Mol. Cell. Biol. 4:2072(1984)、Hermonatら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466(1984)、Tratschinら, Mol. Cell. Biol. 5:3251(1985)、McLaughlinら, J. Virol., 62:1963(1988)、Lebkowskiら, 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349(1988)、Samulskiら(1989, J. Virol., 63:3822-3828)、U. S. Patent No. 5,173,414、WO95/13365(U. S. Patent No. 5,658,776)、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ら(1995) Vaccine 13:1244-1250、Paulら(1993) Human Gene Therapy 4:609-615、Clarkら(1996) Gene Therapy 3:1124-1132、U. S. Patent No. 5,786,211、U. S. Patent No. 5,871,982、とU. S. Patent No. 6,258,595に記載されている。上記の文献は、r A A V 製造に関するセクションが特に強調されるが、その全てが参照として本明細書に組み込まれる。

【0056】

更なる態様において、本開示は、このように、感染性 r A A V を製造するパッケージング細胞を提供する。ある実施形態において、パッケージング細胞は HeLa 細胞 293 細胞、および Per C. 6 細胞（同族 293 株）などの安定的に形質転換された癌細胞である。他の実施形態において、パッケージング細胞は、低通過 293 細胞（E1 アデノウイルスで形質転換されたヒト胎児由来腎臓細胞）、MRC-5 細胞（ヒト胎児繊維芽細胞）、WI-38 細胞（ヒト胎児繊維芽細胞）、Vero 細胞（サル腎臓細胞）、および FRhL-2 細胞（アカゲザル胎児肺細胞）などの、形質転換された癌細胞ではない細胞である。

【0057】

rAAVは、カラムクロマトグラフィーや塩化セシウム密度勾配法などの当該分野で標準化された方法で精製される。ヘルパーウイルスからのAAVベクターの精製方法は、当該分野でよく知られており、例えば、Clarkら, Hum. Gene Ther., 10 (6): 1031-1039 (1999); SchenppやClark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002)、U.S. Patent No. 6,566,118、およびWO98/09657に開示されている方法が含まれる。

【0058】

このように、他の態様において、本開示は、GALGT2ポリヌクレオチドを含むrAAVを考慮している。幾つかの実施形態において、rAAVは、AAV rh74カプシドとGALGT2ポリヌクレオチドである。幾つかの実施形態において、rAAVのゲノムはAAV repとcapDNAを欠損している。本方法の実施形態において、rAAVはrAAVrh74.MCK.GALGT2である。幾つかの実施形態において、rAAVは自己相補性ゲノムである。

【0059】

他の態様において、本開示は、本明細書に記載のrAAVを含む組成物を考慮している。本開示の組成物は、薬学的に許容されるキャリアー中にrAAVを含んでいる。該組成物は、希釈剤などの他の成分も含んでいる。その様なキャリアーや成分は、需要者にとって毒性がなく、好ましくは、採用された用量や濃度で不活性であり、リン酸、クエン酸、または他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸、グルコース、マンノースまたはデキストリンなどの単糖類、二糖類および他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの造塩対イオン、および/またはツイーン、プルロニックスまたはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性表面活性剤などが含まれる。幾つかの実施形態において、rAAVはトリス、塩化マグネシウム、塩化ナトリウムとプルロニックF68中で製剤化される。幾つかの実施形態において、rAAVは20mMのトリス(pH8.0)、1mMの塩化マグネシウムおよび0.001%のプルロニックF68を含む200mMの塩化ナトリウム中で製剤化される。

【0060】

本明細書において、併用療法も考慮される。本明細書で用いられている併用とは、同時治療または順を追った治療を含んでいる。標準化されている医療的治療(例えば、コルチコステロイドおよび/または免疫抑制剤)との本開示の方法の併用は、新規な治療との併用として、特別に考慮される。種々の実施形態において、対象者は、本明細書で考慮される方法によって治療を受ける前、その間、またはその後(これらの3つの可能性のうち二つ以上の組み合わせのいずれの順番でもよい)、コルチコステロイドで治療を受ける。

【0061】

無菌の注入可能な溶液が、上に列挙された種々のその他の成分とともに適当な溶媒に必要な量のrAAVを取り込むことによって調整され、必要ならば、ろ過殺菌される。一般的に、分散液は殺菌された活性成分を、基本の分散媒と上に列挙されたうちの必要な他の成分を含んでいる無菌の媒体に取り込むことによって調整される。無菌の注入可能な溶液の調整のための無菌粉末である場合、好ましい調整方法は、殺菌濾過された溶液から活性成分と必要なあらゆる添加成分の粉末を収集することができる真空乾燥および冷凍乾燥の技術である。

【実施例】

【0062】

本発明の態様と実施形態は以下の実施例により説明する。

【0063】

実施例1

10

20

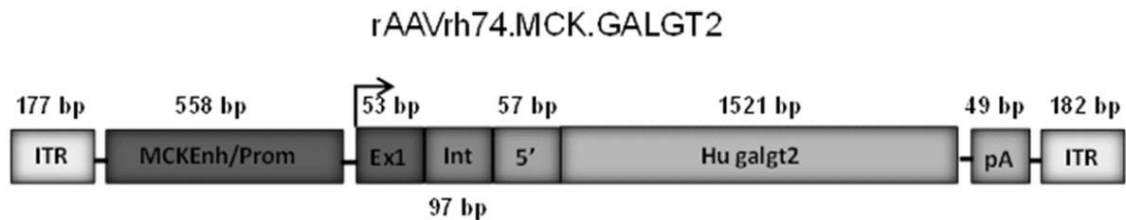
30

40

50

rAAVrh74.MCK.GALGT2の名付けられた非天然的rAAVが製造された。該rAAVベクターは、筋クレアチンキナーゼプロモーター（MCK；筋特異プロモーター）の制御下で完全なヒトGALGT2 cDNA（GenBank登録番号AJ517771）を含んでいる。MCKプロモーター／エンハンサー配列が筋特異遺伝子発現を促進するために用いられ、これは、351bp MCK核プロモーター（基部（プロキマル））に融合されたマウスMCK核エンハンサー（206bp）から成る。該核プロモーターの後に、53bp内生性マウスMCKエクソン1（非翻訳）が十分な転写阻害のために存在し、次にSV40遅延16S/19Sスプライスシグナル（97bp）と小さな5'UTR（非翻訳領域、61bp）が続いている。イントロンと5'UTRは、プラスミドpCMV（Clontech）由来である。GALGT2カセットは、mRNAの終結のためのATG開始と小さな53bp合成ポリAシグナルの直前にコンセンサスコザック配列を有する。ヒトGALGT2カセットは、すでにMartinら（2009）、上記に述べられている。含まれているウイルス性配列は、AAV2の末端逆位配列（ITR）のみであり、これはウイルスDNA複製とパッケージングの両方のため必要とされる。pAAVrh74.MCK.GALGT2プラスミドは、AAV2末端逆位配列が側に配置されているヒトGALGT2 cDNA発現カセットを含んでいる。該遺伝子カセットは、MCKプロモーター、遺伝子発現を最善化するためのコザック配列をもつキメライントロン、配列をコードするヒトGALGT2とポリAシグナルを含んでいる。遺伝子カセットの配列は、側に配置されているAAV ITRとともに配列番号：2に表わされている。

【表3】



【0064】

GALGT2ポリヌクレオチドを含むAAVベクターは、HEK293細胞中で、アデノウイルスフリーの3重プラスミドDNA形質導入（リン酸カルシウム沈殿）方法において改良されたクロスパッケージングの手法で作られた（Rabinowitzら, J. Virol., 76:791-801（2002））。ベクターは、すでに述べられている方法（Wangら, Gene Ther., 10:1528-1534（2003））と同様な仕方で、AAVヘルパープラスミドrep2-cap rh.74とアデノウイルスヘルパープラスミドでGALGT2ポリヌクレオチドを含むプラスミドを同時形質導入することによって製造した。プラスミドrep2-cap rh.74は野生型AAV2 rep遺伝子とrh.74 cap遺伝子をコードし、アデノウイルスヘルパープラスミド（pAdHelper）は、高力価rAAV製造に要求されるアデノウイルス型5E2A、E4ORF6、とVAI/II RNA遺伝子を発現する。

【0065】

ベクターは、すでに述べられているように（Clarkら, Hum. Gene Ther., 10:1031-1039（1999））、清澄な293細胞溶解物から、逐次イオジキサノール勾配浄化と直線的な塩化ナトリウム塩勾配を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより浄化された。ベクターゲノム（vg）力価は、すでに述べられているように（Clarkら, 前述）、MCK特異プライマー／プローブセットで、プリズム7500Taqman検出器システム（PE Applied Biosystems）を用いて測定された。ベクターストック力価は 1×10^{12} vg/mLから 40×10^{12} vg/mLであった。

【0066】

ベクターは、20 mM トリス (pH 8.0)、1 mM の塩化マグネシウムおよび 0.001 % のプルロニック F68 を含む 200 mM の塩化ナトリウム中で製剤化される。該ベクターは、臨床的投与の前に解凍される凍結液として供給される。

【0067】

実施例 2

DMD による対象者への IM 送達

ヒト患者が、本明細書において IM 送達によって治療を受けると考えられる対象者である。例示的治療プロトコルにおいて、DMD 患者は、各々の患者の一つの短指伸筋 (EDB) にベクター rAAVrh74.MCK.GALGT2 と各々の患者の他の一つの EDB に生理食塩水のみを両側注射を受ける。第一コホートの対象者は、 3×10^{11} vg (総用量) のベクター用量をうける。第二コホートの対象者は、より高い 1×10^{12} vg (総用量) のベクター用量をうける。

10

【0068】

臨床セッティングへの輸送の直前に、ベクターの適当な希釈液が調製される。注入のための希釈は、通常生理食塩水と 1:1 である。ベクターは、投与まで氷の (凍結されない) 上で保たれ、調製から 8 時間以内に対象者に投与される。rAAVrh74.MCK.GALGT2 の取り扱い、バイオセーフティレベル 1 ベクターの遵守基準に従う。参照、www4.od.nih.gov/oba/RAC/guidelines__02/APPENDIX__G.htm#_Toc72465661。

【0069】

20

対象者は、臨床テストによる筋力低下がみられるものである。DMD の遺伝子的診断は、妥当な病歴の現場において、DMD と一致する DMD 遺伝子突然変異に基づいて確立されている。本研究では、対象者はすべて DMD の症状を示す年齢層内 (すなわち、ステロイド治療なしの 12 歳以下、または、長期にわたるステロイド治療の現場にいる 15 歳以下) の歩行運動を失った非独歩患者である。対象者は、治療に先立ち、安定した用量の副腎皮質ステロイド療法 (プレドニゾンかデフラザコルトのいずれか、または、これらのジェネリック薬) を 12 週間受ける。

【0070】

ベクターまたは対照が対象者の一つの足の短指伸筋 (EDB) に直接筋肉内注射により送達され、もう一つの足は、生理食塩水のみを受ける。12 歳未満の協力者には、意識下鎮静法が用いられる。12 歳以上の患者は、遺伝子導入に先立ち少なくとも 1 時間、意識下鎮静法を受けるかまたは鎮静作用 (ロラゼパムのような) を受ける。加えて、遺伝子導入部位の皮膚は、クリーム基剤 (EMLA クリーム) またはセルロースディスク (EMLA パッチ) に組み込まれたリドカイン/プリロカイン共融混合物によって前処理が行われる。キシロカインクリームなど、同等のクリーム基剤の麻酔が採用される。無菌状態で手順が執り行われる。注入部位は、ヨウ素を含まない手術用スワップで続けて 3 回塗布することで清浄にし、使い捨て無菌のドレープで覆う。通常の臨床用ドップラー超音波が導入を受ける者の周りの無菌のシースと共に用いられ注入現場の無菌状態を保つ。EDB への rAAVrh74.MCK.GALGT2 または偽薬のベクター注入のために、同期 EMG 記録ができる使い捨てミオJECT 針 (MyoJECT Needles) と流動体注入が、筋肉注射の精度を高めるために用いられる。筋肉の解剖学的中心線が皮膚上で同定され、2~6 の別々のベクター注入が筋肉に注入される。注入は、筋肉表面から 0.5 cm の深さである。ベクターの総用量は、1.5 ml 中に 3×10^{11} vg の低用量投与群と 1.5 ml 中に 1×10^{12} vg の高用量投与群である。超音波で測られたベクター送達の中央部と末端部の範囲は、遺伝子導入後の筋生検時の参考のために消えないレントゲンマーカーを付ける。

30

40

【0071】

対象者のバイタルサインの綿密なモニタリングがつづいて行われる。注入後、併用薬物治療が観察され記録される。遺伝子導入後、(もし、副作用が観察されなければ)、対象者は、2 日後退院できる。

50

【 0 0 7 2 】

対象者は、外来通院する。筋生検が45日と90日目に行われる。遺伝子導入後45日と75日、および9、12、18および24か月目の免疫検査は、rAAVrh74への抗体の結合とGALGT2への抗体の結合試験とカプシド抗原に対するT細胞応答を検出するためELISpot試験を含んでいる。対象者は、1年目と2年目の終わりに、身体検査、体力検査と免疫検査を受ける。

【 0 0 7 3 】

実施例3

予後有効度測定

EDB筋から筋生検がおこなわれる。試料は、全てのrAAVrh74・MCK・GALGT2の注入を受けた者に対する追跡分析における盲検を保つため符号がつけられた。

10

【 0 0 7 4 】

予後有効度の測定は、抗-CTエピトープ抗体で示されるGALGT2発現、ウェスタンブロットで定量され密度検査で評価されるGALGT2タンパク質発現、筋肉からのGALGT導入遺伝子のqPCRによって測定され、遺伝子シングルコピー制御に正常化されるベクターゲノムとして表現される形質導入、t-テストによって筋肉間で較べられる中心核を含む繊維の数、およびジストロフィン発現(N-末端、C-末端、および桿状部分に対する抗体による)ウトロフィン発現およびCD45、CD3、CD4、CD8、およびMAC387を含む白血球マーカーを含んでいる。筋肉は身体的外見のため調べられる。rAAVrh74カプシドとGALGTタンパク質の両方に対するPBMC ELISpotsとともにrAAVrh47に対する抗体が、2年に及ぶ研究の間の異なる時々

20

【 0 0 7 5 】

導入遺伝子発現が、一人の対象者の両EDB筋の間で、また45日と90日の対象者の生体組織検査の間で盲検的に比べられた。Aベクター特異プライマープローブセットが、内在性のGALGT2から導入遺伝子発現GALGT2タンパク質を区別する独自の5'非翻訳領域を増強するのに用いられる。筋肉組織の直接免疫蛍光法(IF)およびウェスタンブロット(WB)研究を用いて筋肉の定量化が行われる。CD4+とCD8+単核細胞が免疫染色法により定量され、mm²面積あたりの細胞の数として報告される。MHC IとMHC II抗原発現が筋肉部位で査定される。繊維サイズ度数分布や中心核形成の定量分析を含む、筋肉形態測定も実施される。分析は、ウイルスDNAのPCR分析も含んでいる。

30

【 0 0 7 6 】

免疫反応は、GALGT2とAAVカプシドへのIFN- ELISpotによって査定される。標準偏差2未満のIFN- のウイルスまたは導入遺伝子への上昇は、有意であると考えられる。免疫反応の追加測定は、AAVの抗体結合分析である。

【 0 0 7 7 】

考えられるものとしては、絶対筋力、偏心的筋肉の収縮の間の力減少、血清CK濃度、血清心筋トロポニン濃度、血清MMP9濃度、握力、肢トルク、肢可動性または柔軟性、歩行運動、6分間歩行テスト、膝関節屈筋または伸筋の強度、最大随意筋等尺性収縮、ノースター歩行能力評価、肢T2強調MRI画像による筋肉量、脂肪減少または浮腫測定、筋収縮、肢関節角度、心機能(心拍数、心拍出量、%左室内径短縮率、1回拍出量)、呼吸機能(呼吸数、血中酸素濃度、酸素補給の必要性を含む)、筋肉壊死、筋肉再生、筋消耗、筋肉炎症、筋肉石灰化、筋肉中央核形成、筋肉サイズまたは筋繊維サイズ、寿命、またはジストロフィンまたはラミニン2タンパク質代用物発現(ウトロフィン(utrophin)、プレクチン1(plectin1)、ラミニン5(laminin alpha5)、アグリン(agrinn))の一つ以上の改善の測定がある。例えばForbesら, Radiology, 269(1): 198-207(2013)、Govoniら, Cell Mol. Life Sci., 70(23): 4585-4602(2013)、ならびにChandrasekharanおよびMartin, Metho

40

50

d s E n z y m o l . , 4 7 9 : 2 9 1 - 3 2 2 (2 0 1 0) .

【 0 0 7 8 】

各測定において、遺伝子導入の前と後の試験の間の違いに基づく統計的分析が対応 t 検定を採用して、優位を示す 0 . 0 5 以上の p 値をもって、分析される。

【 0 0 7 9 】

実施例 4

分離式患肢灌流による血管送達

分離式患肢灌流 (I L P) と名付けられる血管送達経路も、ヒト患者の治療のために考慮される。大腿動脈を通じて I L P 送達により、複数の脚筋が目標になり得る。該方法は、形質導入の効率を上昇しウイルスが大循環へ逃れることを防止しすることにより、肢の大循環からの隔離を許すものである (R o d i n o - K l a p a c ら , M o l . T h e r . , 1 8 : 1 0 9 - 1 1 7 (2 0 1 0)) 。例示的治験実施計画が以下に述べられている。

【 0 0 8 0 】

r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 が、上述の実施例 1 と 2 で調製される。

【 0 0 8 1 】

対象者は、治療に先立ち、安定した用量の副腎皮質ステロイド療法 (プレドニゾンかデフラザコルトのいずれか、または、これらのジェネリック薬) を 1 2 週間受ける。プレドニゾン治療も遺伝子導入後続けられる。鎮痛剤で安定化され麻酔された対象者は、外科床に付けられる。基部および末端止血帯が、ニホンザルの膝の上とすね筋の下にゆるく位置づけられる。出血を制御しカテーテル導入を補助するため、小さな切込みを大腿三角につけ、大腿動脈が見分けられ、解放切開され、基部と末端の結索系でゆるく結ばれる。大腿動脈は、大腿に事前に設置されたワイヤーのところまで水洗されたシースを通してセルディング方法によって 3 . 0 F r 導入シースでカニューレ処置された。シースは数センチだけ前に進められ 3 . 0 の編み絹糸で安定化された。

【 0 0 8 2 】

大腿動脈と静脈へのシースの設置に続いて、100 ~ 200 u / k g の未分画ヘパリンを投与し、3 ~ 5 分間循環させる。次に、チョイス P T 冠状ガイドワイアが、始めに右大腿静脈および動脈に挿入され、続いて最終的に左大腿静脈および動脈に挿入される。4 m m 径のバルーンカテーテル (T y s h a k M i n i B a l l o o n c a t h e t e r) が 3 . 3 - フレンチシース (3 . 3 - F r e n c h s h e a t h) を通して、右大腿動脈を通して大腿 - 腸骨動脈接合部に通される。8 m m 径で 2 c m 長さのバルーンカテーテル (8 - m m d i a m e t e r x 2 c m l o n g T y s h a k M i n i B a l l o o n c a t h e t e r) が 4 - フレンチシース (4 - F r e n c h s h e a t h) を通して、右大腿 - 腸骨動脈接合部の適切な位置に通される。希釈された対照の少量手動注入が、左大腿動脈と右大腿静脈両方の適切な閉塞を確認するため行われる。必要ならば、シースとバルーンはより大きなものと取り換えることができる。例えば、右大腿静脈における 4 - フレンチシースは 6 - フレンチシースに替えることができ、12 m m 径で 2 c m 長さのバルーンカテーテル (1 2 m m x 2 c m l o n g T y s h a k I I B a l l o o n c a t h e t e r) がチョイス P T 冠状ガイドワイアを超え適当な位置にまで通される。大腿静脈中の位置と完全な閉塞を確認するため、少量手動注入がシースのサイドアームを通して行われる。

【 0 0 8 3 】

右脚を隔離して、右大腿動脈と大腿静脈両バルーンを膨らませた後、2 m L / k g のヘパリンを添加された乳酸リンゲル液を事前に染渡らせる。1 分後に、乳酸リンゲル液の洗い流しを 2 m L / k g で完了させる。次に、r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 ベクターが、 2×10^{12} v g / k g / 肢 ~ 4.8×10^{13} v g / k g / 肢の間の用量で、8 m L / k g L R の量で、1 分 ~ 1 分 3 0 秒にわたって注入される。(左右の肢灌流が行われるので、患者への総用量は 4×10^{12} v g / k g ~ 9.6×10^{13} v g / k g) である。r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 が送達された後、留める時間を 1 0 分間置き、次に右の大腿深動脈シースを用いて、1 分以上 2 m L / k g のヘパリンを添加され

た乳酸リンゲルを染渡らせる。次にバルーンをすばませ、カテーテルと導入ワイヤーが取り除かれる。

【0084】

次に、同様の手順で左脚が目的とされる。左の大腿動脈が、3.3 フレンチシース (3.3 - French sheaths) で保たれる。チョイスPT冠状ガイドワイアを超えている左大腿動脈における4mm径のバルーンカテーテル (4 - mm diameter Tyshak Mini Balloon catheter) と、同様に3気圧まで膨らませられた、左大腿静脈における5 - フレンチシースを通る12mm径で2cm長さのバルーンカテーテル (12mm x 2cm long Tyshak II Balloon catheter) を用いて、適切な血管閉塞が示される。1分以上の2mL/kgのヘパリンを添加された乳酸リンゲルの注入が繰り返され、rAAVrh74.MCK.GALGT2を 2×10^{12} vg/kg/肢～ 4.8×10^{13} vg/kg/肢の間の用量で、10分の滞留時間をもって1分15秒の間注入される。最後に、2mL/kgのヘパリンを添加された乳酸リンゲルが左大腿深動脈シースを通して注入され、次に、圧迫止血処置をしながら、HemConパッチを用いて、シースが4つの全ての部位から取り除かれる。

10

【0085】

rAAVrh74.MCK.GALGT2の他の必要とする筋肉群へ他の動脈を経て送達するために本処置手順の変形を採用することもできる。例えば、横隔膜、肋間および/または肋骨下動脈を通して横隔膜筋を供給する送達、または冠状動脈を通して心筋を供給する送達が考えられる。各手順のために、同じような用量を用いてもよく、複数の手順を一人の患者、または一人の入院患者に実施してもよい。

20

【0086】

服用の完了時、止血帯とカテーテルが取り除かれ、出血を制御するため、傷に直接圧迫が10分間加えられる。傷は、連続する表皮下の4.0 Vicryl縫合糸によって閉じられる。圧力包帯が該部位にあてられ、対象者が麻酔から覚めるまで保たれる。

【0087】

ILPベクター送達の医療手順に従って、IM - 治療を受けた対象者に対し、上述の対象者の追跡調査と予後有効度の測定/分析が実施される。

【0088】

実施例5

30

全身性血管送達

rAAVrh74.MCK.GALGT2ベクターの考えられる他の送達の方法は、全身性血管送達である。有効性を検査するための模範的用量の段階的増大についての研究は、以下のように実行される

【0089】

用量範囲の決定

日齢1日目の 1.4×10^{15} vg/kgのrAAVrh74.MCK.GALGT2の(尾静脈をへて)IV注入は、野生型マウスにおいて、前脛骨筋、腓腹筋、四頭筋、三頭筋を含む90%以上の全ての肢の骨格筋の形質導入を引き起こし、同用量は、野生型マウスにおいて全ての心筋細胞の50%以上およびmdxモデルマウス心臓において70%以上の心筋細胞の形質導入をもたらす。モック処置済mdx対照動物との比較で、処置後3か月のmdxマウスのあらゆる心臓機能の分析は、この用量のベクターでrAAVrh74.MCK.GALGT2処置の結果として、心拍数を刺激するーアゴニストであるドブタミンによる刺激がある場合またはない場合いずれでも、明らかに心拍出量がほぼ2倍になることが示された。このように、病気と関連する心臓の病理が発症する前にベクターが与えられるとき、rAAVrh74.MCK.GALGT2処置の結果として、ジストロフィン不足の心臓から血流に80%の増量がある。 5×10^{15} vg/kgが、静脈注射を用いて、全身隅々に心臓および骨格筋細胞の全てを形質導入するための最大治療用量と考えられる。このように、約 5×10^{13} vg/kgから 5×10^{15} vg/kgの用量範囲が、第四相臨床試験におけるすべての患者のrAAVrh74.MCK.GAL

40

50

G T 2 治療にとって最少有効量と最適有効量をカバーするものと考えられる。

【 0 0 9 0 】

プロトコル

実施例 1 と 2 に述べられたように、r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 が調製される。

【 0 0 9 1 】

対象者は、r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 投与の 1 日前に、予防的経腸プレドニゾロン（糖質コルチコイド）（約 1 m g / k g / 日）が始められる。プレドニゾロン治療は、遺伝子導入後も続けられる。

【 0 0 9 2 】

r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 注入に先立つ遺伝子導入日（0 日）、バイタルデータ収集とともに、医学的検査が行われる。

【 0 0 9 3 】

もし対象者が、P I 判定で不適切に水分補給されているように見える場合、1 0 ~ 2 0 m L / k g の通常生理食塩水の大量摂取を、入院中と遺伝子導入の間行ってよい。対象者は、遺伝子導入の 8 時間前まで通常の食事をしてよく、その後は、固形食は摂らず、清澄な液体は遺伝子導入の 2 時間前まで許され、その後、完全に絶食となる。対象者は、麻酔前の基準にまで戻った後、通常の経口摂取を再開する。遺伝子導入は、資格を有する麻酔医の指示のもと、鎮静を緩やかなものにする光の下で、無菌状態で行われる。鎮静作用は様々でよいが、対象者は、静脈内経由でのプロポフォールの導入に先立ち亜硝酸の吸引を用いて鎮静化され、セボフルランの吸引またはプロポフォールの滴下によってその状態に保たれる。研究責任者（および麻酔医との相談によって）安全なベクターの送達のために鎮静が必要ではないと決定された対象者においては、鎮静化は見送ってよい。

【 0 0 9 4 】

治験の対象者は皆、末梢肢静脈を経て r A A V r h 7 4 . M C K . G A L G T 2 の静脈注入を受ける。考えられる用量の範囲は、 5×10^{13} v g / k g ~ 5×10^{15} v g / k g である。

【 0 0 9 5 】

一例として、各用量のベクターは、希釈されずに与えられ、5 0 m L かそれ以下に分けられ、ベクトン・ディッキンソンの 6 0 m L 容量のポリプロピレン注射器に満たされ、N C H 治験薬局により調製される。ベクター塩類溶液は約 4 0 0 m O s m o l / L である。注入は、PharmGuard Infusion Management Software Suite を備える Smiths Medical Medfusion 4 0 0 0 Syringe Infusion Pump によって行われ、Smiths Medical M X 5 6 3 注入管によって送達される。注入速度は、いずれの対象者に対しても 2 m L / k g / 分は超えない。注入は、約 1 0 分から 2 0 分にわたり行われる。ベクターは、注入の終わりに、通常生理食塩水を使い注入管から洗い流される。必要ならば、ベクターの用量は分けることができ、違った方法で投与することができると考えられる。

【 0 0 9 6 】

対象者は、注入の間、心拍数、呼吸数、血中酸素濃度や時々の高血圧測定など、副作用を注意深く観察される。心拍数、呼吸数、血中酸素濃度、体温および高血圧は、注入の前と直後、注入の間 5 分ごとに測られ、注入後 1 5 分ごとに繰り返される。

【 0 0 9 7 】

対象者は、遺伝子導入に続いて集中治療床に残り、遺伝子導入後 4 8 時間は病室に留まる。遺伝子導入後、バイタルサインが 1 時間ごとに 4 時間、続いて 4 時間ごとに退院まで記録される。研究責任者の心配がなければ、注入後観察の初めの 2 4 時間の後、集中治療から転床が行われる。

【 0 0 9 8 】

ベクター送達のプロトコルに続き、上述の I M 治療を受けた対象者についてと同じように、対象者の追跡調査と予後有効度分析が行われる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

特定の実施形態の観点から、本発明を述べたが、当業者であれば変形や修正が可能であることは理解されるであろう。従って、特許範囲に述べられている制限のみが本発明を制限するものである。

【 0 1 0 0 】

該特許出願に引用されている全ての文献は、特に触れられている内容とともにその全体が参照として本明細書に組み込まれる。また、本特許出願は、2015年9月17日出願された米国仮出願第62/220107、2015年9月20日出願された米国仮出願第62/221068、と2016年2月に提出された62/301260の権利を主張するものであり、これら全体が本明細書に参照として組み込まれる。

10

【 配 列 表 】

0007338970000001.app

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 P	7/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/10	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/301,260

(32)優先日 平成28年2月29日(2016.2.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/221,068

(32)優先日 平成27年9月20日(2015.9.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マーティン, ポール テイラー

アメリカ合衆国 オハイオ 43209, ベックスリー, メリーランド アベニュー 2520

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 牧野 晃久

(56)参考文献 Molecular Therapy, (2014), Vol. 22, No. 4, p. 713 - 724

Drug Delivery System, 2007, Vol. 22, No. 6, p. 643 - 650

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

CAPLus / WPIDS (STN)

Genbank / EMBL / DDBJ / GENESEQ

UniProt / GENESEQ