

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-520196

(P2021-520196A)

(43) 公表日 令和3年8月19日 (2021.8.19)

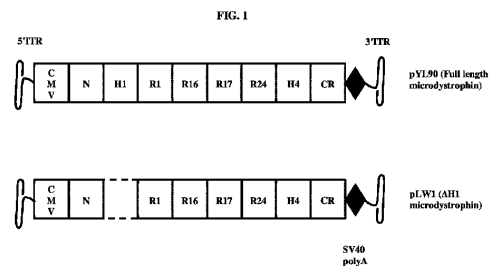
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-554102 (P2020-554102)	(71) 出願人	595034112
(86) (22) 出願日	平成31年4月3日 (2019.4.3)		ザ・キュレーターズ・オブ・ザ・ユニバー
(85) 翻訳文提出日	令和2年10月2日 (2020.10.2)		シティー・オブ・ミズーリ
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/025496		THE CURATORS OF THE
(87) 国際公開番号	W02019/195362		UNIVERSITY OF MISS
(87) 国際公開日	令和1年10月10日 (2019.10.10)		OUR I
(31) 優先権主張番号	62/651, 772		アメリカ合衆国、ミズリー州 6 5 2 1 1
(32) 優先日	平成30年4月3日 (2018.4.3)		、コロンビア、ユニバーシティー・ホール
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		3 1 6
		(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ジストロフィン異常症 (dystrophinopathy) 治療のためのヒンジ1および／または4の改変ジストロフィン

(57) 【要約】

ジストロフィン異常症の治療のための組成物および方法が開示されている。組成物は、改変されたヒンジ1 (H1) および／またはヒンジ4 (H4) を有する改変ジストロフィンタンパク質をコードする改変ジストロフィンポリヌクレオチドを含む。改変されたヒンジ1 (H1) および／または改変されたヒンジ4 (H4) を有する改変ジストロフィンタンパク質をコードする組成物を投与することによる、ジストロフィン異常症の治療のための方法も開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒンジ 1 (H 1) 領域の改変、ヒンジ 4 (H 4) 領域の改変、およびそれらの組み合わせのうちの少なくとも一つに対するヒンジ領域改変を含む、改変ジストロフィンをコードする核酸。

【請求項 2】

前記ヒンジ 1 (H 1) 領域の改変は、ヒンジ 1 (H 1) 領域の完全欠失、およびヒンジ 1 (H 1) 領域の部分欠失から選択される、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

前記ヒンジ 4 領域の改変は、ヒンジ 4 (H 4) 領域の部分欠失である、請求項 1 に記載の核酸。 10

【請求項 4】

ヒンジ 1 (H 1) 領域の改変、ヒンジ 4 (H 4) 領域の改変、およびそれらの組み合わせのうちの少なくとも一つに対するヒンジ領域改変を含む、改変ジストロフィンをコードする核酸を含むベクター。

【請求項 5】

前記 H 1 領域の改変は、ヒンジ 1 (H 1) 領域の完全欠失、およびヒンジ 1 (H 1) 領域の部分欠失から選択される、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】

前記ヒンジ 4 (H 4) 領域の改変は、ヒンジ 4 (H 4) 領域の部分欠失である、請求項 4 に記載のベクター。 20

【請求項 7】

前記ベクターは、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターから選択される、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 8】

前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターから選択される、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】

前記アデノ随伴ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス血清型 1 (A V V - 1)、アデノ随伴ウイルス血清型 5 (A V V - 5)、アデノ随伴ウイルス血清型 6 (A V V - 6)、アデノ随伴ウイルス血清型 8 (A V V - 8)、アデノ随伴ウイルス血清型 9 (A V V - 9)、アデノ随伴ウイルス血清型 r h 7 4 (A V V - r h 7 4)、アデノ随伴ウイルス 2 i 8 (A V V - 2 i 8)、アデノ随伴ウイルス B 1 (A V V - B 1)、アデノ随伴ウイルス C A M 1 3 0 (A V V - C A M 1 3 0)、アデノ随伴ウイルス M 4 1 (A V V - M 4 1)、アデノ随伴ウイルス M T P (A V V 5 8 7 M T P および A V V 5 8 8 M T P)、アデノ随伴ウイルス N P 2 2 (A V V - N P 2 2)、アデノ随伴ウイルス N P 6 6 (A V V - N P 6 6)、アデノ随伴ウイルス M Y O (A V V M Y O)、アデノ随伴ウイルスチロシン変異体、および祖先アデノ随伴ウイルスベクター (a n c A V V) から選択される、請求項 8 に記載のベクター。 30

【請求項 10】

組織特異的プロモーターをさらに含む、請求項 4 に記載のベクター。 40

【請求項 11】

前記組織特異的プロモーターは、筋特異的プロモーターおよび心臓特異的プロモーターから選択される、請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】

それを必要とする対象にベクターを投与することを含み、ここで、ベクターは改変ジストロフィンをコードする核酸を含み、改変ジストロフィンは、ヒンジ 1 (H 1) 領域、ヒンジ 4 (H 4) 領域、およびそれらの組み合わせのうちの少なくとも一つに対するヒンジ領域改変を含む、それを必要とする対象におけるジストロフィン異常症の治療のための方法。 50

【請求項 13】

前記ヒンジ領域の改変は、ヒンジ 1 (H 1) 領域の部分欠失、およびヒンジ 1 (H 1) 領域の完全欠失から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ヒンジ領域の改変は、ヒンジ 4 (H 4) 領域の部分欠失である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸は、ベクターに搭載されている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記ベクターは、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターから選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記アデノ随伴ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス血清型 1 (A V V - 1)、アデノ随伴ウイルス血清型 5 (A V V - 5)、アデノ随伴ウイルス血清型 6 (A V V - 6)、アデノ随伴ウイルス血清型 8 (A V V - 8)、アデノ随伴ウイルス血清型 9 (A V V - 9)、アデノ随伴ウイルス血清型 r h 7 4 (A V V - r h 7 4)、アデノ随伴ウイルス 2 i 8 (A V V - 2 i 8)、アデノ随伴ウイルス B 1 (A V V - B 1)、アデノ随伴ウイルス C A M 1 3 0 (A V V - C A M 1 3 0)、アデノ随伴ウイルス M 4 1 (A V V - M 4 1)、アデノ随伴ウイルス M T P (A V V 5 8 7 M T P および A V V 5 8 8 M T P)、アデノ随伴ウイルス N P 2 2 (A V V - N P 2 2)、アデノ随伴ウイルス N P 6 6 (A V V - N P 6 6)、アデノ随伴ウイルス M Y O (A V V M Y O)、アデノ随伴ウイルスチロシン変異体、および祖先アデノ随伴ウイルスベクター (a n c A V V) から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

それを必要とする対象に改変ジストロフィンタンパク質を投与することを含み、ここで、改変ジストロフィンタンパク質は、ヒンジ 1 (H 1) 領域、ヒンジ 4 (H 4) 領域、およびそれらの組み合わせのうちの少なくとも一つに対するヒンジ領域改変を含む、それを必要とする対象におけるジストロフィン異常症の治療のための方法。

【請求項 19】

前記ジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D)、ベッカー型筋ジストロフィー (B M D)、および X 連鎖性拡張型心筋症 (X L D C) から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D)、ベッカー型筋ジストロフィー (B M D)、および X 連鎖性拡張型心筋症 (X L D C) から選択されるジストロフィン異常症の保因者である、請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2018年4月3日に提出された米国仮出願第62/651,772号の優先権を主張し、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

提出する配列表の援用における記載

配列表の紙のコピー、およびサイズが151,883バイト(M I C R O S O F T W I N D O W S (登録商標)エクスプローラで測定される)である「18UMC046__S T 25 . t x t」と名付けられたファイルを含む配列表のコンピュータ可読形式が本明細書に提供されており、参照により本明細書に組み込まれる。この配列表は、配列番号: 1 ~ 18からなる。

【0003】

10

20

30

40

50

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所により授与されたNS090634に基づく政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

本開示は、ジストロフィン異常症の治療のための組成物および方法に関する。組成物は、改変されたヒンジ1 (H1) および/またはヒンジ4 (H4) を有する改変ジストロフィンタンパク質をコードする改変ジストロフィンポリヌクレオチドを含む。改変されたヒンジ1 (H1) および/または改変されたヒンジ4 (H4) を有する改変ジストロフィンタンパク質をコードする組成物を投与することによる、ジストロフィー症を治療するための方法も開示される。

10

【0005】

ジストロフィン異常症は、ジストロフィン遺伝子の突然変異によって引き起こされる一群の疾患を指す。ジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー (BMD)、およびX連鎖性拡張型心筋症 (XLCD) およびその保因者を含む。

【0006】

ジストロフィン遺伝子 (2.4 mb) は、ゲノムにおける最大の遺伝子の1つである。ジストロフィンmRNAは14 kbである。ジストロフィンタンパク質は4つの領域; アミノ末端 (NT)、24個のスペクトリン様リピート (R) 領域を有するセントラルロッドドメイン、および4つのヒンジ (H) 領域、システインリッチドメイン (CR)、およびカルボキシル末端 (CT) ドメインからなる。NT、CR、およびCT、ならびにロッドドメインのリピート、およびH2およびH3の生物学的機能は広範に調べられているが、H1およびH4の機能はほとんど知られていない。

20

【0007】

ウイルス媒介性または非ウイルス媒介性の遺伝子送達により、変異したジストロフィン遺伝子を機能的遺伝子で置換することは、ジストロフィン異常症を治療するための非常に有望な戦略である。ジストロフィン遺伝子およびそのcDNAは、ウイルスベクター、特にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターにパッケージ化するには大きすぎる。このため、合成ミニ遺伝子およびマイクロ遺伝子の開発に多大な関心が寄せられている。AAVマイクロジストロフィン遺伝子治療は、特に重要である。AAVマイクロ遺伝子ベクターを使用して、いくつかの臨床試験が開始された。現在のジストロフィンマイクロ遺伝子を改良できる戦略は、ジストロフィン異常症の治療に有益である。

30

【0008】

したがって、ジストロフィン異常症の治療のための代替ジストロフィンマイクロ遺伝子および方法のニーズが存在する。

【発明の概要】

【0009】

開示の簡単な説明

一つの態様では、本開示は、ヒンジ1 (H1) 領域、ヒンジ4 (H4) 領域、およびこれらの組み合わせの少なくとも1つに対するヒンジ領域改変を含む、改変ジストロフィンをコードする核酸に関する。

40

【0010】

一つの態様では、本開示は、ヒンジ1 (H1) 領域、ヒンジ4 (H4) 領域、およびこれらの組み合わせの少なくとも1つに対するヒンジ領域改変を含む、改変ジストロフィンをコードする核酸を含むベクターに関する。

【0011】

一つの態様では、本開示は、それを必要とする対象におけるジストロフィン異常症の治療のための方法に関する。当該方法は、改変ヒンジ領域を有する改変ジストロフィンを、それを必要とする対象に投与することを含む。

50

【 0 0 1 2 】

以下の発明の詳細な説明を考慮すると、本開示はよりよく理解され、上記以外の特徴、態様、および利点が明らかになるであろう。そのような発明の詳細な説明は、以下の図面を参照する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 図 1 は、p Y L 9 0（全長マイクロジストロフィンを有するプラスミド）、および p L W₁（Δ H₁ マイクロジストロフィンを有するプラスミド）のタンパク質構造の略図である。

【 図 2 】 図 2 A および 2 B は、B L 6（対照）マウスおよび未処理の m d x（「M d x 4 c v u n i n j」）マウスと比較した、A A V ウイルス L W₁ 処理（図 2 A）および A A V ウイルス Y L 9 0 処理（図 2 B）m d x マウスの発現を検出するウエスタンブロットである。

【 図 3 】 図 3 は、ジストロフィン、およびジストロフィン結合タンパク質複合体のタンパク質について免疫染色した Y L 9 0、L W₁、B L 6、および M d x 4 c v マウス由来の筋肉の画像を示す。

【 図 4 】 図 4 は、同様の筋肉組織構造を示す、L W₁ 処理および Y L 9 0 処理マウスのヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）染色した筋肉の画像を示す。各画像は 1 匹の独立した動物由来である。

【 図 5 】 図 5 A ~ 5 C は、L W₁ 処理 m d x 4 c v マウス（「L W₁ i n j」）、Y L 9 0 処理 m d x 4 c v マウス（「Y L 9 0 i n j」）、B L 6（対照）マウス、および未処理 m d x 4 c v マウス（「u n i n j」）における、比単収縮力（図 5 A）、比力収縮頻度（f o r c e f r e q u e n c y）（図 5 B）、およびストレッチ誘発性損傷（s t r e t c h - i n d u c e d d a m a g e）に対する抵抗（パーセント力低下 [p e r c e n t f o r c e d r o p]）（図 5 C）を測定する筋力解析を示すグラフである。

【 図 6 】 図 6 は、p Y L 9 0、p L W₂、p L W₃、p L W₄、p L W₅、および p L W₆ マイクロジストロフィンのタンパク質構造を示す略図である。

【 図 7 】 図 7 A ~ 7 F は、Y L 9 0（図 7 A）、L W₂（図 7 B）、L W₃（図 7 C）、L W₄（図 7 D）、L W₅（図 7 E）、および L W₆（図 7 F）M d x 4 c v マウス由来のジストロフィンについて免疫染色した筋肉の画像である。

【 図 8 】 図 8 A ~ 8 F は、M d x 4 c v マウスにおける Y L 9 0（図 8 A）、L W₂（図 8 B）、L W₃（図 8 C）、L W₄（図 8 D）、L W₅（図 8 E）、および L W₆（図 8 F）の発現を示すウエスタンブロットである。

【 図 9 】 図 9 A ~ 9 F は、M d x 4 c v マウスにおける Y L 9 0（図 9 A）、L W₂（図 9 B）、L W₃（図 9 C）、L W₄（図 9 D）、L W₅（図 9 E）、および L W₆（図 9 F）由来の H & E 染色した筋肉の画像を示す。

【 図 10 】 図 10 は、B L 6（対照）マウス、および未処理 m d x（「M d x 4 c v u n i n j」）マウスと比較した、p Y L 9 0（全長マイクロジストロフィンを有するプラスミド）、および p L W₃（H 4 において部分欠失を有するプラスミド）のタンパク質構造の略図である。

【 図 11 】 図 11 A および 11 B は、B L 6 マウスにおけるジストロフィンと比較した、L W₃ 処理（図 11 A）および Y L 9 0 処理（図 11 B）M d x 4 c v マウスの発現を示すウエスタンブロットである。

【 図 12 】 図 12 A ~ 12 C は、L W₃（図 12 A）およびピンキュリン（図 12 B）の発現を示すウエスタンブロット、および L W₃ および Y L 9 0 の発現レベルを定量化するグラフである。

【 図 13 】 図 13 は、ジストロフィンおよびジストロフィン結合タンパク質複合体タンパク質について免疫染色した Y L 9 0、L W₃、B L 6、および M d x 4 c v マウスの筋肉の画像である。

10

20

30

40

50

【図 1 4】図 1 4 は、同様の筋肉組織構造を示す、LW₃ 処理およびYL90 処理マウスの H & E 染色した筋肉の画像を示す。各画像は 1 匹の独立した動物由来である。

【図 1 5】図 1 5 A および 1 5 B は、LW₃ 処理 md x 4 cv マウス（「LW₃」）、YL90 処理 md x 4 cv マウス（「YL90」）、BL6（対照）マウス、および未処理 md x 4 cv マウスにおける、比単収縮力（図 1 5 A）、およびストレッチ誘発性損傷（stretch-induced damage）に対する抵抗（パーセント力低下 [percent force drop]）（図 1 5 B）を測定する筋力解析を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

10

本開示は、様々な改変形態および代替形態が可能であるが、その特定の実施形態が例として図面に示されており、本明細書で以下に詳細に説明される。しかしながら、特定の実施形態の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の趣旨および範囲に含まれるすべての改変、均等物、および代替物を網羅するように、本開示を限定することを意図しないことを理解されたい。

【0015】

本開示の詳細な説明

別段の定義がない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法および材料を本開示の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料を以下に記載する。

20

【0016】

本開示は、ジストロフィン異常症の治療のための組成物および方法に関する。

【0017】

一つの態様では、本開示は、ヒンジ 1（H1）領域、ヒンジ 4（H4）領域、およびそれらの組み合わせの少なくとも 1 つに対するヒンジ領域改変を含む改変ジストロフィンをコードする核酸に関する。

【0018】

ヒンジ 1（H1）領域へのヒンジ領域改変は、ジストロフィタンパク質の H1 領域の部分欠失および H1 領域の完全欠失から選択（choose；または選択 [select]）することができる。H1 領域の特に好適な欠失は、ジストロフィタンパク質の H1 領域の完全欠失であってもよい。H1 領域の完全欠失または部分欠失は、参照配列（配列番号：1）としてヒトジストロフィンアミノ酸配列（GI：M185331.1）を使用して、253 から 327 までのアミノ酸残基を含んでもよい。H1 領域の完全欠失または部分欠失は、参照配列（配列番号：2）としてマウスジストロフィンのアミノ酸配列（GI：M68859.1）を使用して、253 から 329 までのアミノ酸残基を含んでもよい。配列番号：3 は、ヒトジストロフィン H1 領域のアミノ酸配列を提供する。配列番号：4 は、マウスジストロフィン H1 領域のアミノ酸配列を提供する。

30

【0019】

ジストロフィンのヒンジ 4（H4）領域へのヒンジ領域改変は、H4 領域の部分欠失であってもよい。H4 領域の部分欠失は、ヒトジストロフィンアミノ酸配列（GI：M18533.1）を参照配列（配列番号：1）として使用して、アミノ酸残基 301 からアミノ酸残基 311 2 にわたるアミノ酸残基の欠失を含んでもよい。一つの実施形態では、H4 領域の部分欠失は、ヒトジストロフィンアミノ酸配列（GI：M18533.1）を参照配列（配列番号：1）として使用して、304 1 から 311 2 までのアミノ酸残基を含んでもよい。一つの実施形態では、H4 領域の部分欠失は、マウスジストロフィンアミノ酸配列（GI：M68859.1）を参照配列（配列番号：2）として使用して、303 4 から 310 5 のアミノ酸残基を含んでもよい。配列番号：5 は、ヒトジストロフィンの H4 領域のアミノ酸配列を提供する。配列番号：6 は、マウスジストロフィン H4 領域のアミノ酸配列を提供する。

40

50

【0020】

好適な改変ジストロフィンは、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17の核酸配列を有してもよい。好適な改変ジストロフィンは、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列を有してもよい。

【0021】

2つの配列の同一性パーセントは、最適な比較のために配列をアラインさせることによって決定することができる。たとえば、第二の核酸配列との最適アラインメントのために、第一の核酸配列の配列にギャップを導入することができる。同じことは、アミノ酸配列の最適アラインメントのために行うことができる。次に、対応する位置のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を比較する。第一の配列の位置が、第二の配列の対応する位置と同じヌクレオチドまたはアミノ酸によって占められている場合、核酸またはアミノ酸はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、配列によって共有される同一のヌクレオチドまたはアミノ酸の数の関数である。したがって、同一性パーセント = [同一ヌクレオチドの数 / 重複する位置の総数] × 100、または同一性パーセント = [同一アミノ酸の数 / 重複する位置の総数] × 100である。配列同一性のパーセンテージは、この式に従って、比較される2つの最適にアラインした配列を比較し、両方の配列で同一の核酸またはアミノ酸が出現する位置の数を決定して一致する位置の数（上記の式の「同一位置の数」）を得て、一致する位置の数を比較する一の総数（上記の式の「重複する位置の総数」）で除し、結果に100を乗じてパーセント配列同一性を得ることで計算することができる。この比較では、配列は同じ長さでも、異なる長さでもよい。比較ウィンドウを決定するための配列の最適なアラインメントは、スミスおよびウォーターマンのローカルホモロジーアルゴリズム（1981）、ニードルマンおよびウンシュのホモロジーアラインメントアルゴリズム（1972）、ピアソンおよびリップマンのホモロジーアラインメントアルゴリズム（1988）、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetic Computer Group, 575, Science Drive, Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA）、または検査（inspection）によって行うことができる。

【0022】

好適な改変ジストロフィタンパク質は、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18のアミノ酸配列を有してもよい。好適なジストロフィタンパク質は、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有してもよい。

【0023】

一つの態様では、本開示は、ヒンジ1（H1）領域の改変、ヒンジ4（H4）領域の改変、およびそれらの組み合わせのうちの少なくとも一つに対するヒンジ領域改変を含む、改変ジストロフィンをコードする核酸を含むベクターに関する。

【0024】

特に好適なベクター構築物は、発現ベクター構築物である。好適なベクターは、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含む。好適なウイルスベクターは、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターから選択（choose；または選択[select]）することができる。好適なベクターは、たとえば、アデノ随伴ウイルス血

10

20

30

40

50

清型 1 (A V V - 1)、アデノ随伴ウイルス血清型 5 (A V V - 5)、アデノ随伴ウイルス血清型 6 (A V V - 6)、アデノ随伴ウイルス血清型 8 (A V V - 8)、アデノ随伴ウイルス血清型 9 (A V V - 9)、アデノ随伴ウイルス血清型 r h 7 4 (A V V - r h 7 4)、アデノ随伴ウイルス 2 i 8 (A V V - 2 i 8)、アデノ随伴ウイルス B 1 (A V V - B 1)、アデノ随伴ウイルス C A M 1 3 0 (A V V - C A M 1 3 0)、アデノ随伴ウイルス M 4 1 (A V V - M 4 1)、アデノ随伴ウイルス M T P (A V V 5 8 7 M T P および A V V 5 8 8 M T P)、アデノ随伴ウイルス N P 2 2 (A V V - N P 2 2)、アデノ随伴ウイルス N P 6 6 (A V V - N P 6 6)、アデノ随伴ウイルス M Y O (A V V M Y O)、アデノ随伴ウイルスチロシン変異体、および祖先アデノ随伴ウイルスベクター (a n c A V V) 等の A A V 血清型を含む。好適なベクターは、プラスミド、リボソーム、エキソソーム、およびナノ粒子も含む。

【0025】

ベクター構築物の詳細は、当技術分野でよく知られているように、使用される特定の宿主細胞、ならびに発現系の所望の特性によって異なる。たとえば、細菌宿主と適合性のあるプロモーター配列は、企図される核酸セグメントの挿入のための一つまたは複数の便利な制限部位を含むプラスミドベクターに典型的に提供される。好適なプロモーターおよびベクターは、外因的に供給されるナリジクス酸によって誘導可能である R e c 7 プロモーター、外因的に供給されるイソプロピル - β - D - チオガラクト - ピラノシド (I P T G)、によって誘導可能である J H E X 2 5 (P r o m e g a , M a d i s o n , W I から市販されている)、プラスミドベクター p K K 2 2 3 - 3 (P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J から市販されている) に存在し、外因的に供給される T P T G によって誘導可能である t a c (t r p および l a c プロモーター/オペレーターのハイブリッド) を含む。他の好適なプロモーターおよびプロモーター/オペレーターは、a r a B、t r p、l a c、g a l、T 7 等を含む。S . セレビシエ (S . c e r e v i s i a e) における生産において、本開示のトロンピン前駆体をコードする核酸は、S . セレビシエ (S . c e r e v i s i a e) において作動可能であり、所望の特性 (たとえば、誘導可能/抑制解除可能 (d e r e p r e s s i b l e) または構成的) を有するプロモーター、たとえば G A L 1 - 1 0、P H O 5、P G K 1、G D P 1、P M A 1、M E T 3、C U P 1、G A P、T P I、M F α 1、および M F α 2、ならびにハイブリッドプロモーター P G K / α 2、T P I / α 2、G A P / G A L、P G K / G A L、G A P / A D H 2、G A P / P H O 5、A D H 2 / P H O 5、C Y C 1 / G R E、および P G K / A R E、および当該技術分野で既知の他のプロモーターと作動可能に連結して配置される。哺乳動物細胞株の場合、プロモーターは、ウイルスプロモーター/エンハンサー (たとえば、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (T K) プロモーター、またはサルウイルスプロモーター (たとえば、S V 4 0 初期または後期プロモーター)、またはアデノウイルス主要後期プロモーター、サイトメガロウイルス (C M V)、ラウス肉腫ウイルス (R S V) またはマウス乳がんウイルス (M M T V) のロングターミナルリピート (L T R)、たとえば L T R、または哺乳類プロモーター、好適には誘導性プロモーター、たとえばメタロチオネインまたはグルココルチコイド受容体プロモーター等であってもよい。筋肉の場合、好適なプロモーターは、内因性および合成の心臓特異的または筋特異的プロモーター (たとえば、S P c 5 - 1 2、筋肉クレアチンキナーゼ (参照により組み込まれる W a n g e t a l . , G e n e T h e r . 2 0 0 8 N o v ; 1 5 (2 2) : 1 4 8 9 - 9 9 を参照のこと)、デスミン、M Y O D 1、および M Y L K 2 を含む。

【0026】

構築物は、意図される宿主細胞に適切なさらなる核酸を含んでもよい。たとえば、高等真核生物細胞株 (たとえば、脊椎動物および昆虫細胞株) で使用するための発現構築物は、ポリアデニル化部位を含み、イントロンの存在により、多くの系 (s y s t e m) において核からの m R N A の搬出 (e x p o r t) が増加するように、イントロン (イントロンを処理するためのシグナルを含む) を含んでもよい。さらに、宿主細胞で作動可能な分泌シグナル配列を構築物の一部として含めてもよい。他の好適な分泌シグナル配列は、ヒ

10

20

30

40

50

ト血清アルブミン、ヒトプロトロンビン、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子、およびプレプロインスリンから得ることができる。発現コンストラクトはまた、他の一般的に使用される制御因子 (regulator element)、たとえば非標的組織/細胞での発現を低下させるマイクロRNA標的部位を含んでもよい。発現構築物はまた、2つの導入遺伝子、たとえばIRESおよび2Aを発現するために使用する因子を含んでもよい。発現構築物の原核細胞での使用を意図する場合、発現構築物は、合成されたポリペプチドの細胞膜周辺腔への輸送を指示するシグナル配列を含んでもよく、または発現は細胞内に指示されてもよい。構築物はまた、構築物を含む宿主細胞を選択するための選択可能なマーカーであってもよい。選択可能なマーカーは、当技術分野でよく知られている。微生物の発現ベクターに含まれるマーカー遺伝子は、たとえば、宿主としての大腸菌 (E. coli) のアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子; 宿主としての酵母のLeu2遺伝子等であってもよい。動物細胞のための発現ベクターに含まれるマーカー遺伝子は、たとえば、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ (neo) 遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 遺伝子、グルタミン合成酵素 (GS) 遺伝子等であってもよい。

10

【0027】

好適な改変ジストロフィンは、本明細書に記載されるように、H1領域、H4領域、およびそれらの組み合わせに対する改変を含む。

【0028】

別の態様では、本開示は、ベクターを含む宿主細胞を対象とし、ここでベクターは、改変ジストロフィンをコードする核酸を含む。

20

【0029】

好適な宿主細胞は、たとえば、真核生物宿主細胞および原核生物宿主細胞を含む。好適な真核細胞は、初代培養筋細胞、初代培養心細胞、不死化筋細胞、および不死化心細胞を含む、筋細胞および心細胞を含む。好適な真核細胞は、昆虫細胞、たとえばSf9、および哺乳動物細胞株、たとえばCHO、COS、293、293-EBNA、BHK、HeLa、NIH/3T3等を含む。例示的な酵母宿主細胞は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、クルイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、シュワンニオミセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、アークスラ・アデニニボランス (*Arxula adenivorans*)、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*)、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、およびヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) を含む。好適な原核細胞は、たとえば大腸菌 (*E. coli*) 細胞、たとえば、例としてBL21 (DE3)、XL-1、TB1、JM103、BLR、pUC8、pUC9、pBR329、pPL、SURE、SUREII、DH5a、Stb12、Stb13、Top10およびpKK223-3細胞、およびサルモネラ菌、たとえば、例としてS.チフィ (*S. typhi*)、S.チフィムリウム (*S. typhimurium*)、およびS.チフィムリウム (*S. typhimurium*) と大腸菌 (*E. coli*) のハイブリッドを含む細菌細胞である。

30

40

【0030】

本開示の改変ジストロフィンポリペプチドは、ポリペプチドをコードする核酸を発現ベクターに組み込み、得られた発現ベクターで好適な微生物または動物細胞を形質転換し、形質転換された微生物または動物細胞を培養して核酸によってコードされるポリペプチドを産生することにより調製できる。核酸によってコードされるポリペプチドの生産のために、ペプチド合成機を使用してもよい。

【0031】

50

好適なベクターは、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含む。好適なベクターは、たとえば、AAV血清型、たとえば、例として、アデノ随伴ウイルス血清型1 (AAV-1)、アデノ随伴ウイルス血清型5 (AAV-5)、アデノ随伴ウイルス血清型6 (AAV-6)、アデノ随伴ウイルス血清型8 (AAV-8)、アデノ随伴ウイルス血清型9 (AAV-9)、アデノ随伴ウイルス血清型rh74 (AAV-rh74)、アデノ随伴ウイルス2i8 (AAV-2i8)、アデノ随伴ウイルスB1 (AAV-B1)、アデノ随伴ウイルスCAM130 (AAV-CAM130)、アデノ随伴ウイルスM41 (AAV-M41)、アデノ随伴ウイルスMTP (AAV587MTPおよびAAV588MTP)、アデノ随伴ウイルスNP22 (AAV-NP22)、アデノ随伴ウイルスNP66 (AAV-NP66)、アデノ随伴ウイルスMYO (AAVMYO)、アデノ随伴ウイルスチロシン変異体、および祖先アデノ随伴ウイルスベクター (ancAAV) を含む。好適なベクターは、プラスミド、リボソーム、およびナノ粒子も含む。

10

【0032】

本明細書に記載されるように、好適な改変ジストロフィン、ヒンジ1 (H1) 領域、ヒンジ4 (H4) 領域の改変、およびそれらの組み合わせへの改変を含む。

【0033】

微生物または動物細胞発現培養物における分泌のための分泌シグナル配列をコードする核酸は、改変ジストロフィンをコードする核酸に含まれてもよい。本開示の改変ジストロフィンは、発現されてもよく、そして培養培地中に分泌されてもよい。好適なシグナル配列は、たとえば、pel Bシグナル； α 因子シグナル；イムノグロブリンシグナルSG-1、C25シグナル等を含む。特に好適な分泌シグナル配列は、因子V (factor V) 分泌ペプチドである。

20

【0034】

タグのための配列は、本開示の改変ジストロフィンをコードする核酸に含まれてもよい。好適なタグは、精製用タグおよび標識であってもよい。好適な精製用タグは、ヒスチジン、HPC4、GST、C-タグ、c-myc、T7、Glu-Glu、FLAG、HA、MBP、CBP、インティン-CBD、ストレプトアビジン/ビオチンベースのタグ、SUMO-タグ、およびHaloTAGタグであってもよい。

【0035】

制限酵素認識部位をコードする配列は、本開示の改変ジストロフィンをコードする核酸に含まれてもよい。

30

【0036】

本明細書に記載されるように、様々な動物細胞を宿主細胞として使用することができる。宿主細胞は、たとえば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、たとえば、脂質ベースのトランスフェクション試薬 (例：リポフェクチン) による沈殿、ポリエチレングリコールを用いたプロトプラストの融合、エレクトロポレーション、バイオリスティック等を含む任意の既知の方法によって形質転換することができる。トランスフェクションに特に好適な方法はLIPOFECTAMINE (登録商標) 3000である。

【0037】

一つの態様では、本開示は、ジストロフィン異常症の治療のための方法に関する。この方法は、改変ヒンジ領域を有する改変ジストロフィンを投与することを含む。本明細書に記載されるように、好適な改変ヒンジ領域は、H1領域、H4領域、およびそれらの組み合わせに対する改変を含む。

40

【0038】

好適な担体は、水、生理食塩水、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リンゲル液等を含む。

【0039】

改変ジストロフィンを送達するための製剤はまた、他の成分、たとえば界面活性剤、保存剤、および賦形剤を含んでもよい。界面活性剤は、ジストロフィンマイクロ遺伝子の表面誘発凝集 (surface-induced aggregation) を低減または

50

防止することができる。好適な界面活性剤脂肪酸エステルおよびアルコール、ならびにポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル。量は一般に、製剤の約 0.001 ~ 約 4 重量%の範囲である。薬学的に許容される防腐剤は、たとえば、フェノール、o - クレゾール、m - クレゾール、p - クレゾール、p - ヒドロキシ安息香酸メチル、p - ヒドロキシ安息香酸プロピル、2 - フェノキシエタノール、p - ヒドロキシ安息香酸ブチル、2 - フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、チオメロサル (thiomerosal)、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロロヘキシジン (chlorohexidine)、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、p - ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン (chlorophenesin; 3 p - クロルフェノキシプロパン - 1, 2 - ジオール) およびそれらの混合物を含む。防腐剤は、約 0.1 mg/ml ~ 約 10 mg/ml を含む、約 0.1 mg/ml ~ 約 20 mg/ml の範囲の濃度で存在してもよい。医薬組成物における防腐剤の使用は、当業者によく知られている。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995 を参照する。製剤は、好適なバッファー、たとえば酢酸ナトリウム、グリシルグリシン、HEPES (4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニウムエタンスルホン酸)、およびリン酸ナトリウムを含んでもよい。賦形剤は、製剤処方調製において一般的に使用されるように、等張化のための成分、抗酸化剤、および安定剤を含む。他の不活性成分は、たとえば、L - ヒスチジン、L - ヒスチジン塩酸塩一水和物、ソルビトール、ポリソルベート 80、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、および EDTA ナトリウムを含む。

10

20

【0040】

一つの実施形態では、担体は、薬学的に許容される担体である。当業者に理解されるように、薬学的に許容される担体、および場合により、他の治療成分および/または予防成分は、製剤の他の成分と適合し、そのレシピエントに対し有害ではないという意味で「許容」されなければならない。好適な薬学的に許容される担体溶液は、水、生理食塩水、等張生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リンゲル液等を含む。本開示の組成物は、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトに、それ自体が治療薬として、互いの混合物として、または医薬製剤の形態で投与することができ、通常薬学的に無害な賦形剤および添加剤に加えて、活性成分として有効量の活性剤を含む。

30

【0041】

非経口投与 (例: 注射、たとえば、ボラス注入または持続注入による) 用の製剤は、アンプル、プレフィルドシリンジ、小容量注入、または防腐剤が添加されたおよび添加されていない複数回投与容器で、単位用量形態で提供されてもよい。製剤は、たとえば懸濁液、溶液、または油性または水性媒体中の乳濁液の形態をとってもよく、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤化剤を含んでもよい。

【0042】

本開示の製剤の投与に好適な方法は、非経口 (例: 静脈内 (IV)、筋肉内 (IM)、皮下 (SC)、または腹腔内 (IP)) 経路によるものであり、通常投与される製剤は、許容される希釈剤、担体および/またはアジュバントと組み合わせた有効量の製品を含む。標準希釈剤、たとえばヒト血清アルブミンは、本明細書に記載される標準担体と同様に、本開示の医薬組成物のために企図される。

40

【0043】

本明細書に記載されるように、「有効量」、「治療上有効量」、「予防上有効量」、および「診断的有效量」は、本明細書で使用される場合、「有効量」、「治療有効量」、「予防有効量」および「診断有効量」は、投与後に所望の生物学的反応を誘発するのに必要な本開示の改変ジストロフィンの量である。改変ジストロフィンの量は、改変ジストロフィンが改変ジストロフィンをコードする核酸 (発現構築物および/またはベクターにパッケージ化されることを含む) として投与されるか、修飾ジストロフィタンパク質として投与されるかなどの形態に依存する。

50

【0044】

有効量は、使用される改変ジストロフィンおよび治療される特定の疾患、障害、または状態に応じて実質的に変化すると予想される。用量は、キログラムあたり約 10^{10} のベクターゲノムからキログラムあたり約 10^{14} のベクターゲノムの範囲であってもよい。本開示の方法での使用に好適な用量は、たとえば、個体の年齢および体重、特定のジストロフィン異常症、ジストロフィン異常症の重症度、組成物の性質、投与経路、およびそれらの組み合わせを含む多くの要因に依存する。最終的に、好適な用量は、当業者、たとえば、医師、獣医、科学者、ならびに他の医学および研究の専門家によって容易に決定することができる。たとえば、当業者は、所望の治療成績 (treatment outcome) または治療成績 (treatment result) に到達するまで増加させることができる低用量から始めることができる。あるいは、当業者は、所望の治療成績 (treatment outcome) または治療成績 (treatment result) を達成するために必要な最小用量に到達するまで減少させることができる高用量から始めることができる。

10

【0045】

オフターゲット効果は、MCK (たとえば、miniMCK、CK5、CK6、CK7、CK8、CK8e、CK9およびMHCK7) 遺伝子、ミオグロビン遺伝子およびデスミン遺伝子、心臓プロモーター (たとえば、cTN1、NCX1、MLC-2v、alpha-1c、mini-alphaMHC)、Pitx3、骨格筋アルファアクチン、および合成プロモーター (たとえば、SPc5-12、SK-CRM1、SK-CRM2、SK-CRM3、SK-CRM4、SK-CRM5、SK-CRM6、SK-CRM7、SK-CRM-Des、SK-CRM-SPc5-12、SK448、およびSP1-28) に由来するもの等の筋特異的調節カセットを使用して最小化することができる。遺伝子発現は、より強力な調節カセットを使用し、コドン最適化され、機能的に強化されたcDNAを使用して向上できる。

20

【0046】

本開示の製剤は、それを必要とする対象に投与することができる。本明細書で使用される場合、「対象」(「個体」および「患者」とも互換的に呼ばれる)は、ヒトおよび非ヒト動物を含む動物を指す。したがって、本明細書に開示される組成物および方法は、ヒトおよび獣医の用途、特にヒトおよび動物の医療用途に使用することができる。好適な対象は、ヒト、コンパニオンアニマル (たとえば、イヌ、ネコ)、ウシ、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、霊長類、およびブタ、好ましくはヒト患者を含む温血哺乳動物宿主を含む。

30

【0047】

別の態様では、本開示は、それを必要とする対象におけるジストロフィン異常症を治療するための方法に関する。本方法は、それを必要とする対象に改変ジストロフィンを投与することを含む。

【0048】

本明細書で使用される場合、「それを必要とする対象」(本明細書では「それを必要とする患者」と互換的に使用される)は、特定の疾患、障害、または状態になりやすい、またはそのリスクがある対象を指す。本明細書に開示される方法は、ジストロフィン異常症にかかりやすいか、またはジストロフィン異常症のリスクが高い対象のサブセットで実施することができる。本開示の方法の実施形態の一部は、特定された対象の特定のサブセットまたはサブクラス (すなわち、本明細書に記載の一つまたは複数の特定の状態に対処する際に支援 (assistance) を「必要としている」対象のサブセットまたはサブクラス) に関するため、すべての対象が、特定の疾患、障害または状態について本明細書に記載されている対象のサブセットまたはサブクラスに含まれるわけではない。一つの実施形態では、対象は、ジストロフィン異常症を有するか、または有すると疑われる。一つの実施形態では、対象は、ジストロフィン異常症の保因者である。本明細書で使用する場合、ジストロフィン異常症の「保因者」(または「遺伝性保因者」)は、ジストロフィン異常症を引き起こすことが知られているまたは考えられている遺伝的形質または突然変異

40

50

の劣性アレルを受け継いだ対象を指す。保因者は、ジストロフィン異常症の症状を示さない場合もあれば、軽度の症状、たとえば筋力低下、けいれん、心筋症、およびそれらの組み合わせを示す場合もある。

【0049】

ジストロフィン異常症は、ジストロフィン遺伝子の突然変異によって引き起こされるか、またはそれに起因する疾患を含む。好適なジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）、X連鎖性拡張型心筋症（XLCD）、およびそれらの保因者を含む。

【0050】

本開示の製剤の投与のための好適な方法は、本明細書に記載される非経口（たとえば、IV、IM、SC、またはIP）経路による。

10

【0051】

別の態様では、本開示は、それを必要とする対象におけるジストロフィン異常症の治療のための方法に関する。方法は、改変ジストロフィンを投与することを含み、ここで改変ジストロフィタンパク質は、ヒンジ1（H1）領域、ヒンジ4（H4）領域、およびそれらの組み合わせのうちの少なくとも一つに対するヒンジ領域改変を含む。

【0052】

ジストロフィン異常症は、ジストロフィン遺伝子の突然変異によって引き起こされるか、またはそれに起因する疾患を含む。本明細書に記載されるように、好適なジストロフィン異常症は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）、X連鎖性拡張型心筋症（XLCD）、およびそれらの保因者を含む。

20

【0053】

本開示の製剤の投与のための好適な方法は、本明細書に記載される非経口（例えば、IV、IM、SC、またはIP）経路による。

【0054】

改変ジストロフィタンパク質は、本明細書中に記載されるような担体を含む組成物として送達できる。特に好適な担体はポリマーであってもよい。

【0055】

本開示の方法での使用のための改変ジストロフィタンパク質の好適な用量は、たとえば、個体の年齢および体重、特定のジストロフィン異常症、ジストロフィン異常症の重症度、組成物の性質、投与経路、およびそれらの組み合わせを含む多くの要因に依存する。最終的に、好適な用量は、当業者、たとえば、医師、獣医、科学者、ならびに他の医学および研究の専門家によって容易に決定することができる。たとえば、当業者は、所望の治療成績（treatment outcome）または治療成績（treatment result）に到達するまで増加させることができる低用量から始めることができる。あるいは、当業者は、所望の治療成績（treatment outcome）または治療成績（treatment result）を達成するために必要な最小用量に到達するまで減少させることができる高用量から始めることができる。

30

【0056】

本開示の方法は、長い相互作用半減期を有するいくつかの相互作用の単離、および同定のために使用できるが、有利には、この方法はまた、弱く相互作用する分子の単離を可能にする。

40

【0057】

本開示は、以下の非限定的な実施例を考慮すると、より完全に理解されるであろう。

【実施例】

【0058】

材料および方法

LW1およびLW3プラスミドの構築、ならびにmdx4cvマウスへの筋肉内注射。元のプラスミドは、YL90を初期のバックボーンとして使用し、PCRをベースにした欠損戦略（deletion strategy）を使用して作成する。YL90は、L

50

ai, Thomas et al. (2009 J Clin Invest 119: 624-35)に記載されるように調製した。ヒンジ1領域が完全欠失したYL90 (LW₁)、およびH4領域が部分欠失したYL90 (LW₃)を調製した。プラスミドをシーケンシングおよび診断消化 (diagnostic digestion) によって確認した。LW₁、LW₃、またはYL90を運搬するアデノ随伴ウイルス血清型9 (AAV-9)を、これらのプラスミドを用いて、マウスにおける筋肉内注射のために作成した。すべての動物実験は、施設内動物管理使用委員会によって承認され、NIHガイドラインに準拠していた。mdx4cvマウスの前脛骨筋 (TA) に、3ヶ月齢のマウスで1E12vg/筋肉の用量で注射した。TAの収縮特性は、注射後3ヶ月で評価した。

【0059】

TA筋の機能評価。TA筋の筋力は、発明者らの発表したプロトコル (Hakim, Li et al. 2011 Methods Mol Biol 709: 75-89; Hakim, Wasala et al. 2013 J Vis Exp: e50183)に従ってin situで測定した。特に、25 mg/mlケタミン、2.5 mg/mlキシラジン、および0.5 mg/mlアセトプロマジンを2.5 μl/g体重で含む混合物を腹腔内注射して、マウスに麻酔した。TA筋と坐骨神経を露出した。マウスを、フットプレート装置のカスタム設計された熱制御プラットフォームに移動した (Hakim, Li et al. 2011 Methods Mol Biol 709: 75-89; Hakim, Wasala et al. 2013 J Vis Exp: e50183)。平衡化の5分後、坐骨神経を1Hz (20V、1,000mA)の周波数で刺激し、2.0~6.0gの静止張力でカスタムメイドの25Gプラチナ電極を使用して単収縮筋収縮 (twitch muscle contraction)を誘発した。TA筋の筋長 (L_m)は、電子デジタルキャリパー (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用して、最大の単収縮力を生成する静止張力で測定した。この長さを、至適筋長 (L₀)として定義した。単収縮力を1Hzの周波数で測定した後、50、100、150、および200Hzで力収縮頻度アッセイ (force frequency assay)を行い、各収縮間に1分間休止した。比筋力は、最大等尺性収縮力 (isometric tetanic force)を筋断面積 (CSA)で割ることによって決定した。CSAは、以下の式、 $CSA = (\text{グラム単位の筋肉量}) / [(\text{cm単位の至適繊維長}) \times (\text{g/cm}^3 \text{単位の筋肉密度})]$ に従って計算した。計算には1.06 g/cm³の筋肉密度を使用した。至適筋長は0.60 × L₀と計算された。0.60は、TA筋のL₀に対する繊維長の比率を表す。収縮力測定後、筋肉を5分間休ませ、その後、以前に公開されたプロトコル (Hakim, Li et al. 2011 Methods Mol Biol 709: 75-89; Hakim, Wasala et al. 2013 J Vis Exp: e50183)に従って、10ラウンドの伸張性収縮に供した。簡単に言うと、強縮の後に、TA筋が0.5 L₀/秒の速度で10% L₀伸ばされた。伸張性収縮サイクルの間に筋肉を1分間休ませた。伸張性収縮の各ラウンド後の力低下のパーセンテージを記録した。305C-LRデュアルモードサーボモータートランスデューサー (Aurora Scientific, Inc.)を使用して、筋収縮および収縮力、および伸張性収縮プロファイルを測定した。データは、Lab ViewベースのDMCおよびDMAプログラム (Version 3.12, Aurora Scientific, Inc.)を使用して処理した。

【0060】

形態学的研究。一般組織学 (general histology)は、ヘマトキシリンおよびエオシン (HE)染色によって調べた。ジストロフィンの発現は、MDA Monoclonal Antibody Resource located at the Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease, RJA Orthopaedic Hospital, Oswestry, UK (www.glenmorris.org.uk/ma

b s . h t m) から入手した、エクソン 4 4 に特異的な M A N E X 4 4 A ジストロフィン抗体 (1 : 1 0 0 ; クローン 5 B 2) を用いた免疫蛍光染色により評価した。スライドは、N i k o n E 8 0 0 蛍光顕微鏡を使用して同じ露出設定で見た。顕微鏡写真は Q i m a g e R E t i g a 1 3 0 0 カメラで撮影した。

【 0 0 6 1 】

ウエスタンブロット。T A 筋溶解物は、記載されているように調製した (L i , L o n g , e t a l . 2 0 0 9 H u m M o l G e n e t 1 8 : 1 2 0 9 - 2 0) 。簡単に言うと、組織を液体窒素で瞬間凍結した。凍結した組織サンプルを液体窒素中で微粉に粉碎した後、1 0 % S D S 、5 m M E D T A 、p H 6 . 8 の 6 2 . 5 m M T r i s - H C l 、およびプロテアーゼ阻害剤混合物 (R o c h e , I n d i a n a p o l i s , I N) を含むバッファーで均質化した。粗溶解物を 9 5 で 3 分間加熱し、氷上で 2 分間冷却した後、1 4 , 0 0 0 r p m で 3 分間遠心分離した。上清を全筋肉溶解物として収集した。D C タンパク質アッセイキット (B i o - R a d , H e r c u l e s , C A) を使用してタンパク質濃度を測定し、1 0 0 μ g のタンパク質を使用して、レーンごとにウエスタンブロットでロードした。ジストロフィンは、M D A M o n o c l o n a l A n t i b o d y R e s o u r c e l o c a t e d a t t h e W o l f s o n C e n t r e f o r I n h e r i t e d N e u r o m u s c u l a r D i s e a s e , R J A H O r t h o p a e d i c H o s p i t a l , O s w e s t r y , U K から入手した、エクソン 1 0 - 1 1 (1 : 1 0 0 ; クローン 7 G 5 、I g G 1) に特異的な M A N E X 1 0 1 1 D ジストロフィン抗体で検出した。ウエスタンブロット定量化は、L I - C O R I m a g e S t u d i o V e r s i o n 5 . 0 . 2 1 ソフトウェアを使用して実行した。それぞれのタンパク質バンドの相対強度を、同じブロットの対応するローディングコントロールに対して正規化した。

【 0 0 6 2 】

実施例で使用されるように、p X X は、マイクロジストロフィンを含むプラスミドを指す。したがって、p Y L 9 0 は全長のマイクロジストロフィンを含むプラスミドを指す。p L W ₁ は、Δ H ₁ マイクロジストロフィン (H ₁ の完全欠失) を含むプラスミドを指す。p L W ₂ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 1 1 2 が完全欠失したプラスミドを指す。p L W ₃ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 5 5 が部分欠失したプラスミドを指す。p L W ₄ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が部分欠失したプラスミドを指す。p L W ₅ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 5 5 および 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が欠失し、D p 4 2 7 の W W ドメインは保持されていたプラスミドを指す。および、p L W ₆ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 7 5 および 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が欠失し、D p 7 1 に存在するアミノ酸残基 3 0 7 6 ~ 3 0 9 2 の部分的な W W ドメインが保持されていたプラスミドを指す。実施例で使用されるように、X X はマイクロジストロフィンを含む A A V ウイルスを指す。したがって、Y L 9 0 は全長のマイクロジストロフィンを有する A A V ウイルスを指す。L W ₁ は、Δ H ₁ マイクロジストロフィン (H ₁ の完全欠失) を伴う A A V ウイルスを指す。L W ₂ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 1 1 2 が完全欠失した A A V ウイルスを指す。L W ₃ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 5 5 が部分欠失した A A V ウイルスを指す。L W ₄ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が部分欠失した A A V ウイルスを指す。L W ₅ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 5 5 および 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が欠失し、D p 4 2 7 の W W ドメインは保持されていた A A V ウイルスを指す。および、L W ₆ は、H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 7 5 および 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が欠失し、D p 7 1 に存在するアミノ酸残基 3 0 7 6 ~ 3 0 9 2 の部分的な W W ドメインが保持されていた A A V ウイルスを指す。

【 0 0 6 3 】

実施例 1

本実施例では、マイクロジストロフィンにおけるヒンジ 1 領域に対する改変の効果を測定した。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

特に、全長マイクロジストロフィン (p Y L 9 0) を親マイクロ遺伝子として使用した。p Y L 9 0 のヒンジ 1 を完全に削除して、H 1 なしの p L W₁ マイクロジストロフィン (マイクロジストロフィン内の H 1 が完全欠失したプラスミド; Δ H₁ マイクロジストロフィン) を作成しました。図 1 は、p Y L 9 0 および p L W₁ のタンパク質構造を示す。
【 0 0 6 5 】

両方のマイクロジストロフィンを、C M V プロモーターの制御下で A A V 9 アデノウイルスベクターにパッケージ化して、A A V ウイルス Y L 9 0 および A A V ウイルス p L W₁ を作成し、そして 1 e 1 2 v g / 筋肉の投薬量で 3 ヶ月齢のオスの m d x 4 c v マウスの前脛骨筋に注射した。筋力分析、免疫学的染色、および組織学的染色は、注射後 3 ヶ月で行った。

【 0 0 6 6 】

図 2 A および 2 B に示されるように、L W₁ (p L W₁ プラスミドを有する A A V ウイルスを意味する) の発現 (図 2 A) は、Y L 9 0 (p Y L 9 0 プラスミドを有する A A V ウイルスを意味する) の発現 (図 2 B) と同様であった。

【 0 0 6 7 】

B L 6 対照マウス、M d x 4 c v マウス (ジストロフィン欠損)、L W₁ を注射した M d x 4 c v マウス、および Y L 9 0 を注射した M d x 4 c v マウス由来の筋組織を、ジストロフィン、ジストロブレピン (d y s t r o v r e v i n)、α - シントロフィン、β - サルコグリカン、および β - ジストログリカンに対する抗体で免疫染色し、ジストロフィン結合タンパク質複合体を視覚化した。図 3 に示すように、L W₁ と Y L 9 0 は同様の染色パターンを示した。両方のタンパク質は D G C も回復しました (図 3)。L W₁ 処理および Y L 9 0 処理マウスは、類似の筋肉組織学を示した (図 4)。L W₁ 処理 (「L W₁ i n j」) および Y L 9 0 処理 (「Y L 9 0 i n j」) マウスは、B L 6 マウスと同様の比単収縮力 (図 5 A) および比力 - 収縮頻度 (図 5 B) を有していた。L W₁ 処理 (「L W₁ i n j」) および Y L 9 0 処理 (「Y L 9 0 i n j」) マウスは、ストレッチ誘発性損傷 (s t r e t c h - i n d u c e d d a m a g e) (パーセント力低下) に対して同様の耐性を示した (図 5 C)。これらの結果は、L W₁ および Y L 9 0 がジストロフィン欠損マウスの筋力の回復に同等に効果的であることを示す。

【 0 0 6 8 】

実施例 2

本実施例では、マイクロジストロフィンのヒンジ 4 領域に対する改変の効果を測定した。

【 0 0 6 9 】

上記の実施例 1 と同様に、全長マイクロジストロフィン (p Y L 9 0) を親マイクロ遺伝子として使用した。図 6 は、p Y L 9 0 (全長マイクロジストロフィンを有するプラスミド)、p L W₂ (H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 1 1 2 が還元欠失したプラスミド)、p L W₃ (H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 5 5 が部分欠失したプラスミド)、p L W₄ (H 4 のアミノ酸残基 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が部分欠失したプラスミド)、p L W₅ (H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 5 5 および 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が欠失し、D p 4 2 7 の W W ドメインは保持されていたプラスミド)、p L W₆ (H 4 のアミノ酸残基 3 0 4 1 ~ 3 0 7 5 および 3 0 9 3 ~ 3 1 1 2 が欠失し、D p 7 1 に存在するアミノ酸残基 3 0 7 6 ~ 3 0 9 2 の部分的な W W ドメインが保持されていたプラスミド) のタンパク質構造を図示する。

【 0 0 7 0 】

図 7 に示されるように、免疫染色は、L W₂、L W₄、L W₅ および L W₆ ではなく、L W₃ の正常な筋鞘局在を明らかにした。L W₂、L W₄、L W₅ および L W₆ は、異なるレベルの細胞質凝集体形成をもたらした。図 8 A ~ 8 B は、Y L 9 0 (図 8 A)、L W₂ (図 8 B)、L W₃ (図 8 C)、L W₄ (図 8 D)、L W₅ (図 8 E)、および L W₆ (図 8 F) のウエスタンブロット評価を示す。図 8 D に示されるように、L W₄ は発現の低下を示した。図 8 F に示されるように、L W₆ マイクロジストロフィンは検出されな

10

20

30

40

50

った。Y L 9 0 (図 8 A)、L W₂ (図 8 B)、L W₃ (図 8 C)、および L W₅ (図 8 E) は、同様のレベルの発現を示した。

【 0 0 7 1 】

図 9 A ~ 9 F (筋肉の H & E 染色) に示されるように、L W₃ (図 9 C) のみが Y L 9 0 (図 9 A) と同様の組織構造を示した。H & E 染色された筋肉の筋組織構造は、L W₂ (図 9 B)、L W₄ (図 9 D)、L W₅ (図 9 E)、および L W₆ (図 9 F) で悪化した。

【 0 0 7 2 】

L W₃ および Y L 9 0 マイクロジストロフィン (図 1 0) を A A V - 9 にパッケージ化し、3ヶ月齢のオス m d x 4 c v マウスの前脛骨筋に 1 e 1 2 v g / 筋肉で注射した。注射後 3 ヶ月で筋力分析、免疫学的および組織学的染色を行った。

10

【 0 0 7 3 】

図 1 1 A および 1 1 B に示されるように、L W₃ 発現 (図 1 1 A) は、Y L 9 0 発現 (図 1 1 B) よりも高く出現した。図 1 1 A および 1 1 B はまた、B L 6 マウスにおいてジストロフィンを示し、L W₃ または Y L 9 0 のいずれも注射されなかった (「 M d x 4 c v i n i n j 」 レーン) M d x 4 c v マウスにおいてジストロフィンを示さなかった。図 1 2 A は、同じプロット上の L W₃ または Y L 9 0 サンプルを用いたウエスタンブロットであり、L W₃ の発現が Y L 9 0 の発現よりわずかに低かったことを示している。図 1 2 B は、ローディングコントロールを示すためにピンキュリンを検出するウエスタンブロット分析である。図 1 2 C は、L W₃ の発現が Y L 9 0 の発現よりわずかに低かったが、統計的に有意ではなかったことを示している。

20

【 0 0 7 4 】

図 1 3 に示されるように、L W₃ および Y L 9 0 は、免疫染色された筋肉において同様の染色パターンを示した。L W₃ および Y L 9 0 の両方が D G C を回復した。L W₃ 処理マウスおよび Y L 9 0 処理マウスは、同様の筋肉組織構造を示した (図 1 4)。図 1 5 に示されるように、L W₃ 処理は、Y L 9 0 処理より高い筋力 (比単収縮力 [s p e c i f i c t w i t c h f o r c e] および比収縮力 [s p e c i f i c t e t a n i c f o r c e]) をもたらした。

【 0 0 7 5 】

これらの結果は、本開示の方法および組成物を、ジストロフィン異常症を治療するために使用できることを示した。本開示のマイクロジストロフィンおよび方法は、ジストロフィン異常症を治療するための代替マイクロジストロフィンを提供する。

30

【 0 0 7 6 】

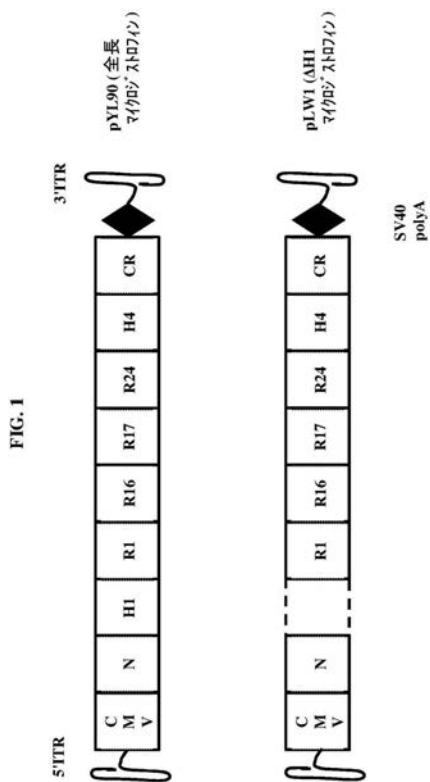
上記を考慮すると、本開示のいくつかの利点が達成され、他の有利な結果が得られることを理解するであろう。本開示の範囲から逸脱することなく上記の方法に様々な変更を加えることができるので、上記の記載に含まれ、添付の図面に示されるすべての事項は、限定ではなく例示として解釈されることを意図する。

【 0 0 7 7 】

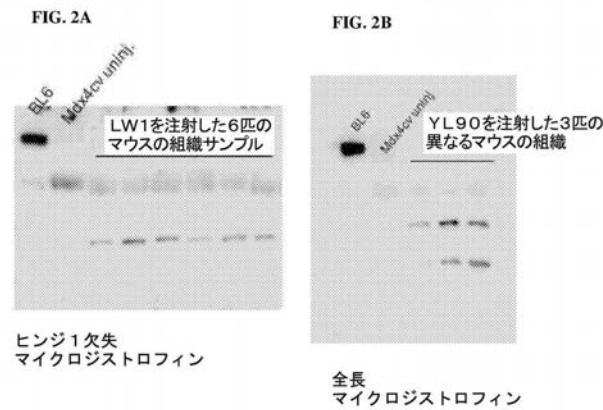
本開示の要素またはその様々なバージョン、実施形態もしくは態様を紹介するとき、冠詞「 a 」、「 a n 」、「 t h e 」、および「 s a i d 」は、一つまたは複数の要素が存在することを意味することを意図する。用語「含む (c o m p r i s i n g)」、「含む (i n c l u d i n g)」、および「有する」は、包括的であることを意図し、列挙された要素以外の追加の要素があり得ることを意味する。

40

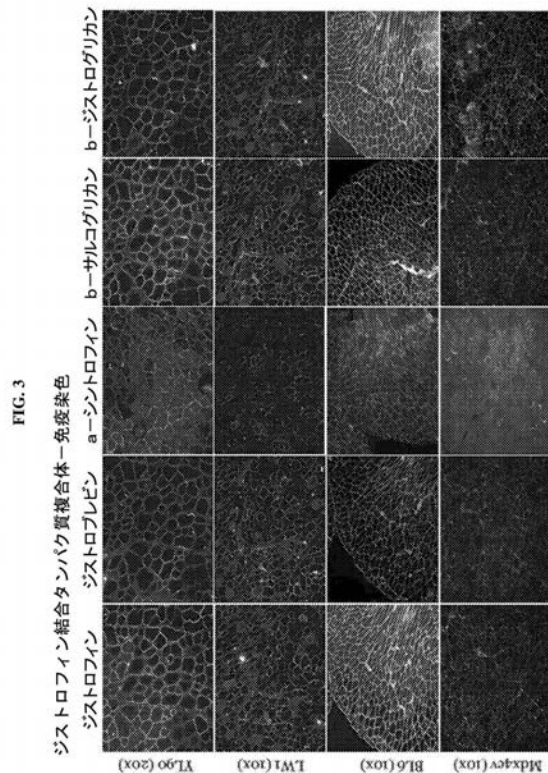
【 図 1 】



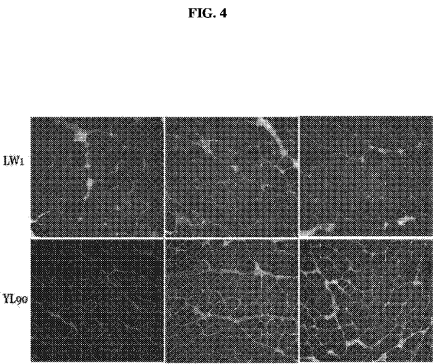
【 図 2 】



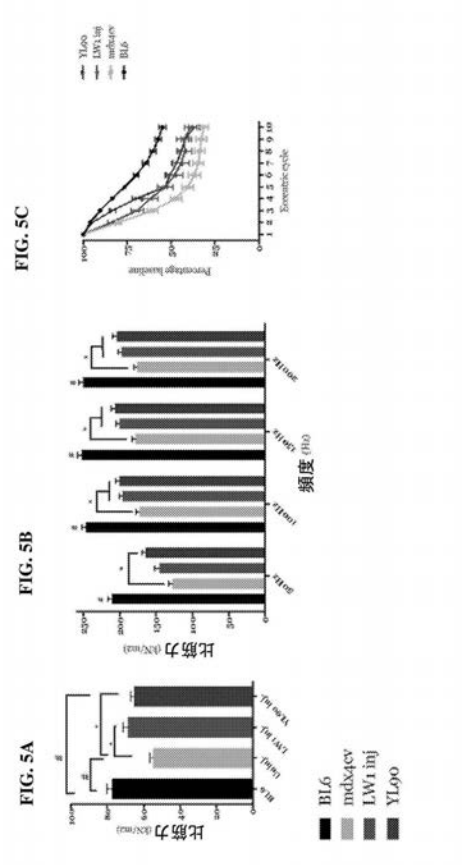
【 図 3 】



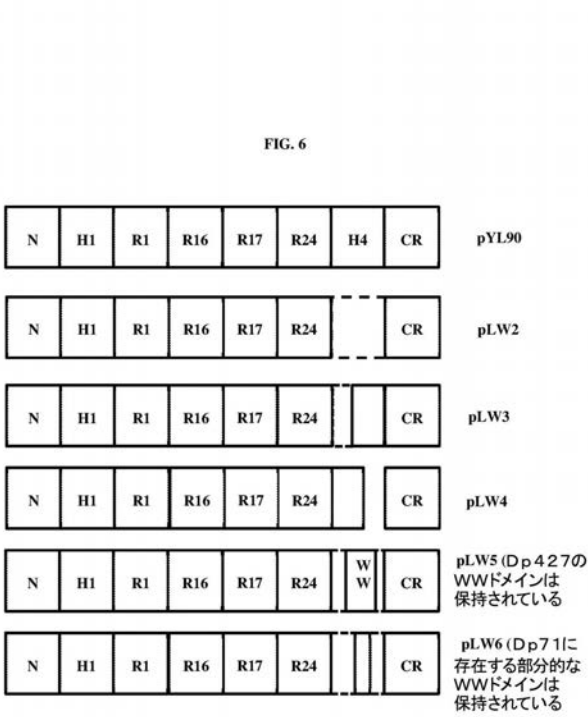
【 図 4 】



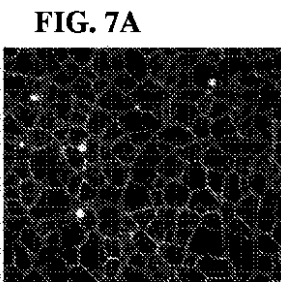
【 図 5 】



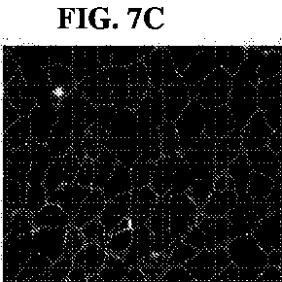
【 図 6 】



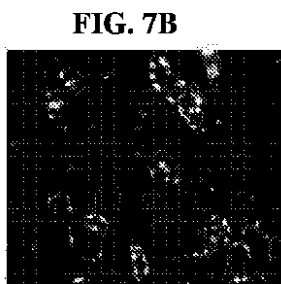
【 図 7 A 】



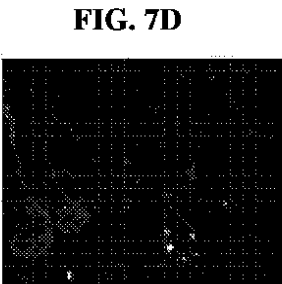
【 図 7 C 】



【 図 7 B 】

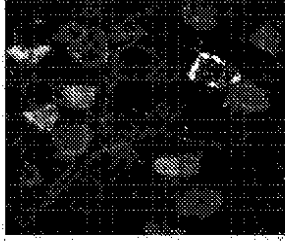


【 図 7 D 】



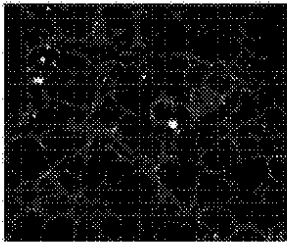
【図 7 E】

FIG. 7E



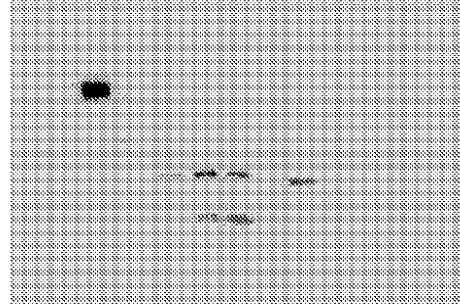
【図 7 F】

FIG. 7F



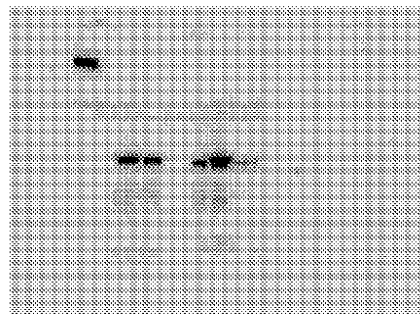
【図 8 A】

FIG. 8A



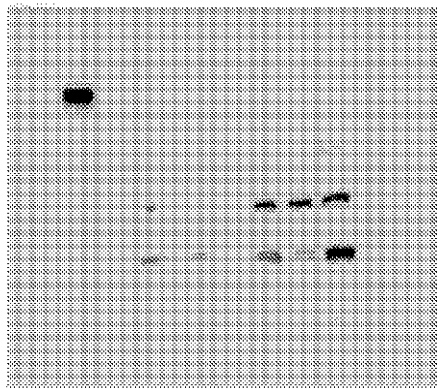
【図 8 B】

FIG. 8B



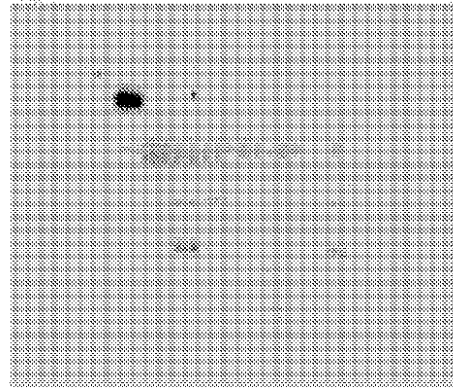
【図 8 C】

FIG. 8C



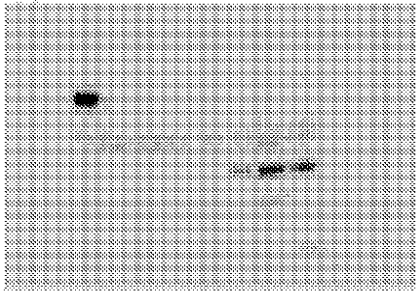
【図 8 D】

FIG. 8D



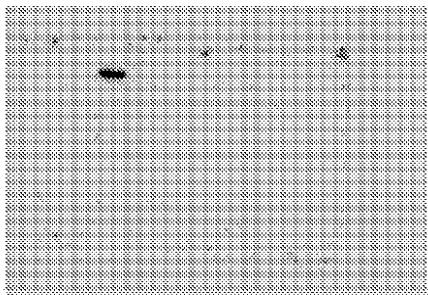
【図 8 E】

FIG. 8E



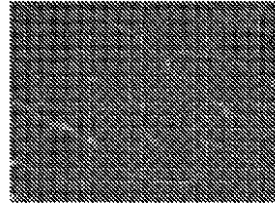
【図 8 F】

FIG. 8F



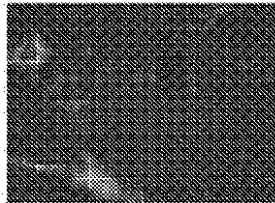
【図 9 A】

FIG. 9A



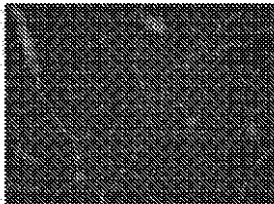
【図 9 B】

FIG. 9B



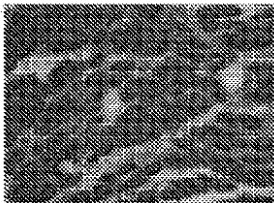
【図 9 C】

FIG. 9C



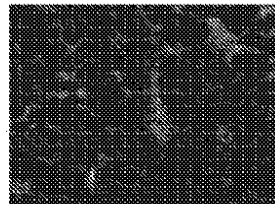
【図 9 D】

FIG. 9D



【図 9 E】

FIG. 9E

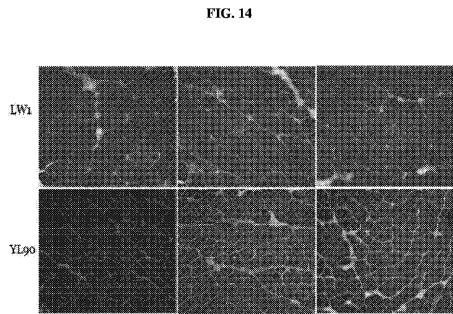


【図 9 F】

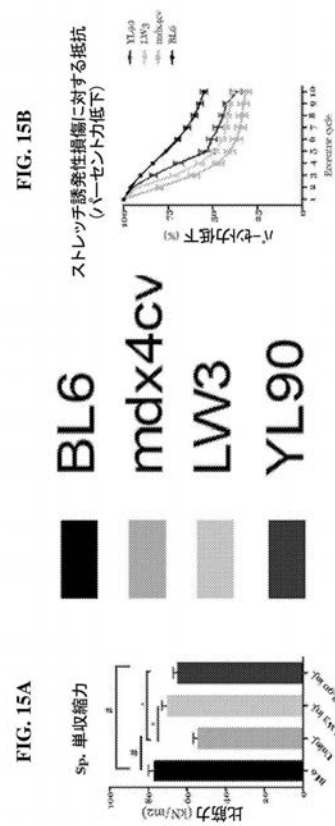
FIG. 9F



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 配 列 表 】

2021520196000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/25496		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/7088, A61K 31/7105, A61K 38/46 (2019.01) CPC - A61K 31/7105, A61K 38/46, A61K 45/06, C12N 15/113				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X ---- Y	US 2014/0234255 A1 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 21 August 2014 (21.08.2014) Entire document, specially abstract; para [0049] [0014] [0058] [0083] [0094] [0155] WO 2017/223128 A1 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 28 December 2017 (28.12.2017) abstract; pg 14, para 2.	1, 4, and 7-11 ----- 2-3, and 5-6 2-3, and 5-6		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 16 July 2019		Date of mailing of the international search report 30 JUL 2019		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/25496

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

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

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

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

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

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

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

Group I, claims 1-11, directed to a nucleic acid encoding a modified dystrophin, and a vector comprising the same.

Group II, claims 12-20, directed to a method for treating dystrophinopathy in a subject in need thereof.

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

-----Please see continuation in first extra sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-11

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/25496

--continued from Box III: Observations where unity of invention is lacking--

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a nucleic acid encoding a modified dystrophin, and a vector comprising the same, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of administering a vector or modified dystrophin protein to a subject in need thereof, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical feature of a vector comprising a nucleic acid encoding a modified dystrophin comprising a hinge region modification to at least one of a modification of hinge 1 (H1) region, a modification of hinge 4 (H4) region, and combinations thereof. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is taught by US 2014/0234255 A1 to the Curators of the University of Missouri (hereinafter 'UM').

UM discloses a vector comprising a nucleic acid encoding a modified dystrophin comprising a hinge region modification to at least one of a modification of hinge 1 (H1) region, a modification of hinge 4 (H4) region, and combinations thereof (abstract: "According to the embodiments described herein, a series of biological materials for treatment/therapy of DMD and/or BMD through the recovery of sarcolemmal nNOS is provided. The biological material comprises the complete dystrophin repeats R16 and R17 or certain domains, sections, or fragments of the dystrophin repeats R16 and R17."; para [0007] "a recombinant adeno-associated viral vector (AAV) that is able to express the R16/R17 or a functional fragment, component, or domain thereof"; [0049]: "As described in the Examples below, restoration of sarcolemmal nNOS by dystrophin repeats R16/17 is independent of other domains of dystrophin, such as the dystrophin NT and CR domains, H1, H4, R1 and R24, retained in the mini- or micro-genes in previous studies...constructs carrying various deletions based on the smallest nNOS binding dystrophin retaining the NT and CR domains, H1, H4, R1 and R24 (.DELTA.R2-R15/.DELTA.R18-R23/.DELTA.C; SEQ ID NO:3). FIGS. 1(A) and (B)"; FIG. 1(A) lists the schematic outlines of the microdystrophin constructs of R2-R15/R18-R23/C and its various deletions: deletion of R1/R24, further deletion of NT terminal and H1, or further deletion of CR terminal and H4."; FIG. 1 (A)).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 21/04 (2006.01)		A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)		A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	

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

(74) 代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(74) 代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(72) 発明者 トンション トアン
アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 1 1, コロンビア, ユニバーシティー ホール 3 1 6, シー
ノオーキュレイターズ オブ ザ ユニバーシティー オブ ミズーリ

(72) 発明者 ラクミニ ワサラ
アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 1 1, コロンビア, ユニバーシティー ホール 3 1 6, シー
ノオーキュレイターズ オブ ザ ユニバーシティー オブ ミズーリ

(72) 発明者 イー ライ
アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 1 1, コロンビア, ユニバーシティー ホール 3 1 6, シー
ノオーキュレイターズ オブ ザ ユニバーシティー オブ ミズーリ

(72) 発明者 ヨンピン ユエ
アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 1 1, コロンビア, ユニバーシティー ホール 3 1 6, シー
ノオーキュレイターズ オブ ザ ユニバーシティー オブ ミズーリ

F ターム(参考) 4C084 AA13 MA17 MA55 MA66 NA14 ZA361 ZA362 ZA941 ZA942 ZC021
ZC022

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA17 MA55 MA66 NA14 ZA36 ZA94
ZC02