(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-519250
(P2018-519250A)
(43)公表日　平成30年7月19日(2018.7.19)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	48/00	4B065
A61P 9/00	***(2006.01)***	A61P	9/00	4C084
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00	4C087
A61P 21/00	***(2006.01)***	A61P	21/00	
A61P 21/04	***(2006.01)***	A61P	21/04	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 48 頁）　最終頁に続く

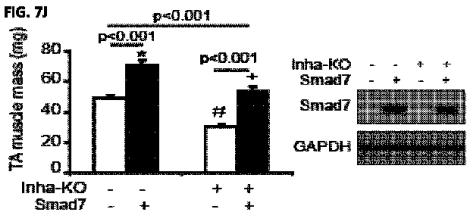
(21)出願番号　特願2017-554845 (P2017-554845)
(86)(22)出願日　平成28年4月22日 (2016.4.22)
(85)翻訳文提出日　平成29年11月14日 (2017.11.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/029018
(87)国際公開番号　WO2016/172608
(87)国際公開日　平成28年10月27日 (2016.10.27)
(31)優先権主張番号　62/151,547
(32)優先日　平成27年4月23日 (2015.4.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　510239406
ワシントン　ステイト　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　ワシントン　９９１６４－１０６０，　プルマン，　ライティ　２８０／２８６，　ピーオー　ボックス　６４１０６０
(71)出願人　310021674
ベイカー　ハート　アンド　ダイアベーツ　インスティテュート
オーストラリア　ヴィクトリア　３００４　メルボルン　コマーシャル　ロード　７５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】治療薬としてのＳＭＡＤ７遺伝子送達

(57)【要約】
Ｓｍａｄ７を発現するアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターおよび組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）などのベクターが本明細書において記載される。開示されるＡＡＶベクターおよびｒＡＡＶは、癌悪液質に関連する筋消耗、心筋消耗および／または骨格筋消耗の処置および改善における治療用途のために使用することができる。具体的には、ｒＡＡＶ構築物は、血清型６（ｒＡＡＶ６）、血清型８（ｒＡＡＶ８）または血清型９（ｒＡＡＶ９）である。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）構築物中にＳｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡを含む組成物であって、前記ｒＡＡＶ構築物が、筋細胞において前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を提供する、組成物。
【請求項２】
前記ｒＡＡＶ構築物が、血清型６（ｒＡＡＶ６）、血清型８（ｒＡＡＶ８）または血清型９（ｒＡＡＶ９）である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡが、ヒト、マウス、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌまたはブタ起源である、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
発現される前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡが構成的に活性型な変異体である、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記ｒＡＡＶ構築物が、筋細胞において前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を指令する組織特異的プロモーターまたはエンハンサーを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
前記ｒＡＡＶ構築物が、心筋細胞、骨格筋細胞またはその両方において前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を提供する、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記ｒＡＡＶ構築物が、前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を筋細胞または心臓細胞に限定する組織特異的サイレンサーを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
被験体における筋肉量および／または筋力を増強する方法であって、治療有効量の請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項９】
前記被験体が筋消耗障害または疾患と診断されていない、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
癌悪液質と診断された被験体における筋消耗を処置する方法であって、癌悪液質を有する被験体を選択すること、および治療有効量の請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項１１】
請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物を使用して、筋消耗を処置して筋力および／または筋体積を増加させる方法。
【請求項１２】
被験体における筋消耗を阻害または予防する方法であって、治療有効量の請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項１３】
前記筋消耗が慢性障害によって引き起こされる、請求項１０、１１または１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記慢性障害が、癌、老化（サルコペニア）、筋ジストロフィー、ミオパシー、腎疾患、慢性閉塞性肺障害、慢性感染症、ＡＩＤＳ、廃用性萎縮症、神経筋傷害、ニューロパシー、肥満症、心血管疾患またはそれらの２つもしくはそれを超える組み合わせを含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
筋消耗が微小重力ストレスによって引き起こされる、請求項１０、１１または１２に記載の方法。

【請求項１６】
前記筋消耗が、心筋、骨格筋またはその両方の消耗を含む、請求項１０、１１または１２に記載の方法。
【請求項１７】
筋肉内注射または静脈内注射を介して前記組成物を送達することを含む、請求項８～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記ｒＡＡＶを投与することが、単回用量のｒＡＡＶの投与を含む、請求項８～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記ｒＡＡＶを投与することが、複数回用量のｒＡＡＶの投与を含む、請求項８～１６のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、２０１５年４月２３日に出願された米国仮出願番号第６２／１５１，５４７号に基づく利益を主張しており、この仮出願は、その全体が参考として本明細書中に援用される。
【０００２】
連邦政府の資金の認諾
本発明の特定の局面は、少なくとも部分的に、国立科学財団（ＩＯＳ１１４７２７５）、筋ジストロフィー協会（２１６６０２）、および国立保健医療協会、オーストラリア（１０４６７８２）によって支援された。
【０００３】
参照による配列表の組み込み
配列表は、２０１６年４月２２日に作成された約１２ＫＢの９６５５４－０１＿ＳｅｑＬｉｓｔ．ｔｘｔというファイル名のＡＳＣＩＩテキストファイル（これは、参照により本明細書に組み込まれる）として提出される。
【背景技術】
【０００４】
背景
腫瘍由来因子は、進行癌を有する患者の最大８０％において悪液質（筋肉および脂肪の重度萎縮症を特徴とする顕著な体重減少、衰弱および疲労の状態）を誘導する（Ｔｉｓｄａｌｅ，Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｒｅｖ ８９，３８１－４１０，２００９；Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２）。これらの患者におけるＩＩＢ型アクチビン受容体（ＡｃｔＲＩＩＢ）リガンドの阻害の治療可能性に多くの関心が集まっている。なせなら、この経路は筋肉異化を刺激し、これらのリガンドの発現は筋消耗と共に上昇することが多いからである（Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２；Ｌｅｅ＆Ｇｌａｓｓ，Ｓｋｅｌｅｔ Ｍｕｓｃｌｅ １，２，２０１１，ｄｏｉ：１０．１１８６／２０４４－５０４０－１－２）。実際、他の悪液質促進性サイトカインが依然として上昇しているという事実にもかかわらず、循環型の改変ＡｃｔＲＩＩＢまたは他の「リガンドトラップ」（例えば、可溶性ＡｃｔＲＩＩＢ、ＡＣＥ－０３１、免疫中和など）は筋消耗を回復させ、寿命を増加させ得る（Ｋｌｉｍｅｋら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３９１，１５４８－１５５４，２０１０；Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０）。したがって、筋肉におけるＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達を選択的に防止する介入は、癌悪液質の処置において有益であることが証明された（Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ

１４２，５３１－５４３，２０１０）。しかしながら、ＡｃｔＲＩＩＢリガンドは、生殖および血管新生を含む多くの器官系に重要であるので、循環または細胞外環境におけるこれらのリガンドのターゲティングは、有害かつ深刻なオフターゲット効果をもたらし得る（Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １３，６１６－６３０，２０１２）。

【０００５】

例えば、粘膜からの出血および皮膚血管拡張を含む遺伝性出血性毛細血管拡張症（ＨＨＴ）を有する患者において見られることが多い兆候の誘導が原因で、ＡＣＥ－０３１（ＡｃｔＲＩＩＢの細胞外ドメインから主に構成されるペプチボディリガンドトラップ）の臨床研究は早期に終了した（Ｓｍｉｔｈ＆Ｌｉｎ，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｕｐｐｏｒｔ Ｐａｌｌｉａｔ Ｃａｒｅ ７，３５２－３６０，２０１３）。したがって、循環中のＡｃｔＲＩＩＢリガンドをターゲティングする他のアプローチは、同様のオフターゲット効果をもたらし得る。この疾患は、最終的には内皮細胞におけるＴＧＦβ受容体シグナル伝達を損なう２つのシグナル伝達タンパク質（エンドグリンまたはアクチビン様キナーゼ－１）の突然変異に起因する。ＨＨＴを有する患者、およびこの疾患のマウスモデルでは、血管の完全性が同様に損なわれる（Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １０４，１３４３－１３５１，１９９９；Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １５６，９１１－９２３，２０００；Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ Ｍｅｄ １０，２７９－２８５，２０００；Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １５８，２０１１－２０２０，２００１；Ｓａｔｏｍｉら、Ｓｔｒｏｋｅ ３４，７８３－７８９，２００３；Ｔｏｒｓｎｅｙら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １０７，１６５３－１６５７，２００３）。実際、これらのモデルは、鼻、耳および尾において出血を発症し、これらはすべて、外部検査で容易に見ることができ、尾の部分的な欠落をさらに引き起こし得る。出血は、いくつかの内部器官においても起こり、肝臓および肺において組織学的に最も明確であるが、出血の病巣部位は、肉眼的検査でも明らかに明白であった。幾匹のマウスは、脳内の動静脈奇形による脳卒中を一層患っており、これは筋弛緩症および下垂症として現れ、やはり容易に検出された。

【０００６】

活性化されたら、ＡｃｔＲＩＩＢは、Ｉ型アクチビン受容体（アクチビン様キナーゼ（ＡＬＫ）４／５）をリクルートして、Ｓｍａｄ２／３をリン酸化する活性化ＡｃｔＲＩＩＢ：ＡＬＫ４／５複合体を形成する（Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １３，６１６－６３０，２０１２）。次いで、これらの受容体ＳｍａｄはＳｍａｄ４に結合して、複合体が核に侵入し、Ｅ３ユビキチンリガーゼＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘをアップレギュレートし、Ａｋｔを脱リン酸化するタンパク質分解転写プログラムを改変することを可能にする（Ａｍｉｒｏｕｃｈｅら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １５０，２８６－２９４，２００９；Ｔｒｅｎｄｅｌｅｎｂｕｒｇら、Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２９６，Ｃ１２５８－１２７０，２００９）。この経路はまた、Ｓｍａｄ２／３リン酸化を防止し、ＡｃｔＲＩ分解を促進する細胞内ネガティブフィードバックの一形態として、Ｓｍａｄ７発現をアップレギュレートする（Ｃｈｅｎら、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ １２，２１４４－２１５２，１９９８）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｔｉｓｄａｌｅ，Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｒｅｖ ８９，３８１－４１０，２００９

【非特許文献２】Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２）。

【非特許文献３】Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２

【非特許文献４】Ｌｅｅ＆Ｇｌａｓｓ，Ｓｋｅｌｅｔ Ｍｕｓｃｌｅ １，２，２０１１

，ｄｏｉ：１０．１１８６／２０４４－５０４０－１－２
【非特許文献５】Ｋｌｉｍｅｋら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３９１，１５４８－１５５４，２０１０
【非特許文献６】Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０
【非特許文献７】Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０
【非特許文献８】Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １３，６１６－６３０，２０１２
【非特許文献９】Ｓｍｉｔｈ＆Ｌｉｎ，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｕｐｐｏｒｔ Ｐａｌｌｉａｔ Ｃａｒｅ ７，３５２－３６０，２０１３
【非特許文献１０】Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １０４，１３４３－１３５１，１９９９
【非特許文献１１】Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １５６，９１１－９２３，２０００
【非特許文献１２】Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ Ｍｅｄ １０，２７９－２８５，２０００
【非特許文献１３】Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １５８，２０１１－２０２０，２００１
【非特許文献１４】Ｓａｔｏｍｉら、Ｓｔｒｏｋｅ ３４，７８３－７８９，２００３
【非特許文献１５】Ｔｏｒｓｎｅｙら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １０７，１６５３－１６５７，２００３
【非特許文献１６】Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １３，６１６－６３０，２０１２
【非特許文献１７】Ａｍｉｒｏｕｃｈｅら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １５０，２８６－２９４，２００９
【非特許文献１８】Ｔｒｅｎｄｅｌｅｎｂｕｒｇら、Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２９６，Ｃ１２５８－１２７０，２００９
【非特許文献１９】Ｃｈｅｎら、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ １２，２１４４－２１５２，１９９８）

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
例示的な態様の概要
本発明者らは、リガンドトラップのオフターゲット効果を回避し得る可能性があるので、リガンド（ミオスタチン、アクチビンおよびＧＤＦ－１１）よりもむしろ細胞内ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達経路を減衰することによって、悪液質を処置するための改善された戦略を開発しようとした。本発明者らは、特に横紋筋におけるＳｍａｄ７発現の増加が、ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達を減衰することによって、筋消耗を改善し得ることを示した。リガンドトラップの潜在的なオフターゲット効果を回避しつつこの目標を達成するために、本発明者らは、横紋筋に対する特異的親和性（ｔｒｏｐｉｓｍ）を有する組換えアデノ随伴ウイルスベクター（血清型６、ｒＡＡＶ６）（Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、Ｎａｔ Ｍｅｄ １０，８２８－８３４，２００４；参照により本明細書に組み込まれる）を利用した。実際、本発明者らの研究は、特に横紋筋におけるＳｍａｄ７の過剰発現が筋肉量および筋肉機能を増強するだけではなく、限定されないが、癌悪液質、糖尿病、肥満症、心血管疾患および老化を含む筋消耗の様々な症状下で消耗を予防し得ることを示している。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
特定の態様は、進行癌を有する患者が、重度の横紋筋消耗により死亡することが多いことを実証する。ＡｃｔＲＩＩＢの活性化は、この異化の基礎となる重要な機構と考えられるが、循環ＡｃｔＲＩＩＢリガンドをアンタゴナイズすることによってそれを予防するための介入は、オフターゲット効果によって妨害されている。横紋筋に対する規定の親和性

を有する組換えアデノ随伴ウイルスベクター（血清型６、ｒＡＡＶ６）［ｒＡＡＶ：Ｓｍａｄ７］でＳｍａｄ７を過剰発現させることによるＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達の減衰は、健常マウスでは骨格筋の量および機能を増強した一方、Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、それは、腫瘍負荷および悪液質促進性リガンドの血清レベルとは無関係に、骨格筋および心筋の萎縮を予防した。

【００１０】

さらなる態様によれば、ｒＡＡＶ：Ｓｍａｄ７はまた、ミオスタチンまたはアクチビンＡの過剰発現を有するインヒビンαノックアウトマウスにおける消耗を予防した。Ｓｍａｄ７活性のバイオマーカーと同様に、Ｓｍａｄ７発現は横紋筋のみに限定されていたので、オフターゲット効果は検出されなかった。機構的には、Ｓｍａｄ７はＳｍａｄ２／３シグナル伝達を無効化し、萎縮症関連ユビキチンリガーゼＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘの発現を阻害した。

【００１１】

またさらなる態様によれば、これらの知見は、Ｓｍａｄ７のベクター媒介性筋肉特異的発現が、筋消耗または過度のＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達さえをも予防するための新規アプローチであるだけではなく、深刻なオフターゲット効果のリスクを限定して筋肉量および筋肉機能を増強するための手段であることを示している。

【００１２】

したがって、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）構築物中にＳｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡを含む組成物であって、前記ｒＡＡＶ構築物が、筋細胞において前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を（構成的にまたは別様に）提供する組成物が本明細書で提供される。このような組成物の非限定的な例として、特定の実施形態では、ｒＡＡＶ構築物は、血清型６（ｒＡＡＶ６）、血清型８（ｒＡＡＶ８）または血清型９（ｒＡＡＶ９）である。このような組成物の非限定的な例として、特定の実施形態では、Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡは、ヒト、マウス、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌまたはブタ起源のものである。

【００１３】

さらなる実施形態では、ｒＡＡＶ構築物は、筋細胞においてＳｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を指令する組織特異的プロモーターまたはエンハンサーを含む。あるいは、ｒＡＡＶ構築物は、心筋細胞、骨格筋細胞またはその両方においてＳｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を提供する。そして、またさらなる実施形態では、ｒＡＡＶ構築物は、Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を筋細胞または心臓細胞に限定する組織特異的サイレンサーを含む。

【００１４】

さらなる実施形態は、被験体における筋肉量および／または筋力を増強する方法であって、本明細書で提供される組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）構築物中にＳｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡを含む治療有効量を前記被験体に投与することを含む方法である。このような方法の例では、被験体は、筋消耗障害または疾患と診断されていない。例えば、このような方法における被験体は、一般に健康であり得る。したがって、本明細書では、被験体の筋肉量および／または筋力をベースラインまたは「正常」よりも高く増強するための、本明細書に記載される組成物および方法の美容的または選択的使用が企図される。

【００１５】

別の実施形態では、癌悪液質と診断された被験体における筋消耗（例えば、心筋、骨格筋またはその両方の萎縮）を処置する方法であって、癌悪液質を有する被験体を選択すること、および組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）構築物中にＳｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡを含む組成物のいずれか１つの治療有効量の組成物を前記被験体に投与することを含み、前記ｒＡＡＶ構築物が、筋細胞において前記Ｓｍａｄ７の遺伝子またはｃＤＮＡの発現を（構成的にまたは別様に）提供する方法である。また、このような組成物を使用して、筋消耗を処置して筋力および／または筋体積を増加させる方法が提供される。さ

らなる実施形態は、被験体における筋消耗を阻害または予防する方法であって、治療有効量のこのような組成物を前記被験体に投与することを含む方法である。

【００１６】

処置方法の実施形態における一例として、筋消耗は、いくつかの場合において、慢性障害によって引き起こされる。限定されないが、様々な場合において、慢性障害は、癌、老化（サルコペニア）、筋ジストロフィー、ミオパシー、腎疾患、慢性閉塞性肺障害、慢性感染症、ＡＩＤＳ、廃用性萎縮症、神経筋傷害、ニューロパシー、肥満症、心血管疾患またはそれらの２つもしくはそれを超える組み合わせを含む。あるいは、筋消耗は、微小重力ストレスによって引き起こされる。

【００１７】

提供される方法の実施形態ではいずれも、組成物は、いくつかの場合において、筋肉内注射または静脈内注射を介して送達され得る。

【００１８】

提供される方法の実施形態ではいずれも、ｒＡＡＶの投与は、いくつかの場合において、単回用量のｒＡＡＶの投与を含み得る。他の例では、前記方法は、複数回用量のｒＡＡＶの投与を含み得る。

【００１９】

上記のおよび他の特徴および利点は、添付の図面を参照しながら進行するいくつかの実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１ＡＢＣ】図１Ａ～１Ｉは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７の発現増加が骨格筋肥大を促進することを示す。（図１Ａ～１Ｂ）マウス四肢筋肉へのｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の注射は、筋肉量を７～２８日間増加させた。（図１Ｃ～１Ｄ）筋肥大は、筋線維直径の増加に関連していた（＊、対照に対してｐ＝０．０３、処置当たり３つの筋肉で、約５００本の筋線維をカウントした、ｔ検定）。スケールバー、１００μｍ。（図１Ｅ～１Ｆ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７をマウスに静脈内注射し、２８日後、これは、ＴＡ（＊、対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝３、ｔ検定）、大腿四頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．００４、ｎ＝３、ｔ検定）および三頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．００３、ｎ＝３、ｔ検定）の肥大、ならびにＴＡ、大腿四頭筋および心臓におけるＳｍａｄ７タンパク質発現の上昇をもたらした。（図１Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、投与後の３つの時点のすべてにおいて、Ｓｍａｄ３のリン酸化を抑制した（＊、対照に対してｐ＝０．００６、ｎ＝４、Ｔ検定）。（図１Ｈ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡ（ｎ＝３）、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７（ｎ＝５）またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡ（ｎ＝５）のいずれかを注射したマウスを、ＴＡ量およびタンパク質発現の効果について処置の２８日後に検査した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｓｍａｄ７に対してｐ＜０．００１、一元配置ＡＮＯＶＡによる）。（図１Ｉ）ヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡを投与した２８日後に検査した筋肉中の筋線維が、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７単独の場合と比較して小さいことを実証している。スケールバー、１００μｍ。

【図１ＤＥＦ】図１Ａ～１Ｉは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７の発現増加が骨格筋肥大を促進することを示す。（図１Ａ～１Ｂ）マウス四肢筋肉へのｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の注射は、筋肉量を７～２８日間増加させた。（図１Ｃ～１Ｄ）筋肥大は、筋線維直径の増加に関連していた（＊、対照に対してｐ＝０．０３、処置当たり３つの筋肉で、約５００本の筋線維をカウントした、ｔ検定）。スケールバー、１００μｍ。（図１Ｅ～１Ｆ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７をマウスに静脈内注射し、２８日後、これは、ＴＡ（＊、対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝３、ｔ検定）、大腿四頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．００４、ｎ＝３、ｔ検定）および三頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．００３、ｎ＝３、ｔ検定）の肥大、ならびにＴＡ、大腿四頭筋および心臓におけるＳｍａｄ７タンパク質発現の上昇をもたらした。（図１Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、投与後の３つの時点のすべてにお

いて、Ｓｍａｄ３のリン酸化を抑制した（＊、対照に対してｐ＝０．００６、ｎ＝４、Ｔ検定）。（図１Ｈ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡ（ｎ＝３）、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７（ｎ＝５）またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡ（ｎ＝５）のいずれかを注射したマウスを、ＴＡ量およびタンパク質発現の効果について処置の２８日後に検査した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｓｍａｄ７に対してｐ＜０．００１、一元配置ＡＮＯＶＡによる）。（図１Ｉ）ヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡを投与した２８日後に検査した筋肉中の筋線維が、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７単独の場合と比較して小さいことを実証している。スケールバー、１００μｍ。

【図１ＧＨＩ】図１Ａ～１Ｉは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７の発現増加が骨格筋肥大を促進することを示す。（図１Ａ～１Ｂ）マウス四肢筋肉へのｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の注射は、筋肉量を７～２８日間増加させた。（図１Ｃ～１Ｄ）筋肥大は、筋線維直径の増加に関連していた（＊、対照に対してｐ＝０．０３、処置当たり３つの筋肉で、約５００本の筋線維をカウントした、ｔ検定）。スケールバー、１００μｍ。（図１Ｅ～１Ｆ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７をマウスに静脈内注射し、２８日後、これは、ＴＡ（＊、対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝３、ｔ検定）、大腿四頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．００４、ｎ＝３、ｔ検定）および三頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．００３、ｎ＝３、ｔ検定）の肥大、ならびにＴＡ、大腿四頭筋および心臓におけるＳｍａｄ７タンパク質発現の上昇をもたらした。（図１Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、投与後の３つの時点のすべてにおいて、Ｓｍａｄ３のリン酸化を抑制した（＊、対照に対してｐ＝０．００６、ｎ＝４、Ｔ検定）。（図１Ｈ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡ（ｎ＝３）、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７（ｎ＝５）またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡ（ｎ＝５）のいずれかを注射したマウスを、ＴＡ量およびタンパク質発現の効果について処置の２８日後に検査した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｓｍａｄ７に対してｐ＜０．００１、一元配置ＡＮＯＶＡによる）。（図１Ｉ）ヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡを投与した２８日後に検査した筋肉中の筋線維が、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７単独の場合と比較して小さいことを実証している。スケールバー、１００μｍ。

【００２１】

【図２ＡＢ】図２Ａ～２Ｄは、特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与の特異性および骨格筋肥大の誘導を示す。（図２Ａ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の静脈内投与後、（ウエスタンブロッティングによって決定した）Ｓｍａｄ７タンパク質発現は、マウスの肝臓、腎臓、肺、脾臓または脂肪ではなく骨格筋および心臓において検出された。（図２Ｂ）野生型マウス（偽）、Ｃ２６腫瘍を有するマウス、およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射したＣ２６マウスの非筋肉組織におけるＳｍａｄ２／３遺伝子標的の遺伝子発現（ＣＴＧＦ、結合組織成長因子；ＣＯＬ１Ａ１、コラーゲン１ａ１型；ＰＡＩ１、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子１；ＦＮ、フィブロネクチン）。Ｃ２６とＣ２６＋Ｓｍａｄ７との間で有意差は検出されなかった（＊偽と比較してｐ＜０．０５）。（図２Ｃ）ファン・ギーソン染色を使用したインタクトな血管の組織学的証拠、およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を与えたマウス由来の組織における出血の欠如。（図２Ｄ）代表的なヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片によって実証されているように、筋線維直径は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７によって増加した（スケールバー、１００μｍ）。

【図２ＣＤ】図２Ａ～２Ｄは、特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与の特異性および骨格筋肥大の誘導を示す。（図２Ａ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の静脈内投与後、（ウエスタンブロッティングによって決定した）Ｓｍａｄ７タンパク質発現は、マウスの肝臓、腎臓、肺、脾臓または脂肪ではなく骨格筋および心臓において検出された。（図２Ｂ）野生型マウス（偽）、Ｃ２６腫瘍を有するマウス、およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射したＣ２６マウスの非筋肉組織におけるＳｍａｄ２／３遺伝子標的の遺伝子発現（ＣＴＧＦ、結合組織成長因子；ＣＯＬ１Ａ１、コラーゲン１ａ１型；ＰＡＩ１、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子１；ＦＮ、フィブロネクチン）。Ｃ２６とＣ２６＋Ｓｍａ

ｄ７との間で有意差は検出されなかった（＊偽と比較してｐ＜０．０５）。（図２Ｃ）ファン・ギーソン染色を使用したインタクトな血管の組織学的証拠、およびｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を与えたマウス由来の組織における出血の欠如。（図２Ｄ）代表的なヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片によって実証されているように、筋線維直径は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７によって増加した（スケールバー、１００μｍ）。

【００２２】

【図３ＡＢＣ】図３Ａ～３Ｇは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、ＡｋｔおよびｍＴＯＲシグナル伝達とは無関係に、骨格筋成長を調節することを示す。（図３Ａ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を筋肉内注射した１４日後に検査した筋肉は、タンパク質合成速度のアップレギュレーションを示した（ｎ＝５～６、ｔ検定）。（図３Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７をマウスに注射し、２８日後、Akt^{S473}またはその基質$GSK3\beta^{S9/21}$および$TSC2^{S939}$のリン酸化は増加しなかった（ＮＤ＝差異なし、ｎ＝６～７、ｔ検定）。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、$S6RP^{S235/236}$（ｎ＝６／処置、ｔ検定）および$4EBP1^{T37/42}$（ｎ＝４～５／処置、ｔ検定）のリン酸化を増加させる。（図３Ｃ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７送達の２８日後に、Ａｋｔキナーゼ活性は変化しなかった。Ｎｅｇ＝ＡＴＰを追加しない陰性対照。全Ａｋｔレベルに対してｐＡｋｔを正規化した（ｎ＝５、ｔ検定）。（図３Ｄ）ラパマイシン投与は、$S6RP^{S235/236}$（ｎ＝４～５、二元配置ＡＮＯＶＡ）および$4EBP1^{T37/43}$（ｎ＝３、二元配置ＡＮＯＶＡ）のリン酸化を阻害した。（図３Ｅ）ラパマイシンを、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置した動物に毎日投与した（ｎ＝６）。前脛骨筋（ＴＡ）量は、反対側の対照筋肉に対する変化率として表される。（図３Ｆ）処置の１４日後において、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、ＭＡＦｂｘ（ｎ＝９～１１、ｔ検定）およびＭｕＲＦ１（ｎ＝９～１１、ｔ検定）の転写を抑制した一方、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡは、両方（ｎ＝４、ｔ検定）を増加させた。（図３Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡとｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７との同時投与は、ＭＡＦｂｘ（ｎ＝５）およびＭｕＲＦ１（ｎ＝５）転写に対するＳｍａｄ７の阻害効果を防止した（ｎ＝５、ｔ検定）。

【図３ＤＥ】図３Ａ～３Ｇは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、ＡｋｔおよびｍＴＯＲシグナル伝達とは無関係に、骨格筋成長を調節することを示す。（図３Ａ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を筋肉内注射した１４日後に検査した筋肉は、タンパク質合成速度のアップレギュレーションを示した（ｎ＝５～６、ｔ検定）。（図３Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７をマウスに注射し、２８日後、Akt^{S473}またはその基質$GSK3\beta^{S9/21}$および$TSC2^{S939}$のリン酸化は増加しなかった（ＮＤ＝差異なし、ｎ＝６～７、ｔ検定）。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、$S6RP^{S235/236}$（ｎ＝６／処置、ｔ検定）および$4EBP1^{T37/42}$（ｎ＝４～５／処置、ｔ検定）のリン酸化を増加させる。（図３Ｃ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７送達の２８日後に、Ａｋｔキナーゼ活性は変化しなかった。Ｎｅｇ＝ＡＴＰを追加しない陰性対照。全Ａｋｔレベルに対してｐＡｋｔを正規化した（ｎ＝５、ｔ検定）。（図３Ｄ）ラパマイシン投与は、$S6RP^{S235/236}$（ｎ＝４～５、二元配置ＡＮＯＶＡ）および$4EBP1^{T37/43}$（ｎ＝３、二元配置ＡＮＯＶＡ）のリン酸化を阻害した。（図３Ｅ）ラパマイシンを、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置した動物に毎日投与した（ｎ＝６）。前脛骨筋（ＴＡ）量は、反対側の対照筋肉に対する変化率として表される。（図３Ｆ）処置の１４日後において、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、ＭＡＦｂｘ（ｎ＝９～１１、ｔ検定）およびＭｕＲＦ１（ｎ＝９～１１、ｔ検定）の転写を抑制した一方、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡは、両方（ｎ＝４、ｔ検定）を増加させた。（図３Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡとｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７との同時投与は、ＭＡＦｂｘ（ｎ＝５）およびＭｕＲＦ１（ｎ＝５）転写に対するＳｍａｄ７の阻害効果を防止した（ｎ＝５、ｔ検定）。

【図３ＦＧ】図３Ａ～３Ｇは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、ＡｋｔおよびｍＴＯＲシグナル伝達とは無関係に、骨格筋成長を調節することを示す。（図３Ａ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を筋肉内注射した１４日後に検査した筋肉は、タンパク質合成速度のアップレギュレーションを示した（ｎ＝５～６、ｔ検定）。（図３Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７

をマウスに注射し、２８日後、Ａｋｔ^{Ｓ４７３}またはその基質ＧＳＫ３β$^{Ｓ９／２１}$およびＴＳＣ２^{Ｓ９３９}のリン酸化は増加しなかった（ＮＤ＝差異なし、ｎ＝６～７、ｔ検定）。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、ＳＲＰ$^{Ｓ２３５／２３６}$（ｎ＝６／処置、ｔ検定）および４ＥＢＰ１$^{Ｔ３７／４２}$（ｎ＝４～５／処置、ｔ検定）のリン酸化を増加させる。（図３Ｃ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７送達の２８日後に、Ａｋｔキナーゼ活性は変化しなかった。Ｎｅｇ＝ＡＴＰを追加しない陰性対照。全Ａｋｔレベルに対してｐＡｋｔを正規化した（ｎ＝５、ｔ検定）。（図３Ｄ）ラパマイシン投与は、ＳＲＰ$^{Ｓ２３５／２３６}$（ｎ＝４～５、二元配置ＡＮＯＶＡ）および４ＥＢＰ１$^{Ｔ３７／４３}$（ｎ＝３、二元配置ＡＮＯＶＡ）のリン酸化を阻害した。（図３Ｅ）ラパマイシンを、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置した動物に毎日投与した（ｎ＝６）。前脛骨筋（ＴＡ）量は、反対側の対照筋肉に対する変化率として表される。（図３Ｆ）処置の１４日後において、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、ＭＡＦｂｘ（ｎ＝９～１１、ｔ検定）およびＭｕＲＦ１（ｎ＝９～１１、ｔ検定）の転写を抑制した一方、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡは、両方（ｎ＝４、ｔ検定）を増加させた。（図３Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ３－ＣＡとｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７との同時投与は、ＭＡＦｂｘ（ｎ＝５）およびＭｕＲＦ１（ｎ＝５）転写に対するＳｍａｄ７の阻害効果を防止した（ｎ＝５、ｔ検定）。

【００２３】

【図４ＡＢＣ】図４Ａ～４Ｇは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７がミオスタチンおよびアクチビン誘導性筋萎縮症を予防することを示す。（図４Ａ～４Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７局所投与の１４日後（＊、Ｍｓｔｎ＋／＋対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＝０．００３、＋、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～６、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）および２８日後（＊、Ｍｓｔｎ＋／＋対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＝０．００１、＋、Ｍｓｔｎ＋／＋に対してｐ＝０．０１　Ｍｓｔｎ－／－、ｎ＝６～８、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）に、野生型マウスおよびミオスタチンヌルマウスにおいて、筋肉量および筋線維を検査した。スケールバー＝１００μｍ。（図４Ｃ）２８日後、ミオスタチンヌルマウスでは、Ｓｍａｄ７は、比較的少ない肥大を誘導した（＊、対照に対してｐ＝０．０３、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図４Ｄ）ミオスタチンヌルマウス（＊、対照に対してｐ＝０．００６、ｎ＝４、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）では、野生型マウス（＊、対照に対してｐ＝０．００１、ｎ＝４、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）と比較して、Ｓｍａｄ７によるＳｍａｄ３$^{Ｓ４３２／４３５}$リン酸化の阻害が維持されていた。（図４Ｅ～４Ｆ）処置の２８日後に、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を単独で、またはｒＡＡＶ６：ミオスタチン（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｓｍａｄ７に対してｐ＝０．００４、ｎ＝７～１５、一元配置ＡＮＯＶＡ）もしくはｒＡＡＶ６：アクチビンＡ（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００３、ｎ＝３～６、一元配置ＡＮＯＶＡ）と共に投与した。（図４Ｇ）単独で、およびＳｍａｄ７の存在下でミオスタチン（＊、対照に対してｐ＝０．０１５、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｍｓｔｎ処置に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～９、一元配置ＡＮＯＶＡ）またはアクチビンＡ（＊、対照に対してｐ＝０．０１、＃、対照処置に対してｐ＜０．００１、＋、Ａｃｔ　Ａ処置に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７、一元配置ＡＮＯＶＡ）を発現する筋肉におけるＳｍａｄ３$^{Ｓ４３２／４３５}$リン酸化。

【図４ＤＥＦ】図４Ａ～４Ｇは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７がミオスタチンおよびアクチビン誘導性筋萎縮症を予防することを示す。（図４Ａ～４Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７局所投与の１４日後（＊、Ｍｓｔｎ＋／＋対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＝０．００３、＋、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～６、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）および２８日後（＊、Ｍｓｔｎ＋／＋対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＝０．００１、＋、Ｍｓｔｎ＋／＋に対してｐ＝０．０１　Ｍｓｔｎ－／－、ｎ＝６～８、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）に、野生型マウスおよびミオスタチンヌルマウスにおいて、筋肉量および筋線維を検査した。スケールバー＝１００μｍ。（図４Ｃ）２８日後、ミオスタチンヌルマウスで

は、Ｓｍａｄ７は、比較的少ない肥大を誘導した（＊、対照に対してｐ＝０．０３、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図４Ｄ）ミオスタチンヌルマウス（＊、対照に対してｐ＝０．００６、ｎ＝４、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）では、野生型マウス（＊、対照に対してｐ＝０．００１、ｎ＝４、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）と比較して、Ｓｍａｄ７によるＳｍａｄ３$^{Ｓ４３２／４３５}$リン酸化の阻害が維持されていた。（図４Ｅ～４Ｆ）処置の２８日後に、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を単独で、またはｒＡＡＶ６：ミオスタチン（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｓｍａｄ７に対してｐ＝０．００４、ｎ＝７～１５、一元配置ＡＮＯＶＡ）もしくはｒＡＡＶ６：アクチビンＡ（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００３、ｎ＝３～６、一元配置ＡＮＯＶＡ）と共に投与した。（図４Ｇ）単独で、およびＳｍａｄ７の存在下でミオスタチン（＊、対照に対してｐ＝０．０１５、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｍｓｔｎ処置に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～９、一元配置ＡＮＯＶＡ）またはアクチビンＡ（＊、対照に対してｐ＝０．０１、＃、対照処置に対してｐ＜０．００１、＋、Ａｃｔ　Ａ処置に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７、一元配置ＡＮＯＶＡ）を発現する筋肉におけるＳｍａｄ３$^{Ｓ４３２／４３５}$リン酸化。

【図４Ｇ】図４Ａ～４Ｇは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７がミオスタチンおよびアクチビン誘導性筋萎縮症を予防することを示す。（図４Ａ～４Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７局所投与の１４日後（＊、Ｍｓｔｎ＋／＋対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＝０．００３、＋、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～６、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）および２８日後（＊、Ｍｓｔｎ＋／＋対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｍｓｔｎ－／－対照に対してｐ＝０．００１、＋、Ｍｓｔｎ＋／＋に対してｐ＝０．０１　Ｍｓｔｎ－／－、ｎ＝６～８、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）に、野生型マウスおよびミオスタチンヌルマウスにおいて、筋肉量および筋線維を検査した。スケールバー＝１００μｍ。（図４Ｃ）２８日後、ミオスタチンヌルマウスでは、Ｓｍａｄ７は、比較的少ない肥大を誘導した（＊、対照に対してｐ＝０．０３、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図４Ｄ）ミオスタチンヌルマウス（＊、対照に対してｐ＝０．００６、ｎ＝４、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）では、野生型マウス（＊、対照に対してｐ＝０．００１、ｎ＝４、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）と比較して、Ｓｍａｄ７によるＳｍａｄ３$^{Ｓ４３２／４３５}$リン酸化の阻害が維持されていた。（図４Ｅ～４Ｆ）処置の２８日後に、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を単独で、またはｒＡＡＶ６：ミオスタチン（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｓｍａｄ７に対してｐ＝０．００４、ｎ＝７～１５、一元配置ＡＮＯＶＡ）もしくはｒＡＡＶ６：アクチビンＡ（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００３、ｎ＝３～６、一元配置ＡＮＯＶＡ）と共に投与した。（図４Ｇ）単独で、およびＳｍａｄ７の存在下でミオスタチン（＊、対照に対してｐ＝０．０１５、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｍｓｔｎ処置に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～９、一元配置ＡＮＯＶＡ）またはアクチビンＡ（＊、対照に対してｐ＝０．０１、＃、対照処置に対してｐ＜０．００１、＋、Ａｃｔ　Ａ処置に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７、一元配置ＡＮＯＶＡ）を発現する筋肉におけるＳｍａｄ３$^{Ｓ４３２／４３５}$リン酸化。

【００２４】

【図５】図５Ａ～５Ｃは、特定の態様によれば、単独投与またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７との同時投与中に、ミオスタチンおよびアクチビンＡが同程度に発現されることを示す。ｒＡＡＶ６投与の２８日後に、ＲＴ－ＰＣＲによって、（図５Ａ）アクチビンＡおよび（図５Ｂ）ミオスタチン導入遺伝子の遺伝子発現を決定した。アクチビンＡまたはミオスタチン遺伝子発現は、Ｓｍａｄ７と同時発現させた場合、アクチビンＡまたはミオスタチン単独の発現レベルと比較して差異がなかった（ＮＤ＝差異なし、ｎ＝３～６、ｔ検定）。（図５Ｃ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７および／またはｒＡＡＶ６：Ｍｓｔｎを同様に与えたマウスの前脛骨筋におけるミオスタチンタンパク質レベル。ｒＡＡＶ６：ＡｃｔＡを与えたマウスにおいて、アクチビンＡタンパク質レベルも測定したが、ＡｃｔＡは分泌されるが細胞内外に貯蔵されないので、検出されなかった。

【００２５】
【図６ＡＢ】図６Ａ～６Ｉは、特定の態様によれば、Ｃ－２６腫瘍移植によって誘導された癌悪液質を示す。（図６Ａ）検査の約２１日前のＣ－２６腫瘍移植は、体重の２５％の減少を誘導した（＊、対照、腫瘍のない（ｔｕｍｏｒ－ｆｒｅｅ）量に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１３～１４、ｔ検定）。（図６Ｂ～６Ｃ）Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、大腿四頭筋および心臓の質量が減少していた（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１３～１４、ｔ検定）。（図６Ｄ）Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、副睾丸脂肪の質量が減少していた（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝６～７、ｔ検定）。（図６Ｅ）Ｓｍａｄ７発現の増加は、インサイチューでＣ－２６腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋によってもたらされるピークテタヌス力の減少を防止した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０３、ｎ＝８～９、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図６Ｆ）ＴＡ筋の断面をラミニン（赤色）およびＭＨＣＩＩａ（ＩＩａ型、緑色）で二重標識して、ＩＩａ型およびＩＩｘ／ｂ型線維（非反応性）の面積を評価した。（図６Ｇ）Ｓｍａｄ７は、腫瘍担持マウスの筋肉におけるＩＩａ型（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＩＩｘ／ｂ型（＊、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００１、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）線維の面積の減少を防止した。（図６Ｈ～６Ｉ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターを投与した健常マウスおよび腫瘍担持マウスの筋肉における線維型の割合（＊、対照群に対してｐ＝０．０２、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）。
【図６ＣＤＥ】図６Ａ～６Ｉは、特定の態様によれば、Ｃ－２６腫瘍移植によって誘導された癌悪液質を示す。（図６Ａ）検査の約２１日前のＣ－２６腫瘍移植は、体重の２５％の減少を誘導した（＊、対照、腫瘍のない（ｔｕｍｏｒ－ｆｒｅｅ）量に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１３～１４、ｔ検定）。（図６Ｂ～６Ｃ）Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、大腿四頭筋および心臓の質量が減少していた（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１３～１４、ｔ検定）。（図６Ｄ）Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、副睾丸脂肪の質量が減少していた（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝６～７、ｔ検定）。（図６Ｅ）Ｓｍａｄ７発現の増加は、インサイチューでＣ－２６腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋によってもたらされるピークテタヌス力の減少を防止した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０３、ｎ＝８～９、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図６Ｆ）ＴＡ筋の断面をラミニン（赤色）およびＭＨＣＩＩａ（ＩＩａ型、緑色）で二重標識して、ＩＩａ型およびＩＩｘ／ｂ型線維（非反応性）の面積を評価した。（図６Ｇ）Ｓｍａｄ７は、腫瘍担持マウスの筋肉におけるＩＩａ型（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＩＩｘ／ｂ型（＊、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００１、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）線維の面積の減少を防止した。（図６Ｈ～６Ｉ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターを投与した健常マウスおよび腫瘍担持マウスの筋肉における線維型の割合（＊、対照群に対してｐ＝０．０２、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）。
【図６ＦＧＨＩ】図６Ａ～６Ｉは、特定の態様によれば、Ｃ－２６腫瘍移植によって誘導された癌悪液質を示す。（図６Ａ）検査の約２１日前のＣ－２６腫瘍移植は、体重の２５％の減少を誘導した（＊、対照、腫瘍のない（ｔｕｍｏｒ－ｆｒｅｅ）量に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１３～１４、ｔ検定）。（図６Ｂ～６Ｃ）Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、大腿四頭筋および心臓の質量が減少していた（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１３～１４、ｔ検定）。（図６Ｄ）Ｃ－２６腫瘍担持マウスでは、副睾丸脂肪の質量が減少していた（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝６～７、ｔ検定）。（図６Ｅ）Ｓｍａｄ７発現の増加は、インサイチューでＣ－２６腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋によってもたらされるピークテタヌス力の減少を防止した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０３、ｎ＝８～９、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図６Ｆ）ＴＡ筋の断面をラミニン（赤色）およびＭＨＣＩＩａ（ＩＩａ型、緑色）で二重標識して、ＩＩａ型お

およびＩＩｘ／ｂ型線維（非反応性）の面積を評価した。（図６Ｇ）Ｓｍａｄ７は、腫瘍担持マウスの筋肉におけるＩＩａ型（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＩＩｘ／ｂ型（＊、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００１、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）線維の面積の減少を防止した。（図６Ｈ～６Ｉ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターを投与した健常マウスおよび腫瘍担持マウスの筋肉における線維型の割合（＊、対照群に対してｐ＝０．０２、ｎ＝８、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００２６】

【図７ＡＢＣ】図７Ａ～７Ｋは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７発現の増加が癌悪液質を予防することを示す。（図７Ａ）Ｃ－２６腫瘍を投与したマウスの四肢筋に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、質量（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、（図７Ｂ）力発生能力（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、および（図７Ｃ）筋線維断面積（ＣＳＡ、＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８）を保持した。（図７Ｄ　健常マウスおよび腫瘍担持マウス由来の筋肉におけるＳｍａｄ７発現（ウエスタンブロット）。（図７Ｅ）腫瘍移植（腫瘍負荷が増加した時、右パネル）の７日後（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０１、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７）および１４日後（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝５～６）に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、筋肉量を保持した（＊、７日に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１０、ｔ検定）。（図７Ｆ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身処置は、体重の減少を軽減し（＊、対照に対してｐ＝０．００５、＃、対照に対してｐ＜０．００１）、（図７Ｇ）筋肉量の減少を防止した（腓腹筋－Ｇａ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝４～７．大腿四頭筋－Ｑｄ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝４～１４．三頭筋－Ｔｒ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００７、ｎ＝４～１４．）。（図７Ｈ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウスの画像。（図７Ｉ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋のヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した４週間後のインヒビンヌルマウス（ｉｎｈａ－ＫＯ）における（図７Ｊ）ＴＡ筋肉量（＊、群に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４）および（ＦＩＧ．７Ｋ）筋線維直径（＊、対照に対してｐ＝０．０２、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、ｉｎｈａ－ＫＯに対してｐ＝０．００６）。特に指示がない限り、二元配置ＡＮＯＶＡによって、データを分析した。スケールバー、１００μｍ。

【図７ＤＥＦ】図７Ａ～７Ｋは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７発現の増加が癌悪液質を予防することを示す。（図７Ａ）Ｃ－２６腫瘍を投与したマウスの四肢筋に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、質量（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、（図７Ｂ）力発生能力（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、および（図７Ｃ）筋線維断面積（ＣＳＡ、＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８）を保持した。（図７Ｄ　健常マウスおよび腫瘍担持マウス由来の筋肉におけるＳｍａｄ７発現（ウエスタンブロット）。（図７Ｅ）腫瘍移植（腫瘍負荷が増加した時、右パネル）の７日後（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０１、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７）および１４日後（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝５～６）に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、筋肉量を保持した（＊、７日に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１０、ｔ検定）。（図７Ｆ）ｒ

ＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身処置は、体重の減少を軽減し（＊、対照に対してｐ＝０．００５、＃、対照に対してｐ＜０．００１）、（図７Ｇ）筋肉量の減少を防止した（腓腹筋－Ｇａ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝４～７．大腿四頭筋－Ｑｄ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝４～１４．三頭筋－Ｔｒ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００７、ｎ＝４～１４．）。（図７Ｈ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウスの画像。（図７Ｉ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋のヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した４週間後のインヒビンヌルマウス（ｉｎｈａ－ＫＯ）における（図７Ｊ）ＴＡ筋肉量（＊、群に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４）および（ＦＩＧ．７Ｋ）筋線維直径（＊、対照に対してｐ＝０．０２、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、ｉｎｈａ－ＫＯに対してｐ＝０．００６）。特に指示がない限り、二元配置ＡＮＯＶＡによって、データを分析した。スケールバー、１００μｍ。

【図７ＧＨＩ】図７Ａ～７Ｋは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７発現の増加が癌悪液質を予防することを示す。（図７Ａ）Ｃ－２６腫瘍を投与したマウスの四肢筋に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、質量（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、（図７Ｂ）力発生能力（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、および（図７Ｃ）筋線維断面積（ＣＳＡ、＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８）を保持した。（図７Ｄ　健常マウスおよび腫瘍担持マウス由来の筋肉におけるＳｍａｄ７発現（ウエスタンブロット）。（図７Ｅ）腫瘍移植（腫瘍負荷が増加した時、右パネル）の７日後（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０１、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７）および１４日後（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝５～６）に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、筋肉量を保持した（＊、７日に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１０、ｔ検定）。（図７Ｆ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身処置は、体重の減少を軽減し（＊、対照に対してｐ＝０．００５、＃、対照に対してｐ＜０．００１）、（図７Ｇ）筋肉量の減少を防止した（腓腹筋－Ｇａ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝４～７．大腿四頭筋－Ｑｄ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝４～１４．三頭筋－Ｔｒ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００７、ｎ＝４～１４．）。（図７Ｈ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウスの画像。（図７Ｉ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋のヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した４週間後のインヒビンヌルマウス（ｉｎｈａ－ＫＯ）における（図７Ｊ）ＴＡ筋肉量（＊、群に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４）および（ＦＩＧ．７Ｋ）筋線維直径（＊、対照に対してｐ＝０．０２、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、ｉｎｈａ－ＫＯに対してｐ＝０．００６）。特に指示がない限り、二元配置ＡＮＯＶＡによって、データを分析した。スケールバー、１００μｍ。

【図７ＪＫ】図７Ａ～７Ｋは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７発現の増加が癌悪液質を予防することを示す。（図７Ａ）Ｃ－２６腫瘍を投与したマウスの四肢筋に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、質量（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、（図７Ｂ）力発生能力（＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１１～１４）、および（図７Ｃ）筋線維断面積（ＣＳＡ、＊、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８）を保持した。（図７Ｄ　健常マウスおよび腫瘍担持マウス

由来の筋肉におけるＳｍａｄ７発現（ウエスタンブロット）。（図７Ｅ）腫瘍移植（腫瘍負荷が増加した時、右パネル）の７日後（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．０１、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～７）および１４日後（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、Ｃ－２６対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝５～６）に送達したｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、筋肉量を保持した（＊、７日に対してｐ＜０．００１、ｎ＝１０、ｔ検定）。（図７Ｆ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身処置は、体重の減少を軽減し（＊、対照に対してｐ＝０．００５、＃、対照に対してｐ＜０．００１）、（図７Ｇ）筋肉量の減少を防止した（腓腹筋－Ｇａ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝４～７．大腿四頭筋－Ｑｄ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝４～１４．三頭筋－Ｔｒ、＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＝０．００２、＋、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００７、ｎ＝４～１４．）。（図７Ｈ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウスの画像。（図７Ｉ）偽またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した対照マウスおよび腫瘍担持マウス由来のＴＡ筋のヘマトキシリンおよびエオシン染色凍結切片。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した４週間後のインヒビンヌルマウス（ｉｎｈａ－ＫＯ）における（図７Ｊ）ＴＡ筋肉量（＊、群に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４）および（ＦＩＧ．７Ｋ）筋線維直径（＊、対照に対してｐ＝０．０２、＃、対照に対してｐ＝０．００４、＋、ｉｎｈａ－ＫＯに対してｐ＝０．００６）。特に指示がない限り、二元配置ＡＮＯＶＡによって、データを分析した。スケールバー、１００μｍ。

【００２７】

【図８ＡＢＣ】図８Ａ～８Ｋは、特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与が、内臓器官の質量または脂肪量に影響を与えないことを示す。（図８Ａ～８Ｂ）健常マウスおよび腫瘍担持マウス由来の心臓（＊、対照に対してｐ＝０．００１、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）、大腿四頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）およびＴＡ筋（＋、対照に対してｐ＝０．００８、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）において、Ｓｍａｄ７タンパク質および遺伝子発現を検査した。（図８Ｃ）ＴＡ筋肉量は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与によって保持された（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８～１４、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図８Ｄ）代表的な画像は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が、三頭筋および大腿四頭筋の筋肉量を保持することを実証している。（図８Ｅ）偽ベクターまたはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与したＣ－２６腫瘍担持マウス間で、腫瘍量は差異がなかった（ＮＤ＝群間で差異なし、ｎ＝８～１４、ｔ検定）。（図８Ｆ～８Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与は、肝臓（＊、対照に対してｐ＝０．００４、ｎ＝８～１４、二元配置ＡＮＯＶＡ）、腎臓（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～７、二元配置ＡＮＯＶＡ）または副睾丸脂肪の質量（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝３～７、二元配置ＡＮＯＶＡ）の腫瘍誘導性減少を防止しなかった。（図８Ｈ～８Ｕ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与は、腫瘍担持マウスにおける心臓萎縮症（脛骨長に対して質量を正規化した）を予防した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝７～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。ヘマトキシリンおよびエオシンスケールバー、１００μｍ。写真スケール、０．２ｃｍ。（図８Ｊ）脛骨長に対して心房重量を正規化した。（図８Ｋ）Ｓｍａｄ７は、心房重量または肺質量に影響を与えなかった（脛骨長に対して正規化、ＮＤ＝差異なし、ｎ＝４～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【図８ＤＥＦＧ】図８Ａ～８Ｋは、特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与が、内臓器官の質量または脂肪量に影響を与えないことを示す。（図８Ａ～８Ｂ）健常マウスおよび腫瘍担持マウス由来の心臓（＊、対照に対してｐ＝０．００１、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）、大腿四頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）およびＴＡ筋（＋、対照に対してｐ＝０．００８、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶ

Ａ）において、Ｓｍａｄ７タンパク質および遺伝子発現を検査した。（図８Ｃ）ＴＡ筋肉量は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与によって保持された（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８～１４、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図８Ｄ）代表的な画像は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が、三頭筋および大腿四頭筋の筋肉量を保持することを実証している。（図８Ｅ）偽ベクターまたはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与したＣ－２６腫瘍担持マウス間で、腫瘍量は差異がなかった（ＮＤ＝群間で差異なし、ｎ＝８～１４、ｔ検定）。（図８Ｆ～８Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与は、肝臓（＊、対照に対してｐ＝０．００４、ｎ＝８～１４、二元配置ＡＮＯＶＡ）、腎臓（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～７、二元配置ＡＮＯＶＡ）または副睾丸脂肪の質量（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝３～７、二元配置ＡＮＯＶＡ）の腫瘍誘導性減少を防止しなかった。（図８Ｈ～８Ｕ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与は、腫瘍担持マウスにおける心臓萎縮症（脛骨長に対して質量を正規化した）を予防した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝７～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。ヘマトキシリンおよびエオシンスケールバー、１００μｍ。写真スケール、０．２ｃｍ。（図８Ｊ）脛骨長に対して心房重量を正規化した。（図８Ｋ）Ｓｍａｄ７は、心房重量または肺質量に影響を与えなかった（脛骨長に対して正規化、ＮＤ＝差異なし、ｎ＝４～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【図８ＨＩＪＫ】図８Ａ～８Ｋは、特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与が、内臓器官の質量または脂肪量に影響を与えないことを示す。（図８Ａ～８Ｂ）健常マウスおよび腫瘍担持マウス由来の心臓（＊、対照に対してｐ＝０．００１、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）、大腿四頭筋（＊、対照に対してｐ＝０．０２、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）およびＴＡ筋（＋、対照に対してｐ＝０．００８、ｎ＝３、一元配置ＡＮＯＶＡ）において、Ｓｍａｄ７タンパク質および遺伝子発現を検査した。（図８Ｃ）ＴＡ筋肉量は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与によって保持された（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８～１４、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図８Ｄ）代表的な画像は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が、三頭筋および大腿四頭筋の筋肉量を保持することを実証している。（図８Ｅ）偽ベクターまたはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与したＣ－２６腫瘍担持マウス間で、腫瘍量は差異がなかった（ＮＤ＝群間で差異なし、ｎ＝８～１４、ｔ検定）。（図８Ｆ～８Ｇ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与は、肝臓（＊、対照に対してｐ＝０．００４、ｎ＝８～１４、二元配置ＡＮＯＶＡ）、腎臓（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～７、二元配置ＡＮＯＶＡ）または副睾丸脂肪の質量（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝３～７、二元配置ＡＮＯＶＡ）の腫瘍誘導性減少を防止しなかった。（図８Ｈ～８Ｕ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与は、腫瘍担持マウスにおける心臓萎縮症（脛骨長に対して質量を正規化した）を予防した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝７～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。ヘマトキシリンおよびエオシンスケールバー、１００μｍ。写真スケール、０．２ｃｍ。（図８Ｊ）脛骨長に対して心房重量を正規化した。（図８Ｋ）Ｓｍａｄ７は、心房重量または肺質量に影響を与えなかった（脛骨長に対して正規化、ＮＤ＝差異なし、ｎ＝４～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００２８】

【図９】図９Ａ～９Ｃは、特定の態様によれば、インヒビンヌルマウスが、脂肪なし（ｌｅａｎ）の量および脂肪量の進行性減少を示すことを示す。（図９Ａ）６週齢のインヒビンαヌルマウスおよびそれらの同腹子対照において、脂肪量（＊、１１週齢のＷＴ対照に対してｐ＝０．００１、＋、１２週齢のＷＴ対照に対してｐ＜０．００１）、脂肪なしの量（＊、９週齢のＷＴ対照に対してｐ＝０．０４、＋、１０週齢のＷＴ対照に対してｐ＝０．００５、＃、１１～１２週齢のＷＴ対照に対してｐ＜０．００１）および総体重（＊、１０週齢のＷＴ対照に対してｐ＝０．００８、＋、１１～１２週齢のＷＴ対照に対してｐ＜０．００１）を評価した（ｎ＝４、二元配置ＡＮＯＶＡによって、データを分析した

）。（図９Ｂ）インヒビンαヌルマウスでは、野生型同腹子と比較して、性腺腫瘍量が増加していた（＊、ＷＴ対照に対してｐ＝０．００８、ｔ検定、ｎ＝４）。（図９Ｃ）インヒビンαヌルマウスの大腿四頭筋の質量は、ＷＴ対照と比較して減少していた（＊、ＷＴ対照に対してｐ＝０．００１、ｔ検定、ｎ＝４）。

【００２９】

【図１０ＡＢ】図１０Ａ～１０Ｆは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、標準的なＴＧＦβシグナル伝達経路およびＥ３リガーゼ発現を調節して、癌悪液質における筋萎縮症を予防することを示す。（図１０Ａ）悪液質マウスにおいて、アクチビンＡおよびアクチビンＢの血清レベルを測定した（ＵＤ＝未決定、＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～１１、ｔ検定）。（図１０Ｂ）腫瘍を移植し、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した２１日後に血清を収集し、Ｃ２Ｃ１２細胞を用いた活性化Ｓｍａｄ２／３レポーターアッセイにおいて使用した（＊、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝３、３回反復、二元配置ＡＮＯＶＡ、ＮＤ＝差異なし）。（図１０Ｃ　ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置したＣ－２６腫瘍担持マウス（＊、対照に対してｐ＝０．０１、＃、対照に対してｐ＝０．００５、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８～１３、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびインヒビンαヌルマウス（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、インヒビンαヌルに対してｐ＜０．００１、ｎ＝４、二元配置ＡＮＯＶＡ）由来のＴＡ筋において、Ｓｍａｄ３$^{S432/435}$リン酸化を測定した。（図１０Ｄ）健常マウスおよび腫瘍担持マウスにおいて、Ｆｏｘｏ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝５～６／処置、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）およびＦｏｘｏ３（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝５～６／処置、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）のウエスタンブロッティングによって、全Ｆｏｘｏタンパク質レベルを決定した。（図１０Ｅ～１０Ｆ）Ｓｍａｄ７は、Ｆｏｘｏ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＦｏｘｏ３（＊、対照に対してｐ＝０．００２、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００４、ｎ＝５、二元配置ＡＮＯＶＡ）ならびにＭｕＲＦ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．０１、ｎ＝４～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＭＡＦｂｘ（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）の転写を抑制した。

【図１０Ｃ】図１０Ａ～１０Ｆは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、標準的なＴＧＦβシグナル伝達経路およびＥ３リガーゼ発現を調節して、癌悪液質における筋萎縮症を予防することを示す。（図１０Ａ）悪液質マウスにおいて、アクチビンＡおよびアクチビンＢの血清レベルを測定した（ＵＤ＝未決定、＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～１１、ｔ検定）。（図１０Ｂ）腫瘍を移植し、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した２１日後に血清を収集し、Ｃ２Ｃ１２細胞を用いた活性化Ｓｍａｄ２／３レポーターアッセイにおいて使用した（＊、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝３、３回反復、二元配置ＡＮＯＶＡ、ＮＤ＝差異なし）。（図１０Ｃ　ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置したＣ－２６腫瘍担持マウス（＊、対照に対してｐ＝０．０１、＃、対照に対してｐ＝０．００５、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８～１３、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびインヒビンαヌルマウス（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、インヒビンαヌルに対してｐ＜０．００１、ｎ＝４、二元配置ＡＮＯＶＡ）由来のＴＡ筋において、Ｓｍａｄ３$^{S432/435}$リン酸化を測定した。（図１０Ｄ）健常マウスおよび腫瘍担持マウスにおいて、Ｆｏｘｏ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝５～６／処置、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）およびＦｏｘｏ３（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝５～６／処置、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）のウエスタンブロッティングによって、全Ｆｏｘｏタンパク質レベルを決定した。（図１０Ｅ～１０Ｆ）Ｓｍａｄ７は、Ｆｏｘｏ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＦｏｘｏ３（＊、対照に対してｐ＝０．００２、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００４、ｎ＝５、二元配置ＡＮＯＶＡ）ならびにＭｕＲＦ１（＊、対

照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．０１、ｎ＝４～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＭＡＦｂｘ（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）の転写を抑制した。

【図１０ＤＥＦ】図１０Ａ～１０Ｆは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、標準的なＴＧＦβシグナル伝達経路およびＥ３リガーゼ発現を調節して、癌悪液質における筋萎縮症を予防することを示す。（図１０Ａ）悪液質マウスにおいて、アクチビンＡおよびアクチビンＢの血清レベルを測定した（ＵＤ＝未決定、＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～１１、ｔ検定）。（図１０Ｂ）腫瘍を移植し、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を注射した２１日後に血清を収集し、Ｃ２Ｃ１２細胞を用いた活性化Ｓｍａｄ２／３レポーターアッセイにおいて使用した（＊、対照に対してｐ＝０．０１、ｎ＝３、３回反復、二元配置ＡＮＯＶＡ、ＮＤ＝差異なし）。（図１０Ｃ　ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置したＣ－２６腫瘍担持マウス（＊、対照に対してｐ＝０．０１、＃、対照に対してｐ＝０．００５、＋、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝８～１３、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびインヒビンαヌルマウス（＊、対照に対してｐ＝０．０３、＃、対照に対してｐ＜０．００１、＋、インヒビンαヌルに対してｐ＜０．００１、ｎ＝４、二元配置ＡＮＯＶＡ）由来のＴＡ筋において、Ｓｍａｄ３$^{S432/435}$リン酸化を測定した。（図１０Ｄ）健常マウスおよび腫瘍担持マウスにおいて、Ｆｏｘｏ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝５～６／処置、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）およびＦｏｘｏ３（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．０４、ｎ＝５～６／処置、二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ）のウエスタンブロッティングによって、全Ｆｏｘｏタンパク質レベルを決定した。（図１０Ｅ～１０Ｆ）Ｓｍａｄ７は、Ｆｏｘｏ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝５～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＦｏｘｏ３（＊、対照に対してｐ＝０．００２、＃、Ｃ－２６に対してｐ＝０．００４、ｎ＝５、二元配置ＡＮＯＶＡ）ならびにＭｕＲＦ１（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．０１、ｎ＝４～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）およびＭＡＦｂｘ（＊、対照に対してｐ＜０．００１、＃、Ｃ－２６に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４～８、二元配置ＡＮＯＶＡ）の転写を抑制した。

【００３０】

【図１１ＡＢＣ】図１１Ａ～１１Ｅは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、悪液質におけるＦｏｘｏリン酸化またはＮＦ－κＢシグナル伝達を変化させないことを示す。（図１１Ａ）腫瘍を移植し、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターを注射した２１日後に、ＥＬＩＳＡによって血清アクチビンＡレベルを測定した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４／コホート、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図１１Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターで処置した腫瘍担持マウスにおける血清ＩＬ－６レベルをＥＬＩＳＡによって測定した（ｎ＝４～５）。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置したＣ－２６腫瘍担持マウスのＴＡ骨格筋における（図１１Ｃ）Ｓｔａｔ３、（図１１Ｄ）ｐ６５および（図１１Ｅ）Ｆｏｘｏ１／３リン酸化（＊、対照に対してｐ＜０．０２、ｎ＝５～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【図１１ＤＥ】図１１Ａ～１１Ｅは、特定の態様によれば、Ｓｍａｄ７が、悪液質におけるＦｏｘｏリン酸化またはＮＦ－κＢシグナル伝達を変化させないことを示す。（図１１Ａ）腫瘍を移植し、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターを注射した２１日後に、ＥＬＩＳＡによって血清アクチビンＡレベルを測定した（＊、対照に対してｐ＜０．００１、ｎ＝４／コホート、二元配置ＡＮＯＶＡ）。（図１１Ｂ）ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７または偽ベクターで処置した腫瘍担持マウスにおける血清ＩＬ－６レベルをＥＬＩＳＡによって測定した（ｎ＝４～５）。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置したＣ－２６腫瘍担持マウスのＴＡ骨格筋における（図１１Ｃ）Ｓｔａｔ３、（図１１Ｄ）ｐ６５および（図１１Ｅ）Ｆｏｘｏ１／３リン酸化（＊、対照に対してｐ＜０．０２、ｎ＝５～１１、二元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００３１】

【図１２】図１２は、Ｓｍａｄ７　ＡＡＶベクターであるｐＡＡＶ－ＭＣＳ＿ｓｍａｄ７

ｓｔｐ　０８１８０９．ｃｅｐのマップを示す；対応する配列は、配列番号３（６１０８塩基対）に提供されている。

【発明を実施するための形態】

【００３２】

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．１．８２２で定義されているように、ヌクレオチド塩基については標準的な略号、およびアミノ酸については３文字表記を使用して示されている。各核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、相補鎖は、示されている鎖への任意の言及に含まれると理解されよう。

【００３３】

配列番号１および２は、アクチビンＡを検出するために使用される代表的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーである（Ｆ：ＧＧＡＧＴＧＴＧＡＴＧＧＣＡＡＧＧＴＣＡＡＣＡ、Ｒ：ＧＴＧＧＧＣＡＣＡＣＡＧＣＡＴＧＡＣＴＴＡ）。

【００３４】

配列番号３および４は、ミオスタチンを検出するために使用される代表的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーである（Ｆ：ＣＣＣＡＧＡＧＧＴＴＣＡＧＣＡＧＧＣＣＣＴ、Ｒ：ＴＣＡＴＧＡＧＣＡＣＣＣＡＣＡＧＣＧＧＴＣ）。

【００３５】

配列番号５は、Ｓｍａｄ７　ＡＡＶベクターｐＡＡＶ－ＭＣＳ＿ｓｍａｄ７ｓｔｐ　０８１８０９．ｃｅｐの配列である。

【００３６】

Ｉ．略語

ＡＡＶ	アデノ随伴ウイルス
ＡｃｔＲＩＩＢ	ＩＩＢ型アクチビン受容体
ＡＬＫ	アクチビン様キナーゼ
ＩＥＥ	組み込み効率要素
ＩＴＲ	逆方向末端反復配列
ＣＴＧＦ	結合組織成長因子
ＣＯＬ１Ａ１	コラーゲン１ａ１型
ＦＮ	フィブロネクチン
ＮＤ	差異なし
ＯＲＦ	オープンリーディングフレーム
ＰＡＩ１	プラスミノーゲン活性化因子阻害因子１
ｒＡＡＶ	組換えＡＡＶ
ＳＥＭ	平均の標準誤差
ＴＡ	前脛骨筋
ＴＲＳ	末端分離部位
ＷＴ	野生型

ＩＩ．用語および方法

【００３７】

特に注記がない限り、技術用語は、従来の用法にしたがって使用される。分子生物学において一般的な用語の定義は、Ｂｅｎｊａｍｉｎ　Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ　Ｖ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｂｙ　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，１９９４（ＩＳＢＮ　０－１９－８５４２８７－９）；Ｋｅｎｄｒｅｗら、（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ　Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　ｏｆ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｂｙ　Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｌｔｄ．，１９９４（ＩＳＢＮ　０－６３２－０２１８２－９）；およびＲｏｂｅｒｔ　Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ　Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｂｙ　ＶＣＨ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，１９９５（ＩＳＢＮ　１－５６０８１－５６９－

８）に見られ得る。
【００３８】
本開示の様々な実施形態の検討を容易にするために、特定の用語に関する以下の説明を提供する：
【００３９】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）：ヒトおよびいくつかの他の霊長類種に感染する小さな複製欠損ノンエンベロープウイルス。ＡＡＶは、疾患を引き起こさないことが公知であり、非常に軽度の免疫応答を誘発する。ＡＡＶを利用する遺伝子治療ベクターは、分裂細胞および静止細胞の両方に感染し得、宿主細胞のゲノムに組み込まれずに、染色体外状態で存続し得る。これらの特徴は、ＡＡＶを、遺伝子治療のための魅力的なウイルスベクターにする。現在、１１個の認められている血清型のＡＡＶ（ＡＡＶ１～ＡＡＶ１１）がある。
【００４０】
投与／投与する：任意の有効経路によって、治療剤（例えば、組換えＡＡＶ）などの薬剤を被験体に提供し、または与えること。例示的な投与経路としては、限定されないが、注射経路（例えば、皮下注射、筋肉内注射、皮内注射、腹腔内注射および静脈内注射）、経口経路、管内経路、舌下経路、直腸経路、経皮経路、鼻腔内経路、膣経路および吸入経路が挙げられる。
【００４１】
コドン最適化された：「コドン最適化された」核酸は、コドンが特定の系（例えば、特定の種または種の群）における発現に最適であるように変化されている核酸配列を指す。例えば、核酸配列は、哺乳動物細胞または特定の哺乳動物種（例えば、ヒト細胞）における発現に最適化され得る。コドン最適化は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させない。
【００４２】
エンハンサー：プロモーターの活性を増加させることによって、転写の速度を増加させる核酸配列。
【００４３】
感染性：ウイルスまたはベクターは、それが細胞を形質導入し、複製し、（いかなる相補的ウイルスまたはベクターの利益も伴わずに）元の形質導入ウイルスまたはベクターと同じ種類の子孫ベクターまたはウイルスを生物または細胞培養物中の他の細胞に拡散する場合に「感染性」であり、子孫ベクターまたはウイルスは、複製して生物または細胞培養物全体に拡散する同じ能力を有する。したがって、例えば、アデノウイルス粒子をコードする核酸は、細胞をトランスフェクトするために該核酸が使用され得るとしても、該核酸がパッケージングされ得ない場合には（例えば、アデノウイルス粒子がパッケージング部位を欠く場合には）感染性ではない。同様に、アデノウイルス粒子によってパッケージングされたアデノウイルス核酸は、それがパッケージングされたアデノウイルスカプシドタンパク質をそれがコードしない場合には感染性ではない。
【００４４】
イントロン：タンパク質のコード情報を含有しない遺伝子内のＤＮＡのストレッチ。イントロンは、メッセンジャーＲＮＡの翻訳前に除去される。
【００４５】
逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）：効率的な複製に必要なアデノ随伴ウイルスのゲノム中の対称核酸配列。ＩＴＲ配列は、ＡＡＶ　ＤＮＡゲノムの各末端に位置する。ＩＴＲは、ウイルスＤＮＡの合成の複製起点として作用し、ＡＡＶ組み込みベクターを作製するための必須のシス成分である。
【００４６】
単離された：「単離された」生物学的成分（例えば、核酸分子、タンパク質、ウイルスまたは細胞）は、該成分が天然に存在する生物の細胞もしくは組織または生物自体における他の生物学的成分、例えば他の染色体および染色体外ＤＮＡおよびＲＮＡ、タンパク質

ならびに細胞から実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸分子およびタンパク質は、標準的な精製方法によって精製されたものを含む。この用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸分子およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子およびタンパク質を包含する。

【００４７】

哺乳動物：この用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語「被験体」は、ヒト被験体および獣医学的被験体の両方を含む。

【００４８】

作動可能に連結された：第１の核酸配列が第２の核酸配列と機能的な関係で配置されている場合、第１の核酸配列は、第２の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列と作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されたＤＮＡ配列は連続的であり、２つのタンパク質コード領域を接続するために必要な場合には、同じリーディングフレームで連続的である。

【００４９】

パッケージング細胞：トランスファーベクターで細胞に導入される遺伝子にとってトランスにパッケージング機能を提供するが、それ自体のゲノムをカプシド化しない細胞。

【００５０】

パッケージングベクター：パッケージングベクター核酸は、パッケージングベクター核酸に対応するＤＮＡをアデノウイルスカプシドにパッケージングするために必要な核酸を欠く。すなわち、パッケージングベクター核酸は、それらがコードするウイルス粒子でそれ自体がカプシド化されない（すなわち、それらは感染性ではない）。パッケージングベクターは、ウイルス粒子の生産に必要な成分のすべてを場合により含むか、またはウイルスパッケージングに必要な成分の一部を場合により含む。例えば、パッケージング細胞は、それぞれがアデノウイルス粒子の生産において相補的な役割を果たす１つを超えるパッケージングベクターで形質転換され得る。

【００５１】

２つ（またはそれを超える）アデノウイルスベースのパッケージングベクターは、それらが一緒になって、アデノウイルスパッケージングに必要な機能のすべてをコードし、それぞれが個々に、パッケージングに必要な機能のすべてをコードしない場合に「相補的」である。例えば、２つのベクターが単一細胞を形質導入し、それらが一緒になって、アデノウイルスパッケージング粒子の生産のための情報をコードする場合、２つのベクターは「相補的」である。相補的ベクターの使用は、組換え事象が感染性ウイルスをもたらす可能性を減少させることによって、パッケージングベクターを用いた形質転換によって作製された任意のパッケージング細胞の安全性を増加させる。

【００５２】

薬学的に許容され得る担体：本開示において有用な薬学的に許容され得る担体（ビヒクル）は、従来のものである。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｂｙ Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９７５）には、１つまたはそれを超える治療用化合物、分子または薬剤の薬学的送達に適切な組成物および製剤が記載されている。

【００５３】

一般に、担体の性質は、用いられる特定の投与様式に依存し得る。例えば、非経口用製剤は、通常、例えば、薬学的および生理学的に許容され得る流体、例えば水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどをビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉末、丸剤、錠剤、またはカプセルの形態）の場合、従来の非毒性固体担体は、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含み得る。生物学的に中性の担体に加えて、投与すべき医薬組成物は、微量の非毒性の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、保存剤およ

びｐＨ緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含有し得る。

【００５４】

疾患の予防、処置または改善：疾患（例えば、癌）または疾患に関連する症候（例えば、癌悪液質）の「予防」は、疾患または症候の完全な発症を阻害することを指す。「処置」は、疾患または病的症状の兆候または症候を、その発症開始後に改善する治療介入を指す。「改善」は、疾患の兆候または症候の数または重症度を軽減することを指す。

【００５５】

プロモーター：核酸（例えば、遺伝子）の転写を指令／開始するＤＮＡの領域。プロモーターは、転写の開始部位の近くに必要な核酸配列を含む。典型的には、プロモーターは、それらが転写する遺伝子の近くに位置する。プロモーターはまた、転写の開始部位から数千塩基対ほどに位置し得る遠位エンハンサーまたはリプレッサー要素を場合により含む。

【００５６】

精製された：用語「精製された」は、絶対的な純度を必要としない；むしろ、それは、相対的な用語として意図される。したがって、例えば、精製されたペプチド、タンパク質、ウイルスまたは他の活性化合物は、天然に付随するタンパク質および他の夾雑物から全体的にまたは部分的に単離されたものである。特定の実施形態では、用語「実質的に精製された」は、細胞、細胞培養培地または他の粗調製物から単離されているペプチド、タンパク質、ウイルスまたは他の活性化合物であって、分画に供されて初期調製物の様々な成分、例えばタンパク質、細胞残屑および他の成分が除去されているペプチド、タンパク質、ウイルスまたは他の活性化合物を指す。

【００５７】

組換え：組換え核酸分子は、天然に存在しない配列を有するもの、またはさもなければ分離されている２つの配列セグメントの人工的な組み合わせによって作製された配列を有するものである。この人工的な組み合わせは、化学合成によって、または単離された核酸分子セグメントの人工的な操作によって、例えば遺伝子工学技術によって達成され得る。

【００５８】

同様に、組換えウイルスは、天然に存在しないか、または異なる起源の少なくとも２つの配列の人工的な組み合わせによって作製された配列（例えば、ゲノム配列）を含むウイルスである。用語「組換え」はまた、天然核酸分子、タンパク質またはウイルスの一部の付加、置換または欠失によってのみ変化されている核酸、タンパク質およびウイルスを含む。本明細書で使用される場合「組換えＡＡＶ」は、組換え核酸分子（例えば、Ｓｍａｄ７をコードする組換え核酸分子）がパッケージングされているＡＡＶ粒子を指す。

【００５９】

配列同一性：２つもしくはそれを超える核酸配列または２つもしくはそれを超えるアミノ酸配列間の同一性または類似性は、該配列間の同一性または類似性に関して表される。配列同一性は、同一性の割合に関して測定され得る；該割合が高いほど、配列はより同一である。配列類似性は、類似性の割合（これは、保存的アミノ酸置換を考慮する）に関して測定され得る；該割合が高いほど、配列はより類似である。核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を使用してアラインした場合に、比較的高度の配列同一性／類似性を有する。オルソロガスタンパク質またはｃＤＮＡがより近縁の種（例えば、ヒトおよびマウス配列）に由来する場合、より遠縁の種（例えば、ヒトおよびＣ．ｅｌｅｇａｎｓ配列）と比較して、この相同性はより有意である。

【００６０】

比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野で周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、Ｓｍｉｔｈ＆Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２，１９８１；Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ＆Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３，１９７０；Ｐｅａｒｓｏｎ＆Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４，１９８８；Ｈｉｇｇｉｎｓ＆Ｓｈ

ａｒｐ，Ｇｅｎｅ，７３：２３７－４４，１９８８；Ｈｉｇｇｉｎｓ＆Ｓｈａｒｐ，ＣＡＢＩＯＳ　５：１５１－３，１９８９；Ｃｏｒｐｅｔら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１６：１０８８１－９０，１９８８；Ｈｕａｎｇら、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ａｐｐｌｓ．ｉｎ　ｔｈｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　８，１５５－６５，１９９２；およびＰｅａｒｓｏｎら、Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．２４：３０７－３１，１９９４に記載されている。Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０，１９９０には、配列アラインメント方法および相同性の計算に関する詳細な検討が示されている。

【００６１】

ＮＣＢＩ　Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－１０，１９９０）は、配列分析プログラムｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎおよびｔｂｌａｓｔｘと併せて使用するために、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）を含むいくつかのソースから、およびインターネット上で利用可能である。さらなる情報は、ＮＣＢＩウェブサイトで見られ得る。

【００６２】

血清型：特徴的な抗原セットによって区別される近縁の微生物（例えば、ウイルス）の群。

【００６３】

Ｓｍａｄ（ＳＭＡＤ）タンパク質：脊椎動物、昆虫および線虫において見られる転写因子のファミリー。ＳＭＡＤは、細胞外シグナルリガンドを核に伝達する細胞内タンパク質であり、そこで、それらは下流遺伝子転写を活性化する。一般に、ＳＭＡＤは、２つの受容体調節ＳＭＡＤと１つのｃｏ－ＳＭＡＤとの三量体を形成する。

【００６４】

Ｓｍａｄ７は、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ遺伝子Ｍｏｔｈｅｒｓ　ａｇａｉｎｓｔ　ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃのホモログ７である。それは、ＴＧＦβ１型受容体アンタゴニストである。それは、受容体に会合するＴＧＦβ１およびアクチビンを遮断して、ＳＭＡＤ２へのアクセスを遮断する。それは、阻害性ＳＭＡＤ（Ｉ－ＳＭＡＤ）であり、ＳＭＵＲＦ２によって増強される。

【００６５】

Ｓｍａｄ７をコードする代表的なヌクレオチド配列としては、ヒト（ＮＭ＿００５９０４．３）；マウス（ｍｏｕｓｅ／ｍｕｒｉｎｅ）（ＮＭ＿００１０４２６６０．１）；ウシ（ｃａｔｔｌｅ／ｂｏｖｉｎｅ）（ＮＭ＿００１１９２８６５．１）；イヌ（ｄｏｇ／ｃａｎｉｎｅ）（ＸＭ＿００５６２３１３１．１）；ブタ（ｐｉｇ／ｐｏｒｃｉｎｅ）（ＮＭ＿００１２４４１７５．１）；ヒツジ（ｓｈｅｅｐ／ｏｖｉｎｅ）（ＸＭ＿０１２１２０９２９．１）；およびウマ（ｈｏｒｓｅ／ｅｑｕｉｎｅ）（ＸＭ＿００１４９９０６１．５）が挙げられる。これらのＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号の内容は、２０１６年４月２２日において利用可能であるので、参照により本明細書に組み込まれる。

【００６６】

被験体：生きている多細胞脊椎動物、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含むカテゴリー。一例として、本明細書に記載される治療用組成物または処置において使用されるＳｍａｄ７配列はそれらで処置される種に適合するように調整され得る（例えば、ヒト被験体の処置ではヒト配列が使用され、イヌ被験体の場合にはイヌ配列、など）。

【００６７】

合成：実験室において人工的手段によって生産されたもの、例えば、合成核酸は、実験室において化学的に合成され得る。

【００６８】

治療有効量：薬剤で処置される被験体または細胞において所望の効果を達成するために十分な指定医薬品または治療剤（例えば、組換えＡＡＶ）の量。薬剤の有効量は、限定されないが、処置される被験体または細胞、および治療用組成物の投与方法を含むいくつか

の要因に依存し得る。

【００６９】

処置することまたは処置：疾患もしくは症状、疾患もしくは症状の症候、または疾患もしくは症状のリスクを根治し、治癒し、緩和し、軽減し、変化させ、矯正し、改善し、向上させ、またはそれに影響を与えることを目的とした、被験体への組成物の適用もしくは投与、または癌悪液質などの筋消耗の症候を有する被験体由来の細胞もしくは組織への組成物の適用もしくは投与を含む。

【００７０】

ベクター：ベクターは、ベクターの複製能力および／または宿主細胞への組み込み能力を損なわずに外来核酸の挿入を可能にする核酸分子である。ベクターは、宿主細胞におけるその複製を可能にする核酸配列、例えば複製起点を含み得る。ベクターはまた、１つまたはそれを超える選択可能なマーカー遺伝子および他の遺伝要素を含み得る。発現ベクターは、挿入される１つまたは複数の遺伝子の転写および翻訳を可能にするための必要な調節配列を含有するベクターである。本明細書におけるいくつかの実施形態では、ベクターは、ＡＡＶベクターである。

【００７１】

特に説明がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。単数形の用語「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈上特に明確な指示がない限り、複数の指示対象を含む。「ＡまたはＢを含む」は、Ａ、またはＢ、またはＡおよびＢを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて示されているすべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズおよびすべての分子量または分子量値は概算であり、説明のために提供されていることをさらに理解するべきである。本明細書に記載されるものと類似または同等の方法および材料が本開示の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が以下に記載されている。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には、用語の説明を含む本明細書が優先する。加えて、材料、方法および例は例示的なものに過ぎず、限定的であることを意図しない。

例示的な態様の詳細な説明

【００７２】

多くの癌患者において、筋肉量および筋力の減少は、予後不良の主要な予測因子である（Ｔｉｓｄａｌｅ，Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｒｅｖ ８９，３８１－４１０，２００９；Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２；Ｄｏｄｓｏｎら、Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｍｅｄ ６２，２６５－２７９，２０１１）。本明細書において、本発明者らは、ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達をターゲティングする遺伝子治療ベースの介入（Ｌｌｏｖｅｒａら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２２１，６５３－６５５，１９９６；Ｌｌｏｖｅｒａら、Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １４２，１８３－１８９，１９９８；Ｃａｉら、Ｃｅｌｌ １１９，２８５－２９８，２００４；Ｗｙｋｅら、Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ９１，１７４２－１７５０，２００４；Ｗａｔｃｈｏｒｎら、Ｉｎｔ Ｊ Ｏｎｃｏｌ ２７，１１０５－１１１１，２００５；Ｗｙｋｅ＆Ｔｉｓｄａｌｅ，Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ９２，７１１－７２１，２００５）が、腫瘍進行に関連する筋消耗を予防する有効な手段であることを初めて実証する。現在、神経筋障害および非筋肉疾患のために、遺伝子治療が開発されているので（Ｍｉｎｇｏｚｚｉ＆Ｈｉｇｈ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ １２，３４１－３５５，２０１１）、本発明者らは、本明細書に記載される戦略が、癌悪液質の状況における筋消耗、および過度のＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達に伴う他の疾患に関連する罹患率および死亡率を減少させることができる介入になり得ることを主張する。

【００７３】

特定の態様によれば、ミオスタチンおよびアクチビンの循環濃度の上昇は骨格筋萎縮症を引き起こす可能性があり、癌、老化、および筋消耗が起こる慢性病の症状に関連してい

たことを考慮して（Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２；Ｚｉｍｍｅｒｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６，１４８６－１４８８，２００２；Ｃｏｅｒｖｅｒら、Ｍｏｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １０，５３４－５４３，１９９６；Ｈａｒａｄａら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ ８１，２１２５－２１３０，１９９６；Ｃｏｓｔｅｌｌｉら、Ｅｕｒ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ３８，５３１－５３８，２００８；Ｈｅｉｎｅｋｅら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １２１，４１９－４２５，２０１０；Ｐｅｎｎａら、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ５，ｅ１３６０４，２０１０；Ｊｕ＆Ｃｈｅｎら、Ｒｅｓｐｉｒ Ｍｅｄ １０６，１０２－１０８，２０１２；Ｏｔａｎｉら、Ｇｙｎｅｃｏｌ Ｏｎｃｏｌ ８３，３１－３８，２００１；Ｓｅｄｅｒら、Ｎｅｏｐｌａｓｉａ １１，３８８－３９６，２００９；Ｗｉｌｄｉら、Ｇｕｔ ４９，４０９－４１７，２００１；Ｈａｎら、Ｉｎｔ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ，４５：２３３３－２３４７，２０１３）、循環中の原因リガンドをターゲティングすることによって、過度のＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達の有害効果を和らげ得る介入を開発するために、多大な努力が注ぎ込まれている（Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２；Ｂｅｎｎｙ Ｋｌｉｍｅｋら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３９１，１５４８－１５５４，２０１０；Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０）。

【００７４】

しかしながら、細胞外レベルでの多面的リガンドの阻害に関連する副作用の可能性により、このようなリガンドトラップをベースとする治療の実現可能性は依然として疑問である（Ｍａｓｓａｇｕｅ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １３，６１６－６３０，２０１２）。これらの問題を回避するために、本発明者らは、筋線維内のＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達の阻害が、直接的なリガンド結合を伴わずに消耗を抑制するための戦略になるかを調査した。本発明者らは、ミオスタチンおよびアクチビンＡの実験的過剰発現によってチャレンジしたところ、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置した筋肉が萎縮症から保護されたことを見出した。本発明者らはまた、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が、腫瘍負荷および悪液質促進性リガンドの循環レベルの持続的上昇とは無関係に、全身性筋消耗を改善し得ると決定した。これらの結果は、筋肉量の維持に関与する重要な細胞内シグナル伝達プロセスの活性を、これらの経路を利用して筋消耗を促進するリガンドの効果から切り離すために、本発明者らのアプローチが有用であることを実証している。また、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の有効性は、悪液質マウスにおける可溶性ＡｃｔＲＩＩＢリガンドトラップについて記載されているもの（Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０）と実質的に同一であるが、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、横紋筋に対してより特異的であり、本発明者らの結果に基づけば、オフターゲット効果をもたらす可能性が低い。

【００７５】

特定の態様によれば、最も重要なことに、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７で処置したいかなるマウスにおいても、ＡＣＥ－０３１（ＡｃｔＲＩＩＢの細胞外ドメインから主に構成されるペプチボディリガンドトラップ）に関連するオフターゲットサインは検出されなかった。非筋肉組織におけるＳｍａｄ７発現も、Ｓｍａｄ７生物活性のマーカーもなかった。後者としては、内部マーカー、例えば肺の重量および形態の変化、または微小血管系の損傷の証拠、ならびに容易に視覚可能な外部マーカー、例えば耳、鼻および尾の傷が挙げられる。このようなマーカーは、おそらくは断続的に現れ得るが、本発明者らのアプローチと、あらゆる検出可能なＨＨＴ兆候の欠如とを組み合わせた特異性は、ｒＡＡＶ６；Ｓｍａｄ７が安全であり、おそらくはＡｃｔＲＩＩＢリガンドトラップのより効率的な代替手段であることを強く示唆している。

【００７６】

特定の態様によれば、機構的には、ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達は、筋肉タンパク質の合成を抑制し、タンパク質分解を促進することによって、筋肉異化を促進し得る（Ａｍｉｒｏｕｃｈｅら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １５０，２８６－２９４，２００９；Ｔｒｅｎｄｅｌｅｎｂｕｒｇら、Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ

２９６，Ｃ１２５８－１２７０，２００９；Ｄｕｒｉｅｕｘら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １４８，３１４０－３１４７，２００７；Ｌｏｋｉｒｅｄｄｙら、Ｍｏｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ ２５，１９３６－１９４９，２０１１）。本明細書に記載される本発明者らの研究は、Ｓｍａｄ７の過剰発現が、ＡｋｔおよびｍＴＯＲの活性化を条件とする機構によるものではなく、タンパク質合成に関連するＳ６Ｋ／Ｓ６ＲＰシグナル伝達を増加させることを実証している。本発明者らはまた、悪液質筋肉におけるＳｍａｄ７の過剰発現が、Ｅ３ユビキチンリガーゼＭｕＲＦ１およびＡｔｒｏｇｉｎ－１（これらの活性は、骨格筋におけるプロテアソーム分解を促進する）の転写を減少させることを観察した。同化および異化シグナル伝達の両方に対するＳｍａｄ７の効果は、Ｓｍａｄ２／３リン酸化の阻害に依存していたが、研究したマウスモデルのすべてにおいて、Ｓｍａｄ７は、ミオスタチンおよびアクチビンレベルの増加に関連する過度のＳｍａｄ２／３リン酸化を迅速に防止した。これらの結果は、Ｓｍａｄ７の発現の増加が、過度のＡｃｔＲＩＩＢ：ＡｃｔＲＩ媒介性Ｓｍａｄ２／３リン酸化（さもなければ、これは有意な筋肉異化に寄与する）を阻害するための強力な方法になるという仮説を裏付けている。

【００７７】

特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を投与した腫瘍担持マウスにおける骨格筋萎縮症の改善は、好ましいことに、以前に報告された、可溶性ＡｃｔＲＩＩＢで同様のマウスモデルを反復処置した抗異化効果（Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０）（これは、腫瘍進行にもかかわらず長期生存した）と同程度である。可溶性ＡｃｔＲＩＩＢを悪液質マウスに投与した研究（Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０）と同様に、本明細書に記載されるｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の全身投与で処置した腫瘍担持マウスでは、偽処置の腫瘍担持カウンターパートと比較して、脂肪量の保持の増強が実証されなかった。悪液質における脂肪分解の改善は、ＴＮＦαなどの他の悪液質関連サイトカインを一緒にターゲティングすることによって、より有効に達成され得る（Ｌｌｏｖｅｒａら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２２１，６５３－６５５，１９９６；Ｌｌｏｖｅｒａら、Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １４２，１８３－１８９，１９９８）。しかしながら、結果は、脂肪なしの量の維持を、長期生存を目的とする介入の主要目標とすべきであることを示している（Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２；Ｌｅｅ＆Ｇｌａｓｓ，Ｓｋｅｌｅｔ Ｍｕｓｃｌｅ １，２，２０１１；Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０）。

【００７８】

特定の態様によれば、ｒＡＡＶ６ベクターは、循環を介して心筋を形質導入し得るので、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の静脈内投与もまた、腫瘍担持マウスにおける心臓萎縮症を予防した。ミオスタチンおよびアクチビンＡの発現の増加は、心臓疾患に関連しており（Ｈｅｉｎｅｋｅら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １２１，４１９－４２５，２０１０；Ｙｎｄｅｓｔａｄら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １０９，１３７９－１３８５，２００４；Ｒｏｄｇｅｒｓら、Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ５８７，４８７３－４８８６，２００９）、傷害で比較的保護されている（ｐｒｏｔｅｃｔｅｄ ｗｉｔｈ ｉｎｓｕｌｔ）（Ｂｉｓｈら、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ５，ｅ１０２３０，２０１０；Ａｒｔａｚａら、Ｊ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １９４，６３－７６，２００７）ミオスタチンヌル心臓では、生理学的肥大ならびに心収縮性およびCa^{2+}ハンドリングの増強がすべて起こる（Ｒｏｄｇｅｒｓら、Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ５８７，４８７３－４８８６，２００９；Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ ２１３，２６３－２７５，２０１２；Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １５５，１７７１－１７８５，２０１４）。したがって、心筋に対する親和性を有するｒＡＡＶ：Ｓｍａｄ７ベクターの全身投与もまた、心臓におけるＡｃｔＲＩＩＢ媒介性萎縮症シグナル伝達を抑制して、悪液質患者における心機能を保持するための魅力的な候補である。

【００７９】

ＡｃｔＲＩＩＢは多くの非筋肉組織において発現され、いくつかのＴＧＦβスーパーフ

ファミリーリガンドがこの受容体に結合して多様な組織特異的作用を発揮するので、リガンドトラップアプローチは、オフターゲット効果を引き起こす有意なリスクをもたらす（Ｋｏｎｃａｒｅｖｉｃら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ　１５３，３１３３－３１４６，２０１２）。本明細書で提示されるデータは、横紋筋における優先的なＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達（Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ　１０，８２８－８３４，２００４；Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ　１２，７８７－７８９，２００６）を減衰するための新規アプローチとして、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７を導入する。骨格筋および／または心筋においてユニークにＳｍａｄ７発現を指令することができる組織特異的プロモーターの組み入れは、特異性をさらに増強し、既に開発されている（Ｓａｌｖａら、Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　１５，３２０－３２９，２００７）。それらの組み入れは、より十分な制御およびおそらくはよりロバストなＳｍａｄ７発現を提供することによって、特異性をより一層向上させる可能性がある。したがって、本発明者らのアプローチを最適化し、筋消耗または心不全の他の症状におけるその有効性を決定するために、さらなる研究が推奨される。

【００８０】

ＡＡＶは、Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ科およびＤｅｐｅｎｄｏｖｉｒｕｓ属に属する。ＡＡＶは、直鎖状一本鎖ＤＮＡゲノムをパッケージングする小さなノンエンベロープウイルスである。ＡＡＶ　ＤＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖は両方とも、同等の頻度でＡＡＶカプシドにパッケージングされる。

【００８１】

ＡＡＶゲノムは、２つのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）に隣接する２つの逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）を特徴とする。ＡＡＶ２ゲノムでは、例えば、ＩＴＲの最初の１２５ヌクレオチドはパリンドロームであり、塩基対形成を最大化するようにそれ自体をフォールディングし、Ｔ字ヘアピン構造を形成する。Ｄ配列と称されるＩＴＲの他の２０塩基は、依然として対形成しない。ＩＴＲは、ＡＡＶ　ＤＮＡ複製に重要なシス作用性配列である；ＩＴＲは複製起点であり、ＤＮＡポリメラーゼによる第２鎖の合成のためのプライマーとして作用する。この合成中に形成される二本鎖ＤＮＡ（これは、複製型単量体と称される）は、第２ラウンドの自己プライミング複製に使用され、複製型二量体を形成する。これらの二本鎖中間体は鎖置換機構によってプロセシングされ、パッケージングに使用される一本鎖ＤＮＡおよび転写に使用される二本鎖ＤＮＡが生じる。Ｒｅｐ結合性要素および末端分離部位（ＴＲＳ）は、ＩＴＲ内に位置する。これらの特徴は、ＡＡＶ複製中に、ウイルス調節タンパク質Ｒｅｐによって、二本鎖中間体をプロセシングするために使用される。ＡＡＶ複製における役割に加えて、ＩＴＲはまた、ＡＡＶゲノムのパッケージング、転写、非許容条件下での負の調節、および部位特異的組み込みに必須である（Ｄａｙａ　ａｎｄ　Ｂｅｒｎｓ，Ｃｌｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｒｅｖ　２１（４）：５８３－５９３，２００８）。

【００８２】

ＡＡＶの左側のＯＲＦは、４個のタンパク質－Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅｐ５２およびＲｅｐ４０をコードするＲｅｐ遺伝子を含有する。右側のＯＲＦは、３個のウイルスカプシドタンパク質（ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３）をもたらすＣａｐ遺伝子を含有する。ＡＡＶカプシドは、正２０面体対称に配置された６０個のウイルスカプシドタンパク質を含有する。ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３は、１：１：１０のモル比で存在する（Ｄａｙａ　ａｎｄ　Ｂｅｒｎｓ，Ｃｌｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｒｅｖ　２１（４）：５８３－５９３，２００８）。

【００８３】

現在、ＡＡＶは、遺伝子治療のために最も頻繁に使用されているウイルスの１つである。ＡＡＶは、ヒトおよびいくつかの他の霊長類種に感染するが、それは、疾患を引き起こさないことが公知であり、非常に軽度の免疫応答を誘発する。ＡＡＶを利用する遺伝子治療ベクターは、分裂細胞および静止細胞の両方に感染し得、宿主細胞のゲノムに組み込まれずに、染色体外状態で存続し得る。ＡＡＶの有利な特徴により、本開示は、本明細書に

開示される組換え核酸分子および方法のためのＡＡＶの使用を企図する。

【００８４】

ＡＡＶは、標的細胞に結合および侵入して核に侵入する能力、核内で長期間発現される能力、および低い毒性を含む、遺伝子治療ベクターのいくつかの望ましい特徴を有する。しかしながら、ＡＡＶゲノムの小サイズは、組み込まれ得る異種ＤＮＡのサイズを制限する。この問題を最小限にするために、Ｒｅｐおよび組み込み効率要素（ＩＥＥ）をコードしないＡＡＶベクターが構築されている。ＩＴＲは、パッケージングに必要なシスシグナルであるので保持される（Ｄａｙａ ａｎｄ Ｂｅｒｎｓ，Ｃｌｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ２１（４）：５８３－５９３，２００８）。

【００８５】

遺伝子治療に適切なｒＡＡＶを生産するための方法は、当技術分野で周知であり（例えば、米国特許出願公開第２０１２／０１００６０６号；米国特許出願公開第２０１２／０１３５５１５号；米国特許出願公開第２０１１／０２２９９７１号；および米国特許出願公開第２０１３／００７２５４８号；ならびにＧｈｏｓｈら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １３（４）：３２１－３２９，２００６）を参照のこと）、本明細書に開示される組換え核酸分子、ベクターおよび方法と共に利用され得る。

【００８６】

以下の実施例は、特定の特徴および／または実施形態を例証するために提供される。これらの実施例は、記載される特定の特徴または実施形態に本開示を限定すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【００８７】

実施例１：材料および方法

抗体－Ｓｍａｄ７（Ｉｍｇｅｎｅｘ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ｐＳｍａｄ３（Ｅｐｉｔｏｍｉｃｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）およびＧＡＰＤＨ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）に対する抗体を除いて、使用した抗体はすべて、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ（Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）から入手した。

【００８８】

ｒＡＡＶ６ベクターの生産－Ｓｍａｄ７（ＧｅｎＢａｎｋ参照番号ＮＭ＿００１０４２６６０．１）（これは、マウスｃＤＮＡライブラリーからＰＣＲ増幅した）、アクチビンＡ、ミオスタチンおよびＳｍａｄ３－ＣＡ（すべて、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪによる合成）をコードするｃＤＮＡ構築物を、標準的なクローニング技術を使用して、ＣＭＶプロモーター／エンハンサーおよびＳＶ４０ポリＡ領域とそれに隣接するＡＡＶ２末端反復からなるｒＡＡＶ発現プラスミドにクローニングした。得られたベクターの配列は、配列番号５に提供されている；マップは、図１２に提供されている。これらのプラスミドを、ｐＤＧＭ６パッケージングプラスミド（これは、ＡＡＶ６キャップ遺伝子、ＡＡＶ２レップ遺伝子およびさらにアデノウイルスヘルパー遺伝子を含有する；Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１０，８２８－８３４，２００４；参照により本明細書に組み込まれる）と共にＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトして、６型シュードタイプウイルスベクターを作製し、これを回収および精製した（Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、Ｎａｔ Ｍｅｄ １０，８２８－８３４，２００４）。簡潔に言えば、ＨＥＫ２９３細胞を、細胞３．２～３．８×10^6個の密度で１０ｃｍ培養皿上にプレーティングし、８～１６時間後、リン酸カルシウム沈殿法によって、１０μｇのベクター－ゲノム含有プラスミドおよび２０μｇのパッケージング／ヘルパープラスミドｐＤＧＭ６をトランスフェクトして、シュードタイプ６ベクターを作製した。トランスフェクションの７２時間後、培地および細胞を収集し、マイクロフルイダイザー（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，Ｗｅｓｔｗｏｏｄ，ＭＡ）によってホモジナイズしてから、０．２２μｍ（Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）で清澄化した。ヘパリンアフィニティーカラム（ＨＩＴＲＡＰ（商標），ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ

，ＰＡ）のアフィニティークロマトグラフィーによって、清澄化した溶解物からベクターを精製し、一晩超遠心分離してから、滅菌生理リンガー液に再懸濁した。カスタマイズされた配列特異的ＰＣＲベースの反応（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）を用いて、精製ベクター調製物を力価測定した。

【００８９】

動物実験－科学目的のための動物の管理および使用に関する関連実施基準（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，ＵＳＡ，１９８５；ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｈｅａｌｔｈ&Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｏｕｎｃｉｌ　ｏｆ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ，２０１３）にしたがって、すべての実験を行った。

【００９０】

ベクターの局所送達では、マウスをイソフルランで、またはケタミン（１００ｍｇ／ｋｇ）とキシラジン（１０ｍｇ／ｋｇ；腹腔内注射、ＶＭ　Ｓｕｐｐｌｉｅｓ，Ｃｈｅｌｓｅａ　Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＶＩＣ，ＡＵ）との混合物で深麻酔した。３０μＬのハンクス緩衝食塩溶液（ＨＢＳＳ）中、所定のベクターの１～１０×１０^{9}のベクターゲノムを後肢前面（これは、前脛骨筋（ＴＡ）および長趾伸筋（ＥＤＬ）の筋肉によって占有されている）に直接投与した。対側肢の対照注射は、機能遺伝子（ｒＡＡＶ６：ＭＣＳ）を欠くベクターを使用した（Ｈａｎら、Ｉｎｔ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ，４５：２３３３－２３４７，２０１３）。全身送達研究では、２００μＬ容量のＨＢＳＳ中、３～５×１０^{12}のベクターゲノムを経尾静脈投与した。ラパマイシン実験では、以前に記載されているように（Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ａｍ　Ｊ　Ｐａｔｈｏｌ　１５６，９１１－９２３，２０００）、ラパマイシンを、０．２％カルボキシメチルセルロースナトリウム塩（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）および０．２５％ポリソルベート－８０（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を含有する水溶液に一晩溶解した。これらの実験では、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７注射の３時間前から開始して１４日間（それを含む）継続する毎日腹腔内注射として、２ｍｇ／ｋｇ／日のラパマイシン（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ（登録商標），Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）またはビヒクルをマウスに投与した。組織採取では、頸椎脱臼によってマウスを人道的に殺し、筋肉を迅速に摘出および計量した後、続いて加工した。ＣＤ２Ｆ１またはＢＡＬＢ／ｃマウスを使用して、Ｃ－２６由来腫瘍組織の移植を行った。以前に記載されているように（Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ　Ｍｅｄ　１０，２７９－２８５，２０００；Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ａｍ　Ｊ　Ｐａｔｈｏｌ　１５８，２０１１－２０２０，２００１）、細胞または組織を背脇腹に移植した。簡潔に言えば、移植直前に細胞を継代し、１０％ＤＭＥＭ培地で再構成した一方、液体窒素から腫瘍片を解凍した。次いで、トロカール針を使用して、背脇腹の小切開によって、細胞または１ｍｍ^{3}切片を移植し、２１日後にマウスをターミネイトした。エコーＭＲＩ技術（Ｅｃｈｏ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）を使用して、インヒビンαヌルマウスの脂肪量、脂肪なしの量および総体重を分析した。

【００９１】

リアルタイムＰＣＲ－トリゾール（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して、ＴＡ筋細胞から全ＲＮＡを収集した。Ｈｉｇｈ　Ｃａｐａｃｉｔｙ　ＲＮＡ－ｔｏ－ｃＤＮＡキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、５００～１０００ｎｇのＲＮＡを逆転写した。次いで、Ｔａｑｍａｎ（商標）ポリメラーゼアッセイオンデマンドキットおよび検出ソフトウェア（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してＲＴ－ＰＣＲによって、Ｓｍａｄ７、Ｆｏｘｏ１、Ｆｏｘｏ３、ＭＡＦｂｘおよびＭｕＲＦ１のｃＤＮＡを分析した。１８Ｓを使用して、ｃＤＮＡ濃度を正規化した。$\Delta\Delta C_T$分析法を使用して、データを分析した。ＳＹＢＲ（登録商標）ＧｒｅｅｎリアルタイムｐｃＲ検出法によって、アクチビンＡ（Ｆ：ＧＧＡＧＴＧＴＧＡＴＧＧＣＡＡＧＧＴＣＡＡＣＡ、配列番号１；Ｒ：ＧＴＧＧＧＣＡＣＡＣＡＧＣＡＴＧＡＣＴＴＡ、配列番号２）およびミオスタチン（Ｆ：ＣＣＣＡＧＡＧＧＴＴＣＡＧＣＡＧＧＣＣＣＴ、配列番号３；Ｒ：ＴＣＡＴ

ＧＡＧＣＡＣＣＣＡＣＡＧＣＧＧＴＣ、配列番号４）を検出した。
【００９２】
ＥＬＩＳＡ－以前に記載されている改変（Ｓａｔｏｍｉら、Ｓｔｒｏｋｅ　３４，７８３－７８９，２００３）を使用して、製造業者の説明書（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｂｉｏ－ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄｓｈｉｒｅ，ＵＫ）にしたがってＥＬＩＳＡによって、マウス血清中のアクチビンＡの濃度を決定した。製造業者の説明書（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）にしたがって、対照マウスおよび悪液質マウス由来の血清ＩＬ－６を測定した。
【００９３】
ルシフェラーゼ実験－２４ウェルプレート中、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、１ウェル当たり０．３５μｇのＳｍａｄ７プラスミド、０．２５μｇのｐＣＡＧＡ－ｌｕｃプラスミドまたは０．２５μｇのＬａｃＺプラスミドのいずれかをＣ２Ｃ１２細胞にトランスフェクトした。１６時間後、培地を交換し、対照マウスまたはＣ－２６腫瘍担持マウス由来の血清を２４時間補充した。次いで、細胞を細胞溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解し、ルミノメーター（Ｂｅｒｔｈｏｌｄ，Ｂａｄ　Ｗｉｌｄｂａｄ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、ｐＣＡＧＡ－ルシフェラーゼ活性とβ－ガラクトシダーゼレポーター活性との比として示されており、データは、３回の独立した実験の代表的なものである。市販のβ－ｇａｌ検出アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、β－ガラクトシダーゼを検出した。簡潔に言えば、溶解物を２×β－ガラクトシダーゼ緩衝液と共に３７℃で最大１時間インキュベートした。続いて、β－ｇａｌ発現を４２０ｎｍで測定した。
【００９４】
組織学－採取した筋肉をＯＣＴ抗凍結剤中に入れ、液体窒素冷却イソペンタンで凍結した。続いて、凍結サンプルを厚さ１０μｍの凍結切片にし、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色して、形態を検査した。ＤｅＰｅＸ封入剤（ＢＤＨ，ＶＷＲ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｒａｄｎｏｒ，ＰＡ）を使用して切片をマウントし、ＩＸ７１顕微鏡およびＰｌａｎＣ　１０×／０．２５対物レンズ（Ｏｌｙｍｐｕｓ）に取り付けたＵ－ＴＶ１Ｘ－２カメラを使用して、染色切片の画像をキャプチャした。ＤＰ２－ＢＳＷ取得ソフトウェア（Ｏｌｙｍｐｕｓ）を使用して、画像を取得した。線維型分析では、ＴＡ筋中腹から、連続横断面凍結切片を得た（－２０℃、ＣＴＩ　Ｃｒｙｏｓｔａｔ；ＩＥＣ，Ｎｅｅｄｈａｍ　Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＭＡ）。筋線維直径および断面積（ＣＳＡ）の決定ためにラミニン（＃Ｌ９３９３，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ならびに／またはＮ２．２６１（Ｄｒ．Ｈ．Ｍ．Ｂｌａｕが開発、Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｂａｎｋから入手、ＮＩＣＨＤの援助の下で開発、およびＴｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｉｏｗａ，Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｉｏｗａ　Ｃｉｔｙ，ＩＡが保管）で切片を染色して、それぞれＩ型（Ｔｏｒｓｎｅｙら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　１０７，１６５３－１６５７，２００３）およびＩＩａ型（Ｄｕｒｉｅｕｘら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ　１４８，３１４０－３１４７，２００７）ミオシンアイソフォームの割合を評価した。以前に示されているように（Ｌｏｋｉｒｅｄｄｙら、Ｍｏｌ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ　２５，１９３６－１９４９，２０１１）、マウスＴＡ筋中の非Ｎ２．２６１反応性線維はすべて、ＩＩｘ／ｂ型線維であると仮定した。カメラを備える正立顕微鏡（Ａｘｉｏ　Ｉｍａｇｅｒ　Ｄ１，Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ，Ｗｒｅｋ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してデジタル画像を得、ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　ＡＣソフトウェア（ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　ＡＣ　Ｒｅｌ．４．７．１，Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）によって制御および定量した。ＩｍａｇｅＪソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）を使用して、マウスＴＡ筋１つ当たり少なくとも５００本の筋線維を測定することによって、最小フェレ径および筋線維面積を決定し、１群当たり少なくとも３匹のマウスを使用して、これらの変数を定量した。

【００９５】
ウエスタンブロッティング－ＣＯＭＰＬＥＴＥ（商標）ＥＤＴＡフリープロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を含むＲＩＰＡベースの溶解緩衝液（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）中で、ＴＡ筋をホモジナイズした。溶解後、１３０００ｇ、４℃で１０分間遠心分離し、サンプルを９５℃で５分間変性させた。Ｐｉｅｒｃｅタンパク質アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用して、タンパク質濃度を決定した。続いて、プレキャスト４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、タンパク質画分を分離し、ニトロセルロース膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）上にブロットし、適切な抗体と共に一晩インキュベートした。ＩｍａｇｅＪピクセル分析（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ）を使用して、標識したウエスタンブロットの定量を実施し、１の対照値に対してデータを正規化した。ウエスタンブロットのデンシトメトリー分析は、ローディング対照に対して正規化したバンド密度として示されており、少なくとも３回の独立した実験の代表的なものである。

【００９６】
Ａｋｔキナーゼアッセイ－製造業者の説明書にしたがって、非放射性Ａｋｔキナーゼアッセイ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）を実施した。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７またはｒＡＡＶ６：ＭＣＳをＴＡ筋に注射し、収集し、ホモジナイズし、次いで、ＡｋｔのＳｅｒ４７３部位に対する抗体を使用して、タンパク質サンプルを免疫沈降に一晩供した。タンパク質溶解物の一部を全細胞溶解物として確保した。次いで、免疫沈降ビーズをペレット化し、洗浄し、キナーゼ緩衝液、ＡＴＰおよびＧＳＫ３α融合タンパク質と共に３０℃で３０分間インキュベートした。次いで、反応物を不活性化し、ウエスタンブロッティングによってサンプルを分析した。全Ａｋｔレベルに対して、Ａｋｔキナーゼ活性を正規化した。

【００９７】
エクスビボタンパク質合成－腱を無傷でＥＤＬ筋を摘出し、４％ウシ血清アルブミン（Ｂｏｖｏｓｔａｒ，Ｂｏｖｏｇｅｎ，Ｅａｓｔ　Ｋｅｉｌｏｒ，ＶＩＣ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）および５ｍＭグルコースを補充した４．５％ＮａＣｌ、５．７５％ＫＣｌ、６．１％ＣａＣｌ２、１０．５５％KH_2PO_4、１９．１％$MgSO_4.7H_2O$、１６％ｖ／ｖ　$NaHCO_3$（ｐＨ＝７．４）からなる２．０ｍＬの加温（３０℃）改変クレブス・ヘンゼライト緩衝液（ＫＨＢ）中で３０分間プレインキュベートしてから、９５：５％O_2：CO_2でガス処理した。１時間かけて、ＫＨＢ中５μＣｉ／ｍＬの３Ｈ－チロシン（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）および５００ｍＭのＬ－チロシンを含む２．０ｍＬのパルス（放射性）緩衝液を含有するバイアルにＥＤＬ筋を移すことによって、細胞内タンパク質プールを標識した。標識後、筋肉を非放射性ＫＨＢでリンスし、乾燥ブロットし、計量し、液体窒素で急速凍結し、－８０℃で保存した。凍結した筋肉を、５００μＬの１０％トリクロロ酢酸中でホモジナイズし、１０，０００ｇで１５分間遠心分離した（４℃）。不溶性タンパク質画分に対応するペレットを５００μＬの１Ｍ　ＮａＯＨに再懸濁し、室温で一晩溶解した。チロシン取り込みを評価するために、再懸濁した１００μＬの各サンプルを５ｍＬのシンチレーション液に追加し、シンチレーションカウンター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｂｒｅａ，ＣＡ）によって各サンプルについて３回反復で、３Ｈ放射活性を測定した。

【００９８】
筋肉機能の評価－以前に記載されているように（Ｈａｎら、Ｉｎｔ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ，４５：２３３３－２３４７，２０１３；Ｌｏｋｉｒｅｄｄｙら、Ｍｏｌ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ　２５，１９３６－１９４９，２０１１）、経皮電極によって一連の電気刺激を脛骨運動神経に送達し、外科用絹縫合糸で遠位の腱に接続した力変換器によって、収縮中に発生した張力を記録することによって、マウスＴＡ筋の収縮特性をインサイチューで評価した。試験前に、腹腔内注射によってペントバルビタールナト

リウム（ＮＥＭＢＵＴＡＬ（登録商標）；６０ｍｇ／ｋｇ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）でマウスを麻酔し、深麻酔状態のまま、評価の終了時に心臓切除によって人道的に殺した。プロトコールの終了時に、筋肉を迅速に切除し、腱および結合組織を避けて切開し、計量した。

【００９９】

統計分析－一元配置または二元配置ＡＮＯＶＡ試験を使用して、統計的差異を複数条件で評価し、スチューデント・ニューマン・クールズ事後検定を群平均間の比較に使用した。２つの条件間の比較では、スチューデントｔ検定のみを利用した。ｐ＜０．０５の値について、群間の差異を統計的に有意であると報告した。データは、平均±ＳＥＭとして示されている。

実施例２：Ｓｍａｄ７の発現の増加は、骨格筋肥大を促進する

【０１００】

本実施例では、マウスの前脛骨筋（ＴＡ）後肢筋への、Ｓｍａｄ７発現カセット（ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７）を有するｒＡＡＶ６ベクター（Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、ＮａｔＭｅｄ １０，８２８－８３４，２００４；Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、ＮａｔＭｅｄ １２，７８７－７８９，２００６）の注射は、Ｓｍａｄ７タンパク質発現（図１Ｂ）および筋線維直径（図１Ｃ～１Ｄ）の増加に付随して、注射の２８日以内に筋肉量の約４５％の増加を誘発した（図１Ａ）。尾静脈投与によってｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７をマウスの筋肉組織に全身的に形質導入すると、骨格筋の肥大が体全体に促進された（図１Ｅ～１Ｆ）。ｒＡＡＶ６ベクターは、横紋筋に対する親和性を示すので（Ｇｒｅｇｏｒｅｖｉｃら、Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ６，４９１－４９８，２００４）、続いて、本発明者らは、内臓器官または脂肪ではなく横紋筋においてＳｍａｄ７タンパク質が迅速に発現され（図１Ｆ）、腎臓、脾臓、肝臓および肺を含む非筋肉組織のサンプルでは、Ｓｍａｄ２／３遺伝子標的（ＣＴＧＦ、ＣＯＬ１Ａ１、ＰＡＩ１、ＦＮ１）の発現も変化しなかった（図２Ａ～２Ｂ）と決定した。全身性「リガンドトラップ」を使用したＡｃｔＲＩＩｂシグナル伝達のアンタゴナイズは、遺伝性出血性毛細血管拡張症（ＨＨＴ）の兆候をもたらし得るので（Ｓｍｉｔｈ＆Ｌｉｎ，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｕｐｐｏｒｔ Ｐａｌｌｉａｔ Ｃａｒｅ ７，３５２－３６０，２０１３；Ｂｏｕｒｄｅａｕら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １０４：１３４３－１３５１，１９９９）、血管の完全性も評価した。重要なことに、本発明者らの組織学的分析または肉眼的形態評価のいずれにおいても、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与はＨＨＴの兆候をもたらさなかったが、筋線維サイズの増加が再認され、これは、筋肉内注射によって得られたものと同程度であった（図２Ｃ～２Ｄ）。

【０１０１】

さらなる実施例では、本発明者らは、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７投与の効果がＳｍａｄ２／３シグナル伝達の阻害に起因していたかを検査したところ、Ｓｍａｄ７を発現する筋肉では、Ｓｍａｄ３ Ｓ４３２／４３５リン酸化が強く抑制されていたことを見出した（図１Ｇ）。また、構成的活性型Ｓｍａｄ３の存在下では、Ｓｍａｄ７の効果が無効化されていた（Ｌｉｕら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ９４，１０６６９－１０６７４，１９９７）（ＣＡ－Ｓｍａｄ３、図１Ｈ～１Ｉ）。本発明者らは、Ｓｍａｄ７発現がＡｋｔおよびｍＴＯＲの下流のシグナル伝達（タンパク質合成を促進する重要な機構）に影響を及ぼしたかを評価した（Ｂｏｄｉｎｅら、Ｎａｔ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ３，１０１４－１０１９，２００１）。Ｓ６ＲＰＳ２３５／２３６および４ＥＢＰ１Ｔ３７／４６を含むｍＴＯＲの下流の標的のリン酸化の増加に付随して、筋肉におけるＳｍａｄ７過剰発現は、タンパク質合成速度を増加させたが、本発明者らは、Ａｋｔリン酸化または活性の変化を検出することができず（図３Ａ～３Ｃ）、ラパマイシン（Ａｋｔ標的であるｍＴＯＲの阻害剤）の投与は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７に対する筋肉の肥大応答を抑制しなかった（図３Ｄ～３Ｅ）。本発明者らは以前に、ｍＴＯＲシグナル伝達を完全に排除したにもかかわらず、Ｓｍａｄ３シグナル伝達の阻害がタンパク質合成を部分的に阻害するに過ぎないことを実証したので（Ｗｉｎｂａｎｋｓら、Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ

１９７，９９７－１００８，２０１２）、これは特に驚くべきことではない。他者もまた、Ｓ６ＲＰが、上流ＭＥＫ／ＥＲＫシグナル伝達によってｍＴＯＲ依存的または非依存的に調節され得ることを実証している（Ｗｕら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ４００，６７９－６８３，２０１０；Ｉｉｊｉｍａら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７，２３０６５－２３０７５，２００２）。したがって、本発明者らは、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の同化作用がタンパク質分解機構の阻害に関連していたかを調査したところ、Ｓｍａｄ７が、Ｅ３ユビキチンリガーゼＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘの基本発現およびＳｍａｄ３誘導性発現を減衰したことを見出した（図３Ｆ～３Ｇ）。したがって、Ｓｍａｄ７は、Ａｋｔ／ｍＴＯＲシグナル伝達を増強することによってではなく、Ｅ３リガーゼ活性および続いてタンパク質分解を抑制し（図３Ｆ）、タンパク質合成と分解との間のバランスをシフトさせて筋肉同化を促すことによって、筋肉量を調節する。

実施例３：Ｓｍａｄ７は、ミオスタチンおよびアクチビン誘導性筋萎縮症を予防する

【０１０２】

本実施例では、本発明者らは、野生型マウスおよびミオスタチンヌル（ｍｓｔｎ－／－）マウスにおけるｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７有効性を比較した。

【０１０３】

ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、筋肉量の同様の絶対変化を誘導し、線維断面積を増加させ、Ｓｍａｄ３リン酸化を減衰したが、ｍｓｔｎ－／－マウスでは、筋肉量の相対変化があまり顕著ではなかった（図４Ａ～４Ｄ）。ウシ科動物におけるポジティブ選択は、「部分的にヌルの」現生種をもたらしたように、これは、ｍｓｔｎ－／－マウスおよびウシの相対的な筋肉過多を比較する際に（Ｔｅｌｌｇｒｅｎら、Ｍｏｌ Ｐｈｙｌｏｇｅｎｅｔ Ｅｖｏｌ ３３，７８２－７９０，２００４）、ＡｃｔＲＩＩＢ活性を減衰するためのアプローチを組み合わせることによって以前に実証された筋肉組織における特有の限界に類似している（Ｌｅｅ，ＰＬｏＳ ＯＮＥ ２，ｅ７８９，２００７）。それにもかかわらず、ｍｓｔｎ－／－マウスにおけるｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の肥大作用は、ＡｃｔＲＩＩＢリガンド（アクチビンおよびＧＤＦ－１１）の冗長作用を実証する以前の研究（Ｌｅｅ，ＰＬｏＳ ＯＮＥ ２，ｅ７８９，２００７；Ｌｅｅら、Ｍｏｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ ２４，１９９８－２００８，２０１０）を裏付けており、アクチビンＡおよびミオスタチンが筋萎縮症を同様に刺激することができることを示唆する本発明者らの最近の研究（Ｃｈｅｎら、ＦＡＳＥＢ Ｊ．，２８（４）：１７１１－１７２３，２０１４）によって裏付けられる。実際、マウスへのｒＡＡＶ６：アクチビンまたはｒＡＡＶ６：ミオスタチンの形質導入は、同時に筋萎縮症を誘導し、Ｓｍａｄ３リン酸化を増加させた。これらの効果は、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の同時投与によって完全に防止されたが、ミオスタチンまたはアクチビンＡ発現のいずれにも影響はなかった（図４Ｅ～４Ｇ；図５Ａ～５Ｃ）。したがって、Ｓｍａｄ７は、筋肉における複数のＡｃｔＲＩＩＢリガンドの冗長作用を阻害し得る。

実施例４：Ｓｍａｄ７の増加は、癌悪液質に関連する筋消耗を予防する

【０１０４】

ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達は、癌悪液質の発症および進行に寄与すると仮説されているので（Ｂｅｎｎｙ Ｋｌｉｍｅｋら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３９１，１５４８－１５５４，２０１０；Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０；Ｚｉｍｍｅｒｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６，１４８６－１４８８．，２００２；Ｃｏｅｒｖｅｒら、Ｍｏｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １０，５３４－５４３，１９９６；Ｌｏｋｉｒｅｄｄｙら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ ４４６，２３－３６，２０１２）、本実施例では、本発明者らは、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が、悪液質を誘導するＣ－２６結腸癌腫由来腫瘍を担持するマウスにおける筋消耗を予防し得るかを検査した。

【０１０５】

腫瘍担持マウスでは、体重、骨格筋量、心臓質量および脂肪量はすべて減少していた（図５Ａ～５Ｄ）。対照的に、腫瘍担持マウスのＴＡ筋へのｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の注射

は、筋肉量（図７Ａ）、ピーク等尺性力（図７Ｂ、図６Ｅ）および筋線維断面積（ＣＳＡ、図７Ｃ）の減少を完全に防止した。癌悪液質はまた、ＩＩａ型線維の分布を減少させ、ＩＩｘ／ＩＩｂ型線維の分布を増加させたが、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、これらの割合を元に戻した（図６Ｆ～６Ｇ）。悪液質またはｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７処置のいずれにおいても、筋線維の数は変化しなかったが（図６Ｇ～６Ｉ）、これは、筋肉量の腫瘍媒介性減少が、アポトーシスではなく萎縮症によるものであったことを示している。筋消耗が発症する前に悪液質の治療を行うことは常に可能ではない場合があるので、本発明者らは、腫瘍樹立の７日後または１４日後におけるｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の注射も保護的であったかを検査した。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の遅延投与を受けた動物の検査により、処置は依然として、筋萎縮症を有意に改善したことが明らかになった（図７Ｅ）。

【０１０６】

癌悪液質は体全体の筋肉の消耗を引き起こすので、さらなる実施例では、本発明者らは、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が全身レベルで筋萎縮症を予防し得るかを試験した。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の静脈内注射は、腫瘍担持マウスの横紋筋組織全体のＳｍａｄ７発現をロバストに増加させた（図８Ａ～８Ｂ）。処置は、体重の減少を完全に防止しなかったが、持続的な腫瘍発生にもかかわらず（図８Ｅ）、体全体の骨格筋量を保持した（図７Ｆ～７Ｉ、図８Ｃ～８Ｄ）。本発明者らは、筋萎縮症の予防と体重の不完全な維持との間の不一致が、他の組織（Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２）、主に脂肪に対する悪液質の効果に起因すると考える（図８Ｆ～８Ｇ）。癌悪液質は心臓にも影響を与えるので、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７全身投与はまた、腫瘍担持マウスにおける心臓萎縮症を予防したが（図８Ｈ～８Ｉ）、心不全に典型的に関連する（Ｂｅｒｎａｒｄｏら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０９，１７６１５－１７６２０，２０１２）心房質量または総肺重量の増加を誘発しなかった（図８Ｊ～８Ｋ）ことに留意されたい。悪液質の状況におけるｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の治療効果が、採用したモデルに固有のものではなかったことを確認するために、本発明者らは、性腺腫瘍の発症後に顕著な悪液質を示すインヒビンαノックアウトマウスにおいて、本発明者らのｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７介入の有効性を試験した（図９Ａ～９Ｃ）（Ｚｈｏｕら、Ｃｅｌｌ １４２，５３１－５４３，２０１０；Ｃｏｅｒｖｅｒら、Ｍｏｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １０，５３４－５４３，１９９６；Ｍａｔｚｕｋら、Ｎａｔｕｒｅ ３６０，３１３－３１９，１９９２）。Ｃ－２６腫瘍担持マウスから得られた結果と一致して、本発明者らは、インヒビンαヌルマウスの筋肉へのｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の投与が筋萎縮症を予防したことを見出したが（図７Ｊ～７Ｋ）、これは、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７が、腫瘍起源とは無関係に悪液質を予防し得ることを実証している。

実施例５：Ｓｍａｄ７は、ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達の下流のユビキチンリガーゼ活性化を部分的に阻害することによって、筋消耗を予防する）

【０１０７】

悪液質モデルでは、アクチビンＡおよびＢの循環レベルは依然として上昇していたにもかかわらず、Ｓｍａｄ７は、消耗から横紋筋組織を保護した（Ｃ－２６腫瘍担持マウス由来の血清は、Ｃ２Ｃ１２筋原細胞におけるＳｍａｄ３反応性ルシフェラーゼレポーターを依然として活性化することができた、図１０Ａ～１０Ｂ、図１１Ａ）。本発明者らは、悪液質マウスにおけるｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の保護効果が、横紋筋におけるＳｍａｄ３転写およびリン酸化の抑制に起因すると考える（図１０Ｃ～１０Ｄ）。しかしながら、腫瘍および宿主由来のインターロイキン－６（ＩＬ－６）もまた、悪液質の病因に関与するので（Ｆｅａｒｏｎら、Ｃｅｌｌ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １６，１５３－１６６，２０１２；Ｓｔｒａｓｓｍａｎｎら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ８９，１６８１－１６８４，１９９２；Ｆｕｊｉｔａら、Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ６８，６３７－６４３，１９９６；Ｂｏｎｅｔｔｏら、Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ Ｍｅｔａｂ ３０３，Ｅ４１０－４２１，２０１２）、本発明者らは、Ｓｍａｄ７の保護効果が、ＩＬ－６シグナル伝達の変化に関連していたかを検査した。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の投与は、腫瘍担持マウスの筋肉におけるＩＬ－６の循環レベルまたはインターロイキン反応

性Ｓｔａｔ３のリン酸化を変化させず（図１１Ｂ～１１Ｃ）、ｐ６５リン酸化（悪液質促進性サイトカインが結合するＮＦκＢシグナル伝達の重要な調節因子）に影響を与えなかった（図１１Ｄ）。興味深いことに、本発明者らは、Ｓｍａｄ７の過剰発現が、リン酸化Ｆｏｘｏ１または３と全Ｆｏｘｏ１または３との比を変化させなかったが（ＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘの転写調節因子（Ｓａｎｄｒｉら、Ｃｅｌｌ　１１７，３９９－４１２，２００４；Ｓｔｉｔｔら、Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　１４，３９５－４０３，２００４）、図１１Ｅ）、処置が、腫瘍担持マウスの筋肉におけるＦｏｘｏ１／３の存在量を減少させて、全リン酸化形態のレベルの減少をもたらした（図１０Ｅ～１０Ｆ）ことを見出した。Ｆｏｘｏ１／３転写の阻害は、ＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘ転写を抑制することによって、筋消耗を改善し得るので（Ｒｅｅｄら、ＦＡＳＥＢ　Ｊ　２６，９８７－１０００，２０１２）、本発明者らは、ＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘの転写に対する処置の効果について、腫瘍担持マウスの筋肉を検査した。本発明者らは、ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７の投与が、対照ベクターを投与したマウスと比較して、腫瘍担持マウスの筋肉におけるＭｕＲＦ１およびＭＡＦｂｘ発現を抑制したことを観察した（図１０Ｇ）。

実施例６：Ｓｍａｄ７を使用した筋消耗の処置

【０１０８】

本実施例では、筋消耗の処置のための、Ｓｍａｄ７をコードするｒＡＡＶベクターの臨床的使用に関する例示的な方法について記載する。

【０１０９】

筋消耗（例えば、癌悪液質）と診断された被験体を処置のために選択する。本明細書に開示されるように、Ｓｍａｄ７を発現する治療有効量の組換えＡＡＶ（例えば、配列番号５またはＳｍａｄ７を発現することができるその等価物を含むｒＡＡＶ）を被験体に投与する。実施形態では、Ｓｍａｄ７は、被験体と同じ種に由来するものから選択される。組換えＡＡＶは、静脈内投与され得る。適切な治療用量は、医師によって選択され得る。いくつかの場合において、治療有効用量は、ウイルス粒子（ｖｐ）1×10^{10}～1×10^{14}個／ｋｇの範囲内、例えば約1×10^{11}または1×10^{12}ｖｐ／ｋｇである。ほとんどの場合において、組成物を単回用量で投与する。免疫調節の非存在下では、患者は、ｒＡＡＶの単回注入しか許容しない可能性がある。被験体が免疫調節に事前に曝露されていた場合、２つまたはそれを超える用量を投与し得る。被験体の健康を経時的にモニタリングして、処置の有効性を決定し得る。

実施例７：Ｓｍａｄ７を使用した筋肉量および／または筋力の増強

【０１１０】

本実施例では、筋肉量および／または筋力の増加または増強のための、Ｓｍａｄ７をコードするｒＡＡＶベクターの美容的使用に関する例示的な方法について記載する。ｒＡＡＶ６：Ｓｍａｄ７は、健常マウスにおける筋肉量および筋力を増加させることが本明細書で実証されたので、本明細書に記載される方法および組成物は、筋肉量、筋力またはその両方の増加を望む健常被験体における選択的／美容的措置において使用され得る。

【０１１１】

筋肉量および／または筋力の増加を望む被験体を処置のために選択する。本明細書に開示されるように、Ｓｍａｄ７を発現する治療有効量の組換えＡＡＶ（例えば、配列番号５またはＳｍａｄ７を発現することができるその等価物を含むｒＡＡＶ）を被験体に投与する。実施形態では、Ｓｍａｄ７は、被験体と同じ種に由来するものから選択される。組換えＡＡＶは、静脈内投与され得る。適切な治療用量は、医師によって選択され得る。いくつかの場合において、治療有効用量は、ウイルス粒子（ｖｐ）1×10^{10}～1×10^{14}個／ｋｇの範囲内、例えば約1×10^{11}または1×10^{12}ｖｐ／ｋｇである。ほとんどの場合において、組成物を単回用量で投与する。免疫調節の非存在下では、患者は、ｒＡＡＶの単回注入しか許容しない可能性がある。被験体が免疫調節に事前に曝露されていた場合、２つまたはそれを超える用量を投与し得る。被験体の健康を経時的にモニタリングして、処置の有効性を決定し得る。

【０１１２】

開示される本発明の原理が適用され得る多くの実施形態の可能性を考慮して、例証されている実施形態は本発明の好ましい実施例に過ぎず、本発明の範囲を限定すると捉えられるべきではないと認識すべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲および精神に入る本発明者らの発明のすべてを特許請求する。

【図１ＡＢＣ】

FIG. 1A

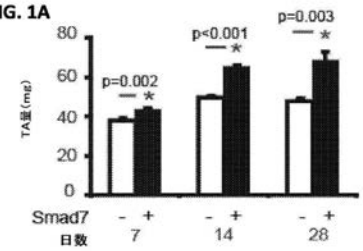


FIG. 1B

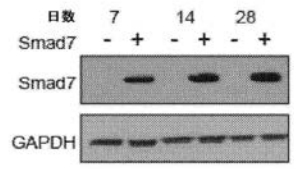
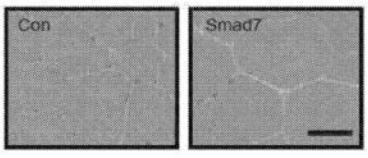


FIG. 1C



【図１ＤＥＦ】

FIG. 1D

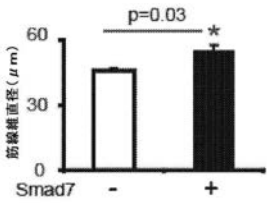


FIG. 1E

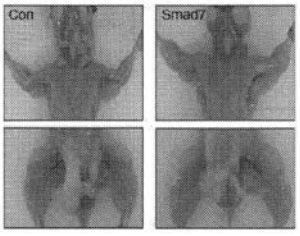
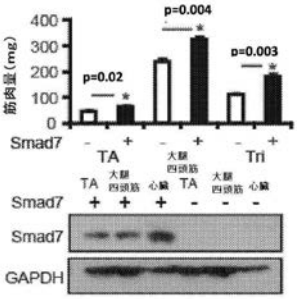
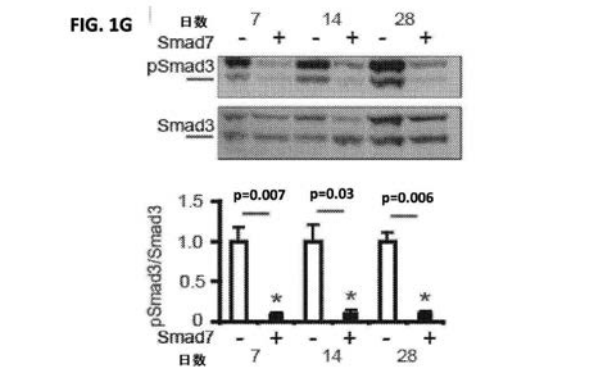


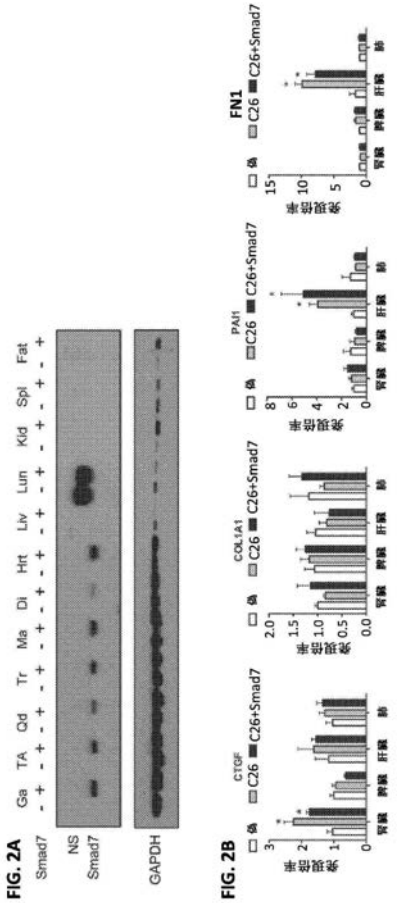
FIG. 1F



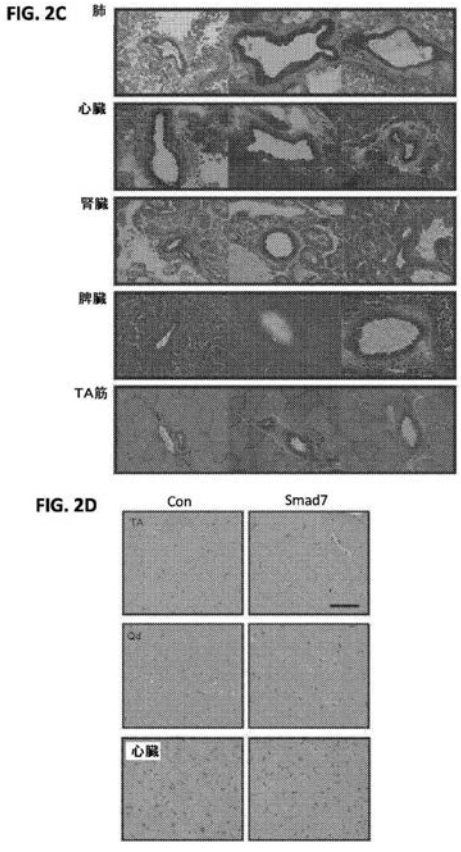
【図１ＧＨＩ】



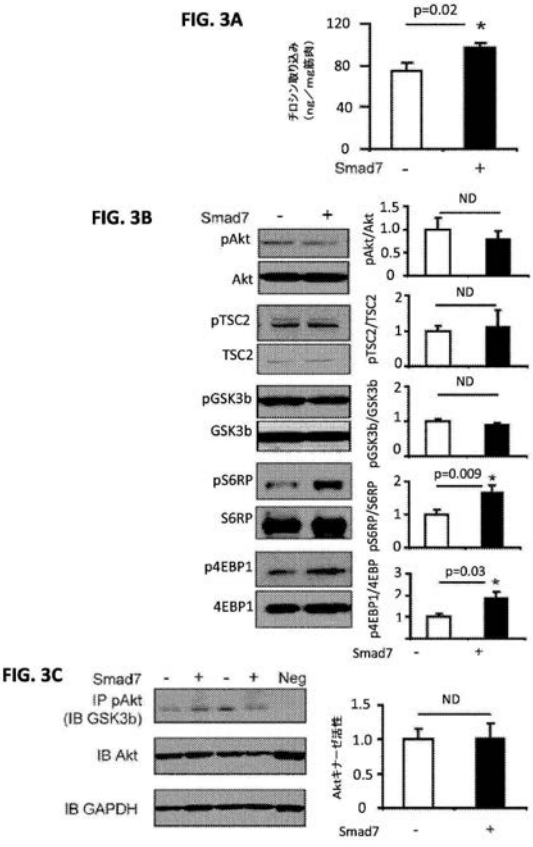
【図２ＡＢ】



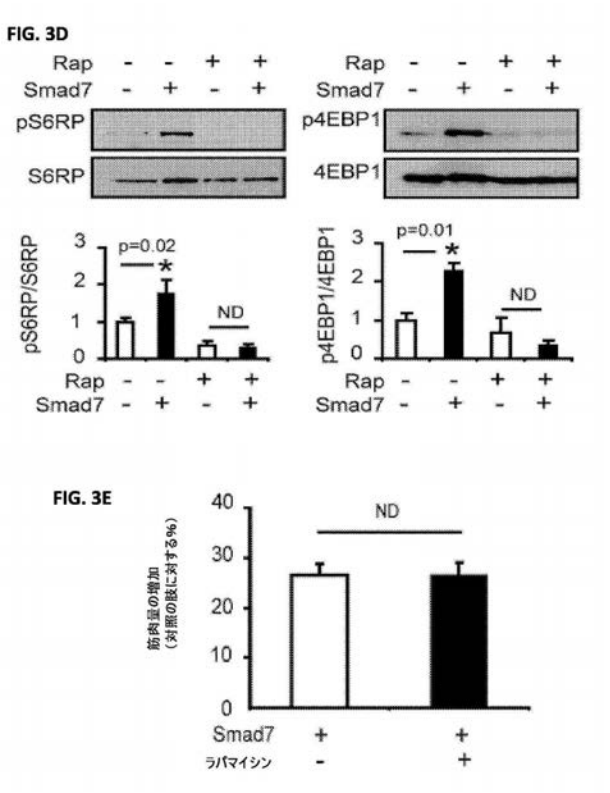
【図２ＣＤ】



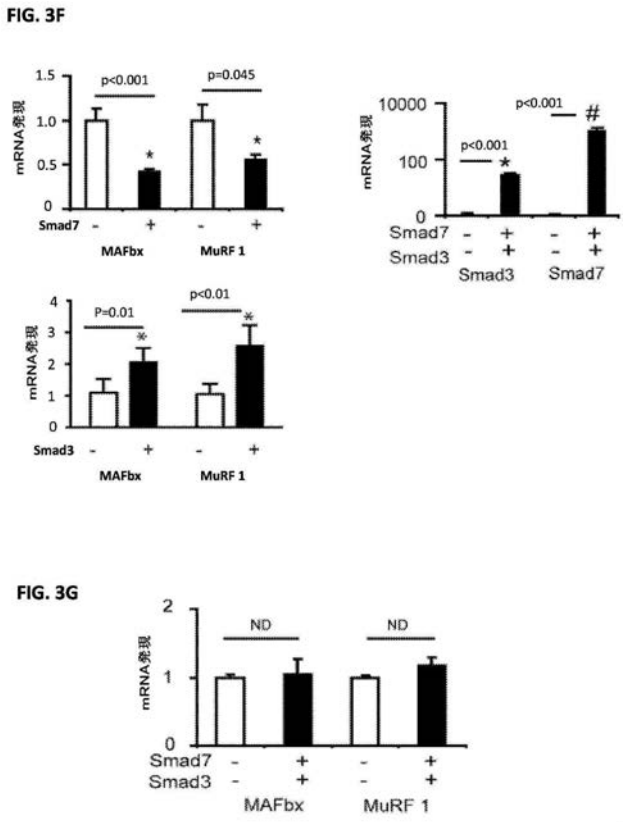
【図３ＡＢＣ】



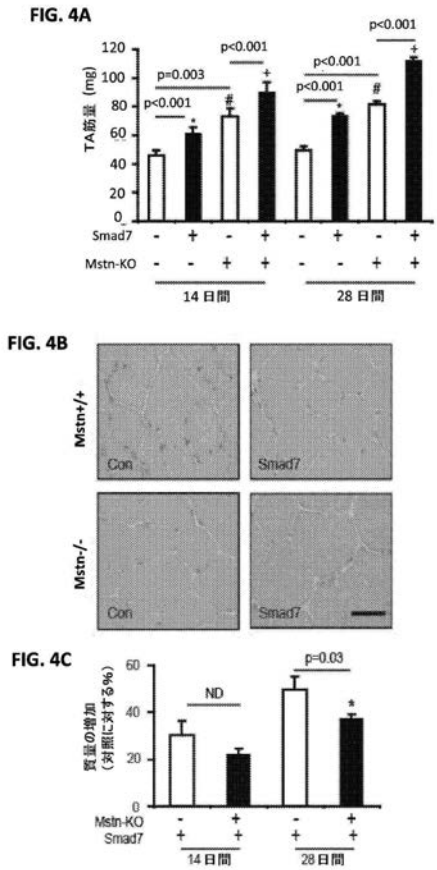
【図３ＤＥ】



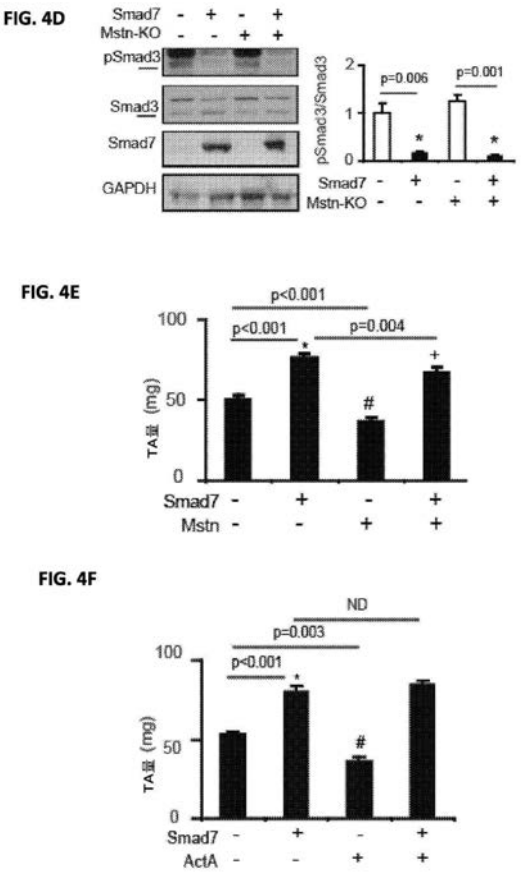
【図３ＦＧ】



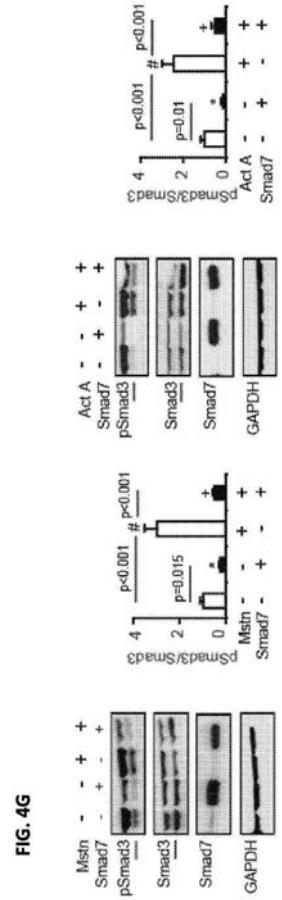
【図４ＡＢＣ】



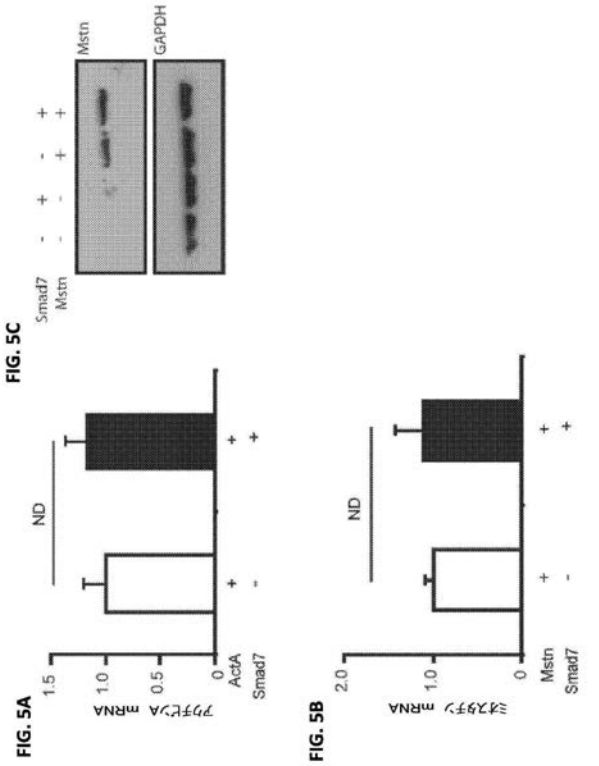
【図４ＤＥＦ】



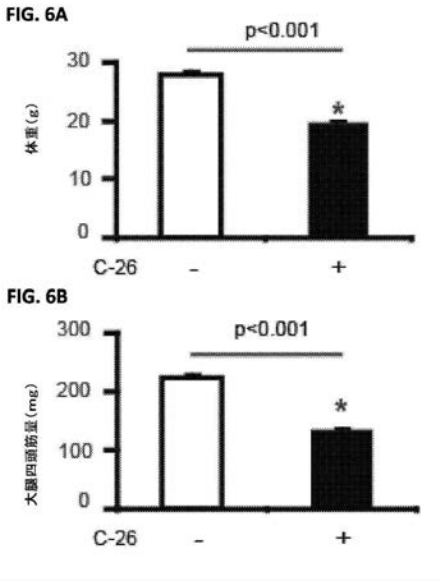
【図４Ｇ】



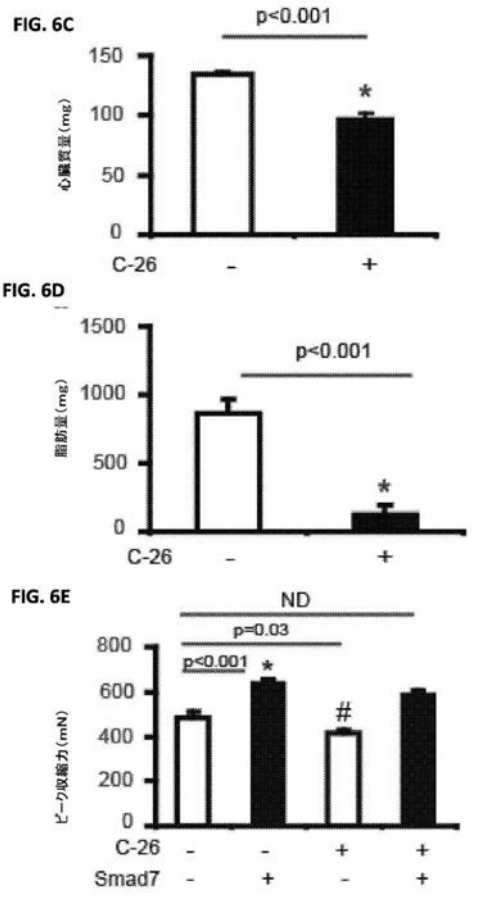
【図５】



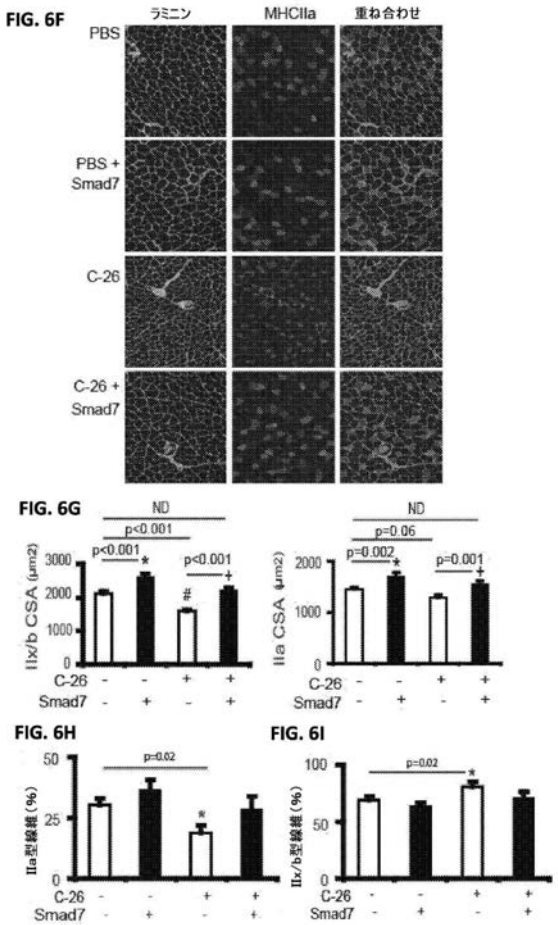
【図６ＡＢ】



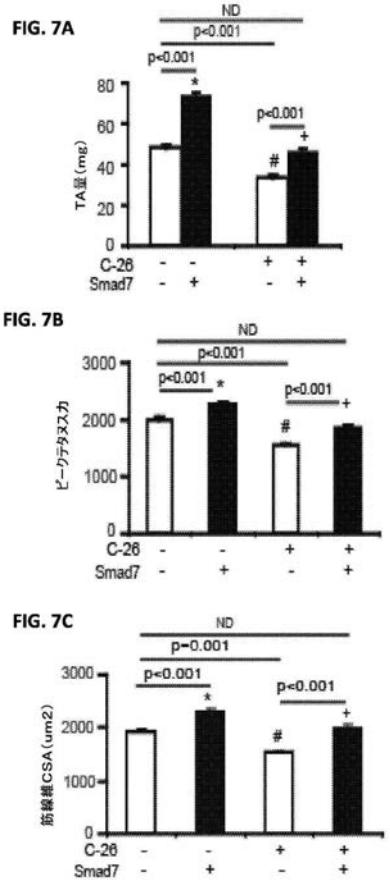
【図６ＣＤＥ】



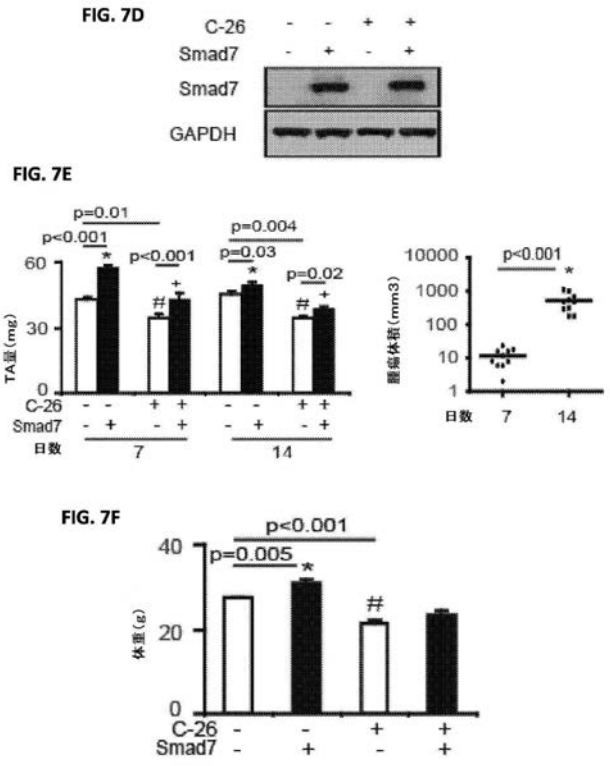
【図６ＦＧＨＩ】



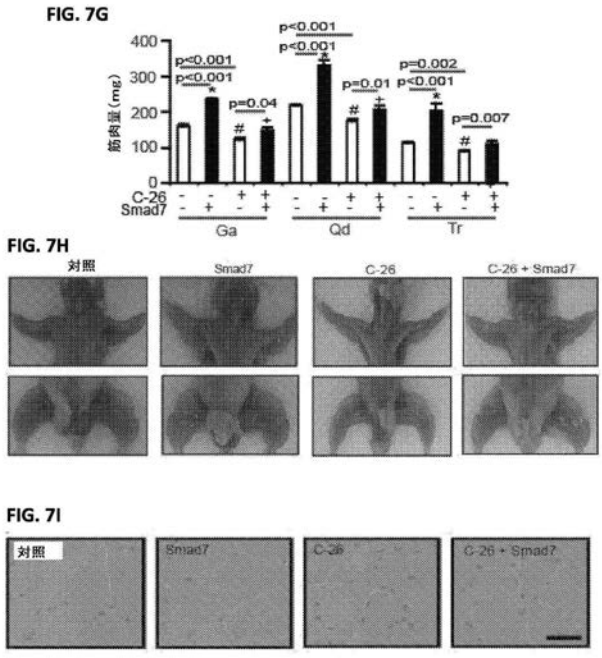
【図７ＡＢＣ】



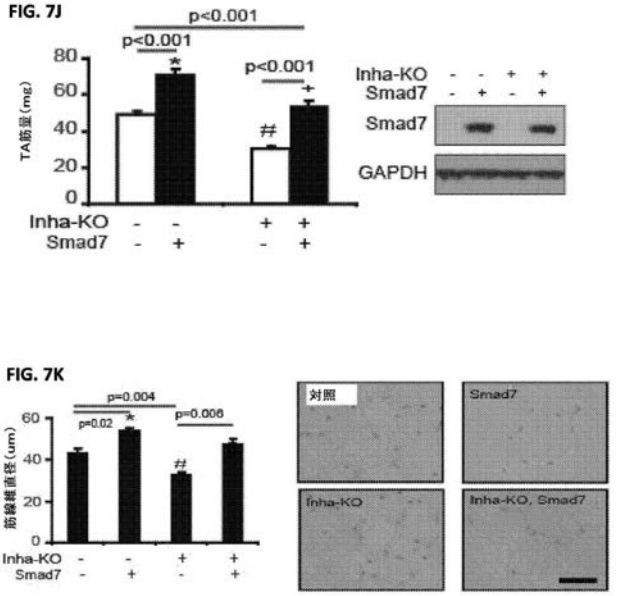
【図７ＤＥＦ】



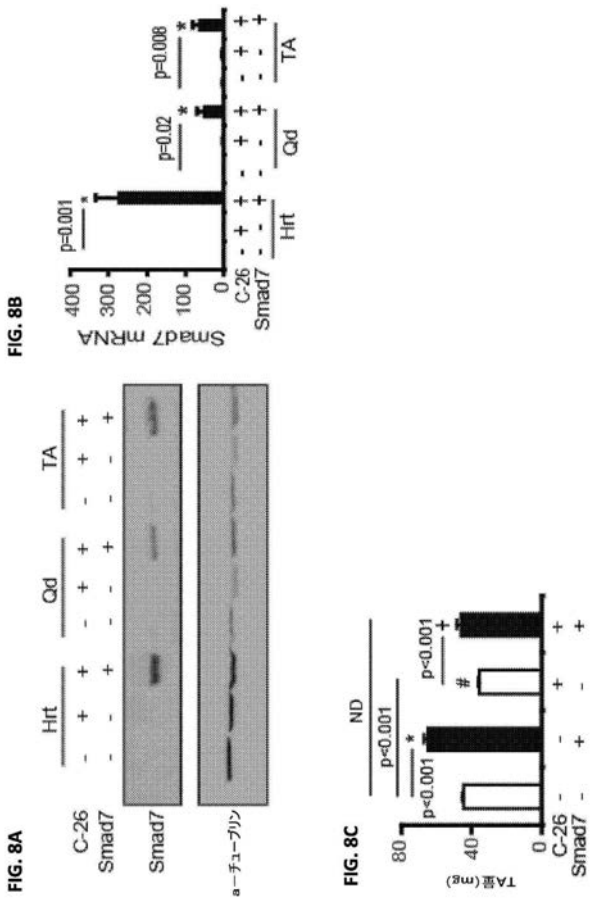
【図７ＧＨＩ】



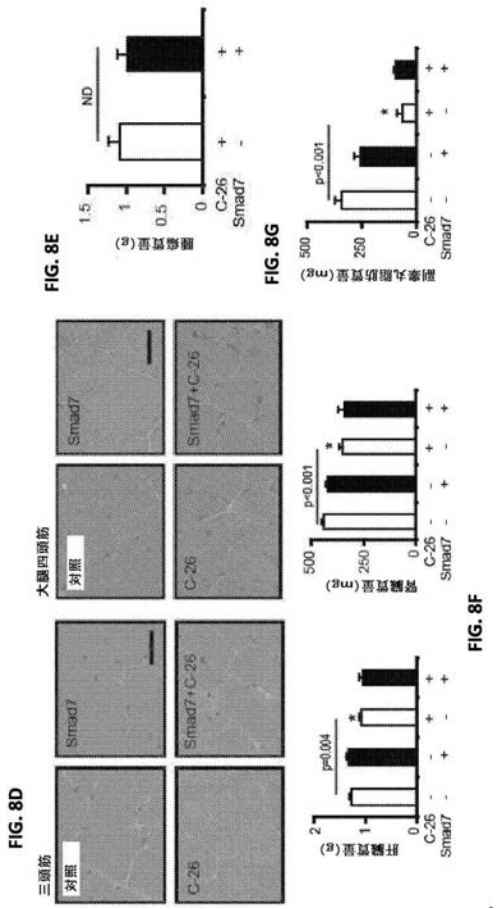
【図７ＪＫ】



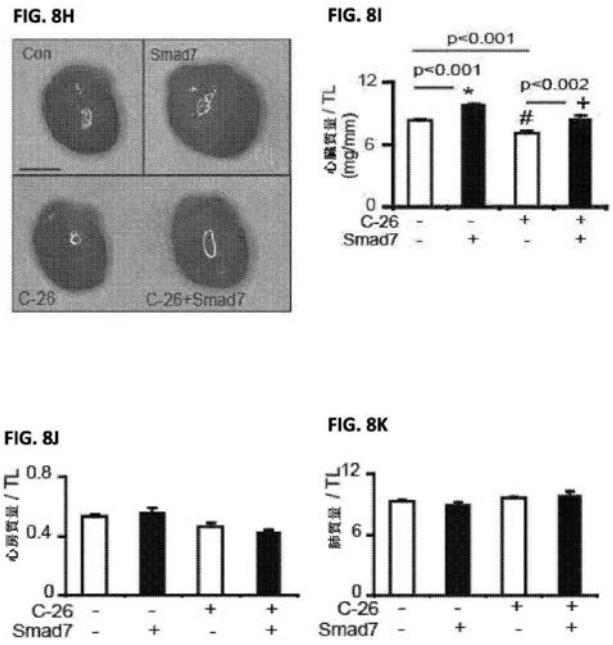
【図８ＡＢＣ】



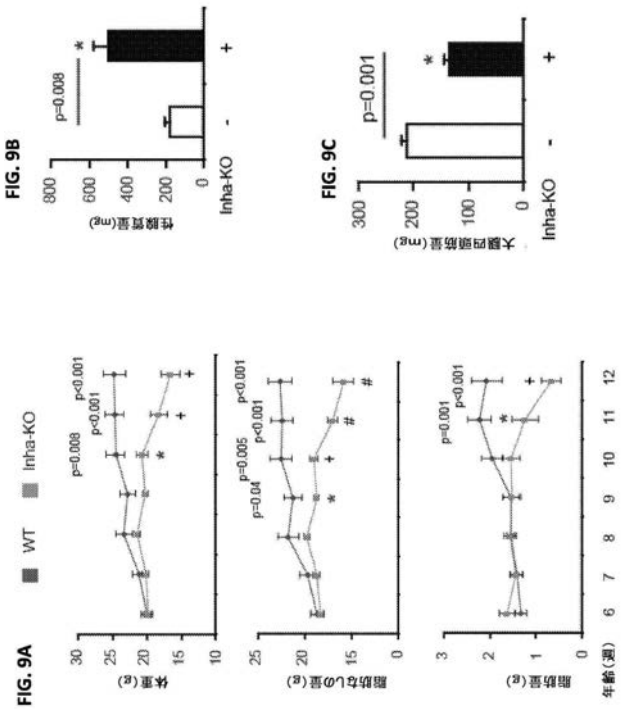
【図８ＤＥＦＧ】



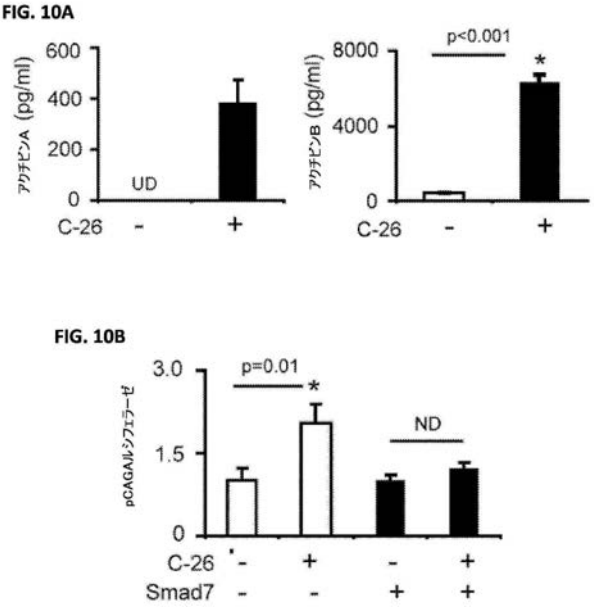
【図８ＨＩＪＫ】



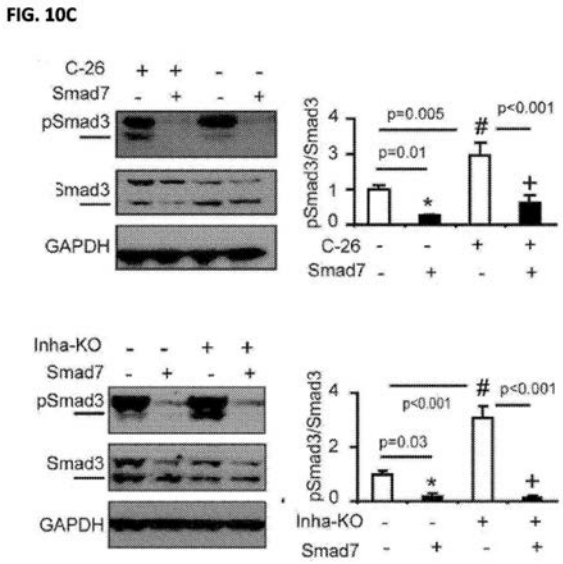
【図９】



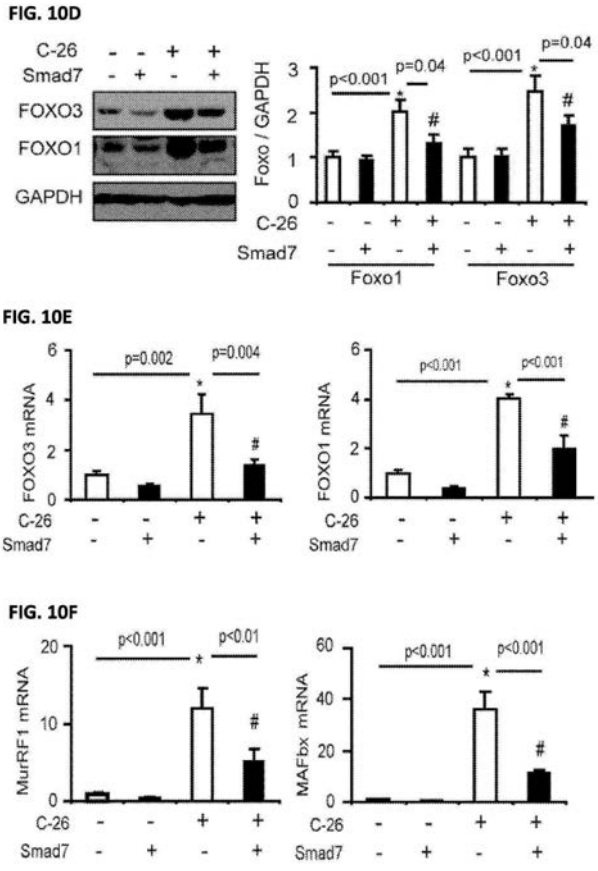
【図１０ＡＢ】



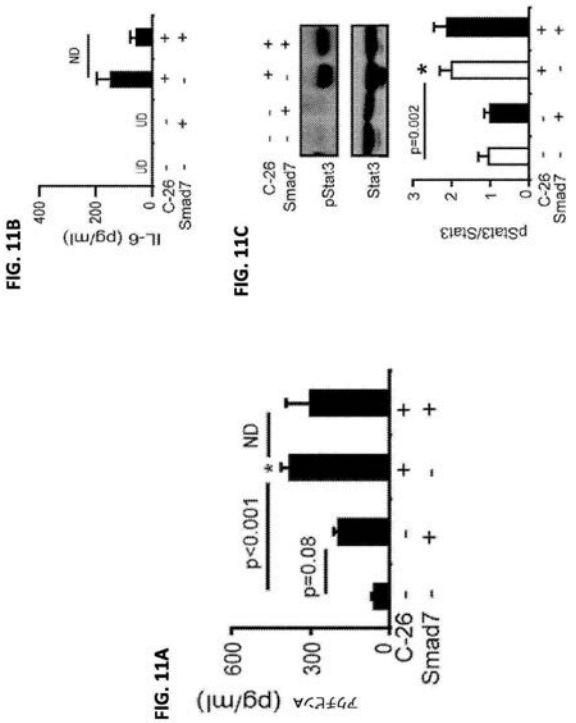
【図１０Ｃ】



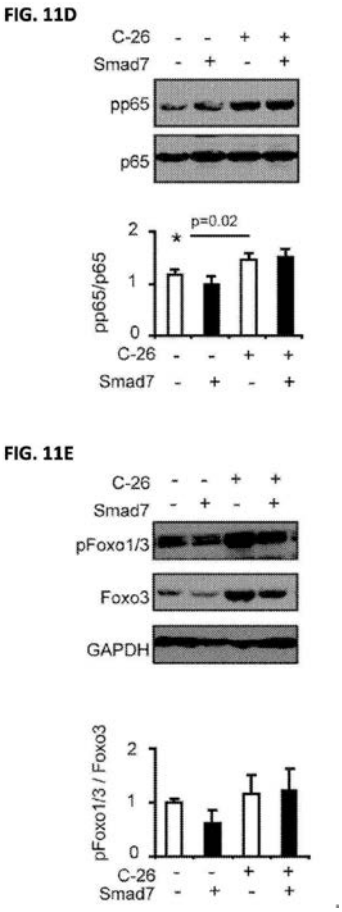
【図１０ＤＥＦ】



【図１１ＡＢＣ】

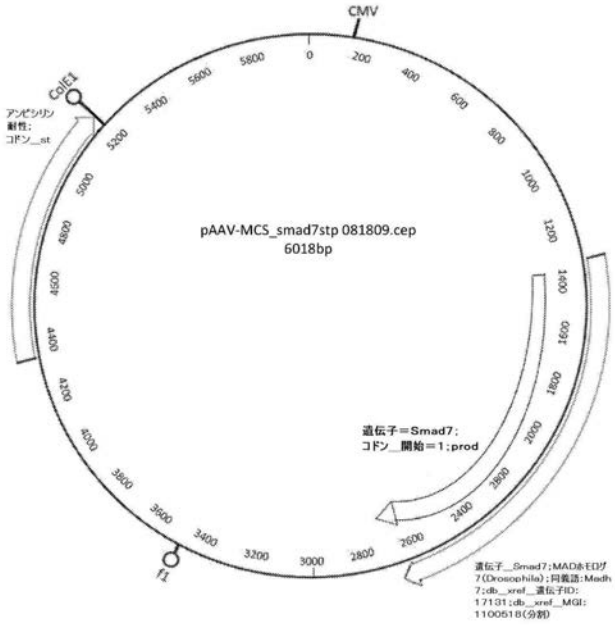


【図１１ＤＥ】



【図１２】

FIG. 12



制限部位

PstI (6)	SspI (1083)	AccI (1989)	XmaI (2700)	BglII (2757)	SspI (3934)
PvuII (11)	ClaI (1320)	PstI (2061)	SmaI (2702)	SspI (2893)	ApaLI (3956)
XmaI (40)	EcoRI (1326)	SacII (2090)	BamHI (2705)	SphI (3081)	SspI (4320)
SmaI (42)	PvuII (1713)	EcoRV (2247)	XbaI (2711)	NotI (3274)	ApaLI (4453)
XmaI (51)	SacII (1746)	PvuII (2316)	SalI (2717)	XmaI (3366)	DraI (4547)
SmaI (53)	PstI (1795)	PvuII (2358)	AccI (2718)	SmaI (3368)	FspI (4902)
NotI (143)	XmaI (1803)	ApaLI (2461)	PstI (2727)	XmaI (3377)	DraI (5239)
SacI (727)	ApaI (1804)	PstI (2525)	HindIII (2729)	SmaI (3379)	DraI (5258)
SacII (814)	SmaI (1805)	PvuII (2633)	XhoI (2737)	PvuII (3410)	ApaLI (5699)
SspI (1067)	SalI (1988)	EcoRI (2694)	XhoI (2751)	PstI (3419)	

【手続補正書】
【提出日】平成29年12月20日(2017.12.20)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2018519250000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/29018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 48/00; A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 15/00 (2016.01)
CPC - C12N 15/86; A61K 35/76; A61K 48/00; C07K 14/005
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 48/00; A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 15/00 (2016.01) - see keyword below
CPC - C12N 15/86; A61K 35/76; A61K 48/00; C07K 14/005; USPC - 424/93.2; 424/93.6; 514/44R; 435/320.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC(8) - A61K 48/00; A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 15/00 (2016.01) - see keyword below
CPC - C12N 15/86; A61K 35/76; A61K 48/00; C07K 14/005; USPC - 424/93.2; 424/93.6; 514/44R; 435/320.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); PatBase; Medline, Google: Smad7, muscle, Adeno-associated virus, recombinant, serotype, rAAV, AAV6, AAV8, AAV9, enhancing, increasing, muscle, cardiac, skeletal, strength, mass, volume, wasting, weakness, lose, cancer cachexia, construct, cassette, promotor, constitutive, tissue-specific, treat, therapy, nucleotide, DN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0267456 A1 (WANG et al.) 10 October 2013 (10.10.2013), para [0003], [0012], [0028], [0029], [0034], [0036], [0042], [0044], [0046], [0051], [0101], [0108], and [0139]	1-3, 5-6, 8-12
Y	US 2013/0136729 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 30 May 2013 (30.05.2013), Abstract, para [0004], [0007], [0009], [0010], [0019], [0026], [0027], [0048], [0232], and [0284]	1-3, 5-6, 8-12
Y	US 2014/0128349 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK et al.) 08 May 2014 (08.05.2014), Abstract, para [0002], [0009], [0010], [0054], [0055], and [0102]	8-12
A	KOLLIAS et al., Smad7 Promotes and Enhances Skeletal Muscle Differentiation. Mol Cell Biol. 2006, Vol. 26(16), p. 6248-60. Entire documentation, especially Abstract	1-3, 5-6, 8-12
A	ELKINA et al., The role of myostatin in muscle wasting: an overview. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2011, Vol. 2(3), p. 143-151. Entire documentation, especially Abstract; pg 146, col 1, middle para; and pg 148, Fig 2	1-3, 5-6, 8-12
A,P	DAVEY et al., Integrated expression analysis of muscle hypertrophy identifies Asb2 as a negative regulator of muscle mass. JCI Insight. 2016, Vol. 1(5). pii: e85477. PDF File: pg 1-24. Entire documentation, especially Abstract	1-3, 5-6, 8-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 June 2016	01 SEP 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/29018

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 13-19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-12, directed to a composition comprising a Smad7 gene or cDNA in a recombinant adenoassisted virus (rAAV) construct, wherein the rAAV construct provides expression of the Smad7 gene or cDNA in muscle cells; and a method of use. The Smad7 gene or cDNA will be searched to the extent that the Smad7 gene or cDNA encompasses wherein the Smad7 gene or cDNA is of human, mouse, equine, bovine, ovine, canine, or porcine origin (each of which is read as a non-mutant Smad7 gene or cDNA); and the tissue-specific modulator (promoter, enhancer, or silencer) will be searched to the extent that the tissue-specific modulator encompasses wherein the rAAV construct comprises a tissue-specific promoter or enhancer that directs expression of the Smad7 gene or cDNA in muscle cell. It is believed that claims 1-3, 5-6, 8-12/(1-3, 5-6) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass wherein the Smad7 gene or cDNA is of human, mouse, equine, bovine, ovine, canine, or porcine origin (each of which is read as a non-mutant Smad7 gene or cDNA), and wherein the rAAV construct comprises a tissue-specific promoter or enhancer that directs expression of the Smad7 gene or cDNA in muscle cell.**See Extra Sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
claims 1-3, 5-6, 8-12/(1-3, 5-6), limited to the Smad7 gene or cDNA is of human, etc. origin (non-mutant Smad7 gene), and the rAAV construct comprises a tissue-specific promoter or enhancer

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/29018

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of Groups I+) Additional Smad7 gene or cDNA or/and tissue-specific modulator will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected Smad7 gene or cDNA or/and tissue-specific modulator. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be wherein the Smad7 gene or cDNA expressed is a constitutively active mutant, and wherein the rAAV construct comprises a tissue-specific silencer that limits expression of the Smad7 gene or cDNA to muscle cells or to heart cells [claims (1-2), 4, (6), 7; 8-12/(1-2, 4, 6)].

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Feature
Among Groups I+, a non-mutant Smad7 gene or cDNA (is of human, mouse, equine, bovine, ovine, canine, or porcine origin) is structurally different from a constitutively active mutant of Smad7; and a tissue-specific promoter or enhancer is structurally and functionally different from a tissue-specific silencer.

Common Technical Features
The inventions of Groups I+ share the technical feature of a composition comprising a Smad7 gene or cDNA in a recombinant adenoassisted virus (rAAV) construct, wherein the rAAV construct provides expression of the Smad7 gene or cDNA in muscle cells (claim 1).

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being obvious over US 2013/0267456 A1 to WANG et al. (hereafter 'Wang'), in view of US 2013/0136729 A1 to University of Virginia Patent Foundation (hereafter 'U_VA_Patent_ Foundation') as follows:
Wang discloses a composition comprising a Smad7 gene or cDNA in a recombinant adeno assisted virus (rAAV) construct (para [0012] - 'a Smad7 agent composition ... agent may be a Smad7 expression vector... a viral ...expression vector'; para [0042] - 'expression vectors are employed to express the Smad7 polypeptide product ... used in gene therapy'; para [0051] - 'a vector, such as an expression construct, to produce a nucleic acid sequence or its cognate polypeptide'; para [0036] - 'Nucleic acids according to the present invention may represent an entire Smad7 gene... nucleic acid would comprise complementary DNA (cDNA)'; para [0046] - 'capacity of certain viral vectors to efficiently infect or enter cells... use as vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. ... adeno-associated virus vectors'; para [0044] - 'construct a vector through standard recombinant techniques'). Wang further discloses wherein the composition can be administered o a subject for treating tissue damage in vivo (Abstract - 'treatment ... tissue damage conditions. ... the use of Smad7 compositions delivered ...systemically'; para [0101] - 'contact a target cell, organ or subject with a Smad7 ... expression construct'; para [0046] - 'capacity of certain viral vectors to efficiently infect or enter cells... for use as vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. ... adeno-associated virus vectors'), and further wherein Smad7 enhances muscle differentiation (para [0029] - 'Smad7 also enhances muscle differentiation').
Wang does not specifically teach wherein the rAAV construct provides expression of the Smad7 gene or cDNA in muscle cells. U_VA_Patent_ Foundation discloses a method of using a recombinant AAV construct for specifically targeting and expressing a gene of interest in muscle cells (para [0026] - 'a recombinant AAV vector ... targeting muscle preferentially over other tissues'; para [0232] - 'recombinant adeno-associated viral (AAV) vector comprising a regulatory element active in muscle cells... constructed to comprise a new regulatory element to drive expression or tissue-specific expression in muscle of a gene of choice or interest'; para [0004] - 'serotypes AAV6, AAV8, and AAV9 transduce cardiomyocytes preferentially following systemic administration').
It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time the invention was made to combine the teachings of Wang and U_VA_Patent_ Foundation, to obtain a composition comprising a Smad7 gene or cDNA in a recombinant adeno assisted virus (rAAV) construct, as taught by Wang, and further wherein the rAAV construct provides expression of the Smad7 gene or cDNA in muscle cells, based on the combination of U_VA_Patent_ Foundation and Wang, in order to use the rAAV preferentially expressing in muscle cells available in the art for producing the construct composition comprising a Smad7 gene or cDNA for facilitating enhancing muscle cell differentiation in vivo with an expected success and without undue experimentation.

Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4. Claims 13-19 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

Note:

I) Claim 9 is objected to as containing a typo "subejct". The word "subejct" is interpreted to read as "subject".

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 13/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ 11/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ 31/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ 31/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18	
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ 3/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/04	
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
Ａ６１Ｋ 35/76	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｎ 5/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(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
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 ロジャース, ビュエル ダンテズ
アメリカ合衆国 ワシントン ９９１６５－１２２７, プルマン, ウィルソン ロード １００
(72)発明者 グレゴレビック, ポール
オーストラリア国 ３００４ ヴィクトリア, メルボルン, コマーシャル ロード ７５, ベイカー アイディーアイ ハート アンド ダイアベーツ インスティテュート ホールディングス リミテッド

Ｆターム(参考) 4B065 AA91Y AA93X AB01 AC14 BA02 BC11 BD14 BD18 CA44
4C084 AA13 MA16 MA17 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA13 ZA021 ZA022 ZA361 ZA362 ZA591 ZA592 ZA701 ZA702 ZA811 ZA812 ZA941 ZA942 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZC411 ZC412 ZC521 ZC522 ZC551 ZC552
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA16 MA17 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA13 ZA02 ZA36 ZA59 ZA70 ZA81 ZA94 ZB09 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC41 ZC52 ZC55