

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号  
特開2023-59858  
(P2023-59858A)

(43)公開日 令和5年4月27日(2023.4.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード ( 参考 )	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 C 0 8 7
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
審査請求		未請求	請求項の数	65	O L
		外国語出願		( 全57頁 )	最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-165300(P2022-165300)	(71)出願人	515289842
(22)出願日	令和4年10月14日(2022.10.14)		リサーチ インスティテュート アット
(31)優先権主張番号	63/256,368		ネーションワイド チルドレンズ ホスピ
(32)優先日	令和3年10月15日(2021.10.15)		タル
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		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】 自己相補的アデノ随伴ウイルスベクター及び筋ジストロフィーの治療におけるその使用

(57)【要約】 ( 修正有 )

【課題】 - サルコグリカンを発現する A A V ベクターのような治療ベクター、並びに筋ジストロフィーに罹患している対象における線維症を軽減し、予防するためにこれらのベクターを使用する方法を提供する。

【解決手段】 特定のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) であって、前記ポリヌクレオチド配列が、 i ) 目的の遺伝子を各々コードする 2 つの相補的ヌクレオチド配列であって、前記目的の遺伝子をコードする前記 2 つの相補的ヌクレオチド配列が、 5 ' I T R 配列に隣接する、 2 つの相補的ヌクレオチド配列と、 i i ) 2 つの相補的ポリアデニル化配列と、を含み、前記ポリヌクレオチド配列が、 2 つの 3 ' I T R 配列によって隣接され、前記 2 つの 3 ' I T R 配列が、相補的である、組換え A A V を提供する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 90 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド配列。

**【請求項 2】**

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド配列。

**【請求項 3】**

ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) であって、前記ポリヌクレオチド配列が、i) 目的の遺伝子を各々コードする 2 つの相補的ヌクレオチド配列であって、前記目的の遺伝子をコードする前記 2 つの相補的ヌクレオチド配列が、5' I T R 配列に隣接する、2 つの相補的ヌクレオチド配列と、i i) 2 つの相補的ポリアデニル化配列と、を含み、

前記ポリヌクレオチド配列が、2 つの 3' I T R 配列によって隣接され、前記 2 つの 3' I T R 配列が、相補的である、組換え A A V 。

**【請求項 4】**

前記目的の遺伝子が、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、又はヒト A N O 5 . カルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子を含む、請求項 3 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 5】**

ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) であって、前記ポリヌクレオチド配列が、i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を各々コードする、2 つの相補的ヌクレオチド配列と、i i) 2 つの相補的ポリアデニル化配列と、を含む、組換え A A V 。

**【請求項 6】**

前記 2 つの相補的ヌクレオチド配列の各々が、筋特異的制御要素に作動可能に連結され、前記 2 つの筋特異的制御要素が、互いに相補的である、請求項 3 ~ 5 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 7】**

前記筋特異的制御要素が、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ ( M C K )、短縮 M C K ( t M C K )、ミオシン重鎖 ( M H C )、M H C K 7、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格速筋トロポニン C 遺伝子要素、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子要素、遅筋トロポニン i 遺伝子要素、低酸素誘発性核因子結合要素、ステロイド誘発性要素、又はグルココルチコイド応答要素 ( g r e ) である、請求項 6 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 8】**

前記筋特異的制御要素が、短縮 M C K ( t M C K ) である、請求項 7 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 9】**

前記筋特異的制御要素が、M H C K 7 である、請求項 7 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 10】**

2 つの相補的キメライントロンを更に含む、請求項 3 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換え A A V 。

**【請求項 11】**

3 つの逆方向末端反復 ( I T R ) を更に含み、1 つの I T R が、前記 2 つの相補的な筋特異的制御要素によって隣接される、請求項 3 ~ 10 のいずれか一項に記載の組換え A A V 。

**【請求項 12】**

配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 3 ~ 11 のいずれか一項に記載の組換え A A V 。

10

20

30

40

50

**【請求項 13】**

前記ベクターが、血清型 AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、又は AAVrh.74 である、請求項 3～12 のいずれか一項に記載の組換え AAV。

**【請求項 14】**

請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV を含む、組成物。

**【請求項 15】**

治療を必要とする対象において筋ジストロフィーを治療する方法であって、前記対象に、請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は請求項 14 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

10

**【請求項 16】**

筋ジストロフィーに罹患している対象において筋力及び / 又は筋量を増加させる方法であって、前記対象に、請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は請求項 14 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

**【請求項 17】**

筋ジストロフィーに罹患している対象において線維症を軽減させる方法であって、前記対象に、請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は請求項 14 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

**【請求項 18】**

筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させる方法であって、前記対象に、請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は請求項 14 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

20

**【請求項 19】**

対象において - サルコグリカン異常症を治療する方法であって、前記対象に、請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は請求項 14 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

**【請求項 20】**

対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は CK レベルを減少させる方法であって、前記対象に、請求項 3～13 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は請求項 14 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

30

**【請求項 21】**

前記ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数が、前記 rAAV 投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数が、前記 rAAV の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、前記ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項 20 に記載の方法。

40

**【請求項 23】**

前記対象が、肢帯筋ジストロフィーに罹患している、請求項 15～22 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記組換え AAV 又は前記組成物が、筋肉内注射又は静脈内注射によって投与される、請求項 15～23 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記組換え AAV 又は前記組成物が、全身投与される、請求項 15～23 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 26】**

50

前記組換え A A V 又は前記組成物が、注射、注入、又は移植によって非経口投与される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、請求項 15 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、請求項 15 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記組換え A A V が、全身投与される、請求項 27 又は 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記組換え A A V が、静脈内投与される、請求項 27 又は 28 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 3 ~ 13 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 14 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 32】

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において筋力及び / 又は筋量を増加させるための、請求項 3 ~ 13 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 14 に記載の組成物を含む、組成物。

20

【請求項 33】

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において線維症を軽減させるための、請求項 3 ~ 13 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 14 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 34】

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において収縮誘発性損傷を軽減させるための、請求項 3 ~ 13 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 14 に記載の組成物を含む、組成物。

30

【請求項 35】

治療を必要とする哺乳動物対象において - サルコグリカン異常症を治療するための、請求項 3 ~ 13 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 14 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 36】

対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は C K レベルを減少させるための、請求項 3 ~ 13 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 14 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 37】

前記ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウェスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項 36 に記載の組成物。

40

【請求項 38】

ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、前記ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 39】

50

前記対象が、肢帯筋ジストロフィーに罹患している、請求項 3 2 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

筋肉内注射又は静脈内注射のために製剤化される、請求項 3 2 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

全身投与のために製剤化される、請求項 3 2 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記全身投与が、注射、注入、又は移植による非経口投与である、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量である、請求項 3 2 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、請求項 3 2 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記組成物が、全身投与のために製剤化される、請求項 4 3 又は 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記組成物が、静脈内投与のために製剤化される、請求項 4 3 又は 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

筋ジストロフィーを治療するための薬剤の調製のための、請求項 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 1 4 に記載の組成物の、使用。

【請求項 4 8】

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において筋力及び / 又は筋量を増加させるための薬剤の調製のための、請求項 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター又は請求項 1 4 に記載の組成物の、使用。

【請求項 4 9】

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において線維症を軽減させるための薬剤の調製のための、請求項 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター又は請求項 1 4 に記載の組成物の、使用。

【請求項 5 0】

筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させるための薬剤の調製のための、請求項 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター又は請求項 1 4 に記載の組成物の、使用。

【請求項 5 1】

治療を必要とする哺乳動物対象において - サルコグリカン異常症を治療するための薬剤の調製のための、請求項 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 1 4 に記載の組成物の、使用。

【請求項 5 2】

対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は C K レベルを減少させるための薬剤の調製のための、請求項 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は請求項 1 4 に記載の組成物の、使用。

【請求項 5 3】

前記ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の

10

20

30

40

50

数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項 5 2 に記載の使用。

【請求項 5 4】

ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、前記ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項 5 2 に記載の使用。

【請求項 5 5】

前記対象が、肢帯筋ジストロフィーに罹患している、請求項 4 7 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の使用。 10

【請求項 5 6】

前記薬剤が、筋肉内注射又は静脈内注射のために製剤化される、請求項 4 7 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 7】

前記薬剤が、全身投与のために製剤化される、請求項 4 7 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5 8】

前記全身投与が、注射、注入、又は移植による非経口投与である、請求項 5 7 に記載の使用。 20

【請求項 5 9】

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量である、請求項 4 7 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6 0】

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、請求項 4 7 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の使用。 30

【請求項 6 1】

前記組換え A A V が、全身投与のために製剤化される、請求項 5 9 又は 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記組換え A A V が、静脈内投与のために製剤化される、請求項 5 9 又は 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) ベクターであって、前記ポリヌクレオチド配列が、5' から 3' 方向に、

- ( 1 ) ポリアデニル化配列の相補的配列と、
- ( 2 ) 目的の遺伝子の相補的配列と、
- ( 3 ) イントロンの相補的配列と、
- ( 4 ) プロモーターの相補的配列と、
- ( 5 ) 5' I T R 配列と、
- ( 6 ) 前記プロモーターと、
- ( 7 ) 前記イントロンと、
- ( 8 ) 前記目的の遺伝子と、
- ( 9 ) 前記ポリアデニル化配列と、を含み、

前記ポリヌクレオチド配列が、2つの 3' I T R 配列によって隣接され、前記 2 つの 3' I T R 配列が、互いに相補的である、組換え A A V ベクター。 40 50

## 【請求項 6 4】

前記目的の遺伝子が、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、及びヒト A N O 5 . カルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子を含む、請求項 6 3 に記載の r A A V ベクター。

## 【請求項 6 5】

前記プロモーターが、筋特異的制御要素であり、前記筋特異的制御要素が、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ ( M C K )、短縮 M C K ( t M C K )、ミオシン重鎖 ( M H C )、M H C K 7、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格速筋トロポニン C 遺伝子要素、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子要素、遅筋トロポニン i 遺伝子要素、低酸素誘発性核因子結合要素、又はステロイド誘発性要素、又はグルココルチコイド応答要素 ( g r e ) を含む、請求項 6 3 に記載の r A A V ベクター。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2021年10月15日に提出された、米国仮出願第 63 / 256368 号の優先権の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

電子的に提出された資料の参照による組込み

本出願は、本開示の別個の部分として、以下のように識別されるコンピューター可読形式の配列表を含み、その全体が参照により組み込まれる：ファイル名：56758 \_ S e q l i s t i n g . t x t、サイズ：28,732 バイト、作成：2022年9月28日。

20

## 【0003】

- サルコグリカンを発現する A A V ベクターのような治療ベクター、並びに筋ジストロフィーに罹患している対象における線維症を軽減し、予防するためにこれらのベクターを使用する方法が本明細書に記載される。

## 【背景技術】

## 【0004】

L G M D は、まれな状態であり、発症年齢、筋力低下の領域、心臓及び呼吸器の関与、進行速度、並びに重症度に関して、人によって症状が異なる。L G M D は、小児期、青年期、若年成人期、又はそれ以降に始まる可能性がある。両方の性別が等しく影響を受ける。L G M D は、肩及び骨盤帯に衰弱を引き起こし、上肢及び腕の近くの筋肉も時間とともに衰弱することがある。脚の脱力感、腕の脱力感よりも前に現れることがよくある。顔の筋肉は、通常影響を受けない。状態が進行するにつれて、人々は、歩行に問題を抱えることがあり、時間の経過とともに車椅子を使用する必要があるかもしれない。肩及び腕の筋肉が関与すると、腕を頭上に上げたり、物を持ち上げたりするのが困難になることがある。L G M D のタイプによっては、心臓及び呼吸筋が関与し得る。

30

## 【0005】

L G M D には少なくとも 19 の形態があり、その形態は関連する遺伝的欠陥によって分類される。

40

【表 1】

タイプ	遺伝形式	遺伝子又は染色体	
LGMD1A	常染色体優性	ミオチリン遺伝子	
LGMD1B	常染色体優性	ラミン A/C 遺伝子	
LGMD1C	常染色体優性	カベオリン遺伝子	
LGMD1D	常染色体優性	7 番染色体	
LGMD1E	常染色体優性	デスミン遺伝子	
LGMD1F	常染色体優性	7 番染色体	
LGMD1G	常染色体優性	4 番染色体	
LGMD2A	常染色体劣性	カルパイン-3 遺伝子	10
LGMD2B	常染色体劣性	ジスフェリン遺伝子	
LGMD2C	常染色体劣性	ガンマサルコグリカン遺伝子	
LGMD2D	常染色体劣性	アルファ-サルコグリカン遺伝子	
LGMD2E	常染色体劣性	ベータ-サルコグリカン遺伝子	
LGMD2F	常染色体劣性	デルタ-サルコグリカン遺伝子	
LGMD2G	常染色体劣性	テレットニン遺伝子	
LGMD2H	常染色体劣性	TRIM32	
LGMD2I	常染色体劣性	FKRP 遺伝子	
LGMD2J	常染色体劣性	タイチン遺伝子	
LGMD2K	常染色体劣性	POMT1 遺伝子	
LGMD2L	常染色体劣性	フクチン遺伝子	20

## 【0006】

肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）2E 型（LGMD2E）は、 $\beta$ -サルコグリカン（SGCB）をコードする遺伝子中の変異から生じる常染色体劣性障害であり、機能性タンパク質の喪失を引き起こす。LGMD2E は、米国における LGMD の比較的一般的かつ重篤な形態を表し、全世界で  $1/20$  万～ $1/35$  万の発生率が報告されている（Moore et al., J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65:995-1003）。 $\beta$ -サルコグリカンが存在しないと、慢性的な筋線維の喪失、炎症、脂肪置換及び線維症（これらは全て筋肉の強度及び機能の悪化を引き起こす）を伴う進行性ジストロフィーを引き起こす。（Araishi et al., Hum Mol Genet 1999; 8:1589-1598、Durbee et al., Mol Cell 2000; 5:141-151）複合体として、 $35 \sim 50$  kD のサイズの範囲である、サルコグリカン（ $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -）は、全て筋活動中の機械的応力からの保護を提供する筋鞘に安定性をもたらす膜貫通タンパク質である。（Araishi et al., Hum Mol Genet 1999; 8:1589-1598）LGMD2E における  $\beta$ -サルコグリカンの喪失は、通常、筋線維の喪失に至る筋膜の脆性に寄与する様々な程度の他のサルコグリカンタンパク質の付随する喪失を引き起こす。1 LGMD2E の臨床的表現型の範囲は様々であるが、診断は典型的には 10 歳までに行われ、10 代半ばから後半までに歩行の喪失が起こる。患者は、血清クレアチンキナーゼ（CK）の上昇、近位筋力低下、床から生じる困難さ、及び進行性の歩行喪失を示す。症例の 50% において心臓障害が発生する。

## 【0007】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖 DNA ゲノムは、2 つの 145 ヌクレオチド逆位末端反復（ITR）を含む約 4.7 kb 長である。AAV の複数の血清型が存在する。AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、既知である。例えば、AAV-1 の完全なゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_002077 に提供されており、AAV-2 の完全なゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_001401 及び Srivastava et al., 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 受入番号 NC\_1829 に提供されており、AAV-4 の完全なゲノムは、GenBa



nk 受入番号 NC\_\_001829 に提供されており、AAV-5 ゲノムは、GenBank 受入番号 AF085716 に提供されており、AAV-6 の完全なゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_\_001862 に提供されており、AAV-7 及び AAV-8 ゲノムの少なくとも一部は、それぞれ、GenBank 受入番号 AX753246 及び AX753249 に提供されており、AAV-9 ゲノムは、Gao et al., 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) に提供されており、AAV-11 ゲノムは、Virology, 330(2): 375-383 (2004) に提供されている。AAV rh.74 ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 9,434,928 号に提供されている。ウイルス DNA 複製 (rep)、カ  
 プシド形成/パッケージング、及び宿主細胞染色体組込みを指示する Cis 作用配列は、  
 AAV ITR 内に含有される。3つの AAV プロモーター (それらの相対マップ位置に  
 対して p5、p19、及び p40 と名付けられる) は、rep 及び cap 遺伝子をコード  
 する 2つの AAV 内部オープンリーディングフレームの発現を推進する。単一の AAV イ  
 ントロンの差別的スプライシング (ヌクレオチド 2107 及び 2227 における) と結合  
 した、2つの rep プロモーター (p5 及び p19) は、rep 遺伝子から 4つの rep  
 タンパク質 (rep78、rep68、rep52、及び rep40) を産生する。Re  
 p タンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を有する。c  
 ap 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、V  
 P2、及び VP3 をコードする。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位  
 は、3つの関連カプシドタンパク質の産生に関与する。単一コンセンサスポリアデニル化  
 部位は、AAV ゲノムのマップ位置 95 に位置する。AAV のライフサイクル及び遺伝学  
 は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992) において概説  
 されている。

#### 【0008】

AAV は、例えば、遺伝子療法において、外来 DNA を細胞に送達するためのベクター  
 として魅力的にする固有の特徴を有する。培養中の細胞の AAV 感染は、非細胞変性であ  
 り、ヒト及び他の動物の自然感染は、サイレント及び無症候性である。更に、AAV は、  
 多くの哺乳動物細胞を感染させ、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を許容  
 する。更に、AAV は、緩徐に分裂する細胞及び非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性  
 な核エピソーム (染色体外要素) として本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続し得  
 る。AAV プロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド内の  
 クローニングされた DNA として挿入される。更に、AAV 複製及びゲノムカプシド形成  
 を指示するシグナルが、AAV ゲノムの ITR 内に含有されるため、内部約 4.3 kb の  
 ゲノム (複製及び構造カプシドタンパク質をコードする、rep-cap) の一部又は全  
 てが、外来 DNA で置換されてもよい。AAV ベクターを生成するために、rep 及び c  
 ap タンパク質は、トランスで提供され得る。AAV の別の重要な特徴は、それが極めて  
 安定した頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するた  
 めに使用される条件 (56 ~ 65 で数時間) に容易に耐え、AAV の低温保存の重要性  
 を低くする。AAV は、凍結乾燥され得る。最後に、AAV 感染細胞は、重複感染に耐性  
 を示さない。

#### 【0009】

複数の研究により、筋肉における長期 (1.5 年を超える) の組換え AAV 媒介タン  
 パク質発現が実証されている。Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659-669 (1997)、Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 14082-14087 (1996)、及び Xiao et al., J Virol, 70: 8098-8108 (1996) を参照されたい。  
 また、Chao et al., Mol Ther, 2: 619-623 (2000)、及び Chao et al., Mol Ther, 4: 217-222 (2001) も

参照されたい。更に、筋肉は高度に血管新生化されているため、Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:5804-5809 (1997)、及びMurphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:13921-13926 (1997)に記載されているように、組換えAAV形質導入により、筋肉内注射後の体循環において導入遺伝子産物の出現がもたらされる。更に、Lewis et al., J Virol, 76:8769-8775 (2002)は、骨格筋線維が抗体の正しいグリコシル化、フォールディング、及び分泌に必要な細胞因子を持っていることを実証し、筋肉が分泌タンパク質治療薬を安定して発現できることを示している。

#### 【0010】

LGM2Eのための療法の新たに出現した形態は、罹患した筋肉への野生型タンパク質を回復するためのウイルス媒介遺伝子送達であり、筋機能の回復をもたらす。患者のサブセットが心筋症を発症する可能性があることを考慮すると(Fannin et al., Neuromusc Disord 2003; 13:303-309、Sveen et al., Arch Neurol 2008; 65:1196-1201、Melacini et al., Muscle Nerve 1999; 22:473-479、Barresi et al., J Med Genet 2000; 37:102-107)、これらの患者の長期ケアにおいて考慮する必要がある。以前の報告では、Sgcbヌルマウスは十分に特徴付けられていた。Araishi et al.は、サルコパンだけでなくサルコグリカン全ての喪失を伴い、メロシン、ジストログリカン、及びジストロフィンを少なくともわずかに保存し、LGM2Eにおいて見られる臨床像を再現する、  
-サルコグリカン欠損マウスを開発した。この動物モデルにおける組織学的変化は、顕性の骨格筋線維症を含む、臨床的対応のプロトタイプでもあった。(Gibertini et al., Cell Tissue Res 2014; 356:427-443) Dressman et al. (Dressman et al., Hum Gene Ther 2002; 13:1631-1646)は、rAAV2.CMV.SGCBを使用して腹横筋に注射した。発現は21ヶ月間持続し、筋線維は再発性壊死から保護された。導入遺伝子発現を増強するための自己相補的AAVの使用(McCarthy et al., Gene Ther 2001; 8:1248-1254)、骨格筋をより良好に標的化する筋特異的プロモーター(Wang et al., Gene Ther 2008; 15:1489-1499、Rodino-Klapac et al., Neurology 2008; 71:240-247)、及びヒト  
-サルコグリカン遺伝子(hSGCB)の最適化も記載されている。

LGM及び他の筋ジストロフィーに罹患している患者における機能改善には、遺伝子回復及び線維症の軽減の両方が必要である。LGM及び他の筋ジストロフィーのより効果的な治療のための遺伝子回復法で修復され得る線維症を軽減させる方法が必要とされている。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0011】

【非特許文献1】Moore et al., J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65:995-1003

【非特許文献2】Araishi et al., Hum Mol Genet 1999; 8:1589-1598

【非特許文献3】Durbee et al., Mol Cell 2000; 5:141-151

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

-サルコグリカン遺伝子を発現する遺伝子用治療ベクター(例えば、AAV)、並び

に - サルコグリカンを筋肉に送達し、線維症を軽減及び／若しくは予防する方法、及び／又は筋力を増加させる方法、及び／又は筋ジストロフィーを罹患している哺乳動物対象を治療する方法が本明細書に記載される。

自己相補的組換え A A V ( r A A V ) s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C B ベクターを投与することを含む筋ジストロフィーを治療する方法、患者においてベータ - サルコグリカン遺伝子を発現する方法、r A A V を含む薬学的組成物、及び r A A V を生成する方法が、本明細書に記載される。

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 )

配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 9 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド配列。 10

( 項目 2 )

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 に記載のポリヌクレオチド配列。

( 項目 3 )

ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) であって、前記ポリヌクレオチド配列が、i ) 目的の遺伝子を各々コードする 2 つの相補的ヌクレオチド配列であって、前記目的の遺伝子をコードする前記 2 つの相補的ヌクレオチド配列が、5 ' I T R 配列に隣接する、2 つの相補的ヌクレオチド配列と、i i ) 2 つの相補的ポリアデニル化配列と、を含む、 20

前記ポリヌクレオチド配列が、2 つの 3 ' I T R 配列によって隣接され、前記 2 つの 3 ' I T R 配列が、相補的である、組換え A A V 。

( 項目 4 )

前記目的の遺伝子が、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、又はヒト A N O 5 . カルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子を含む、項目 3 に記載の組換え A A V 。

( 項目 5 )

ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) であって、前記ポリヌクレオチド配列が、i ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を各々コードする、2 つの相補的ヌクレオチド配列と、i i ) 2 つの相補的ポリアデニル化配列と、を含む、組換え A A V 。 30

( 項目 6 )

前記 2 つの相補的ヌクレオチド配列の各々が、筋特異的制御要素に作動可能に連結され、前記 2 つの筋特異的制御要素が、互いに相補的である、項目 3 ~ 5 に記載の組換え A A V 。

( 項目 7 )

前記筋特異的制御要素が、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ ( M C K )、短縮 M C K ( t M C K )、ミオシン重鎖 ( M H C )、M H C K 7、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格速筋トロポニン C 遺伝子要素、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子要素、遅筋トロポニン i 遺伝子要素、低酸素誘発性核因子結合要素、ステロイド誘発性要素、又はグルココルチコイド応答要素 ( g r e ) である、項目 6 に記載の組換え A A V 。 40

( 項目 8 )

前記筋特異的制御要素が、短縮 M C K ( t M C K ) である、項目 7 に記載の組換え A A V 。

( 項目 9 )

前記筋特異的制御要素が、M H C K 7 である、項目 7 に記載の組換え A A V 。

( 項目 1 0 )

2 つの相補的キメライントロンを更に含む、項目 3 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換え A A V 。

## (項目 1 1)

3つの逆方向末端反復 (ITR) を更に含み、1つの ITR が、前記 2つの相補的な筋特異的制御要素によって隣接される、項目 3 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組換え AAV。

## (項目 1 2)

配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、項目 3 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え AAV。

## (項目 1 3)

前記ベクターが、血清型 AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、又は AAVrh.74 である、項目 3 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組換え AAV。 10

## (項目 1 4)

項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV を含む、組成物。

## (項目 1 5)

治療を必要とする対象において筋ジストロフィーを治療する方法であって、前記対象に、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は項目 1 4 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

## (項目 1 6)

筋ジストロフィーに罹患している対象において筋力及び / 又は筋量を増加させる方法であって、前記対象に、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は項目 1 4 に記載の組成物を投与することを含む、方法。 20

## (項目 1 7)

筋ジストロフィーに罹患している対象において線維症を軽減させる方法であって、前記対象に、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は項目 1 4 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

## (項目 1 8)

筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させる方法であって、前記対象に、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は項目 1 4 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

## (項目 1 9)

対象において - サルコグリカン異常症を治療する方法であって、前記対象に、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は項目 1 4 に記載の組成物を投与することを含む、方法。 30

## (項目 2 0)

対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は CK レベルを減少させる方法であって、前記対象に、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え AAV 又は項目 1 4 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

## (項目 2 1)

前記ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数が、前記 rAAV 投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、項目 2 0 に記載の方法。 40

## (項目 2 2)

ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数が、前記 rAAV の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、前記ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、項目 2 0 に記載の方法。

## (項目 2 3)

前記対象が、肢帯筋ジストロフィーに罹患している、項目 1 5 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。 50

## (項目 2 4)

前記組換え A A V 又は前記組成物が、筋肉内注射又は静脈内注射によって投与される、項目 1 5 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

## (項目 2 5)

前記組換え A A V 又は前記組成物が、全身投与される、項目 1 5 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

## (項目 2 6)

前記組換え A A V 又は前記組成物が、注射、注入、又は移植によって非経口投与される、項目 2 5 に記載の方法。

## (項目 2 7)

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、項目 1 5 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

## (項目 2 8)

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、項目 1 5 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

## (項目 2 9)

前記組換え A A V が、全身投与される、項目 2 7 又は 2 8 に記載の方法。

## (項目 3 0)

前記組換え A A V が、静脈内投与される、項目 2 7 又は 2 8 に記載の方法。

## (項目 3 1)

項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物を含む、組成物。

## (項目 3 2)

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において筋力及び / 又は筋量を増加させるための、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物を含む、組成物。

## (項目 3 3)

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において線維症を軽減させるための、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物を含む、組成物。

## (項目 3 4)

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において収縮誘発性損傷を軽減させるための、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物を含む、組成物。

## (項目 3 5)

治療を必要とする哺乳動物対象において - サルコグリカン異常症を治療するための、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物を含む、組成物。

## (項目 3 6)

対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は C K レベルを減少させるための、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物を含む、組成物。

## (項目 3 7)

前記ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される、項目 3 6 に記載

10

20

30

40

50

の組成物。

(項目38)

ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、前記ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、項目36に記載の組成物。

(項目39)

前記対象が、肢帯筋ジストロフィーに罹患している、項目32～38のいずれか一項に記載の組成物。

(項目40)

筋肉内注射又は静脈内注射のために製剤化される、項目32～39のいずれか一項に記載の組成物。

(項目41)

全身投与のために製剤化される、項目32～39のいずれか一項に記載の組成物。

(項目42)

前記全身投与が、注射、注入、又は移植による非経口投与である、項目41に記載の組成物。

(項目43)

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量である、項目32～42のいずれか一項に記載の組成物。

(項目44)

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、項目32～42のいずれか一項に記載の組成物。

(項目45)

前記組成物が、全身投与のために製剤化される、項目43又は44に記載の組成物。

(項目46)

前記組成物が、静脈内投与のために製剤化される、項目43又は44に記載の組成物。

(項目47)

筋ジストロフィーを治療するための薬剤の調製のための、項目3～13のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目14に記載の組成物の、使用。

(項目48)

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において筋力及び/又は筋量を増加させるための薬剤の調製のための、項目3～13のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター又は項目14に記載の組成物の、使用。

(項目49)

筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において線維症を軽減させるための薬剤の調製のための、項目3～13のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター又は項目14に記載の組成物の、使用。

(項目50)

筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させるための薬剤の調製のための、項目3～13のいずれか一項に記載の組換え A A V ベクター又は項目14に記載の組成物の、使用。

(項目51)

治療を必要とする哺乳動物対象において - サルコグリカン異常症を治療するための薬剤の調製のための、項目3～13のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目14に記載の組成物の、使用。

10

20

30

40

50

## (項目 5 2)

対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は C K レベルを減少させるための薬剤の調製のための、項目 3 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 又は項目 1 4 に記載の組成物の、使用。

## (項目 5 3)

前記ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、項目 5 2 に記載の使用。

## (項目 5 4)

ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数が、前記 r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、前記ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される、項目 5 2 に記載の使用。

## (項目 5 5)

前記対象が、肢帯筋ジストロフィーに罹患している、項目 4 7 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の使用。

## (項目 5 6)

前記薬剤が、筋肉内注射又は静脈内注射のために製剤化される、項目 4 7 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の使用。

## (項目 5 7)

前記薬剤が、全身投与のために製剤化される、項目 4 7 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の使用。

## (項目 5 8)

前記全身投与が、注射、注入、又は移植による非経口投与である、項目 5 7 に記載の使用。

## (項目 5 9)

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量である、項目 4 7 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の使用。

## (項目 6 0)

前記組換え A A V が、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される、項目 4 7 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の使用。

## (項目 6 1)

前記組換え A A V が、全身投与のために製剤化される、項目 5 9 又は 6 0 に記載の方法。

## (項目 6 2)

前記組換え A A V が、静脈内投与のために製剤化される、項目 5 9 又は 6 0 に記載の方法。

## (項目 6 3)

ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) ベクターであって、前記ポリヌクレオチド配列が、5' から 3' 方向に、

- (1) ポリアデニル化配列の相補的配列と、
- (2) 目的の遺伝子の相補的配列と、
- (3) イントロンの相補的配列と、
- (4) プロモーターの相補的配列と、
- (5) 5' I T R 配列と、

10

20

30

40

50

- ( 6 ) 前記プロモーターと、
- ( 7 ) 前記イントロンと、
- ( 8 ) 前記目的の遺伝子と、
- ( 9 ) 前記ポリアデニル化配列と、を含み、

前記ポリヌクレオチド配列が、2つの3' I T R 配列によって隣接され、前記2つの3' I T R 配列が、互いに相補的である、組換え A A V ベクター。

( 項目 6 4 )

前記目的の遺伝子が、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、及びヒト A N O 5 . カルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子を含む、項目 6 3 に記載の r A A V ベクター。

10

( 項目 6 5 )

前記プロモーターが、筋特異的制御要素であり、前記筋特異的制御要素が、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ ( M C K )、短縮 M C K ( t M C K )、ミオシン重鎖 ( M H C )、M H C K 7、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格速筋トロポニン C 遺伝子要素、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子要素、遅筋トロポニン i 遺伝子要素、低酸素誘発性核因子結合要素、又はステロイド誘発性要素、又はグルココルチコイド応答要素 ( g r e ) を含む、項目 6 3 に記載の r A A V ベクター。

【 0 0 1 3 】

- サルコグリカン遺伝子を発現する自己相補的 A A V ( s c A A V ) が本明細書に提供される。例えば、提供される s c A A V は、i ) 自己相補的である - サルコグリカンタンパク質をコードする2つのヌクレオチド配列と、i i ) 自己相補的であり、A A V ゲノム配列 ( 発現カセット ) の中心に位置する変異逆方向末端反復 ( I T R ) を含む、2つのポリアデニル化配列と、を含む、ポリヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 1 4 】

また、ポリヌクレオチド配列を含む組換え A A V ( r A A V ) ベクターも提供され、ポリヌクレオチド配列は、5' から 3' 方向に、( 1 ) ポリアデニル化配列の相補的配列と、( 2 ) 目的の遺伝子の相補的配列と、( 3 ) イントロンの相補的配列と、( 4 ) プロモーターの相補的配列と、( 5 ) 5' I T R 配列と、( 6 ) プロモーターと、( 7 ) イントロンと、( 8 ) 目的の遺伝子と、( 9 ) ポリアデニル化配列と、を含み、ポリヌクレオチド配列は、2つの3' I T R 配列によって隣接され、2つの3' I T R 配列は、相補的である。一実施形態では、目的の遺伝子は、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、ヒト A N O 5、又はカルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子を含む。別の実施形態では、プロモーターは、筋特異的制御要素である。筋特異的制御要素の例は、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 M E F、筋クレアチンキナーゼ ( M C K ) プロモーター、M C K エンハンサー、短縮 M C K ( t M C K ) プロモーター、t M C K エンハンサー、ミオシン重鎖 ( M H C ) プロモーター、M H C K 7 プロモーター、C 5 - 1 2 プロモーター、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格速筋トロポニン C 遺伝子要素、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子要素、遅筋トロポニン i 遺伝子要素、低酸素誘発性核因子結合要素、又はステロイド誘発性要素、又はグルココルチコイド応答要素 ( G R E ) を含む。

30

40

【 0 0 1 5 】

一本鎖 A A V ベクター ( s s A A V ) は、核に入ると、複製及び転写の準備が整う前に、第2の鎖の細胞媒介性合成を必要とする。しかしながら、s c A A V が s s A A V において必要とされる第2鎖の細胞合成の律速段階を迂回するので、本明細書において提供される s c A A V は、遺伝子療法において s s A A V よりも優れている。

【 0 0 1 6 】

本明細書では、2つの自己相補的ヌクレオチド配列 ( 発現カセットとも称される ) を含むポリヌクレオチドが提供され、各ヌクレオチド配列は、M H C K 7 プロモーター、キメ

50



ライントロン、h S G C B c D N A 配列、及びポリアデニル化配列、並びに 2 つのヌクレオチド配列の間に位置する単一の 5' I T R を含む。5' I T R は、ヌクレオチド配列がハイブリダイズするときにヘアピンを形成する。

#### 【 0 0 1 7 】

例えば、本開示は、配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を提供し、これはまた図 1 に概略図として示される。配列番号 1 のポリヌクレオチド配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列をコードし、互いにハイブリダイズする 2 つの h S G C B c D N A 配列（配列番号 2 及び / 又は配列番号 1 1）、互いにハイブリダイズする 2 つのキメライントロン配列（配列番号 4 及び / 又は配列番号 1 1）、並びに互いにハイブリダイズする 2 つの M H C K 7 プロモーター（配列番号 5 及び / 又は配列番号 1 3）及び互いにハイブリダイズする 2 つのポリアデニル化配列（配列番号 6 及び / 又は配列番号 1 4）を含む、4 5 1 1 ヌクレオチド配列である。ポリヌクレオチド配列の中心に位置する I T R 配列は、配列番号 7 として示されるヌクレオチド配列を有する。追加の I T R 配列は、配列番号 8 及び 1 5 として示される。

10

#### 【 0 0 1 8 】

本開示は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、又は少なくとも約 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。本開示は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列も提供する。

#### 【 0 0 1 9 】

加えて、本開示は、開示されたポリヌクレオチドのいずれかを含む組換え A A V ( r A A V ) を提供する。例えば、本開示は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、又は少なくとも約 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む r A A V を提供する。本開示は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む r A A V も提供する。

20

#### 【 0 0 2 0 】

本開示はまた、ポリヌクレオチド配列を含む r A A V を提供し、ポリヌクレオチド配列は、i) 目的の遺伝子を各々コードする、2 つの自己相補的ヌクレオチド配列であって、目的の遺伝子をコードする 2 つの自己相補的ヌクレオチド配列が、5' I T R 配列に隣接する、2 つの自己相補的ヌクレオチド配列と、i i) 2 つの自己相補的ポリアデニル化配列と、を含み、ポリヌクレオチド配列は、2 つの 3' I T R 配列によって隣接され、2 つの 3' I T R 配列は、相補的である。例えば、目的の遺伝子は、G A D、M T M 1、L P L、R P E、R E P - 1、C N G B 3、P 1 N D 4、X L R S、F V I I I、F I X、F I X 1 9、A A T、N F - B、I F N - 、A R S A、N G F、h A R S B、ニユーロツリン、A A D C、S U M F、S U M F 1、O T C、F G F - 4、N D 4、A R S A、R E P 1、シトシンデアミナーゼ、H G F 7 2 8、H G F 7 2 3、h G A A、 - グロビン遺伝子、G a g、M G 1 M A 3、L 5 2 3 S、M E T R A P、G D N F、A Q P 1、P G 9 D P、H B B、A D A、T C R、C A R、フィルグラスチム、I L - 1 2、G M - C S F、I C P 3 4 . 5、P E N K、R B 9 4、S S T 2、D C K . P 5 3、H S C、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、ヒト A N O 5、カルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子である。例えば、ポリヌクレオチド配列では、第 1 のヌクレオチド配列は、目的の遺伝子の補体配列であり、目的の遺伝子をコードする第 2 のヌクレオチド配列は、そのセンス配列であるため、第 1 のヌクレオチド配列及び第 2 のヌクレオチド配列は、互いに相補的である。

30

40

#### 【 0 0 2 1 】

目的の遺伝子が、ヒトサルコグリカン - ( h S C G B )、ヒトサルコグリカン ( h S C G G )、ヒトジスフェルリン、ヒト A N O 5、又はカルパイン - 3 ( C a p 3 ) 遺伝子である、請求項 3 に記載の組換え A A V。

#### 【 0 0 2 2 】

本開示はまた、ポリヌクレオチドを含む r A A V を提供し、ポリヌクレオチド配列は、

50

i) 配列番号3のアミノ酸配列などの、ヒト - サルコグリカン (hSGCB) タンパク質を各々コードする、2つの自己相補的ヌクレオチド配列、ii) 2つの自己相補的ポリアデニル化配列を含む。いくつかの実施形態では、hSGCBタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも約90%、少なくとも約95%、若しくは少なくとも約99%同一であるか、又はhSGCBタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。例えば、ポリアデニル化配列は、配列番号6のヌクレオチド配列を含む。

#### 【0023】

別の態様では、- サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列を含む組換えAAVベクターが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、- サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列は、例えば、配列番号5又は配列番号2に記載のヌクレオチド配列と少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、又は89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上同一の配列を含み、- サルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、- サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号2に記載のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、- サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号5又は配列番号2に記載のヌクレオチド配列からなる。

#### 【0024】

別の態様では、本明細書に記載の組換えAAVベクターは、配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、又は89%、より典型的には少なくとも90%、91%、92%、93%、又は94%、更により典型的には少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性である、- サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列を含み、そのタンパク質は、- サルコグリカン活性を保持する。

#### 【0025】

別の態様では、ストリンジェントな条件下で配列番号5若しくは配列番号2の核酸配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む機能性- サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列、又はその補体を含む、組換えAAVベクターが本明細書に記載される。

#### 【0026】

「ストリンジェントな」という用語は、ストリンジェントとして当該技術分野において一般に理解される条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、及びホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーション及び洗浄のためのストリンジェントな条件の例は、0.015Mの塩化ナトリウム、65~68の0.0015Mのクエン酸ナトリウム又は0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、及び42の50%ホルムアミドである。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)を参照されたい。よりストリンジェントな条件(より高い温度、より低いイオン筋力、より高いホルムアミド、又は他の変性剤など)も使用することができるが、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受ける。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが関係する場合、追加のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例には、37(14塩基オリゴの場合)、48(17塩基オリゴの場合)、55(20塩基オリゴの場合)、及び60(23塩基オリゴの場合)での6xSSC0.05%ピロリン酸ナトリウムでの洗浄が含まれる。

#### 【0027】

10

20

30

40

50

分子量、濃度、又は投薬量などの物理的特性について本明細書で範囲が使用される場合、範囲及びその中の特定の実施形態の全ての組み合わせ及び部分的な組み合わせが含まれることが意図される。数値又は数値範囲を指す場合の「約」という用語は、参照される数値又は数値範囲が実験的変動内（又は統計的実験誤差内）の近似値であることを意味し、したがって、数値又は数値範囲は、例えば、記載された数値又は数値範囲の1%～15%の間で変動し得る。

#### 【0028】

非特異的及び/又はバックグラウンドハイブリダイゼーションを低減する目的で、ハイブリダイゼーション及び洗浄緩衝液に他の薬剤を含めることができる。例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニル-ピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、 $\text{NaDodSO}_4$ 、(SDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA（又は他の非相補的DNA）、及び硫酸デキストランがあるが、他の好適な薬剤も使用できる。これらの添加物の濃度及び種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更できる。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH6.8～7.4で行われるが、典型的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーションの速度はpHにほとんど依存しない。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England)を参照されたい。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を考慮して、異なる配列類似性のDNAがハイブリッドを形成することを可能にするために、当業者によって調整され得る。

#### 【0029】

加えて、提供されるrAAVのうちのいずれかは、ポリヌクレオチドを含み、2つの自己相補的ヌクレオチド配列の各々は、筋特異的制御要素に作動可能に連結され、2つの筋特異的制御要素は、自己相補的である。例えば、筋特異的制御要素は、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、筋細胞特異的エンハンサー結合因子(MEF)、筋クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーター、MCK要素、短縮MCK(tMCK)プロモーター、tMCK要素、ミオシン重鎖(MHC)プロモーター、MHC7プロモーター(MHC及びMCKのハイブリッドバージョン)、C5-12プロモーター(合成プロモーター)、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格速筋トロポニンC遺伝子要素、遅筋心臓トロポニンC遺伝子要素、遅筋トロポニンi遺伝子要素、低酸素誘発性核因子結合要素、ステロイド誘発性要素、又はグルココルチコイド応答要素(GRE)である。

#### 【0030】

いくつかの実施形態では、開示されたrAAVは、ポリヌクレオチド配列を含み、2つの相補的ヌクレオチド配列の各々は、配列番号9のヌクレオチド配列を含む筋特異的制御要素MCK(tMCK)プロモーターに作動可能に連結される。他の実施形態では、開示されたrAAVは、ポリヌクレオチド配列を含み、2つの相補的ヌクレオチド配列の各々は、配列番号13又は配列番号5のヌクレオチド配列を含む筋特異的制御要素MHC7プロモーターに作動可能に連結される。

#### 【0031】

更なる実施形態では、開示されたrAAVは、2つの相補的なキメライントロンを含むポリヌクレオチド配列を含む。例えば、キメライントロンは、配列番号12又は配列番号4のヌクレオチド配列を含む。

#### 【0032】

追加の実施形態では、開示されたrAAVは、3つの逆方向末端反復(ITR)を含み、1つのITRは、2つの相補的な筋特異的制御要素によって隣接される。例えば、ITRは、配列番号7及び/又は配列番号8及び/又は配列番号15を含み得る。特定の例では、2つの自己相補的な筋特異的制御要素によって隣接されるITRは、配列番号7のヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、2つのITRは、配列番号8及び配列番号1

5 のヌクレオチド配列を含み、I T R のうちの 1 つは、配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 3 3 】

A A V は、例えば、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、A A V - 1 2、A A V - 1 3 及び A A V r h . 7 4 の任意の血清型であり得る。偽型 r A A V の産生は、例えば W O 0 1 / 8 3 6 9 2 に開示されている。他のタイプの r A A V 変異体、例えば、カプシド変異を有する r A A V も企図される。例えば、M a r s i c e t a l . , M o l e c u l a r T h e r a p y , 2 2 ( 1 1 ) : 1 9 0 0 - 1 9 0 9 ( 2 0 1 4 ) を参照されたい。

10

【 0 0 3 4 】

本開示は、開示された r A A V 又は開示されたポリヌクレオチドのいずれかを含む組成物も提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び / 又は補助剤を更に含む。例えば、組成物は、本開示の r A A V、緩衝剤、イオン強度剤、及び界面活性剤のいずれかを含む。

【 0 0 3 5 】

一態様では、対象に開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを投与するステップを含む、治療を必要とする対象において筋ジストロフィーを治療する方法が本明細書に記載される。

【 0 0 3 6 】

別の態様では、本開示は、対象に開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを投与することを含む、筋ジストロフィーに罹患している対象において筋力及び / 又は筋量を増加させる方法を提供する。

20

【 0 0 3 7 】

本開示はまた、対象に開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを投与することを含む、筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させる方法を提供する。

【 0 0 3 8 】

加えて、本開示は、対象に開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを投与することを含む、対象において - サルコグリカン異常症を治療する方法を提供する。

30

【 0 0 3 9 】

本開示はまた、対象に開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを投与することを含む、対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は C K レベルを減少させる方法を提供する。例えば、開示された方法のいずれにおいても、ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウェスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される。代替的に、開示された方法のいずれにおいても、ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数は、r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出される。

40

【 0 0 4 0 】

開示された方法のいずれにおいても、対象は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。

【 0 0 4 1 】

開示された方法のいずれにおいても、組換え A A V 又は組成物は、筋肉内注射又は静脈内注射によって投与される。他の実施形態では、r A A V 又は組成物は、全身投与され、例えば、静脈内投与される。

【 0 0 4 2 】

50

開示された方法のいずれにおいても、組換え A A V は、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される。

【 0 0 4 3 】

別の実施形態では、開示された方法のいずれにおいても、組換え A A V は、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量で投与される。

【 0 0 4 4 】

一態様では、本開示は、治療を必要とする対象において筋ジストロフィーを治療するための組成物を提供し、組成物は、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを含む。

【 0 0 4 5 】

別の態様では、本開示は、筋ジストロフィーに罹患している対象において筋力及び／又は筋量を増加させるための組成物を提供し、組成物は、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを含む。

【 0 0 4 6 】

本開示はまた、筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させるための組成物を提供し、組成物は、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを含む。

【 0 0 4 7 】

加えて、本開示は、対象において - サルコグリカン異常症を治療するための組成物を提供し、組成物は、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを含む。

【 0 0 4 8 】

本開示はまた、対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び／又は C K レベルを減少させるための組成物も提供し、組成物は、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかを含む。例えば、開示された組成物の投与は、r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出されるように、ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現の増加又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数の増加をもたらす。代替的に、開示された組成物の投与は、r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出されるように、ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現の増加又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数の増加をもたらす。

【 0 0 4 9 】

開示された組成物のいずれにおいても、対象は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。

【 0 0 5 0 】

開示された組成物のいずれにおいても、組換え A A V 又は組成物は、筋肉内注射又は静脈内注射による投与のために製剤化される。他の実施形態では、r A A V 又は組成物は、静脈内投与などの、全身投与のために製剤化される。

【 0 0 5 1 】

開示された組成物のいずれにおいても、組換え A A V は、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量である。

【 0 0 5 2 】

別の実施形態では、開示された組成物のいずれにおいても、組換え A A V は、線状参照

10

20

30

40

50

プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量である。

【 0 0 5 3 】

一態様では、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかの、それを必要とする対象において筋ジストロフィーを治療するための薬剤の調製のための、使用が本明細書に記載される。

【 0 0 5 4 】

別の態様では、本開示は、筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物対象において筋力及び / 又は筋量を増加させるための薬剤の調製のための、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかの、使用を提供する。

10

【 0 0 5 5 】

本開示はまた、筋ジストロフィーに罹患している対象において収縮誘発性損傷を軽減させるための薬剤の調製のための、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかの、使用を提供する。

【 0 0 5 6 】

加えて、本開示は、対象において - サルコグリカン異常症を治療するための薬剤の調製のための、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかの、使用を提供する。

【 0 0 5 7 】

本開示はまた、対象の筋肉組織においてベータ - サルコグリカン陽性線維を増加させる及び / 又は C K レベルを減少させるための薬剤の調製のための、開示された r A A V のいずれか又は開示された組成物のいずれかの、使用を提供する。例えば、使用のいずれにおいても、r A A V 又は組成物の投与は、r A A V の投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出されるように、ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又は陽性ベータ - サルコグリカン陽性線維の数の増加をもたらした。代替的に、開示された使用のいずれにおいても、r A A V 又は組成物の投与は、r A A V の投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、ベータ - サルコグリカントタンパク質レベルを測定することによって検出されるように、ベータ - サルコグリカン遺伝子の発現又はベータ - サルコグリカン陽性筋線維の数の増加をもたらした。

20

30

【 0 0 5 8 】

開示された使用のいずれにおいても、対象は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。

【 0 0 5 9 】

開示された使用のいずれにおいても、組換え A A V ベクター又は組成物は、筋肉内注射又は静脈内注射による投与のために製剤化される。他の実施形態では、r A A V 又は組成物は、静脈内投与などの、全身投与のために製剤化される。

【 0 0 6 0 】

開示された使用のいずれにおいても、組換え A A V は、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $2 \times 10^{14}$  v g / k g のその同等の投与量である。

40

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、開示された使用のいずれにおいても、組換え A A V は、線状参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の投与量、又はスーパーコイル参照プラスミドを使用した q P C R によって測定された  $5 \times 10^{13}$  v g / k g のその同等の投与量である。

【 0 0 6 2 】

開示された方法、組成物、又は使用のうちのいずれにおいても、対象における血清クレ

50

アチンキナーゼ ( C K ) レベルは、 r A A V 又は組成物の投与前の血清 C K レベルと比較して、 r A A V 又は組成物の投与後に減少する。

【 0 0 6 3 】

別の態様では、開示された方法、組成物、又は使用のうちのいずれにおいても、対象の細胞におけるベータ - サルコグリカン遺伝子発現のレベルは、 r A A V 又は組成物の投与前のベータ - サルコグリカン遺伝子発現のレベルと比較して、 r A A V 又は組成物の投与後に増加し、対象の筋肉組織におけるベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、 r A A V の投与前のベータ - サルコグリカン陽性線維の数と比較して、 r A A V の投与後に増加するか、又は運動機能は、 r A A V の投与前のその対象の運動機能と比較して、その対象において改善されており、運動機能は、 1 0 0 メートルの時間歩行試験によって決定される。

10

【 0 0 6 4 】

一態様では、開示された方法、組成物、又は使用のうちのいずれにおいても、アルファ - サルコグリカン遺伝子発現のレベルは、 r A A V 又は組成物の投与前のアルファ - サルコグリカン遺伝子発現のレベルと比較して、 r A A V 又は組成物の投与後に、それを必要とする対象において増加する。別の態様では、開示された方法、組成物、又は使用のうちのいずれにおいても、 r A A V 又は組成物の対象への投与後に、それを必要とする対象においてアルファ - サルコグリカンの細胞膜への局在化の増加をもたらす。別の態様では、開示された方法、組成物、又は使用のうちのいずれにおいても、アルファ - サルコグリカン発現のレベルは、筋肉組織において増加するか、又は筋機能は、 r A A V 若しくは組成物の投与前のアルファ - サルコグリカン発現のレベル若しくは筋機能のレベルと比較して、 r A A V の投与後に、それを必要とする対象において改善する。

20

【 0 0 6 5 】

別の態様では、本開示は、対象に h S G C B をコードする開示された r A A V のいずれかを投与することと、その h S G C B を発現する細胞の細胞膜において少なくとも第 2 のサルコグリカンの発現の増加を検出することと、を含む、対象の筋肉組織においてサルコグリカン発現を増加させる方法を提供する。いくつかの態様では、第 2 のサルコグリカンは、 - サルコグリカン ( S G C A ) 、 - サルコグリカン ( S G C G ) 、又は - サルコグリカン ( S G C D ) である。

【 0 0 6 6 】

別の態様では、プラスミドを細胞に移入することを含み、プラスミドが、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 、少なくとも約 9 5 % 、又は少なくとも約 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、本明細書に開示される r A A V を生成する方法が提供される。特に、プラスミドは、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 0 6 7 】

提供される方法、組成物、及び使用のうちのいずれかにおいて、対象の細胞におけるベータ - サルコグリカン遺伝子発現のレベルが、 r A A V 又は組成物の投与前のベータ - サルコグリカン遺伝子発現のレベルと比較して、 r A A V 又は組成物の投与後に増加し、対象における血清クレアチンキナーゼ ( C K ) レベルが、 r A A V 又は組成物の投与前の血清 C K レベルと比較して、 r A A V 又は組成物の投与後に減少し、及び / 又は対象の筋肉組織におけるベータ - サルコグリカン陽性線維の数が、 r A A V の投与前のベータ - サルコグリカン陽性線維の数と比較して、 r A A V 又は組成物の投与後に増加する。

40

【 0 0 6 8 】

別の実施形態では、提供される方法、組成物及び使用のうちのいずれかにおいて、運動機能が、 r A A V 又は組成物の投与前のその対象の運動機能と比較して、その対象において改善されており、運動機能が、 1 0 0 メートルの時間歩行試験によって決定される。例えば、運動機能は、遺伝子移入後 1 ヶ月又は 3 0 日で少なくとも 5 % 、遺伝子移入後 2 ヶ月又は 6 0 日で少なくとも 1 0 % 、又は遺伝子移入後 3 ヶ月又は 9 0 日で少なくとも 1 5 % 改善する。いくつかの実施形態では、運動機能は、少なくとも 5 % 、 1 0 % 、 1 5 % 、 2 0 % 、 2 5 % 、 3 0 % 、 4 0 % 、 4 5 % 、又は 5 0 % 改善する。

50

## 【 0 0 6 9 】

例えば、提供される方法、組成物及び使用のうちのいずれかにおいて、全身投与経路は、静脈内経路である。例えば、 $rAAV$ は、静脈内経路を使用して投与され、投与される $rAAV$ の用量は、定量標準としての線状化プラスミドに基づいて、約 $1.85 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 若しくは約 $7.41 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ であるか、又は投与される $rAAV$ の用量は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて、約 $5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 若しくは約 $2 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ である。

## 【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、 $rAAV$ の用量は、静脈内経路を使用して投与され、用量は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて、約 $1.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$  ~ 約 $5 \times 10^{14}$ 、又は定量標準としての線状化プラスミドに基づいて、約 $1.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$  ~ 約 $1.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ である。

## 【 0 0 7 1 】

加えて、投与される $rAAV$ の用量は、約 $1.5 \times 10^{13} \text{ vg}$  ~ 約 $2 \times 10^{16} \text{ vg}$ 、又は $1.5 \times 10^{13} \text{ vg}$  ~  $1 \times 10^{16} \text{ vg}$ 、又は約 $1.5 \times 10^{13} \text{ vg}$  ~ 約 $2 \times 10^{15} \text{ vg}$ 、又は約 $1.5 \times 10^{13} \text{ vg}$  ~ 約 $1 \times 10^{15} \text{ vg}$ である。加えて、方法、提供される方法、組成物及び使用のうちのいずれかにおいて、 $rAAV$ の用量は、約 $10 \text{ mL/kg}$ の濃度で投与される。提供される方法、提供される方法、組成物及び使用のうちのいずれかにおいて、筋ジストロフィーは、肢帯型筋ジストロフィーである。

## 【 0 0 7 2 】

提供される筋ジストロフィーを治療する方法、使用、及び組成物のうちのいずれかにおいて、対象は、4 ~ 15歳であり、両方の対立遺伝子においてベータ-サルコグリカン(SGCB)変異が確認されており、 $AAVrh74$ 抗体に対して陰性であり、及び/又は100メートル歩行試験が40%を超えるか、又は正常であった。提供される筋ジストロフィーを治療する方法、使用及び組成物のうちのいずれかにおいて、対象は、小児対象である。いくつかの実施形態では、対象は、小児対象であり、例えば、1 ~ 10歳の範囲の対象である。いくつかの実施形態では、対象は、4 ~ 15歳である。一実施形態では、対象は、青年対象であり、例えば、10 ~ 19歳の範囲の対象である。加えて、対象は、一実施形態では、若年成人対象、例えば、10代後半又は20代前半の範囲の対象であり、例えば、対象は、15 ~ 29歳の範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、対象は、中年の成人又は高齢の対象であり、その結果、中年の成人は、25 ~ 55歳の範囲であってもよく、高齢の対象は、50歳を超える範囲であってもよい。

## 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、 $rAAV$ は、注射、注入、又は移植によって投与される。例えば、 $rAAV$ は、およそ1 ~ 2時間にわたる注入によって投与される。加えて、 $rAAV$ は、末梢四肢静脈を介した静脈内経路によって投与される。

## 【 0 0 7 4 】

提供される方法、使用、又は組成物のうちのいずれかにおいて、対象は、サルコグリカン又は筋ジストロフィーをコードする遺伝子中の遺伝子変異を有している。いくつかの態様では、サルコグリカンは、 - サルコグリカン(SGCB)、 - サルコグリカン(SGCA)、 - サルコグリカン(SGCG)、又は - サルコグリカン(SGCD)である。いくつかの態様では、サルコグリカンは、 - サルコグリカン又は - サルコグリカンである。

## 【 0 0 7 5 】

提供される方法、使用又は組成物のうちのいずれかにおいて、ベータ-サルコグリカンタンパク質のレベルは、 $rAAV$ 投与後に少なくとも25%、又は少なくとも26%、又は少なくとも27%、又は少なくとも28%、又は少なくとも29%、又は少なくとも30%、又は少なくとも31%、又は少なくとも32%、又は少なくとも33%、又は少なくとも34%、又は少なくとも又は35%、又は少なくとも36%、又は少なくとも37%、又は少なくとも38%、又は少なくとも39%、又は少なくとも40%、又は少なく



とも41%、又は少なくとも42%、又は少なくとも43%、又は少なくとも44%、又は少なくとも45%又は少なくとも46%、又は少なくとも47%、又は少なくとも48%、又は少なくとも49%、又は少なくとも50%、又は少なくとも51%、又は少なくとも52%、又は少なくとも53%、又は少なくとも54%、又は少なくとも55%又は少なくとも56%、又は少なくとも57%、又は少なくとも58%、又は少なくとも59%、又は少なくとも60%、又は少なくとも63%、又は少なくとも65%、又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%増加する。例えば、ベータ - サルコグリカンタンパク質のレベルは、r A A V投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロットで、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される場合、少なくとも33%増加し、又はベータ - サルコグリカンタンパク質のレベルは、r A A V投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学によって、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される場合、少なくとも38%又は少なくとも39%増加する

10

**【0076】**

本明細書で提供される方法、使用又は組成物のうちのいずれかにおいて、対象における血清CKレベルが、r A A Vの投与前の血清CKレベルと比較して、r A A Vの投与後に減少する。例えば、対象における血清CKレベルは、r A A Vの投与前の血清CKレベルと比較して、r A A Vの投与後60日～90日、60日、又は90日に少なくとも50%、又は少なくとも51%、又は少なくとも52%、又は少なくとも53%、又は少なくとも54%、又は少なくとも55%又は少なくとも56%、又は少なくとも57%、又は少なくとも58%、又は少なくとも59%、又は少なくとも60%、又は少なくとも63%、又は少なくとも65%、又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも81%、又は少なくとも82%、又は少なくとも83%、又は少なくとも84%、又は少なくとも85%、又は少なくとも86%又は少なくとも87%、又は少なくとも88%、又は少なくとも89%、又は少なくとも90%又は少なくとも95%、又は少なくとも98%減少する。

20

**【0077】**

本明細書で提供される方法、使用又は組成物のうちのいずれかにおいて、対象の筋肉組織におけるベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、r A A Vの投与前のベータ - サルコグリカン陽性線維の数と比較して、r A A Vの投与後に増加する。例えば、ベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、r A A V投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロット又は免疫組織化学によって、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される。例えば、対象の筋肉組織におけるベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、r A A V投与後に少なくとも25%、又は少なくとも26%、又は少なくとも27%、又は少なくとも28%、又は少なくとも29%、又は少なくとも30%、又は少なくとも31%、又は少なくとも32%、又は少なくとも33%、又は少なくとも34%、又は少なくとも35%又は少なくとも36%、又は少なくとも37%、又は少なくとも38%、又は少なくとも39%、又は少なくとも40%、又は少なくとも41%、又は少なくとも42%、又は少なくとも43%、又は少なくとも44%、又は少なくとも45%又は少なくとも46%、又は少なくとも47%、又は少なくとも48%、又は少なくとも49%、又は少なくとも50%、又は少なくとも51%、又は少なくとも52%、又は少なくとも53%、又は少なくとも54%、又は少なくとも55%又は少なくとも56%、又は少なくとも57%、又は少なくとも58%、又は少なくとも59%、又は少なくとも60%、又は少なくとも63%、又は少なくとも65%、又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%又は少なくとも95%、又は少なくとも98%増加する。

30

40

**【0078】**

本明細書で提供される方法、組成物及び使用のうちのいずれかにおいて、対象におけるアルファ - サルコグリカンのレベルは、r A A Vの投与前のアルファ - サルコグリカンの

50

レベルと比較して、r A A Vの投与後に増加する。アルファ - サルコグリカンのレベルは、r A A V投与の前及び後の筋生検において、免疫組織化学又はウエスタンブロットによって、アルファ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される。

【 0 0 7 9 】

細胞においてベータ - サルコグリカン遺伝子を発現するための提供される方法、使用、又は組成物のうちのいずれかにおいて、細胞におけるベータ - サルコグリカン遺伝子の発現は、本明細書に開示される r A A V又は組成物のいずれかの投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロット又は免疫組織化学で、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される。例えば、細胞は、1より多いA A Vウイルスコピー数を有する。加えて、ベータ - サルコグリカン遺伝子は、核当たり1より多いr A A Vベクターゲノムコピーを検出することによって、対象において測定される。

10

【 0 0 8 0 】

これらの方法、使用、及び組成物のうちのいずれかにおいて、対象における血清C Kレベルは、r A A Vの投与前の血清C Kレベルと比較して、開示されたr A A V又は組成物のいずれかの投与後60日までに少なくとも82%減少する。

【 0 0 8 1 】

これらの方法、使用及び組成物のうちのいずれかにおいて、ベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、r A A V投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロット又は免疫組織化学によって、ベータ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される。加えて、方法、使用及び組成物のうちのいずれかにおいて、ベータ - サルコグリカン陽性線維の数は、核当たり1より多いr A A Vベクターゲノムコピーを検出することによって測定される。

20

【 0 0 8 2 】

これらの方法、使用及び組成物のうちのいずれかにおいて、アルファ - サルコグリカンのレベルは、r A A V投与の前及び後の筋生検において、ウエスタンブロット又は免疫組織化学によって、アルファ - サルコグリカンタンパク質レベルを測定することによって検出される。加えて、提供される方法、使用及び組成物のいずれかにおいて、アルファ - サルコグリカンは、s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C Bによってコードされるベータ - サルコグリカンを発現する細胞の膜に共局在化する。

【 0 0 8 3 】

組換えA A Vベクター粒子を産生する方法であって、本明細書に記載のプラスミドでトランスフェクトされる細胞を培養することと、トランスフェクトされた細胞の上清から組換えA A V粒子を回収することと、を含む、方法も提供される。本明細書に記載の組換えA A Vベクターのいずれかを含むウイルス粒子もまた企図される。一実施形態では、r A A Vを生成する方法は、A A Vベクタープラスミドを宿主細胞に移すことを含む。別の実施形態では、プラスミドは、配列番号1と少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%同一であるヌクレオチド配列を含む。別の態様では、本開示は、配列番号1のヌクレオチド配列を含むA A Vベクタープラスミドを含む細胞を提供する。本明細書に記載の細胞は、昆虫細胞、例えば、D r o s o p h i l a細胞（例えば、S 2細胞又はK c細胞）、カイコ細胞（例えば、B m e 2 1細胞）、又は蚊細胞（例えば、C 6 / 3 6細胞）、又は哺乳動物細胞（好ましくはヒト細胞、例えば、ヒト初代細胞又は確立された細胞株）を含み、これらであり得る。一実施形態では、哺乳動物細胞は、2 9 3細胞、C O S細胞、H e L a細胞、又はK B細胞である。

30

40

【 0 0 8 4 】

別の実施形態では、プラスミドは、配列番号1と少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクタープラスミドは、配列番号1のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、A A Vベクタープラスミドは、宿主細胞において安定して発現される。A A Vベクタープラスミドを安定して保有する宿主細胞を使用して、r A A Vを生成することができる。一実施形態では、A A Vベクタープラスミドは、p A A V .

50

M H C K 7 . h S G C B . K A N プラスミドである。

【 0 0 8 5 】

本明細書で提供される組換え A A V ベクター粒子を産生する方法は、パッケージングプラスミド及び / 又はヘルパーウイルスを宿主細胞に移入するステップを更に含み得る。例えば、この方法は、パッケージング細胞が、安定に組み込まれた A A V c a p 遺伝子を含むステップ、及び / 又はパッケージング細胞が、安定に組み込まれた A A V r e p 遺伝子を含むステップを更に含む。本発明はまた、配列番号 1 と少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、若しくは少なくとも約 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含むプラスミド、又は配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むプラスミドを含む、細胞を提供する。配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む細胞も提供される。

10

【 0 0 8 6 】

それを必要とする対象における線維症を軽減させる方法も提供される。この点について、方法は、治療有効量の本明細書に記載の r A A V ベクター（又は本明細書に記載の r A A V ベクターを含む組成物）を、哺乳動物の対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、筋ジストロフィーに罹患している。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の r A A V ベクター（又は本明細書に記載の r A A V ベクターを含む組成物）の投与は、対象の骨格筋又は心筋における線維症を軽減させる。

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用される「筋ジストロフィー」という用語は、強度及び筋肉量が徐々に低下する障害を指す。筋ジストロフィー疾患の非限定的な例としては、ベッカー型筋ジストロフィー、脛骨筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、エメリー - ドレイフス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、サルコグリカン異常症、部分的 L A M A 2 欠損による先天性筋ジストロフィーのような先天性筋ジストロフィー、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー、1 D 型先天性筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、肢帯型 1 A 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 A 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 B 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 C 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 D 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 E 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 F 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 G 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 H 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 I 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 J 型筋ジストロフィー、肢帯型 2 K 型筋ジストロフィー、肢帯型 I C 型筋ジストロフィー、単純型表皮水疱症を伴う強直性脊椎型筋ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー、及びウルリッヒ型スクレオアトニック筋ジストロフィーを挙げることができる。いくつかの実施形態では、対象は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、肢帯型筋ジストロフィー 2 E 型（L G M D 2 E）に罹患している。

20

30

【 0 0 8 8 】

本明細書で使用する「線維症」という用語は、細胞外マトリックス（E C M）成分の過剰又は未制御沈着並びに骨格筋、心筋、肝臓、肺、腎臓、及び脾臓を含む損傷後の組織における異常な修復プロセスを指す。沈着する E C M 成分には、コラーゲン（例えばコラーゲン 1、コラーゲン 2、又はコラーゲン 3）及びフィブロネクチンが含まれる。

【 0 0 8 9 】

別の態様では、治療有効量の本明細書に記載の A A V ベクター（又は本明細書に記載の A A V ベクターを含む組成物）を哺乳動物の対象に投与することを含む、哺乳動物の対象における筋力及び / 又は筋肉量を増加する方法が本明細書に記載される。一実施形態では、対象はヒトである。

40

【 0 0 9 0 】

提供される製剤又は組成物では、緩衝剤は、トリス、トリシン、ビス - トリシン、H E P E S、M O P S、T E S、T A P S、P I P E S、及び C A P S のうちの 1 つ以上を含む。例えば、緩衝剤は、約 5 m M ~ 約 4 0 m M の濃度で p H 8 . 0 のトリスを含むか、又は緩衝剤は、約 2 0 m M で p H 8 . 0 のトリスを含む。

【 0 0 9 1 】

50

提供される製剤又は組成物のうちのいずれかにおいて、イオン強度剤は、塩化カリウム ( $\text{KCl}$ )、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、酢酸アンモニウム、塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ )、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン ( $\text{MnCl}_2$ )、酢酸マンガン、硫酸マンガン、塩化ナトリウム ( $\text{NaCl}$ )、酢酸ナトリウム、塩化リチウム ( $\text{LiCl}$ )、及び酢酸リチウムのうちの1つ以上を含む。例えば、イオン強度剤は、約  $0.2 \text{ mM}$  ~ 約  $4 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{MgCl}_2$  を含むか、又はイオン強度剤は、約  $50 \text{ mM}$  ~ 約  $500 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{NaCl}$  を含むか、又はイオン強度剤は、約  $0.2 \text{ mM}$  ~ 約  $4 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{MgCl}_2$  を含み、約  $50 \text{ mM}$  ~ 約  $500 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{NaCl}$  を含むか、又はイオン強度剤は、約  $1 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{MgCl}_2$  を含み、約  $200 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{NaCl}$  を含む。

10

#### 【0092】

提供される製剤又は組成物のうちのいずれかにおいて、界面活性剤は、スルホネート、サルフェート、ホスホネート、ホスフェート、ポロキサマー、及びカチオン性界面活性剤のうちの1つ以上を含む。例えば、ポロキサマーは、ポロキサマー124、ポロキサマー181、ポロキサマー184、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー331、ポロキサマー338、及びポロキサマー407のうちの1つ以上を含む。ポロキサマーは、約  $0.00001\%$  ~ 約  $1\%$  の濃度であってもよい。例示的な界面活性剤は、約  $0.001\%$  の濃度のポロキサマー188である。

#### 【0093】

前述の段落は、本発明の全ての態様を定義することを意図するものではなく、追加の態様は、詳細な説明のような他のセクションに記載される。文書全体は、統一された開示として関連することが意図されており、特徴の組み合わせがこの文書と同じ文章、又は段落、又はセクションで一緒に見られない場合でも、本明細書に記載される特徴の全ての組み合わせが考慮されることを理解されたい。本発明は、追加の態様として、上記の特定の段落で定義される変形よりもいくらか範囲が狭い本発明の全ての実施形態を含む。例えば、本発明の特定の態様が属として記載される場合、属の各メンバーが個々に本発明の態様であると理解されるべきである。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0094】

【図1】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  治療用 - サルコグリカン導入遺伝子カセットの概略図を提供する。コドン最適化ヒト - サルコグリカン遺伝子 ( $hSGCB$ ) を含む自己相補的  $AAV$  ベクター。筋特異的  $MHCK7$  プロモーターが発現を駆動する。カセットはまた、安定性のためにプロセッシング及びポリアダニル化シグナルを増強するキメライントロンを含む。

30

【図2A - 1】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  ノアノテーション付与サレタヌクレオチド

【図2A - 2】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  ノアノテーション付与サレタヌクレオチド

【図2B】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  のアノテーションが付与されたヌクレオチド

40

【図2C】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  のアノテーションが付与されたヌクレオチド配列を提供する。

【図3】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  の注入後60日目の  $SGCB$  の堅牢な発現及び筋細胞膜局在化を示す。

【図4】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  の注入後60日目の筋細胞膜における  $SGCD$  及び  $SGCG$  タンパク質の発現の増加を示す。

【図5】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  ( $SRP - 9003$ ) による治療後のクレアチンキナーゼ ( $CK$ ) の低減を示す。  $LLN$  = 正常の下限、  $ULN$  = 正常の上限。

【図6】  $rAAVrh74$ 、 $MHCK7$ 、 $SGCB$  ( $SRP - 9003$ ) 治療が  $NSAD$  合計スコアの持続的な改善をもたらすことを示す。

50

【図7】 rAAVrh74.MHCK7.SGCB(SRP-9003)治療患者が自然経過データと比較して合計NSADスコアの改善を示すことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0095】

本発明の実施は、他に示されない限り、当業者の技術の範囲内で、ウイルス学、微生物学、分子生物学、及び組換えDNA技術の従来の方法を使用する。そのような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Current Edition)、DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I&II (D. Glover, ed.), Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Current Edition)、Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)、CRC Handbook of Parvoviruses, vol. I&II (P. Tijssen, ed.), Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I&II (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.), Freshney Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (Wiley-Liss, Third Edition)、及び Ausubel et al. (1991) Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience, N.Y.) を参照されたい。

【0096】

定義

単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈上特に明記されていない限り、複数形の指示対象が含まれる。したがって、例えば、「細胞」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「培養物」への言及は、1つ以上の培養物及び当業者に周知されるその同等物への言及を含む、などである。「組換えAAV」への言及は、2つ以上のrAAVビリオンの混合物を含む、などである。別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0097】

特許請求の範囲における「又は」という用語の使用は、代替案のみを指すように明示的に示されない限り、又は代替案が相互に排他的である場合を除き、「及び/又は」を意味するように使用されるが、本開示は、代替案及び「及び/又は」のみを指す定義を支持する。

【0098】

本出願全体を通して、「約」という用語は、値が、値を決定するために使用されているデバイス又は方法に対する統計的実験誤差（誤差の標準偏差）を含むことを示すために使用される。

【0099】

「ベクター」という用語は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどの、適切な制御要素と関連する場合に複製することができ、かつ細胞間で遺伝子配列を移入することができる、任意の遺伝子要素を意味する。一実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。

【0100】

本明細書で使用される場合、「AAV」という用語は、アデノ随伴ウイルスの一般的な略語である。アデノ随伴ウイルスは、ある特定の機能が同時感染ヘルパーウイルスによって提供される細胞内でのみ成長する一本鎖DNAパルボウイルスである。現在、特性評価されているAAVの血清型は13個存在する。AAVの一般的な情報及び概説は、例えば

、Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169 - 228、及びBerns, 1990, Virology, pp. 1743 - 1764, Raven Press, (New York)で見つけることができる。しかしながら、様々な血清型が遺伝子レベルでさえも構造的及び機能的の両方で非常に密接に関連していることがよく知られているため、これらの同じ原理が追加のAAV血清型に適用可能であることが十分に予想される。(例えば、Blacklowe, 1988, pp. 165 - 174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed., 及びRose, Comprehensive Virology 3: 1 - 61 (1974)を参照されたい)。例えば、全てのAAV血清型は、相同rep遺伝子によって媒介される非常に類似した複製特性を明らかに呈し、これらは全て、AAV2で発現されるものなどの3つの関連カプシドタンパク質を有する。関連性の程度は、ゲノムの長さに沿った血清型間の広範な交差ハイブリダイゼーション、及び「逆位末端反復配列」(ITR)に対応する末端における類似自己アニーリングセグメントの存在を明らかにする、ヘテロ二本鎖分析によって更に示唆される。類似感染性パターンはまた、各血清型における複製機能が類似調節制御下にあることも示唆する。

10

20

30

#### 【0101】

本明細書で使用される場合の「AAVベクター」とは、AAV末端反復配列(ITR)に隣接している1つ以上の目的とするポリヌクレオチド(又は導入遺伝子)を指す。かかるAAVベクターは、rep及びcap遺伝子産物をコード及び発現するベクターでトランスフェクトされた宿主細胞中に存在する場合に、感染性ウイルス粒子に複製及びパッケージングされ得る。一実施形態では、AAVベクターは、限定されないが、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAVrh10、及びAAVrh.74を含む、アデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクターである。AAVベクターは、好ましくはrep及び/又はcap遺伝子で、AAV野生型遺伝子のうちの1つ以上が全部又は一部分において欠失しているが、機能的な隣接ITR配列を保持することができる。機能的なITR配列は、AAVビリオンのレスキュー、複製、及びパッケージングに必要である。したがって、AAVベクターは、ウイルスの複製及びパッケージング(例えば、機能的ITR)のためにシスで必要とされる少なくともこれらの配列を含むように本明細書で定義される。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的レスキュー、複製、及びパッケージングを提供する限り、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失又は置換によって変更され得る。

40

#### 【0102】

「AAVヘルパー機能」という用語は、生産的なAAV複製のために次にトランスで機能するAAV遺伝子産物を提供するために発現され得るAAV由来コード配列を指す。したがって、AAVヘルパー機能は、主要なAAVオープンリーディングフレーム(ORF)、rep、及びcapを含む。Rep発現産物は、とりわけ、DNA複製のAAV起点の認識、結合、及びニッキング、DNAヘリカーゼ活性、並びにAAV(又は他の異種)プロモーターからの転写の調節を含む、多くの機能を所有することが示されている。Cap発現産物は、必要なパッケージング機能を供給する。AAVヘルパー機能は、本明細書では、AAVベクターから失われたトランスのAAV機能を補完するために使用される。

40

#### 【0103】

「組換えウイルス」とは、例えば、ウイルス粒子への異種核酸配列の付加又は挿入によって遺伝的に変更されたウイルスを意味する。

#### 【0104】

「AAVビリオン」又は「AAVウイルス粒子」又は「AAVベクター粒子」とは、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質及びカプシドに包まれたポリヌクレオチドAAVベクターからなるウイルス粒子を指す。一実施形態では、AAVビリオンは、異種ポリヌクレオチド(すなわち、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子などの野生型AAVゲノ

50

ム以外のポリヌクレオチド)を含む。いくつかの実施形態では、AAVウイルス粒子の産生には、AAVベクターの産生が含まれ、例えば、ベクターは、AAVベクター粒子内に含有される。

#### 【0105】

哺乳類細胞に送達される導入遺伝子などのAAVゲノム、それは、典型的には、「AAVベクター粒子」又は単に「AAVベクター」と称される。したがって、かかるベクターがAAVベクター粒子内に含有されるため、AAVベクター粒子の産生には、必然的にAAVベクターの産生が含まれる。

#### 【0106】

例えば、野生型(wt)AAVウイルス粒子は、AAVキャプシドタンパク質コートに関連する線状の一本鎖AAV核酸ゲノムを含む。AAVビリオンは、一本鎖(ss)AAV又は自己相補的(SC)AAVのいずれかであり得る。一実施形態では、相補的センス、例えば「センス」又は「アンチセンス」鎖のいずれかの一本鎖AAV核酸分子は、AAVビリオンにパッケージングされ得、両方の鎖は、等しく感染性である。

#### 【0107】

「組換えAAV」又は「rAAV」という用語は、AAV ITRが両側に隣接する目的の異種ヌクレオチド配列をカプセル化する、AAVタンパク質シェルから成る感染性の複製欠損ウイルスとして本明細書で定義される。一実施形態では、rAAVは、好適な宿主細胞で産生され、これは、その中に導入されたAAVベクター、AAVヘルパー機能、及びアクセサリ機能を有する。このようにして、宿主細胞は、その後の遺伝子送達のために、AAVベクター(目的の組換えヌクレオチド配列を含有する)を感染性組換えビリオン粒子にパッケージングするために必要とされるAAVポリペプチドをコードすることができる。

#### 【0108】

「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来DNAの取り込みを指し、細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入されたときに「トランスフェクト」される。多くのトランスフェクション技術が当該技術分野において一般的に知られている。例えば、Graham et al. (1973) Virology, 52: 456、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier、及びChuet al. (1981) Gene 13: 197を参照されたい。そのような技術を用いて、ヌクレオチド組込みベクター及び他の核酸分子などの、1つ以上の外来性DNA部分を好適な宿主細胞に導入することができる。

#### 【0109】

「宿主細胞」という用語は、AAVヘルパー構築物、AAVベクタープラスミド、アクセサリ機能ベクター、又はその他のトランスファーDNAのレシピエントとして使用できるか、又は使用されてきた、例えば、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳動物細胞を意味する。この用語には、トランスフェクトされた元の細胞の子孫が含まれる。したがって、本明細書で使用される「宿主細胞」は、一般に、外因性DNA配列でトランスフェクトされた細胞を指す。単一の親細胞の子孫は、自然、偶発的、又は意図的な変異のために、形態又はゲノム又は全DNA補体において必ずしも完全に同一でない場合があることが理解される。

#### 【0110】

「形質導入」という用語は、レシピエント細胞による - サルコグリカンの発現をもたらす、記載の複製欠損rAAVを介するインビボ又はインビトロのいずれかでのレシピエント細胞への目的のポリヌクレオチド(例えば、 - サルコグリカンコードするポリヌクレオチド配列)の投与/送達を指すために使用される。

#### 【0111】

10

20

30

40

50

「筋肉細胞」又は「筋肉組織」とは、あらゆる種類の筋肉（例えば、消化管、膀胱、血管、又は心臓組織に由来する骨格筋及び平滑筋）に由来する細胞又は細胞群を意味する。そのような筋肉細胞は、筋芽細胞、筋細胞、筋管、心筋細胞、及び心筋芽細胞など、分化又は未分化であり得る。

#### 【 0 1 1 2 】

「異種」という用語は、コード配列及び制御配列などの核酸配列に関連するとき、通常は一緒に結合されていない、かつ／又は通常は特定の細胞に関連していない配列を示す。したがって、核酸構築物又はベクターの「異種」領域は、自然界で他の分子と関連して見られない、別の核酸分子内又は別の核酸分子に付着した核酸のセグメントである。例えば、核酸構築物の異種領域は、自然界のコード配列に関連して見られない配列が隣接するコード配列を含み得る。異種コード配列の別の例は、コード配列自体が自然界で見られない（例えば、天然の遺伝子とは異なるコドンをもつ合成配列）構築物である。同様に、細胞内に通常は存在しない構築物で形質転換された細胞は、本発明の目的のために異種であるとみなされるであろう。本明細書で使用される場合、対立遺伝子変異又は自然に発生する変異事象は、異種 DNA を生じさせない。

#### 【 0 1 1 3 】

「コード配列」又は特定のタンパク質を「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に配置されると、インビトロ又はインビボでポリペプチドに転写され（DNA の場合）、翻訳される（mRNA の場合）核酸配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドン及び 3'（カルボキシ）末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列には、原核生物又は真核生物の mRNA からの cDNA、原核生物又は真核生物の DNA からのゲノム DNA 配列、更には合成 DNA 配列が含まれ得るが、これらに限定されない。転写終結配列は、通常、コード配列の 3' 側に位置するであろう。

#### 【 0 1 1 4 】

「核酸」配列は、DNA 又は RNA 配列を指す。核酸には、4 - アセチルシトシン、8 - ヒドロキシ - N6 - メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5 - （カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルシュードウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルケオシン、5' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、シュードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、及び 2, 6 - ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない DNA 及び RNA の塩基類似体が含まれる。

#### 【 0 1 1 5 】

DNA 「制御配列」という用語は、集合的に、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製の起点、内部リボソーム侵入部位（「IRES」）、エンハンサーなどを指し、これらは、レシピエント細胞におけるコード配列の複製、転写、及び翻訳を集合的に提供する。選択されたコード配列が適切な宿主細胞で複製、転写、及び翻訳されることが出来る限り、これらの制御配列の全てが常に存在する必要はない。

#### 【 0 1 1 6 】

「プロモーター」という用語は、DNA 調節配列を含むヌクレオチド領域を指すために



、その通常の意味で本明細書において使用され、調節配列は、RNAポリメラーゼに結合し、下流（3' - 方向）コーディング配列の転写を開始させることができる遺伝子に由来する。転写プロモーターには、「誘導性プロモーター」（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される）、「抑制性プロモーター」（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される）、及び「構成的プロモーター」が含まれ得る。一実施形態では、プロモーターは、筋特異的プロモーターであり、これには、ヒト骨格アクチン遺伝子要素、心臓アクチン遺伝子要素、デスミンプロモーター、骨格アルファアクチン（ASKA）プロモーター、トロポニンI（TN NI 2）プロモーター、筋細胞特異的エンハンサー結合因子mef結合要素、筋クレアチンキナーゼ（MCK）プロモーター、短縮MCK（tMCK）プロモーター、ミオシン重鎖（MHC）プロモーター、ハイブリッドa - ミオシン重鎖エンハンサー / MCKエンハンサープロモーター（MHC K 7）プロモーター、C 5 ~ 1 2プロモーター、マウスクレアチンキナーゼエンハンサー要素、骨格の速筋トロポニンC遺伝子要素、遅筋心臓トロポニンC遺伝子要素、遅筋トロポニンi遺伝子要素、低酸素誘導性核因子（HIF）応答要素（HRE）、ステロイド誘導性要素、及びグルココルチコイド応答要素（GRE）が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、プロモーターは、MCKプロモーター、tMCKプロモーター、又はMHC K 7プロモーターである。

10

#### 【0117】

「動作可能にリンクされた」という用語は、そのように記述された構成要素がそれらの通常の実行を実行するように構成される要素の配置を指す。したがって、コード配列に作動可能に連結された制御配列は、コード配列の発現に影響を与えることができる。制御配列は、それらがその発現を指示するように機能する限り、コード配列と隣接している必要はない。したがって、例えば、介在する未翻訳であるが転写された配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在することができ、プロモーター配列は、依然としてコード配列に「作動可能に連結されている」とみなされ得る。

20

#### 【0118】

RNAポリメラーゼがプロモーター配列に結合し、コード配列をmRNAに転写し、次にコード配列によってコードされるポリペプチドに翻訳されるとき、プロモーターは、細胞内のコード配列の「転写を指示」する。

30

#### 【0119】

「発現カセット」又は「発現構築物」は、目的の配列又は遺伝子の発現を指示することができる集合体を指す。発現カセットは、上記のように、目的の配列又は遺伝子に（転写を指示するように）作動可能に連結されるプロモーターなどの制御要素を含み、ポリアダニル化配列も含むことが多い。本発明のある特定の実施形態内で、本明細書に記載の発現カセットは、プラスミド構築物内に含まれ得る。発現カセットの構成要素に加えて、プラスミド構築物はまた、1つ以上の選択可能なマーカー、プラスミド構築物が一本鎖DNAとして存在することを可能にするシグナル、少なくとも1つのマルチクロニング部位、及び「哺乳動物」の複製起点（例えば、SV40又はアデノウイルスの複製起点）を含み得る。

40

#### 【0120】

ヌクレオチド配列を指す場合の「単離された」とは、示された分子が、他のヌクレオチド配列、クロマチン材料などの他の生物学的高分子の実質的な不在下に存在することを意味する。したがって、「特定のポリペプチドをコードする単離された核酸分子」は、対象のポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子を指すが、しかしながら、分子は、組成物の基本的な特性に悪影響を及ぼさないいくつかの追加の塩基又は部分を含み得る。

#### 【0121】

特定のヌクレオチド配列が別の配列に対して「上流」、「下流」、「3」、又は「5」に位置すると記載されている場合など、本出願全体にわたって特定の核酸分子中のヌクレ

50

オチド配列の相対位置を記載する目的で、それは、当技術分野で慣習的であると称される DNA 分子の「センス」又は「コーディング」鎖における配列の位置であることが理解されるべきである。

#### 【0122】

核酸配列又はアミノ酸配列の文脈における「配列同一性」、「配列同一性の割合」、又は「同一の割合」という用語は、最大限対応するようにアラインメントさせたときに同じである 2 つの配列中の残基を指す。配列同一性の比較の長さは、ゲノムの全長、遺伝子コード配列の全長であり得るか、又は少なくとも約 500 ~ 5000 個のヌクレオチドの断片が望ましい。しかしながら、少なくとも約 9 個のヌクレオチド、通常は少なくとも約 20 ~ 24 個のヌクレオチド、少なくとも約 28 ~ 32 個のヌクレオチド、少なくとも約 36 個以上のヌクレオチドなど、より小さい断片間の同一性もまた所望され得る。配列の同一性パーセントは、当該技術分野で知られている技法によって決定することができる。例えば、相同性は、配列情報を整列させ、ALIGN、ClustalW2、及びBLASTなどの容易に入手可能なコンピュータプログラムを使用することにより、2 つのポリペプチド分子間の配列情報を直接比較することによって決定することができる。一実施形態では、BLASTがアラインメントツールとして使用される場合、次のデフォルトパラメータ、遺伝暗号 = 標準；filter = なし；鎖 = 両方；カットオフ = 60；予測 = 10；マトリックス = BLOSUM62；説明 = 50 個の配列；並べ替え = 高得点；データベース = 非冗長、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻訳 + スイスプロテイン + Snpupdate + PIR。

10

20

#### 【0123】

「対象」という用語は、動物界の任意のメンバーを指し、これには、ヒト並びにチンパンジー及び他の類人猿及びサル種などの非ヒト霊長類、牛、羊、豚、山羊、及び馬などの家畜、犬及び猫などの家畜哺乳類、マウス、ラット、及びモルモットなどの齧歯動物を含む実験動物などが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象は、出生 ~ 2 歳、1 ~ 10 歳の範囲、又は 4 ~ 15 歳の範囲、又は 10 ~ 19 歳の範囲、又は 20 ~ 40 歳、又は 15 ~ 29 歳又は 25 ~ 55 歳の範囲、又は 40 ~ 60 歳の範囲、又は 50 歳以上又は 60 歳以上又は 65 歳以上又は 70 歳以上のヒトである。

#### 【0124】

##### AAV

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖 DNA ゲノムは、145ヌクレオチドの末端逆位配列 (ITR) を含む約 4.7 kb 長である。AAV の複数の血清型が存在する。AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は公知である。例えば、AAV 血清型 2 (AAV2) ゲノムのヌクレオチド配列は、Ruffing et al., J Gen Virol, 75:3385-3392 (1994) によって修正された Srivastava et al., J Virol, 45:555-564 (1983) に提示されている。他の例として、AAV-1 の完全ゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_002077 に提示されており、AAV-3 の完全ゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_1829 に提示されており、AAV-4 の完全ゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_001829 に提示されており、AAV-5 ゲノムは、GenBank 受入番号 AF085716 に提示されており、AAV-6 の完全ゲノムは、GenBank 受入番号 NC\_001862 に提示されており、AAV-7 及び AAV-8 のゲノムの少なくとも一部は、それぞれ、GenBank 受入番号 AX753246 及び AX753249 に提示されており (AAV-8 に関する米国特許第 7,282,199 号及び同第 7,790,449 号もまた参照されたい)、AAV-9 ゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78:6381-6388 (2004) に提示されており、AAV-10 ゲノムは、Mol. Ther., 13(1):67-76 (2006) に提示されており、AAV-11 ゲノムは、Virology, 330(2):375-383 (2004) に提示されている。AAVrh.74 血清型のクローニングは、Rodino-Klapac, et al. Journal of translati

30

40

50

onal medicine 5, 45 (2007) に記載されている。ウイルス DNA 複製 (rep)、カプシド形成/パッケージング、及び宿主細胞染色体組込みを指示する Cis 作用配列は、ITR 内に含有される。3つの AAV プロモーター (それらの相対マップ位置に対して p5、p19、及び p40 と名付けられる) は、rep 及び cap 遺伝子をコードする 2つの AAV 内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一の AAV イントロンの差別的スプライシング (例えば、AAV2 のヌクレオチド 2107 及び 2227 における) と相まって、2つの rep プロモーター (p5 及び p19) は、rep 遺伝子から 4つの rep タンパク質 (rep78、rep68、rep52、及び rep40) の産生をもたらす。Rep タンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に 10  
関与する複数の酵素特性を保有する。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、及び VP3 をコードする。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連カプシドタンパク質の産生に関与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、AAV ゲノムのマップ位置 95 に位置する。AAV のライフサイクル及び遺伝学は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992) において概説されている。

#### 【0125】

AAV は、例えば、遺伝子療法において、外来 DNA を細胞に送達するためのベクターとしてそれを魅力的にする固有の特徴を有する。培養中の細胞の AAV 感染は、非細胞変性であり、ヒト及び他の動物の自然感染は、サイレント及び無症候性である。更に、AAV は、多くの哺乳動物細胞を感染させ、インビボで多くの異なる組織を標的とする可能性を許容する。更に、AAV は、ゆっくりと分裂する細胞及び非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性な核エピソーム (染色体外エレメント) としてそれらの細胞の寿命にわたって本質的に存続することができる。AAV プロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド中のクローン化 DNA として感染性である。更に、AAV 複製、ゲノムカプシド形成及び組込みを指示するシグナルが AAV ゲノムの ITR 内に含有されるため、ゲノムの内部約 4.3 kb (複製及び構造カプシドタンパク質、rep-cap をコードする) のいくつか又は全ては、プロモーター、目的の DNA、及びポリアデニル化シグナルを含有する遺伝子カセットなどの外来 DNA と置換され得る。rep 及び cap タンパク質は、トランスで提供され得る。AAV の別の重要な特徴は、それが極めて安定した頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件 (56 ~ 65 で数時間) に容易に耐え、AAV の低温保存の重要性を低くする。AAV は、凍結乾燥され得る。最後に、AAV 感染細胞は、重複感染に耐性を示さない。

#### 【0126】

複数の研究により、筋肉における長期 (1.5 年を超える) の組換え AAV 媒介タンパク質発現が実証されている。Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659-669 (1997)、Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 14082-14087 (1996)、及び Xiao et al., J Virol, 70: 8098-8108 (1996) を参照されたい。Chao et al., Mol Ther, 2: 619-623 (2000) and Chao et al., Mol Ther, 4: 217-222 (2001) もまた参照されたい。更に、筋肉は高度に血管新生化されているため、Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804-5809 (1997)、及び Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13921-13926 (1997) に記載されているように、組換え AAV 形質導入により、筋肉内注射後の体循環において導入遺伝子産物の出現がもたらされる。更に、Lewis et al., J Virol, 76: 8769-8775 (2002) は、骨格筋線維が抗体の正しいグリコシル化、フォールディング、及び分泌に必要な細胞因子を持っていることを実証し、筋肉が分泌タンパク質治療薬を安定して発現でき 40  
50

ることを示している。

【0127】

本開示の組換えAAVゲノムは、本開示の核酸分子及び核酸分子に隣接する1つ以上のAAV ITRを含む。rAAVゲノムのAAV DNAは、AAV血清型AAV rh. 74、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh. 10、及びAAV rh. 74を含むがこれらに限定されない、組換えウイルスを誘導できる任意のAAV血清型に由来し得る。偽型rAAVの産生は、例えば、WO 01/83692に開示されている。他のタイプのrAAV変異体、例えば、カプシド変異を有するrAAVも企図される。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11):1900-1909(2014)を参照されたい。上記の背景技術の部分に記載されたように、様々なAAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野において既知である。筋肉特異的な発現を促進するために、AAV rh. 74を使用することができる。

10

【0128】

本開示のDNAプラスミドは、本開示のrAAVゲノムを含む。DNAプラスミドは、rAAVゲノムの感染性ウイルス粒子への組み立てのために、AAVのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、E1欠失アデノウイルス、又はヘルペスウイルス）の感染に許容される細胞に移される。パッケージングされるAAVゲノム、rep及びcap遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される、rAAV粒子を産生する技術は、当該技術分野において標準的である。rAAVの産生は、以下の成分、rAAVゲノム、rAAVゲノムから分離した（すなわち、その中に存在しない）AAV rep及びcap遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。AAVのrep及びcap遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型に由来してもよく、rAAVゲノムITRとは異なるAAV血清型、例えば、AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV rh. 74、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV rh. 10、AAV rh. 74、及びAAV-13を含むがこれらに限定されない血清型に由来してもよい。偽型rAAVの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO 01/83692に開示される。

20

30

【0129】

パッケージング細胞を生成する方法は、AAV粒子の産生に必要な全ての成分を安定して発現する細胞株を作製することである。例えば、AAV rep及びcap遺伝子を欠くrAAVゲノム、rAAVゲノムから分離したAAV rep及びcap遺伝子、並びにネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能なマーカーを含む、プラスミド（又は複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれる。AAVゲノムは、GCテーリング（Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含有する合成リンカーの付加（Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73）、又は直接平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666）などの手順により細菌プラスミドに導入されている。次いで、パッケージング細胞株は、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。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、rAAVの大規模産生に好適であることである。好適な方法の他の例は、rAAVゲノム及び/又はrep遺伝子及びcap遺伝子をパッケージング細胞に導入するためのプラスミドではなく、アデノウイルス又はバキュロウイルスを使用する。

40

【0130】

rAAV生産の一般原則は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539、及びMuzyc

50

zka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158: 97 - 129) に概説されている。様々なアプローチは、Rat  
schin et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984)、  
Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466 (1984)、  
Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985)、McLaughlin et al., J. Virol., 62: 1963 (1988)、及び Lebkowski et al., Mol.  
Cell. Biol., 7: 349 (1988)、Samulski et al., J. Virol., 63: 3822 - 3828 (1989)、米国特許第 5, 173, 414 号、WO 95 / 13365、並びに対応する米国特許第 5, 658, 776 号、WO 95 / 13392、WO 96 / 17947、PCT / US 98 / 18600、WO 97 / 09441 (PCT / US 96 / 14423)、WO 97 / 08298 (PCT / US 96 / 13872)、WO 97 / 21825 (PCT / US 96 / 20777)、WO 97 / 06243 (PCT / FR 96 / 01064)、WO 99 / 11764、Perrin et al. Vaccine 13: 1244 - 1250 (1995)、Paul et al. Human Gene Therapy 4: 609 - 615 (1993)、Clark et al. Gene Therapy 3: 1124 - 1132 (1996)、米国特許第 5, 786, 211 号、米国特許第 5, 871, 982 号、及び米国特許第 6, 258, 595 号に記載されている。前述の文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、rAAV 産生に関する文書の部分を特に強調する。

#### 【0131】

したがって、本開示は、感染性 rAAV を産生するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、HeLa 細胞、293 細胞、及び PerC.6 細胞（同種 293 株）などの安定して形質転換されたがん細胞であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換されたがん細胞ではない細胞、例えば、低継代 293 細胞（アデノウイルスの E1 で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、MRC-5 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、WI-38 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、Vero 細胞（サル腎細胞）、及び FRhL-2 細胞（アカゲザル胎児肺細胞）である。

#### 【0132】

本開示の組換え AAV（すなわち、感染性カプシド化 rAAV 粒子）は、rAAV ゲノムを含む。例示的な実施形態では、両方の rAAV のゲノムは、AAV の rep 及び cap の DNA を欠いており、すなわち、ゲノムの ITR 間に AAV の rep 又は cap の DNA が存在しない。本開示の核酸分子を含むように構築され得る rAAV の例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願第 PCT / US 2012 / 047999 号（WO 2013 / 016352）に記載されている。

#### 【0133】

例示的な実施形態では、本開示の組換え AAV ベクターは、AAV ベクタープラスミド scAAV.MHCK7.hSCGB、pNLRep2-Caprh74、及び pHelp を使用した三重トランスフェクション法（Xiao et al., J. Virol. 72, 2224 - 2232 (1998)）によって産生され、rAAV は、AAV 2 逆方向末端反復配列（ITR）によって隣接される hSCGB 遺伝子発現カセットを含有する。AAVrh.74 ビリオンにカプシド化されるのはこの配列である。プラスミドは、hSCGB 配列並びに遺伝子発現を駆動する筋特異的プロモーターの MHCK7 エンハンサー及びコアプロモーター要素を含有する。発現カセットには、高レベルの遺伝子発現を促進する SV40 イントロン（SD / SA）も含まれており、効率的な転写終結のためにウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルが使用される。

#### 【0134】

pNLREP2-Caprh74 は、血清型 rh74 由来の 4 つの野生型 AAV2 rep タンパク質と 3 つの野生型 AAV VP カプシドタンパク質をコードする AAV ヘルパープラスミドである。pNLREP2-Caprh74 プラスミドの概略図を、図 3 に

示す。

【0135】

pHELPAデノウイルスヘルパープラスミドは11,635bpであり、Applied Viromicsから入手した。このプラスミドには、AAV複製に重要なデノウイルスゲノムの領域、すなわちE2A、E4ORF6、及びVA RNAが含まれている(デノウイルスE1機能は293細胞によって提供される)。このプラスミドに存在するデノウイルス配列は、デノウイルスゲノムの約40%に過ぎず、デノウイルスの末端反復配列などの複製に重要なシスエレメントを含んでいない。したがって、このような生産システムから感染性デノウイルスが生成されることは予想されない。pHELPAプラスミドの概略図を図4に示す。

10

【0136】

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

【0137】

別の実施形態では、本開示は、本開示のrAAVを含む組成物を企図する。本開示の組成物は、rAAV及び薬学的に許容される担体を含む。本組成物は、希釈剤及びアジュバントなどの他の成分も含み得る。許容される担体、希釈剤、及びアジュバントは、レシピエントに対して無毒であり、好ましくは、採用された投薬量及び濃度で不活性であり、緩衝液及びブルロニック(登録商標)などの界面活性剤を含む。

20

【0138】

本開示の方法で投与されるrAAVの力価は、例えば、特定のrAAV、投与モード、治療目標、標的化された個体、及び細胞型に応じて異なり、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。rAAVの力価は、1ml当たり、約 $1 \times 10^6$ 、約 $1 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^8$ 、約 $1 \times 10^9$ 、約 $1 \times 10^{10}$ 、約 $1 \times 10^{11}$ 、約 $1 \times 10^{12}$ 、約 $1 \times 10^{13}$ 、約 $1 \times 10^{14}$ から、又はそれ以上のDNase耐性粒子(DRP)の範囲であってもよい。投薬量は、ウイルスゲノム(vg)の単位で表されてもよい。カプセル化されたベクターゲノム力価を決定する1つの例示的な方法は、(Pozsgai et al., Mol. Ther. 25(4):855-869, 2017)に記載されている方法などの定量的PCRを使用する。特に記載されない限り、本明細書に記載の投与量は、スーパーコイルDNA標準によって決定される用量に対応する。

30

【0139】

インビボ又はインビトロで、rAAVで標的細胞を形質導入する方法が、本開示によって企図される。インビボ方法は、有効用量又は有効複数回用量の本開示のrAAVを含む組成物を、それを必要とする動物(人間を含む)に投与するステップを含む。用量が、障害/疾患の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が、障害/疾患の発症後に投与される場合、投与は治療的である。本開示の実施形態では、有効用量は、治療される障害/疾患状態と関連する少なくとも1つの症状を緩和(排除若しくは低減)し、障害/疾患状態への進行を遅延若しくは予防し、障害/疾患状態の進行を遅延若しくは予防し、疾患の程度を軽減し、疾患の寛解(部分若しくは完全)をもたらす、かつ/又は生存を延長する用量である。本開示の方法による予防又は治療のために企図される疾患の一例は、筋ジストロフィー、例えば、肢帯型筋ジストロフィー又はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

40

【0140】

併用療法も本開示によって企図される。本明細書で使用される組み合わせは、同時治療及び逐次的治療の両方を含む。新規の療法との併用など、本開示の方法と標準の医学的治

50

療（例えば、コルチコステロイド）との併用が特に企図される。

【0141】

有効用量の組成物、併用療法又は製剤の投与は、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、鼻、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、又は膈を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で標準的な経路によるものであり得る。本開示の r A A V の A A V 成分（具体的には、A A V I T R 及びカプシドタンパク質）の投与経路及び血清型は、治療される感染症及び／又は疾患状態、並びに h S C G B タンパク質を発現する標的細胞／組織を考慮して、当業者によって選択及び／又は適合され得る。

【0142】

本開示は、本開示の r A A V、製剤、及び組成物の有効用量の局所投与及び全身投与を提供する。例えば、全身投与とは、全身が影響を受けるように循環系に投与することである。全身投与には、消化管を通した吸収などの経腸投与、及び注射、注入、又は移植を通した非経口投与が含まれる。

【0143】

特に、本開示の r A A V の実際の投与は、r A A V 組換えベクターを動物の標的組織に輸送する任意の物理的方法を使用することによって達成され得る。本開示による投与には、筋肉への注射及び血流への注射が含まれるが、これらに限定されない。リン酸緩衝生理食塩水中に r A A V を単に再懸濁させることが、筋肉組織発現に有用なピヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、r A A V と同時投与され得る担体又は他の成分に対する既知の制限はない（が、DNA を分解する組成物が r A A V との通常の様式で避けられるべきである）。r A A V のカプシドタンパク質は、r A A V が筋肉などの目的の特定の標的組織に標的化されるように修飾されてもよい。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる W O 0 2 / 0 5 3 7 0 3 を参照されたい。医薬組成物は、注射可能な製剤として、又は経皮輸送により筋肉に送達される局所製剤として調製することができる。筋肉内注射及び経皮輸送の両方のための多数の製剤が先行して開発されており、本開示を実施する際に使用され得る。r A A V は、投与及び取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用することができる。

【0144】

筋肉内注射を目的として、ゴマ油若しくは落花生油などのアジュバント溶液、又は水性プロピレングリコール溶液、及び滅菌水溶液を用いることができる。そのような水溶液は、必要に応じて緩衝化することができ、液体希釈剤は最初に生理食塩水又はグルコースで等張にされる。遊離酸（DNA は酸性リン酸基を含む）又は薬理学的に許容される塩としての r A A V の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合した水で調製することができる。r A A V の分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中で、並びに油中で調製することができる。通常の保存状態及び使用下においては、これらの製剤は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。これに関連して、用いられる滅菌水性媒体は全て、当業者に周知の標準的な技術により容易に入手可能である。

【0145】

注射用途に好適な薬学的な担体、希釈剤、又は賦形剤には、滅菌水溶液又は分散液、及び滅菌注射溶液又は分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、形態は滅菌でなければならず、容易な注射器使用可能性が存在する程度に流動性でなければならない。形態は、製造及び保管の条件下で安定していなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、及び植物油を含む溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散剤の場合には必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらすことができる。多く

10

20

30

40

50

の場合、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長時間の吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用によってもたらされ得る。

#### 【0146】

滅菌されている注射可能な溶液は、必要な量の rAAV を適切な溶媒に、必要に応じて上に列挙した他の様々な成分とともに組み込み、その後濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散液は滅菌した活性成分を、基礎的な分散媒及び上に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルへと混合することによって調製される。滅菌されている注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技術であり、それは、活性成分プラス予め滅菌濾過したそれらの溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす。

10

#### 【0147】

rAAV による形質導入は、インビトロで行うこともできる。一実施形態では、所望の標的筋肉細胞を対象から取り出し、rAAV で形質導入し、対象に再導入する。代替的に、同系又は異種の筋肉細胞は、それらの細胞が対象において不適切な免疫応答を生成しない場合に使用され得る。

#### 【0148】

対象への形質導入及び形質導入細胞の再導入のための好適な方法は、当該技術分野で既知である。一実施形態では、細胞は、例えば適切な培地で rAAV を筋肉細胞と組み合わせ、サザンブロット及び / 又は PCR などの従来の技術を使用して、又は選択可能なマーカーを使用して目的の DNA を持つ細胞をスクリーニングすることにより、インビトロで形質導入することができる。次に、形質導入された細胞を医薬組成物に製剤化し、組成物を、筋肉内、静脈内、皮下、及び腹腔内注射による、又は例えばカテーテルを使用して平滑筋及び心筋への注射によるなど、様々な技術により対象に導入することができる。

20

#### 【0149】

本開示の rAAV による細胞の形質導入は、hSCGB タンパク質の持続的発現をもたらす。よって、本開示は、hSCGB タンパク質を発現する rAAV を動物、好ましくはヒトに投与 / 送達する方法を提供する。これらの方法には、本開示の 1 つ以上の rAAV で組織（筋肉などの組織、肝臓及び脳などの臓器、並びに唾液腺などの腺を含むが、これらに限定されない）を形質導入することが含まれる。形質導入は、組織特異的制御エレメントを含む遺伝子カセットで行われ得る。例えば、本開示の一実施形態は、限定されないが、アクチン及びミオシン遺伝子ファミリー、例えば、myoD 遺伝子ファミリーに由来するもの（Weintraub et al., Science, 251: 761 - 766 (1991) を参照されたい）、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 MEF-2（Cserjesi and Olson, Mol. Cell. Biol., 11: 4854 - 4862 (1991)）、ヒト骨格筋アクチン遺伝子に由来する制御要素（Muscat et al., Mol. Cell. Biol., 7: 4089 - 4099 (1987)）、心臓アクチン遺伝子に由来する制御要素、筋クレアチンキナーゼ配列要素（Johnson et al., Mol. Cell. Biol., 9: 3393 - 3399 (1989) を参照されたい）、並びにマウスクレアチンキナーゼエンハンサー（mCK）要素、骨格速筋トロポニン C 遺伝子、遅筋心臓トロポニン C 遺伝子、及び遅筋トロポニン I 遺伝子に由来する制御要素、低酸素誘発性核内因子結合要素（Semenza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5680 - 5684 (1991)）、グルココルチコイド応答要素（GRE）を含む、ステロイド誘発性要素及びプロモーター（Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603 - 5607 (1993) を参照されたい）、並びに他の制御要素を含む、筋特異的制御要素によって指示される筋細胞及び筋肉組織を形質導入する方法を提供する。

30

40

#### 【0150】

筋肉組織は生命維持に必須な臓器ではなく、アクセスしやすいため、インビボ DNA 送

50



達の魅力的な標的である。本開示は、形質導入筋原線維由来の h S C G B の持続発現を企図する。

【 0 1 5 1 】

よって、本開示は、h S C G B をコードする r A A V の有効用量（又は本質的に同時に投与される用量若しくは間隔を置いて投与される用量）を、それを必要とする対象に投与する方法を提供する。

【 0 1 5 2 】

本発明の方法で投与される r A A V の力価は、例えば、特定の r A A V、投与方法、処置目標、個体、及び標的とされる細胞型に応じて変化し、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。r A A V の力価は、1 m L 当たり約  $1 \times 10^6$ 、約  $1 \times 10^7$ 、約  $1 \times 10^8$ 、約  $1 \times 10^9$ 、約  $1 \times 10^{10}$ 、約  $1 \times 10^{11}$ 、約  $1 \times 10^{12}$ 、約  $1 \times 10^{13}$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  以上の D N a s e 耐性粒子 ( D R P ) の範囲であり得る。投薬量は、ウイルスゲノム ( v g ) の単位で表されてもよい。r A A V の力価は、スーパーコイルプラスミド定量標準又は線状化プラスミド定量標準によって決定されてもよい。

【 0 1 5 3 】

インビボ又はインビトロで、標的細胞に r A A V を形質導入する方法が、本発明によって企図される。インビボ方法は、本発明の r A A V を含む組成物の有効用量又は有効な複数用量を、それを必要とする動物（ヒトを含む）に投与するステップを含む。用量が、障害 / 疾患の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が、障害 / 疾患の発症後に投与される場合、投与は治療的である。本発明の実施形態では、有効用量は、治療すべき障害 / 疾患の状態に関連する少なくとも 1 つの症状を緩和（排除若しくは軽減）する用量であり、障害 / 疾患の状態への進行を緩徐化若しくは予防する用量であり、疾患の範囲を縮小する用量であり、疾患の寛解（部分的若しくは完全な）をもたらす用量であり、並びに / 又は生存を延長させる用量である。本発明の方法による予防又は治療のために企図される疾患の例は、筋ジストロフィー、例えば肢帯型筋ジストロフィーである。よって、提供されるのは、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、r A A V s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C B で標的細胞を形質導入する方法である。

【 0 1 5 4 】

併用療法も本発明により企図される。本明細書で使用される併用療法は、同時治療又は連続治療を含む。本発明の方法と標準的な医学的治療（例えば、ステロイド、コルチコステロイド、及び / 又は限定されないがプレドニゾン、プレドニゾロン、及びデフラザコートのうちの 1 つ以上を含むグルココルチコイド）との組み合わせは、新規療法との組み合わせと同様に、具体的に企図される。この観点で、この組み合わせは、本発明の方法の r A A V を対象に投与する前に、r A A V を対象に投与すると同時に、又は r A A V を対象に投与した後に、1 つ以上のステロイド、コルチコステロイド、及び / 又は限定されないがプレドニゾン、プレドニゾロン、及びデフラザコートのうちの 1 つ以上を含むグルココルチコイドを対象に投与することを含む。

【 0 1 5 5 】

本発明によって企図される併用療法の関連する実施形態では、グルココルチコイドとしては、限定されないが、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ブデソニド、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、又はトリアムシノロンが挙げられる。

【 0 1 5 6 】

抗原特異的 T 細胞応答は、r A A V ベクターを投与された対象で起こり得ることが認識されている。これは、遺伝子移入後 2 ~ 4 週間で予想される応答である。このような抗原特異的 T 細胞応答に対する 1 つの考えられる結果は、形質導入された細胞のクリアランス及び導入遺伝子発現の喪失である。r A A V ベースの治療に対する宿主の免疫応答を弱めるために、治療前、例えば治療手順の 2 4 時間前に、対象は、およそ 1 m g / k g / 日の経口による予防的プレドニゾン又は同等のグルココルチコイドから始め、最大用量 6 0 m g / 日で投与することができる。必要に応じて、同等のグルココルチコイドをおよそ 1 m

10

20

30

40

50

g / k g / 日の用量で静脈内投与することも可能である。治療は、およそ1ヶ月続く。プレゾニゾン又は同等のグルココルチコイドの量を漸減させるプロトコルを、個々の対象の遺伝子移入に対する免疫応答に基づいて実施し、E L I S p o t アッセイによって、またG G T による肝機能モニタリングによって評価することができる。

#### 【0157】

r A A V ベクターの治療有効量は、約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $2 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $4 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $6 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $7 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $8 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $9 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $2 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $3 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  ~ 約  $4 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $4 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $6 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $7 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $8 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $9 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $2 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $3 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  ~ 約  $4 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $6 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $7 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $8 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $9 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $2 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $3 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  ~ 約  $4 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g ~ 約  $2 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g ~ 約  $3 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{14}$  ~ 約  $4 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{14}$  v g / k g、 $6 \times 10^{14}$  v g / k g、 $7 \times 10^{14}$  v g / k g、 $8 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $9 \times 10^{14}$  v g / k g の範囲の r A A V の用量である。本発明はまた、これらの範囲の r A A V ベクターを含む組成物も含む。

#### 【0158】

例えば、r A A V ベクターの治療有効量は、 $1 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $2 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $4 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $6 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $7 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $7.4 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $8 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $9 \times 10^{13}$  v g / k g、約  $1 \times 10^{14}$  v g / k g、約  $2 \times 10^{14}$  v g / k g、約  $3 \times 10^{14}$  v g / k g、約  $4 \times 10^{14}$  v g / k g 及び  $5 \times 10^{14}$  v g / k g の用量である。A A V ベクターの力価又は投薬量は、定量標準としてのプラスミドDNAの物理的形態に基づいて変化し得る。例えば、力価又は投薬量の値は、スーパーコイル標準 q P C R 力価測定法又は線状標準 q P C R 力価測定法に基づいて変化し得る。一実施形態では、治療有効量の r A A V は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて  $5 \times 10^{13}$  v g / k g の用量、又は定量標準としての線状化プラスミドに基づいて  $1.85 \times 10^{13}$  v g / k g の用量である。別の実施形態では、治療有効量の r A A V は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて  $2 \times 10^{14}$  v g / k g の用量、又は定量標準としての線状化プラスミドに基づいて  $7.41 \times 10^{13}$  v g / k g の用量である。別の実施形態では、治療有効量の s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C B は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{14}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $2 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $3 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $4 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $5 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $6 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $7 \times 10^{13}$  v g / k g、又は約  $1 \times 10^{13}$  v g / k g ~ 約  $8 \times 10^{13}$  v g / k g

、又は約  $1 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $9 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $1 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $1 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $1 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $2 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は  $1 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $3 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $1 \text{ e } 13 \sim$  約  $4 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $4 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $6 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $7 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $8 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $9 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $1 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $2 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $3 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \sim$  約  $4 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $3 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $5 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $6 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $7 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $8 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $9 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $1 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $2 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $3 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \sim$  約  $4 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $5 \text{ e } 13 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $5 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $1 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $2 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は  $1 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $3 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $1 \text{ e } 14 \sim$  約  $4 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は約  $1 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g } \sim$  約  $5 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、 $6 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、 $7 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、 $8 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$ 、又は  $9 \text{ e } 14 \text{ v g } / \text{ k g}$  の範囲の用量である。本発明はまた、これらの用量の  $r A A V$  ベクターを含む組成物も含む。

10

20

【0159】

有効用量の組成物の投与は、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、鼻、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、又は膣を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で標準的な経路によるものであり得る。本発明の  $r A A V$  の  $A A V$  成分（具体的には、 $A A V$   $I T R$  及びカプシドタンパク質）の投与経路及び血清型は、治療される感染症及び／又は疾患状態、並びに - サルコグリカンを発現する標的細胞／組織を考慮して、当業者によって選択及び／又は適合され得る。

【0160】

本発明は、本発明の  $r A A V$  及び組成物の有効用量の局所投与及び全身投与を提供する。例えば、全身投与とは、全身が影響を受けるように循環系に投与することである。全身投与には、胃腸管を通した吸収のような経腸投与及び注射、注入、又は移植による非経口投与が含まれる。

30

【0161】

特に、本発明の  $r A A V$  の実際の投与は、 $r A A V$  組換えベクターを動物の標的組織に輸送する任意の物理的方法を使用することにより達成され得る。本発明による投与としては、筋肉内への注入、血流への注入、及び／又は肝臓への直接注入が挙げられるが、これらに限定されない。リン酸緩衝生理食塩水中に  $r A A V$  を単に再懸濁させることが、筋肉組織発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが実証されており、 $r A A V$  と同時投与され得る担体又は他の成分に対する既知の制限はない（が、 $D N A$  を分解する組成物が  $r A A V$  との通常の方法で避けられるべきである）。 $r A A V$  のカプシドタンパク質は、 $r A A V$  が筋肉などの目的の特定の標的組織に標的化されるように修飾されてもよい。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる  $W O 02 / 053703$  を参照されたい。

40

【0162】

医薬組成物は、注射可能な製剤として、又は経皮輸送により筋肉に送達される局所製剤として調製することができる。筋肉内注射及び経皮輸送の両方のための多数の製剤がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用することができる。 $r A A V$  は、投与及び取り扱いを容易にするために、任意の薬学的に許容される担体とともに使用することができる。したがって、別の態様では、本出願は、 $A A V r h 74$  由来のカプシドを含む  $r A A V$  と、緩衝剤と、イオン強度剤と、界面活性剤と、を含む製剤に関する。一実施形態では、 $r A A V$  は、約  $1.0 \times 10^{12} \text{ v g } / \text{ m l } \sim$  約  $5.0 \times 10^{14} \text{ v g } / \text{ m l }$  の

50

濃度である。別の実施形態では、 $rAAV$ は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて、約  $5.0 \times 10^{12} \text{ vg/ml}$  ~ 約  $1.0 \times 10^{14} \text{ vg/ml}$  の濃度である。別の実施形態では、 $rAAV$ は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて、約  $2.0 \times 10^{13} \text{ vg/ml}$  の濃度である。一実施形態では、 $rAAV$ は、 $scAAVrh74.MHCK7.hSGCB$  ベクターである。一実施形態では、組成物又は製剤中の  $rAAV$  の濃度は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて、 $1 \times 10^{13} \text{ vg/ml}$  ~  $2 \times 10^{14} \text{ vg/ml}$  である。別の実施形態では、濃度は、定量標準としてのスーパーコイルプラスミドに基づいて、 $2 \times 10^{13} \text{ vg/ml}$ 、 $4 \times 10^{13} \text{ vg/ml}$ 、又は  $5 \times 10^{13} \text{ vg/ml}$  である。一実施形態では、緩衝剤は、トリス、トリシン、ビス-トリシン、HEPES、MOPS、TES、TAPS、PIPES、及びCAPSのうちの1つ以上を含む。別の実施形態では、緩衝剤は、約  $5 \text{ mM}$  ~ 約  $40 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{pH } 8.0$  のトリスを含む。一実施形態では、緩衝剤は、約  $20 \text{ mM}$  で  $\text{pH } 8.0$  のトリスを含む。一実施形態では、イオン強度剤は、塩化カリウム ( $\text{KCl}$ )、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、酢酸アンモニウム、塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ )、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン ( $\text{MnCl}_2$ )、酢酸マンガン、硫酸マンガン、塩化ナトリウム ( $\text{NaCl}$ )、酢酸ナトリウム、塩化リチウム ( $\text{LiCl}$ )、及び酢酸リチウムのうちの1つ以上を含む。一実施形態では、イオン強度剤は、約  $0.2 \text{ mM}$  ~ 約  $4 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{MgCl}_2$  を含む。別の実施形態では、イオン強度剤は、約  $50 \text{ mM}$  ~ 約  $500 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{NaCl}$  を含む。別の実施形態では、イオン強度剤は、約  $0.2 \text{ mM}$  ~ 約  $4 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{MgCl}_2$  を含む。別の実施形態では、イオン強度剤は、約  $50 \text{ mM}$  ~ 約  $500 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{NaCl}$  を含む。別の実施形態では、イオン強度剤は、約  $1 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{MgCl}_2$  を含む。別の実施形態では、イオン強度剤は、約  $200 \text{ mM}$  の濃度で  $\text{NaCl}$  を含む。一実施形態では、界面活性剤は、スルホネート、サルフェート、ホスホネート、ホスフェート、ポロキサマー、及びカチオン性界面活性剤のうちの1つ以上を含む。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー124、ポロキサマー181、ポロキサマー184、ポロキサマー188、ポロキサマー237、ポロキサマー331、ポロキサマー338、及びポロキサマー407のうちの1つ以上を含む。一実施形態では、界面活性剤は、約  $0.00001\%$  ~ 約  $1\%$  の濃度でポロキサマーを含む。別の実施形態では、界面活性剤は、約  $0.001\%$  の濃度でポロキサマー188を含む。筋肉内注射を目的として、ゴマ油若しくは落花生油などのアジュバント溶液、又は水性プロピレングリコール溶液、及び滅菌水溶液を使用することができる。そのような水溶液は、必要に応じて緩衝化することができ、液体希釈剤は最初に生理食塩水又はグルコースで等張にされる。遊離酸 ( $\text{DNA}$  は酸性リン酸基を含む) 又は薬理学的に許容される塩としての  $rAAV$  の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合した水で調製することができる。 $rAAV$  の分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中で、並びに油中で調製することができる。通常の保存状態及び使用下においては、これらの製剤は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。これに関連して、用いられる滅菌水性媒体は全て、当業者に周知の標準的な技術により容易に入手可能である。

#### 【0163】

したがって、本明細書では、有効用量（又は本質的に同時に投与される用量若しくはある間隔で与えられる用量）の、 $rAAV$  をコードする  $rAAV$  を、それを必要とする哺乳動物の対象に投与する方法も記載される。

#### 【0164】

本明細書で言及される全ての刊行物及び特許は、各個々の刊行物又は特許が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されているかのように、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、本出願が、本明細書中のいかなる定義も含み、優先される。

#### 【0165】

本発明は、以下の実施例において更に説明され、これは特許請求の範囲に記載される本

発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0166】

s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C B を使用した前臨床試験は、国際特許公開第 2 0 1 7 / 1 8 0 9 7 6 号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0167】

実施例 1

s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C B の構築

図 1 に示すコドン最適化された全長ヒト S C G B c D N A を含有する導入遺伝子カセットを構築した。カセットは、コンセンサス K o z a k 配列 ( C C A C C )、S V 4 0 キメライントロン、合成ポリアデニル化部位、及びカセットの発現を駆動するのに使用される筋特異的 M H C K 7 を含む。これは、近位プロモーターを有する内因性筋クレアチンキナーゼ遺伝子 ( e n h 3 5 8 M C K、5 8 4 b p ) 内の転写開始部位の約 1 . 2 k b の 5 ' から採取した 2 0 6 b p エンハンサーを利用する M C K ベースのプロモーターである。カセットを、A A V 8 に対して 9 3 % 相同である自己相補的 ( s c ) A A V r h . 7 4 ベクターにパッケージングした。A A V r h . 7 4 は、マウス及び非ヒト霊長類において、特に、循環によって筋肉に送達される場合に血液関門を通過する際に、安全かつ効果的であることが示されている。( Ch i c o i n e e t a l . , M o l T h e r 2 0 1 4 ; 2 2 : 7 1 3 - 7 2 4 . , R o d i n o - K l a p a c e t a l . , M o l T h e r 2 0 1 0 ; 1 8 : 1 0 9 - 1 1 7 , Ch i c o i n e e t a l . , M o l T h e r 2 0 1 4 ; 2 2 : 3 3 8 - 3 4 7 )

【0168】

一本鎖 A A V ベクター ( s s A A V ) は、核に入ると、複製及び転写の準備が整う前に、第 2 の鎖の細胞媒介性合成を必要とする。例示的な自己相補的 A A V ベクター ( s c A A V ) は、図 1 に示される構造及び図 2 に提供されるアノテーションが付与されたヌクレオチド配列を有し、以下の表に記載される。s c A A V が s s A A V において必要とされる第 2 鎖の細胞合成の律速段階を迂回するので、この s c A A V は、遺伝子療法において s s A A V よりも優れている。

10

20

30

40

50

【表 2】

scAAVrh.74.MHCK7.hSCGB の分子的特徴				
タイプ	開始	終了	名称	説明
領域	1	130	3' ITR	自己相補的配列 3'逆方向末端反復
領域	27	69	ヘアピン	3'ITR 内のヘアピン
領域	204	255	ポリ A	自己相補的配列ポリ A
遺伝子	262	1218	hSCGB cDNA	自己相補的 hSCGB cDNA
領域	1228	1375	キメライントロン	ヒト $\beta$ -グロビン遺伝子の 5'供与部位と IgG 重鎖可変領域の分岐点及び 3'スプライス受容部位
領域	1385	2176	MHCK7	自己相補的マウスミオシン重鎖複合体-E ボックス筋肉クレアチンキナーゼ融合エンハンサー/プロモーター
領域	2194	2318	5' ITR	5' ITR
遺伝子	2336	3127	MHCK7	自己相補的マウスミオシン重鎖複合体-E ボックス筋肉クレアチンキナーゼ融合エンハンサー/プロモーター
領域	3137	3284	キメライントロン	ヒト $\beta$ -グロビン遺伝子の 5'供与部位と IgG 重鎖可変領域の分岐点及び 3'スプライス受容部位
遺伝子	3294	4250	hSCGB cDNA	hSCGB cDNA
領域	4257	4309	ポリ A	ポリ A
領域	4382	4511	3' ITR	3' ITR

10

20

## 【 0 1 6 9 】

## 実施例 2

## L G M D 2 E 非盲検試験

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . S G C B で治療された 6 人の患者は、堅牢な標的組織形質導入及び導入遺伝子発現（上腕二頭筋、T A）（図 3）、並びに複数の外来臨床転帰測定値の改善による臨床的有効性を示した。この臨床用量漸増試験では、2 つの用量コホート（各々  $n = 3$  患者を含む）を評価し、患者は、r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . S G C B（本明細書では「SRP - 9 0 0 3」と呼ばれる）を  $1.85 \times 10^{13} \text{ vg / kg}$  及び  $7.41 \times 10^{13} \text{ vg / kg}$  の用量で静脈内注入を介して受けた。 $1.85 \times 10^{13} \text{ vg / kg}$  の投与量は、 $5 \times 10^{13} \text{ vg / kg}$  のそのスーパーコイル参照 DNA 同等物での線状参照プラスミド DNA qPCR を使用した qPCR によって測定した。 $7.41 \times 10^{13} \text{ vg / kg}$  は、 $2 \times 10^{14} \text{ vg / kg}$  のそのスーパーコイル参照 DNA 同等物での線状参照プラスミド DNA qPCR を使用した qPCR によって測定した。

30

## 【 0 1 7 0 】

表 1 に示されるように、標的組織形質導入（核当たりのベクターゲノムコピーとして測定される）及び - S G タンパク質のパーセント（平均 - サルコグリカン陽性線維パーセント（P S G P F）の免疫蛍光、及び平均蛍光発現パーセント（P F E）の免疫蛍光、及びウエスタンブロットによる総タンパク質発現として測定される）の両方の用量依存的な増加が観察された。更に、 $1.84 \times 10^{13} \text{ vg / kg}$  で治療され、2 年目の生検が最近得られたコホート 1 患者では、- S G の発現は、60 日目～2 年目に高レベルで維持された。

40

## 【表 3】

表 1 : qPCR、免疫蛍光、及びウエスタンブロット法によって測定された、移植後 60 日目及び 2 年目の rAAVrh74.MHCK7.SGCB の生物学的活性

コホート	コホート 1 (1.85×10 <sup>13</sup> vg/kg)				コホート 2 (7.41×10 <sup>13</sup> vg/kg)			
患者番号	E01	E02	E03	平均	E04	E05	E07	平均
60 日目の遺伝子発現評価								
平均 vg コピー/核	1.05	0.44	0.27	0.60	4.02	7.15	1.57	4.2
免疫蛍光: 平均 pβSGPF	63%	49%	42%	51%	65%	77%	75%	72%
免疫蛍光: 平均 PFE	47%	57%	38%	47%	55%	67%	97%	73%
ウエスタンブロット: 正常% <sup>a</sup>	35%	39%	35%	36%	53%	63%	70%	62%
2 年目の遺伝子発現評価								
平均 vg コピー/核	0.12	0.08	0.20	0.13	-	-	-	-
免疫蛍光: 平均 pβSGPF	22%	61%	60%	48%	-	-	-	-
免疫蛍光: 平均 PFE	9%	51%	46%	35%	-	-	-	-
ウエスタンブロット: 正常% <sup>a</sup>	37%	69%	56%	54%	-	-	-	-

pβSGPF=β-サルコグリカン陽性線維パーセント、PFE=蛍光発現パーセント、qPCR=定量的ポリメラーゼ連鎖反応、vg=ベクターゲノム。

データは、前脛骨筋及び上腕二頭筋を含む。

<sup>a</sup> 正常のパーセンテージとして示される。平均野生型 β-サルコグリカン発現として定義される正常対照(n=3)。

10

## 【0 1 7 1】

ベータ - サルコグリカン (SGCB) タンパク質の欠乏は、膜からの他のサルコグリカンサブユニットの低減又は完全な喪失につながる。SRP - 9003 の投与後、SGCB 発現の再構成は、- サルコグリカン (SGCD) 及び - サルコグリカン (SGCG) 発現の増加をもたらした (図 4)。他のサルコグリカンの発現及び - SG の筋細胞膜への局在化 (SGCB 陽性線維パーセント及び線維強度によって測定される) の同時増加は、rAAVrh74.MHCK7.SGCB によって誘導された SGCB 発現が、天然 SCGB タンパク質に期待されるように、機能的であり、筋細胞内に正しく局在したことを示す。

## 【0 1 7 2】

上昇した CK レベルは、疾患期間と統計的に有意に逆相関し (Sempli c i n i 2015)、コホート 1 の患者においてベースラインで観察されるものなどの、CK の著しい上昇が、筋肉劣化の活性プロセス (すなわち、永久劣化前の活動性疾患) を意味することを示す。SRP - 9003 での全身遺伝子導入は、平均 CK レベルの早期かつ大幅な低減をもたらし、これは 750 日目の評価で維持された (74%) (図 5)。

## 【0 1 7 3】

rAAVrh74.MHCK7.SGCB で治療された患者は、1 年目及び 2 年目の間のジスフェルリン異常症のノースター評価 (NSAD) を含む複数の機能運動評価及び時限機能検査において臨床的に意味のある改善を示した (図 6 及び表 2)。両方のコホートにおける機能的改善は、合計 NSAD スコアにおける 2 つの用量コホートにわたる全体的な 5 ポイントの改善によって最も印象的に認められた。重要なことには、治療された患者において観察された改善は、2 年目の終わりで持続された。

20

30

40

## 【表 4】

表 2 時限機能検査におけるベースラインに対する改善

ベースラインからの 平均変化 (秒)	コホート 1 ( $1.85 \times 10^{13}$ vg/kg)			コホート 2 ( $7.41 \times 10^{13}$ vg/kg)	
	6 ヶ月目	12 ヶ月目	24 ヶ月目	6 ヶ月目	12 ヶ月目
起き上がるまでの 時間	-0.2	-0.8	-0.6	-1.3	-1.1
4 段昇降	-0.5	-0.5	-0.3	-0.4	-0.4
100m	-3.8	-5.3	-2.8	-6.3	-7.9
10m	-0.6	-0.6	-0.2	-0.6	-0.6

10

## 【0174】

## 実施例 3

## 自然経過試験

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . S G C B 試験において治療患者との比較のために「自然経過」対照コホートにおける患者を選択するために、非盲検臨床試験の予め定義された選択基準と同じ、以下の基準を「自然経過」データセットに適用した：

20

L G M D 2 E / R 4 外来患者のみに制限される。このコホートについて、それは 1 0 M W R 値が欠損していないものとして定義された。

4 歳 ~ 1 5 歳のベースライン年齢

1 0 0 M W R 試験結果：年齢、身長、性別、及び体重について予測された結果の 4 0 % 以上が健康な対照と一致した

## 【0175】

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . S G C B ( S R P - 9 0 0 3 ) 治療患者の自然経過コンパレータを導き出すために「自然経過」データベース全体に適用される基準に関して、3 5 人の患者の全体的なデータセットから、これらの基準を満たす 5 人の対照患者が特定された。治療コホートと自然経過コホートとの間のベースラインを表 3 で比較する。年齢及び性別は、r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . S G C B 治療対象と「自然経過」対照コホートとの間で十分にバランスがとれている。特に、ベースライン機能的エンドポイントスコアは、N C H 対照コホートにおいてより高い。

30

## 【表 5】

表 3：SRP-9003 治療患者の自然経過コホートとのベースライン比較

	SRP-9003-101 (N=6)	NCH (N=5)
男性、n (%)	3 (50)	3 (60)
年齢 (歳)	10.0 (3.5)	9.8 (3.2)
NSAD	41.2 (3.7)	49.0 (3.9)
100m (秒)	51.4 (10.5)	38.9 (3.9)
10m (秒)	5.1 (0.9)	4.4 (0.3) <sup>a</sup>

40

## 【0176】

r A A V r h 7 4 . M H C K 7 . S G C B の投与後、「自然経過」対照コホートにおけ

50



る下降傾向と比較して、遺伝子療法で治療された対象において全体的な改善が観察された（図7）。個々の対象のNSADスコアのベースラインからの変化は、NH = 自然経過、NSAD = ジスフェルリン異常症のノーススター評価、SD = 標準偏差で提供される。SRP-9003で治療された患者は、NSADによって測定された、LGMD2E/R4自然経過コホートとの探索的比較において、機能的転帰において臨床的に意味のある改善を示した。

#### 【0177】

rAAVrh74.MHCK7.SGCBの安全性及び忍容性は、コホート1については18ヶ月目まで、コホート2については6ヶ月目までの各来院時の有害事象、身体検査、バイタルサイン、血清及び尿検査結果、並びに免疫原性を評価することによって決定した。両方のコホートでは、安全性の懸念を示す他の検査異常はなかった。正常範囲外の血小板数の減少は観察されなかった。補体活性化に関連する臨床的後遺症はなかった。結果は、新しい安全性シグナルを示さず、全ての治療関連AEは、早期に発生し、一過性及び管理可能であった。

#### 参考文献：

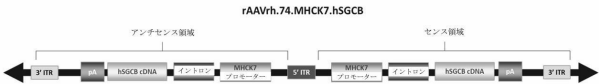
- 1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266 - 273. 20
- 2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 995 - 1003.
- 3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1589 - 1598. 30
- 4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000; 5: 141 - 151.
- 5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1953 - 1961. 40
- 6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176 - 179.
- 7 Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic p 50

- rospects. *Exp Rev Mol Med* 2009;11:e28.
- 8 Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromusc Disord* 2003;13:303-309.
- 9 Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2008;65:1196-1201.
- 10 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999;22:473-479.
- 11 Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2014;83:1453-1463.
- 12 Wong-Kissiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. *Neuromusc Disord* 2010;20:122-124.
- 13 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnani R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* 2000;37:102-107.
- 14 Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. *Cell Tissue Res* 2014;356:427-443.
- 15 McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 2003;10:2112-2118.
- 16 McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001;8:1248-1254.

- 17 Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. *Mol Ther* 2014; 22: 713 - 724.
- 18 Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged microdystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 2010; 18: 109 - 117. 10
- 19 Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 2007; 5: 45. 20
- 20 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 1489 - 1499.
- 21 Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* 2014; 22: 338 - 347. 30
- 22 Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995; 118: 959 - 964.
- 23 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139: 375 - 385. 40
- 24 Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015; 23: 192 - 201.
- 25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E et al. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum* 50

- Gene Ther 2002;13:1631-1646.
- 26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. Neurology 2008;71:240-247.
- 27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. Mol Cell Biol 1996;16:5058-5068.
- 28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. J Virol 2002;76:791-801.
- 29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc 2006;1:1412-1428.
- 30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. Hum Gene Ther 1999;10:1031-1039.
- 31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. Mol Ther 2005;11:245-256.
- 32 Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-month-old mdx mice. J Appl Physiol 2011;110:1656-1663.
- 33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szeghyarto CA, Maiti B, Findlay A et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. Nat Med 2014;20:992-1000.

【図面】  
【図 1】



【図 2 A - 1】

長さ:4511 (配列番号 1)  
3' ITR (5' 配列番号 8、3' 配列番号 15)  
ポリ A (5' 配列番号 6、3' 配列番号 14)  
ペーダー-サルコグリカン cDNA 配列 (5' 配列番号 11、3' 配列番号 2)  
キメライントロン配列 (5' 配列番号 4、3' 配列番号 2)  
MHCK7 (5' 配列番号 5、3' 配列番号 13)  
5' ITR (配列番号 7)  
ヘアピン (配列番号 10)

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGC**CGCC** **CGGGCAAAGC** **CCGGCGGTGC**  
51 **GGCGACCTTT** **GGTCGCCCG** CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG  
101 GAGTGGCCAA CTCCATCACT AGGGGTTCTT TGTAGTTAAT GATTAACCCG  
151 CCATGCTACT TATCTACGTA GCCATGCTCT AGAGGCGCGC CCCTGCAGGA  
201 CACACAAAA ACCAACACAC AGATCTAATG AAAATAAAG TCTTTTATTG  
251 CGGCCAAGCT TTTAATGAGT ATTCCCACAA GGGTTATCGC TAATCTGACA  
301 TCCCATATTC TGGCTGGTGA CCTGCACCTT AAACAGGGTG CCATCGGCAC  
351 ACATGCACAG CTTATACCTG ACCCAATCTC CGGACCCCG CTGGTCTCCA  
401 CTAGAGGAGC TGGGCAGTCT GGTAGTGGAG ACCATCACGC TCCCATTGAG  
451 AATGATGCTG TTTCTGCTT TCAGCTCCAT GTTGCTCCC ATGTGAAATT  
501 CAATTGTCTT GCCCATGATG AACACGCCCT CATTTCCTCG GACAATAGCT  
551 CGTCCATCCA CCTTGATATT CAGGTCTGAT GTAGCGTTAC TGSTGATTCT  
601 CTCAGTGCTG GCTTCTGGA CGTTCAGAGA CTTACCCCG GAAGGCAGAT  
651 GAAATTCGTG TGTCTCATAG TCGGTACTGA ACAGGATATT CTGGGTCCGG  
701 GGATCAAAGA ACTGCATGCC AATGTCGCTA GTGATTGATG TTTTATTGTT  
751 TTCCACAGAC AGCTTTGTGG TTCCCTGCTG GAACACAATG GGCTGATTGT

10

20

30

40

50

【図 2 A - 2】

801 TCCCGGTGAT CACCAGATTG TCGTTTCTCC GCCCGCGCAC AGTAGATTTG  
 851 TACAGTGGAT GGATGACCCC CATATCGGAC ACCTGCTTAA ATCGCAGCAG  
 901 GCCACTTTTC TGGAATCCA TAGAGTCACA CCCGTTTGGG CCAATGCGGA  
 951 TGACAGCCCA AATCACCAGA GTAATGATCA GATTAATCAC GGCCAGGATA  
 1001 AACAGCAGAA TGATGACGCA GATTGCCAGG TTCTCTTTGC GCCCCTCAG  
 1051 GCCTGTCTTA TGCAGGCGAT CTTCGTCAAT AGGGATGTAG CCGGCTTGA  
 1101 AATTGTGTT GTGCTCCTTA TTCACTGATC TCCTCTCGAC GGCCTTTTCT  
 1151 CTCATTGATT TTTTCACTGG TCCATTGCTT GACTGCTGCT CGCGGCTGCT  
 1201 GGCGGCTGCT GCTGCCATGG TGGTACC**GGG** TACAATTCCG CAGCTTTTAG  
**1251 AGCAGAAGTA ACACCTCCGT ACAGGCCTAG AAGTAAAGC AACATCCACT**  
**1301 GAGGAGCAGT TCTTTGATT GCACCACCAC CGGATCCGGG ACTGAAATA**  
**1351 AAAGACAAAA AGACTAACT TACCT**GGGCG CGCCGCTGGC TGCTCCTGAG  
 1401 TCTCTGCTG TCGTGTGGAG GTGTGTGTA AATGAGGCA GCCCTGTGCT  
 1451 CCCTGSGTTA TATAGAGGAG CTAACAGGT GTGACTAGCC AGSAGGGCT  
 1501 GTCCCCAGGG AGGGGCCCT GAGAGCAGAT GAGCTTTCAG CTCGTTGCC  
 1551 GGGACCGTG CCCACCCGG ACCCAGGCT GAGCTTTCG CAGCCCCATG  
 1601 GCCTGTGATG GGCTGCCCA AGGCTGACT TGCTCACTGG TTCTAAACT  
 1651 AAGTGTGAG TCTAGCTGG GGGGACAGC TGSCCTTTCG CCGGGAACAT  
 1701 GAACACGTA TACTTTGGGA GTCCAGGCA CATAAAGC TGCGCCCA  
 1751 AGCCTGTTAC AGCTGCCCT CAGTCCGCCA CGACTGCTT CGAAGATCTT  
 1801 CGCATGCAGG GGATCCACCA GGGCAGGCT TATTTTAGA GGCAGCAGT  
 1851 GTGGGGGGG GGGGGGCGC CAGATGCTG GGTAAATTAT AACCAGCAT  
 1901 CTCGGCTGTC CCCAGGCTT GCCTCCTTAC ATGGGACGCC TAGACCGTA  
 1951 GTGGGSCATG CTAGACAGCA GGGCCCAAG GTTTGCCCAT GAAAGGCTG  
 2001 TTGCGCTCG CCTCTGCT CATTGSCCT TTTTACTTC TTGGCACAAT  
 2051 TCCTCCTCC CAAGGGCGC ATGGCAGAT AGAGGAGAGA CAGGAGCTC  
 2101 TCACACGACC TCCTCTACCC AGGCGCTTAC CTCAGTATT TTTAATCTGA  
 2151 AGGGCTTAGC TTAGACATGC AAGCTTGGG CGGCAATTG GTTAACCCCA  
 2201 CTCCTCTCT GCGGCTCGG TCGCTCACTG AGGC**CGCCCG** GGCAAGCCC

【図 2 C】

3651 CATCCACTGT ACAAACTAC TGTCGGCGGG CGGAGAAACG AGAATCTGGT  
 3701 GATCACCGGG AACAATCAGC CCATTGTGTT CCAGCAGGGA ACCACAAAGC  
 3751 TGTCTGTGGA AAACAATAAA ACATCAATCA CTAGCGACAT TGGCATGCAG  
 3801 TTCTTTGATC CCCGGACCCA GAATATCCTG TTCAGTACCG ACTATGAGAC  
 3851 ACACGAATTT CATCTGCTT CCGGGGTGAA GTCTCTGAAC GTCCAGAAAG  
 3901 CCAGCACTGA GAGAATCACC AGTAACGCTA CATCAGACCT GAATATCAAG  
 3951 GTGGATGGAC GAGCTATTGT CCGGGGAAAT GAGGGCGTGT TCATCATGGG  
 4001 CAAGACAATT GAATTTACA TGGGAGGCAA CATGGAGCTG AAAGCAGAAA  
 4051 ACAGCATCAT TCTGAATGGG AGCGTGATGG TCTCCACTAC CAGACTGCC  
 4101 AGCTCCTCTA GTGGAGACCA GCTGGGGTCC GGAGATTGGG TCAGGTATAA  
 4151 GCTGTGCATG TGTGCCGATG GCACCCGTGT TAAAGTGCAG GTCACCAGCC  
 4201 AGAAATATGGG ATGTCAAGAT AGCGATAACC CTTGTGGGAA TACTCATTAA  
 4251 AAGCTTGCC GCAATAAAAG ATCTTTATTT TCATTAGATC TGTGTGTTGG  
 4301 TTTTTTGTGT GTCCTGCAGG GCGCGCCTC TAGAGCATGG CTACGTAGAT  
 4351 AAGTAGCATG GCGGGTTAAT CATTAACATC AAGGAACCCC TAGTGATGGA  
 4401 GTGGGCACT CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCCGGGCGAC  
 4451 CAAAGGTCGC CCGACGCCG GGCTTTGCC GGGCGGCCTC AGTGAGCGAG  
 4501 CGAGCGCGCA G

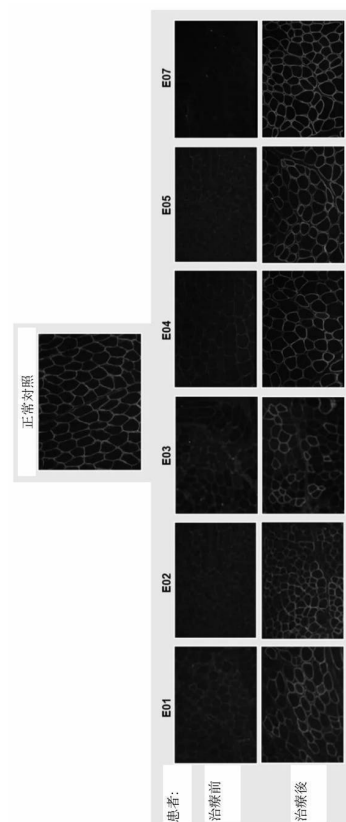
【図 2 B】

2251 GGGCGTCGGG CGACCTTTGG TCGCCCGGCC TCAGTAGCG AGCGAGCGCG  
 2301 CAGAGAGGGA GTGGGTTAA CCAATTGGCG GCCGCAAGCT TGCATGCTTA  
 2351 AGCTAGACCC TTCAGATTAA AAATACTGA GGTAGGGCG TGGTAGGGG  
 2401 AGGTGGTGTG AGACGCTGCT GTCTCTGCTC TATCTGCGCA TCGGCTCTT  
 2451 GGGAGGAGG AATGTGCCA AGGACTAAA AAAGGCCATG GAGGAGAGG  
 2501 GCGAGGGCA ACAGACCTTT CATGGGCAA CGTTGGGGC CTGCTGCTTA  
 2551 GCATGCCCA CTACGGTCT AGGCTGCCA TGTAGGAGG CAAGGCTGG  
 2601 GGACACCCGA GATGCTGCT TATAATTAAC CCAGACATGT GGTGCCCCC  
 2651 CCCCCCCCAA CACCTGCTGC CTCTAAAAAT AACCTGTCC CTGGTGATC  
 2701 CCCTGCATGC GAAGATCTTC GAACAAGGCT GTGGGGGACT GAGGGCAGG  
 2751 TGTAACAGGC TTGGGGGCCA GGGCTTATAC GTGCTGGGA CTCGAAAGT  
 2801 ATTACTGTTT CATGTTCGCG GCGAAGGCC AGCTGTCCG CGGCAGTAG  
 2851 ACTCAGACT TACTTTAGGA ACCAGTGAGC AAGTCAAGC TTGGGGCAG  
 2901 CCATACAAGG CCATGGGGCT GGGCAAGCTG CAGGCTGGG TCGGGGTGG  
 2951 GCACGGTGC CGGGCAACGA GCTGAAGCT CATCTGCTT CAGGGGCCCG  
 3001 TCCCTGGGGA CAGCCCTGC TGGTAGTCA CAGCTGTAG GTCCTCTAT  
 3051 ATAACCCAGG GGCACAGGG CTGCCCTCAT TCTACACCA CTTCCACAGC  
 3101 ACAGACAGAC ACTCAGGAGC AGCCAGCGC GCGCCC**AGGT** AAGTTAGTC  
**3151 TTTTGTCTT TTATTTCAGG TCOCGGATCC GGTGGTGGT CAAATCAAG**  
**3201 AACTGCTCTC CAGTGGATGT TGCCTTTACT TCTAGGCTG TACGGAAGT**  
**3251 TTACTTCTGC TCTAAAAGCT CGGGAATTGT ACCCGTACC ACCATGGCAG**  
 3301 CAGCAGCCG CGCAGCCGCC GAGCAGCAGT CAAGCAATGG ACCAGTAAA  
 3351 AAATCAATGA GAGAAAAAGC CGTCGAGAG AGATCAGTGA ATAGGAGCA  
 3401 CAACAGCAAT TTCAAAGCG GCTACATCCC TATTGACGAA GATCGCCTG  
 3451 ATAAGCAGG CCGAGGGGG CGCAAAGGAA ACCTGGCAAT CTGCGTCATC  
 3501 ATTCTGCTGT TTATCTGGC CGTGATTAA CTGATCATT CTCTGTTAT  
 3551 TTGGGCTGTC ATCCGATTG GCCCAAACG GTGTGACTCT ATGAGTTCC  
 3601 ACGAAAGTGG CCGTCTGCGA TTTAAGCAGG TGTCCGATAT GGGGGTCATC

10

20

【図 3】

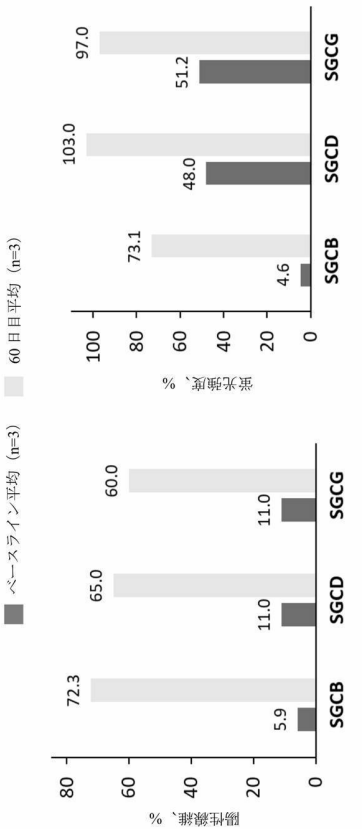


30

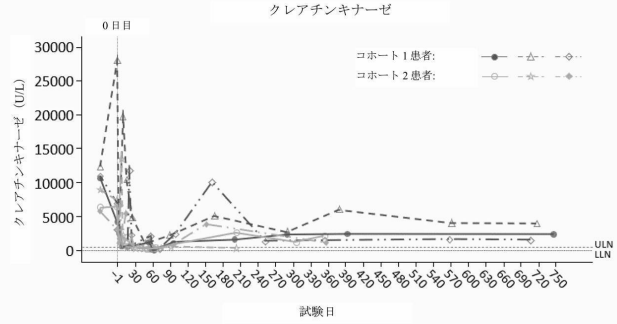
40

50

【 図 4 】



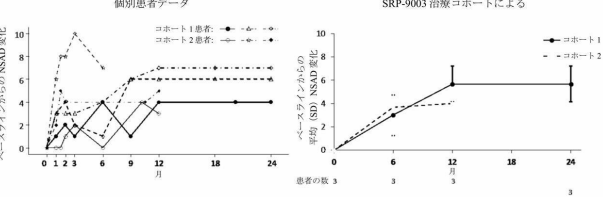
【 図 5 】



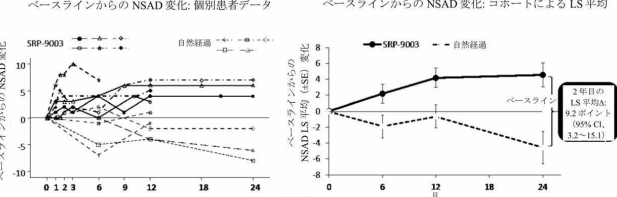
10

20

【 図 6 】



【 図 7 】



30

40

50

【配列表】

2023059858000001.xml

【外国語明細書】

2023059858000016.pdf

10

20

30

40

50



フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
(74)代理人	230113332			
	弁護士 山本 健策			
(72)発明者	ルイーズ ロディノ - カラパック			
	アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 1 2 5 , イー . グローブポート , ビックスビー リッジ ドライブ 4 9 1 2			
(72)発明者	ジェリー アール . メンデル			
	アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 3 5 , コロンバス , コッパーフィールド ドライブ 8 1 7 6			
F ターム (参考)	4C084 AA02 AA13 BA01 CA18 MA66 MA67 NA14 ZA94 ZB21			
	4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 MA67 NA14 ZA94 ZB21			