

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-527742

(P2024-527742A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(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 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	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全92頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-501135(P2024-501135)	(71)出願人 513204012 インスメッド インコーポレイテッド アメリカ合衆国 0 8 8 0 7 - 1 7 0 4 ニュージャージー州ブリッジウォーター 、ユーエス・ハイウェイ 2 0 2 / 2 0 6 、 7 0 0 番
(86)(22)出願日 令和4年8月5日(2022.8.5)	(74)代理人 100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85)翻訳文提出日 令和6年1月25日(2024.1.25)	(74)代理人 100109346 弁理士 大貫 敏史
(86)国際出願番号 PCT/US2022/074622	(74)代理人 100117189 弁理士 江口 昭彦
(87)国際公開番号 WO2023/015304	(74)代理人 100134120 弁理士 内藤 和彦
(87)国際公開日 令和5年2月9日(2023.2.9)	(72)発明者 カスパー、ブライアン
(31)優先権主張番号 63/229,936	
(32)優先日 令和3年8月5日(2021.8.5)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(31)優先権主張番号 63/239,881	
(32)優先日 令和3年9月1日(2021.9.1)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA 最終頁に続く	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノ随伴ウイルス粒子及びその使用方法

(57)【要約】

本発明は、A A V粒子を含む髄腔内組成物、及びデュシエンヌ型筋ジストロフィーを含むジストロフィノパシーなどの単一遺伝子筋肉障害を治療するためのそれらの使用を提供する。

【選択図】 図 1 1 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量のアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子と、薬学的に許容可能な担体と、を含む、髄腔内組成物であって、前記 AAV 粒子が、ベクターゲノムをカプシド封入するカプシドを含み、前記ベクターゲノムが、5' から 3' まで、

5' 逆位末端反復（ITR）と、

プロモーターと、

SV40 イントロンと、

マイクロジストロフィン（ $\mu D y s$ ）導入遺伝子と、

SV40 ポリ（A）テールと、

3' ITR と、を含み、

10

前記有効量の前記 AAV 粒子が、静脈内組成物中の $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入する有効量の AAV 粒子よりも約 90% 以下のベクターゲノムを含む、髄腔内組成物。

【請求項 2】

有効量のアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子と、薬学的に許容可能な担体と、を含む、髄腔内組成物であって、前記 AAV 粒子が、ベクターゲノムをカプシド封入するカプシドを含み、前記ベクターゲノムが、5' から 3' まで、

5' ITR と、

エンハンサーと、

プロモーターと、

マイクロジストロフィン（ $\mu D y s$ ）導入遺伝子と、

SV40 ポリ（A）テールと、

3' ITR と、を含み、

20

前記有効量の前記 AAV 粒子が、静脈内組成物中の $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入する有効量の AAV 粒子よりも約 90% 以下のベクターゲノムを含む、髄腔内組成物。

【請求項 3】

前記エンハンサーが、SK-CRM4 エンハンサーである、請求項 2 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 4】

前記 SK-CRM4 エンハンサーが、配列番号 8 を含む配列を有する、請求項 3 に記載の髄腔内組成物。

30

【請求項 5】

前記エンハンサーが、サイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーである、請求項 2 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 6】

前記サイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーが、配列番号 9 を含む配列を有する、請求項 5 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 7】

前記ベクターゲノムが、前記マイクロジストロフィン導入遺伝子の 5'（上流）及び前記プロモーターの 3'（下流）に SV40 イントロンを更に含む、請求項 2 に記載の髄腔内組成物。

40

【請求項 8】

前記ベクターゲノムが、(i) アクチン結合部位を含む N 末端領域（NTD）と、(ii) 2～4 個のヒンジ領域及び 4～6 個のスペクトリン反復を含む中央ロッドドメインと、(iii) システイン豊富ドメインと、を含む、 $\mu D y s$ タンパク質をコードするマイクロジストロフィン（ $\mu D y s$ ）導入遺伝子を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 9】

前記ベクターゲノム静脈内組成物が、(i) アクチン結合部位を含む N 末端領域（NTD）と、(ii) 3 個のヒンジ領域及び 4 個のスペクトリン反復を含む中央ロッドドメイ

50

ンと、(i i i) システイン豊富ドメインと、を含む、 $\mu D y s$ タンパク質をコードするマイクロジストロフィン ($\mu D y s$) 導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 0】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 1 6 及び 1 7 を含む、請求項 8 又は 9 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 1】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 1 及び 2 4 を含む、請求項 8 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 2】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 2 を含む、請求項 8 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 3】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 2 2 を含む、請求項 8 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 4】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 2 3 を含む、請求項 8 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 5】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 1、1 6、1 7、2 3、及び 2 4 を含む、請求項 8 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 6】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 1、2、3、及び 2 4 を含む、請求項 8 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 7】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復 1、2、2 2、2 3、及び 2 4 を含む、請求項 8 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 8】

前記ヒンジ領域が、ジストロフィンヒンジ領域 1 及び 4 を含む、請求項 8 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 1 9】

前記ヒンジ領域が、ヒンジ領域 1、3、及び 4 を含む、請求項 8 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 2 0】

前記マイクロジストロフィン導入遺伝子が、配列番号 5 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 2 1】

前記マイクロジストロフィン導入遺伝子が、配列番号 5 からなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 2 2】

前記 5' I T R が、A A V 2 I T R である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 2 3】

前記 5' A A V 2 I T R が、配列番号 1 を含む配列を有する、請求項 2 2 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 2 4】

前記 5' A A V 2 I T R が、配列番号 1 からなる配列を有する、請求項 2 2 又は 2 3 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 2 5】

前記 3' I T R が、A A V 2 I T R である、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

髄腔内組成物。

【請求項 26】

前記 3' AAV2 ITR が、配列番号 7 を含む配列を有する、請求項 25 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 27】

前記 3' AAV2 ITR が、配列番号 7 からなる配列を有する、請求項 25 又は 26 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 28】

前記プロモーターが、MHCK7プロモーターである、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 29】

前記プロモーターが、ニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターである、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 30】

前記ニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターが、配列番号 3 に記載される配列を含む、請求項 29 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 31】

前記 MHCK7プロモーターが、配列番号 2 に記載される配列を含む、請求項 28 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 32】

前記 MHCK7プロモーターが、配列番号 2 に記載される配列からなる、請求項 28 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 33】

前記 SV40 イントロンが、配列番号 4 に記載される核酸配列を含む、請求項 1 及び 3 ~ 32 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 34】

前記 SV40 イントロンが、配列番号 4 に記載される核酸配列からなる、請求項 1 及び 3 ~ 32 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 35】

前記 SV40 ポリ(A)テールが、配列番号 6 に記載される核酸配列を含む、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 36】

前記 SV40 ポリ(A)テールが、配列番号 6 に記載される核酸配列からなる、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 37】

前記カプシドが、1つ以上の AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又は AAV13 カプシドタンパク質を含む、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 38】

前記 AAV 粒子が、AAV9 粒子であり、前記カプシドが、AAV9 カプシドタンパク質からなる、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 39】

前記 AAV 粒子が、AAV9 粒子であり、前記カプシドが、AAV9 カプシドタンパク質からなる、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 40】

前記カプシドが、1つ以上の AAV9 カプシドタンパク質を含む、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 41】

前記 1つ以上の AAV9 カプシドタンパク質が、AAV9 カプシドタンパク質 VP1 を

10

20

30

40

50

含む、請求項 40 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 42】

前記 1 つ以上の AAV9 カプシドタンパク質が、AAV9 カプシドタンパク質 VP2 を含む、請求項 40 又は 41 に記載の髄腔内組成物。

【請求項 43】

前記 1 つ以上の AAV9 カプシドタンパク質が、AAV9 カプシドタンパク質 VP3 を含む、請求項 40 ~ 42 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 44】

前記 AAV 粒子が、AAV9 粒子である、請求項 1 ~ 43 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

10

【請求項 45】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 AAV 粒子が、前記静脈内組成物中の前記有効量の前記 AAV 粒子よりも約 80% 以下のベクターゲノムを含む、請求項 1 ~ 44 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 46】

前記有効量の前記 AAV 粒子が、前記静脈内組成物中の前記有効量の前記 AAV 粒子よりも約 70% 以下のベクターゲノムを含む、請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

【請求項 47】

前記有効量の前記 AAV 粒子が、前記有効量の前記静脈内組成物よりも約 10 ~ 40 倍少ないベクターゲノムを含む、請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物。

20

【請求項 48】

ジストロフィノパチーの治療を必要とする対象においてジストロフィノパチーを治療する方法であって、請求項 1 ~ 47 のいずれか一項に記載の髄腔内組成物を単回用量で前記対象に髄腔内投与することを含む、方法。

【請求項 49】

前記対象が、約 6 ヶ月 ~ 約 7 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記対象が、約 1 歳 ~ 約 7 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記対象が、約 2 歳 ~ 約 7 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

30

【請求項 52】

前記対象が、約 3 歳 ~ 約 7 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 53】

前記対象が、約 4 歳 ~ 約 7 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 54】

前記対象が、約 5 歳 ~ 約 7 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 55】

前記対象が、約 2 歳 ~ 約 6 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 56】

前記対象が、約 2 歳 ~ 約 5 歳の男性対象である、請求項 48 に記載の方法。

40

【請求項 57】

前記ジストロフィノパチーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) である、請求項 48 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記ジストロフィノパチーが、ベッカー型筋ジストロフィーである、請求項 48 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記ジストロフィノパチーが、DMD 関連拡張型心筋症 (DCM) である、請求項 48 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 60】

前記対象が、前記治療中にトレンデレンブルグ位に配置される、請求項 48 ~ 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記髄腔内組成物が、非イオン性低浸透圧造影剤の非存在下で投与される、請求項 48 ~ 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 AAV 粒子が、静脈内投与される同一のベクターゲノム用量の同じ AAV 粒子よりも優れた治療応答を提供する、請求項 45 ~ 61 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 63】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 AAV 粒子が、静脈内投与されたときの前記静脈内組成物中の同一のベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも優れた治療応答を提供する、請求項 48 ~ 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

前記髄腔内組成物が、前記静脈内組成物中の有効ベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも約 90%、約 90% 以下、約 75%、約 75% 以下、約 50%、約 50% 以下、約 25%、又は約 25% 以下の有効ベクターゲノム用量を含む、請求項 48 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

髄腔内組成物が、前記静脈内組成物中の前記有効ベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも約 90% 以下の有効ベクターゲノム用量を含む、請求項 48 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 66】

髄腔内組成物が、前記静脈内組成物中の前記有効ベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも約 80% 以下の有効ベクターゲノム用量を含む、請求項 48 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

髄腔内組成物が、前記静脈内組成物中の前記有効ベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも約 75% 以下の有効ベクターゲノム用量を含む、請求項 48 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 68】

髄腔内組成物が、前記静脈内組成物中の前記有効ベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも約 50% 以下の有効ベクターゲノム用量を含む、請求項 48 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

髄腔内組成物が、前記静脈内組成物中の前記有効ベクターゲノム用量の前記 AAV 粒子よりも約 25% 以下の有効ベクターゲノム用量を含む、請求項 48 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

治療することが、前記対象のベースラインノースター歩行評価 (NSAA) スコアと比較して、治療後の前記対象の NSAA スコアを増加させることを含む、請求項 48 ~ 69 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 71】

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 5 ~ 約 25、又は約 5 ~ 約 20、約 5 ~ 約 15、又は約 5 ~ 約 10 だけ増加させることを含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 2 ~ 約 12 点増加させることを含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

50

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 2 ~ 約 10 点増加させることを含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 74】

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 3 ~ 約 10 点増加させることを含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 75】

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 4 ~ 約 10 点増加させることを含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 76】

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 2 ~ 約 8 点増加させることを含む、請求項 0 に記載の方法。 10

【請求項 77】

前記スコアを増加させることが、前記スコアを約 2 ~ 約 6 点増加させることを含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 78】

前記対象の前記ベースライン NSAA スコアが、前記対象が前記治療方法を受ける前に測定される、請求項 70 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

治療後の前記 NSAA スコアが、前記組成物の髄腔内投与の 6 ヶ月後に測定される、請求項 70 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 80】

治療後の前記 NSAA スコアが、前記組成物の髄腔内投与の 12 ヶ月後に測定される、請求項 70 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

治療後の前記 NSAA スコアが、前記組成物の髄腔内投与の 18 ヶ月後に測定される、請求項 70 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

治療後の前記 NSAA スコアが、前記組成物の髄腔内投与の 24 ヶ月後に測定される、請求項 70 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】 30

治療することが、6 分間歩行試験 (6 MWT) において前記対象が歩くベースラインメートル数と比較して、治療後の前記 6 MWT において前記対象が歩くメートル数を増加させることを含む、請求項 48 ~ 82 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 84】

前記 6 MWT において前記対象が歩く前記ベースラインメートル数が、前記対象が前記治療方法を受ける前に測定される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 6 ヶ月後に評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 86】 40

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 12 ヶ月後に評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 87】

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 18 ヶ月後に評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 88】

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 24 ヶ月後に評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 89】

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 36 ヶ月後に 50

評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 90】

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 48 ヶ月後に評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 91】

治療後の前記 6 分間歩行試験 (6 MWT) が、前記組成物の髄腔内投与の 60 ヶ月後に評価される、請求項 83 又は 84 に記載の方法。

【請求項 92】

前記 6 MWT において前記対象が歩くメートル数を増加させることが、約 5 メートル～約 50 メートル、約 5 メートル～約 45 メートル、約 5 メートル～約 40 メートル、約 5 メートル～約 35 メートル、約 5 メートル～約 30 メートル、約 5 メートル～約 25 メートル、約 5 メートル～約 20 メートル、約 5 メートル～約 15 メートル、又は約 5 メートル～約 10 メートル増加させることを含む、請求項 83～91 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 93】

前記有効量の髄腔内に投与された前記 AAV 粒子が、有効用量で静脈内投与される μ Dys 導入遺伝子をカプシド封入する AAV 粒子と比較して、副作用の数の減少、又は 1 つ以上の副作用の重症度の低減をもたらす、請求項 48～92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 94】

前記髄腔内組成物が、肝組織における μ Dys 導入遺伝子発現の量と比較して、骨格筋及び心筋においてより優れた μ Dys 導入遺伝子発現を提供する、請求項 48～93 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 95】

前記有効量の前記髄腔内組成物が、肝組織における μ Dys 導入遺伝子発現の量と比較して、骨格筋又は心筋においてより優れた μ Dys 導入遺伝子発現を提供する、請求項 48～93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

前記有効量の前記髄腔内組成物が、肝組織における μ Dys 導入遺伝子発現の量と比較して、骨格筋においてより優れた μ Dys 導入遺伝子発現を提供する、請求項 48～93 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 97】

前記有効量の前記髄腔内組成物が、肝組織における μ Dys 導入遺伝子発現の量と比較して、心筋においてより優れた μ Dys 導入遺伝子発現を提供する、請求項 48～93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記より優れた μ Dys 導入遺伝子発現が、肝組織における μ Dys 導入遺伝子発現の量と比較して、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、又は少なくとも約 80% 優れた発現である、請求項 94～97 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 99】

前記髄腔内組成物の投与の 18 ヶ月後に測定された前記治療応答が、前記髄腔内組成物の投与の 12 ヶ月後に測定された前記治療応答と実質的に同じであるか、又はそれよりも良好である、請求項 48～98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

前記髄腔内組成物の投与の 24 ヶ月後に測定された前記治療応答が、前記髄腔内組成物の投与の 12 ヶ月後に測定された前記治療応答と実質的に同じであるか、又はそれよりも良好である、請求項 48～98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 101】

対象の骨格筋及び / 又は心筋にマイクロジストロフィン (μ Dys) 導入遺伝子を優先

50

的に送達するための方法であって、

有効量のアデノ随伴ウイルス血清型 9 (A A V 9) 粒子と、薬学的に許容可能な担体と、を含む、髄腔内組成物を、単回用量で対象に髄腔内投与することを含み、前記 A A V 9 粒子が、ベクターゲノムをカプシド封入する A A V 9 カプシドを含み、前記ベクターゲノムが、5'から3'まで、

5' I T R と、
プロモーターと、
μ D y s 導入遺伝子と、
S V 4 0 ポリ (A) テールと、
3' I T R と、を含み、

10

投与後、前記 μ D y s 導入遺伝子が、前記対象の肝組織における導入遺伝子発現と比較して、前記対象の骨格筋又は心筋においてより高いレベルで発現される、方法。

【請求項 1 0 2】

投与後、前記 μ D y s 導入遺伝子が、前記対象の肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現と比較して、前記対象の骨格筋においてより高いレベルで発現される、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

投与後、前記 μ D y s 導入遺伝子が、前記対象の肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現と比較して、前記対象の心筋においてより高いレベルで発現される、請求項 1 0 1 又は 1 0 2 に記載の方法。

20

【請求項 1 0 4】

投与後、前記 μ D y s 導入遺伝子が、前記対象の肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現と比較して、前記対象の骨格筋及び心筋においてより高いレベルで発現される、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記より高いレベルが、肝組織における導入遺伝子発現の量と比較して、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、又は少なくとも約 8 0 % 高い、請求項 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

30

前記 5' I T R が、A A V 2 I T R である、請求項 1 0 1 ~ 1 0 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記 5' A A V 2 I T R が、配列番号 1 の配列を含む、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記 5' A A V 2 I T R が、配列番号 1 からなる配列を有する、請求項 1 0 6 又は 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記 3' I T R が、A A V 2 I T R である、請求項 1 0 1 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 1 0】

前記 3' A A V 2 I T R が、配列番号 7 を含む配列を有する、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記プロモーターが、M H C K 7 プロモーターである、請求項 1 0 1 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記 M H C K 7 プロモーターが、配列番号 2 を含む配列を有する、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

50

前記プロモーターが、ニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターである、請求項 101 ~ 110 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

前記ニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターが、配列番号 3 を含む配列を有する、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

前記ベクターゲノムが、前記導入遺伝子の 5' (上流) 及び前記プロモーターの 3' (下流) に SV40 イントロンを更に含む、請求項 101 ~ 114 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 116】

前記 SV40 イントロンが、配列番号 4 を含む配列を有する、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

前記 SV40 イントロンが、配列番号 4 からなる配列を有する、請求項 115 又は 116 に記載の方法。

【請求項 118】

前記 SV40 ポリ (A) テールが、配列番号 6 を含む配列を有する、請求項 101 ~ 117 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 119】

前記ベクターゲノムが、エンハンサーが前記 5' ITR の 3' (下流) 及び前記プロモーターの 5' (上流) にあることを更に含む、請求項 101 ~ 118 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 120】

前記エンハンサーが、SK-CRM4 エンハンサーである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記 SK-CRM4 エンハンサーが、配列番号 8 を含む配列を有する、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】

前記エンハンサーが、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサーである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 123】

前記サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサーが、配列番号 9 を含む配列を有する、請求項 122 に記載の方法。

【請求項 124】

前記対象が、前記投与中にトレンデレンブルグ位に配置される、請求項 101 ~ 123 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 125】

前記髄腔内組成物が、非イオン性低浸透圧造影剤の非存在下で投与される、請求項 101 ~ 124 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 126】

髄腔内投与された前記 AAV9 粒子の用量が、静脈内投与される同一用量の同じ AAV9 粒子と比較して、骨格筋及び / 又は心筋においてより優れた導入遺伝子発現を提供する、請求項 101 ~ 125 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 127】

前記髄腔内投与された AAV9 粒子によって提供される [(骨格筋及び / 又は心筋導入遺伝子発現)] / (肝臓導入遺伝子発現)] の比が、同一用量の同じ AAV9 粒子が静脈内投与されるときと同じ比よりも大きい、請求項 101 ~ 126 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 128】

10

20

30

40

50

前記導入遺伝子が、(i)アクチン結合部位を含むNTDと、(ii)2~4個のヒンジ領域及び4~6個のスペクトリン反復を含む中央ロッドドメインと、(iii)システイン豊富ドメインと、を含む、マイクロジストロフィンタンパク質をコードするマイクロジストロフィン導入遺伝子である、請求項101~127のいずれか一項に記載の方法。

【請求項129】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復16及び17を含む、請求項128に記載の方法。

【請求項130】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復1及び24を含む、請求項128又は129に記載の方法。

【請求項131】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復2を含む、請求項128~130のいずれか一項に記載の方法。

【請求項132】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復22を含む、請求項128~130のいずれか一項に記載の方法。

【請求項133】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復23を含む、請求項128~130のいずれか一項に記載の方法。

【請求項134】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復16及び17を含む、請求項128に記載の方法。

【請求項135】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復1、16、17、23、及び24を含む、請求項128に記載の方法。

【請求項136】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復1、2、3、及び24を含む、請求項128に記載の方法。

【請求項137】

前記スペクトリン反復が、スペクトリン反復1、2、22、23、及び24を含む、請求項128に記載の方法。

【請求項138】

前記ヒンジ領域が、ジストロフィンヒンジ領域1及び4を含む、請求項128~137のいずれか一項に記載の方法。

【請求項139】

前記ヒンジ領域が、ヒンジ領域1、3、及び4を含む、請求項128~137のいずれか一項に記載の方法。

【請求項140】

前記マイクロジストロフィン導入遺伝子が、配列番号5を含む、請求項128に記載の方法。

【請求項141】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記AAV粒子が、約 1.0×10^9 ~約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項48~140のいずれか一項に記載の方法。

【請求項142】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記AAV粒子が、約 1.0×10^9 ~約 1×10^{15} ベクターゲノムである、請求項48~140のいずれか一項に記載の方法。

【請求項143】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記AAV粒子が、約 1.0×10^9 ~約 1×10^{14} ベクターゲノムである、請求項48~140のいずれか一項に記載の方法。

【請求項144】

10

20

30

40

50

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1.0×10^9 ~ 約 1×10^{13} ベクターゲノムである、請求項 48 ~ 140 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 145】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1.0×10^9 ~ 約 1×10^{12} ベクターゲノムである、請求項 48 ~ 140 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 146】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1.0×10^9 ~ 約 1×10^{11} ベクターゲノムである、請求項 48 ~ 140 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 147】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1.0×10^9 ~ 約 1×10^{10} ベクターゲノムである、請求項 48 ~ 140 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 148】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 149】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{15} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 150】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{14} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。 20

【請求項 151】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{13} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 152】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{12} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 153】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{11} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 154】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{11} ~ 約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。 30

【請求項 155】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{12} ~ 約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 156】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{13} ~ 約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 157】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{14} ~ 約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。 40

【請求項 158】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 1×10^{15} ~ 約 1×10^{16} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 159】

前記髄腔内組成物中の前記有効量の前記 A A V 粒子が、約 2.5×10^{13} ~ 約 1×10^{14} ベクターゲノムである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 160】

治療応答を提供するために十分な髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物のベクターゲノム用量よりも約 2 倍、 50

約 5 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 35 倍、約 40 倍、約 45 倍、約 50 倍、約 55 倍、約 60 倍、約 65 倍、約 70 倍、約 75 倍、約 80 倍、約 85 倍、約 90 倍、約 95 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、約 250 倍低い、請求項 48 ~ 159 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 161】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 10 倍 ~ 40 倍低い、請求項 160 に記載の方法。

【請求項 162】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 20 倍低い、請求項 160 に記載の方法。

10

【請求項 163】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 40 倍低い、請求項 160 に記載の方法。

【請求項 164】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 100 倍低い、請求項 160 に記載の方法。

20

【請求項 165】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも少なくとも約 2 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 15 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 35 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 45 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 55 倍、少なくとも約 60 倍、少なくとも約 65 倍、少なくとも約 70 倍、少なくとも約 75 倍、少なくとも約 80 倍、少なくとも約 85 倍、少なくとも約 90 倍、少なくとも約 95 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 150 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 250 倍低い、請求項 48 ~ 159 のいずれか一項に記載の方。

30

【請求項 166】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 10 倍低い、請求項 165 に記載の方法。

【請求項 167】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 20 倍低い、請求項 165 に記載の方法。

【請求項 168】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 40 倍低い、請求項 165 に記載の方法。

40

【請求項 169】

治療応答を提供するために十分な前記髄腔内ベクターゲノム用量が、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な前記静脈内組成物の前記ベクターゲノム用量よりも約 100 倍低い、請求項 165 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

本出願は、2021年8月5日に出願された米国仮特許出願第63/229,936号、及び2021年9月1日に出願された米国仮特許出願第63/239,881号の優先権を主張するものであり、その各々の内容は、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる。

【発明の分野】

【0002】

本発明は、概して、マイクロジストロフィン導入遺伝子を送達するためのアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子、AAV粒子を産生する方法、AAV粒子を産生する細胞、並びにジストロフィンパッチ、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療のための骨格筋及び/又は心筋へのマイクロジストロフィン導入遺伝子の送達のためにAAV粒子を使用する方法に関する。

10

【0003】

配列表の組み込み

本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにXML形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むXMLファイルの名称は、INMD_166_02WO_Seqlist_ST26.xmlである。XMLファイルは、約40,532バイトであり、2022年8月3日に作成され、USPTO特許センターを介して電子的に提出されている。

【背景技術】

【0004】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、X連鎖劣性パターンで遺伝し、筋肉が適切に機能するために必要とするタンパク質であるジストロフィンを身体が産生することを妨げる、遺伝子変異によって引き起こされる。DMDは、部分的に進行性筋肉変性を特徴とする。疾患が進行するにつれて、最初は大腿、骨盤、及び腕の筋肉に影響を及ぼし、DMDは、最終的に全ての随意筋に影響を及ぼし、後の段階では心筋及び呼吸筋に關与する。欧州及び北米では、DMDの有病率は、3,600件の男性の出生に約1件である。DMDは、最も高頻度の小児型筋ジストロフィーであり、ほぼ独占的に男性に影響を及ぼす。DMDの既知の治療法はなく、現在の治療基準は、主に、ステロイド、免疫抑制剤、抗痙攣薬、ブレース、矯正手術、及び補助換気を含む、症状の管理を目的としている。DMDに関連する拡張型心筋症の積極的な管理には、重度の症例における抗うっ血薬及び心臓移植が含まれる。

20

30

【0005】

遺伝子療法は、核酸が変異遺伝子又は非機能的遺伝子を保有する細胞に送達されて、変異細胞の欠陥を補正する、急速に加速している治療アプローチである。ある特定の遺伝子療法では、核酸は、核酸を細胞に送達するアデノ随伴ウイルス(AAV)内にパッケージ化される。細胞核の内側に入ると、次いで、核酸は、適切なタンパク質産生を誘導し、ウイルスは、安全に分解される。DMDの治療のための遺伝子療法が提案されているが、患者の毒性につながる高い全身ウイルス価の送達を必要とし、患者当たり必要とされる大量のウイルスに起因する高い製造コストを有する。

【0006】

動物モデル及びヒトにおける、修飾されているが機能的な短縮ジストロフィン核酸配列である、マイクロジストロフィン(μ Dys)の送達は、筋機能を促進することが報告されている。 μ Dys導入遺伝子は、427kDaのジストロフィンタンパク質の固有の機能ドメインの様々な組み合わせをコードするように設計されている。概して、長さが5キロベース未満である、 μ Dys配列は、DMD研究のための最も広く使用されている動物モデルであるmdxマウスを使用して、DMDのマウスモデルにおいて μ Dys導入遺伝子を送達するためにAAVを使用して試験されている。mdxマウスにおける変異は、完全長ジストロフィン発現を中止したエクソン23におけるナンセンス点変異(CからTへの移行)である(参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Sicinski et al. (1989) Science 244, pp. 1578-1580)。 μ Dy

40

50

s の送達を示している有望性にもかかわらず、新規の治療法が、D M D の治療のために必要とされる。本発明は、この必要性及び他の必要性に対処する。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、部分的に、マイクロジストロフィン ($\mu D y s$) 導入遺伝子をパッケージ化する (すなわち、カプシド封入する) カプシドを含む、アデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、及び例えば、髄腔内投与によって、同粒子を用いて様々なジストロフィノパチーを治療するための方法に関する。一実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、(i) アクチン結合部位を含む N 末端領域 (N T D) と、(i i) 3 個のヒンジ領域及び 4 個のスペクトリン反復を含むドメインと、(i i i) システイン豊富ドメインと、を含む、 $\mu D y s$ ポリペプチドをコードする。 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、一実施形態では、配列番号 5 に記載される核酸配列を含む。

10

【0008】

一態様では、ベクターゲノムをカプシド封入するカプシドを含む、A A V 粒子が提供される。ベクターゲノムは、一実施形態では、5' から 3' まで、5' 逆位末端反復 (I T R) と、プロモーターと、 $\mu D y s$ 導入遺伝子と、S V 4 0 ポリ (A) テールと、3' I T R と、を含む。 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、一実施形態では、(i) アクチン結合部位を含む N 末端領域 (N T D) と、(i i) 2 ~ 4 個のヒンジ領域及び 4 ~ 6 個のスペクトリン反復を含む中央ロッドドメインと、(i i i) システイン豊富ドメインと、を含む、ポリペプチドをコードする。更なる実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、N T D と、ヒンジ領域 1、2、及び 4 と、スペクトリン反復 1、2、3、及び 2 4 と、システイン豊富ドメインと、を含む、 $\mu D y s$ ポリペプチドをコードする。その上更なる実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、配列番号 5 に記載される核酸配列を含む。A A V 粒子は、一実施形態では、A A V 9 粒子であり、髄腔内組成物中に有効量で存在する。有効量の A A V 粒子は、一実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子、例えば、髄腔内組成物中に存在する同じ $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む静脈内 (I V) 組成物の有効ベクターゲノム量よりも約 9 0 % 以下のベクターゲノムを含む。

20

【0009】

一実施形態では、ベクターゲノムは、 $\mu D y s$ 導入遺伝子の 5' (上流) 及びプロモーターの 3' (下流) に S V 4 0 イントロンを更に含む。別の実施形態では、ベクターゲノムは、エンハンサーが 5' I T R の 3' (下流) 及びプロモーターの 5' (上流) にあることを更に含む。

30

【0010】

プロモーターは、一実施形態では、M H C K 7 又はニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターである。

【0011】

好ましい実施形態では、A A V 粒子は、A A V 9 粒子であり、すなわち、A A V 粒子は、1 つ以上の A A V 9 カプシドタンパク質を含む。A A V 9 粒子のカプシドは、一実施形態では、A A V 9 カプシドタンパク質からなる。更に別の実施形態では、A A V 粒子は、A A V r h 7 4 粒子である。

40

【0012】

いくつかの実施形態では、本発明の組み換え A A V ベクターゲノムは、5' から 3' まで、5' I T R と、S K - C R M 4 エンハンサーと、プロモーターと、 $\mu D y s$ 導入遺伝子と、S V 4 0 ポリ (A) テールと、3' I T R と、を含む。いくつかの実施形態では、S K - C R M 4 エンハンサーは、配列番号 8 を含むか、又はそれからなる配列を有する。いくつかの実施形態では、 $\mu D y s$ コード配列は、アクチン結合ドメインと、少なくとも 4 個のスペクトリン反復、例えば、4 ~ 6 個のスペクトリン反復と、を含む、 $\mu D y s$ タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、配列番号 5 の核酸配列を含むか、又はそれからなる。

【0013】

50

いくつかの実施形態では、本発明のカプシド封入ベクターゲノムは、5' AAV2 ITR及び3' AAV2 ITRを含む。いくつかの実施形態では、5' AAV2 ITRは、配列番号1を含むか、又はそれからなる配列を有する。いくつかの実施形態では、3' AAV2 ITRは、配列番号7を含むか、又はそれからなる配列を有する。

【0014】

いくつかの実施形態では、カプシド封入ベクターゲノムは、MHCK7プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、MHCK7プロモーターは、配列番号2を含むか、又はそれからなる配列を有する。別の実施形態では、プロモーターは、ニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターである。更なる実施形態では、ニワトリ - アクチンハイブリッドプロモーターは、配列番号3に記載される核酸配列を有する。

10

【0015】

いくつかの実施形態では、本発明のカプシド封入ベクターゲノムは、配列番号4を含むか、又はそれからなる配列を有するSV40イントロンを含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、カプシド封入ベクターゲノムは、配列番号6を含むか、又はそれからなる配列を有するSV40ポリ(A)テールを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、AAV粒子のカプシドは、1つ以上のAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はAAV13カプシドタンパク質を含む。好ましい実施形態では、カプシドは、AAV9カプシドであり、AAV9カプシドは、AAV9カプシドタンパク質からなる。

20

【0018】

別の態様では、本発明は、ジストロフィノパチーの治療を必要とする対象においてジストロフィノパチーを治療する方法であって、本明細書に更に記載されるように、 μ Dys導入遺伝子を含むベクターゲノムをカプシド封入する有効量のAAV粒子のうちの1つを含む組成物を、単回用量で対象に髄腔内投与することを含む、方法に関する。一実施形態では、ジストロフィノパチーは、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、又はDMD関連拡張型心筋症(DCM)である。その上更なる実施形態では、ジストロフィノパチーは、DMDである。有効量のAAV粒子は、更なる実施形態では、 μ Dys導入遺伝子、例えば、髄腔内投与された組成物中に存在する同じ μ Dys導入遺伝子を含むベクターゲノムをカプシド封入するAAV粒子を含む、有効量の対応するIV組成物(例えば、静脈内投与された組成物)よりも約90%以下のベクターゲノムを含む。

30

【0019】

一実施形態では、対象は、トレンドンブルク位にあるときに組成物を投与される。更なる実施形態では、投与は、非イオン性低浸透圧造影剤の非存在下にある。

【0020】

本明細書に記載されるジストロフィノパチーを治療する方法の一実施形態では、有効量の髄腔内投与されたAAV粒子は、 μ Dys導入遺伝子、例えば、髄腔内投与されたAAV粒子中に存在する同じ μ Dys導入遺伝子を含むベクターゲノムをカプシド封入する同一用量の静脈内投与されたAAV粒子よりも優れた治療応答を提供する。治療応答は、一実施形態では、ノーススター歩行評価(NSAA)上のベースラインからの増加である。

40

【0021】

本明細書に記載されるジストロフィノパチーを治療する方法の別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子を含むベクターゲノムをカプシド封入する有効量のAAV粒子の髄腔内投与は、第2の対象が、 μ Dys導入遺伝子を含むベクターゲノムをカプシド封入する有効量の対応するAAV粒子を静脈内投与されるときに、第2の対象によって体験される副作用の数又は副作用の重症度と比較して、対象において副作用の数の減少、又は1つ以上の

50

副作用の重症度の低減をもたらす。更なる実施形態では、ジストロフィノパチーは、DMDである。その上更なる実施形態では、AAV粒子は、AAV9粒子である。

【0022】

ジストロフィノパチーを治療する方法の更に別の実施形態では、有効量の髄腔内投与されたAAV粒子は、肝組織における $\mu D y s$ 導入遺伝子発現の量と比較して、骨格筋及び/又は心筋においてより優れた $\mu D y s$ 導入遺伝子発現を提供する。更なる実施形態では、ジストロフィノパチーは、DMDである。その上更なる実施形態では、AAV粒子は、AAV9粒子である。なおもその上更なる実施形態では、AAV粒子は、配列番号5に記載される核酸配列を有する $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入する。

【0023】

本発明の別の態様では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子を対象の骨格筋及び/又は心筋に優先的に送達するための方法が提供される。本方法は、AAV9カプシドを含む有効量のAAV9粒子と、AAV9カプシドによってカプシド封入された $\mu D y s$ 導入遺伝子を含むベクターゲノムと、を含む、組成物を、単回用量で対象に髄腔内投与することを伴う。カプシド封入ゲノムは、5'から3'まで、5'ITRと、プロモーターと、 $\mu D y s$ 導入遺伝子と、SV40ポリ(A)テールと、3'ITRと、を含む。投与後、 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、対象の肝組織における導入遺伝子発現と比較して、対象の骨格筋及び/又は心筋においてより高いレベルで発現される。

【0024】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、対象において本明細書に記載されるAAV粒子によって送達される $\mu D y s$ 導入遺伝子の発現は、対象の骨格筋及び/又は心筋と比較して、対象の肝組織では著しく少ない。更なる実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子発現は、肝組織における $\mu D y s$ 導入遺伝子発現の量と比較して、対象の骨格筋及び/又は心筋では少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、又は少なくとも約80%優れている。別の実施形態では、 $\mu D y s$ 導入遺伝子発現は、骨格筋及び/又は心筋における $\mu D y s$ 導入遺伝子発現の量と比較して、対象の肝臓では少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、又は少なくとも約80%少ない。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】例示的な $\mu D y s$ コード遺伝子構築物(INS1201)の概略図を示す。

【図1B】代替的な $\mu D y s$ コード遺伝子構築物(INS1212)の概略図を示す。

【図1C】HindIII/BsaI及びSmaIで消化された(それぞれ、レーン1及び2)psZ01ベクター骨格(psZ01-INS1201)制限部にクローニングされたINS1201遺伝子構築物、並びにHindIII/BsaI及びSmaIで消化された(それぞれ、レーン3及び4)psZ01ベクター骨格(psZ01-INS1212)制限部にクローニングされたINS1212遺伝子構築物のアガロースゲル電気泳動を示す。

【図2】 $1 \mu l$ のINS1201-AAV9調製物(レーン1)、 $1 \mu l$ のINS1212-AAV9調製物(レーン2)、並びに $0.5 \mu l$ 、 $1 \mu l$ 、 $2 \mu l$ 、及び $4 \mu l$ の $1 \times 10^{13} v g / m l$ AAV2標準(それぞれ、レーン3、4、5、及び6)の銀染色SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を示す。

【図3A】 $2.7 \times 10^{11} v g$ のINS1201-AAV9(iii)又はINS1212-AAV9(iv)を用いた筋肉内注射の21日後にmdxマウスから取得され、ジストロフィンについて免疫蛍光染色された腓腹筋切片を示す。非注射mdxマウス(i)及び野生型C57/BLマウス(ii)から取得され、ジストロフィンについて免疫蛍光染色された腓腹筋切片が、比較のために示される。

【図3B】 2.7×10^{11} ベクターゲノム(vg)のINS1212-AAV9を用い

10

20

30

40

50

た筋肉内注射の21日後にmd x マウスから取得され、D A P I (i) で、及びジストロフィン (i i) について染色された腓腹筋切片を示す。マージされた画像が、(i i i) に示される。

【図4A】 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の21日後にmd x マウスから取得され、ジストロフィンについて免疫蛍光染色された、腓腹筋 (i)、前脛骨筋 (i i)、大腿四頭筋 (i i i)、臀筋 (i v)、三頭筋 (v)、横隔膜 (v i)、心臓 (v i i)、及び肝臓 (v i i i) 切片を示す。

【図4B】 9×10^{10} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の21日後にmd x マウスから取得され、ジストロフィンについて免疫蛍光染色された、腓腹筋 (i)、前脛骨筋 (i i)、大腿四頭筋 (i i i)、臀筋 (i v)、三頭筋 (v)、横隔膜 (v i)、心臓 (v i i)、及び肝臓 (v i i i) 切片を示す。

10

【図5】 9×10^{10} v g の I N S 1 2 1 2 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の21日後にmd x マウスから取得され、ジストロフィンについて免疫蛍光染色された、腓腹筋 (i)、前脛骨筋 (i i)、大腿四頭筋 (i i i)、臀筋 (i v)、三頭筋 (v)、横隔膜 (v i)、心臓 (v i i)、及び肝臓 (v i i i) 切片を示す。

【図6A】 9×10^{10} v g (i i) 又は 2.7×10^{11} v g (i i i) の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後にmd x マウスから取得され、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) で染色された腓腹筋切片を示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス (i) 及び非注射 md x マウス (i v) から取得され、H & E 染色された腓腹筋切片が、比較のために示される。

20

【図6B】 9×10^{10} v g (i i) 又は 2.7×10^{11} v g (i i i) の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後にmd x マウスから取得され、ジストロフィンについて染色された腓腹筋切片を示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス (i) 及び非注射 md x マウス (i v) から取得され、ジストロフィンについて染色された腓腹筋切片が、比較のために示される。

【図7A】 9×10^{10} v g (i i) の I N S 1 2 1 2 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後にmd x マウスから取得され、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) で染色された腓腹筋切片を示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス (i) 及び非注射 md x マウス (i i i) から取得され、H & E 染色された腓腹筋切片が、比較のために示される。

【図7B】 9×10^{10} v g (i i) の I N S 1 2 1 2 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後にmd x マウスから取得され、ジストロフィンについて染色された腓腹筋切片を示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス (i) 及び非注射 md x マウス (i i i) から取得され、ジストロフィンについて染色された腓腹筋切片が、比較のために示される。

30

【図8A】 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後のmd x マウスにおける腓腹筋細胞の平均線維直径 (μ m) の棒グラフを示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス及び非注射 md x マウスにおける腓腹筋細胞の平均線維直径 (μ m) が、比較のために示される。

【図8B】 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後のmd x マウスにおける腓腹筋細胞の細胞直径 (μ m) の相対頻度 (%) の折れ線グラフを示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス及び非注射 md x マウスにおける腓腹筋細胞の細胞直径の相対頻度が、比較のために示される。

40

【図8C】 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後のmd x マウスにおける三頭筋細胞の平均線維直径 (μ m) の棒グラフを示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス及び非注射 md x マウスにおける三頭筋細胞の平均線維直径 (μ m) が、比較のために示される。

【図8D】 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射の80日後のmd x マウスにおける三頭筋細胞の細胞直径 (μ m) の相対頻度 (%) の折れ線グラフを示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス及び非注射 md x マウスにおける三頭筋細胞の細胞直径の相対頻度が、比較のために示される。

【図8E】 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用

50

いた脳室内 (ICV) 注射の 80 日後の md x マウスにおける前脛骨筋細胞の平均線維直径 (μm) の棒グラフを示す。野生型 C57/B1 マウス及び非注射 md x マウスにおける前脛骨筋細胞の平均線維直径 (μm) が、比較のために示される。

【図 8 F】 $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ 又は $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9 を用いた脳室内 (ICV) 注射の 80 日後の md x マウスにおける前脛骨筋細胞の細胞直径 (μm) の相対頻度 (%) の折れ線グラフを示す。野生型 C57/B1 マウス及び非注射 md x マウスにおける前脛骨筋細胞の細胞直径の相対頻度が、比較のために示される。

【図 8 G】 $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ 又は $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9 を用いた脳室内 (ICV) 注射の 80 日後の md x マウスにおける横隔膜筋細胞の平均線維直径 (μm) の棒グラフを示す。野生型 C57/B1 マウス及び非注射 md x マウスにおける横隔膜筋細胞の平均線維直径 (μm) が、比較のために示される。

【図 8 H】 $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ 又は $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9 を用いた脳室内 (ICV) 注射の 80 日後の md x マウスにおける横隔膜筋細胞の細胞直径 (μm) の相対頻度 (%) の折れ線グラフを示す。野生型 C57/B1 マウス及び非注射 md x マウスにおける横隔膜筋細胞の細胞直径の相対頻度が、比較のために示される。

【図 9 A】 $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1212 - AAV9 を用いた脳室内 (ICV) 注射の 80 日後の md x マウスにおける腓腹筋細胞の平均線維直径 (μm) の棒グラフを示す。野生型 C57/B1 マウス及び非注射 md x マウスにおける横隔膜筋細胞の平均線維直径 (μm) が、比較のために示される。

【図 9 B】 $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1212 - AAV9 を用いた脳室内 (ICV) 注射の 80 日後の md x マウスにおける腓腹筋細胞の細胞直径 (μm) の相対頻度 (%) の折れ線グラフを示す。野生型 C57/B1 マウス及び非注射 md x マウスにおける横隔膜筋細胞の細胞直径の相対頻度が、比較のために示される。

【図 10 A】野生型 C57/B1 マウス、生後 1 日目 (p1) にビヒクルを用いた脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウス、生後 1 日目 p1 に $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9 の ICV 注射を受けた md x マウス、及び p1 に $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9 の ICV 注射を受けた md x マウスにおける偏心収縮 (EC) から生じる EDL 筋の収縮力の割合の折れ線グラフである。

【図 10 B】 (i) 野生型 C57/B1 マウス、及び生後 1 日目 (p1) に (ii) $9 \times 10^9 \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iii) $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iv) $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、又は (v) ビヒクル対照を用いた脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける偏心収縮 (EC) 前応力に対する EDL 筋の EC 後応力の割合の折れ線グラフである。

【図 10 C】 (i) 野生型 C57/B1 マウス、及び生後 28 日目 (p28) に (ii) $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iii) $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iv) $5.4 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(v) $1.2 \times 10^{12} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、又は (vi) ビヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける偏心収縮 (EC) 数の関数としての EDL 筋の収縮力の割合 (偏心収縮 1 (EC1) %) を示すグラフである。

【図 10 D】 (i) 野生型 C57/B1 マウス、及び生後 28 日目 (p28) に (ii) $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iii) $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iv) $5.4 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(v) $1.2 \times 10^{12} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、又は (vi) ビヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける EDL 筋の力の割合 ([EC5 後 / EC1 後]) を示す棒グラフである。

【図 10 E】 (i) 野生型 C57/B1 マウス、及び生後 28 日目 (p28) に (ii) $9 \times 10^9 \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iii) $9 \times 10^{10} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(iv) $2.7 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、(v) $5.4 \times 10^{11} \text{ v g}$ の INS1201 - AAV9、又は (vi) ビヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射

10

20

30

40

50

を受けたmd x マウスにおける偏心収縮 (EC) から生じるEDL筋の最大張力 (kPa) のグラフである。

【図10F】(i)野生型C57/B1マウス、及び生後28日目(p28)に(ii) 9×10^9 vgのINS1201-AAV9、(iii) 9×10^{10} vgのINS1201-AAV9、(iv) 2.7×10^{11} vgのINS1201-AAV9、(v) 5.4×10^{11} vgのINS1201-AAV9、又は(vi) 1.2×10^{12} vgのINS1201-AAV9、又は(vii)ピヒクル対照のいずれかの脳室内(ICV)注射を受けたmd x マウスにおける様々な周波数(Hz)での偏心収縮(EC)から生じるピーク応力(kPa)のグラフである。

【図11A】非注射カニクイザル(i)、 5×10^{13} vg(ii)若しくは 1×10^{14} vg(iii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iv)、 5×10^{13} vg(v)、若しくは 1×10^{14} vg(vi)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標)で免疫染色された腓腹筋切片を示す。 10

【図11B】非注射カニクイザル(i)、 5×10^{13} vg(ii)若しくは 1×10^{14} vg(iii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iv)、 5×10^{13} vg(v)、若しくは 1×10^{14} vg(vi)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標) 20

【図11C】非注射カニクイザル(i)、 5×10^{13} vg(ii)若しくは 1×10^{14} vg(iii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iv)、 5×10^{13} vg(v)、若しくは 1×10^{14} vg(vi)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標)で免疫染色された三角筋切片を示す。

【図11D】非注射カニクイザル(i)、 5×10^{13} vg(ii)若しくは 1×10^{14} vg(iii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iv)、 5×10^{13} vg(v)、若しくは 1×10^{14} vg(vi)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標) 30

【図11E】非注射カニクイザル(i)、 5×10^{13} vg(ii)若しくは 1×10^{14} vg(iii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iv)、 5×10^{13} vg(v)、若しくは 1×10^{14} vg(vi)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標)で免疫染色された二頭筋切片を示す。

【図11F】 5×10^{13} vg(i)若しくは 1×10^{14} vg(ii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iii)、 5×10^{13} vg(iv)、若しくは 1×10^{14} vg(v)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標)で免疫染色された前脛骨筋切片を示す。 40

【図11G】 5×10^{13} vg(i)若しくは 1×10^{14} vg(ii)のAAV9 CBA-GFPを用いた静脈内(IV)注射の21日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} vg(iii)、 5×10^{13} vg(iv)、若しくは 1×10^{14} vg(v)のAAV9 CBA-GFPを用いた髄腔内(IT)注射の21日後のカニクイザルから取得され、GFP発現の検出のためにNovaRed(商標)で免疫染色された横隔膜筋切片 50

を示す。

【図11H】 5×10^{13} v g (i) 若しくは 1×10^{14} v g (ii) の AAV9 CBA - GFP を用いた静脈内 (IV) 注射の 21 日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} v g (iii)、 5×10^{13} v g (iv)、若しくは 1×10^{14} v g (v) の AAV9 CBA - GFP を用いた髄腔内 (IT) 注射の 21 日後のカニクイザルから取得され、GFP 発現の検出のために NovaRed (商標) で免疫染色された心筋切片を示す。

【図11I】 5×10^{13} v g (i) 若しくは 1×10^{14} v g (ii) の AAV9 CBA - GFP を用いた静脈内 (IV) 注射の 21 日後のカニクイザル、又は 2.5×10^{13} v g (iii)、 5×10^{13} v g (iv)、若しくは 1×10^{14} v g (v) の AAV9 CBA - GFP を用いた髄腔内 (IT) 注射の 21 日後のカニクイザルから取得され、GFP 発現の検出のために NovaRed (商標) で免疫染色された肝臓切片を示す。

【図12A】 2.5×10^{13} v g の AAV9 CBA - GFP を用いた髄腔内 (IT) 注射の 21 日後にカニクイザルから取得され、抗 GFP 抗体でプローブされた、二頭筋 (1)、三頭筋 (2)、三角筋 (3)、大腿四頭筋 (4)、腓腹筋 (5)、前脛骨筋 (6)、横隔膜 (7)、及び心臓 (8) の筋タンパク質試料のボンソー染色 (上のパネル) 又はウェスタンブロット (下のパネル) を示す。

【図12B】 5×10^{13} v g の AAV9 CBA - GFP を用いた髄腔内 (IT) 注射の 21 日後にカニクイザルから取得され、抗 GFP 抗体でプローブされた、二頭筋 (1)、三頭筋 (2)、三角筋 (3)、大腿四頭筋 (4)、腓腹筋 (5)、前脛骨筋 (6)、横隔膜 (7)、及び心臓 (8) の筋タンパク質試料のボンソー染色 (上のパネル) 又はウェスタンブロット (下のパネル) を示す。

【図12C】 1×10^{14} v g の AAV9 CBA - GFP を用いた髄腔内 (IT) 注射の 21 日後にカニクイザルから取得され、抗 GFP 抗体でプローブされた、二頭筋 (1)、三頭筋 (2)、三角筋 (3)、大腿四頭筋 (4)、腓腹筋 (5)、前脛骨筋 (6)、横隔膜 (7)、及び心臓 (8) の筋タンパク質試料のボンソー染色 (上のパネル) 又はウェスタンブロット (下のパネル) を示す。

【図12D】非注射カニクイザルから取得され、抗 GFP 抗体でプローブされた、二頭筋 (1) 及び三頭筋 (2) のボンソー染色 (上のパネル) 又はウェスタンブロットを示す。

【図13】 2.5×10^{13} v g の AAV9 CBA - GFP を用いた髄腔内 (IT) 注射の 21 日後にカニクイザルから取得され、逆転写酵素の存在下 (+) 又は非存在下 (-) で RT-PCR を受けた、二頭筋 (1)、三頭筋 (2)、三角筋 (3)、前脛骨筋 (4)、腓腹筋 (5)、大腿四頭筋の外側広筋 (6)、横隔膜筋 (7)、及び心筋 (8)、並びに肝臓 (9) 組織試料のアガロースゲル電気泳動を示す。非注射カニクイザルから取得され、逆転写酵素の存在下 (+) 又は非存在下 (-) で RT-PCR を受けた、二頭筋 (10)、三頭筋 (11)、三角筋 (12)、及び大腿四頭筋 (13) の筋組織試料が、比較のために示される。

【図14】本明細書で提供される μ Dys 導入遺伝子によってコードされる様々な μ Dys タンパク質ドメインを示す。

【図15】生後 28 日目 (p28) に (ii) 9×10^9 v g の INS1201 - AAV9、(iii) 9×10^{10} v g の INS1201 - AAV9、(iv) 2.7×10^{11} v g の INS1201 - AAV9、(v) 5.4×10^{11} v g の INS1201 - AAV9、(vi) 1.2×10^{12} v g の INS1201 - AAV9、又は (vii) ビヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた mdx マウスにおける 2 倍体ゲノム当たりの INS1201 DNA コピーの数を示すグラフである。

【図16】生後 28 日目 (p28) に (ii) 9×10^9 v g の INS1201 - AAV9、(iii) 9×10^{10} v g の INS1201 - AAV9、(iv) 2.7×10^{11} v g の INS1201 - AAV9、(v) 5.4×10^{11} v g の INS1201 - AAV9、(vi) 1.2×10^{12} v g の INS1201 - AAV9、又は (vii) ビ

10

20

30

40

50

ヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける R P P 3 0 のコピー数に対して正規化された INS 1 2 0 1 RNA 転写物コピーの数を示すグラフである。

【図 17】(i) 野生型 C 5 7 / B 1 マウス、及び生後 2 8 日目 (p 2 8) に (i i) 9×10^9 v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(i i i) 9×10^{10} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(i v) 2.7×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(v) 5.4×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(v i) 1.2×10^{12} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、又は (v i i) ビヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける生後 1 2 0 日目 (p 1 2 0) での E D L 筋細胞の平均線維直径 (μ m) のグラフである。

10

【図 18】(i) 野生型 C 5 7 / B 1 マウス、及び生後 2 8 日目 (p 2 8) に (i i) 9×10^9 v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(i i i) 9×10^{10} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(i v) 2.7×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(v) 5.4×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(v i) 1.2×10^{12} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、又は (v i i) ビヒクル対照のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける生後 1 2 0 日目 (p 1 2 0) での前脛骨筋の平均線維直径 (μ m) のグラフである。

【図 19】様々な用量の INS 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (ICV) 注射後のピクロシリウスレッドで染色された横隔膜筋切片を示す。野生型 C 5 7 / B 1 マウス及びビヒクルを投与された md x マウスから取得された横隔膜切片が、上部セクションに比較のために示される。

20

【図 20】(i) 野生型 C 5 7 / B 1 マウス、及び生後 2 8 日目 (p 2 8) に (i i) ビヒクル対照、(i i i) 9×10^9 v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(i v) 9×10^{10} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(v) 2.7×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、(v) 5.4×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9、又は (v i) 1.2×10^{12} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9 のいずれかの脳室内 (ICV) 注射を受けた md x マウスにおける生後 1 2 0 日目 (p 1 2 0) での横隔膜筋のコラーゲン率を示すグラフである。

【図 21】上部は、生後 2 8 日目 (p 2 8) での 5.4×10^{11} v g の INS 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (ICV) 注射後の p 1 2 0 に md x マウスから取得され、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) (左端)、ラミニン / d a p i (左から 2 番目)、ジストロフィン (右から 2 番目) で染色された長趾伸 (E D L) 筋切片、及びマージされた画像 (右端) を示す。図 2 1 の下部は、生後 2 8 日目 (p 2 8) での 5 ビヒクル対照を用いた脳室内 (ICV) 注射後の p 1 2 0 に md x マウスから取得され、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) (左端)、ラミニン / d a p i (左から 2 番目)、ジストロフィン (右から 2 番目) で染色された E D L 筋切片、及びマージされた画像 (右端) を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、部分的には、アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、並びに単一遺伝子筋肉疾患、例えば、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、又は DMD 関連拡張型心筋症 (DCM) などのジストロフィノパチーの治療を必要とする対象に、同粒子を心筋及び/又は骨格筋に優先的に送達するための方法に関する。理論に束縛されることを所望することなく、粒子、及び例えば、ジストロフィノパチーなどの単一遺伝子筋肉疾患を治療するために、同粒子の送達を必要とする対象に同粒子を送達するための方法は、少なくとも本発明が、(i) 実質的に同じ又はより良好な治療利益を達成するために、IV 送達よりも著しく低い投与量を可能にし、それによって、ウイルス負荷及び毒性並びに他の副作用を低減し、かつ/又は (i i) 肝組織と比較して、心筋及び/又は骨格筋組織における優先的な導入遺伝子標的化及び発現を可能にし、それによって、導入遺伝子を目的の細胞に標的化し、静脈内送達される AAV ベクターと比較して、より優れた治療利益を提供し、(i i i) 製造負担の減少に対応する、必要とされる低投与

40

50

量により、IV製剤と比較して、より大きな患者集団に利益をもたらすことができるため、既知のAAV粒子及び治療方法よりも優れた利益を提供する。

【0027】

本発明の態様は、AAV粒子、同粒子を産生するための方法、及び治療を必要とする対象にAAV粒子を送達するための方法に関する。AAV粒子、例えば、AAV9粒子は、1つ以上のAAV9カプシドタンパク質を含むカプシドと、AAV9カプシドによってカプシド封入されたベクターゲノムと、を含む。ベクターゲノムは、導入遺伝子と、筋細胞、例えば、骨格筋及び/又は心筋細胞内に送達されると導入遺伝子の遺伝子発現を促進する、調節エレメントと、を含む。一実施形態では、導入遺伝子は、マイクロジストロフィン(μ Dys)導入遺伝子である。

10

【0028】

本明細書に記載される方法は、ジストロフィノパチーの治療を必要とする対象に、有効量の明細書に記載されるAAV粒子を含む組成物を単回用量で髄腔内投与することを含む。一実施形態におけるジストロフィノパチーは、DMD、ベッカー型筋ジストロフィー、又はDCMである。好ましい実施形態では、ジストロフィノパチーは、DMDである。本明細書に記載される実施形態では、筋細胞への本発明のAAV粒子の髄腔内送達は、 μ Dysの堅調な発現をもたらすことができ、筋肉の健康及び機能を著しく改善することができる。本発明はまた、本明細書に記載されるAAV粒子を産生するための方法及び細胞も提供する。本明細書に記載される方法の一実施形態では、AAV粒子の髄腔内投与後に、導入遺伝子は、対象の肝組織における導入遺伝子発現と比較して、対象の骨格筋及び/又は心筋においてより高いレベルで発現される。

20

【0029】

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語及び語句が以下に定義される。

【0030】

本明細書で使用される場合の「a」及び「an」という用語は、「1つ以上」を意味し、文脈が不適切でない限り、複数を含む。

【0031】

「核酸」、「ヌクレオチド」、又は「オリゴヌクレオチド」という用語は、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかのデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)及びそのポリマーを指す。具体的に限定されない限り、本用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様に代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補的配列、並びに明示的に示された配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(又は全ての)コドンの第3の位置が混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換される、配列を生成することによって達成され得る(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991)、Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985)、及びRossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。

30

40

【0032】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖を産生又はコードすることに関与するDNAのセグメントを指し得る。これは、コーディング領域(リーダー及びトレイラー)並びに個々のコーディングセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)の前後の領域を含み得る。代替的に、「遺伝子」という用語は、rRNA、tRNA、ガイドRNA(gRNA)、短鎖干渉RNA(siRNA)、又はマイクロRNA(miRNA)などの非翻訳RNAを産生又はコードすることに関与するDNAのセグメントを指し得る。

【0033】

本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」という用語は、細胞のゲノムに人工的に導入される、ベクターゲノム中に存在する外因性遺伝子、又は細胞のゲノム中の非天然遺伝

50

子座に人工的に導入される内因性遺伝子を指す。導入遺伝子は、ポリペプチド鎖を産生又はコードすることに関与するDNAのセグメントを指し得る。導入遺伝子は、コーディング領域（リーダー及びトレイラー）並びに個々のコーディングセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）の前後の領域を含み得る。本明細書に記載される実施形態による導入遺伝子は、 $\mu D y s$ である。 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、一実施形態では、N末端領域、約2～3個のヒンジ領域、約4～6個のスペクトリン反復、及びシステイン豊富ドメインを含む、 $\mu D y s$ ポリペプチドをコードする。

【0034】

本明細書で使用される場合の「ベクターゲノム」は、1つ以上の異種核酸配列を含む核酸ゲノムである。1つ以上の異種核酸配列は、導入遺伝子を含む。本発明のいくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、少なくとも1つのITR配列（例えば、AAV ITR配列）、任意選択的に、2つのITR（例えば、2つのAAV ITR）を含み、これらは典型的には、ベクターゲノムの5'末端及び3'末端にあり、1つ以上の異種核酸に隣接するであろう。ITRは、互いに同じであるか、又は異なり得る。

10

【0035】

本明細書で使用される場合、核酸、例えば、遺伝子、又は細胞中のタンパク質に関する「内因性」という用語は、例えば、その天然遺伝子位置又は遺伝子座において自然界で見出されるように、その特定の細胞で生じる核酸又はタンパク質である。更に、核酸又はタンパク質を「内因的に発現する」細胞は、自然界で見出されるように、その核酸又はタンパク質を発現する。

20

【0036】

「プロモーター」は、核酸、例えば、導入遺伝子の転写を誘導し、ベクターゲノム内に存在し得る、1つ以上の核酸制御配列として定義される。本明細書で使用される場合、プロモーターは、転写の開始部位の付近に核酸配列を含む。プロモーターはまた、任意選択的に、転写の開始部位から数千個もの塩基対に位置し得る、遠位エンハンサー又はリプレッサー要素を含む。

【0037】

本明細書で使用される場合の「調節エレメント」は、遺伝子（例えば、導入遺伝子）の転写を調節し、かつ/又は転写されたmRNA産物の安定性若しくは翻訳を調節することが可能な核酸配列を指し、ベクターゲノム内に存在し得る。いくつかの実施形態では、調節エレメントは、遺伝子の組織特異的転写を調節することができる。調節エレメントは、少なくとも1つの転写因子結合部位、例えば、筋肉特異的転写因子のための転写因子結合部位を含むことができる。本明細書で使用される場合の調節エレメントは、調節エレメントの非存在下でのプロモーター単独からの遺伝子の転写と比較すると、プロモーター駆動型遺伝子発現を増加させるか、又は増強する。本明細書で使用される場合の調節エレメントは、それらが調節する導入遺伝子まで任意の距離（すなわち、近位又は遠位）に生じ得る。本明細書で使用される場合の調節エレメントは、転写制御に関与するより大きな配列の一部、例えば、プロモーター配列の一部を含み得る。しかしながら、調節エレメント単独は、典型的には、独力で転写を開始するためには十分ではなく、プロモーターの存在を必要とする。

30

40

【0038】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれるときに、「動作可能に連結される」。例えば、プロモーター若しくはエンハンサーが、配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に動作可能に連結されるか、又はリボソーム結合部位が、翻訳を促進するように位置付けられる場合、コード配列に動作可能に連結される。

【0039】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書では互換的に使用される。本明細書で使用される場合、本用語は、全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖、及びその機能的断片を包含し、アミノ酸残基は、共有ペプチド結合によって連結される。

50

【0040】

本明細書で使用される場合、「相補的」又は「相補性」という用語は、ヌクレオチド又は核酸間の具体的な塩基対合を指す。相補的ヌクレオチドは、概して、A及びT（又はA及びU）、並びにG及びCである。本明細書に記載されるガイドRNA（gRNA）は、ゲノム配列に対して完全に相補的又は実質的に相補的である（例えば、ほんのわずかなミスマッチ塩基を有する）配列、例えば、DNA標的化配列を含むことができる。

【0041】

本明細書で使用される場合、核酸、例えば、AAVベクターとの関連での「導入すること」又は「送達すること」という用語は、細胞の外側から細胞の内側、例えば、筋細胞への核酸の転座を指す。いくつかの場合では、導入することは、細胞の外側から細胞の核の内側への核酸の転座を指す。エレクトロポレーション、ナノワイヤ又はナノチューブとの接触、受容体媒介性内部化、細胞透過性ペプチドを介した転座、リポソーム媒介性転座、及び同等物を含むがこれらに限定されない、そのような転座の様々な方法が企図される。

10

【0042】

本明細書で使用される場合、「パッケージ化される」又は「カプシド封入される」という用語は、AAV粒子を形成するためのウイルスカプシドタンパク質を含むカプシド内のベクターゲノムの包含を指す。

【0043】

ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列との関連で使用される場合の「実質的な同一性」又は「実質的に同一」という用語は、参照配列と少なくとも60%の配列同一性を有する配列を指す。代替的には、同一性率は、60%~100%の任意の整数であり得る。例示的な実施形態は、本明細書に記載されるプログラム、好ましくは、以下に記載される標準パラメータを使用するBLASTを使用して、参照配列と比較すると、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%を含む。当業者は、これらの値が、コドン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレーム位置付け、及び同等物を考慮することによって、2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定するように適切に調整され得ることを認識するであろう。

20

【0044】

配列比較については、典型的には、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験配列及び参照配列がコンピュータに入力され、必要である場合、サブ配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。デフォルトプログラムパラメータを使用することができるか、又は代替的パラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性率を計算する。

30

【0045】

配列同一性率及び配列類似性を決定するため好適であるアルゴリズムは、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschulet al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410、及びAltschulet al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のウェブサイトを通して公的に利用可能である。アルゴリズムは、最初に、データベース配列内の同じ長さのワードと整列されたときに、ある正の値の閾値スコアTに一致するか、又はそれを満たすかのいずれかである、クエリ配列内の長さWの短いワードを識別することによって、高スコア配列対(HSP)を識別することを伴う。Tは、近接ワードスコア閾値と称される(Altschulet al., 上記)。これらの初期隣接ワードヒットは、検索を開始して、それらを含むより長いHSPを見出すためのシードとして作用する。次いで、累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、ワードヒットは、各配列に沿って両方向に拡張される。累積スコアは、ヌクレオ

40

50

チド配列について、パラメータM（一对の一致残基に対する報酬スコア、常に > 0 ）及びN（ミスマッチ残基に対するペナルティスコア、常に < 0 ）を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスが、累積スコアを計算するために使用される。各方向におけるワードヒットの拡張は、累積アラインメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ低下するか、累積スコアが、1つ以上の負のスコアの残基アラインメントの蓄積に起因してゼロ以下になるか、又はいずれか一方の配列の終端に達するときに、停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、及びXは、アラインメントの感度及び速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、デフォルトとして、28のワードサイズ（W）、10の期待値（E）、 $M = 1$ 、 $N = -2$ 、及び両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワードサイズ（W）、10の期待値（E）、及びBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)を参照されたい）。

10

【0046】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析も実施する（例えば、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)を参照されたい）。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列間の一致が偶然に生じる確率の指示を提供する、最小合計確率（ $P(N)$ ）である。例えば、試験核酸と参照核酸との比較における最小合計確率が約0.01未満、より好ましくは約 10^{-5} 未満、最も好ましくは約 10^{-20} 未満である場合、核酸は、参照配列と類似するとみなされる。

20

【0047】

本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、本明細書に記載される方法及び組成物によって治療される生物を指す。そのような生物には、ヒト、サル、マウス、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、及び同等物などの哺乳動物が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象又は患者は、ヒトである。本明細書で提供される治療の方法における対象は、一実施形態では、男性対象である。

【0048】

対象が男性のヒトである実施形態では、男性ヒト対象は、約4歳～約7歳、新生児、約1歳～約7歳、約2歳～約7歳、約2歳～約6歳、約2歳～約5歳、約2歳～約4歳、約3歳～約7歳、約3歳～約6歳、約1ヵ月～約6歳、約1ヵ月～約5歳、約1ヵ月～約4歳、約1ヵ月～約3歳、約1ヵ月～約2歳、又は約1ヵ月～約12ヵ月である。

30

【0049】

一実施形態では、対象は、約4歳～約7歳の男性ヒト患者である。一実施形態では、対象は、約3歳～約7歳の男性ヒト患者である。一実施形態では、対象は、約2歳～約7歳の男性ヒト患者である。

【0050】

本明細書で使用される場合、「効率的な送達」又は「効率的に送達すること」という用語は、所望の細胞又は組織において導入遺伝子の発現をもたらす導入遺伝子をコードするベクターゲノムをカプシド封入するAAVカプシドを含む、AAV粒子の投与を指す。

40

【0051】

本明細書で使用される場合、「有効量」又は「有効用量」という用語は、有益な又は所望の結果（例えば、タンパク質の発現、又は所望の予防若しくは治療効果）をもたらすために十分な物質（例えば、本発明のAAV粒子）の量を指す。有効量は、1回以上の投与、適用、又は投与量で投与することができ、特定の処方又は投与経路に限定されることを意図していない。用量が「ベクターゲノム」で提供される場合、「有効用量」は、本明細書では、「有効ベクターゲノム用量」と称され得る。

【0052】

本明細書で使用される場合、「治療すること」という用語は、状態、疾患、障害、若し

50

くは同等物の改善をもたらす、任意の効果、例えば、低減すること、軽減すること、調節すること、改善すること、若しくは排除すること、又はその症状を改善することを含む。

【0053】

説明の全体を通して、組成物が、具体的な成分を有する、含む (including)、若しくは含む (comprising) ものとして説明される場合、又はプロセス及び方法が、具体的なステップを有する、含む (including)、若しくは含む (comprising) ものとして説明される場合、加えて、記載された成分から本質的になるか、又はそれらからなる本発明の組成物が存在し、記載された処理ステップから本質的になるか、又はそれらからなる本発明によるプロセス及び方法が存在することが企図される。

10

【0054】

アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子

本明細書に記載されるように、本発明の一態様は、1つ以上のAAVカプシドタンパク質と、1つ以上のカプシドタンパク質によってカプシド封入されたベクターゲノムと、を含む、AAV粒子、及び同粒子を含む髄腔内組成物に関する。ゲノムは、5'から3'まで、5'逆位末端反復 (ITR) と、プロモーターと、導入遺伝子と、SV40ポリ (A) テールと、3' ITRと、を含む。治療を必要とする対象に髄腔内投与されると、一実施形態では、導入遺伝子は、対象の肝組織における導入遺伝子発現と比較して、対象の骨格筋及び/又は心筋においてより高いレベルで発現される。別の実施形態では、本明細書に記載されるAAV粒子によって提供される [(骨格筋及び/又は心筋導入遺伝子発現)] / (肝臓導入遺伝子発現)] の比は、同一用量の同じAAV粒子が静脈内投与されるときと同じ比よりも大きい。1つの好ましい実施形態では、AAV粒子は、1つ以上のAAV9カプシドタンパク質を含むAAV9粒子である。

20

【0055】

本明細書で使用される場合、「アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子」は、AAVカプシドと、AAVカプシドによって封入されたベクターゲノムと、を含む、AAVビリオンを指す。ベクターゲノムは、典型的には、プロモーターと、AAV ITR 配列に隣接している1つ以上の導入遺伝子と、を含む。AAVカプシドは、1つ以上のAAVカプシドタンパク質を含む。AAVカプシドタンパク質は、同じ又は異なるAAV血清型に由来し得、野生型であるか、又は操作され得る。本明細書に記載されるベクターゲノムは、複製され、rep及びcap遺伝子産物をコードする1つ以上のプラスミドも含む宿主細胞に導入されたときにウイルスベクター (粒子) にパッケージ化され得る。一実施形態では、ヘルパープラスミドも宿主細胞にトランスフェクトされて、宿主細胞によるベクター産生を補助する。一実施形態では、本明細書で使用されるAAVベクターは、例えば、その開示があらゆる目的のために参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、米国特許第7,906,111号に記載されるAAV9ベクターである。一実施形態では、AAVカプシドは、AAV9カプシドである。

30

【0056】

「空のカプシド」、「空のバイアル粒子」、及び「空のAAV」という用語は、その中にパッケージ化されたベクターゲノムを欠くAAVカプシドシェルを指す。

40

【0057】

本明細書に記載されるカプシド封入ベクターゲノムは、1つ以上の調節エレメント、例えば、導入遺伝子上流に1つ以上の調節エレメントを含むことができる。カプシド封入ゲノムは、一実施形態では、5'から3'まで、5' ITRと、プロモーターと、導入遺伝子と、SV40ポリ (A) テールと、3' ITRと、を含む。別の実施形態では、封入ゲノムは、5'から3'まで、5' ITRと、エンハンサーと、プロモーターと、導入遺伝子と、SV40ポリ (A) テールと、3' ITRと、を含む。カプシド封入ゲノムは、更に別の実施形態では、5'から3'まで、5' ITRと、プロモーターと、SV40イントロンと、導入遺伝子と、SV40ポリ (A) テールと、3' ITRと、を含む。その上更に別の実施形態では、カプシド封入ゲノムは、5'から3'まで、5' ITRと、エンハンサ

50

ーと、プロモーターと、SV40イントロンと、導入遺伝子と、SV40ポリ(A)テールと、3'ITRと、を含む。

【0058】

逆位末端反復

逆位末端反復(ITR)は、導入遺伝子に隣接するパリンドローム145ヌクレオチド配列である。AAVベクターゲノムの5'及び3'ITRは、宿主細胞ゲノム(例えば、ヒトにおける19番染色体)への導入遺伝子の統合及びAAV粒子への導入遺伝子のカプシド封入の両方のために必要である。

【0059】

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、いずれか1つのAAV血清型、例えば、AAVrh.74、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、又はAAV13由来のITR配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるAAVベクターゲノムは、5'AAV2ITR配列及び3'AAV2ITR配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるAAVベクターゲノムは、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する5'AAV2ITRを含む(表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、5'AAV2ITRは、配列番号1を含む。いくつかの実施形態では、5'AAV2ITRは、配列番号1からなる。

【0061】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるAAVベクターゲノムは、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する3'AAV2ITRを含む(表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、3'AAV2ITRは、配列番号7を含む。いくつかの実施形態では、3'AAV2ITRは、配列番号7からなる。

【0062】

プロモーター

プロモーターは、導入遺伝子の発現を駆動し、典型的には、それらが発現を調節する導入遺伝子上流(又は5')に位置する。

【0063】

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、哺乳動物プロモーター、例えば、ヒト、非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル)、マウス、ウマ、ウシ、ブタ、ネコ、及びイヌプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組換えAAVベクターゲノムは、導入遺伝子の高レベル発現を駆動するための強力で構成的に活性なプロモーターを含む。例えば、いくつかの実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター/エンハンサー、伸長因子1(EF1)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、ニワトリ-アクチンハイブリッドプロモーター、又はCAGプロモーターである。

【0064】

プロモーターは、一実施形態では、MHCK7又はニワトリ-アクチンハイブリッドプロモーターである。

【0065】

ある特定の実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、導入遺伝子に動作可能に連結されて、筋細胞において高レベルかつ組織特異的な発現をもたらす、筋肉特異的プロモーターを含む。例えば、本発明の筋肉特異的プロモーターには、デスミン(DES、CSM1又はCSM2としても知られる)プロモーター、アルファ2アクチニン(ACTN2、CMD1AAとしても知られる)プロモーター、フィラミン-C(FLNC、アクチ

ン結合様タンパク質 (A B L P)、フィラミン - 2 (F L N 2)、A B P - 2 8 0、A B P 2 8 0 A、A B P A、A B P L、M F M 5、又はM P D 4としても知られる)プロモーター、筋形質 / 小胞体カルシウムA T P a s e 1 (A T P 2 A 1、A T P 2 A 又はS E R C A 1としても知られる)プロモーター、トロポニンI型1 (T N N I 1、S S T N I 又は2 5 T T N Iとしても知られる)プロモーター、ミオシン - 1 (M Y H 1)プロモーター、リン酸化可能な高速骨格筋ミオシン軽鎖 (M Y L P F)プロモーター、ミオシン1 (M Y H 1、M Y H S A 1、M Y H a、M y C - 2 X / D、又はM y H C - 2 xとしても知られる)プロモーター、アルファ - 3 鎖トロポミオシン (T P M 3、C F T D、N E M 1、O K / S c l . 5、T M - 5、T M 3、T M 3 0、T M 3 0 n m、T M 5、T P M s k 3、T R K、h T M 5、又はh s c p 3 0としても知られる)プロモーター、アンキリン反復ドメイン含有タンパク質2 (A N K R D 2、A R P Pとしても知られる)プロモーター、ミオシン重鎖 (M H C)プロモーター、ミオシン軽鎖 (M L C)プロモーター、筋クレアチンキナーゼ (M C K)プロモーター、L i e t a l . (1 9 9 9 . N a t B i o t e c h n o l . 1 7 : 2 4 1 - 2 4 5) に記載される合成筋プロモーター、例えば、S P c 5 - 1 2プロモーター、筋クレアチンキナーゼ (M C K)プロモーター、d M C Kプロモーター (それぞれ、W a n g e t a l . (2 0 0 8 . G e n e T h e r . 1 5 : 1 4 8 9 - 1 4 9 9) に記載されるように、M C K基礎プロモーターへのM C Kエンハンサーの二重又は三重タンデムからなる)、及びハイブリッドプロモーター、例えば、ハイブリッドアルファ - ミオシン重鎖エンハンサー / M C Kエンハンサー (M H C K 7、7 7 0 b p)、W a n g e t a l . (2 0 0 8 . G e n e T h e r . 1 5 : 1 4 8 9 - 1 4 9 9) に記載されるM C K - C 5 - 1 2プロモーター、並びにR u d e c k S e t a l . (2 0 1 6 , G e n e s i s . 5 4 (8) : 4 3 1 - 8) に記載される心筋及び骨格筋特異的ミオシンシャペロンU n c 4 5 b (1 9 5 b p)プロモーターから選択されるプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。心臓特異的プロモーターの非限定的な例としては、カルセクエストリン2 (P D I B 2、F L J 2 6 3 2 1、F L J 9 3 5 1 4、又はC A S Q 2 (ヒト遺伝子についてはG e n e I D 8 4 5) としても知られる)プロモーター、アンキリン反復ドメイン1 (心臓アンキリン反復タンパク質としても知られる)プロモーター、サイトカイン誘導性核タンパク質プロモーター、肝臓アンキリン反復ドメイン1 (A N K R D 1、ヒト遺伝子についてはG e n e I D 2 7 0 6 3)、ミオシン、軽鎖2、調節性、心臓、低速 (M Y L 2、ヒト遺伝子についてはG e n e I D 4 6 3 3)プロモーター、ミオシン、軽鎖3、アルカリ、脳室、骨格1 0 低速 (M Y L 3、ヒト遺伝子についてはG e n e I D 4 6 3 4)プロモーター、プロモドメイン含有7 (B P 7 5、C E L T I X 1、N A G 4 (B R D 7、ヒト遺伝子についてはG e n e I D 2 9 1 1 7 としても知られる))プロモーター、アルファミオシン重鎖 (M H C)プロモーター、心臓トロポニンCプロモーター、及び心臓特異性を付与する心臓ナトリウム - カルシウム交換体 (N C X 1) のプロモーターが挙げられる。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるA A Vベクターゲノムは、M H C K 7プロモーターを含む。例えば、いくつかの実施形態では、M H C K 7プロモーターは、配列番号2と少なくとも8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は1 0 0 %の配列同一性を有する (表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、M H C K 7プロモーターは、配列番号2を含む。いくつかの実施形態では、M H C K 7プロモーターは、配列番号2からなる。

【 0 0 6 7 】

S V 4 0イントロン

いくつかの実施形態では、本発明のA A Vベクターゲノムは、S V 4 0イントロンを含む。S V 4 0イントロンは、遺伝子療法ベクターにおける一般的に使用されている調節エレメントであり、発現されたR N A転写物の翻訳及び安定性を増強する。

【 0 0 6 8 】

ある特定の実施形態では、S V 4 0イントロンは、プロモーターの下流 (すなわち、3 50

')及び導入遺伝子の上流(すなわち、5')にある。他の実施形態では、SV40イントロンは、導入遺伝子の下流(すなわち、3')にあり得る。

【0069】

いくつかの実施形態では、SV40イントロンは、配列番号4と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する(表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、SV40イントロンは、配列番号4を含む。いくつかの実施形態では、SV40イントロンは、配列番号4からなる。

【0070】

SV40-ポリ(A)テール

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、SV40ポリ(A)テールをコードする核酸配列を含む。SV40-ポリ(A)テール配列は、核からのRNA輸出、RNAの翻訳、及びRNA安定性を支援する、遺伝子療法ベクターにおける一般的に使用されている核酸要素である。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、配列番号6と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するSV40ポリ(A)テールをコードする配列を含む(表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、SV40ポリ(A)テールをコードする配列は、配列番号6を含む。いくつかの実施形態では、SV40ポリ(A)テールをコードする配列は、配列番号6からなる。

20

【0072】

エンハンサー

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、1つ以上のエンハンサー配列を含む。エンハンサー配列は、一実施形態では、例えば、DNAループ形成及びプロモーターへの転写機構の動員を支援する転写因子及び共調節因子のための結合部位として機能することによって、導入遺伝子の転写レベルを増加させることができる。

【0073】

いくつかの実施形態では、エンハンサーは、5'ITRの下流(すなわち、3')及びプロモーターの上流(すなわち、5')にある。いくつかの実施形態では、エンハンサーは、プロモーターの下流(すなわち、3')及び導入遺伝子の上流(すなわち、5')にある。いくつかの実施形態では、エンハンサーは、導入遺伝子の下流(すなわち、3')及び3'UTRの上流(すなわち、5')にある。

30

【0074】

いくつかの実施形態では、本発明の組換えAAVベクターゲノムは、筋細胞、例えば、骨格筋及び/又は心筋細胞における導入遺伝子の転写を著しく促進するエンハンサーを含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換えAAVベクターは、骨格シス調節モジュール4(SK-CRM4)エンハンサーを含む。例えば、いくつかの実施形態では、SK-CRM4エンハンサーは、配列番号8と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する(表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、SK-CRM4エンハンサーは、配列番号8を含む。いくつかの実施形態では、SK-CRM4エンハンサーは、配列番号8からなる。

40

【0076】

更に別の実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、サイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー核酸配列を含む。更なる実施形態では、CMVエンハンサーは、プロモーター配列の上流にある。例えば、一実施形態では、CMVエンハンサーは、配列番号9の核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、CMVエンハンサーは、配列番号9と

50

少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する(表1を参照されたい)。いくつかの実施形態では、CMVエンハンサーは、配列番号9を含む。いくつかの実施形態では、CMVエンハンサーは、配列番号9からなる。

【0077】

導入遺伝子

本発明とともに使用するための導入遺伝子は、導入遺伝子が送達される細胞(例えば、筋細胞)において発現されるポリペプチド又はその機能断片をコードする核酸配列である。

【0078】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、それが送達される宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るか、又はエピソーム的に発現され得る。

【0079】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、導入遺伝子が送達される細胞によって内因的に発現されないポリペプチド又はその機能断片をコードすることができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、導入遺伝子が送達される細胞によって内因的に発現されるポリペプチド又はその機能断片の変異型をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、導入遺伝子が送達される細胞によって内因的に発現されるが、低レベルで発現されるタンパク質又はその機能断片をコードし、導入遺伝子の発現は、タンパク質又はその機能断片のより高い発現レベルをもたらす。いくつかの実施形態では、導入遺伝子が送達される細胞は、内因性タンパク質及び/又は機能的欠陥タンパク質の発現レベルの低下をもたらす1つ以上の変異を保有し、導入遺伝子の発現は、内因性タンパク質の発現の回復及び/又は欠陥タンパク質の機能的補充をもたらす。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、導入遺伝子が送達され、発現が誘導され得る細胞に導入されたときにサイレントである。

【0080】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、本明細書に記載される組換えAAVベクター中に存在するプロモーター及び/又は他の調節エレメントに対して異種(すなわち、異なる種に由来する)又は同種(すなわち、同じ種に由来する)であり得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、導入遺伝子が送達される細胞に対して異種又は同種であり得る。

【0081】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、全長cDNA若しくはゲノムDNA配列、又は機能的活性を有するその断片若しくは変異体であり得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、ミニ遺伝子、すなわち、そのイントロン配列の一部、大部分、若しくは全てを欠く遺伝子配列であり得るか、又はそのイントロン配列の全てを含み得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、同種及び/又は異種cDNA断片並びに/若しくはゲノムDNA断片を含む、ハイブリッド核酸配列であり得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、野生型配列と比較して、1つ以上のヌクレオチド置換、欠失、及び/又は挿入を含み得る。

【0082】

いくつかの実施形態では、本発明の導入遺伝子は、治療用タンパク質をコードする。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、構造タンパク質をコードし得る。

【0083】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、 μ Dysポリペプチドをコードするマイクロジストロフィン(μ Dys)導入遺伝子である。更なる実施形態では、導入遺伝子によってコードされる μ Dysポリペプチドは、(i)アクチン結合部位を含むN末端領域(NTD)と、(ii)2~4個のヒンジ領域及び4~6個のスペクトリン反復を含む中央ロッドドメインと、を含む。更なる実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、配列番号5に記載される核酸配列を含む。その上更なる実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、配列番号

10

20

30

40

50

5に記載される核酸配列からなる。別の実施形態では、 μ Dysタンパク質をコードする配列は、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する。

【0084】

一実施形態における μ Dys導入遺伝子は、あらゆる目的のために参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、米国特許第10,351,611号の配列番号4に記載される核酸配列を含む。別の実施形態では、 μ Dysタンパク質をコードする配列は、米国特許第10,351,611号の配列番号4と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する。

10

【0085】

一実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、(i)アクチン結合部位を含むN末端領域(NTD)と、(ii)3個のヒンジ領域及び4個のスペクトリン反復を含むドメインと、(iii)システイン豊富ドメインと、を含む、 μ Dysポリペプチドをコードする。 μ Dys導入遺伝子は、更なる実施形態では、アクチン結合部位を含むN末端領域(NTD)と、(ii)ヒンジ領域1、2、及び4、並びにスペクトリン反復1、2、3、及び24を含む中央ロッドドメインと、(iii)システイン豊富ドメインと、を含む、 μ Dysポリペプチドをコードする。

【0086】

μ Dys導入遺伝子は、一実施形態では、筋線維鞘神経一酸化窒素合成酵素(nNOS)標的化のための足場として報告されている、ジストロフィンスペクトリン反復16及び17をコードする。更なる実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1及び24をコードする。別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1、16及び17、23並びに24をコードする。更に別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1、2、3及び24をコードする。その上更に別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1、2、22、23及び24をコードする。

20

【0087】

μ Dys導入遺伝子は、一実施形態では、ジストロフィンヒンジ領域1及び4をコードする。別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンヒンジ領域1、3及び4をコードする。

30

【0088】

一実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、図14に記載される μ Dysドメインの組み合わせのうちの一つを含む、 μ Dysタンパク質をコードする。

【0089】

本明細書に記載されるAAVベクターゲノムは、(i)アクチン結合部位を含むNTDと、(ii)2~4個のヒンジ領域及び4~6個のスペクトリン反復を含む中央ロッドドメインと、(iii)システイン豊富ドメインと、を含む、 μ Dysタンパク質をコードする μ Dys導入遺伝子を含む。例えば、一実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復16及び17をコードする。更なる実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1及び24をコードする。別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1、16及び17、23及び24をコードする。更に別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1、2、3及び24をコードする。その上更に別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンスペクトリン反復1、2、22、23及び24をコードする。

40

【0090】

一実施形態における μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンヒンジ領域1及び4をコードする。別の実施形態では、 μ Dys導入遺伝子は、ジストロフィンヒンジ領域1、3及び4をコードする。

50

【0091】

本明細書に記載されるAAV粒子は、一実施形態では、 μ Dysタンパク質をコードするカプシド封入導入遺伝子を含む。例えば、いくつかの実施形態では、 μ Dysタンパク質をコードする配列は、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する（表1を参照されたい）。いくつかの実施形態では、 μ Dysタンパク質をコードする配列は、配列番号5を含む。いくつかの実施形態では、 μ Dysタンパク質をコードする配列は、配列番号5からなる。

【化1】

10

表1:本発明とともに使用するための例示的なベクターゲノム成分	
調節エレメント又は導入遺伝子	配列
5'AAV2 ITR	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCT [配列番号1]
MHCK7プロモーター	CCTTCAGATTAATAAATAACTGAGGTAAGGGCTGGGTAGGGGAGGTGGTG TGAGACGCTCCTGTCTCTCTATCTGCCCATCGGCCCTTTGGGGAGGAG GAATGTGCCCAAGGACTAAAAAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGG CAACAGACCTTTCATGGGCAAACTTGGGGCCCTGTGTCTAGCATGCCCC ACTACGGGCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCCTGGGGACACCCG AGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCCAA CACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGATCCCTGCATGCG AAGATCTTCGAACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCT TGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCA TGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAG TTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATACAAGGCCA TGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCCGG GCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGC CCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATAAACCAGGGGCAC AGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCCTCCACAGCACAGACAGACACTCAG GAGCCAGCCAGCC [配列番号2]
ニワトリ β -アクチンハイブリッドプロモーター	CCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTT GTATTTATTTATTTTAATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGG GGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGAGCCAAATCAGAGCGGCGGCTCCGAA AGTTTCCTTTATGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA AGCGCGCGGCGGGCGGGAG [配列番号3]
SV40イントロン	GTAAGTTTAGTCTTTTTTGTCTTTTATTTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGT GCAAAACAAGAAGTGCCTCAGTCGATGTTGCCTTACTTCTAG [配列番号4]
マイクロジストロフィン(μ Dys)導入遺伝子	ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAAGAGAAGATGTTCA AAAGAAAACATTCACAAAATGGGTAAATGCACAATTTTCTAAGTTTGGGA AGCAGCATATTGAGAACCCTTTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGCGCTCC TAGACCTCCTCGAAGGCTGACAGGGCAAAAACCTGCCAAAAGAAAAGGA TCCACAAGAGTTTCATGCCCTGAACAATGTCAACAAGGCACTGCGGGTTTTG CAGAACAATAATGTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTAGAT GGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTGAATTTGGAATATAATCCTCCACTGG CAGGTCAAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGATTGCAACAACCAA CAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTATCC ACAGGTAAATGTAATCAACTTACCACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTT GAATGCTCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTTGACTGGAATAGTGT GGTTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTCAACATCGC CAGATATCAATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGATAC CACCTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCA AGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAAATGTT GCCAAGGCCACCTAAAAGTGAATAAAGAACAATTTTCAGTTACATCATCA AATGCACTATTCTCAACAGATCACGGTCAGTCTAGCACAGGGATATGAGA GAACTTCTTCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTG

20

30

40

50

【化 2】

表 1:本発明とともに使用するための例示的なベクターゲノム成分	
調節エレメント又は導入遺伝子	配列
	CTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACGGAGCCATTTCTTCACAGCATT GGAAGCTCCTGAAGACAAGTCATTTGGCAGTTCATTGATGGAGAGTGAAG TAAACCTGGACCGTTATCAAAACAGCTTTAGAAGAAGTATTATCGTGGCTTC TTTCTGCTGAGGACACATTGCAAGCACAAGGAGAGATTTCTAATGATGTGG AAGTGGTGAAGACCAGTTTCATACTCATGAGGGGTACATGATGGATTTGA CAGCCCATCAGGGCCGGGTTGTAATATTCTACAATTGGGAAGTAAGCTGA TTGGAACAGGAAAATTATCAGAAGATGAAGAACTGAAGTACAAGAGCAG ATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAGGGTAGCTAGCATGGA AAAACAAAGCAATTTACATAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAACT GAAAGAGTTGAATGACTGGCTAACAAAAACAGAAGAAAGAAACAAGGAAA ATGGAGGAAGAGCCTCTTGGACCTGATCTTGAAGACCTAAAAACGCCAAGT ACAACAACTAAGGTGCTTCAAGAAGATCTAGAACAAGAACAAGTCAGGG TCAATTCTCTACTCACATGGTGGTGGTAGTTGATGAATCTAGTGGAGATC ACGCAACTGCTGCTTTGGAAGAACAACCTTAAGGTATTGGGAGATCGATGG GCAAACATCTGTAGATGGACAGAAGACCGCTGGGTTCTTTTACAAGACATC CTTCTCAAATGGCAACGCTTACTGAAGAACAGTGCCTTTTTAGTGCATGG CTTTCAGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTCACACAACCTGGCTTTAA AGATCAAAATGAAATGTTATCAAGCTTCAAAAACTGGCCGTTTTAAAAAGC GGATCTAGAAAAGAAAAAGCAATCCATGGGCAAACCTGTATTCACTCAAAC AAGATCTTCTTTCAACACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAA GCATGGCTGGATAACTTTGCCCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAAACTT GAAAAGAGTACAGCACAGATTTACAGGCTGTCACCACCACTCAGCCATC ACTAACACAGACAACCTGTAATGGAAACAGTAACTACGGTGACCACAAGGG AACAGATCTTGGTAAAGCATGCTCAAGAGGAACTTCCACCACCACCTCCCC AAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATCTTGAAGACTCCAGGAACTTCAA GAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAGCTGAGGTGATCAA GGGATCTTGGCAGCCCGTGGGCGATCTCCTCATTGACTCTCTCCAAGATCA CCTCGAGAAAAGTCAAGGCACTTCGAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGA ACGTGAGCCACGTCAATGACCTTGCTCGCCAGCTTACCACCTTTGGGCATT AGCTCTCACCGTATAACCTCAGCACTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGA AGCTTCTGCAGGTGGCCGTCGAGGACCGAGTCAGGCAGCTGCATGAAGCC CACAGGGACTTTGGTCCAGCATCTCAGCACTTTCTTTCCACGTCTGTCCAGG GTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCAAACAAAGTGCCCTACTATATCAACC ACGAGACTCAAACAACCTTGCTGGGACCATCCAAAAATGACAGAGCTCTAC CAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGCTTATAGGACTGCC ATGAAACTCCGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTG TCAGCTGCATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGACCA GCCCATGGATATCCTGCAGATTATTAATTGTTTGACCACTATTTATGACCGC CTGGAGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATATG TGTCTGAACTGGCTGCTGAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATC CGTGTCTGTCTTTAAAACTGGCATCATTCCCTGTGTAAAGCACATTTGG AAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACAGGATTTT GTGACCAGCGCAGGCTGGGCCCTCTTCTGCATGATTCTATCCAAATTTCAA GACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCAAGTG TCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAGCCAGAGATCGAAGCGGCC TCTTCTAGACTGGATGAGACTGGAACCCAGTCCATGGTGTGGCTGCCCCG TCCTGCACAGAGTGGCTGCTGCAGAACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGT AACATCTGCAAAAGAGTGTCCAATCATTGGATTCAAGGTACAGGAGTCTAAA GCACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGTTCGAGTTGCA

10

20

30

40

50

【化 3】

表 1:本発明とともに使用するための例示的なベクターゲノム成分	
調節エレメント又は導入遺伝子	配列
	AAAGGCCATAAAATGCACTATCCCATGGTGAATATTGCACTCCGACTACA TCAGGAGAAGATGTTTCGAGACTTTGCCAAGGTACTAAAAACAAATTCG AACCAAAAGGTATTTTGCGAAGCATCCCCGAATGGGCTACCTGCCAGTGCA GACTGCTTAGAGGGGGACAACATGGAACTGACACAATTTAG [配列番号 5]
SV40-ポリ(A) テール	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA AATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCCTACTGC [配列番号 6]
3'AAV2 ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号 7]
SK-CRM4 エンハンサー	TTCTGAGTTCTCTAAGGTCCCTCACTCCCAACTCAGACCCAAGTCCTGTCAA TTCCCATTCAGTGTCTGATCTCCTTCTTCTCACCTTCCCCATCTTCCATTTGA CCCAAGCTTCTGAGCACTCCTCCCATTCCCCTTTTTGGAGTCCTCCTCCTC TCCCAGAACCCAGTAATAAGTGGGCTCCTCCCTGGCCTGGACCCCCATGGT AACCCATAAAGGCGAGGCAGCTGCCATCTGAGGCAGGGAGGGGCTGGTGT GGGAGGCTAAGG [配列番号 8]
CMV エンハンサー	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCC CCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG GACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTT GGCAGTACATCAAGGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA TGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC [配列番号 9]

10

20

【0092】

本明細書に開示される核酸要素は、標準的な分子生物学技術を使用してともにライゲーションされて、遺伝子構築物を形成することができる（例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.” (Sambrook et al., 1989)、“Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel et al., 1987)を参照されたい)。

30

【0093】

本明細書に記載される遺伝子構築物は、最小限に（5'から3'まで）、(i)プロモーターと、(ii)導入遺伝子と、を含む。例えば、いくつかの実施形態では、プロモーターは、MHCK7プロモーターである。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、 μ Dysをコードする核酸を含む。更なる実施形態では、当該遺伝子構築物は、1つ以上の追加の調節エレメントを含むことができる。一実施形態では、遺伝子構築物は、5'から3'まで、プロモーターと、導入遺伝子と、SV40ポリ(A)テールと、を含む。別の実施形態では、遺伝子構築物は、5'から3'まで、エンハンサーと、プロモーターと、導入遺伝子と、SV40イントロンと、SV40ポリ(A)テールと、を含む。

40

【0094】

いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、（5'から3'まで）、(i)プロモーターと、(ii)SV40イントロンと、(iii)導入遺伝子と、を含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは、MHCK7プロモーターである。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、 μ Dysをコードする核酸である。更なる実施形態では、当該遺伝子構築物は、1つ以上の追加の調節エレメントを含むことができる。いくつかの実施形態では、

50

本明細書に記載される遺伝子構築物は、配列番号10と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する連続核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、配列番号10を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、配列番号10からなる。

【化4】

遺伝子構築物1(配列番号10)	
CCTTCAGATTAATAAATAACTGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGAGAC	
GCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCCCATCGGCCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCAAG	
GACTAAAAAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGGCAACAGACCTTTCATGGGCA	10
AACCTTGGGGCCCTGCTGTCTAGCATGCCCCACTACGGGCTAGGCTGCCCATGTAAG	
GAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGC	
TGCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCTGTCCCTGGTGGATCC	
CCTGCATGCGAAAGTAATCTGAGCAACAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAG	
GCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTT	
CCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACC	
AGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCT	
GCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCTGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTG	
CTCTCAGGGGCCCCCTCCCTGGGGACAGCCCTCCTGCTAGTACACCCTGTAGGCTC	
CTCTATAAACCAGGGGCACAGGGGTGCCCTCATTCTACCACCACCTCCACAGCCT	
TCAGATTAATAAATAACTGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGAGACGT	
CCTGTCTCTCCTCTATCTGCCCATCGGCCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCAAGGAC	
TAAAAAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGGCAACAGACCTTTCATGGGCAAAC	20
CTTGGGGCCCTGCTGTCTAGCATGCCCCACTACGGGCTAGGCTGCCCATGTAAGGA	
GGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTG	
CCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCTGTCCCTGGTGGATCCCC	
TGCATGCGAAGTCTTCAACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGG	
CTTGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTT	
CCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCA	
GTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGC	
ACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCTGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCT	
CTCAGGGGCCCCCTCCCTGGGGACAGCCCTCCTGGCTAGTACACCCTGTAGGCTCCT	
CTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCACCTCCACAGCACA	
GACAGACTCAGGAGCCAGCCAGCCGTAAGTTTAGTCTTTTTTGTCTTTTATTTTCAG	
GTCCCGGATCCGGTGGTGGTCAAAATCAAGAAGTCTCCTCAGTCGATGTTGCCTTT	
ACTTCTAGAGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAAGAGAAGATGTT	
AAAAGAAAACATTCACAAAATGGGTAATGCACAATTTTCTAAGTTTGGGAAGCAGC	30
ATATTGAGAACCCTTTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGCGCCTCCTAGACCTCCTCG	
AAGGCCTGACAGGGCAAAAAGTCCAAAAGAAAAGGATCCACAAGAGTTCATGCC	
CTGAACAATGTCAACAAGGCACTGCGGGTTTTGCAAGCAATAATGTTGATTTAGTG	
AATATTGGAAGTACTGACATCGTAGATGGAATCATAAAGTACTCTTGGTTTGAATT	
GGAATATAATCCTCCACTGGCAGGTCAAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGAT	
TGCAACAAAACCAACAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTA	
ATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTACCACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTT	
GAATGCTCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTTGACTGGAATAGTGTGGTTTGC	
CAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTCAACATCGCCAGATATCAATTA	
GGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGATACCACCTATCCAGATAAGAAG	
TCCATCTTAATGTACATCACATCACTTCCAAAGTTTTGCCCTCAACAAGTGAGCATTG	
AAGCCATCCAGGAAGTGGAAATGTTGCCAAGGCCACCTAAAGTGAATAAAGAAGAA	
CATTTTCAGTTACATCATCAATGCACATTTCTAACAGATCACGGTCAGTCTAGCAC	
AGGGATATGAGAGAAGTCTTCCCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACAC	40
AGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACGGAGCCCATTTCCTTACAGCATT	
GGAAGCTCCTGAAGACAAGTCAATTGGCAGTTCATTGATGGAGAGTGAAGTAAACCT	
GGACCGTTATCAAACAGCTTTAGAAGAAGTATTATCGTGGCTTCTTCTGCTGAGGAC	
ACATTGCAAGCACAAGGAGAGATTTCTAATGATGTGGAAGTGGTGAAGACCAGTTT	
CATACTCATGAGGGGTACATGATGGATTTGACAGCCATCAGGGCCGGGTTGGTAAT	
ATTCTACAATTGGGAAGTAAGCTGATTGGAACAGGAAAATTATCAGAAGATGAAGA	
AACTGAAGTACAAGAGCAGATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAGGGT	

10

20

30

40

50

【化 5】

遺伝子構築物 1(配列番号 10)	
AGCTAGCATGGA AAAACAAAGCAATTTACATAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCA GAAACTGAAAGAGTTGAATGACTGGCTAACAAAAACAGAAGAAAGAACAAGGAAA ATGGAGGAAGAGCCTCTTGGACCTGATCTTGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAACAA CATAAGGTGCTTCAAGAAGATCTAGAACAAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTCACT CACATGGTGGTGGTAGTTGATGAATCTAGTGGAGATCACGCAACTGCTGCTTTGGAA GAACA ACTTAAGGTATTGGGAGATCGATGGGCAAACATCTGTAGATGGACAGAAGA CCGCTGGGTTCTTTTACAAGACATCCTTCTCAAATGGCAACGTCTTACTGAAGAACAG TGCTTTTTTAGTGCATGGCTTTCAGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTACACA ACTGGCTTTAAAGATCAAATGAAATGTTATCAAGTCTTCAAAA ACTGGCCGTTTTAA AAGCGGATCTAGAAAAGAAAAAGCAATCCATGGGCAA ACTGTATTCACTCAAACAA GATCTTCTTTCAACACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGGCTG GATAACTTTGCCCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAA ACTTGAAAAGAGTACAGCA CAGATTTACAGGCTGTCACCACC ACTCAGCCATCACTAACACAGACA ACTGTAATG GAAACAGTAACTACGGTGACCACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCAAGA GGA ACTTCCACCACCACCTCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATCTTGAAAG ACTCCAGGAACTTCAAGAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAGCTGA GGTGATCAAGGGATCCTGGCAGCCCGTGGGCGATCTCCTCATTGACTCTCTCCAAGAT CACCTCGAGAAAGTCAAGGC ACTTCGAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACGT GAGCCACGTCAATGACCTTGCTCGCCAGCTTACC ACTTTGGGCATTCAGCTCTCACCG TATAACCTCAGCACTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAGGTGGCC GTCGAGGACCGAGTCAGGCAGCTGCATGAAGCCACAGGGACTTTGGTCCAGCATCT CAGCACTTTCTTTCCACGTCTGTCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCAAACA AAGTGCCCTACTATATCAACCACGAGACTCAAACA ACTTGCTGGGACCATCCCAAAA TGACAGAGCTCTACCAGTCTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGCTTATAG GACTGCCATGAAACTCCGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCT GTCAGCTGCATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGACCAGCCCAT GGATATCCTGCAGATTATTAATTGTTTGACC ACTATTTATGACCGCCTGGAGCAAGAG CACAACAATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATATGTGTCTGAACTGGCTGCTGA ATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCCTGTCTTTTAAA ACTGGCA TCATTTCCCTGTGTAAGCACATTTGGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGT GGCAAGTTCAACAGGATTTTGTGACCAGCGCAGGCTGGGCCCTCTTCTGCATGATTCT ATCCAAATTTCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAG CCAAGTGTCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAGCCAGAGATCGAAGCGGCC CTCTTCCTAGACTGGATGAGACTGGAACCCAGTCCATGGTGTGGCTGCCCCGTCTGC ACAGAGTGGCTGCTGCAGAACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTAACATCTGCAAAG AGTGTCCAATCATTGGATTCAGGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTAATTATGACATCTG CCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGTCGAGTTGCAAAAGGCCATAAAATGCACTATCCCATG GTGGAATATTGCACTCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTTCGAGACTTTGCCAAGGTA CTAAAAACAAATTTGCAACCAAAAGGTATTTTGC GAAGCATCCCCGAATGGGCTAC CTGCCAGTGCAGACTGTCTTAGAGGGGGACAACATGGAAACTGACACAATTTAGAAC TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA ATAAAGCATTTTTTTCACTGC	10 20 30 40

10

20

30

40

【0095】

いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、(5'から3'まで)(i)エンハンサーと、(ii)プロモーターと、(iii)導入遺伝子と、(iv)SV40ポリ(A)ターミナルをコードする配列と、を含む。ある特定の実施形態では、エンハンサーは、SK-CRM4エンハンサーである。ある特定の実施形態では、プロモーターは、MHCK7プロモーターである。ある特定の実施形態では、導入遺伝子は、 μ Dysをコードする核酸である。更なる実施形態では、当該遺伝子構築物は、1つ以上の追加の調節エレメントを含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子構築物は、配列番号11と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%

50

、 96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する連続核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、配列番号11の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、配列番号11の核酸配列からなる。

【0096】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるベクターゲノムは、配列番号12と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子構築物は、配列番号12からなる。いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号12の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号12の核酸配列からなる。

10

20

30

40

50

【化 6】

遺伝子構築物 2(配列番号 11)

TTCTGAGTTCTCTAAGGTCCTCACTCCCAACTCAGACCCAAGTCCTGTCAATTCCCA
TTCAGTGTCTGATCTCTTCTTCTCACCTTCCCCATCTTCCATTTGACCCAAGCTTCCT
GAGCACTCCTCCCATTCCTCTTTTGGAGTCCCTCCTCTCCAGAACCCAGTAATA
AGTGGGCTCCTCCCTGGCCTGGACCCCATGGTAACCTATAAGGCGAGGCAGCTGC
CATCTGAGGCAGGGAGGGGCTGGTGTGGGAGGCTAAGGCCTCAGATTAAAAATAA
CTGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGAGACGCTCCTGTCTCTCTCTAT
CTGCCATCGGCCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCCAAGGACTAAAAAAGGCCATG
GAGCCAGAGGGGCGAGGGCAACAGACCTTTCATGGGCAAACCTGGGGCCCTGCTGT
CTAGCATGCCCCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGAC
ACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCAAC
ACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGAAGATCTT
CGAACAAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTGGGGGCCAGGGCT
TATACGTGCCTGGGACTCCAAAGTATTACTGTTCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGC
TGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCC
TTGGGGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGG
TGGGCACGGTGCCTGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTCCC
TGGGGACAGCCCCCTCTGGCTAGTCACACCTTGAGGCTCCTCTATATAACCCAGGG
GCACAGGGGCTGCCTCATTCTACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACTCAGGA
GCCAGCCAGCCATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAAGAGAAGAT
GTTCAAAAGAAAAATTACAAAAATGGGTAAATGCACAATTTTCTAAGTTTGGGAAG
CAGCATATTGAGAACCCTTTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGCGCCTCCTAGACCTC
CTCGAAGGCCTGACAGGGCAAAAAGTCCAAAAGAAAAAGGATCCACAAGAGTTCA
TGCCCTGAACAATGTCAACAAGGCACTGCGGGTTTTGCAGAACATAATGTTGATTT
AGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTAGATGGAAATCATAAACTGACTCTTGTTTT
GATTTGGAATATAATCCTCCACTGGCAGGTCAAAAAATGTAATGAAAAATATCATGGC
TGGATTGCAACAAACCAACAGTGAAGATTCTCCTGAGCTGGGTCCGACAATCAAC
TCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTACCACCAGCTGGTCTGATGGCCTG
GCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTTGACTGGAATAGTGTGG
TTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTCAACATCGCCAGATATC
AATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGATACCACCTATCCAGATA
AGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAG
CATTGAAGCCATCCAGGAAGTGAAATGTTGCCAAGGCCACCTAAAGTGACTAAAGA
AGAACATTTTCAGTTACATCATCAATGCACACTATTCTCAACAGATCACGGTCAGTCTA
GCACAGGGATATGAGAGAACTTCTTCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGCCTAC
ACACAGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACGGAGCCATTTCTTTCACAGC
ATTTGGAAGCTCCTGAAGACAAGTCATTTGGCAGTTCATTGATGGAGAGTGAAGTAA
ACCTGGACCGTTATCAACAGCTTTAGAAGAAGTATTATCGTGGCTTCTTTCTGCTGA
GGACACATTGCAAGCACAAAGGAGAGATTTCTAATGATGTGGAAGTGGTGAAGACC
AGTTTCTATCTCATGAGGGGTACATGATGGATTTGACAGCCATCAGGGCCGGTTG
GTAATATTCTACAATTGGGAAGTAAGCTGATTGGAACAGGAAAATTATCAGAAGATG
AAGAACTGAAGTACAAGAGCAGATGAATCTCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCA
GGGTAGCTAGCATGGAAAAACAAAGCAATTTACATAGAGTTTTAATGGATCTCCAGA
ATCAGAACTGAAAAGTTGAATGACTGGCTAACAAAAACAGAAGAAAGAACAAGG
AAAATGGAGGAAGAGCCTCTTGGACCTGATCTTGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAA
CAACATAAGGTGCTTCAAGAAGATCTAGAACAAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTC
ACTCACATGGTGGTGGTAGTTGATGAATCTAGTGGAGATCACGCAACTGCTGCTTTG
GAAGAACAACCTAAGGTATTGGGAGATCGATGGGCAAACATCTGTAGATGGACAGA
AGACCGCTGGGTTCTTTTACAAGACATCCTTCTCAAATGGCAACGCTTACTGAAGAA
CAGTGCCTTTTATGTCATGGCTTTCAGAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTAC
ACAACCTGGCTTTAAGATCAAAATGAAATGTTATCAAGTCTCAAAAACCTGGCCGTT

10

20

30

40

50

【化 7】

遺伝子構築物 2(配列番号 11)	
TTAAAAGCGGATCTAGAAAAGAAAAAGCAATCCATGGGCAAACGTATTCACTCAA CAAGATCTTCTTTCAACACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGG CTGGATAACTTTGCCCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAACTTGAAAAGAGTACA GCACAGATTTACAGGCTGTCACCACCCTCAGCCATCCTAACACAGACAACCTGTA ATGGAAACAGTAACACTACGGTGACCACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCA AGAGGAACTTCCACCACCACCTCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATCTTGA AAGACTCCAGGAACTTCAAGAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAG CTGAGGTGATCAAGGGATCCTGGCAGCCCGTGGGCGATCCTCATTGACTCTCTCCA AGATCACCTCGAGAAAGTCAAGGCACTTCGAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGA ACGTGAGCCACGTCAATGACCTTGCTCGCCAGCTTACCACCTTTGGGCATTGAGCTCTC ACCGTATAACCTCAGCACTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAGGT GGCCGTCGAGGACCAGTCAGGCAGCTGCATGAAGCCCACAGGGACTTTGGTCCAGC ATCTCAGCACTTTCTTTCCACGTCTGTCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCA AACAAAGTGCCCTACTATATCAACCACGAGACTCAAACAACCTGCTGGGACCATCCC AAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGCTT ATAGGACTGCCATGAAACTCCGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGA GCCTGTCAGCTGCATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAAATGACCAGC CCATGGATATCCTGCAGATTATTAATTGTTTACCCTATTTATGACCGCCTGGAGCA AGAGCACAAACAATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATATGTGTCTGAACTGGCTG CTGAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAAC GGCATATTTCCCTGTGTAAAGCACATTTGGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGC AAGTGGCAAGTTCAACAGGATTTTGTGACCAGCGCAGGCTGGGCCTCCTTCTGCATG ATTCTATCCAAATTCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGGCAGTAACAT TGAGCCAAGTGTCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAGCCAGAGATCGAAGC GGCCCTCTTCTAGACTGGATGAGACTGGAACCCAGTCCATGGTGTGGCTGCCCCGTC CTGCACAGAGTGGCTGCTGCAGAACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTAACATCTGC AAAGAGTGTCCAATCATTGGATTGAGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTAATTATGAC ATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGTTCGAGTTGCAAAAGGCCATAAAATGCACTATC CCATGGTGGAAATATTGCACTCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTTCGAGACTTTGCCA AGGTAATAAAAAACAAATTTTGAACCAAAAGGTATTTTGCGAAGCATCCCCGAATGG GCTACCTGCCAGTGCAGACTGTCTTAGAGGGGGACAACATGGAAACTGACACAATTT AGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATTTTTTTCTACTGC	10 20 30

10

20

30

40

50

【化 8】

本発明の例示的なベクターゲノム配列(配列番号 12)

```

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCC
ATCACTAGGGGTTCTTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGC
AAGCTAGCGTACCTCGCGAATGCATCTAGATTGCGGACGTTACATAACTTACGGTAA
ATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT
ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT
ACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTA
TGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCC
CATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATATTTTGTGC
AGCGATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGGCGGGGCGGGG
GAGGGGCGGGGCGGGGCGGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGC
CGTCCGAAAAGTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCCCTATAAAAAAGC
GAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGGTAAGTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCG
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTCTCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCT
AGATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAAGAGAAGATGTTCAAAAAG
AAAACATTCACAAAATGGGTAAATGCACAATTTTCTAAGTTTGGGAAGCAGCATATT
GAGAACCTCTTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGCGCCTCCAGACCTCTCGAAGGC
CTGACAGGGCAAACACTGCCAAAAGAAAAGGATCCACAAGAGTTCATGCCCTGAA
CAATGTCACAAGGCACCTGCGGGTTTTGCAAGCAATAATGTTGATTTAGTGAATAT
TGGAAAGTACTGACATCGTAGATGGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTGATTTGGAAT
ATAATCTCCACTGGCAGGTCAAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGATTGCAA
CAAACCAACAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTAT
CCACAGGTAAATGTAATCAACTTCACCACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATG
CTCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTTGACTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGCA
GTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTCAACATCGCCAGATATCAATTAGGCAT
AGAGAAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGATACCACCTATCCAGATAAGAAGTCCAT
CTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCC
ATCCAGGAAGTGGAATGTTGCCAAGGCCACCTAAAGTGACTAAAGAAGAACAATTTT
CAGTTACATCATCAAATGCACTATTCTCAACAGATCACGGTCAGTCTAGCACAGGGA
TATGAGAGAACTTCTTCCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTG
CTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACGGAGCCCATTTCCTTACAGCATTGGAAGC
TCCTGAAGACAAGTCATTTGGCAGTTCATTGATGGAGAGTGAAGTAAACCTGGACCG
TTATCAAACAGCTTTAGAAGAAGTATTATCGTGGCTTCTTTCTGCTGAGGACACATTG
CAAGCACAAGGAGAGATTTCTAATGATGTGGAAGTGGTGAAGACCAGTTTCATACT
CATGAGGGGTACATGATGGATTTGACAGCCCATCAGGGCCGGGTTGGTAATATTCTA
CAATTGGGAAGTAAGCTGATTGGAACAGGAAAATTATCAGAAGATGAAGAACTGA
AGTACAAGAGCAGATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAGGGTAGCTAG
CATGGA AAAACAAAGCAATTTACATAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAACT
GAAAGAGTTGAATGACTGGCTAACAAAAACAGAAGAAAGAACAAAGGAAAATGGAG
GAAGAGCCTCTTGACCTGATCTTGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAACAACATAAG
GTGCTTCAAGAAGATCTAGAACAAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTCACTCACATG
GTGGTGGTAGTTGATGAATCTAGTGGAGATCACGCAACTGCTGCTTTGGAAGAACA
CTTAAGGTATTGGGAGATCGATGGGCAACATCTGTAGATGGACAGAAGACCGCTGG
GTTCTTTTACAAGACATCTTCTCAAATGGCAACGCTTACTGAAGAACAGTGCCTTT
TTAGTGCATGGCTTTCAGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTCACACA ACTGGCT
TTAAAGATCAAAAATGAAATGTTATCAAGTCTTCAAAAACCTGGCCGTTTTAAAAGCGG
ATCTAGAAAAGAAAAGCAATCCATGGGCAAACCTGTATTCACTCAACAAGATCTTC
TTTCAACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGGCTGGATAACT
TTGCCCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAAACTTGAAGAAGTACAGCACAGATTT
CACAGGCTGTCACCACCACTCAGCCATCACTAACACAGACAACCTGTAATGGAAACAG

```

10

20

30

40

50

【化 9】

本発明の例示的なベクターゲノム配列(配列番号 12)

```

TAACTACGGTGACCACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCAAGAGGAACTTC
CACCACCACCTCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATCTTGAAAGACTCCAGG
AACTTCAAGAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAGCTGAGGTGATCA
AGGGATCCTGGCAGCCCGTGGGCGATCTCCTCATTGACTCTCTCCAAGATCACCTCGA
GAAAGTCAAGGCACTTCGAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACGTGAGCCACG
TCAATGACCTTGCTCGCCAGCTTACCACCTTGGGCATTGAGCTCTCACCGTATAACCT
CAGCACTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAGGTGGCCGTCGAGGA
CCGAGTCAGGCAGCTGCATGAAGCCCACAGGGACTTTGGTCCAGCATCTCAGCACTT
TCTTTCCACGTCTGTCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCAAACAAAGTGCC
CTACTATATCAACCACGAGACTCAAACAACCTGCTGGGACCATCCCCAAAATGACAGA
GCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGCTTATAGGACTGCC
ATGAAACTCCGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTG
CATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGACCAGCCATGGATATCC
TGCAGATTATTAATTGTTTGACCCTATTTATGACCGCCTGGAGCAAGAGCACAAACA
ATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATATGTGTCTGAACTGGCTGCTGAATGTTTA
TGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCCTGTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTC
CTGTGTAAGCACATTTGGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGT
TCAACAGGATTTTGTGACCAGCGCAGGCTGGGCCCTCTTCTGCAATGATTCTATCCAAA
TTCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCAAGTG
TCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAGCCAGAGATCGAAGCGGCCCTCTTCCT
AGACTGGATGAGACTGGAACCCAGTCCATGGTGTGGCTGCCCGTCCTGCACAGAGT
GGCTGCTGCAGAACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTAACATCTGCAAAGAGTGTCC
AATCATTGGATTGAGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTAATTATGACATCTGCCAAAG
CTGCTTTTTTTCTGGTTCGAGTTGCAAAAGGCCATAAAATGCACTATCCCATGGTGGAA
TATTGCACTCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTTCGAGACTTTGCCAAGGTAATAAAA
AACAAATTTGCAACCAAAAGGTATTTTGCAGCATCCCCGAATGGGCTACCTGCCA
GTGCAGACTGCTTAGAGGGGGACAACATGGAAACTGACACAATTTAGAACTTGTTT
ATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAA
GCATTTTTTTTACTGCTCGCGAATCGGATCCCCTCGAGTTCTACGTAGATAAGTAGCA
TGGCGGGTTAATCATTAATACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGC
TTTGGCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

```

10

20

30

【0097】

AAVベクター骨格

いくつかの実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、標準的な分子生物学技術を使用して、本明細書に記載される遺伝子構築物を適切なアデノウイルスプラスミド骨格に挿入することによって組み立てることができる(例えば、Sambrook et al. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.", Ausubel et al. (1987). "Current Protocols in Molecular Biology"を参照されたい)。アデノウイルスプラスミド骨格は、一実施形態では、本明細書に記載される5' ITR配列及び3' ITR配列を含む。遺伝子構築物は、ITR配列間、5' ITR配列の下流、及び3' ITR配列の上流で、アデノウイルスプラスミド骨格に挿入される。

40

【0098】

例えば、一実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、配列番号10の配列を含む遺伝子構築物を、配列番号13の配列を含むアデノウイルスプラスミド骨格に挿入することによって組み立てることができる。

【0099】

別の実施形態では、本発明のAAVベクターゲノムは、配列番号11の配列を含む遺伝

50

子構築物を、配列番号 13 の配列を含むアデノウイルスプラスミド骨格に挿入することによって組み立てることができる。

【0100】

いくつかの実施形態では、本発明のアデノウイルスプラスミド骨格は、配列番号 13 と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスプラスミド骨格は、配列番号 13 の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスプラスミド骨格は、以下に提供される配列番号 13 の核酸配列からなる。

【化 10】

10

例示的なアデノウイルスプラスミド骨格(配列番号 13)	
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA	
GGCCGGGCGACCAAAGTTCGCCGACGCCCGGGCTTGGCCGGGCGGCTCAGTGAG	
CGAGCGAGCGCGCAGCC TTAATTAACCTAAGGAAAATGAAGTGAAGTTCCTATACTT	
TCTAGAGAATAGGAACTTCTATAGTGAGTCAATAAGGGCGACACAAAATTTATTCT	
AAATGCATAATAAATACTGATAACATCTTATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTT	
GACATGTATAATTTTGATATCAAAAACGATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTTATT	
TTCTTAATTCCTTTAACAACTAGAAATATTGTATATACAAAAATCATAAATAATA	
GATGAATAGTTTAATTATAGGTGTTCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTTAA	
GTGCGTTGCTTTTTCTCATTATAAAGGTTAAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTG	
ACAGGCGCCCTTAAATATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATAAAAAA	
ACCCGCCGAAGCGGGTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATTACTCGTTATCAGAAC	
CGCCAGGGGGCCCGAGCTTAACCTTTTTATTTGGGGGAGAGGGAAGTCATGAAAAA	
ACTAACCTTTGAAATTCGATCTCCAGCACATCAGCAAACGCTATTCACGCAGTACA	
GCAAATCCTTCCAGACCCAACCAACCAATCGTAGTAACCATTCAGGAACGCAACCG	
CAGCTTAGACAAAACAGGAAGCTATGGGCTGCTTAGGTGACGTCCTCGTCAGGT	
TGAATGGCTAGGTGCTGGCTGGATGCAGAAAGCTGGAAGTGTGTGTTTACCGCAGC	
ATTAAGCAGCAGGATGTTGTTCTAACCTTGCCGGGAATGGCTTTGTGGTAATAGG	
CCAGTCAACCAGCAGGATGCGTGTAGGCGAATTTGCGGAGCTATTAGAGCTTATACA	
GGCATTCCGGTACAGAGCGTGGCGTTAAGTGGTCAGACGAAGCGAGACTGGCTCTGGA	
GTGGAAGCGAGATGGGGAGACAGGGCTGCATGATAAATGTCGTTAGTTTCTCCGGT	
GGCAGGACGTCAGCATATTTGCTCTGGCTAATGGAGCAAAGCGACGGGCAGGTAA	
AGACGTGCATTACGTTTTATGGATACAGGTTGTGAACATCCAATGACATATCGGTTT	
GTCAGGGAAGTTGTGAAGTTCTGGGATATACCGCTCACCGTATTGCAGGTTGATATC	
AACCCGGAGCTTGGACAGCCAAATGGTTATACGGTATGGGAACCAAAGGATATTCAG	
ACGCGAATGCCGTGTTCTGAAGCAATTTATCGATATGGTAAAGAAATATGGC ACTCCA	
TACGTCGGCGGCGCGTTCGCACTGACAGATTA AAAACTCGTTCCCTTACCAAATACT	
GTGATGACCATTTCCGGGCGAGGGAATTACACCACGTGGATTGGCATCAGAGCTGATG	
AACCGAAGCGGCTAAAGCCAAAGCCTGGAATCAGATATCTTGCTGAACTGTCAGACT	
TTGAGAAGGAAGATATCCTCGCATGGTGGAAAGCAACAACCATTCGATTTGCAAATAC	
CGGAACATCTCGGTAACCTGCATATCTGCATTA AAAAATCAACGCAAAAAATCGGAC	
TTGCCTGCAAAGATGAGGAGGATTGCAGCGTGT TTTTAATGAGGTCATCACGGGAT	
CCCATGTGCTGACGGACATCGGGAACGCCAAAGGAGATTATGTACCAGGGAAGA	
ATGTCGCTGGACGGTATCGGAAAATGTATTACAGAAAATGATTATCAAGCCCTGTAT	
CAGGACATGGTACGAGCTAAAAGATTCGATAACCGGCTCTTGTCTGAGTCATGCGAA	
ATATTTGGAGGGCAGCTTGATTTGACTTCGGGAGGGAAGCTGCATGATGCGATGTT	
ATCGGTGCGGTGAATGCAAAGAAGATAACCGCTTCCGACCAAATCAACCTTACTGGA	
ATCGATGGTGTCTCCGGTGTGAAAGAACCAACAGGGGTGTTACCACTACCGCAGG	
AAAAGGAGGACGTGTGGCGAGACAGCGACGAAGTATCACCGACATAATCTGCGAAA	
ACTGCAAATACCTTCAACGAAACGCACCAGAAA TAAACCCAAGCCAATCCAAAAA	
GAATCTGACGTAAAAACCTTCAACTACACGGCTCACCTGTGGGATATCCGGTGGCTA	
AGACGTGTCGAGGAAAACAAGGTGATTGACCAAATCGAAGTTACGAACAAGAA	
AGCGTCGAGCGAGCTTTAACGTGCGCTAACTGCGGTCAGAAGCTGCATGTGCTGGAA	
GTTACGTGTGTGAGCACTGCTGCGCAGA ACTGATGAGCGATCCGAATAGCTCGATG	
CACGAGGAAGAAGATGATGGCTAAACAGCGCAAGACGATGTA AAAACGATGAAT	
GCCGGGAATGGTTTACCCTGCATTCGCTAATCAGTGGTGGTCTCTCCAGAGTGTGG	
AACCAAGATAGCACTCGAACGACGAAGTAAAGAACGCGAAAAAGCGAAAAAGCA	
GCAGAGAAGAACAGCAGCAGAGGAGCAGAAACAGAAAAGATAAACTTAAGATTC	
GAAAACTCGCCCTTAAAGCCCGCAGTTACTGGATTAAACAAGCCCAACAAAGCCGTAA	
ACGCCCTTATCAGAGAAAAGACCGCGACTTACCATGTATCTCGTGCGGAACGCTCA	
CGTCTGCTCAGTGGGATGCCGGACATTACCGGACA ACTGCTGCGGCACCTCAACTCC	
GATTAATGAACGCAATATTCACAAGCAATGCGTGGTGTGCAACCAGCACAAAAGCG	

20

30

40

50

【化 1 1】

例示的なアデノウイルスプラスミド骨格(配列番号 13)

GAAATCTCGTTCCTGATCGCGTCGAACTGATTAGCCGCATCGGGCAGGAAGCAGTAG
 ACGAAATCGAATCAAACATAACCGCCATCGCTGGACTATCGAAGAGTGCAAGGCG
 ATCAAGGCAGAGTACCAACAGAACTCAAAGACCTGCGAAATAGCAGAAGTGAGGC
 CGCATGACGTTCTCAGTAAAAACATTCCAGACATGCTCGTTGAAGCATAACGAAAT
 CAGACAGAAGTAGCACGCAGACTGAAATGTAGTCGCGGTACGGTCAGAAAAATACGT
 TGATGATAAAGACGGGAAAATGCACGCCATCGTCAACGACGTTTCATGGTTCATCG
 CGGATGGAGTGAAAGAGATGCGCTATTACGAAAAAATTGATGGCAGCAAATACCGA
 AATATTTGGGTAGTTGGCGATCTGCACGGATGCTACACGAACCTGATGAACAAACTG
 GATACGATTGGATTGACAACAAAAAGACCTGCTTATCTCGGTGGGCGATTTGGTT
 GATCGTGGTGCAGAGAACGTTGAATGCCTGGAATTAATCACATTCCCCTGGTTCAGA
 GCTGTACGTGGAAACCATGAGCAAATGATGATGATGGCTTATCAGAGCGTGGAAAC
 GTTAATCACTGGCTGCTTAATGGCGGTGGCTGGTTCCTTAATCTCGATTACGACAAAG
 AAATTCTGGCTAAAGCTCTTGCCATAAAGCAGATGAACTTCCGTTAATCATCGAACT
 GGTGAGCAAAGATAAAAAATATGTTATCTGCCACGCCGATTATCCCTTTGACGAATA
 CGAGTTTGGAAAGCCAGTTGATCATCAGCAGGTAATCTGGAACCGCGAACGAATCAG
 CAACTCACAAAAACGGGATCGTGAAGAAATCAAAGGCGCGGACACGTTTCATCTTTGG
 CTACACGCCAGCAGTGAACCACTCAAGTTTGCCAAACAAATGTATATCGATACCGG
 CGCAGTGTCTGCGGAAACCTAACATTGATTACGGTACAGGGAGAAAGGCGCATGAGA
 CTCGAAAGCGTAGCTAAATTTCAATTCGCCAAAAAGCCGATGATGAGCGACTACCA
 CGGGCCACGGCTTCTGACTCTCTTCCGGTACTGATGTGATGGCTGCTATGGGGATGG
 CGCAATCACAAGCCGGATTCTGGTATGGCTGCATTCTGCGGTAAGCACGAACTCAGCC
 AGAACGACAAACAAAAGGCTATCAACTATCTGATGCAATTTGCACACAAGGTATCGG
 GAAATACCGTGGTGGCAAAGCTTGAAGGAAATACTAAGGCAAAGGTACTGCAAG
 GTGCTCGCAACATTGCTTATGCGGATTATTGCCGTAGTGCCGCGACGCCGGGGCA
 AGATGCAGAGATTGCCATGGTACAGGCCGTGCGGTTGATATTGCCAAAAACAGAGCTG
 TGGGGGAGAGTTGTCGAGAAAGAGTGCAGGAAAGATGCAAAGGCGTCCGGCTATTCAAG
 GATGCCAGCAAGCGCAGCATATCGCGCTGTGACGATGCTAATCCCAAACCTTACCCA
 ACCACCTGGTCAACGCTGTTAAGCCGCTGTATGACGCTCTGGTGGTGCATGGCCAC
 AAAAAAGAGTCAATCGCAGACAACATTTGAATGCGGTCACACGTTAGCAGCATGAT
 TGCCACGGATGCAACATATTAACGGCATGATATTGACTTATTGAATAAAATTGGGT
 AAATTTGACTCAACGATGGGTTAATTCGCTCGTTGTGGTAGTGAGATGAAAAGAGGC
 GGCCTTACTACCGATTCCGCCTAGTTGGTCACTTCGACGTATCGTCTGGAACCCAA
 CCATCGCAGGCAGAGAGGTCTGCAAAATGCAATCCCGAAACAGTTTCGACGTAATAG
 TTAGAGCCTGCATAACGGTTTCGGGATTTTTATATCTGCACAACAGGTAAGAGCATT
 GAGTCGATAATCGTGAAGAGTGGCGAGCCTGGTTAGCCAGTGTCTTTCCGTTGTGC
 TGAATTAAGCGAATAACCGAAGCAGAACCAGGATACCAAATGCGTACAGGCGTCATC
 GCCGCCAGCAACAGCACAAACCCAAACTGAGCCGTAGCCACTGCTGTCCTGAATTC
 ATTAGTAATAGTTACGCTGCGGCCTTTTACACATGACCTTCGTGAAAGCGGGTGGCA
 GGAGGTCGCGCTAACAACTCCTGCCGTTTTGCCCCTGCATATCGGTCACGAACAAA
 TCTGATTACTAAACACAGTAGCCTGGATTTGTTCTATCAGTAATCGACCTTATTCCTA
 ATAAATAGAGCAAATCCCTTATTGGGGGTAAGACATGAAGATGCCAGAAAAACAT
 GACCTGTTGGCCGCCATTCTCGCGGCAAAGGAACAAGGCATCGGGCAATCTTGCG
 TTTGCAATGGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGGCGGTGCGTTTACAAAAACAGTA
 ATCGACGCAACGATGTGCGCCATTATCGCCTGGTTCATTCTGTGACCTTCTGACTTCG
 CCGGACTAAGTAGCAATCTCGCTTATATAACGAGCGTGTATTCGCTACATCGGTAC
 TGACTCGATTGGTTTCGCTTATCAAACGCTTCGCTGCTAAAAAAGCCGGAGTAGAAGA
 TGGTAGAAATCAATAACAACGTAAGGCCTTCCTCGATATGCTGGCGTGGTCGGAGG
 GAACTGATAACGGACGTCAGAAAACAGAAATCATGGTTATGACGTCATTGTAGGCG
 GAGAGCTATTTACTGATTACTCCGATCACCCTCGCAAACTTGTACGCTAAACCCAAA
 ACTCAAATCAACAGGCGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTACAACACAGAAAGAGTTG
 TAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCTTCGCTTAGTTTGTATGCTGGCAG
 TTCCCTACTCTCGCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGC
 TGCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG

10

20

30

40

50

【化 1 2】

例示的なアデノウイルスプラスミド骨格(配列番号 13)

```

GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGT
AAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA
GGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACC
GGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
CCCCGTTACGCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACT
AGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGACGCGCGGTAACCTACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCTTTTAGAAAACT
CATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTT
TTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATT
AATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAATGGCAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCC
AGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGA
TTGCGCCTGAGCGAGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGG
AATCGAGTGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGA
ATCAGGATATTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGT
AACCATGCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCCGGAAGTGGCATAAAT
TCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTT
TGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAAGCGATAGATTGT
CGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCC
ATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTCTTCTT
TTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACCAATT
CTGAACATTATCGCGAGCCATTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTTG
CCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAA
CGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGACTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAG
GCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGCCCGGGCTAATT
AGGGGGTGTGCGCCTTATTCGACTCTATAGTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAG
GAACTTCTGAAGTGGGGTCTGACTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG
CCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCG
AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCT

```

10

20

30

【0101】

アデノ随伴ウイルス(AAV)粒子産生

A AV 粒子は、任意の標準的な方法によって産生することができる(例えば、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる、WO 2001/083692、Masica et al., 2014, *Molecular Therapy*, 22(11):1900-1909、Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539、Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial, and Immunol.*, 158:97-129)、Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072(1984)、Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466(1984)、Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251(1985)、McLaughlin et a

40

50

1, 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、WO95/13365、米国特許第5,658,776号、WO95/13392、WO96/17947、PCT/US98/18600、WO97/09441 (PCT/US96/14423)、WO97/08298 (PCT/US96/13872)、WO97/21825 (PCT/US96/20777)、WO97/06243 (PCT/FR96/01064)、WO99/11764、Perrin 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号を参照されたい)。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるAAVベクターゲノムは、DNA産生を拡張するために *Escherichia coli* に形質転換し、任意の標準的な方法（例えば、Maxi-Prep K、Thermo Scientific）を使用して精製し、制限消化又は配列決定によって検証することができる。次いで、精製されたAAVベクターゲノムは、AAV rep及びAAV cap遺伝子を含むプラスミド、並びにAAVヘルパープラスミドと組み合わせて、標準的な方法（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリエチレンイミン、エレクトロポレーション、及び同等物）を使用して、適切なパッケージング細胞株（例えば、HEK293、HeLa、又はPerC.6、MRC-5、WI-38、Vera、及びFRhL-2細胞）にトランスフェクトすることができる。AAV rep遺伝子及びcap遺伝子は、任意のAAV血清型に由来し得、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh.74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、及びAAV13を含むがこれらに限定されない、組換えAAVベクターITRのものと同じであるか、又は異なり得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるAAV粒子は、それぞれ、AAV2及びAAV9に由来するAAV rep及びcap遺伝子を含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるAAV粒子は、パッケージング細胞から採取され、塩化セシウム超遠心分離勾配又はカラムクロマトグラフィーなどによる、当該技術分野において標準的な方法（例えば、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる、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)によって精製することができる。

【0103】

医薬組成物

本明細書で提供される医薬組成物は、髄腔内医薬組成物であり、すなわち、髄腔内経路を介した送達のために意図される。髄腔内組成物は、本明細書に記載されるように、 μ Dys導入遺伝子をカプシド封入する有効量のAAV粒子を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、本発明のAAV粒子と、薬学的に許容可能な担体と、任意選択的に、他の薬剤、医薬品、安定剤、緩衝剤、担体、アジュバント、希釈剤などを含む。「薬学的に許容可能な」とは、有毒ではないか、又は別様に有害ではない材料を意味し、すなわち、材料は、いずれの望ましくない生物学的効果も引き起こすことなく対象に投与され得る。医薬組成物は、髄腔内医薬組成物である。有効量のAAV粒子は、同じベクターゲノム成分、又は同じ導入遺伝子を含むIV AAV医薬組成物と比較して、より低用量のベクターゲノムを含む。例えば、一実施形態では、有効量の本明細書に記載されるAAV粒子は、同じAAV粒子又は同じマイクロジストロフィン導入遺伝子を含む有効量のIV組成物のよりも約90%以下のベクターゲノムである。

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物は、任意選択的に、医薬組成物が送達される対象の血液と等張である、滅菌水性及び非水性注射溶液を含む。医薬組成物は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び組成物を投与される意図された対象の血液と等張にする溶質を含有することができる。水性及び非水性滅菌懸濁液、溶液、並びにエマルションは、懸濁剤及び増粘剤を含むことができる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、水、アルコール溶液/水溶液、エマルション、又は懸濁液が挙げられ、生理食塩水及び緩衝媒体を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容可能なビヒクルを含み、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、又は固定油を含むことができる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス、並びに同等物などの防腐剤及び他の添加剤も存在し得る。

10

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単位/用量又は複数回用量容器、例えば、密封アンプル及びバイアル中で提示することができ、使用の直前に、滅菌液体担体、例えば、生理食塩水又は注射用蒸留水の添加のみを必要とする、フリーズドライ（凍結乾燥）状態で保管することができる。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、I V、筋肉内、又は脳室内（I C V）投与のために代替的に処方することができる。

20

【 0 1 0 7 】

治療の方法

本発明の一態様は、有効量の本明細書に記載されるA A V粒子を含む髄腔内組成物を単回用量で髄腔内投与することを含む、ジストロフィノパチーの治療を必要とする対象においてジストロフィノパチーを治療する方法に関する。本方法は、例えば、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、又はD M D関連拡張型心筋症（D C M）などのジストロフィノパチーを治療するために、A A V粒子を対象の心臓及び/又は骨格に優先的に送達するために採用することができる。理論に束縛されることを所望することなく、A A V粒子、及びジストロフィノパチーを治療するために、同粒子の送達を必要とする対象に同粒子を送達するための方法は、少なくとも本発明が、（i）実質的に同じ又はより良好な治療利益を達成するために、I V送達よりも著しく低い投与量を可能にし、それによって、ウイルス負荷及び毒性並びに他の副作用を低減し、かつ/又は（i i）肝組織と比較して、心筋及び/又は骨格筋組織における優先的な導入遺伝子標的化及び発現を可能にし、それによって、導入遺伝子を目的の細胞に標的化し、静脈内送達されるA A Vベクターと比較して、より優れた治療利益を提供し、（i i i）製造負担の減少に対応する、必要とされる低投与量により、I V製剤と比較して、より大きな患者集団に利益をもたらすことができるため、既知のA A V粒子及び治療方法よりも優れた利益を提供する。

30

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、治療を必要とする対象を治療する方法であって、 $\mu D y s$ 導入遺伝子を含むベクターゲノムをカプシド封入するA A Vカプシドを含む有効量のA A V粒子を含む組成物を、単回用量で対象に髄腔内投与することを含む、方法が提供される。更なる実施形態では、対象は、髄腔内投与の前にトレンデレンブルク位に位置付けられる。一実施形態では、組成物の髄腔内投与は、非イオン性低浸透圧造影剤の非存在下にある。別の実施形態では、髄腔内投与は、非イオン性低浸透圧造影剤の存在下にある。

40

【 0 1 0 9 】

本発明は、部分的に、有効量の本明細書に記載されるA A V粒子の髄腔内投与が、対象の肝組織における導入遺伝子発現と比較して、対象の骨格筋及び/又は心筋においてより高いレベルで $\mu D y s$ 導入遺伝子発現を可能にするという所見に基づく。例えば、一実施

50

形態では、有効量の A A V 粒子、例えば、A A V 9 粒子の投与後に、 μ D y s 導入遺伝子は、肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現のレベルと比較して、対象の骨格筋においてより高いレベルで発現される。別の実施形態では、有効量の A A V 粒子、例えば、組換え A A V 9 粒子の投与後に、 μ D y s 導入遺伝子は、肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現のレベルと比較して、対象の心筋においてより高いレベルで発現される。更に別の実施形態では、有効量の A A V 粒子、例えば、組換え A A V 9 粒子の投与後に、 μ D y s 導入遺伝子は、肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現のレベルと比較して、対象の骨格筋及び心筋においてより高いレベルで発現される。

【0110】

本明細書に記載される実施形態によれば、導入遺伝子発現は、遺伝子発現（すなわち、m R N A レベルを測定することによる）又は対応するタンパク質の発現を指し得る。異なる組織型における導入遺伝子発現のレベルを決定するために、実質的に同じ量の組織、又は実質的に同じ数の細胞が、遺伝子発現レベルについて比較されるべきであることが当業者によって理解されるであろう。骨格筋及び/又は心筋におけるより高いレベルの μ D y s 導入遺伝子発現は、一実施形態では、肝組織における μ D y s 導入遺伝子発現の量と比較して、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、又は少なくとも約 80% 高い。更なる実施形態では、 μ D y s 導入遺伝子は、配列番号 5 に記載される核酸配列を含む。

10

【0111】

本明細書に記載される方法の一実施形態では、 μ D y s 導入遺伝子をカプシド封入する有効量の A A V 粒子を送達する方法は、静脈内投与される μ D y s 導入遺伝子をカプシド封入する実質的に同一用量の A A V 粒子と比較して、骨格筋及び/又は心筋においてより優れた μ 導入遺伝子発現を提供する。別の実施形態では、有効量の A A V 粒子を送達する方法は、 μ D y s 導入遺伝子をカプシド封入する有効量の A A V 粒子が静脈内送達されるときと比較して、骨格筋及び/又は心筋においてより優れた μ D y s 導入遺伝子発現を提供する。導入遺伝子発現は、一実施形態では、有効量の A A V 粒子を含む組成物の投与の約 1 週間、約 1 ヶ月、約 2 ヶ月、約 3 ヶ月、約 4 ヶ月、約 5 ヶ月、約 6 ヶ月、約 7 ヶ月、約 8 ヶ月、約 9 ヶ月、約 10 ヶ月、約 11 ヶ月、約 12 ヶ月、約 18 ヶ月、又は約 24 ヶ月後に測定される。導入遺伝子は、一実施形態では、配列番号 5 に示される核酸配列を含む。

20

30

【0112】

別の実施形態では、本発明の μ D y s 導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子は、髄腔内投与されると、同一のベクターゲノム用量が静脈内投与されるときと同じ組織型における導入遺伝子発現と比較して、骨格筋及び/又は心筋において少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、又は少なくとも約 80% 優れた導入遺伝子発現を提供する。同一のベクターゲノムは、同じ調節エレメント及び/又は同一の導入遺伝子配列若しくは同じ A A V カプシドを含む必要はない。しかしながら、髄腔内及び静脈内投与される導入遺伝子は、 μ D y s ポリペプチドをコードする。

40

【0113】

更に別の実施形態では、髄腔内投与された A A V 粒子の投与後に測定される [(骨格筋及び/又は心筋 μ D y s 導入遺伝子発現)] / (肝臓 μ D y s 導入遺伝子発現)] の比は、 μ D y s 導入遺伝子をカプシド封入する同一用量の A A V 粒子が静脈内投与されるときと同じ比よりも大きい。導入遺伝子発現は、一実施形態では、有効量の A A V 粒子を含む組成物の投与の約 1 週間、約 1 ヶ月、約 2 ヶ月、約 3 ヶ月、約 4 ヶ月、約 5 ヶ月、約 6 ヶ月、約 7 ヶ月、約 8 ヶ月、約 9 ヶ月、約 10 ヶ月、約 11 ヶ月、約 12 ヶ月、約 18 ヶ月、約 24 ヶ月、約 36 ヶ月、約 48 ヶ月、又は約 60 ヶ月後に測定される。

【0114】

一実施形態では、 μ D y s 導入遺伝子をカプシド封入する有効量の A A V 粒子は、髄腔

50

内投与されると、同じ用量で静脈内投与される μ Dys 導入遺伝子をカプシド封入する AAV 粒子と比較して、より優れた有効性又はより優れた治療利益を提供する。

【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な髄腔内 (IT) ベクターゲノム (vg) 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な μ Dys 導入遺伝子をコードするベクターゲノムの静脈内 (IV) vg 用量の約 90%、約 90% 以下、約 85%、約 85% 以下、約 80%、約 80% 以下、約 75%、約 75% 以下、約 70%、約 70% 以下、約 60%、約 60% 以下、約 50%、約 50% 以下、約 40%、約 40% 以下、約 30%、約 30% 以下、約 25%、約 25% 以下、約 10%、又は約 10% 以下である。IT ベクターゲノムは、 μ Dys 導入遺伝子を含む。IT 及び IV μ Dys 導入遺伝子は、同じ核酸配列を含む必要はない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 90% 以下である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 75% 以下である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 50% 以下である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 25% 以下である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 10% 以下である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 10 ~ 40 倍少ない。一実施形態における治療応答は、筋組織、例えば、心筋及び/又は骨格筋組織における μ Dys 導入遺伝子発現である。別の実施形態では、治療応答は、ノーススター歩行評価 (NSAA) におけるベースライン (すなわち、治療前) からの対象のスコアの増加である。更なる実施形態では、導入遺伝子は、 μ Dys ポリペプチドをコードする。

【0116】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な髄腔内 (IT) ベクターゲノム (vg) 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な静脈内 (IV) vg 用量よりも低く、IT ベクターゲノム及び IV ベクターゲノムは各々、 μ Dys ポリペプチドをコードする導入遺伝子を含む。しかしながら、それぞれの導入遺伝子は、同じ核酸配列を含む必要はない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 2 倍、約 5 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 35 倍、約 40 倍、約 45 倍、約 50 倍、約 55 倍、約 60 倍、約 65 倍、約 70 倍、約 75 倍、約 80 倍、約 85 倍、約 90 倍、約 95 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、約 250 倍、約 500 倍、又は約 1000 倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 10 倍 ~ 約 20 倍、約 10 倍 ~ 約 30 倍、約 10 倍 ~ 約 40 倍、約 10 倍 ~ 約 50 倍、約 10 倍 ~ 約 75 倍、約 10 倍 ~ 約 100 倍、又は約 10 倍 ~ 約 1000 倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分な IT vg 用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分な IV vg 用量よりも約 2.5 倍 ~ 約 3 倍、約 2.5 倍 ~ 約 4 倍、約

25倍～約50倍、約25倍～約75倍、約25倍～約100倍、約25倍～約500倍、又は約25倍～約1000倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約50倍～約75倍、約50倍～約100倍、約50倍～約250倍、約50倍～約500倍、又は約50倍～約1000倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約100倍～約200倍、約100倍～約250倍、約100倍～約500倍、又は約100倍～約1000倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約10～40倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約25～40倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約40倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約50倍低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法のうちの1つについて治療応答を提供するために十分なIT v g用量は、同じ又は実質的に同じ治療応答を提供するために十分なIV v g用量よりも約100倍低い。一実施形態における治療応答は、筋組織、例えば、心筋及び/又は骨格筋組織における導入遺伝子発現である。

10

20

30

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるµDys導入遺伝子をカプシド封入するAAV粒子を含む、髄腔内(IT)組成物の有効用量は、µDys導入遺伝子をカプシド封入するAAV粒子を含む、静脈内(IV)組成物の有効用量よりも低い。いくつかの実施形態では、AAV粒子を含むIT組成物の有効用量は、IV組成物の有効量よりも約90%、約90%以下、約85%、約85%以下、約80%、約80%以下、約75%、約75%以下、約70%、約70%以下、約60%、約60%以下、約50%、約50%以下、約40%、約40%以下、約30%、約30%以下、約25%、約25%以下、約10%、又は約10%以下のベクターゲノムである。いくつかの実施形態では、AAV粒子を含むIT組成物の有効量は、IV組成物の有効量よりも約90%以下のベクターゲノムである。いくつかの実施形態では、AAV粒子を含むIT組成物の有効量は、IV組成物の有効量よりも約75%以下のベクターゲノムである。いくつかの実施形態では、AAV粒子を含むIT組成物の有効量は、IV組成物の有効量よりも約50%以下のベクターゲノムである。いくつかの実施形態では、AAV粒子を含むIT組成物の有効量は、IV組成物の有効量よりも約25%以下のベクターゲノムである。いくつかの実施形態では、AAV粒子を含むIT組成物の有効量は、IV組成物の有効量よりも約10%以下のベクターゲノムである。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、IT組成物中のAAV粒子の有効用量は、IV組成物中のAAV粒子の有効用量よりも低用量であり、各AAV粒子は、µDys導入遺伝子をカプシド封入する。いくつかの実施形態では、IT組成物中のAAV粒子の有効用量は、IV組

50

成物中の A A V 粒子の有効用量よりも約 2 倍、約 5 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 35 倍、約 40 倍、約 45 倍、約 50 倍、約 55 倍、約 60 倍、約 65 倍、約 70 倍、約 75 倍、約 80 倍、約 85 倍、約 90 倍、約 95 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、約 250 倍、約 500 倍、又は約 1000 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量（有効用量）は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量（有効用量）よりも約 10 倍～約 20 倍、約 10 倍～約 30 倍、約 10 倍～約 40 倍、約 10 倍～約 50 倍、約 10 倍～約 75 倍、約 10 倍～約 100 倍、又は約 10 倍～約 1000 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む髄腔内組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 25 倍～約 30 倍、約 25 倍～約 40 倍、約 25 倍～約 50 倍、約 25 倍～約 75 倍、約 25 倍～約 100 倍、約 25 倍～約 500 倍、又は約 25 倍～約 1000 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む髄腔内組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 50 倍～約 75 倍、約 50 倍～約 100 倍、約 50 倍～約 250 倍、約 50 倍～約 500 倍、又は約 50 倍～約 1000 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 100 倍～約 200 倍、約 100 倍～約 250 倍、約 100 倍～約 500 倍、又は約 100 倍～約 1000 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 25 倍～約 40 倍低い。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 10 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 25 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 40 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 50 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、A A V 粒子を含む I T 組成物の有効量は、同じ A A V 粒子、又は I T 組成物中の A A V 粒子によってカプシド封入された導入遺伝子と同じポリペプチドをコードする導入遺伝子をカプシド封入する A A V 粒子を含む I V 組成物の有効量よりも約 100 倍低い用量である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、 $\mu D y s$ 導入遺伝子である。

10

20

30

40

50

【0119】

本明細書で提供される治療方法の一実施形態では、治療することは、治療前の血清 C K レベルと比較して、対象における血清クレアチンキナーゼ（C K）レベルを減少させることを含む。いくつかの実施形態では、血清 C K レベルは、治療前の血清 C K レベルと比較して、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、又はそれ以上減少する。更なる実施形態では、血清 C K レベルは、A A V 粒子を用いた治療の前に、及び A A V 粒子の投与後約 12 ヶ月、約 18 ヶ月、約 24 ヶ

月、又は約30ヶ月で評価される。更なる実施形態では、AAV粒子は、 $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入するAAV9カプシドを含む。

【0120】

本明細書で提供される髄腔内治療方法の別の実施形態では、治療することは、有効量の同じAAV粒子、又は $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入する異なるAAV粒子のIV投与を介して治療される対象と比較して、治療されている対象における副作用の数を減少させること、又は1つ以上の副作用の重症度を減少させることを含む。髄腔内投与されるAAV粒子は、一実施形態では、AAV9粒子である。

【0121】

いくつかの実施形態では、本発明のAAV粒子、又は同粒子を含む医薬組成物を使用して、DMD、ベッカー型筋ジストロフィー、及びDCMを含むがこれらに限定されない、ジストロフィノパチーを治療することができる。

【0122】

いくつかの実施形態では、本発明のAAV粒子は、治療を必要とする対象、例えば、DMDを有する対象に、1回又は複数回投与される。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、治療を必要とする対象に、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、又はそれ以上投与される。好ましい実施形態では、AAV粒子を含む本明細書で提供される髄腔内組成物は、治療を必要とする対象に1回投与される。更なる実施形態では、AAV粒子は、AAV9粒子である。

【0123】

一実施形態では、本明細書に記載される $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入するAAVカプシドを含む、有効量のAAV粒子が、治療を必要とする対象においてDMDを治療するための方法で使用される。更なる実施形態では、対象は、AAV粒子を含む組成物を単回用量で髄腔内投与される。更なる実施形態では、AAV粒子は、AAV9粒子である。その上更なる実施形態では、対象は、投与前にトレンデレンブルク位に位置付けられる。

【0124】

DMDを治療するための方法の一実施形態では、治療を必要とする対象は、 $\mu D y s$ 導入遺伝子をカプシド封入するAAVカプシドを含む有効量のAAV粒子を含む組成物を、単回用量で髄腔内投与される。 $\mu D y s$ 導入遺伝子は、一実施形態では、図14に記載されるジストロフィン要素の組み合わせを含む。一実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号5、10、11、又は12に記載される核酸配列を含む。

【0125】

DMDを治療するための方法の一実施形態では、治療することは、ノーススター歩行評価(NSAA)におけるベースライン(すなわち、治療前)から対象のスコアを増加させることを含む。NSAAは、歩行可能なDMD対象における機能的運動能力を測定するために使用される17項目の評定尺度である。本尺度は、完全に独立した機能を示す最大スコアとして34を含む、序数である。各活動は、0(独立して達成することができない)、1(修正された方法であるが、別の人からの身体的支援を受けずに目標を達成する)、又は2(正常-活動の明らかな修正なし)のいずれかとして等級分けされる。例えば、各々の開示が、あらゆる目的のために参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Mazzone et al. (2009). *Neuromuscular Disorders* 19, pp. 458-461、及びresearchrom.com/masterlist/view/18#form2を参照されたい。ベースラインからの変化は、一実施形態では、髄腔内組成物の投与の12ヶ月後に測定される。別の実施形態では、ベースラインからの変化は、髄腔内組成物の投与の18ヶ月後に測定される。別の実施形態では、ベースラインからの変化は、髄腔内組成物の投与の24ヶ月後に測定される。更に別の実施形態では、投与の12ヶ月後に測定されるNSAAにおけるベースラインからの対象のスコアの増加は、投与後18ヶ月で実質的に変化していないか、又は増加する。その上更に別の実施形態では、投与の12ヶ月後に測定されるNSAAにおけるベースラインからの対象のスコアの増加は、投与後24ヶ月で実質的に変化していないか、又は増加

10

20

30

40

50

する。その上更に別の実施形態では、投与の12ヶ月後に測定されるNSAAにおけるベースラインからの対象のスコアの増加は、投与後60ヶ月で実質的に変化していないか、又は増加する。

【0126】

NSAAスコアを増加させることは、一実施形態では、NSAAスコアを約5~約25、約5~約20、約5~約15、又は約5~約10だけ増加させることを含む。別の実施形態では、NSAAスコアを増加させることは、NSAAスコアを約2点~約12点増加させることを含む。別の実施形態では、NSAAスコアを増加させることは、NSAAスコアを約2点~約10点増加させることを含む。更に別の実施形態では、NSAAスコアを増加させることは、NSAAスコアを約3点~約10点増加させることを含む。更に別の実施形態では、NSAAスコアを増加させることは、スコアを約4点~約10点増加させることを含む。その上更に別の実施形態では、NSAAスコアを増加させることは、スコアを約2点~約8点増加させることを含む。別の実施形態では、NSAAスコアを増加させることは、NSAAスコアを約2点~約6点増加させることを含む。

10

【0127】

DMDを治療するための方法の一実施形態では、治療を必要とする対象は、 μ Dys導入遺伝子をカプシド封入する有効量のAAVベクターを、単回用量で髄腔内投与される。 μ Dys導入遺伝子は、一実施形態では、図14に記載されるジストロフィン要素の組み合わせを含む。一実施形態では、ベクターゲノムは、配列番号5、10、11、又は12に記載される核酸配列を含む。 μ Dys導入遺伝子をカプシド封入するAAVベクターの有効量は、一実施形態では、治療前に歩行したメートル数と比較して、6分間歩行試験(6MWT)において歩行したメートル数を増加させるために十分な量である。

20

【0128】

本発明のAAV粒子、又は同粒子を含む医薬組成物は、単回用量として、又は分割用量として投与される。いくつかの実施形態では、用量は、単回投与として、又は分割投与として送達される、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{16}$ ベクターゲノム(vg)、 $2.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $7.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $1 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $2.5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $7.5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $1 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14}$ vg、 $2.5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14}$ vg、 $5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14}$ vg、 $7.5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14}$ vg、 $1 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14}$ vg、 $2.5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14}$ vg、 $5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14}$ vg、 $7.5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14}$ vg、 $1 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14}$ vg、 $2.5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14}$ vg、 $5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14}$ vg、 $7.5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14}$ vg、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vg、 $2.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vg、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vg、 $7.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vgである。例えば、いくつかの実施形態では、本発明のAAV粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 2.5×10^{13} vgの単回用量として投与される。別の実施形態では、本発明のAAV粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 5×10^{13} vgの単回用量として投与される。更に別の実施形態では、本発明のAAV粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 1×10^{14} vgの単回用量として投与される。

30

40

【0129】

本発明のAAV粒子、又は同粒子を含む医薬組成物は、単回髄腔内用量として投与される。いくつかの実施形態では、髄腔内送達のための用量は、単回用量又は分割用量として送達される、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{16}$ ベクターゲノム(vg)、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{16}$ vg、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{16}$ vg、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{16}$ vg、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{16}$ vg、 $1 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{16}$ vg、 $1 \times 10^{15} \sim 1 \times 10^{16}$ vg、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{15}$ vg、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$ vg、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{13}$ vg、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ vg、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ vg、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ vg、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15}$ ベクターvg、 $2.5 \times 10^{13} \sim$

50

$1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 $2.5 \times 10^{13} \text{ v g}$ の単回髄腔内用量として投与することができる。別の実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 $5 \times 10^{13} \text{ v g}$ の単回髄腔内用量として投与することができる。更に別の実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 $1 \times 10^{14} \text{ v g}$ の単回髄腔内用量として投与することができる。

【0130】

他の実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、単回又は分割脳室内用量として投与することができる。いくつかの実施形態では、脳室内送達のための用量は、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 7.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 5.0 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 2.5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $2.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、 $7.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g}$ であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 $2.5 \times 10^{13} \text{ v g}$ の単回脳室内用量として投与することができる。別の実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 $5 \times 10^{13} \text{ v g}$ の単回脳室内用量として投与することができる。更に別の実施形態では、本発明の AAV 粒子又は同粒子を含む医薬組成物は、 $1 \times 10^{14} \text{ v g}$ の単回脳室内用量として投与することができる。

【実施例】

【0131】

ここで一般的に記載されている本発明は、本発明のある特定の態様及び実施形態の例証の目的のためのみに含まれる、以下の実施例を参照することによって、より容易に理解され、本発明を限定することを意図していない。

【0132】

厳選した方法

生後1日目 (p1) での脳室内 (ICV) 注射

大脳半球を介して新生子マウス (p1) の脳室内注射 (ICV) を実施する。新生マウスは、完全に覚醒して注射される。針が 2 mm の注射深度について印付けられていることを確認する。注射部位は、耳と眼との間の中間点である (場所は、矢状縫合の約 0.7 ~ 1.0 mm 外側、及び新生前項から 0.7 ~ 1.0 mm 尾側である)。P0 が、マウスの誕生日 (DoB) として指定される。動物は、同腹の子の発見の 36 時間以内に注射され得る。

【0133】

10

20

30

40

50

過剰な量の投薬溶液が、注射部位から漏出していると判定されるか、又は注射部位が完全に見失われた場合、動物は研究から除外される。

【0134】

生後28日目(p28)での脳室内(ICV)注射

ハミルトンシリンジが、所望の体積の投薬溶液を装填される。標準体積は、注射部位当たり8 μ lである。動物が、ケージから個々に取り出され、麻酔チャンバーに入れられる。チャンバーに入ると、動物は、麻酔される。管類が、注射中の継続的な麻酔を可能にするために、麻酔器から定位固定装置に接続される。それぞれの動物は、取り出されて定位固定装置上に配置される前に、約2分間チャンバー内に留まる。動物が定位固定装置上に置かれると、注射のための座標は、内側/外側(M/L): + / - 1.00 mm、前方/後方(A/P): - 0.5 ~ - 0.8 mm、背側/腹側(D/F): - 2.5 mmに設定される。

10

【0135】

ヨードスワブが、滅菌目的のために動物の頭皮上の切開部位に適用される。メスを使用して、小切開が動物の頭皮に加えられ、頭皮が穏やかに剥がされて、頭蓋領域を露出させる。針が所望の場所に来ると、シリンジプランジャーが、ゆっくりと押し下げられ、投薬溶液を頭蓋腔に注入する。注射部位は、注射の品質を確認するために注射中及び注射直後に監視される。

【0136】

筋肉の準備

動物が適切な年齢に達すると、計量され、腹腔内(i.p.)注射を介して麻酔される(ケタミン[80 mg/kg]、アセプロマジン[0.5 mg/kg]、及びキシラジン[16 mg/kg])。次いで、組織の切開が実行される。鋏が、足首の皮膚を切断するために使用され、次いで、両方の下腿の皮膚が後方に引かれて、下腿筋及び上腿筋を露出させる。片側の前脛骨筋が、その挿入点の近くで解離され、最も近い0.1 mgまで計量され、次いで、廃棄される。次いで、4.0 縫合糸が、長趾伸筋(EDL)の近位端及び遠位端の筋腱間接合部において結ばれ、次いで、解離され、リングル溶液(137 mmのNaCl、5 mmのKCl、2 mmのCaCl₂、1 mmのMgSO₄、1 mmのNaH₂PO₄、24 mmのNaHCO₃、10 mg/リットルのクラーレを含む11 mmのグルコース)に入れられ、これが、室温で保たれる。

20

30

【0137】

EDLを解離した後、腹部が開かれ、1 ccシリンジを使用して、下大静脈から採血される(約300 ~ 500 μ l)。血液は、室温で25 ~ 35分間静置し、次いで、4において3,500 x gで10分間遠心分離される。上清を回転させた後、血清が単離され、微小遠心管に入れられ、-80 で凍結される。

【0138】

次いで、アキレス腱が切断され、後方に引かれて、ヒラメ筋、足底筋、及び腓腹筋を露出させる。ヒラメ筋が、解離され、管に入れられ、液体窒素冷却イソペンタン中で凍結される。足底筋が、腓腹筋がない状態で鈍的解離され、次いで、可能な限り近位に切断され、管に入れられ、液体窒素冷却イソペンタン中で凍結され、-80 で保管される。

40

【0139】

腓腹筋が、可能な限り近位に切断され、最も近い0.1 mgまで計量され、管に入れられ、凍結される。反対側からの前脛骨筋が、遊離した状態で解離され、最も近い0.1 mgまで計量され、静止長においてコルク上でピン留めされる。同じ側からのEDLもまた、遊離した状態で解離され、静止長において同じコルク上でピン留めされる。次いで、コルクは、液体窒素冷却イソペンタンに浸漬される。約30 ~ 約45秒後、コルクは、ドライアイス上に置かれ、箔に包まれ、-80 で保管される。大腿四頭筋が、解離され、管に入れられ、液体窒素冷却イソペンタン中で凍結され、-80 で保管される。肝臓の小片が、解離され、管に入れられ、液体窒素冷却イソペンタン中で凍結され、-80 で保管される。横隔膜が、解離され、半分に折り畳まれ、次いで、再び折り畳まれ、次いで、

50

コルクの上に置かれ、ピン留めされる。次いで、コルクは、液体窒素冷却イソペンタンに浸漬される。30～45秒後、コルクは、ドライアイス上に置かれ、箔に包まれ、-80で保管される。

【0140】

心臓全体が、解離され、最も近い0.1mgまで計量され、管に入れられ、液体窒素冷却イソペンタン中で凍結される。管は、キャップを付けられ、-80で保管するまで液体窒素に入れられる。

【0141】

実施例1：組換えアデノ随伴ウイルス粒子の生成

マイクロジストロフィン遺伝子構築物の分子クローニング

10

MHCK7プロモーター及びSV40イントロンを、 μ Dys及びSV40ポリ(A)シグナルをコードするポリヌクレオチドに動作可能に連結することによって、本明細書ではINS1201と称され、以前はMTS-001として知られていた、マイクロジストロフィン(μ Dys)をコードする遺伝子構築物を合成した(図1A)。MHCK7プロモーターを含むSK-CRM4エンハンサーを、SV40ポリ(A)シグナルをコードするポリヌクレオチドに動作可能に連結することによって、代替的な μ Dysをコードする遺伝子構築物(本明細書ではINS1212と称され、以前はMTS-003として知られていた)を合成した(図1B)。INS1201及びINS1212遺伝子構築物を、Puc57ベクター骨格において生成した。INS1201及びINS1212構築物を、DNA配列決定法によって確認し、4542bp及び4714構築物を、それぞれ、NruI制限消化によって単離し、適切なAAV骨格への後続のクローニングのためにゲル精製した。

20

【0142】

単離されたINS1201及びINS1212遺伝子構築物を各々、独立して、ITR部位を含むゲル精製されたpSZ01ベクター骨格、及びNruI制限消化によって線形化/単離されたカナマイシン耐性遺伝子に鈍的クローニングした。pSZ01ベクター骨格を有するINS1212構築物及びpSZ01ベクター骨格を有するINS1212構築物のT4ライゲーション後、NEB Monarch(登録商標)Plasmid Miniprepキットを使用して、DNAをE.coliに形質転換し、増殖させ、精製した。完全なpSZ01-INS1201又はpSZ01-INS1212プラスミドクローンを産生するためにライゲーションに成功した遺伝子構築物を、HindIII/BsaI制限消化によって識別した。

30

【0143】

Maxi-Prepキット(GeneJET Endo-free Plasmid Maxiprep Kit, Thermo Scientific)を使用した、E.coliにおける細菌形質転換によって、pSZ01-INS1201及びpSZ01-INS1212クローンを拡張した。正しいプラスミド配列を、BsaI/HindIII消化によって再確認した(図1C、レーン1及び3)。加えて、pSZ01ベクター骨格内にINS1201及びINS1212を含むITR部位の正しい組み込みの更なる確認として、SmaIを使用した制限消化(図1C、レーン2及び4)を実施した。

40

一過性のトランスフェクション及びウイルスパッケージング

【0144】

標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション法(例えば、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Vandendriessche et al.(2007.J Thromb Haemost 5:16-24)に記載される)を使用して、アデノウイルスヘルパープラスミド、及びAAV9 cap遺伝子とともにAAV2 rep遺伝子を送達するキメラパッケージング構築物と組み合わせて、確認されたpSZ01-INS1201及びpSZ01-INS1212 AAVベクターをHEK293細胞に一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、AAV粒子を採取し、連続2回の塩化セシウム密度勾配超遠心分離を使用して精製した。SDS-PAGEによって

50

分解され、銀染色された 1×10^{13} v g AAV2 標準 (図2、レーン3 ($0.5 \mu\text{l}$)、レーン4 ($1 \mu\text{l}$)、レーン5 ($2 \mu\text{l}$)、レーン6 ($4 \mu\text{l}$)) と比較することによって、各 $1 \mu\text{l}$ の精製された INS1201-AAV9 (図2、レーン1) 及び INS1212-AAV9 (図2、レーン2) を滴定した。

【0145】

実施例2: AAV9 μDys (INS1201-AAV9 及び INS1212-AAV9) の筋肉内送達、MTXマウスにおける μDys 発現の増加をもたらす。

INS1201-AAV9 及び INS1212-AAV9 を、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの一般的なマウスモデルである mdx マウスの腓腹筋に筋肉内注射した (例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Rodino-Klapac et al. (2013) Hum Mol Genet. 22(24): 4929-37 を参照されたい)。図3Aに示されるように、筋肉内注射の21日後、 2.7×10^{11} v g の INS1201-AAV9 (iii) 又は INS1212-AAV9 (iv) を注射された腓腹筋は、非注射 mdx マウスよりも著しく高いレベルで (i)、及び野生型 C57/B1 マウスと同等のレベルで (ii)、 μDys の広範な発現を示した。図3Bは同様に、 2.7×10^{11} v g の INS1212-AAV9 を用いた筋肉内注射の21日後に mdx マウスにおいて μDys の高レベル発現を示す。

【0146】

実施例3: AAV9 μDys (INS1201-AAV9 及び INS1212-AAV9) の脳室内送達、MDXマウスにおいて μDys 発現の増加をもたらす。

INS1201-AAV9 を、生後1日目 (p1) に mdx マウスに脳室内注射し、組織試料を収集し、ジストロフィンについて分析した。図4Aに示されるように、 1.8×10^{11} v g の AAV を用いた脳室内 (ICV) 注射の21日後、INS1201-AAV9 は、mdx 動物の腓腹筋 (i)、前脛骨筋 (ii)、大腿四頭筋 (iii)、臀筋 (iv)、三頭筋 (v)、横隔膜 (vi)、及び心臓 (vii) の筋細胞における μDys の発現を効率的に標的化してもたらし、肝臓 (viii) では発現がほとんど又は全くなかった。同様に、図4Bに示されるように、 9×10^{10} v g の AAV を用いた ICV 注射の21日後、INS1201-AAV9 は、腓腹筋 (i)、前脛骨筋 (ii)、大腿四頭筋 (iii)、臀筋 (iv)、三頭筋 (v)、横隔膜 (vi)、及び心臓 (vii) の筋細胞における μDys の発現を効率的に標的化してもたらし、肝臓 (viii) では発現がほとんど又は全くなかった。

【0147】

INS1212-AAV9 も、p1 で mdx マウスに脳室内注射し、組織試料を収集し、ジストロフィンについて免疫蛍光染色した。図5に示されるように、 9×10^{10} v g の AAV を用いた ICV 注射の21日後、INS1212-AAV9 は、腓腹筋 (i)、前脛骨筋 (ii)、大腿四頭筋 (iii)、臀筋 (iv)、三頭筋 (v)、横隔膜 (vi)、及び心臓 (vii) の筋細胞における μDys の発現を効率的に標的化してもたらし、肝臓 (viii) では発現がほとんど又は全くなかった。

【0148】

図6Aのヘマトキシリン及びエオシン染色試料に示されるように、 9×10^{10} v g (ii) 及び 2.7×10^{11} v g (iii) の INS1201-AAV9 を用いた ICV 注射の80日後、腓腹筋組織は、野生型 C57/B1 (i) 及び非注射 mdx マウス対照 (iv) と比較して、正常な組織構造の回復及びデュシェンヌ型筋ジストロフィーの組織病理学的特徴の補正を示した。図6Bに示されるように、 9×10^{10} v g (ii) 及び 2.7×10^{11} v g (iii) の INS1201-AAV9 を用いた ICV 注射後80日目に、腓腹筋組織は、野生型 C57/B1 マウス (i) におけるジストロフィンレベルに匹敵し、非注射 mdx マウス (iv) におけるジストロフィンレベルよりも著しく高い μDys のレベルを示した。

【0149】

同様に、図7A (ii) のヘマトキシリン及びエオシン染色試料に示されるように、9

10

20

30

40

50

$\times 10^{10}$ v g の INS 1212 - AAV9 を用いた I C V 注射の 80 日後、腓腹筋組織は、野生型 C57/B1 (図 7 A (i)) 及び非注射 m d x マウス対照 (図 7 A (i i i)) と比較して、正常な組織構造の回復及びデュシェンヌ型筋ジストロフィーの組織病理学的特徴の補正を示した。図 7 B (i i) に示されるように、 9×10^{10} v g の INS 1212 - AAV9 を用いた I C V 注射後 80 日目に、腓腹筋組織は、野生型 C57/B1 マウス (図 7 B (i)) におけるジストロフィンレベルに匹敵し、非注射 m d x マウス (図 7 A (i i i)) におけるジストロフィンレベルよりも著しく高い $\mu D y s$ のレベルを示した。

【0150】

図 8 に示されるように、 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の INS 1201 - AAV9 を用いた I C V 注射の 80 日後の m d x マウスにおける腓腹筋 (図 8 A)、三頭筋 (図 8 C)、前脛骨筋 (図 8 E)、及び横隔膜 (図 8 F) の筋組織は、非注射 m d x マウスと比較して平均線維直径の増加を示した。 9×10^{10} v g 又は 2.7×10^{11} v g の INS 1201 - AAV9 を脳室内注射された m d x マウスはまた、非注射マウスと比較して、腓腹筋 (図 8 B)、三頭筋 (図 8 D)、前脛骨筋 (図 8 F)、及び横隔膜 (図 8 H) において、注射の 80 日後に、より大きな直径 (例えば、 $25 \mu m \sim 60 \mu m$) を有する細胞の頻度の増加を示した。

【0151】

同様に、図 9 A に示されるように、腓腹筋組織は、 9×10^{10} v g の INS 1212 - AAV9 を用いた I C V 注射の 80 日後の m d x マウスにおける腓腹筋組織は、より大きな直径 (例えば、 $25 \mu m \sim 60 \mu m$) を有する細胞の頻度の同時増加 (図 9 B) とともに、非注射 m d x マウスと比較して平均線維直径の増加を示した。

【0152】

実施例 4 : INS 1201 - AAV9 の脳室内送達、m d x マウスにおける $\mu D y s$ 発現の増加、筋組織学の改善、及び線維化の低減をもたらす。

生後 28 日目 (p 28) の m d x マウス (注射時にいずれの動物も P 27 未満ではなく、いずれの動物も P 35 を超えないように、- 1 日及び + 7 日の時間帯を有する) に、脳室内 (I C V) 注射を介して、以下の治療のうちの一つを投与した: (i) 9×10^9 v g の INS 1201 - AAV9 ($n = 6$)、(i i) 9×10^{10} v g の INS 1201 - AAV9 ($n = 7$)、(i i i) 2.7×10^{11} v g の INS 1201 - AAV9 ($n = 10$)、(i v) 5.4×10^{11} v g の INS 1201 - AAV9 ($n = 7$)、(v) 1.2×10^{12} v g の INS 1201 - AAV9 ($n = 8$)、又は (v i) ビヒクル対照 (T F F 製剤緩衝液、 $n = 11$)。C57/B1 同齡マウスを、野生型 (W T) 比較対象 ($n = 10$) として使用した。

【0153】

組織を、生後約 120 日目に上記に記載されるように解離した。

【0154】

INS 1201 導入遺伝子に特異的なプライマーを使用した液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応 (d d P C R) を介して、2 倍体ゲノム当たりの INS 1201 コピーを測定した。INS 1201 の DNA コピーが、図 15 で提供される。RNA 転写物コピーが、図 16 で提供される。T A : 前脛骨筋、E D L : 長趾伸筋、G A S : 腓腹筋、D I A : 横隔膜。R P P 30 : リボヌクレアーゼ P / M R P サブユニット P 30。

【0155】

図 17 に示されるように、試験された全ての用量で INS 1201 - AAV9 を投与された m d x マウスは、非注射 m d x マウスと比較して、平均 E D L 線維直径の増加を示した。これらの所見と一致して、全ての用量で INS 1201 - AAV9 を脳室内注射された m d x マウスはまた、非注射マウスと比較して、E D L 筋においてより大きな直径 (例えば、 $25 \mu m \sim 60 \mu m$) を有する細胞の頻度の増加を示した。

【0156】

図 18 に示されるように、試験された 4 回の最高用量で INS 1201 - AAV9 を投

与された m d x マウスは、非注射 m d x マウスと比較して、平均 T A 線維直径の増加を示した。これらの所見と一致して、試験された 4 回の最高用量 (9×10^{10} v g、 2.7×10^{11} v g、 5.4×10^{11} v g、 1.2×10^{12} v g) で I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を脳室内注射された m d x マウスは、非注射マウスと比較して、T A 筋においてより大きな直径を有する細胞の頻度の増加を示した。

【0157】

図 19 は、様々な用量の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射後のピクロシリウスレッドで染色された横隔膜筋切片を示す。ピクロシリウスレッドが、コラーゲン含有量を可視化するために使用される。野生型 C 5 7 / B 1 マウス及びビヒクルを投与された m d x マウスから取得された横隔膜切片が、比較のために示される (上部パネル)。図 19 の下部パネルに示されるように、試験された 5 回の用量 (9×10^9 v g、 9×10^{10} v g、 2.7×10^{11} v g、 5.4×10^{11} v g、 1.2×10^{12} v g) で I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を投与された m d x マウスは、コラーゲン含有量によって測定されると、ビヒクルを投与された m d x マウスと比較して線維化の減少を示した。横隔膜筋におけるコラーゲン率も、図 20 で提供される。

【0158】

図 21 の上部は、生後 28 日目 (p 2 8) での 5.4×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9 を用いた脳室内 (I C V) 注射後の p 1 2 0 に m d x マウスから取得され、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) (左端)、ラミニン / d a p i (左から 2 番目)、ジストロフィン (右から 2 番目) で染色された E D L 切片、及びマージされた画像 (右端) を示す。図 21 の下部は、生後 28 日目 (p 2 8) でのビヒクル対照を用いた脳室内 (I C V) 注射後の p 1 2 0 に m d x マウスから取得され、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) (左端)、ラミニン / d a p i (左から 2 番目)、ジストロフィン (右から 2 番目) で染色された E D L 筋切片、及びマージされた画像 (右端) を示す。染色は、対照マウスから採取された試料と比較して、I N S 1 2 0 1 - A A V 9 で処置されたマウスから取得された試料において、より優れたジストロフィン発現を示す。I N S 1 2 0 1 - A A V 9 処置マウス由来の筋肉も、H & E 及びラミニン / d a p i 染色から明白であるように、より健康に見える。

【0159】

実施例 5 : I N S - 1 2 0 1 A A V 9 の I C V 送達 が、m d x マウスにおいて筋肉生理学の改善をもたらす。

生後 1 日目 (p 1) の m d x マウスに、脳室内 (I C V) 注射を介して以下の治療のうちの 1 つを投与した : (i) 9×10^9 v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、(i i) 9×10^{10} v g の I N S - 1 2 0 1 - A A V 9、(i i i) 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、(i v) ビヒクル対照 (T F F 製剤緩衝液)。C 5 7 / B L 1 0 同 齢マウス (W T) を比較対象として使用した。

【0160】

生後 28 日目 (p 2 8) の m d x マウス (注射時にいずれの動物も P 2 7 未満ではなく、いずれの動物も P 3 5 を超えないように、- 1 日及び + 7 日の時間帯を有する) に、脳室内 (I C V) 注射を介して、以下の治療のうちの 1 つを投与した : (i) 9×10^9 v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、(i i) 9×10^{10} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、(i i i) 2.7×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、(i v) 5.4×10^{11} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、(v) 1.2×10^{12} v g の I N S 1 2 0 1 - A A V 9、又は (v i) ビヒクル対照 (T F F 製剤緩衝液)。C 5 7 / B L 1 同 齢マウスを、野生型 (W T) 比較対象として使用した。

【0161】

動物が 1 2 0 ~ 1 3 5 日 齢 であ っ た と き に、筋 肉 の 解 離 及 び 準 備 を 上 記 に 記 載 さ れ る よ う に 実 行 し た。

【0162】

筋生理学実験設計

10

20

30

40

50

E D Lにおける筋力学

E D Lが、室温でリンゲル溶液（137 mmのNaCl、5 mmのKCl、2 mmのCaCl₂、1 mmのMgSO₄、1 mmのNaH₂PO₄、24 mmのNaHCO₃、10 mg / リットルのクラーレを含む11 mmのグルコース）を含む特殊チャンパー内に搭載される。筋起始が、剛性支柱に縛られ、付着部が、筋肉長の正確な制御を可能にする、デュアルモードエルゴメーター（モデル300B、Aurora Scientific、ON, Canada）のアームに固定される。

【0163】

筋肉の活性化が、筋肉の長さを延長させる平行白金平板電極を使用した電気刺激装置を介して提供される。最大上刺激条件は、力が実験的試験について水平状態に達した値よりも+50%大きい値を使用して、増加する電圧の単一の0.3ミリ秒収縮パルスによって各実験について確立される。力の特性を評価するための最適な筋肉長は、筋肉長を漸進的に増加させながら（弛緩長から10%増分）一連の収縮を使用して決定され、最大上刺激が最大収縮力を生じさせる長さとして定義される。最適な長さを確立した後、筋線維長（L_f）が測定され、筋肉が2分間休止される。

10

【0164】

次いで、筋肉は、収縮特性（収縮張力、半弛緩時間、及びピーク張力までの時間）を評価するために、60秒間隔（0.3ミリ秒のパルス持続時間）の2回の収縮で刺激される。

【0165】

筋肉は、力 - 周波数（F - F）関係を決定するために、収縮間に120秒間隔で増加する周波数（400ミリ秒のパルス列持続時間及び0.3ミリ秒のパルス持続時間、（i）E D L：1 Hz、10 Hz、30 Hz、50 Hz、70 Hz、120 Hz、（ii）ヒラメ筋：1 Hz、5 Hz、10 Hz、20 Hz、40 Hz、60 Hz、80 Hz、及び100 Hz）において刺激される。

20

【0166】

F - F試験後に、最大収縮力を試験終了時の長さの最大±20%まで実験的に試験することによって、最適な長さが再検証される。

【0167】

偏心収縮

F - F曲線を完成させた後、全ての伸張又は収縮が、2分間隔で実施され、刺激が、等角及び偏心収縮について400ミリ秒のパルス列持続時間及び0.3ミリ秒のパルス持続時間で100 Hzにおいて実施される。具体的には、F - F評価の終了から2分間の休止期間後に、開始筋肉長に戻る前に500ミリ秒の保留を伴って0.7 L_f / 秒で10% L_f伸張を2回付与することによって、筋肉の受動的な機械的特性が測定される。次いで、2回の等角収縮が、偏心収縮（E C）前の最大等角力の測定として取得される。

30

【0168】

次いで、各筋肉は、10回の収縮のE C発作を受け、その間に、筋肉は、最初の200ミリ秒間等角的に刺激され、その後、15% L_f長変化が、2 L_f / 秒の速度で付与される。次いで、筋肉は、開始筋肉長に戻る前に、この長さで500ミリ秒間保持される。10回のE C収縮後、2回の等角収縮が、E C後の最大等角力を決定するために取得される。最終的な等角測定の完了時に、2回の追加の受動的伸張が、E C後の受動的な機械的測定を決定するために取得される。

40

【0169】

収縮試験後、筋肉が、外腱から切り取られ、乾燥状態でプロットされ、最も近い0.01 mgまで計量される。筋肉の生理学的断面積が、線維長及び筋肉量の関数として計算される。全ての分析について、力が、筋肉の生理学的断面積に対して正規化され、応力として報告される。

【0170】

生後1日目（p 1）に試験された全ての用量（9 × 10⁹ v g、9 × 10¹⁰ v g、2

50

、 7×10^{11} v g) で INS 1201 - AAV9 の I C V 注射を受けた m d x マウスは、ビヒクルで処置された m d x マウスと比較して、E C から生じる収縮力率の減弱した減少を示した (図 10 A)。図 10 B は同様に、p 1 に試験された 3 回の用量 (9×10^9 v g、 9×10^{10} v g、 2.7×10^{11} v g) で INS 1201 - AAV9 の I C V 注射を受けたマウスが、ビヒクル処置マウスと比較して、偏心収縮前応力に対する偏心収縮後応力率の増加によって示される、筋生理学の増加を示した。

【0171】

生後 28 日目 (p 28) に試験された 3 回の最高用量 (2.7×10^{11} v g、 5.4×10^{11} v g、 1.2×10^{12} v g) で INS 1201 - AAV9 の I C V 注射を受けた m d x マウスは、ビヒクルで処置された m d x マウスと比較して、E C から生じる収縮力率の減弱した減少を示した (図 10 C、10 D)。

【0172】

生後 28 日目 (p 28) に試験された 3 回の最高用量 (2.7×10^{11} v g、 5.4×10^{11} v g、 1.2×10^{12} v g) で INS 1201 - AAV9 の I C V 注射を受けた m d x マウスは、ビヒクルで処置された m d x マウスと比較して、様々な周波数における刺激後にピーク筋力の増加によって示される筋機能の改善及び安定化を示した (図 10 E、10 F)。

【0173】

実施例 6 : AAV9 の 1 回用量髄腔内投与が、骨格筋及び心筋組織への導入遺伝子送達を標的化する

AAV9 - CBA - GFP を、高度に特異的な抗 AAV9 E L I S A を使用して抗 AAV9 抗体についてスクリーニングされたカニクイザルに髄腔内投与した。カニクイザル対象を、単回髄腔内用量を介して 2.5×10^{13} v g、 5×10^{13} v g、又は 1×10^{14} v g の AAV9 - CBA - GFP で処置し、GFP 発現を、NovaRed GFP 免疫染色及び Vector (登録商標) HRP 基質を用いた免疫組織化学分析、RT-PCR、並びにウェスタンブロット分析によって決定した。

【0174】

図 11 に示されるように、 2.5×10^{13} v g (i v)、 5×10^{13} v g (v)、又は 1×10^{14} v g (v i) で AAV9 - CBA - GFP の単回髄腔内用量を受けたカニクイザルは、静脈内投与された 5×10^{13} v g (i i) 又は 1×10^{14} v g (i i i) の AAV9 - CBA - GFP を受けたカニクイザル対象と比較して、腓腹筋 (図 11 A)、大腿四頭筋 (図 11 B)、三角筋 (図 11 C)、三頭筋 (図 11 D)、及び二頭筋 (図 11 E) の筋組織において GFP の染色の増加を示した。同様に、 2.5×10^{13} v g (i i i)、 5×10^{13} v g (i v)、又は 1×10^{14} v g (v) で AAV9 - CBA - GFP の単回髄腔内投与を受けたカニクイザルは、静脈内投与された 5×10^{13} v g (i) 又は 1×10^{14} v g (i i) の AAV9 - CBA - GFP を受けたカニクイザル対象と比較して、横隔膜 (図 11 F)、前脛骨筋 (図 11 G)、及び心臓 (図 11 H) の筋組織において GFP の染色の増加を示した。図 11 A ~ E (i) に示されるように、非注射カニクイザル対象は、GFP 染色をほとんど又は全く示さなかった。

【0175】

図 11 I に示されるように、 5×10^{13} v g (i)、又は 1×10^{14} v g (i i) で AAV9 - CBA - GFP の単回静脈内用量を受けたカニクイザルが、肝組織において高レベルの GFP 染色を示した一方で、 2.5×10^{13} v g (i i i)、 5×10^{13} v g (i v)、又は 1×10^{14} v g (v) で AAV9 - CBA - GFP の単回髄腔内用量を受けた対象は、著しく低い GFP 染色を示した。

【0176】

図 12 に示されるように、図 11 に示される GFP の免疫組織化学染色は、抗 GFP ウェスタンブロットによって検出されるタンパク質レベルに対応した。 2.5×10^{13} v g (図 12 A)、 5×10^{13} v g (図 12 B)、又は 1×10^{14} v g (図 12 C) で AAV9 - CBA - GFP の単回髄腔内投与を受けたカニクイザルが、二頭筋 (1)、三

10

20

30

40

50

頭筋(2)、三角筋(3)、大腿四頭筋(4)、腓腹筋(5)、前脛骨筋(6)、横隔膜(7)、及び心臓(8)の筋組織においてGFPLレベルの増加を示した一方で、非注射対象の二頭筋(図12D、1)又は三頭筋(図12D、2)ではウエスタンブロットによってGFPTタンパク質が検出されなかった。

【0177】

図13に示されるように、図11及び12に示されるGFPTタンパク質レベルは、GFPMRNAレベルに対応し、AAV9-CBA-GFPの単回髄腔内用量を受けたカニクイザルは、RT-PCRによって分析される、二頭筋(1)、三頭筋(2)、三角筋(3)、前脛骨筋(4)、腓腹筋(5)、大腿四頭筋の外側広筋(6)、横隔膜(7)、及び心臓(8)の筋組織において検出可能なGFPMRNA発現を示した。最小GFPMRNAが、肝組織(9)で検出され、GFPMRNAは、非注射対象から収集された二頭筋(10)、三頭筋(11)、三角筋(12)、及び大腿四頭筋(13)の筋組織では検出可能ではなかった。

10

【0178】

実施例7：若年C57BL/6Jマウスにおける脳室内注射の単回投与後のINS1201-AAV9の毒性及び生体内分布研究

試験システム

- ・ 種：ハツカネズミ
- ・ 株：C57BL/6J
- ・ 性別：オス
- ・ 年齢：1日目に約4週齢
- ・ 体重：年齢に相応する
- ・ 数：192匹(+60匹余分)
- ・ ケージング：ASC SOPに準拠
- ・ 最小順化：5日

20

【0179】

種/株、数、性別。研究開始時に約4週齢の最大252匹のオスC57BL/6J(株番号000664)マウスが、この研究のために入手される。意図された患者集団がオスのみであるため、オスのマウスのみが研究で使用される。

【0180】

開始年齢及び体重範囲。この研究で使用するために選択される動物は、研究の開始時に可能な限り年齢及び体重が均一であろう。動物は、納入時に約3週齢であり、研究の1日目に約4週齢であろう。

30

【0181】

動物は、種特異的な食事を給餌され、自由に給餌されるであろう。いずれの汚染物質も、この研究の結果を妨げるレベルで食事中に存在しないことが知られている。照射水が、各動物に自由に利用可能であろう。

【0182】

本研究で使用される被験物質及び対照物質が、それぞれ、表2及び表3で提供される。

40

【表 1】

表2.被験物質。			
物質	用量	有効成分	濃度
INS1201-AAV9	1(第2群) 8.0×10 ¹¹ vg	AAV-マイクロジ ストロフィン	5×10 ¹³ vg/mL
INS1201-AAV9	2(第3群) 4.0×10 ¹¹ vg	AAV-マイクロジ ストロフィン	5×10 ¹³ vg/mL
INS1201-AAV9	3(第4群) 2.0×10 ¹¹ vg	AAV-マイクロジ ストロフィン	2.5×10 ¹³ vg/mL

10

【表 2】

表3.対照物質。			
ビヒクル対照	用量	有効成分	濃度
製剤緩衝液	ビヒクル (第1群)	プルロニックF- 68	0.006%

20

【 0 1 8 3 】

実験設計

研究設計

本研究は、3つのコホートからなる：コホート1に割り当てられた動物は、注射手技後85±10日目に殺処分され、コホート2に割り当てられた動物は、注射手技後43±7日目に殺処分され、コホート3は、注射手技後22±3日目に殺処分される。全体的な研究設計が、表4に提示される。余分な動物が投薬され、手技活動（すなわち、注射、拘束、並びに注射及び/又は採血中の取扱）の直接的な結果として生じる研究群動物の任意の予定外の死亡に取って代わるために使用され得る。被験物質投与手技を生き延びないか、死亡するか、又は4日目の前に（注射の3日後に）早期終了を必要とする動物は、交代され得る。これらの動物は、肉眼的剖検を受けない。年齢の包含基準を満たさない動物は、必要に応じて交代され得る。全ての動物の死亡は、注射後の死亡のタイミングにかかわらず報告される。各所与の時点における第1～4群については、5匹の動物が、血液学、血液ddPCR、及び組織ddPCRに使用され、5匹の動物が、臨床化学及び組織病理学に使用され、5匹の動物が、凝固検査及び組織病理学に使用される（n=15/群/時点）。全ての第5群の動物が、血液学、臨床化学、及び凝固のために12週目に安楽死させられる（各試験についてn=4）。第5群からの5匹の動物が、組織病理学に使用される一方で、残りの動物からの組織は、収集及び保存される。

30

40

50

【表 3】

表 4. 研究設計。						
群	用量	治療	採血及び分析	組織収集及び分析	動物の数/時点	時点
1(n=45)	ビヒクル	片側 ICV P28	血液学 +ddPCR	ddPCR	5	3 週目(22±3 日目) 6 週目(43±7 日目) 12 週目(85±10 日 目)
			臨床化学	組織病理学	5	
			凝固	組織病理学	5	
2(n=45)	用量 1 8.0×10 ¹¹ vg	両側 ICV P28	血液学 +ddPCR	ddPCR	5	3 週目(22±3 日目) 6 週目(43±7 日目) 12 週目(85±10 日 目)
			臨床化学	組織病理学	5	
			凝固	組織病理学	5	
3(n=45)	用量 2 4.0×10 ¹¹ vg	片側 ICV P28	血液学 +ddPCR	ddPCR	5	3 週目(22±3 日目) 6 週目(43±7 日目) 12 週目(85±10 日 目)
			臨床化学	組織病理学	5	
			凝固	組織病理学	5	
4(n=45)	用量 3 2.0×10 ¹¹ vg	片側 ICV P28	血液学 +ddPCR	ddPCR	5	3 週目(22±3 日目) 6 週目(43±7 日目) 12 週目(85±10 日 目)
			臨床化学	組織病理学	5	
			凝固	組織病理学	5	
5(n=12)	該当なし	ナリーブ 未処置	血液学	組織病理学 (n=5)	4	12 週目(85±10 日 目)
			臨床化学		4	
			凝固		4	

10

20

【 0 1 8 4 】

コホート 1 - 85 ± 10 日目の終了。本研究のコホート 1 については、第 1 ~ 4 群に指定された 60 匹の動物が、その群割り当てに基づいて、1 日目に脳室内 (ICV) 注射を受ける (表 1)。コホート 1 の追加の 12 匹の動物は、注射されない第 5 群の動物 (「ナリーブ / 未処置」、表 1) の一部である。研究の 85 ± 10 日目に、全ての第 1 ~ 5 群内の動物が殺処分され、血液及び組織試料が表 5 に記載されるように収集される。

30

40

50

【表 4】

表5.コホート1の血液及び組織試料。				
群	治療及び 用量	動物の数	終末手技収集	
			血液分析	組織分析
1	ビヒクル	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
2	用量1 8.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
3	用量2 4.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
4	用量3 2.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
5	未処置	4	血液学	組織病理学(n=5)
		4	臨床化学	
		4	凝固	

10

20

【0185】

コホート2 - 43 ± 7日目の終了。コホート2については、60匹の動物が、その群割り当てに基づいて、1日目にICV注射を受ける(表1)。研究の43 ± 7日目に、動物が殺処分され、血液及び組織試料が表6に記載されるように収集される。

30

40

50

【表 5】

表6.コホート2の血液及び組織試料。				
群	治療及び 用量	動物の数	終末手技収集	
			血液分析	組織分析
1	ビヒクル	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
2	用量 1 8.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
3	用量 2 4.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
4	用量 3 2.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	

10

20

【 0 1 8 6 】

コホート 3 - 22 ± 3 日目の終了。コホート 3 については、60 匹の動物が、その群割り当てに基づいて、1 日目に I C V 注射を受ける（表 1）。研究の 22 ± 3 日目に、動物が殺処分され、血液及び組織試料が表 7 に記載されるように収集される。

【表 6】

表7.コホート3の血液及び組織試料。				
群	治療及び 用量	動物の数	終末手技収集	
			血液分析	組織分析
1	ビヒクル	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
2	用量 1 8.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
3	用量 2 4.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	
4	用量 3 2.0×10^{11} vg	5	血液学+ddPCR	ddPCR
		5	臨床化学	組織病理学
		5	凝固	

30

40

【 0 1 8 7 】

50

群割り当て。動物が、表 5、6、及び 7 によって、順序付けされ、3 つの別個のコホートにおける試験群に割り当てられる。1 群当たり最大 12 匹の余分な動物を含む動物の各コホートが、計量され、体重に従って減少順で 1 ~ X の数値ランクを割り当てられる（最も重い動物はランク = 1 を割り当てられる）。次いで、動物は、研究設計によって、終了コホートに基づいて各試験群に順次割り当てられる（表 5、6、7 を参照）。

【0188】

バイアスのための対照。全ての試行は、(a) 適切な対照群の包含、(b) 研究群への動物の無作為化された割り当て、及び (c) 群にわたる動物の適切な交互投薬を含む、潜在的な研究バイアスを最小限にするために行われる。

【0189】

被験物質の投与及び研究手順

麻酔及び外科的準備。動物は、吸入麻酔を使用して麻酔される（誘導のための 100% の酸素を含む 1 ~ 5% のイソフルラン、外科手技中の維持のための 1 ~ 3%）。代替的に、動物は、腹腔内投与されるケタミン（最大 80 mg / kg）及びキシラジン（最大 12 mg / kg）カクテルで麻酔される。

【0190】

被験物質の調製及び送達。全ての被験物質の調製及び投与は、スポンサーが指定した人員によって実施される。1 日目に、各コホート（表 5 ~ 7）について、ビヒクル及び被験物質は、その群割り当てに基づいて、脳室内への定位固定注射を介して全ての動物に投与される。被験物質及び対照物質は、使用の準備ができるまで氷上又は 2 ~ 8 °C で保持される。

【0191】

コホート注射方略。各終了日コホートのための注射は、3 ~ 4 日間にわたって行われる。各個々の注射日に、約 15 ~ 30 匹のマウスが注射される。被験物質用量製剤を考慮すると、各コホートの第 1 日目に、用量 1 の全てのマウスの注射が完了し、続いて、時間が許す限り、第 1 群の動物のサブセットへのビヒクル注射が行われる。各コホートの第 2 日目に、全ての用量 2 マウスの注射が完了し、続いて、注射チームに時間が許す限り、動物の第 2 のサブセットへのビヒクル注射が行われる。各コホートの第 3 日目に、全ての用量 3 マウスの注射が完了し、続いて、注射チームに時間が許す限り、動物の第 3 のサブセットへのビヒクル注射が行われる。全てのビヒクル注射マウスが最初の 3 日間にわたって注射されているわけではない場合、残りのビヒクル注射は、第 4 日目に行われる。

【0192】

治療。治療が、表 5、6、及び 7 に従って、側脳室内への治療の直接注射によって動物に投与される。各動物は、投薬群に応じて、単一の外科手技において、1 回の片側注射、又は 2 回の注射（両側 / 側面当たり 1 回の注射）のいずれかを受ける。外科手技が、定位固定器具を使用して実施される。注射装置、手術器具、ドレープ、及びガウンが、適切な場合に滅菌されている。以下に記載される手順の修正が、外科医の裁量で実施され得る。単回用量のメロキシカム（1 mg / kg、SC / IM）及び / 又はブプレノルフィン（0.01 ~ 0.05 mg / kg SC）が、頭蓋骨切開前の麻酔の誘導後に手術からの痛みを緩和することに役立つために投与される。動物が麻酔されると、頭蓋上の皮膚が（必要に応じて）削られ、動物が定位固定フレームに搭載され、適宜、耳棒及び切歯棒の使用によって頭部が位置付けられた状態で麻酔のためにノーズコーン上で動物を維持する。無菌技術が、全ての外科手技に使用される。皮膚が、ベタジン溶液、続いて、70% アルコールワイプ又は同等物で消毒される。

【0193】

約 2 cm の切開が、頭蓋骨上の正中線に加えられる。電気焼灼が、切開部位からの任意のわずかな出血の止血を達成するために使用され得る。ハミルトン 2 インチ、26 ゲージ（又はそれより小さい）、12 度ベベルステンレス鋼針を有するハミルトンシリンジが、定位固定装置の Z 軸に取り付けられる。前項に基づく以下の近似定位固定座標が、片側又は両側のいずれかで側脳室を標的とするために使用される。

10

20

30

40

50

・ 注射座標：

- 前後 (A P) : - 0 . 5 ~ - 0 . 8 m m
- 内外側 (M L) : + / - 1 . 0 m m *
- 片側注射を投与するとき、注射は脳の右側である。両側注射を投与するとき、第 1 の注射は右側であり、第 2 の注射は左側である。
- 背腹側 (D V) : - 2 . 5 m m

【 0 1 9 4 】

注射の実際の場所は、必要に応じて外科医によって調整され得る。座標が上記に記載されるものと異なる場合、未加工データの外科記録内に記録される。

【 0 1 9 5 】

針が所望の場所に来ると、シリンジプランジャーが、ゆっくりと押し下げられて、投薬溶液を頭蓋腔に注射する。注射部位は、注射の品質を確認するために、注射中及び注射直後に監視される。

【 0 1 9 6 】

所望の注射体積は、注射部位当たり 8 μ L である。注射は、側脳室を標的とし、合計 1 回又は 2 回の注射を含む。針は、逆流を防止するために、治療を送達した後に約 1 分間定位置に残される。任意の注射異常 (漏出、逆流など) が、注射されている動物の注射用紙上に記述される。注射及び針の除去の完了後、V e t B o n d (商標) 外科用接着剤を使用して切開が閉鎖され、縫合糸で補強され得る。動物のリアルタイム状態に基づく外科手技のわずかな変更が行われてもよく、研究プロトコルの逸脱とみなされない。

【 0 1 9 7 】

術後のケア。外科手技後に、動物は、回復を通して熱支持体上で維持され、必要に応じて交互に横向きに寝た状態で配置される。マウスに、滅菌生理食塩水が皮下投与される (約 0 . 5 ~ 1 m L) 。動物はまた、その外科的回復中に補足飼料としてケージ床上でその飼料及び D i e t - G e l を提供され得る。

生存中の観察及び測定

【 0 1 9 8 】

日常的な全般的健康観察。動物が、飼育スタッフによって、順化期間中の全身外観、行動、及び疾病の兆候の変化について観察され、記録が、施設記録の一部としてファイルに保持される。毎日の観察が、1 日目に開始して、その指定された終了日まで研究の過程の全体を通して記録される。1 日目の前に非正常臨床兆候を示す任意の動物が、研究から除外される。

【 0 1 9 9 】

研究前臨床観察 全ての動物が、1 日目の前に臨床兆候について詳細な検査を受ける。健康不良、ストレス、又は他の異常を示す臨床兆候が注目され、動物は、研究責任者 / 担当獣医及びスポンサー代表の裁量で研究から除外され得る。

【 0 2 0 0 】

臨床観察。全ての研究動物は、予定された終了まで、術後 6 ~ 1 0 日間、次いで、その後週に 1 回、体重と併せて詳細な臨床観察を受ける。予定された観察外で注目された観察は、予定外として入力される。評価には、自発運動、神経学的観察、姿勢、呼吸、水分補給状態、外科手術部位、常同行動、膀胱及び腸 (便) 観察、並びに全体的身体状態の評価が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 2 0 1 】

予定された臨床観察中の所見の非存在又は存在が記録される。健康不良、ストレス、及び疼痛を示す臨床兆候が注目され、担当獣医に報告される。最終的な詳細な検査が、切迫安楽死させた任意の動物について担当獣医によって行われる。

【 0 2 0 2 】

体重。個々の体重が、動物の到着の直後に初期群割り当てのために記録される。ベースライン体重が、投薬前 4 日以内に得られる。体重が、予定された終了まで週に 1 回実施され (臨床観察と同時に起こる) 、最終的な体重が、予定された終了前に測定される。研究

10

20

30

40

50

責任者の裁量により、有害な健康又は体重減少の兆候（すなわち、前週の体重の10%以上）が観察される場合、体重は、より頻繁に測定され得る。

【0203】

予定された犠牲。その予定された終了日、研究の22±3日目、43±7日目、85±10日目まで生存する動物が、人道的に安楽死させられ、剖検され、血液及び組織試料が、以下に記載されるように収集される。動物は、AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals: 2020 Editionに従って安楽死させられる。

【0204】

試料/検体収集

採血。剖検前に、動物は、麻酔ボックスに移され、血液学及び液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）、血清化学、並びに凝固のための採血のために、イソフルラン（1~2%）を使用して麻酔され得る。適切な量の全血が、心臓穿刺又は他の適切な血管を介して、各動物から25g針及び1ccシリンジ、又は類似物を使用して収集される。血液試料が、その予定された終了日に全ての研究動物から収集される。血液が、ASCSOPによって処理され、分析のためにQVLに送られる。

【0205】

血液学及びddPCRのための試料

血液学については、約250~500µLの全血が、抗凝固剤としてK₂EDTAを含むバイアルに入れられ、混合するために数回穏やかに反転され、2~8を維持するように設定された冷蔵庫内で保管するまで湿潤氷上に置かれる。

【0206】

血液学

収集量：約250~500µL

抗凝固剤：K₂EDTA

【0207】

分析される血液学パラメータが、表8で提供される。

【表7】

表8.分析される血液学パラメータ。	
白血球(WBC)数 微分白血球数	微分白血球数(自動及び/又は手動)
赤血球(RBC)数	RBC及びWBC形態
ヘモグロビン濃度(HGB)	絶対網状赤血球数
ヘマトクリット(HCT)	絶対好中球数
平均赤血球容積(MCV)	絶対リンパ球数
平均赤血球ヘモグロビン(MCH)	絶対単球数
平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	絶対好酸球数
RBC分布幅(RDW)	絶対好塩基球数
血小板数(PLT)	絶対大型無染色細胞数
平均血小板容積(MPV)	網状赤血球率
血液塗抹	

【0208】

デジタル液滴ポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）による生体内分布。加えて、約250~500µLの全血が、ddPCR分析による生体内分布のために収集される。全血が、抗凝固剤としてのK₂EDTAに入れられ、混合するために数回穏やかに反転され、-80±10で保管するまでドライアイス上に置かれる。

【0209】

臨床化学のための試料。臨床化学については、約500~1000µLの全血が、抗凝固剤を含まない管の中に収集され、遠心分離前に室温で少なくとも30分間凝固させられ

10

20

30

40

50

る。凝固した全血が、4℃の温度において約3000×gで5分間遠心分離されて、血清を生じさせる。血清試料が、遠心分離後に分離され、収集直後にドライアイス上で凍結され、-80±10℃で凍結して保管される。

【0210】

分析される血清化学パラメータが、表9で提供される。

【表8】

アルブミン(ALB)	カルシウム(CA)
アニオンギャップ	コレステロール(CHOL)
総タンパク質(TP)	グルコース(GLU)
アルカリホスファターゼ(ALP)	無機リン(PHOS)
アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)	ガンマグルタミルトランスフェラーゼ(GGT)
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)	重炭酸塩(TCO2)
クレアチンキナーゼ(CK)	ナトリウム(Na)
総ビリルビン(TBil)	カリウム(K)
直接ビリルビン(DBil)	塩化物(Cl)
間接ビリルビン(IBil)	グロブリン(Glob)
尿素窒素(BUN)	ALB/GLOB比(A/G)
クレアチン(CREAT)	BUN/CRE比(B/c)
トリグリセリド	

10

20

【0211】

凝固のための試料。血漿試料が、遠心分離後に分離され、-10℃～-30℃を維持するように設定された冷凍庫内に保管される。

【0212】

凝固。収集量：約300～800μL、抗凝固剤：3.2%クエン酸ナトリウム、処理：血漿まで。分析されるパラメータ：プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノゲン。

30

【0213】

肉眼的剖検。剖検は、動物の全般的身体状態及び組織(呼吸器系、心血管系、消化系、及び泌尿生殖器系)の系統的な巨視的外部及び内部検査からなる。これは、全ての予定された犠牲及び予定外の犠牲について実施される。任意の肉眼的病変が、文書記録され、温存される。組織収集についての詳細が、以下に詳細に記載される。訓練を受けた適任の研究人員が、肉眼的剖検及び組織収集を行う。

【0214】

組織収集。終了時に収集され、組織病理学又はddPCRのいずれかによって分析される組織が、表10に提示される。

40

【表 9】

表 10.収集及び分析される組織				
組織	計量された	収集された	組織病理学(組織学及び顕微鏡的評価)	ddPCRによる生体内分布
脳	X	X	X	X
後根神経節(頸部レベル)		X	X	
後根神経節(胸部レベル)		X	X	
後根神経節(腰部レベル)		X	X	
肉眼的病変/腫瘍		X	X	
心臓	X	X	X	X
腎臓	X	X	X	X
大腸、盲腸		X	X	
大腸、結腸		X	X	
大腸、直腸		X	X	
肝臓	X	X	X	X
気管支を含む肺	X	X	X	X
鼠径リンパ節		X	X	X
脾臓		X	X	X
小腸、十二指腸		X	X	
小腸、回腸		X	X	
小腸、空腸		X	X	X
脊髄		X	X	X
脾臓	X	X	X	X
胃		X	X	
睾丸 a、b	X	X	X	X
副睾丸 a	X	X	X	X
胸腺	X	X		
膀胱		X	X	
筋組織				
第 6、第 7 肋骨(肋間筋を含む)	X	X	X	X
上腕三頭筋	X	X	X	X
大腿四頭筋	X	X	X	X
腓腹筋	X	X	X	X
前脛骨筋	X	X	X	X
指伸筋	X	X	X	X
舌	X	X	X	X

10

20

30

40

【0215】

組織収集：組織病理学。組織病理学のための組織が、表 2、3、及び 4 により、その指定された終了日に動物から収集される。肉眼的病変/異常組織を含む、組織病理学のために表 6 にマークされた全ての組織（眼球を除く）が収集され、10%中性緩衝ホルマリン（NBF）中で固定される。眼球が、Davidson 溶液中で 24 ~ 48 時間固定され、次いで、70%エタノールに移される。

【0216】

組織が、切り取られ、処理され、パラフィンに包埋され、ミクロトームで切断され、H & E で染色され、カバースリップで覆われる。可能な場合、筋肉は、横方向及び縦方向の

50

両方で切片化される。結果として得られるスライドは、顕微鏡によって品質チェックされる。全ての調製されたスライドは、ACVP 獣医病理学者によって評価される。表集計された顕微鏡データ及び注目に値する変化の考察からなる、病理報告書草案が発行される。顕微鏡写真が撮影され、注釈を付けられる。

【0217】

ddPCR 分析。表10に列挙される組織の代表的な試料が、ddPCR 分析のために収集され、保持される。1つの大きな部分として収集された検体が、管に入れられ、液体窒素中で急速凍結され、-60 ~ 80 を維持するように設定された冷凍庫に入れられるまで、ドライアイスを含む冷却器に入れられる。

【0218】

実施例8：非ヒト霊長類(NHP)における髄腔内送達後のINS1201-AAV9の生体内分布

試験システム

- ・ 属：マカク属
- ・ 種：カニクイザル
- ・ 性別：オス
- ・ 体重：約2 ~ 5 kg

【0219】

末梢及び骨格筋におけるINS1201-AAV9生体内分布が、髄腔内投与にตอบสนองして測定される。

【0220】

全ての注射が、脊髄の腰椎腔内へ髄腔内に実施される。合計12匹の動物が、表11で提供されるように使用される。

【表10】

表 11.					
群	およそのNHPの体重	用量(総ベクターゲノム(vg))	被験物質	送達方法	n
1	3kg	2.0×10^{14}	INS1201-AAV9	髄腔内(IT)	3
2	3kg	1.0×10^{14}	INS1201-AAV9	IT	3
3	3kg	5.0×10^{13}	INS1201-AAV9	IT	3
4	3kg	2.5×10^{13}	INS1201-AAV9	IT	3

【0221】

研究のために選択される動物は、体重が約3kgである2ヶ月~5歳の若年又は成体サルである。動物は、事前にスクリーニングされ、AAV9抗体について陰性である。スクリーニング前の採血が、注射手技前2ヶ月以内に行われる。スクリーニングのための動物が鎮静状態にされ、血液試料が収集される。

【0222】

選択された動物が、注入の数週間前に病院エリアに運ばれる。注入日(d0)に、対象が鎮静状態にされ、血液試料が化学分析及び細胞血球計数(CBC)のために収集される。次いで、対象は、上記の投薬表に従って単回用量のINS1201-AAV9を注射される。9ヶ月未満の全ての動物は、堰堤を用いて収容される。9ヶ月を超える動物は、小さい群で収容される。

【0223】

注射は、腰部鞘嚢のくも膜下腔内への腰椎穿刺によって実施される。髄腔内(IT)注射については、対象が側臥位に配置され、約L4/5レベルにおける(脊髄の円錐の下方の)後正中線注射部位が識別される。滅菌条件下では、スタイレットを有する脊髄針が挿

10

20

30

40

50

入され、針からの明瞭なCSFの流れ、並びに少量のイオヘキソールの注射、続いて、手技中脊髄造影法により、くも膜下挿管が確認される。約1mlのCSFが、ベースライン試料として排出され、収集され、凍結される。これは、後続の被験物質の注射によって生成される圧力の増加を軽減するものである。被験物質の吻側流分布を改善するために、次いで、対象は、トレンデンベルグ位（軽く頭部を下げた位置）で傾転される。これは、ヒト対象においてCT骨髄造影を実施するときの日常的な手順である。CSFタップ/IT注入については、皮下注射針（22G 3/4又は1 1/2"）も、この目的のために使用することができる。

【0224】

生存中の観察：処置されたNHPは、交絡毒性源への曝露を低減するために孤立状態で保たれる。対象は、獣医スタッフによって、活動、相対的な皮膚の色、及び全般的健康について、1日2回観察される。動物は、注射後約21日間保持される。生体内分布及び臨床化学検査が、安楽死時に収集された試料に実施される。

【0225】

以下のセグメントが、生体内分布研究のために脊髄から収集される：頸髄、胸髄、腰髄、仙髄、後根神経節（DRG）根頸部レベル、DRG根胸部レベル、DRG根腰部レベル。各脊髄セグメントについて、合計2つの断片が収集される。1つの断片が4%パラホルムアルデヒド（PFA）中で保管され、1つが瞬間凍結される。

【0226】

筋肉及び器官については、各々の4つの試料が収集される。2つが4%PFAに入れられ、2つが瞬間凍結される。以下の筋肉の試料が収集される：横隔膜、肋間筋及び神経を含む第6/第7肋骨、腰筋、三角筋、大胸筋、上腕二頭筋、上腕三頭筋、大腿直筋、内側広筋、外側広筋、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、舌、咬筋、指伸筋、腹直筋。以下の器官の試料が収集される：心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓。

【0227】

臨床化学検査は、以下の通りである：AST、ALT、GGT、Alk Phos、カリウム、ナトリウム、塩化物、クレアチニン、血中尿素窒素、CBC。

【0228】

脳試料が、以下のように収集される。小脳が、脳の残りの部分から分離される。小脳が4つの四分円に切断され、右の2つの四分円が4%PFA中に保管され、左の2つの四分円が瞬間凍結される。脳が、右半球及び左半球に分割される。次いで、脳が4つの四分円に切断され（冠状切断）、右の2つの四分円が4%PFA中に保管され、左の2つの四分円が瞬間凍結される。

【0229】

6つの試料が、後続の筋肉生検のために大腿四頭筋から採取される。3つが4%PFA中に保管され、3つが瞬間冷凍される。

【0230】

脳脊髄液（CSF）及び血清も、生体内分布研究のために収集される。

【0231】

生体内分布研究が、液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）によって前述の試料に実行される。

【0232】

参照による組み込み

本明細書で言及される特許文献及び科学論文の各々の開示全体は、あらゆる目的のために参照により組み込まれる。

【0233】

同等物

本発明は、その趣旨又は本質的な特性から逸脱することなく、他の具体的な形態で具現化され得る。したがって、前述の実施形態は、本明細書に記載される本発明を限定するのではなく、あらゆる点に関して例証的とみなされるものである。したがって、本発明の範

10

20

30

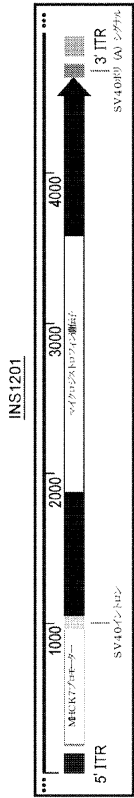
40

50

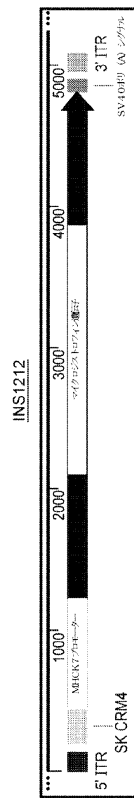
図は、前述の説明ではなく添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の同等性の意味及び範囲内にある全ての変更は、その中に包含されることを意図している。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

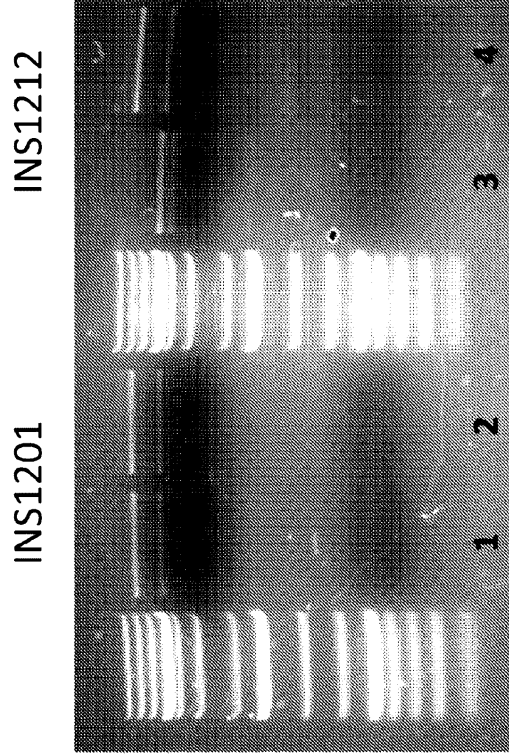
20

30

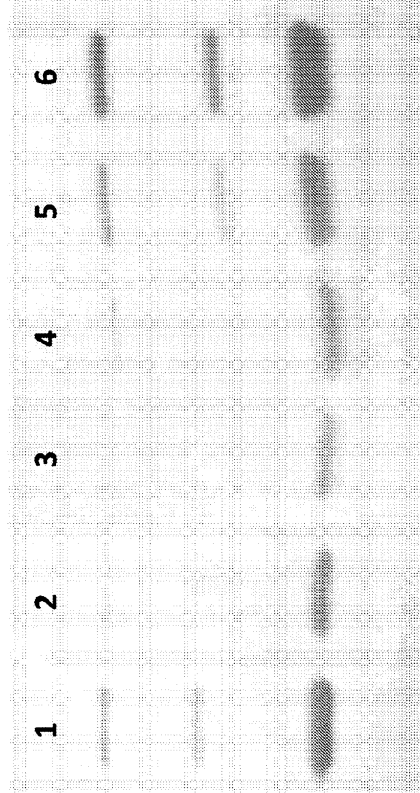
40

50

【 図 1 C 】



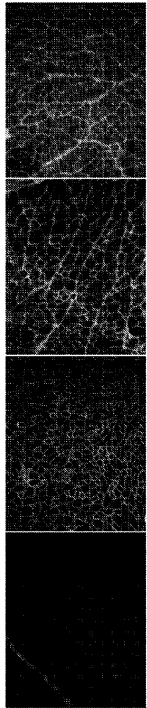
【 図 2 】



10

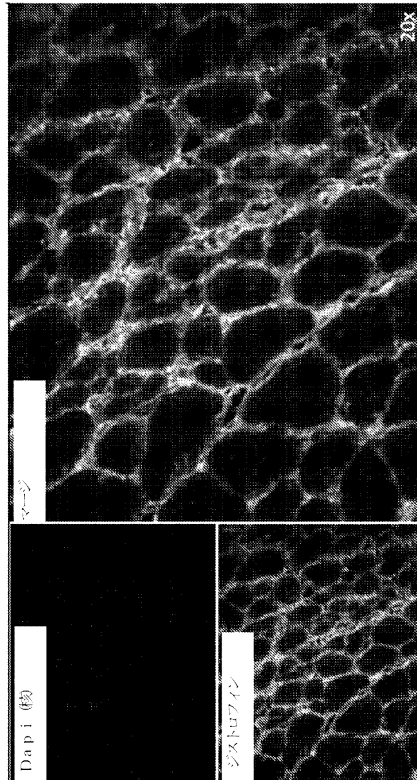
20

【 図 3 A 】



ZO2

【 図 3 B 】

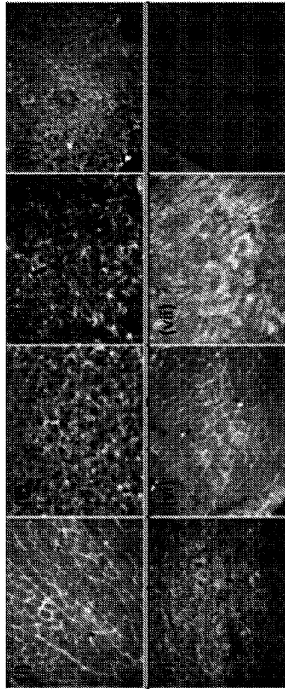


30

40

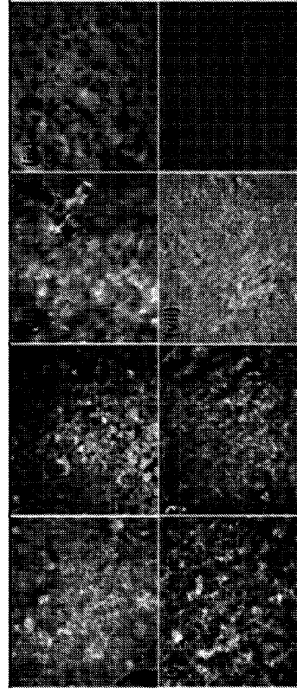
50

【 図 4 A 】



ビメンチン

【 図 4 B 】

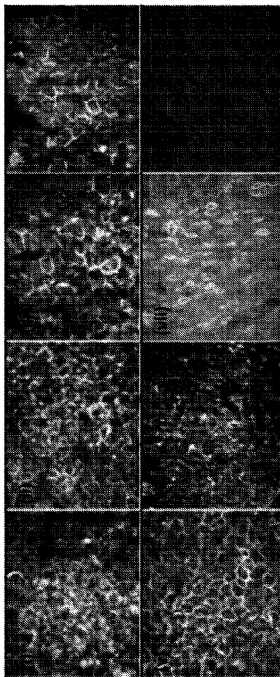


ビメンチン

10

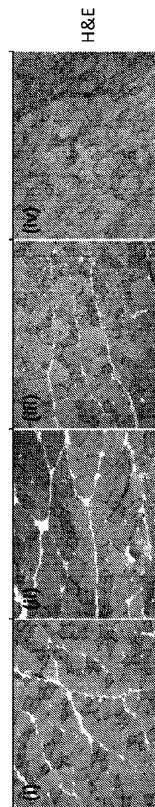
20

【 図 5 】



ビメンチン

【 図 6 A 】

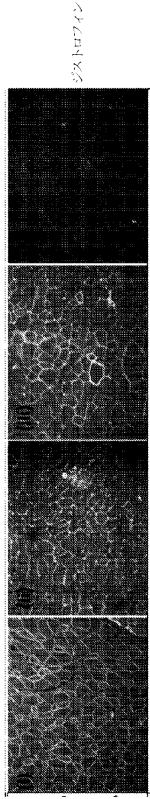


30

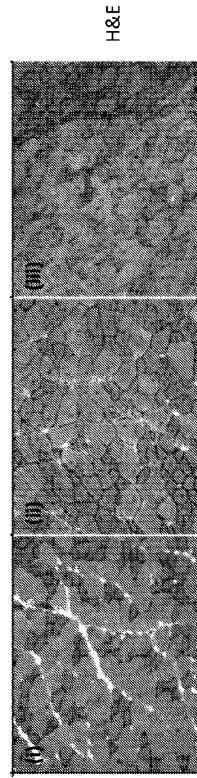
40

50

【図 6 B】



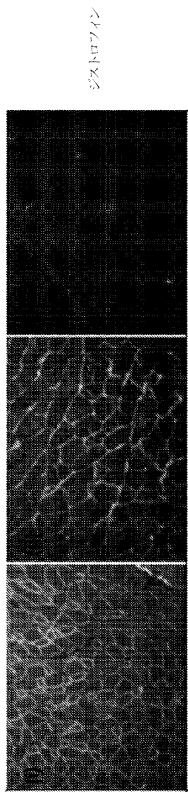
【図 7 A】



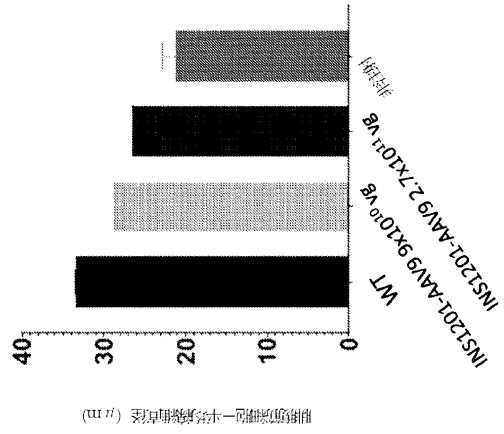
10

20

【図 7 B】



【図 8 A】

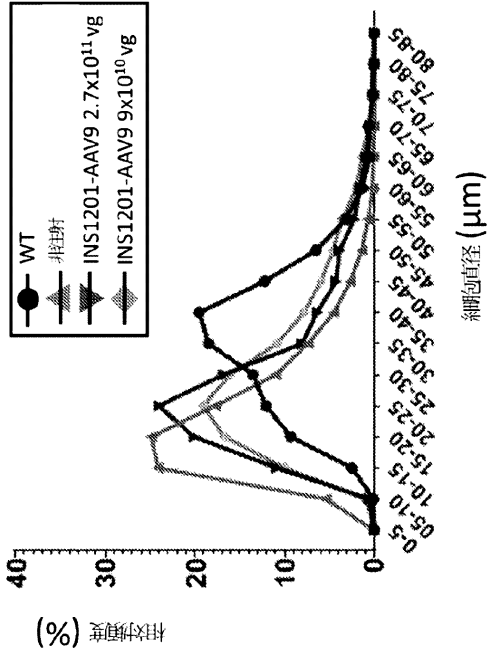


30

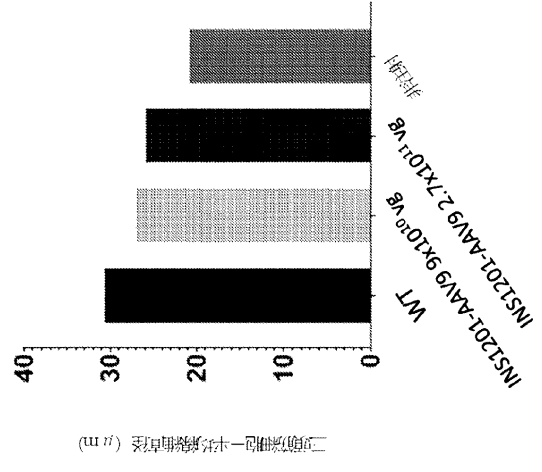
40

50

【 8 B 】



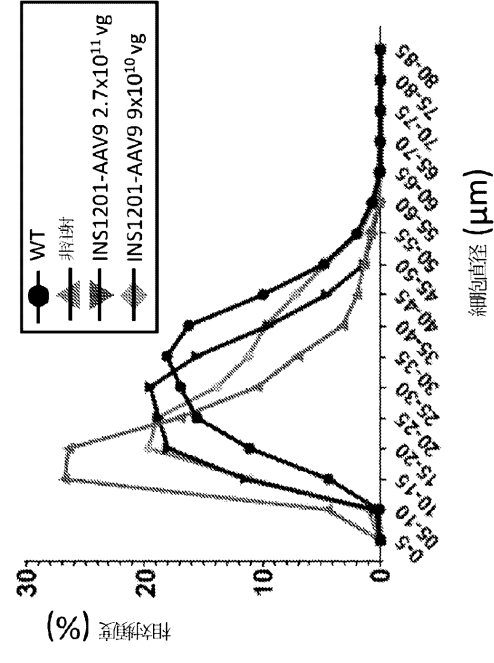
【 8 C 】



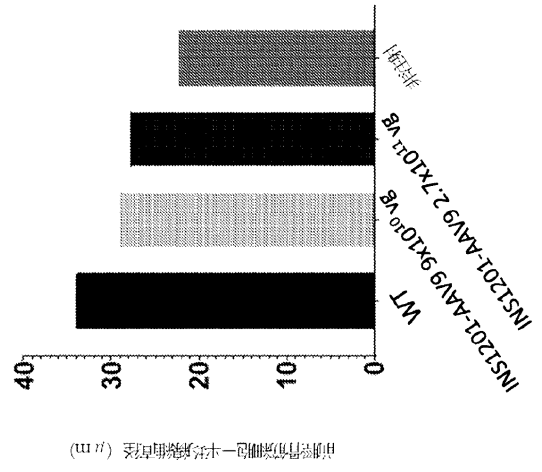
10

20

【 8 D 】



【 8 E 】

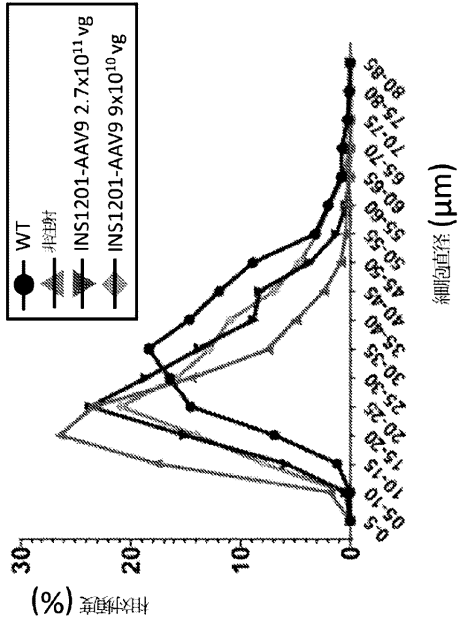


30

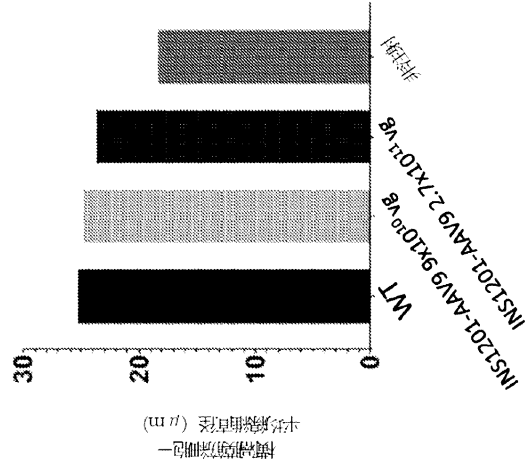
40

50

【 図 8 F 】



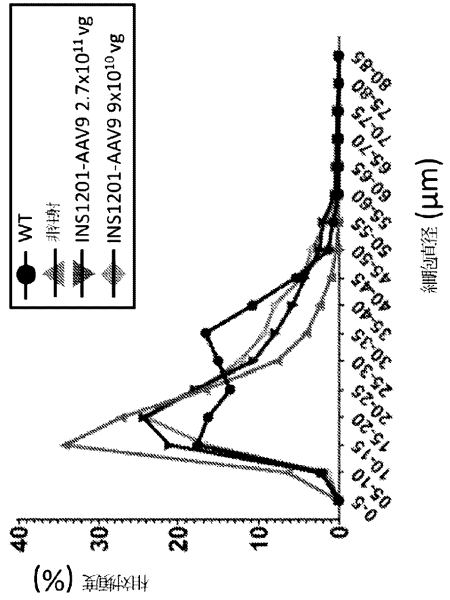
【 図 8 G 】



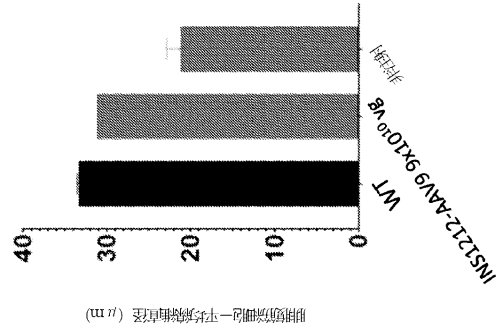
10

20

【 図 8 H 】



【 図 9 A 】

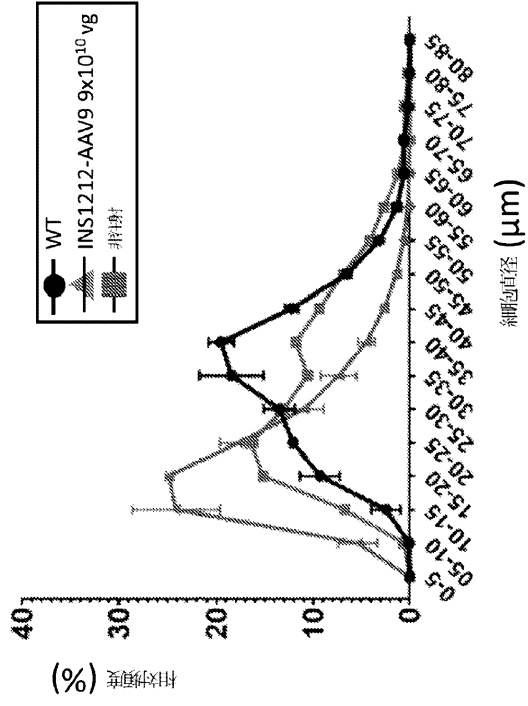


30

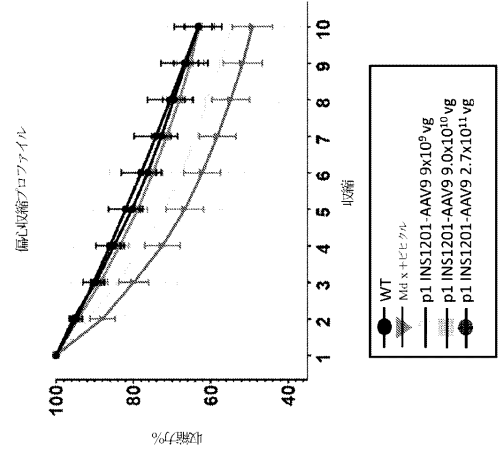
40

50

【図 9 B】



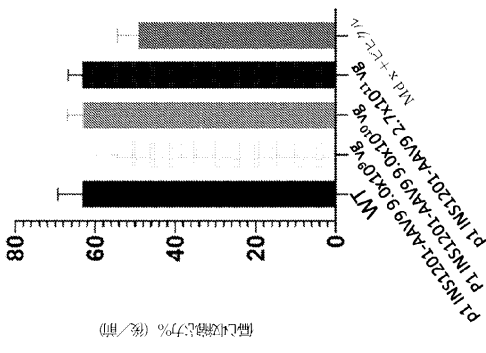
【図 10 A】



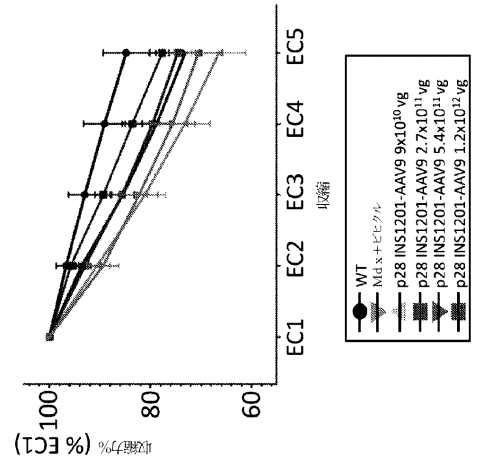
10

20

【図 10 B】



【図 10 C】

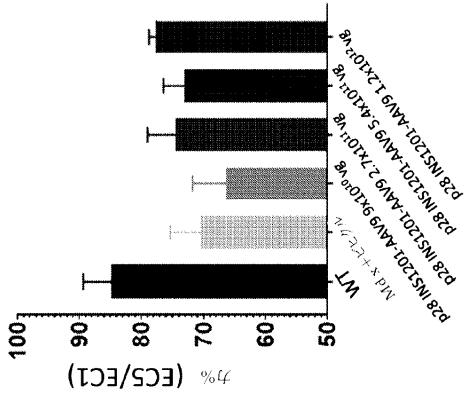


30

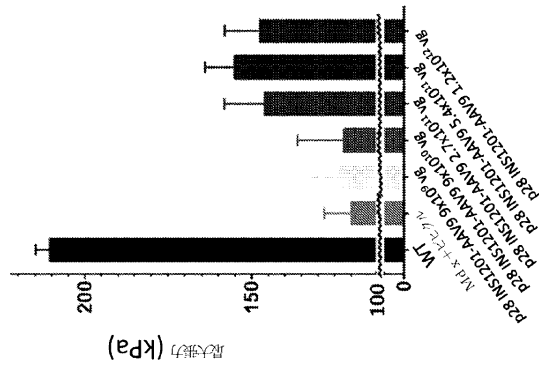
40

50

【 10 D 】

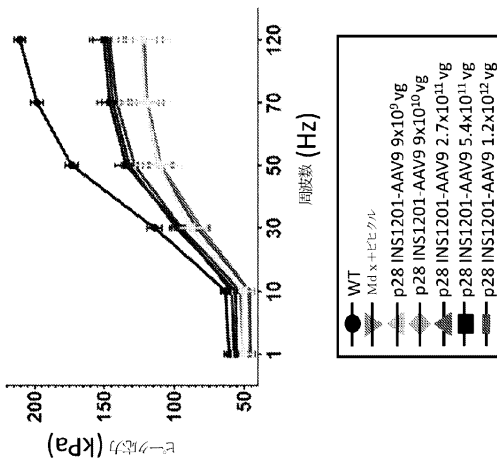


【 10 E 】

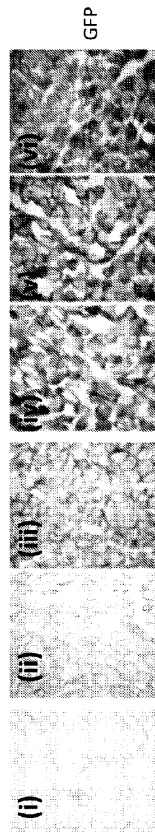


10

【 10 F 】



【 11 A 】



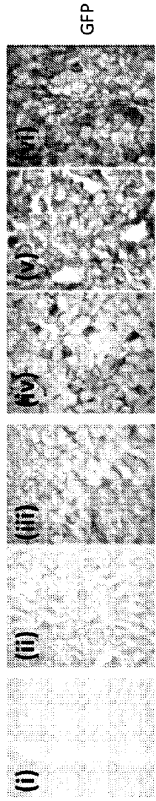
20

30

40

50

【 図 1 1 B 】



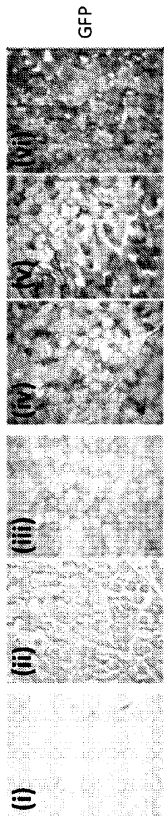
【 図 1 1 C 】



10

20

【 図 1 1 D 】



【 図 1 1 E 】



30

40

50

【 図 1 1 F 】



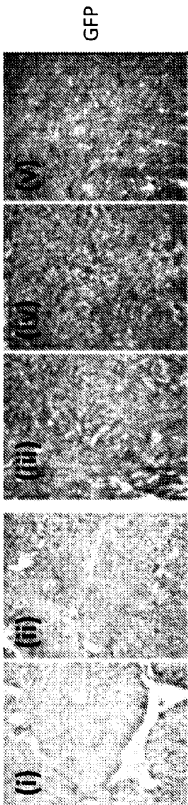
【 図 1 1 G 】



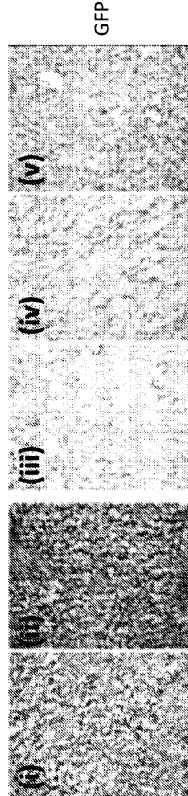
10

20

【 図 1 1 H 】



【 図 1 1 I 】

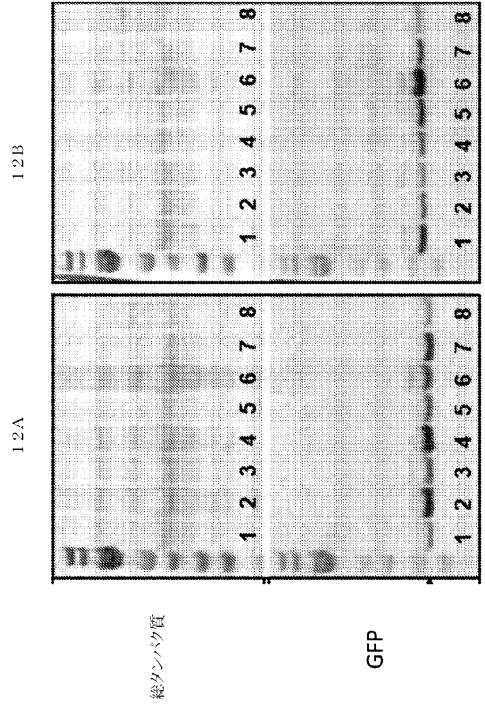


30

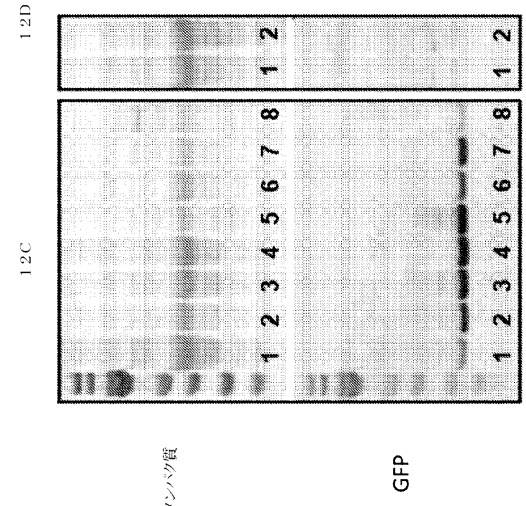
40

50

【 図 1 2 A - B 】



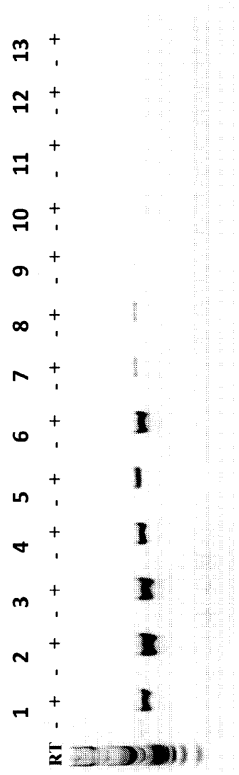
【 図 1 2 C - D 】



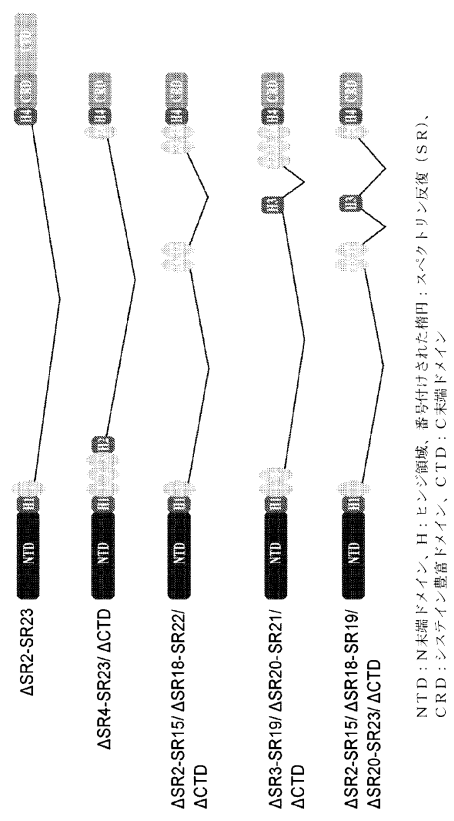
10

20

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

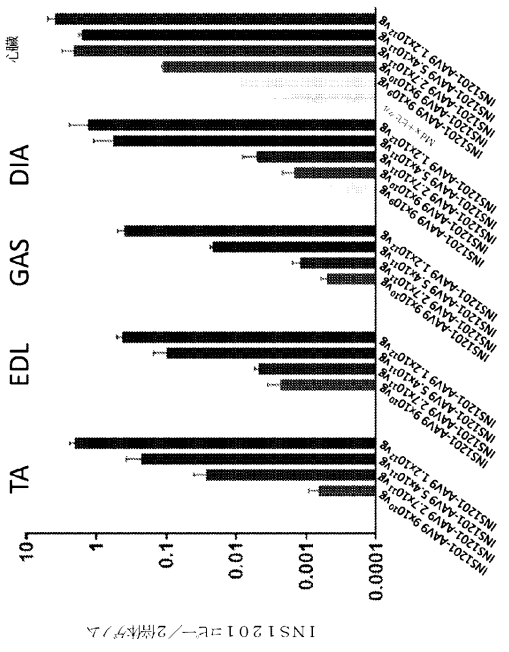


30

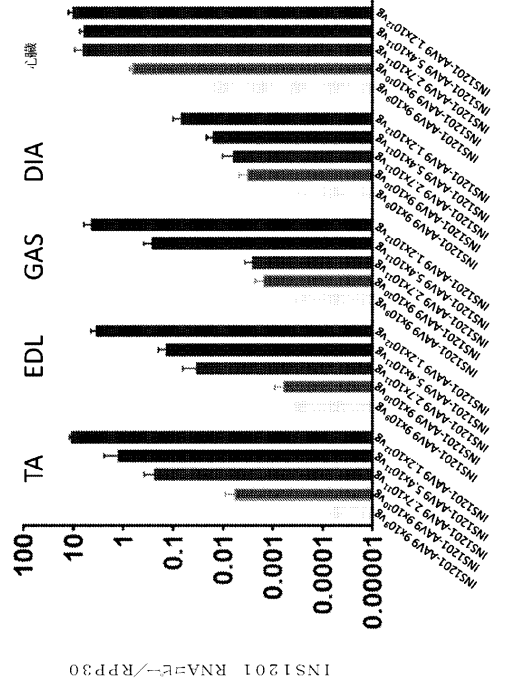
40

50

【 15 】



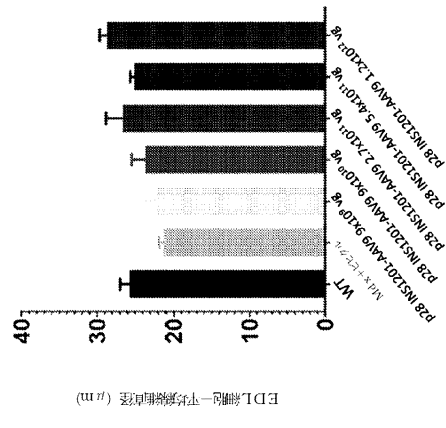
【 16 】



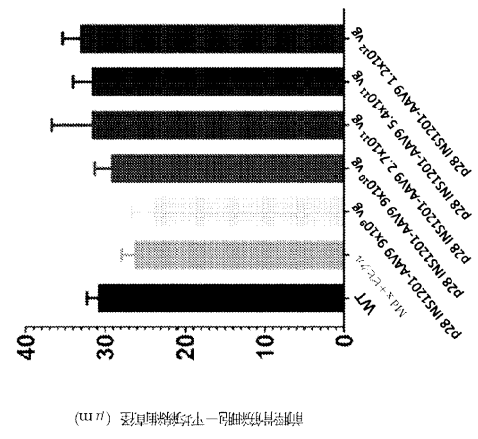
10

20

【 17 】



【 18 】

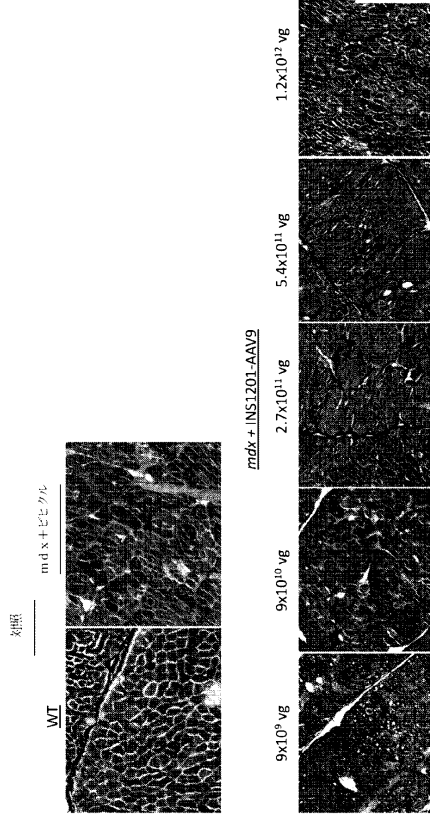


30

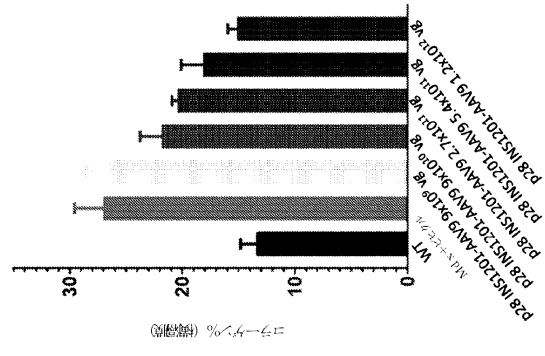
40

50

【 図 1 9 】



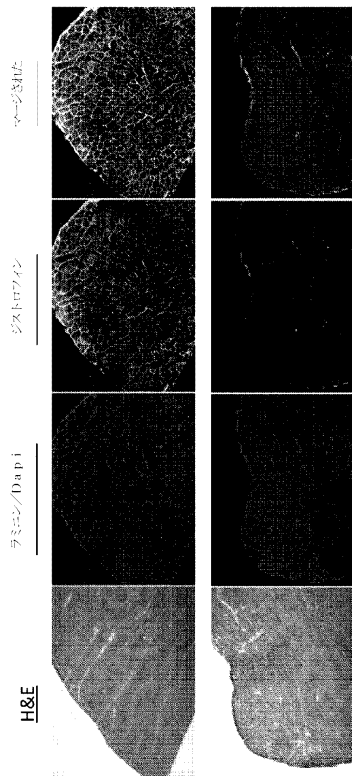
【 図 2 0 】



10

20

【 図 2 1 】



30

40

50

【配列表】

2024527742000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - INV. A61K 48/00, C12N 15/86 (2022.01)
 ADD. A61K 38/17, A61P 21/00, C07K 14/47 (2022.01)
 CPC - INV. A61K 48/005, A61K 48/0058, C07K 14/4708
 ADD. C12N 15/86, C12N 2750/14143, C12N 2830/008

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 — A	WO 2021/077000 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 22 April 2021 (22.04.2021) para [0005]; [0011]-[0013]; [0025]-[0027]; [0046]-[0047]; [0081]-[0082]; [0101]; [0169]; [0174]-[0182]; [0197]-[0199]; [0227]; [0237]-[0238]; [0268]; [0472]; [0548]	2, 5, (8-9,15-17)/(2,5), 101-104 1, 3, 6-7, (8-9,15-17)/(1,3,6-7) 4, (8-9,15-17)/4
Y	US 2020/0199621 A1 (RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL) 25 June 2020 (25.06.2020) abstract; para [0015]-[0016]	1, 7, (8-9,15-17)/(1,7)
Y — A	US 2020/0407746 A1 (VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL) 31 December 2020 (31.12.2020) para [0010]; [0314]-[0317]; SEQ ID NO: 10	3, (8-9,15-17)/3 4, (8-9,15-17)/4
Y	US 2020/0231943 A1 (ENCODED THERAPEUTICS INC.) 23 July 2020 (23.07.2020) para [0004]; SEQ ID NO: 10	6, (8-9,15-17)/6
A	GenBank Accession No. AC270814, Pan troglodytes chromosome 16 clone CH251-74E21, complete sequence, 21 June 2016 [online], [Retrieved on 11 October 2022]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC270814 > full document, especially nts 58415-58146	4, (8-9,15-17)/4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

12 October 2022

Date of mailing of the international search report

NOV 08 2022

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
 Karl Rodriguez
 Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/74622

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed.

10

b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/74622

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.: 10-14, 18-100, 105-169
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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:

- 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.:

20

30

- 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.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74622

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2022/104062 A1 (PRECISION BIOSCIENCES INC.) 19 May 2022 (19.05.2022) full document	1-9, 15-17, 101-104
X, P	WO 2022/029543 A1 (INTAS PHARMACEUTICALS LTD.) 10 February 2022 (10.02.2022) full document	1-9, 15-17, 101-104

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 21/04 (2006.01) A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00

,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,D
 K,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),O
 A(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,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB
 ,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT, JM,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,W
 S,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 8 8 0 7 ブリッジウォーター ユーエス ハイウェイ 2
 0 2 / 2 0 6 7 0 0 インスメッド インコーポレイテッド内

(72)発明者

カスパー, アラン

アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 8 8 0 7 ブリッジウォーター ユーエス ハイウェイ 2
 0 2 / 2 0 6 7 0 0 インスメッド インコーポレイテッド内

(72)発明者

トムセン, グレッチェン

アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 8 8 0 7 ブリッジウォーター ユーエス ハイウェイ 2
 0 2 / 2 0 6 7 0 0 インスメッド インコーポレイテッド内

F ターム (参考)

4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA35 MA66 NA14 ZA36 ZA94 ZC51
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA36 ZA94 ZC51