

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7231226号
(P7231226)

(45)発行日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(24)登録日 令和5年2月20日(2023.2.20)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	Z N A
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	

請求項の数 13 (全59頁)

(21)出願番号	特願2019-523836(P2019-523836)	(73)特許権者	507088266
(86)(22)出願日	平成29年11月7日(2017.11.7)		ユニバーシティ オブ マサチューセッツ
(65)公表番号	特表2019-534298(P2019-534298 A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 0 8、ボストン、ワン ビーコン ス トリート、3 1 ス フロア
(43)公表日	令和1年11月28日(2019.11.28)		One Beacon Street, 3 1st Floor, Boston, M assachusetts 0 2 1 0 8
(86)国際出願番号	PCT/US2017/060410	(74)代理人	100102842
(87)国際公開番号	WO2018/085842		弁理士 葛和 清司
(87)国際公開日	平成30年5月11日(2018.5.11)	(72)発明者	ジョーンズ, ベーター, エル.
審査請求日	令和2年11月4日(2020.11.4)		アメリカ合衆国 ネバダ州 8 9 7 0 3、 カーソン シティ、ヌーマガ パス 4 8 0 0
(31)優先権主張番号	62/490,783	(72)発明者	グリーン, マイケル, アール.
(32)優先日	平成29年4月27日(2017.4.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/418,694		
(32)優先日	平成28年11月7日(2016.11.7)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーのための治療標的

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを有する対象を処置するための医薬組成物であって、D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子の有効量を含み、ここで、前記エピジェネティックな修飾因子が、対象の筋細胞においてD U X 4 遺伝子発現を低下させ、ここで、前記エピジェネティックな修飾因子が、K D M C 4 C の阻害剤であり、ここで、前記K D M C 4 C の阻害剤が、K D M 4 C のm R N A に結合しK D M 4 C を特異的にノックダウンするs h R N Aである、前記組成物。

【請求項 2】

エピジェネティックな修飾因子が、対象の筋細胞においてZ S C A N 4 遺伝子発現を低下させる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子が、対象の筋細胞においてT R I M 4 3 またはZ S C A N 4 を阻害しない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子が、1 つ以上の筋原性制御遺伝子を阻害しない、請求項 1 または請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

1 つ以上の筋原性制御遺伝子が、ミオゲニン (M y o G)、m y o D、およびミオシン重鎖 (M y H C) である、請求項 4 に記載の組成物。

10

20

【請求項 6】

エピジェネティックな修飾因子が、J Q 1、または J Q 1 のアナログではない、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子が、配列番号 1 ~ 3 のいずれかで表される s h R N A である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

筋細胞が、最終分化した筋細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

有効量が、対象の筋細胞に *ex vivo* で投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項 10】

転写活性 D U X 4 遺伝子の存在に基づいて、F S H D を有する対象が同定される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

筋細胞が、エピジェネティックな修飾因子の有効量の投与の前に、染色体 4 q 3 5 においてエピジェネティックに調節不全となった D 4 Z 4 アレイを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

エピジェネティックに調節不全となった D 4 Z 4 アレイが、11 個より少ない反復単位を含む、請求項 11 に記載の組成物。 20

【請求項 13】

投与前および/または後に、対象の D U X 4 発現レベルが評価され、ここで、D U X 4 発現レベルの変化が、処置の有効性を示す、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2016年11月7日に出願された米国仮出願番号62/418,694、表題「IDENTIFICATION OF THERAPEUTIC TARGETS FOR FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY」、および2017年4月27日に出願された米国仮出願番号62/490,783、表題「IDENTIFICATION OF THERAPEUTIC TARGETS FOR FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY」の出願日の利益を主張し、これらの内容は、その全体において参考として援用される。 30

【0002】

政府の支援

本発明は、国立衛生研究所により付与されたAR062587下における政府の支援によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (F S H D) は、染色体 4 q 3 5 におけるエピジェネティックに調節不全となった D 4 Z 4 アレイからの D U X 4 遺伝子の異常発現により引き起こされる。この遺伝子は、健康な個体においては、一般に発現しないか、非常に低いレベルにおいて発現する。F S H D 患者においては、D U X 4 遺伝子は、骨格筋において、高いレベルで異常発現する。この異常発現が、最終的に、筋肉の病変、萎縮、および臨床的な脱力をもたらす。開発されているほとんどの治療は、D U X 4 の m R N A またはタンパク質を標的とする。

【0004】

10

20

30

40

50

D U X 4 のタンパク質の mRNA を標的とするいくつかの治療剤が、F S H D の処置のために研究されてきた。しかし、有効なヒト用の処置は、なお必要とされている。今日まで、F S H D のための特異的治療は存在せず、現在の処置は、行動症状を改善するためのみに向けられている。したがって、F S H D を処置するための新規の組成物および方法の開発について、一般的な必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

概要

いくつかの側面において、本開示は、D U X 4 の異常な発現に関連する疾患（例えば、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、F S H D）の処置のために有用な組成物および方法に関する。いくつかの態様において、本明細書において開示されるエピジェネティックな修飾因子は、D U X 4 の異常な発現をエピジェネティックに制御（例えば阻害）するため有用である。いくつかの態様において、D U X 4 の異常な発現により特徴づけられる疾患（例えば F S H D）を有する対象における、エピジェネティックな修飾因子（例えば選択的阻害剤）による D U X 4 発現の低下は、病原性 D U X 4 - F L タンパク質の発現の低下をもたらす、それにより、疾患の総体症状を軽減するか、疾患の症状を逆転させることが期待される。いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、対象において Z S C A N 4 遺伝子発現を低下させる。

10

【0006】

本開示の側面は、エピジェネティックな修飾因子（例えば選択的阻害剤）による D U X 4 遺伝子発現の阻害が、D U X 4 遺伝子発現の低下および/または D U X 4 タンパク質（例えば、D U X 4 - F L）のタンパク質産生の低下をもたらすという発見に関する。例えば、特定のプロモドメイン含有タンパク質（例えば、B R D 2、B A Z 1 A など）、ヒストンデメチラーゼ（例えば K D M 4 C）、特定のメチルトランスフェラーゼ（例えば A S H 1 L）、およびクロマチンリモデリングタンパク質（例えば、S M A R C A 5、S M A R C B 1 など）をコードする遺伝子の選択的阻害は、D U X 4 遺伝子発現の低下（例えば、D U X 4 遺伝子のエピジェネティックサイレンシング）をもたらす。したがって、いくつかの態様において、D U X 4 遺伝子の選択的なエピジェネティックな修飾因子は、病原性 D U X 4 - F L タンパク質の産生を低下させ、F S H D を処置するために有用である。

20

【0007】

本開示のいくつかの側面において、それを必要とする対象において顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（F S H D）を処置するための方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、対象に D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子の治療有効量を投与することを含む。いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、対象の筋細胞、筋前駆細胞、または筋幹細胞において、D U X 4 発現を低下させる。

30

【0008】

いくつかの態様において、D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子は、D U X 4 とハイブリダイズする干渉性核酸ではない。

いくつかの態様において、D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子は、デメチラーゼ酵素の阻害剤である。いくつかの態様において、デメチラーゼは、リジン特異的デメチラーゼである。いくつかの態様において、リジン特異的デメチラーゼは、K D M 4 A、K D M 4 B、K D M 4 C、K D M 4 D、K D M 6 A、K D M 6 B、および P H F 2 からなる群より選択される。いくつかの態様において、リジン特異的デメチラーゼは、K D M C 4 C および K D M 4 C を特異的に阻害するエピジェネティックな修飾因子である。

40

【0009】

いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、プロモドメイン含有タンパク質（B R D）の阻害剤である。いくつかの態様において、B R D タンパク質は、B R D 2、B R D 3、B R D T、A S H 1 L、B R P F 1、B R P F 3、B P T F、B A Z 1 A、B A Z 1 B、または B A Z 2 A である。いくつかの態様において、B R D タンパク質は、B R D 2 であり、エピジェネティックな修飾因子は、B R D 2 を特異的に阻害する。

50

いくつかの態様において、BRDタンパク質は、BAZ1Aであり、エピジェネティックな修飾因子は、BAZ1Aを特異的に阻害する。

【0010】

いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、クロマチンリモデリングタンパク質の阻害剤である。いくつかの態様において、クロマチンリモデリングタンパク質は、SMARCA5またはSMARCB1である。

いくつかの態様において、クロマチンリモデリングに関与するタンパク質は、SMARCA5であり、エピジェネティックな修飾因子は、SMARCA5を特異的に阻害する。

【0011】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、メチルトランスフェラーゼ酵素の阻害剤である。いくつかの態様において、メチルトランスフェラーゼは、CARM1、DOT1L、KMT2A、KMT2C、KMT2E、PRMT1、SETD1A、SETD1B、SMYD3、またはASH1Lである。いくつかの態様において、メチルトランスフェラーゼは、ASH1Lであり、エピジェネティックな修飾因子は、ASH1Lを特異的に阻害する。

10

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、核酸、ポリペプチド、または小分子である。

【0012】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、核酸である。いくつかの態様において、核酸は、二本鎖RNA(dsRNA)、siRNA、shRNA、miRNA、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)からなる群より選択される干渉性核酸である。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、表1において列記される配列を有する干渉性核酸である。

20

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、ポリペプチドである。いくつかの態様において、ポリペプチドは、抗体である。

【0013】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、小分子である。本開示の側面は、部分的に、筋分化を改変することによりDUX4発現を改変する小分子(例えばJQ1)は、いくつかの態様においては、FSDの処置のための実行可能な候補ではない、という発見に関する。したがって、いくつかの態様において、小分子は、対象の細胞における1つ以上の筋原性制御遺伝子を改変するかまたはこれを実質的に改変することなく、DUX4発現を阻害する。いくつかの態様において、1つ以上の筋原性制御遺伝子は、ミオゲニン(Myog)、MyoD、およびミオシン重鎖(MyHC)からなる群より選択される。いくつかの態様において、小分子は、対象の細胞において、筋分化(myodifferentiation)を阻害しない。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、JQ1、またはJQ1のアナログではない。

30

【0014】

いくつかの態様において、筋細胞は、分化した筋細胞、任意に最終分化した筋細胞である。いくつかの態様において、有効量は、対象の筋細胞にex vivoで投与される。

いくつかの態様において、筋細胞は、染色体4q35において、エピジェネティックに調節不全となったD4Z4アレイを含む。いくつかの態様において、エピジェネティックに調節不全となったD4Z4アレイは、11個より少ない反復単位を含む。

40

【0015】

いくつかの態様において、方法は、投与前および/または後に、対象のDUX4発現レベルを評価することをさらに含み、ここで、DUX4発現レベルの変化が、処置の有効性を示す。

いくつかの側面において、本開示は、DUX4遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子を同定するための方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、以下を含む：(i) DUX4の発現により特徴づけられる細胞を、DUX4の推定のクロマチンモディファイアの発現または活性を修飾するための候補の剤と接触させること；(ii) 細胞

50

におけるDUX4の発現レベルを検出すること；ならびに、(iii)候補の剤との接触の後でDUX4の発現レベルが対照細胞と比較して低下した場合に、候補の剤を、DUX4のエピジェネティックな修飾因子として同定すること。

【0016】

いくつかの態様において、細胞および/または対照細胞は、最終分化した筋細胞などの筋細胞である。いくつかの態様において、細胞は、エピジェネティックに調節不全となったD4Z4アレイを含む。いくつかの態様において、対応する対照細胞は、エピジェネティックに調節不全となったD4Z4アレイを含まない。

いくつかの態様において、候補の剤は、化合物ライブラリーから選択される。いくつかの態様において、ライブラリーは、デメチラーゼ阻害剤を含むか、またはこれからなる。いくつかの態様において、デメチラーゼ阻害剤は、リジン特異的デメチラーゼ阻害剤である。いくつかの態様において、ライブラリーは、プロモドメイン阻害剤を含むか、またはこれからなる。いくつかの態様において、ライブラリーは、クロマチンリモデリングタンパク質の阻害剤（例えばSMARCA5阻害剤など）を含むか、またはこれからなる。いくつかの態様において、ライブラリーは、メチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えばASH1L阻害剤）を含むか、またはこれからなる。

10

【0017】

いくつかの態様において、候補の剤は、核酸、ポリペプチド、または小分子である。

いくつかの態様において、候補の剤は、核酸である。いくつかの態様において、核酸は、二本鎖RNA(dsRNA)、siRNA、shRNA、miRNA、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)からなる群より選択される干渉性核酸である。

20

【0018】

いくつかの態様において、候補の剤は、ポリペプチドである。いくつかの態様において、ポリペプチドは、抗体である。

いくつかの態様において、候補の剤は、小分子である。

いくつかの態様において、DUX4の発現レベルは、ハイブリダイゼーションベースのアッセイ、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)またはFACSを用いて検出される。

【0019】

本開示の側面は、DUX4遺伝子発現の低下を引き起こすために有用な遺伝子編集複合体および/または分子の開発に関する。したがって、いくつかの側面において、本開示は、細胞においてDUX4遺伝子発現を阻害するための方法を提供し、該方法は、細胞を、組み換え遺伝子編集複合体の有効量と接触させることを含み、ここで、当該遺伝子編集複合体が、当該細胞において、リジン特異的デメチラーゼ、BRDタンパク質、メチルトランスフェラーゼ、または別のクロマチンリモデリングタンパク質の発現の低下を引き起こす。

30

【0020】

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、DUX4とハイブリダイズまたは直接的に結合しない。

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、Casタンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、またはヌクレアーゼ（例えばメガヌクレアーゼ）を含む。

40

【0021】

いくつかの態様において、Casタンパク質は、Cas9タンパク質、Cpf1タンパク質、またはそのバリエーションである。いくつかの態様において、Casタンパク質は、不活性型(dead)Cas9(dCas9)タンパク質、例えば配列番号31において記載される配列を含むdCas9タンパク質などである。

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、転写抑制因子ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、転写抑制因子ドメインは、KRABドメインである。いくつかの態様において、遺伝子編集複合体は、配列番号29において記載される配列を

50

含む。

【0022】

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、ガイドRNA (gRNA)、任意に一本鎖ガイドRNA (sgRNA) をさらに含む。いくつかの態様において、gRNA または sgRNA は、リジン特異的デメチラーゼ、BRDタンパク質、メチルトランスフェラーゼ、またはクロマチンリモデリングに關与するタンパク質をコードする遺伝子に特異的にハイブリダイズする。いくつかの態様において、リジン特異的デメチラーゼは、KDM4Cである。いくつかの態様において、BRDタンパク質は、BRD2である。いくつかの態様において、BRDタンパク質は、BAZ1Aである。いくつかの態様において、クロマチンリモデリングタンパク質は、SMARCA5である。いくつかの態様において、メチルトランスフェラーゼは、ASH1Lである。

10

【0023】

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、例えばレンチウイルスベクターまたは組み換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターなどのウイルスベクターにより、細胞に送達される。

いくつかの態様において、細胞は、筋細胞、任意に最終分化した筋細胞である。

【0024】

いくつかの側面において、本開示は、(i) 組み換え遺伝子編集タンパク質；および、(ii) リジン特異的デメチラーゼ、BRDタンパク質、メチルトランスフェラーゼ、またはクロマチンリモデリングに關与するタンパク質に特異的にハイブリダイズするガイドRNA (gRNA) を含む組み換え遺伝子編集複合体を含む組成物を提供し、ここで、細胞における標的遺伝子へのガイド鎖の結合は、細胞におけるDUX4遺伝子発現の阻害をもたらす。

20

いくつかの側面において、本開示は、本明細書において記載されるような組み換え遺伝子編集複合体を含む組成物を提供する。いくつかの態様において、組成物は、本開示により記載されるような遺伝子編集複合体をコードするウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクターまたはrAAVベクター）を含む。いくつかの態様において、組成物は、薬学的に受入可能な賦形剤をさらに含む。

【0025】

いくつかの側面において、本開示は、それを必要とする対象において顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) を処置するための方法を提供し、該方法は、本開示により記載されるような治療組み換え遺伝子編集複合体の有効量または本開示により記載されるような組成物を、対象に投与することを含む。

30

いくつかの態様において、対象は、哺乳動物、任意にヒトである。

【0026】

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、注射、任意に筋肉内注射または静脈内注射により、対象に投与される。

いくつかの態様において、組み換え遺伝子編集複合体は、対象の筋細胞、任意に対象の最終分化した筋細胞、筋幹細胞、筋サテライト細胞、または筋芽細胞に投与される。

【図面の簡単な説明】

40

【0027】

【図1】図1は、Dux4 (DUX4-fl)、他の筋原性因子 (ミオゲニン、MyoD、MyHC)、FSHD領域遺伝子1 (FRG1)、ユートロフィン (UTRN)、および18Sの発現に対する、プロモドメイン含有タンパク質 (BRD) ファミリーメンバーBRD2、BRD3、BRD4、およびBRDTのshRNAノックダウンの効果を示す。各々のBRD遺伝子を、2つの異なるレンチウイルスにより発現されるshRNAによりノックダウンした。

【0028】

【図2】図2は、メチラーゼファミリーメンバーコアクチベーター結合型アルギニンメチルトランスフェラーゼ1 (CARM1) およびリジンメチルトランスフェラーゼ2A (K

50

MT2A)、およびリジンデメチラーゼ4A(KDM4A)、リジンデメチラーゼ4B(KDM4B)、リジンデメチラーゼ4C(KDM4C)、およびリジンデメチラーゼ4D(KDM4D)の、Dux4(DUX4-fl)、他の筋原性因子(ミオゲニン、MyoD、MyHC)、FSHD領域遺伝子1(FRG1)、ユートロフィン(UTRN)、および18Sの発現に対する、shRNAノックダウンの効果を示す。各々の遺伝子を、2つの異なるレンチウイルスにより発現されるshRNAによりノックダウンした。

【0029】

【図3】図3は、Dux4(DUX4-fl)、他の筋原性因子(ミオゲニン、MyoD、MyHC)、FSHD領域遺伝子1(FRG1)、ユートロフィン(UTRN)、および18Sの発現に対する、ジンクフィンガードメイン隣接プロモドメイン(Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain)1B(BAZ1B)、ジンクフィンガードメイン隣接プロモドメイン1A(BAZ1A)、ジンクフィンガードメイン隣接プロモドメイン2A(BAZ2A)、SWI/SNF関連マトリックス結合型アクチン依存性クロマチン制御因子(SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin)サブファミリーBメンバー1(SMARCB1)、SWI/SNF関連マトリックス結合型アクチン依存性クロマチン制御因子サブファミリーAメンバー5(SMARCA5)、BRCA1関連タンパク質1(BAP1)、およびASH1様タンパク質(ASH1L)のshRNAノックダウンの効果を示す。各々の遺伝子を、2つの異なるレンチウイルスにより発現されるshRNAによりノックダウンした。

10

【0030】

【図4A-B】図4A~4Eは、候補標的遺伝子のshRNAノックダウンを示す。図4Aは、3つの異なるshRNAを用いたASH1Lのノックダウンを示す。図4Bは、2つの異なるshRNAを用いたBRD2のノックダウンを示す。

20

【図4C-D】図4A~4Eは、候補標的遺伝子のshRNAノックダウンを示す。図4Cは、3つの異なるshRNAを用いたKDM4Cのノックダウンを示す。図4Dは、2つの異なるshRNAを用いたSMARCA5のノックダウンを示す。

【図4E】図4A~4Eは、候補標的遺伝子のshRNAノックダウンを示す。図4Eは、2つの異なるshRNAを用いたBAZ1Aのノックダウンを示す。

【0031】

【図5】図5は、CRISPR/dCas9/KRAB転写修飾の図による説明を示す。

30

【0032】

【図6】図6は、17Abic細胞におけるKDM4CのレンチウイルスベースのdCas9-KRABノックダウンについての代表的なデータを示す。KDM4C、DUX4-fl(D4-fl)、FRG1、MyoG、MyHC、18SおよびMyoDの相対的遺伝子発現を示す。2つの異なるガイドRNA(gRNA)を用いた実験からのデータを示す。

【0033】

【図7】図7は、17Abic細胞におけるASH1LのレンチウイルスベースのdCas9-KRABノックダウンについての代表的なデータを示す。ASH1L、DUX4-fl(D4-fl)、FRG1、MyoG、MyHC、18SおよびMyoDの相対的遺伝子発現を示す。シングルガイドRNA(gRNA)を用いた実験からのデータを示す。

40

【0034】

【図8】図8は、17Abic細胞におけるSMARCA5のレンチウイルスベースのdCas9-KRABノックダウンについての代表的なデータを示す。SMARCA5、DUX4-fl(D4-fl)、FRG1、MyoG、MyHC、18SおよびMyoDの相対的遺伝子発現を示す。2つの異なるガイドRNA(gRNA)を用いた実験からのデータを示す。

【0035】

【図9】図9は、17Abic細胞におけるBAZ1AのレンチウイルスベースのdCas9-KRABノックダウンについての代表的なデータを示す。BAZ1A、DUX4-

50

f l (D 4 - f l)、F R G 1、M y o G、M y H C、1 8 S および M y o D の相対的遺伝子発現を示す。2 つの異なるガイドRNA (g R N A) を用いた実験からのデータを示す。

【 0 0 3 6 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、1 7 A B i c 細胞における B R D 2 のレンチウイルススペースの d C a s 9 - K R A B ノックダウンについての代表的なデータを示す。B R D 2、D U X 4 - f l (D 4 - f l)、F R G 1、M y o G、M y H C、1 8 S および M y o D の相対的遺伝子発現を示す。シングルガイドRNA (g R N A) を用いた実験からのデータを示す。

【 0 0 3 7 】

【 図 1 1 A - B 】 図 1 1 A ~ 1 1 F は、エピジェネティックな制御因子の s h R N A ノックダウンが、F S H D 筋細胞において D U X 4 - f l の発現を低下させることを示す。分化した F S H D 筋細胞に、2 回の連続したラウンドにおいて、A S H 1 L (図 1 1 A)、B A Z 1 A (図 1 1 B)、B R D 2 (図 1 1 C)、K D M 4 C (図 1 1 D)、S M A R C A 5 (図 1 1 E)、またはスクランブル (scramble) した対照に対する s h R N A を感染させた。4 日後、q R T - P C R による全長 D U X 4 アイソフォーム (D U X 4 - f l)、ミオゲニン (M y o g)、M y o D、ミオシン重鎖 1 (M y H C)、F R G 1、ユートロフィン (U t r)、および 1 8 S 遺伝子発現の分析のために、細胞を収集した。図 1 1 F は、A S H 1 L (1 6 1 6 9)、B R D 2 (6 3 0 8)、K D M 4 C (2 2 0 5 8)、または S M A R C A 5 (1 3 2 1 4) に対する s h R N A が、いくつかの F S H D コホート (0 5 A b i c、1 8 A b i c、および 1 7 A b i c) にわたり D U X 4 - f l 発現を低下させることを示す。全てのパネルにおいて、モックまたは対照感染細胞についての相対的 mRNA 発現を、1 に設定する。データを、技術的複製の平均値 + S D 値としてプロットする。

10

20

【 図 1 1 C - D 】 図 1 1 A ~ 1 1 F は、エピジェネティックな制御因子の s h R N A ノックダウンが、F S H D 筋細胞において D U X 4 - f l の発現を低下させることを示す。分化した F S H D 筋細胞に、2 回の連続したラウンドにおいて、A S H 1 L (図 1 1 A)、B A Z 1 A (図 1 1 B)、B R D 2 (図 1 1 C)、K D M 4 C (図 1 1 D)、S M A R C A 5 (図 1 1 E)、またはスクランブル (scramble) した対照に対する s h R N A を感染させた。4 日後、q R T - P C R による全長 D U X 4 アイソフォーム (D U X 4 - f l)、ミオゲニン (M y o g)、M y o D、ミオシン重鎖 1 (M y H C)、F R G 1、ユートロフィン (U t r)、および 1 8 S 遺伝子発現の分析のために、細胞を収集した。図 1 1 F は、A S H 1 L (1 6 1 6 9)、B R D 2 (6 3 0 8)、K D M 4 C (2 2 0 5 8)、または S M A R C A 5 (1 3 2 1 4) に対する s h R N A が、いくつかの F S H D コホート (0 5 A b i c、1 8 A b i c、および 1 7 A b i c) にわたり D U X 4 - f l 発現を低下させることを示す。全てのパネルにおいて、モックまたは対照感染細胞についての相対的 mRNA 発現を、1 に設定する。データを、技術的複製の平均値 + S D 値としてプロットする。

30

【 図 1 1 E - F 】 図 1 1 A ~ 1 1 F は、エピジェネティックな制御因子の s h R N A ノックダウンが、F S H D 筋細胞において D U X 4 - f l の発現を低下させることを示す。分化した F S H D 筋細胞に、2 回の連続したラウンドにおいて、A S H 1 L (図 1 1 A)、B A Z 1 A (図 1 1 B)、B R D 2 (図 1 1 C)、K D M 4 C (図 1 1 D)、S M A R C A 5 (図 1 1 E)、またはスクランブル (scramble) した対照に対する s h R N A を感染させた。4 日後、q R T - P C R による全長 D U X 4 アイソフォーム (D U X 4 - f l)、ミオゲニン (M y o g)、M y o D、ミオシン重鎖 1 (M y H C)、F R G 1、ユートロフィン (U t r)、および 1 8 S 遺伝子発現の分析のために、細胞を収集した。図 1 1 F は、A S H 1 L (1 6 1 6 9)、B R D 2 (6 3 0 8)、K D M 4 C (2 2 0 5 8)、または S M A R C A 5 (1 3 2 1 4) に対する s h R N A が、いくつかの F S H D コホート (0 5 A b i c、1 8 A b i c、および 1 7 A b i c) にわたり D U X 4 - f l 発現を低下させることを示す。全てのパネルにおいて、モックまたは対照感染細胞についての相対的 mRNA 発現を、1 に設定する。データを、技術的複製の平均値 + S D 値としてプロ

40

50

ットする。

【0038】

【図12A - B】図12A ~ 12Dは、dCas9 - KRABによるエピジェネティックな制御因子の転写抑制が、FSHD筋細胞においてDUX4 - flの発現を低下させることを示す。分化したFSHD筋細胞を、dCas9 - KRABまたはBAZ1A (図12A)、BRD2 (図12B)、KDM4C (図12C) もしくはSMARCA5 (図12D)を標的とする個々のsgRNA (各々の標的遺伝子について、g1 - 2)のいずれかを発現するレンチウイルス上清の組み合わせによる、4回の連続的な共感染に供した。qRT - PCRによる遺伝子発現の分析のために、約72時間後に細胞を収集した (図11A ~ 11Fにおけるものと同様に)。データを、3回の独立した実験の平均値 + SD値としてプロットし、dCas9 - KRABのみを感染させた細胞についての相対的mRNA発現を、1に設定する。

10

【図12C - D】図12A ~ 12Dは、dCas9 - KRABによるエピジェネティックな制御因子の転写抑制が、FSHD筋細胞においてDUX4 - flの発現を低下させることを示す。分化したFSHD筋細胞を、dCas9 - KRABまたはBAZ1A (図12A)、BRD2 (図12B)、KDM4C (図12C) もしくはSMARCA5 (図12D)を標的とする個々のsgRNA (各々の標的遺伝子について、g1 - 2)のいずれかを発現するレンチウイルス上清の組み合わせによる、4回の連続的な共感染に供した。qRT - PCRによる遺伝子発現の分析のために、約72時間後に細胞を収集した (図11A ~ 11Fにおけるものと同様に)。データを、3回の独立した実験の平均値 + SD値としてプロットし、dCas9 - KRABのみを感染させた細胞についての相対的mRNA発現を、1に設定する。

20

【0039】

【図13A - B】図13A ~ 13Dは、候補制御因子のノックダウンが、D4Z4マクロサテライトにおいてクロマチン抑制を増大させることを示す。分化したFSHD筋細胞に、2回の連続したラウンドにおいて、ASH1L (図13A)、BRD2 (図13B)、KDM4C (図13C)、SMARCA5 (図13D)、GFP対照、またはスクランブルした対照に対するshRNAを感染させた。4日後、細胞をChIP分析のために収集した。H3K9me3またはH3に対して特異的な抗体を用いて、クロマチンを免疫沈降させ、染色体4のD4Z4アレイ (4-spec D4Z4)、ミオゲニンプロモーター (Myog prom)、D4Z4に近い領域 (5' flank)、および染色体4上の4pアレイに対するプライマーを用いたqPCRにより分析した。データを、H3K9me3による標的領域のエンリッチメントの倍率として提示し、GFP shRNA感染細胞についてのエンリッチメントを、1に設定する。データを、2回の独立した実験の平均値 + SD値としてプロットする。

30

【図13C - D】図13A ~ 13Dは、候補制御因子のノックダウンが、D4Z4マクロサテライトにおいてクロマチン抑制を増大させることを示す。分化したFSHD筋細胞に、2回の連続したラウンドにおいて、ASH1L (図13A)、BRD2 (図13B)、KDM4C (図13C)、SMARCA5 (図13D)、GFP対照、またはスクランブルした対照に対するshRNAを感染させた。4日後、細胞をChIP分析のために収集した。H3K9me3またはH3に対して特異的な抗体を用いて、クロマチンを免疫沈降させ、染色体4のD4Z4アレイ (4-spec D4Z4)、ミオゲニンプロモーター (Myog prom)、D4Z4に近い領域 (5' flank)、および染色体4上の4pアレイに対するプライマーを用いたqPCRにより分析した。データを、H3K9me3による標的領域のエンリッチメントの倍率として提示し、GFP shRNA感染細胞についてのエンリッチメントを、1に設定する。データを、2回の独立した実験の平均値 + SD値としてプロットする。

40

【0040】

【図14A - B】図14A ~ 14Dは、候補制御因子のノックダウンが、D4Z4マクロサテライトにおいてクロマチン抑制を増大させることを示す。分化したFSHD筋細胞に

50

、2回の連続したラウンドにおいて、BRD2 (図14A)、ASH1L (図14B)、SMARCA5 (図14C)、KDM4C (図14D)、GFP対照、またはスクランブルした対照に対するshRNAを感染させた。4日後、細胞をChIP分析のために収集した。H3K36me3に対して特異的な抗体を用いて、クロマチンを免疫沈降させ、染色体4のD4Z4アレイ(4-spec D4Z4)、ミオゲニンプロモーター(Myog prom)、D4Z4に近い領域(5' flank)、および染色体4上の4pアレイに対するプライマーを用いたqPCRにより分析した。データを、-ヒストンH3に対して正規化したH3K9me3による標的領域のエンリッチメントの倍率として提示し、GFP shRNA感染細胞についてのエンリッチメントを、1に設定する。

【図14C-D】図14A~14Dは、候補制御因子のノックダウンが、D4Z4マクロサテライトにおいてクロマチン抑制を増大させることを示す。分化したFSDH筋細胞に、2回の連続したラウンドにおいて、BRD2 (図14A)、ASH1L (図14B)、SMARCA5 (図14C)、KDM4C (図14D)、GFP対照、またはスクランブルした対照に対するshRNAを感染させた。4日後、細胞をChIP分析のために収集した。H3K36me3に対して特異的な抗体を用いて、クロマチンを免疫沈降させ、染色体4のD4Z4アレイ(4-spec D4Z4)、ミオゲニンプロモーター(Myog prom)、D4Z4に近い領域(5' flank)、および染色体4上の4pアレイに対するプライマーを用いたqPCRにより分析した。データを、-ヒストンH3に対して正規化したH3K9me3による標的領域のエンリッチメントの倍率として提示し、GFP shRNA感染細胞についてのエンリッチメントを、1に設定する。

【0041】

【図15】図15は、FSDH1罹患(A)およびFSDH無症候(B)患者から単離された初代筋芽細胞の、小分子のみ、または、D4Z4のエピジェネティック状態に影響を及ぼす組み合わせによる処置が、DUX4発現に影響を及ぼすことを示す。

【0042】

【図16】図16は、DUX4のJQ1制御が、間接的であり、いくつかの重要な筋原性制御遺伝子であるミオゲニン(Myog)、myoD、ミオシン重鎖(MyHC)、およびミオスタチン(Myost)の発現を阻害することにより達成されることを示す。

【0043】

【図17】図17は、FSDHおよび健康なヒト骨格筋筋芽細胞(HSMM)の両方において、筋原性遺伝子であるミオゲニン(Myog)、myoD、ミオシン重鎖(MyHC)が、JQ1により誤制御されることを示す。

【0044】

【図18】図18は、DUX-4アンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下または不在下における、FSDHの骨格筋の筋管におけるZSCAN4発現についての代表的なデータを示す。DUX-4およびZSCAN4の相対的遺伝子発現を示す。

【0045】

【図19】図19は、SMARCA5およびKDM4Cのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下または不在下における、FSDHの骨格筋の筋管におけるZSCAN4発現についての代表的なデータを示す。SMARCA5、KDM4CおよびZSCAN4の相対的遺伝子発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

詳細な説明

いくつかの側面において、本開示は、DUX4の異常な発現に関連する疾患(例えば、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、FSDH)の処置のために有用な方法および組成物に関する。本開示は、部分的に、特定のエピジェネティックな修飾因子(例えば、KDM4C、ASH1L、SMARCA5、BAZ1A、BRD2などの阻害剤)を用いてDUX4遺伝子発現を抑制することにより、FSDHに関連する病原性のmRNAアイソフォームであるDUX4-f1タンパク質の産生の低下がもたらされるという、驚くべき発見に

10

20

30

40

50

基づく。いくつかの態様において、本開示により記載される方法および組成物は、例えば、RNA干渉（RNAi）媒介型ロックダウン、遺伝子編集分子媒介型ロックダウン、または小分子阻害剤を通して、DUX4の特定の制御因子（例えば、クロマチンモディファイアー）を標的とすることにより、DUX4遺伝子発現を阻害する。いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、対象においてZSCAN4遺伝子発現を低下させる。

【0047】

本開示の側面は、部分的に、DUX4遺伝子発現の特定の阻害剤（例えば、特定の間接的阻害剤）（例えば、JQ1、またはJQ1のアナログ）が、例えば筋分化の動力学を改変することにより、および/またはミオゲニン（Myog）、MyoD、ミオシン重鎖（MyHC）、およびミオスタチン（Myost）などの筋原性制御因子の異常な発現を引き起こすことにより、筋形成または細胞の筋分化を阻害するという発見に基づく。したがって、いくつかの態様において、本開示により記載されるようなDUX4発現のエピジェネティックな修飾因子は、筋原性制御遺伝子（例えば、Myog、MyoD、MyHC、Myostなど）を阻害しない。いくつかの態様において、DUX4遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子は、JQ1、またはJQ1のアナログではない。

10

【0048】

したがって、いくつかの側面において、本開示は、それを必要とする対象において顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）を処置するための方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、対象にDUX4遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子の治療有効量を投与することを含み、ここで、エピジェネティックな修飾因子は、対象の筋細胞においてDUX4発現を低下させる。

20

【0049】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）

本明細書において用いられる場合、用語「顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー」または「FSHD」とは、骨格筋の量および/または機能の進行的喪失を伴う筋ジストロフィーを指し、ここで、顔面、肩甲（shoulder blades）および上腕の筋肉は、最も影響を受けるものである。FSHDは、DUX4の異常な発現を伴う。ある態様において、FSHDは、DUX4遺伝子の転写活性化からもたらされる。いくつかの態様において、DUX4遺伝子の活性化は、DUX4遺伝子の機能（例えば、病原性DUX4-f1の産生）の有害な獲得をもたらす、進行性の骨格筋脱力（例えば、顔面筋脱力、肩の脱力など）、聴覚の喪失、異常な心臓のリズム、二頭筋、三頭筋、三角筋および前腕の筋肉の不均衡な衰弱、腹筋および/または下肢の筋肉の強度の喪失、下垂足を含む広範な症状を引き起こす。いくつかの態様において、FSHDにより、対象は換気補助を必要とするようになるか、または車いすにより制限されるようになる。

30

【0050】

一般に、FSHDは、ヒトゲノムの染色体4上のサブテロメア領域4q35におけるD4Z4反復配列の短縮に関連する。一般に、FSHDを有さない対象の染色体4は、11~150個の反復単位を有するD4Z4反復領域を含み、これは、選択的にスプライシングされた3'が短縮されたDUX4トランスクリプト（DUX4-s）の産生をもたらす。いくつかの態様において、短縮したD4Z4反復配列（例えば、11個以下の反復単位）を有する対象のDUX4遺伝子は、反復配列により媒介される抑制の喪失に起因して転写的に活性化され、これは、病原性の全長DUX4（DUX4-f1）のmRNAおよびタンパク質の産生をもたらす。

40

【0051】

いくつかの側面において、本発明は、特定のDUX4のクロマチンモディファイアー（例えば、KDM4C、ASH1L、SMARCA5、BAZ1A、BRD2など）の阻害が、対象において（例えば、対象の細胞において）DUX4（例えばDUX4-f1）発現を低下させるという発見に関する。本明細書において用いられる場合、用語「低下したDUX4発現」とは、適切な対照と比較した、対象の細胞におけるDUX4のmRNAお

50

よび/またはタンパク質のレベルの低下を指す。いくつかの態様において、低下したDUX4発現は、転写的に活性な(例えば、発現されたかまたは転写された)状態から、転写活性が低下した状態、例えば転写的に不活性な(例えばサイレンシングされた)状態への、DUX4遺伝子の状態の変化に関連する。例えば、いくつかの態様において、転写的に活性な(例えば発現された)DUX4遺伝子を有する対象(例えば対象における細胞)は、DUX4-f1を産生する;例えばDUX4のクロマチンモディファイアーの阻害剤の投与による、対象(例えば、対象における細胞)におけるDUX4発現のノックダウン(例えばサイレンシング)は、対象において低下した(または阻害された)DUX4-f1の発現および産生をもたらす。

【0052】

いくつかの態様において、DUX4発現の低下は、DUX4のクロマチンモディファイアーの阻害剤による処置の前の試料中のDUX4(例えば、DUX4-f1)の発現レベルと比較した、DUX4のクロマチンモディファイアーの阻害剤による処置の後の試料(例えば、細胞または対象)中のDUX4の発現レベルとして測定することができる。一般に、DUX4(例えばDUX4-f1)の発現レベルは、当該分野において公知の任意の好適な方法により、例えば、ハイブリダイゼーションベースのアッセイ(例えば、RT-PCR、qRT-PCR、ノーザンブロット)、タンパク質ベースの方法(例えば、ウェスタンブロット)、分光学的な方法(例えば、質量分析)、および細胞ベースの方法(例えば、フローサイトメトリー、蛍光励起セルソーティング(FACS))により、測定することができる。

【0053】

DUX4のエピジェネティックな修飾因子

本明細書において用いられる場合、用語「エピジェネティックな修飾因子」とは、例えば、その遺伝子のクロマチンの状態に影響を及ぼすこと(例えば、転写を阻害する凝縮したクロマチン状態または転写を増強する弛緩したクロマチン状態を促進すること)により、遺伝子(例えばDUX4)の転写活性を改変する剤を指す。いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、細胞、例えば筋細胞に送達された場合に、活性なDUX4遺伝子に接触して、細胞におけるDUX4の転写を低下させる剤である。いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、DUX4遺伝子発現を直接的に修飾する。いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、DUX4遺伝子発現を間接的に修飾する(例えば、DUX4遺伝子座またはD4Z4反復配列アレイに直接的には結合しないか、またはDUX4遺伝子発現の直接的なクロマチンモディファイアーの発現または活性を制御する)。例えば、いくつかの態様において、エピジェネティックな修飾因子は、DUX4遺伝子発現の正の制御因子(例えば、DUX4遺伝子座におけるオープンなクロマチン状態を促進するクロマチンモディファイアー)を標的とするRNAi分子または小分子阻害剤であり、それにより、負のDUX4遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子として機能する。

【0054】

本開示の側面は、例えばRNAiまたは小分子阻害剤を用いてDUX4遺伝子発現の特定の制御因子(例えば、KDM4C、BRD2、BAZ1A、ASH1L、SMARCA5などのクロマチンモディファイアー)を阻害することは、DUX4遺伝子発現の阻害をもたらす、したがって、異常なDUX4発現により特徴づけられる疾患または状態(例えばF5HD)の処置のために有用であり得るという発見に関する。

【0055】

細胞のクロマチンの状態(例えば、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質によるDNAのパッケージング)は、遺伝子発現に対して顕著な影響を有する。いくつかの態様において、本開示は、ノックダウンされた場合に細胞(例えば、最終分化した筋細胞などの筋細胞)においてDUX4遺伝子の発現を低下させるクロマチンモディファイアー(例えば、クロマチンリモデリングタンパク質およびこれをコードする遺伝子)に関する。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、クロマチンモディファイ

10

20

30

40

50

アーを標的とする。本明細書において用いられる場合、用語「クロマチンモディファイアー」とは、DNAを修飾する（例えば、メチル化により）かまたはヒストンタンパク質を転写後に修飾して（例えばリン酸化、アセチル化、メチル化、またはユビキチン化により）、クロマチン構造の改変をもたらす、それにより遺伝子発現の修飾をもたらす剤（例えば、酵素または転写因子）を指す。クロマチンモディファイアーの例として、これらに限定されないが、ヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ酵素）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、特定のプロモドメイン含有タンパク質、キナーゼ（例えば、ヒストンをリン酸化するキナーゼ）、およびアクチン依存性のクロマチンの制御因子が挙げられる。いくつかの態様において、クロマチン構造リモデリング複合体（RSC）中に1つ以上のクロマチンリモデリングタンパク質が存在する。したがって、いくつかの態様において、DUX4のクロマチンモディファイアーは、RSCの構成成分（例えば、その中に存在するタンパク質）である。

10

【0056】

本明細書において用いられる場合、用語「ヒストンデメチラーゼ」とは、ヒストンタンパク質からのメチル基の除去を触媒する酵素を指す。いくつかの態様において、ヒストンデメチラーゼ酵素は、以下のドメインのうちの1つ以上を含む：Swi3、RscおよびMoira（SWIRM1）ドメイン、十文字NまたはC末端（JmjNまたはJmjC）ドメイン、PHDフィンガードメイン、ジンクフィンガードメイン、アミノオキシダーゼドメイン、およびTudorドメイン。例えば、いくつかの態様において、ヒストンデアセチラーゼは、少なくとも1つのTudorドメインおよび2つのJmjドメイン（例えば、1つのJmjNドメインおよび1つのJmjCドメイン）を含む。いくつかの態様において、ヒストンデメチラーゼは、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである。リジン特異的ヒストンデメチラーゼの非限定的な例として、KDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM4D、KDM6A、KDM6B、およびPHF2が挙げられる。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、ヒストンデメチラーゼ阻害剤である。

20

【0057】

本明細書において用いられる場合、用語「プロモドメイン含有タンパク質」とは、モノアセチル化されたリジン残基を認識するプロモドメインを有するタンパク質を指す。一般に、プロモドメイン含有（BRD）タンパク質は、アセチル化されたヒストンに結合し、いくつかの態様において、クロマチンリモデリングを媒介する。いくつかの態様において、BRDタンパク質は、少なくとも1つのプロモドメイン（例えば、1、2、3、4、5、またはそれより多くのプロモドメイン）および1つの末端外（ET）ドメインを含む。BRDタンパク質の非限定的な例として、BRD2、BRD3、BRD4、BRDT、BRPF1、BRPF3、BPTF、BAZ1A、BAZ1B、およびBAZ2Aが挙げられる。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、BRDタンパク質阻害剤である。

30

【0058】

本明細書において用いられる場合、用語「アクチン依存性のクロマチンの制御因子」とは、タンパク質は、SWI/SNF関連マトリックス結合型アクチン依存性クロマチン制御因子のファミリーのメンバーを指す。一般に、SWI/SNFタンパク質ファミリーのメンバーは、ヘリカーゼドメインおよびATPaseドメインを含み、クロマチン構造を改変することにより特定の遺伝子の転写を制御するように機能する。いくつかの態様において、アクチン依存性のクロマチンの制御因子は、1つ以上のSwi3、Ada2、N-CoR、およびTFIIIB（SANT）ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、1つ以上のアクチン依存性のクロマチンの制御因子は、クロマチンリモデリングおよびスプライシング因子（RSF）複合体中に存在する。アクチン依存性のクロマチンの制御因子の非限定的な例として、SMARCA5、SMARCB1、SMARCA4、SMARCC1、SMARCC2、SMARCD1、SMARCD2、およびSMARCD3が挙げられる。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、

40

50

アクチン依存性のクロマチンの制御因子阻害剤である。

【0059】

本明細書において用いられる場合、用語「ヒストンメチルトランスフェラーゼ」とは、ヒストンタンパク質少なくとも1つのメチル基（例えば、1、2、3、またはそれより多くのメチル基）のリジンおよび/またはアルギニン残基への移動を触媒する酵素を指す。一般に、ヒストンメチルトランスフェラーゼ酵素は、リジン特異的またはアルギニン特異的メチルトランスフェラーゼのいずれかとして特徴づけられる。

【0060】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、リジン特異的メチルトランスフェラーゼの阻害剤である。リジン特異的メチルトランスフェラーゼの2つのファミリー：SETドメイン含有メチルトランスフェラーゼおよび非SETドメイン含有メチルトランスフェラーゼが存在する。リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼの例として、これらに限定されないが、ASH1L、DOT1L、EHMT1、EHMT2、EZH1、EZH2、MLL、MLL2、MLL3、MLL4、MLL5、NSD1、PRDM1、KMT2A、KMT2C、KMT2E、SET、SETBP1、SETD1A、SETD2、SETD3、SETD4、SETD5、SETD6、SETD7、SETD9、SETD1B、SMYD1、SMYD2、SMYD3、SMYD4、SMYD5、SUV39H1、SUV39H2、SUV420H1、およびSUV420H2が挙げられる。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、リジン特異的メチルトランスフェラーゼ阻害剤である。

【0061】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、アルギニン特異的メチルトランスフェラーゼの阻害剤である。アルギニン特異的メチルトランスフェラーゼは、PRMTとも称され、一般に、2つの群に分類される。PRMT1、PRMT3、CARM1、PRMT4およびRmt1/Hmt1を含むPRMTの1つの群は、モノメチルアルギニンおよび不斉性のジメチルアルギニン残基を生成する。JBP1およびPRMT5を含むPRMTの第2の群は、モノメチルまたは不斉性のジメチルアルギニン残基を生成する。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、アルギニン特異的メチルトランスフェラーゼ阻害剤である。

【0062】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、キナーゼ（例えば、セリン-スレオニンキナーゼ、例えばNEK6）、デアセチラーゼ酵素（例えば、ヒストンデアセチラーゼ、例えばHDAC1）、スプライシング因子タンパク質（例えば、スプライシング因子3bタンパク質複合体のメンバー、例えばSF3B1）、ポリメラーゼ（例えば、PARP1、PARP2、PARP3など）、リガーゼ（例えば、UFL1）、ヒドラーゼ（例えば、BAP1）、ペプチダーゼ（例えば、ユビキチン特異的ペプチダーゼ、例えばUSP3、USP7、USP16、USP21、もしくはUSP22）、またはプロテアーゼ（例えば、ヒストンユビキチナーゼ、例えばMYSM1）の阻害剤である。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、前述のタンパク質のうちのいずれか1つの阻害剤（例えば、キナーゼ阻害剤、デアセチラーゼ酵素阻害剤、スプライシング因子タンパク質阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、リガーゼ阻害剤、ヒドラーゼ阻害剤、ペプチダーゼ阻害剤、またはプロテアーゼ阻害剤）である。

【0063】

本発明の側面は、特定のクロマチンモディファイアの阻害が、DUX4遺伝子発現の低下および/またはDUX4タンパク質（例えば、DUX4-f1）タンパク質産生の低下をもたらすという発見に関する。本明細書において用いられる場合、用語「阻害剤」とは、標的分子または遺伝子の活性または発現を低下させる（例えば妨げる）任意の剤（例えば、DUX4のクロマチンモディファイア）を指す。阻害剤は、核酸（例えば、干渉RNA）、ペプチド、タンパク質、ポリペプチド（例えば、抗体）、小分子、または前述のものの任意の組み合わせであってよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

本開示の側面は、部分的に、D U X 4 遺伝子発現の特定の阻害剤（例えば、特定の間接的阻害剤）が、筋形成または細胞の筋分化を阻害し、したがって、F S H D の処置のために好適であり得るといふ発見に基づく。例えば、いくつかの態様において、小分子 J Q 1 は、D U X 4 遺伝子発現のみならず、T R I M 4 3 および Z S C A N 4 の発現をも阻害し、筋分化の動力学を改変する。J Q 1 は、プロモドメインタンパク質の B E T ファミリーの選択的阻害剤である。J Q 1 のアナログはまた、例えば Syeda et al. (2015) Tetrahedron Letters 56(23):3454-3457 により記載されるとおり、当該分野において公知である。したがって、いくつかの態様において、本開示により記載されるような D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子は、筋形成または細胞の筋分化を阻害しない。いくつかの態様において、D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子は、J Q 1 または J Q 1 のアナログではない。

10

【 0 0 6 5 】

特定の間接的 D U X 4 遺伝子発現の阻害剤（例えば、J Q 1）はまた、ミオゲニン（M y o g）、M y o D、ミオシン重鎖（M y H C）、およびミオスタチン（M y o s t）などの筋原性制御因子の異常な発現を引き起こすことが観察されている。したがって、いくつかの態様において、本開示により記載されるような D U X 4 発現のエピジェネティックな修飾因子は、筋原性制御遺伝子（例えば、M y o g、M y o D、M y H C、M y o s t など）を阻害しない。いくつかの態様において、筋原性制御遺伝子の阻害とは、D U X 4 遺伝子発現の阻害剤により処置されていない細胞における遺伝子の発現と比較した、D U X 4 遺伝子発現の阻害剤により処置された細胞における遺伝子の発現の低下である。いくつかの態様において、遺伝子の発現の低下とは、D U X 4 発現の阻害剤により処置されていない細胞における遺伝子の発現よりも、約 1 0 %、約 2 0 %、約 3 0 %、約 4 0 %、約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、または約 9 9 % 少ないことである。

20

【 0 0 6 6 】

いくつかの態様において、D U X 4 遺伝子発現のエピジェネティックな修飾因子は、選択的阻害剤である。本明細書において用いられる場合、「選択的に阻害する」と言われる「選択的阻害剤」または阻害剤とは、特定のクラスの標的分子の活性または発現を、当該クラスの他の分子と比較して、優先的に阻害する阻害剤を指す。いくつかの態様において、特定のクラスの標的分子の選択的阻害剤は、標的分子に対して、当該クラスの 1 つ以上の他のメンバーに対する I C 5 0 よりも、少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍、または少なくとも 5 0 倍低い最大半量阻害濃度（I C 5 0）を有する。

30

選択的阻害剤は、メチルトランスフェラーゼ（例えば、D N A メチルトランスフェラーゼもしくはヒストンメチルトランスフェラーゼ、例えばリジン特異的メチルトランスフェラーゼもしくはアルギニン特異的メチルトランスフェラーゼ）、B R D タンパク質、ヒストンデメチラーゼ、またはアクチン依存性のクロマチンの制御因子（例えば、クロマチン構造リモデリング複合体（R S C）の構成成分）の阻害剤である。

【 0 0 6 7 】

いくつかの態様において、選択的阻害剤は、ヒストンデメチラーゼを選択的に阻害する。いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである K D M 4 C の選択的阻害剤は、K D M 4 C に対して、1 つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍、または少なくとも 5 0 倍低い最大半量阻害濃度（I C 5 0）を有する。

40

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである K D M 4 A の選択的阻害剤は、K D M 4 A に対して、1 つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍、または少なくとも 5 0 倍低い最大半量阻害濃度（I C 5 0）を有する。

50

【 0 0 6 8 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである K D M 4 B の選択的阻害剤は、K D M 4 B に対して、1つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである K D M 4 D の選択的阻害剤は、K D M 4 D に対して、1つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

10

【 0 0 6 9 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである K D M 6 A の選択的阻害剤は、K D M 6 A に対して、1つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである K D M 6 B の選択的阻害剤は、K D M 6 B に対して、1つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

20

【 0 0 7 0 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンデメチラーゼである P H F 2 の選択的阻害剤は、P H F 2 に対して、1つ以上の他のヒストンデメチラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

いくつかの態様において、選択的阻害剤は、ヒストンメチルトランスフェラーゼを選択的に阻害する。いくつかの態様において、アルギニン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである C A R M 1 の選択的阻害剤は、C A R M 1 に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

30

【 0 0 7 1 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである A S H 1 L の選択的阻害剤は、A S H 1 L に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

40

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである D O T 1 L の選択的阻害剤は、D O T 1 L に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度 (I C 5 0) を有する。

【 0 0 7 2 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである K M T 2 A の選択的阻害剤は、K M T 2 A に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する I C 5 0 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍

50

、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである K M T 2 C の選択的阻害剤は、K M T 2 C に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

【 0 0 7 3 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである K M T 2 E の選択的阻害剤は、K M T 2 E に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

10

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである P R M T 1 の選択的阻害剤は、P R M T 1 に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

【 0 0 7 4 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである S E T D 1 A の選択的阻害剤は、S E T D 1 A に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

20

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである S E T D 1 B の選択的阻害剤は、S E T D 1 B に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

【 0 0 7 5 】

いくつかの態様において、リジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼである S M Y D 3 の選択的阻害剤は、S M Y D 3 に対して、1つ以上のリジン特異的ヒストンメチルトランスフェラーゼに対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

30

いくつかの態様において、選択的阻害剤は、B R D タンパク質を選択的に阻害する。いくつかの態様において、B R D 2 の選択的阻害剤は、B R D 2 に対して、1つ以上のB R D タンパク質に対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

【 0 0 7 6 】

いくつかの態様において、B R D 3 の選択的阻害剤は、B R D 3 に対して、1つ以上のB R D タンパク質に対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

40

いくつかの態様において、B R D T の選択的阻害剤は、B R D T に対して、1つ以上のB R D タンパク質に対する IC 50 よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC 50)を有する。

【 0 0 7 7 】

いくつかの態様において、B R P F 1 の選択的阻害剤は、B R P F 1 に対して、1つ以

50

上のBRDタンパク質に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

いくつかの態様において、BRPF3の選択的阻害剤は、BRPF3に対して、1つ以上のBRDタンパク質に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

【0078】

いくつかの態様において、BRPTFの選択的阻害剤は、BRPTFに対して、1つ以上のBRDタンパク質に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

10

いくつかの態様において、BAZ1Aの選択的阻害剤は、BAZ1Aに対して、1つ以上のBRDタンパク質に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

【0079】

いくつかの態様において、BAZ1Bの選択的阻害剤は、BAZ1Bに対して、1つ以上のBRDタンパク質に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

20

いくつかの態様において、BAZ2Aの選択的阻害剤は、BAZ2Aに対して、1つ以上のBRDタンパク質に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

【0080】

いくつかの態様において、選択的阻害剤は、アクチン依存性のクロマチンの制御因子(例えば、SMARCA5、SMARCB1)を選択的に阻害する。いくつかの態様において、SMARCA5の選択的阻害剤は、SMARCA5に対して、1つ以上のアクチン依存性のクロマチンの制御因子に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。いくつかの態様において、SMARCB1の選択的阻害剤は、SMARCB1に対して、1つ以上のアクチン依存性のクロマチンの制御因子に対するIC50よりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍低い最大半量阻害濃度(IC50)を有する。

30

【0081】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子は、干渉RNAである。干渉RNAの例として、これらに限定されないが、二本鎖RNA(dsRNA)、siRNA、shRNA、miRNA、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)が挙げられる。阻害性オリゴヌクレオチドは、遺伝子の発現、転写および/または翻訳を妨害し得る。一般に、阻害性オリゴヌクレオチドは、相補性の領域を介して標的ポリヌクレオチドに結合する。例えば、阻害性オリゴヌクレオチドの標的ポリヌクレオチドへの結合は、RNAi経路により媒介される標的ポリヌクレオチド(dsRNA、siRNA、shRNAなどの場合)の分解を引き起こし得るか、転写の機構(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)を遮断し得る。阻害性オリゴヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。いくつかの態様において、阻害性オリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNAである。いくつかの態様において、阻害性オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNAおよびmiRNAからなる群より選択

40

50

される。いくつかの態様において、阻害性オリゴヌクレオチドは、修飾された核酸である。

【0082】

用語「ヌクレオチドアナログ」または「改変されたヌクレオチド」または「修飾されたヌクレオチド」とは、天然に存在しないリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む、標準的でないヌクレオチドを指す。いくつかの態様において、ヌクレオチドアナログは、ヌクレオチドの特定の化学的特性を改変するが、ヌクレオチドアナログがその意図される機能を行う能力を保持するために、任意の位置において修飾される。誘導体化され得るヌクレオチドの位置の例として、5位、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-プロモウリジン、5-プロピンウリジン、5-プロペニルウリジンなど；6位、例えば、6-(2-アミノ)プロピルウリジン；アデノシンおよび/またはグアノシンについては8位、例えば、8-プロモグアノシン、8-クロログアノシン、8-フルオログアノシンなどが挙げられる。ヌクレオチドアナログはまた、デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザ-アデノシン；O-およびN-修飾された（例えばアルキル化された、例えばN6-メチルアデノシン、または当該分野において他に公知であるように）ヌクレオチド；ならびに他のヘテロ環が修飾されたヌクレオチドアナログ、例えばHerdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 2000 Aug. 10(4):297-310において記載されるものを含む。

10

【0083】

ヌクレオチドアナログはまた、ヌクレオチドの糖部分に対する修飾を含んでもよい。例えば、2'-OH-基を、H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR、またはORから選択される基により置き換えてもよく、ここで、Rは、置換されたまたは未置換のC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールなどである。他の可能な修飾として、米国特許第5,858,988号および同第6,291,438号において記載されるものが挙げられる。しばしばアクセス不能な(inaccessible)RNAとしても言及されるロックド核酸(LNA)は、修飾されたRNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2'-酸素と4'-炭素とを連結する余分の架橋により修飾される。

20

【0084】

ヌクレオチドのリン酸基もまた、リン酸基の酸素のうちの1つ以上を硫黄で置換することにより（例えばホスホロチオエート）、または、例えば、Eckstein, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000 Apr. 10(2):117-21、Rusckowski et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000 Oct. 10(5):333-45、Stein, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2001 Oct. 11(5):317-25、Vorobjev et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2001 Apr. 11(2):77-85、および米国特許第5,684,143号において記載されるような、ヌクレオチドがその意図される機能を行うことを可能にする他の置換を行うことにより、修飾される。上で言及される修飾のうちの特定のもの（例えばリン酸基修飾）は、好ましくは、例えば前記アナログを含むポリヌクレオチドのin vivoまたはin vitroでの加水分解の速度を低下させる。いくつかの態様において、阻害性オリゴヌクレオチドは、修飾された阻害性オリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、修飾された阻害性オリゴヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)、ホスホロチオエート骨格、および/または2'-OMe修飾を含む。以下の表1は、DUX4発現の修飾因子である干渉RNAの例を提供する。

30

40

【0085】

表1 DUX4発現を修飾するための干渉RNAの例

【表 1】

遺伝子	shRNA配列	標的遺伝子	配列番号
KDM4C	(PJ73) CCGGGCTCTGACATGCGATTTGAACTCGAGTT CAAATCGCATGTCAGAGGCTTTTT	NC_000009.12	1
	(PJ74) CCGGGCAGAGAGTAATGGTGTGTTACTCGAGTA ACACACCATTACTCTCTGCTTTTT		2
	(PJ75) CCGGGCCCAAGTCTTGGTATGCTATCTCGAGAT AGCATACCAAGACTTGGGCTTTTT		3
ASH1L	(PJ1) CCGGCGACATAAACTTGACATCTTCTCGAGAA AGATGTCAAGTTTATGTCGTTTTT	NC_000001.11	4
	(PJ2) CCGGCCTGCCAAATACCATAAGAACTCGAGTT TCTTATGGTATTTGGCAGGTTTTT		5
	(PJ3) CCGGCGTACTTTGTTTATCCAGAACTCGAGTTC TGGGATAAACAAAGTACGTTTTT		6
SMARCA5	(PJ195) CCGGGTTCTTTAATTTACGGGCTTCTCTCGAGAAG ACCCGTAAATTAAGAAGCTTTTT	NC_000004.12	7
	(PJ196) CCGGCCGGGCAAATAGATTCGAGTACTCGAGTA CTCGAATCTATTTGCCCGTTTTT		8
BAZ1A	(PJ152) CCGGGCGATGAAGAAGAAGGTCAAACCTCGAGT TTGACCTTCTTCTTCATCGCTTTTTG	NC_000014.9	9
BRD2	(PJ11) CCGGCCCTTTGCTGTGACACTTCTTCTCGAGAAG AAGTGTACAGCAAAGGGTTTTT	NC_000006.12	10
	(PJ12) CCGGGCCCTCTTTACGTGATTCAAACTCGAGTTT GAATCACGTAAAGAGGGCTTTTT		11

10

20

【0086】

遺伝子編集分子

本開示の側面は、いくつかの態様において、遺伝子編集複合体（例えば、遺伝子編集分子）は、DUX4遺伝子発現を阻害するためのエピジェネティックな修飾因子として有用であるという発見に関する。したがって、いくつかの側面において、本開示は、細胞においてDUX4遺伝子発現を阻害するための方法を提供し、該方法は、細胞を、組み換え遺伝子編集複合体の有効量と接触させることを含み、ここで、遺伝子編集複合体が、細胞においてリジン特異的デメチラーゼ、BRDタンパク質、メチルトランスフェラーゼ、またはクロマチンリモデリングタンパク質の発現を阻害する。

【0087】

本明細書において用いられる場合、「遺伝子編集複合体」とは、例えば標的DNAにおいて二本鎖切断(DSB)を引き起こすことにより、ゲノム配列（例えば遺伝子配列）を加えるか、破壊するかまたはこれを変更するために、あるいは、標的DNA配列の転写を阻害する（例えば、CRISPR/Cas系または類似の系の1つ以上の構成成分を用いて）ために設計された、生物学的に活性な分子（例えば、タンパク質、1つ以上のタンパク質、核酸、1つ以上の核酸、または前述のものの任意の組み合わせ）を指す。遺伝子編集複合体の例として、これらに限定されないが、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、改変メガヌクレアーゼの再設計ホーミングエンドヌクレアーゼ(engineered meganuclease re-engineered homing endonuclease)、CRISPR/Cas系、およびメガヌクレアーゼ（例えば、メガヌクレアーゼI-SceI）が挙げられる。いくつかの態様において、遺伝子編集

30

40

50

複合体は、CRISPR/Cas系に関連するタンパク質または分子（例えば構成成分）を含み、これは、限定されないが、Cas9、Cas6、dCas9、Cpf1、CRISPR RNA (crRNA)、トランス活性化crRNA (tracrRNA)、およびこれらのバリエーションを含む。

【0088】

本明細書において用いられる場合、用語「エンドヌクレアーゼ」および「ヌクレアーゼ」とは、ポリヌクレオチド鎖中のホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。ヌクレアーゼは、天然に存在するものであっても、遺伝子操作されたものであってもよい。遺伝子操作されたヌクレアーゼは、ゲノム編集のために特に有用であり、一般に、4つのファミリーに分類される：ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ（例えば、改変メガヌクレアーゼ）およびCRISPR関連タンパク質 (Casヌクレアーゼ)。いくつかの態様において、ヌクレアーゼは、ZFNである。いくつかの態様において、ZFNは、FokI切断ドメインを含む。いくつかの態様において、ZFNは、Cys₂His₂折りたたみ基 (fold group) を含む。いくつかの態様において、ヌクレアーゼは、TALENである。いくつかの態様において、TALENは、FokI切断ドメインを含む。いくつかの態様において、ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼである。メガヌクレアーゼの例として、これらに限定されないが、I-SceI、I-CreI、I-DmoI、およびこれらの組み合わせ（例えば、E-DreI、DmoCre）が挙げられる。

【0089】

用語「CRISPR」とは、「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)」を指し、これは、塩基配列の短い反復配列を含むDNA遺伝子座である。CRISPR遺伝子座は、外来遺伝子材料に対する耐性を付与する、原核生物の獲得免疫系の一部を形成する。各々のCRISPR遺伝子座には、ウイルスゲノム材料に由来する「スペーサーDNA」の短いセグメントが隣接する。II型CRISPR系において、スペーサーDNAは、トランス活性化RNA (tracrRNA) にハイブリダイズして、CRISPR-RNA (crRNA) にプロセッシングされ、その後、CRISPR関連ヌクレアーゼ (Casヌクレアーゼ) に結合して、外来DNAを認識して分解する複合体を形成する。ある態様において、ヌクレアーゼは、CRISPR関連ヌクレアーゼ (Casヌクレアーゼ) である。CRISPRヌクレアーゼの例として、これらに限定されないが、Cas9、dCas9、Cas6、Cpf1、およびこれらのバリエーションが挙げられる。いくつかの態様において、ヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの態様において、Cas9は、細菌Streptococcus pyogenes（例えば、SpCas9）またはStaphylococcus aureus（例えば、SaCas9、例えば配列番号28）に由来する。いくつかの態様において、Casタンパク質は、ヌクレアーゼ活性を失うように修飾される（例えば遺伝子操作される）。例えば、不活性型Cas9 (dCas9) タンパク質は、標的遺伝子座に結合するが、前記遺伝子座を切断しない。いくつかの態様において、dCas9タンパク質は、配列番号31において記載される配列を含む。いくつかの態様において、Casタンパク質またはそのバリエーションは、例えばRan et al. (2015) Nature. 520(7546); 186-91において記載されるような、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターなどのウイルスベクターのパッケージング能力を超えない。例えば、いくつかの態様において、Casタンパク質をコードする核酸は、約4.6 kb未満の長さである。

【0090】

本開示の側面は、CRISPR干渉などのCRISPRにより媒介される転写の制御の、DUX4発現の低下（例えばサイレンシング）のための使用に関する。例えば、いくつかの態様において、触媒的に不活性型のCas9タンパク質（例えば、不活性型Cas9、「dCas9」）は、Qi et al. (2013) Cell. 152(5); 1173-1183およびGilbert et al. (2013) Cell. 154(2); 442-451において記載されるように、転写制御因子ドメインに融合（例えば共有結合）して、標的遺伝子（例えば、DUX4遺伝子発現の制御因子、

10

20

30

40

50

例えばKDM4C、ASH1L、BRD2、BAZ1A、SMARCA5などのクロマチンモディファイアー)の発現を修飾する(例えば阻害する)。いくつかの態様において、dCas9は、配列番号31において記載される配列を含む。いかなる特定の理論によっても拘束されることは望まないが、dCas9(または別の触媒的に不活性型のCasタンパク質)は、いくつかの態様においては、標的配列への転写機構(例えば、RNAポリメラーゼ複合体)の結合を立体的に妨害することにより、転写抑制を媒介する。

【0091】

いくつかの態様において、CRISPR Casタンパク質(例えばdCas9)は、転写制御因子ドメインに融合する。本明細書において用いられる場合、「転写制御因子ドメイン」とは、転写活性の改変(例えば、転写活性化または転写抑制)をもたらすクロマチン分子の構造または化学的变化を触媒する、タンパク質ドメインである。いくつかの態様において、転写制御因子ドメインは、転写抑制因子ドメインである。いくつかの態様において、抑制性ドメインは、Kruppel関連ボックスドメイン(KRABドメイン)を含む。KRABドメインの非限定的な例として、KOX1 KRABドメイン、KOX8 KRABドメイン、ZNF43 KRABドメイン、およびZNF184 KRABドメインが挙げられる。いくつかの態様において、KRABドメインは、KOX1 KRABドメインである。いくつかの態様において、遺伝子編集タンパク質は、配列番号29または配列番号30において記載される配列を含む。抑制性ドメインのさらなる非限定的な例として、Chromo Shadow(CS)ドメイン(例えば、HP1のCSドメイン)およびWRPWドメイン(例えば、Hes1のWRPWドメイン)が挙げられる。

【0092】

いくつかの態様において、転写制御因子ドメインは、転写活性化因子ドメインである。いくつかの態様において、転写活性化因子ドメインは、VP16などの単純ヘルペスウイルスの転写活性化ドメイン、またはそのパリアントを含む。一般に、例えばBeerli et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(25); 14628-33により記載されるように、転写因子は、複数の活性化ドメインを含み得る。したがって、いくつかの態様において、転写活性化因子ドメインは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の活性化ドメインを含む。いくつかの態様において、転写活性化因子ドメインは、VP64、VP96、またはVP160である。

【0093】

いくつかの態様において、Casタンパク質は、転写制御因子ドメインに融合せず、ヌクレアーゼ活性(例えばDNA切断)を介して遺伝子発現を修飾する(例えば阻害する)ことができる。一般に、dCas9は、ガイドRNAによりターゲティングされた部位においてDNAを切断し、次いで、不正確かつしばしばターゲティングされた配列を破壊する小さな挿入または欠失(Indel)をもたらす非同源末端結合(NHEJ)により修復されるか、あるいは、特異的な位置におけるゲノム中への変更されたかまたは新たなDNA配列の挿入を可能にする相同組み換えDNA修復(homology directed DNA repair)により修復される。いかなる特定の理論によっても拘束されることは望まないが、Casタンパク質によるDNA切断およびその後の修復は、遺伝子発現に有害に作用(例えば阻害)し得る標的DNA配列中に修飾を導入する。したがって、いくつかの側面において、本開示は、機能的ヌクレアーゼおよびガイドRNAを含む遺伝子編集複合体であって、DUX4遺伝子発現の制御因子(例えば、KDM4C、ASH1L、BAZ1A、BRD2、SMARCA5など)をコードする遺伝子にハイブリダイズするか、および/またはこれと相補的であり、当該因子の発現を阻害することができ、それにより、対象(例えば対象の細胞)においてDUX4の発現を阻害することができるものを指す。

【0094】

ゲノム編集の目的のために、CRISPR系は、tracrRNAおよびcrRNAを、シングルガイドRNA(sgRNA)またはただの(gRNA)中に組み合わせるために修飾されていてもよい。本明細書において用いられる場合、用語「ガイドRNA」、「gRNA」、および「sgRNA」とは、細胞における標的配列に対して相補的であり、

C a sヌクレアーゼと結合し、それにより、C a sヌクレアーゼを標的配列に方向づけるポリヌクレオチド配列を指す。いくつかの態様において、g R N A（例えばs g R N A）は、1 ~ 3 0ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの態様において、g R N A（例えばs g R N A）は、5 ~ 2 5ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの態様において、g R N A（例えばs g R N A）は、1 0 ~ 2 2ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの態様において、g R N A（例えばs g R N A）は、1 4 ~ 2 4ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの態様において、C a sタンパク質およびガイドRNA（例えばs g R N A）は、同じベクターから発現される。いくつかの態様において、C a sタンパク質およびガイドRNA（例えばs g R N A）は、別々のベクター（例えば、2つ以上のベクター）から発現される。いかなる特定の理論によっても拘束されることは望まないが、ガイドRNA（例えば、g R N Aまたはs g R N A）は、標的配列にハイブリダイズして（例えばワトソン・クリック塩基対形成により特異的に結合して）、それにより、C R I S P R / C a sタンパク質を標的配列に方向づける。いくつかの態様において、ガイドRNAは、D U X 4のクロマチンモディファイアをコードする遺伝子（例えば核酸配列）にハイブリダイズする（例えばターゲティングする）。いくつかの態様において、ガイド鎖は、ヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ酵素）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、プロモドメイン含有タンパク質、キナーゼ（例えば、ヒストンタンパク質をリン酸化するキナーゼ）、またはアクチン依存性クロマチン制御因子をコードする遺伝子にハイブリダイズする。

10

【0095】

20

いくつかの態様において、ガイド鎖は、ヒストンデメチラーゼをコードする遺伝子（例えば核酸配列）にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ガイド鎖は、リジン特異的ヒストンデメチラーゼ、例えばK D M 4 A、K D M 4 B、K D M 4 C、K D M 4 D、K D M 6 A、K D M 6 B、またはP H F 2にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ガイド鎖は、配列番号12（

【数1】

CGTTACCGGGGTGGAGCCTCGGAAT

；P A Mを太字とした）または配列番号13（

30

【数2】

CTTGCCCGGAAGCGCTGGCTGGGGT

；P A Mを太字とした）により記載される配列を含む。

【0096】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、B R Dタンパク質、例えばB R D 2、B R D 3、B R D 4、B R D T、B R P F 1、B R P F 3、B P T F、B A Z 1 A、B A Z 1 B、またはB A Z 2 Aをコードする遺伝子（例えば核酸配列）にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ガイド鎖は、配列番号14（

40

【数3】

GCCAAAGCAGGGAAACGGGAGGGGT

；P A Mを太字とした）により記載される配列を含む。いくつかの態様において、ガイド鎖は、配列番号15（

【数4】

ATACAAGTTAAATCGTAATTGGAAT

50

; P A Mを太字とした) または配列番号 1 6 (【数 5】

TTGACTACACGATGGGAAAAGGGAT

; P A Mを太字とした) により記載される配列を含む。

【0097】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、アクチン依存性のクロマチンの制御因子、例えば S M A R C A 5、S M A R C B 1、S M A R C A 4、S M A R C C 1、S M A R C C 2、S M A R C D 1、S M A R C D 2、または S M A R C D 3 をコードする遺伝子 (例えば核酸配列) にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ガイド鎖は、配列番号 1 7 (

【数 6】

AAAACCGTGAGACTTCACTTGGGGT

; P A Mを太字とした) または配列番号 1 8 (

【数 7】

TGTGTCTTCTGTGCCTGACAGGGGT

; P A Mを太字とした) により記載される配列を含む。

【0098】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、リジン特異的メチルトランスフェラーゼ、例えば A S H 1 L、D O T 1 L、E H M T 1、E H M T 2、E Z H 1、E Z H 2、M L L、M L L 2、M L L 3、M L L 4、M L L 5、N S D 1、P R D M 1、K M T 2 A、K M T 2 C、K M T 2 E、S E T、S E T B P 1、S E T D 1 A、S E T D 2、S E T D 3、S E T D 4、S E T D 5、S E T D 6、S E T D 7、S E T D 9、S E T D 1 B、S M Y D 1、S M Y D 2、S M Y D 3、S M Y D 4、S M Y D 5、S U V 3 9 H 1、S U V 3 9 H 2、S U V 4 2 0 H 1、または S U V 4 2 0 H 2 をコードする遺伝子 (例えば核酸配列) にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ガイド鎖は、配列番号 1 9 (

【数 8】

GCCCTCACGCGTACCTTCAACGG

; P A Mを太字とした) により記載される配列を含む。

【0099】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、アルギニン特異的メチルトランスフェラーゼ、例えば P R M T 1、P R M T 3、C A R M 1、P R M T 4、R m t 1 / H m t 1、J B P 1、または P R M T 5 をコードする遺伝子 (例えば核酸配列) にハイブリダイズする。

いくつかの態様において、いくつかの態様において、ガイド鎖は、キナーゼ (例えば、セリン - スレオニンキナーゼ、例えば N E K 6)、デアセチラーゼ酵素 (例えば、ヒストンデアセチラーゼ、例えば H D A C 1)、スプライシング因子タンパク質 (例えば、スプライシング因子 3 b タンパク質複合体のメンバー、例えば S F 3 B 1)、ポリメラーゼ (例えば、P A R P 1、P A R P 2、P A R P 3 など)、リガーゼ (例えば、U F L 1)、ヒドラーゼ (例えば、B A P 1)、ペプチダーゼ (例えば、ユビキチン特異的ペプチダーゼ、例えば U S P 3、U S P 7、U S P 1 6、U S P 2 1、もしくは U S P 2 2)、またはプロテアーゼ (例えば、ヒストンデユビキチナーゼ、例えば M Y S M 1) をコードする遺伝子 (例えば核酸配列) にハイブリダイズする。

10

20

30

40

50

【0100】

処置の方法

いくつかの側面において、本開示は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（F S H D）を有する対象を処置するための方法を提供する。例えば、D U X 4 遺伝子の転写活性化は、対象においてF S H Dをもたらす。本明細書において用いられる場合、「対象」は、「それを必要とする対象」と交換可能であり、これらはいずれも、F S H Dを有する対象、またはかかる障害を発症するリスクが、集団全般と比較して増大している対象を指す。例えば、いくつかの態様において、対象は、染色体4 q 3 5において1 1以下の反復単位を含むD 4 Zアレイを有するが、F S H Dの徴候および症状を示さない。それを必要とする対象は、転写活性D U X 4 遺伝子を有する対象（例えば、D U X 4 - f 1タンパク質を

10

【0101】

本明細書において用いられる場合、用語「処置」、「処置すること」、および「治療」とは、治療的処置および予防的（prophylactic）または防止的（preventative）処置を指す。用語は、さらに、既知の症状、例えばF S H Dに関連する症状を寛解させること、さらなる症状を防止すること、症状の根底にある原因を寛解または防止すること、症状の原因を防止または逆転させることを含む。したがって、用語は、F S H Dを有するか、またはかかる障害を発症する可能性を有する対象に、有益な結果が与えられることを意味する。さらに、用語「処置」は、疾患、疾患の症状、または疾患への素因を、治癒させる（cure）か、治癒させる（heal）か、軽減するか、緩和するか、改変するか、治療するか、寛解させるか、改善するか、またはこれに影響を与えることを目的として、疾患、疾患の症状、または疾患への素因を有し得る対象、または対象から単離された組織もしくは細胞株への、剤（例えば、治療剤または治療用組成物）の適用または投与として定義される。

20

【0102】

治療剤または治療用組成物は、特定の疾患（例えばF S H D）の症状を防止および/または軽減する薬学的に受入可能な形態において、化合物を含んでもよい。例えば、治療用組成物は、F S H Dの症状を防止および/または軽減する医薬組成物であってもよい。本発明の治療用組成物は、任意の好適な形態において提供されるであろうことが、企図される。治療用組成物の形態は、本明細書において記載されるような投与の様式を含む、多数の要因に依存するであろう。治療用組成物は、本明細書において記載されるような他の成分の中で、希釈剤、アジュバントおよび賦形剤を含んでもよい。

30

【0103】

いくつかの側面において、本開示は、細胞において転写活性D U X 4 遺伝子を阻害する（例えばサイレンシングする）ための方法を提供し、該方法は、細胞を、D U X 4のエピジェネティックな修飾因子の有効量と接触させることを含み、ここで、エピジェネティックな修飾因子は、細胞においてD U X 4発現を低下させる。いくつかの態様において、細胞は、in vitroまたはex vivoのものである。

【0104】

本明細書において用いられる場合、「ex vivoで修飾された細胞」とは、対象から取り除かれて、遺伝子的に修飾され（例えば、外来核酸により遺伝子導入または形質導入されたか、または遺伝的に再プログラムされ）、培養されるかまたは増殖させられ（expanded）、および任意に、対象（例えば、同じ対象または異なる対象のいずれか）に戻された細胞（例えば、哺乳動物細胞）を指す。一般に、ex vivoで修飾された細胞は、自家細胞治療または同種細胞治療のために有用である。例えば、細胞を、特定の遺伝子異常に関連する疾患（例えばF S H D）を有する対象から取り除き、遺伝子異常を修正する（例えば、D U X 4の発現を低下させる）遺伝子編集複合体で遺伝子導入し、対象中に再導入する。別の非限定的な例において、細胞を、対象から取り除き、遺伝子的に再プログラムし（例えば、筋細胞に分化させるか、分化転換させ）、増殖させ、対象に再導入する。

40

【0105】

50

D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子の有効量と接触させられる細胞は、転写活性 D U X 4 遺伝子を有する任意の細胞であってよい。例えば、細胞は、筋細胞（例えば、筋芽細胞、最終分化した筋細胞、筋サテライト細胞、または筋幹細胞）であってよい。

転写活性 D U X 4 遺伝子を有する細胞はまた、D U X 4 遺伝子の染色体 4 q 3 5 における D 4 Z 4 反復配列アレイの短縮を含んでもよい。アレイ中の反復単位の数、変化し得る。いくつかの態様において、短縮中の反復単位の数、1 1 以下（例えば、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、1、または 0）個の反復単位である。

【 0 1 0 6 】

医薬組成物

いくつかの側面において、本開示は、D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子を含む、医薬組成物に関する。いくつかの態様において、組成物は、D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子および薬学的に受入可能なキャリアを含む。本明細書において用いられる場合、用語「薬学的に受入可能なキャリア」は、医薬の投与に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含むことを意図する。薬学的に活性な物質のためのかかる媒質および剤の使用は、当該分野において周知である。任意の慣用的な媒質または剤が活性化合物と不適合である場合を除き、組成物におけるそれらの使用が企図される。補足的な活性化合物もまた、組成物中に組み込むことができる。医薬組成物は、以下に記載されるように調製することができる。活性成分は、任意の慣用的な薬学的に受入可能なキャリアまたは賦形剤と混合または配合することができる。組成物は、無菌であってよい。

【 0 1 0 7 】

典型的には、医薬組成物は、剤（例えば、D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子）の有効量を送達するために処方される。一般的に、活性剤の「有効量」とは、所望される生物学的応答（例えば転写抑制、例えば活性な D U X 4 遺伝子のサイレンシングまたは阻害）を引き起こすために十分な量を指す。剤の有効量は、所望される生物学的エンドポイント、化合物の薬物動態学、処置されている疾患（例えば F S H D）、投与の様式、および患者などの要因に依存して、変化し得る。

【 0 1 0 8 】

組成物は、その投与が、レシピエント患者により耐容され得る場合に、「薬学的に受入可能なキャリア」であると言われる。無菌のリン酸緩衝食塩水は、薬学的に受入可能なキャリアの一例である。他の好適なキャリアは、当該分野において周知である。例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、第 1 8 版（1 9 9 0 年）を参照。

【 0 1 0 9 】

当業者は、投与の任意の様式、慣用的に使用され、活性剤に関して不活性なビヒクルまたはキャリアを、本開示の医薬組成物を調製および投与するために利用することができることを、理解するであろう。かかる方法、ビヒクルおよびキャリアの説明は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第 4 版（1 9 7 0 年）において記載されるものであり、この開示は、本明細書において参考として援用される。本開示の原理に触れた当業者は、好適かつ適切なビヒクル、賦形剤およびキャリアを決定することにおいて、または活性成分をそれらと配合して本開示の医薬組成物を形成させることにおいて、何らの困難も経験しないであろう。

【 0 1 1 0 】

化合物（例えば、アンチセンス核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）、遺伝子編集複合体、または小分子 D U X 4 のエピジェネティックな修飾因子）の有効量は、治療有効量としてもまた言及され、細胞において、またはかかる修飾を必要とする個体において、遺伝子の活性化（例えば、転写活性化）または増大した発現に関連する、少なくとも 1 つの有害効果を寛解させるために十分な量である。いくつかの態様において、有効量は、細胞において、または D U X 4 阻害を必要とする個体において、D U X 4 遺伝子を阻害する（例えば転写的に抑制する）ために、十分な量である。医薬組成物中に含まれるべき治療有効量は、各々の場合において、いくつかの要因、例えば、処置されるべき患者の型、サイ

10

20

30

40

50

ズおよび条件、意図される投与の様式、患者が意図される投与形態を取り入れる能力などに依存する。一般に、活性剤の量は、約 0.1 ~ 約 250 mg / kg、および好ましくは約 0.1 ~ 約 100 mg / kg を提供するように、各々の投与形態中に含まれる。当業者は、経験的に適切な治療有効量を決定することができるであろう。

【0111】

本明細書において提供される教示と組み合わせ、多様な活性化合物の中から選択すること、および強度、相対的なバイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の重篤度、および選択される投与の様式などの要因を比較することにより、実質的な毒性を引き起こさず、しかし特定の対象を処置するために完全に有効である有効な予防的または治療的処置レジメンを計画することができる。任意の特定の適用のための有効量は、処置されている疾患もしくは状態、投与されている特定の治療剤、対象のサイズ、または疾患もしくは状態の重篤度などの要因に依存して変化し得る。当業者は、過度の実験を必要とすることなく、特定の核酸および/または他の治療剤の有効量を、経験的に決定することができる。

10

【0112】

いくつかの場合において、本開示の化合物は、コロイド状分散系中で調製される。コロイド状分散系は、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む、脂質ベースの系を含む。いくつかの態様において、本開示のコロイド状の系は、リポソームである。リポソームは、送達ベクターとして *in vivo* または *in vitro* で有用な人工の膜管である。0.2 ~ 4.0 μm の範囲のサイズの大単層小胞 (large unilamellar vesicle: LUV) は、大きな巨大分子を封入することができることが示されている。RNA、DNA および完全なビリオンを、水性の内部に封入して、生物学的に活性な形態において細胞に送達することができる。Fraley et al. (1981) Trends Biochem Sci 6:77。

20

【0113】

リポソームは、リポソームを、モノクローナル抗体、糖、糖脂質またはタンパク質などの特異的リガンドにカップリングさせることにより、特定の組織に対してターゲティングすることができる。リポソームを、例えば平滑筋細胞に対してターゲティングするために有用であり得るリガンドとして、限定されないが、平滑筋細胞に特異的な受容体と相互作用する完全な分子または分子のフラグメント、およびがん細胞の細胞表面マーカーと相互作用する、抗体などの分子が挙げられる。かかるリガンドは、当業者に周知の結合アッセイにより、容易に同定することができる。さらに他の態様において、リポソームは、それを、当該分野において公知の抗体とカップリングすることにより、組織に対してターゲティングすることができる。

30

【0114】

遺伝子導入のための脂質処方物は、QIAGEN から、例えば、EFFECTENE (商標) (非リポソーム性の脂質、および特別な DNA 縮合増強剤) および SUPERFECT (商標) (新規の活性型 dendri-mer 技術) として、市販されている。

リポソームは、Gibco BRL から、例えば、LIPOFECTIN (商標) および LIPOFECTACE (商標) として市販されており、これらは、N - [1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) - プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) などのカチオン性脂質からなる。リポソームを作製するための方法は、当該分野において周知であり、多くの刊行物において記載されている。リポソームはまた、Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241 により概説されている。

40

【0115】

特定の N - [1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) - プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムメチル硫酸塩 (DOTAP) を含む特定のカチオン性脂質は、本開示の DUX4 のエピジェネティックな修飾因子 (例えば、干渉 RNA) と組み合わせる場合に、有利となり得る。

【0116】

50

本開示のいくつかの側面において、圧縮剤の使用もまた、望ましい場合がある。圧縮剤はまた、単独で、または生物学的もしくは化学的/物理的ベクターと組み合わせて使用してもよい。「圧縮剤」とは、本明細書において用いられる場合、ヒストンなどの、核酸に対する負の電荷を中和して、それにより核酸の微細な顆粒への圧縮を可能にする剤を指す。核酸の圧縮は、標的細胞による核酸への取り込みを促進する。圧縮剤は、例えばDUX4のエピジェネティックな修飾因子を、細胞によってより効率的に取り込まれる形態において送達するために単独で、または上記のキャリアのうちの1つ以上と組み合わせて用いることができる。

【0117】

DUX4のエピジェネティックな修飾因子の取り込みを促進するために用いられる他の例示的な組成物として、リン酸カルシウムおよび他の細胞内輸送の化学メディエーター、マイクロインジェクション組成物、エレクトロポレーションおよび相同組み換え組成物（例えば、核酸を、標的細胞の染色体中の予め選択された位置に組み込むためのもの）が挙げられる。

10

【0118】

化合物は、単独で（例えば食塩水または緩衝液中で）、または当該分野において公知の任意の送達ビヒクルを用いて、投与することができる。例えば、以下の送達ビヒクルが記載されている：コクリエート；エマルソーム（Emulsome）；ISCOM；リポソーム；生細菌ベクター（例えば、Salmonella、Escherichia coli、Bacillus Calmette-Guérin、Shigella、Lactobacillus）；生ウイルスベクター（例えば、ワクシニア、アデノウイルス、単純ヘルペス、レンチウイルス）；マイクロスフェア；核酸ワクチン；ポリマー（例えば、カルボキシメチルセルロース、キトサン）；ポリマー環；プロテアソーム；フッ化ナトリウム；トランスジェニック植物；ピロソーム；およびウイルス様粒子。いくつかの態様において、本開示により記載されるDUX4のエピジェネティックな修飾因子は、レンチウイルスベクターにより送達される。

20

【0119】

本開示の処方物は、薬学的に受入可能な溶液中で投与され、これは、慣用的に、薬学的に受入可能な濃度の塩、緩衝化剤、保存剤、適合性のキャリア、アジュバントおよび任意に他の治療成分を含んでもよい。

【0120】

用語薬学的に受入可能なキャリアとは、ヒトまたは他の脊椎動物への投与のために好適な、1つ以上の適合性の固体または液体の充填剤、希釈剤または封入用物質を意味する。キャリアという用語は、適用を容易にするために活性成分を組み合わせる、天然または合成の有機または無機の成分を意味する。医薬組成物の構成成分はまた、本開示の化合物と、互いに、所望される薬学的な効率を実質的に損なう相互作用が存在しない様式において、混合することができる。

30

【0121】

糖衣錠のコアは、好適なコーティングを備える。この目的のために、濃縮された糖溶液を用い、これは、任意に、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含んでもよい。活性化合物の用量の異なる組み合わせの同定のため、またはこれらの特徴づけるために、錠剤または糖衣錠のコーティングに、染料または色素を添加してもよい。

40

【0122】

本明細書において記載される処方物に加えて、化合物はまた、デポー製剤として処方してもよい。かかる長期作用型処方物は、好適なポリマー性または疎水性の材料により（例えば、受入可能な油脂中のエマルジョンとして）、またはイオン交換樹脂により、または難溶性の誘導体として、例えば難溶性の塩として、処方することができる。

医薬組成物はまた、好適な固相またはゲル相のキャリアまたは賦形剤を含んでもよい。かかるキャリアまたは賦形剤の例として、これらに限定されないが、炭酸カルシウム、リ

50

ン酸カルシウム、多様な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーが挙げられる。

【0123】

好適な液体または固体の医薬製剤形態は、例えば、吸入のための水溶液または食塩水溶液、マイクロカプセル化、コクリエート化、顕微鏡用金粒子上に被覆したものの、リポソーム中に含まれるもの、噴霧化したもの、エアロゾル、皮膚中への移植のためのペレット、または皮膚中に引っ掻くための鋭い物体上で乾燥させたものである。医薬組成物はまた、顆粒、粉末、錠剤、コーティングされた錠剤、(マイクロ)カプセル、坐剤、シロップ、エマルジョン、懸濁液、クリーム、滴下剤、または活性化合物の長期放出を有する製剤を含み、これらの製剤中に、賦形剤および添加物および/または助剤、例えば崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨潤剤、潤滑剤、香味剤、甘味剤または可溶化剤は、上記のように習慣的に用いられる。医薬組成物は、多様な薬物送達系における使用のために好適である。薬物送達のための方法の簡単な概説については、本明細書において参考として援用される Langer R (1990) Science 249:1527-1533 を参照。

10

【0124】

化合物は、それ自体(ニート)で、または薬学的に受入可能な塩の形態において投与することができる。医薬において用いられる場合、塩は、薬学的に受入可能であるべきであるが、薬学的に受入不可能な塩もまた、その薬学的に受入可能な塩を調製するために便利に用いることができる。かかる塩として、これらに限定されないが、以下の酸から調製されるものが挙げられる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸。また、かかる塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩、例えばカルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩として、調製することができる。

20

【0125】

好適な緩衝化剤は、酢酸および塩(1~2% w/v)；酢酸および塩(1~3% w/v)；ホウ酸および塩(0.5~2.5% w/v)；ならびにリン酸および塩(0.8~2% w/v)が挙げられる。好適な保存剤として、塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03% w/v)；クロロブタノール(0.3~0.9% w/v)；パラベン(0.01~0.25% w/v)およびチメロサル(0.004~0.02% w/v)が挙げられる。

30

【0126】

組成物は、単位投与形態において、便利に提示することができ、製薬の分野において周知の方法のうちのいずれかにより、調製することができる。全ての方法は、化合物を、1つ以上の補助成分を構成するキャリアと組み合わせるステップを含む。一般的に、組成物は、化合物を、液体のキャリア、微細に分割された固体のキャリア、またはその両方と、均一にかつ緊密に組み合わせて、次いで必要な場合には、製品を成形することにより、調製される。液体の用量の単位は、バイアルまたはアンプルである。固体の用量の単位は、錠剤、カプセルおよび坐剤である。

【0127】

投与の様式

本開示の医薬組成物は、好ましくは、化合物または混合物を、錠剤、カプセルもしくは丸剤として経口で、または非経口で、静脈内で、皮内で、筋肉内で、もしくは皮下で、もしくは経皮で、投与可能にするために好適な、薬学的に受入可能なキャリアまたは賦形剤を含む。

40

【0128】

いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子の治療有効量は、標的組織または標的細胞に送達される。いくつかの態様において、DUX4(例えば、DUX4-f1)は、F5HDを有する対象の筋細胞において発現される。したがって、いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子の有効量は、対象の筋

50

細胞に送達される。いくつかの態様において、筋細胞は、最終分化した筋細胞である。分化した筋細胞の例として、筋細胞および筋管が挙げられる。

【0129】

DUX4のエピジェネティックな修飾因子および/または他の化合物を含む医薬組成物は、医薬を投与するための任意の好適な経路により投与することができる。多様な投与経路が利用可能である。選択される特定の様式は、無論、選択される特定の剤、処置されている特定の状態、および治療効力のために必要とされる投与量に依存するであろう。本開示の方法は、一般的に言って、医学的に受入可能な任意の投与の様式を用いて実施することができ、これは、臨床的に受け入れることができない有害効果を引き起こさない任意の様式を意味する。多様な投与の様式が、本明細書において議論される。治療における使用のために、DUX4のエピジェネティックな修飾因子の有効量および/または他の治療剤は、所望される表面、例えば全身、筋肉内などに剤を送達する任意の様式により、対象に投与することができる。

10

【0130】

本開示の医薬組成物を投与することは、当業者に公知の任意の手段により達成することができる。投与の経路として、これらに限定されないが、経口、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻内、舌下、気管内、吸入、皮下、眼、膺、および直腸が挙げられる。全身経路は、経口および非経口を含む。いくつかの型のデバイスは、吸入による投与のために定期的に用いられる。これらの型のデバイスは、定量噴霧式吸入器(MDI)、吸気感応型MDI、乾燥粉末吸入器(DPI)、MDIと組み合わせたスプレー/保持チャンバー、およびネブライザーを含む。

20

【0131】

経口投与のために、化合物は、活性化合物を、当該分野において周知の薬学的に受入可能なキャリアと組み合わせることにより、容易に処方することができる。かかるキャリアは、本開示の化合物を、処置されるべき対象による経口摂取のために、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方することを可能にする。経口での使用のための医薬製剤は、固体の賦形剤として得ることができ、任意に、必要な場合には好適な助剤を添加した後で、生じた混合物を粉碎し、顆粒の混合物を処理して、錠剤または糖衣錠のコアを得る。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖；トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、馬鈴薯デンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース製剤、および/またはポリビニルピロリドン(PVP)などの充填剤である。所望される場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩(アルギン酸ナトリウムなど)などの崩壊剤を添加してもよい。任意に、経口処方物はまた、内部の酸条件を中和するための食塩水または緩衝液中で処方してもよく、いかなるキャリアも用いずに投与してもよい。

30

【0132】

経口で用いることができる医薬製剤は、ゼラチン製のプッシュ・フィット式カプセル、ならびに軟性のゼラチンおよび可塑化剤(グリセロールまたはソルビトールなど)からできた密封カプセルを含む。プッシュ・フィット式カプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、および/またはたたくもしくはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および任意に安定化剤との混合物中に、活性成分を含んでもよい。軟性のカプセル中で、活性化合物は、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの好適な液体中で溶解または懸濁してもよい。加えて、安定化剤を添加してもよい。経口投与のために処方されたマイクロスフェアもまた、用いることができる。かかるマイクロスフェアは、当該分野においてよく定義されている。経口投与のための全ての処方物は、かかる投与のために好適な投与量であるべきである。

40

【0133】

頬側投与のために、組成物は、慣用的な様式において処方された錠剤またはロゼンジの

50

形態をとってもよい。

吸入による投与のために、本開示による使用のための化合物は、好適な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適な気体を使用する、加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーの体裁の形態において、便利に送達することができる。加圧エアロゾルの場合、投与単位は、計量された量を送達するための値を提供することにより、決定することができる。吸入器または注入器 (insufflator) における使用のための、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含めて処方することができる。

【0134】

化合物は、それらを全身に送達することが望ましい場合、注射による、例えばボーラス注射または持続注入による、非経口投与のために処方してもよい。注射のための処方物は、単位投与形態において、例えば、アンプルにおいて、または複数用量容器において、保存剤を添加して、提示してもよい。組成物は、油性または水性のビヒクル中の、懸濁液、溶液または乳液などの形態をとってもよく、懸濁剤、安定化剤、および/または分散剤などの処方剤を含んでもよい。

【0135】

非経口投与のための医薬処方物は、水溶性の形態における活性化合物の水溶液を含む。したがって、活性化合物の懸濁液は、適切な油性の注射用懸濁液として調製してもよい。好適な親油性の溶媒またはビヒクルとして、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成の脂肪酸エステル、またはリポソームを含む。水性の注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストリンなどの、懸濁液の粘性を増大させる物質を含んでもよい。任意に、懸濁液はまた、化合物の可溶性を増大させて、高濃度の溶液の調製を可能にする、好適な安定化剤を含んでもよい。

【0136】

あるいは、活性化合物は、好適なビヒクル、例えば無菌のピロジェンフリー水により、使用の前に再構成するために、粉末形態であってもよい。

化合物はまた、例えばカカオバターまたは他のトリグリセリドなどの慣用的な坐剤用基剤を含む、坐剤または停留浣腸などの直腸または腔用組成物において処方してもよい。

【0137】

他の送達系は、時間放出、遅延放出または持続放出送達系を含んでもよい。かかる系は、化合物の繰り返し投与を回避することができ、対象および医師に対する利便性を増大することができる。多くの型の放出送達系が利用可能であり、当業者に公知である。それらは、ポリ(ラクチドグリコリド)、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸およびポリ無水物などのポリマーベースの系を含む。薬物を含む前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば、米国特許第5,075,109号において記載される。送達系はまた、非ポリマー系：すなわち、コレステロール、コレステロールエステルなどのステロール、および、モノ、ジおよびトリグリセリドなどの脂肪酸または中性脂肪を含む脂質；ハイドロゲル放出系；サイラスティック系；ペプチドベースの系；ワックスコーティング；慣用的な結合剤および賦形剤を用いて圧縮成形された錠剤；部分的に融合したインプラント；などを含む。具体例として、これらに限定されないが、(a) 本開示の剤がマトリックス内の形態において含まれる浸食性の系、例えば、米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号および同第5,736,152号において記載されるもの、ならびに(b) 活性な構成成分がポリマーから制御された速度において浸透する拡散性の系、例えば、米国特許第3,854,480号、同第5,133,974号および同第5,407,686号において記載されるものが挙げられる。加えて、ポンプベースのハードウェア送達系を用いてもよく、そのうちのいくつかは、移植のために適切である。

【0138】

いくつかの態様において、阻害性オリゴヌクレオチド(例えば干渉RNA)は、阻害剤

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドを発現するように操作された発現ベクターを介して、細胞に送達することができる。発現ベクターは、所望される配列を、制御配列に作動的に連結されてRNAトランスクリプトとして発現されることができるよう、例えば制限酵素切断およびライゲーションにより、挿入することができるものである。発現ベクターは、典型的には、タンパク質のための、または阻害性オリゴヌクレオチドのためのコード配列であるインサート、例えばshRNA、miRNA、またはmiRNAを含む。ベクターは、当該ベクターにより形質転換または遺伝子導入されているか、またはそうされていない細胞の同定における使用のために好適な、1つ以上のマーカー配列をさらに含んでもよい。マーカーとして、例えば、抗生物質または他の化合物に対する耐性または感受性のいずれかを増大または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、その活性が標準的なアッセイまたは蛍光タンパク質などにより検出可能である酵素をコードする遺伝子が挙げられる。

10

【0139】

本明細書において用いられる場合、コード配列（例えば、タンパク質コード配列、miRNA配列、shRNA配列）と制御配列とは、それらが、コード配列の発現または転写を、制御配列の影響または制御下におくように、共有結合により連結される場合に、「作動的に」連結していると言われる。コード配列が、機能的タンパク質に翻訳されることが望ましい場合、2つのDNA配列は、5'制御配列中のプロモーターの誘導が、コード配列の転写をもたらす場合、および、2つのDNA配列の間の連結の性質が、(1)フレームシフト変異の導入をもたらさない、(2)プロモーター領域がコード配列の転写を指揮する能力を妨げない、または(3)対応するRNAトランスクリプトがタンパク質に翻訳される能力を妨げない場合に、作動的に連結していると言われる。したがって、生じたトランスクリプトが所望されるタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得るように、プロモーター領域がそのDNA配列の転写をもたらすことができる場合に、プロモーター領域はコード配列に作動的に連結される。コード配列が、miRNA、shRNAまたはmiRNAをコードし得ることが、理解されるであろう。

20

【0140】

遺伝子発現のために必要とされる制御配列の正確な性質は、種または細胞型の間で変化し得るが、一般的に、必要である場合には、それぞれ転写および翻訳の開始に参与する5'非転写および5'非翻訳配列、例えばTATAボックス、キャップ配列、CAAT配列などを含むべきである。かかる5'非転写制御配列は、作動的に連結された遺伝子の転写の制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含むであろう。制御配列はまた、所望される場合、エンハンサー配列または上流のアクチベーター配列を含んでもよい。本開示のベクターは、任意に、5'リーダーまたはシグナル配列を含んでもよい。

30

【0141】

いくつかの態様において、核酸分子の送達のためのウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスおよび弱毒化ボックスウイルスを含むボックスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス、ならびにTyウイルス様粒子からなる群より選択される。外来核酸を送達するために用いられてきたウイルスおよびウイルス様粒子の例として、以下が挙げられる：複製欠損アデノウイルス、修飾されたレトロウイルス、非複製性レトロウイルス、複製欠損セムリキ森林ウイルス、カナリアボックスウイルスおよび高度に弱毒化されたワクシニアウイルス誘導體、非伴複製ワクシニアウイルス、伴複製ワクシニアウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、レンチウイルスベクターおよびTyウイルス様粒子。

40

【0142】

特定の適用のために有用な別のウイルスは、アデノ随伴ウイルスである。アデノ随伴ウイルスは、広範な細胞型および種に感染することができ、複製欠損になるように操作され得る。それはさらに、熱および脂質溶媒安定性、造血細胞を含む多様な系統の細胞における高い形質導入頻度、および重複感染の阻害の欠失により複数の一連の形質導入を可能にすることなどの利点を有する。アデノ随伴ウイルスは、

50

部位特異的な様式においてヒト細胞DNA中に組み込み、それにより、挿入変異の可能性および挿入遺伝子の発現の変異性を最小化することができる。加えて、野生型アデノ随伴ウイルス感染は、選択圧の不在下における100回を超える継代にわたる組織培養において継続し、このことは、アデノ随伴ウイルスのゲノム組み込みが、比較的安定なイベントであることを意味する。アデノ随伴ウイルスはまた、染色体外での様式においても機能し得る。

【0143】

一般的に、他の有用なウイルスベクターは、必須でない遺伝子が目的の遺伝子で置き換えられている非細胞傷害性の真核生物ウイルスに基づく。非細胞傷害性のウイルスとして、その生活環が、ゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写と、その後の宿主細胞のDNA中へのプロウイルス性組み込みを含む、特定のレトロウイルスが挙げられる。一般的に、レトロウイルスは、複製欠損である（例えば、所望されるトランスクリプトの合成を指揮することはできるが、感染性粒子を産生することはできない）。かかる遺伝子改変されたレトロウイルス発現ベクターは、*in vivo*での遺伝子の高効率での形質移入のために、一般的な有用性を有する。複製欠損レトロウイルスを産生するための標準的なプロトコル（外来遺伝子材料のプラスミド中への組み込み、プラスミドによるパッケージング細胞株の遺伝子導入、パッケージング細胞株による組み換えレトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子の回収、およびウイルス粒子による標的細胞の感染を含む）は、Kriegler, M., 「Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual」、W.H. Freeman Co., New York (1990年) および Murry, E.J. 編、「Methods in Molecular Biology」、第7巻、Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991年) において提供される。いくつかの態様において、DUX4のエピジェネティックな修飾因子（例えば、干渉RNAまたは遺伝子編集複合体）は、レンチウイルスベクターにより、細胞（例えば、対象の細胞）に送達される。

【0144】

本開示の核酸分子を細胞中に導入するために、核酸分子が宿主において*in vitro*で導入されるのか*in vivo*で導入されるのかに依存して、多様な技術を使用することができる。かかる技術として、核酸分子-リン酸カルシウム沈殿物の遺伝子導入、DEAEに関連する核酸分子の遺伝子導入、目的の核酸分子を含む前述のウイルスによる遺伝子導入または感染、リポソーム媒介型遺伝子導入などが挙げられる。他の例として、以下が挙げられる：Sigma-AldrichによるN-TER（商標）ナノ粒子遺伝子導入系、Polyplus Transfectionによる昆虫細胞のためのFectoFly（商標）遺伝子導入試薬、Polysciences, Inc.によるポリエチレンイミン「Max」、Cosmo Bio Co., Ltd.によるユニークな非ウイルス性遺伝子導入ツール、InvitrogenによるLipofectamine（商標）LTX遺伝子導入試薬、StratageneによるSatisFfection（商標）遺伝子導入試薬、InvitrogenによるLipofectamine（商標）遺伝子導入試薬、Roche Applied ScienceによるFuGENE（登録商標）HD遺伝子導入試薬、Polyplus TransfectionによるGMP準拠*in vivo*-jetPEI（商標）遺伝子導入試薬、およびNovagenによるInsect GeneJuice（登録商標）遺伝子導入試薬。

【0145】

スクリーニング方法

いくつかの側面において、本開示は、DUX4のエピジェネティックな修飾因子として機能にする剤を同定する方法に関する。したがって、いくつかの態様において、本開示は、DUX4のエピジェネティックな修飾因子を同定するための方法を提供し、該方法は、DUX4（例えばDUX4-fl）の発現により特徴づけられる細胞を、DUX4の推定のクロマチンモディファイアーの発現または活性を修飾するための候補の剤と接触させること；細胞におけるDUX4の発現レベルを検出すること；ならびに、候補の剤との接触の後でDUX4の発現レベルが対照細胞と比較して低下した場合に、候補の剤を、DUX4のエピジェネティックな修飾因子として同定することを含む。例示的な候補の剤として、これらに限定されないが、小分子、抗体、抗体コンジュゲート、ペプチド、タンパク質、アンチセンス分子（例えば、干渉RNA）または他の核酸が挙げられる。いくつかの態

10

20

30

40

50

様において、本開示により記載される方法は、新たなDUX4のエピジェネティックな修飾因子を同定するために、候補化合物の大きなライブラリー（例えば、化合物ライブラリー）をスクリーニングするために有用である。いくつかの態様において、化合物ライブラリーは、特定の標的核酸（例えば核酸配列）または特定のタンパク質標的、例えばヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ酵素）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、プロモドメイン含有タンパク質、キナーゼ（例えば、ヒストンタンパク質をリン酸化するキナーゼ）、またはアクチン依存性のクロマチンの制御因子に対して特異的な、候補の剤からなる。いくつかの態様において、候補の剤は、ヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ酵素）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、プロモドメイン含有タンパク質、キナーゼ（例えば、ヒストンタンパク質をリン酸化するキナーゼ）、またはアクチン依存性のクロマチンの制御因子の阻害剤である。

10

【0146】

当業者は、活性化されたDUX4遺伝子を有する細胞を候補化合物と接触させるためのいくつかの方法を認識する。例えば、自動液体操作システムが、一般に、ハイスループット薬物スクリーニングのために利用される。自動液体操作システムは、ロボットアームにより制御される液体分配容器のレイを利用して、固定された容積の液体をアッセイプレートのウェルに分配する。一般に、レイは、96、384または1536個の液体分配チップを含む。自動液体操作システムの非限定的な例として、デジタルディスペンサー（例えば、HP D300 Digital Dispenser）およびピンニング機（例えば、MULTI-BLOT（商標）Replicator System、CyBio、Perkin Elmer Janus）が挙げられる。自動化されていない方法もまた、本開示により企図され、これらに限定されないが、手動のデジタルリピートマルチチャンネルピペットが挙げられる。

20

【0147】

いくつかの態様において、本開示により記載されるスクリーニング方法は、ハイスループットモードにおいて行われる。いくつかの態様において、ハイスループットスクリーニングは、マルチウェル細胞培養プレート中で行われる。いくつかの態様において、マルチウェルプレートは、プラスチックまたはガラスである。いくつかの態様において、マルチウェルプレートは、6、24、96、384または1536ウェルのレイを含む。しかし、当業者は、マルチウェルプレートは、複数の6、24、96、384または1536のウェルの数を有するマルチウェルプレートなどの多様な他の受入可能な形状に構築することができることを理解する。例えば、いくつかの態様において、マルチウェルプレートは、3072ウェルのレイを含む（これは複数の1536である）。

30

【0148】

細胞におけるDUX4の発現レベルは、当該分野において公知の任意の好適な手段により測定することができる。例えば、細胞におけるDUX4の発現レベルは、ハイブリダイゼーションベースの方法により測定することができる。ハイブリダイゼーションベースのアッセイの例として、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、定量RT-PCR（qRT-PCR）、ノーザンブロット、およびサザンブロットが挙げられる。いくつかの態様において、細胞におけるDUX4（例えばDUX4-f1）の発現レベルは、タンパク質ベースの方法により測定される。タンパク質ベースのアッセイの例として、これらに限定されないが、ウェスタンブロット、ブラッドフォードアッセイ、ローリータンパク質アッセイ、および分光学的方法（例えば、質量分析、高圧液体クロマトグラフィーなど）が挙げられる。いくつかの態様において、細胞におけるDUX4（例えばDUX4-f1）の発現レベルは、細胞ベースの方法により決定される。細胞ベースのアッセイの例として、フローサイトメトリー、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、磁気活性化細胞ソーティング（MACS）が挙げられる。いくつかの態様において、細胞は、DUX4阻害が耐性遺伝子の発現に作動的に連結され、それにより、DUX4の阻害（例えば転写抑制）が、選択培地の存在下において細胞の増殖および選択を可能にするように、修飾さ

40

50

れる。細胞におけるDUX4の発現レベルを定量するさらなる方法は、当業者には容易に明らかとなるであろう。

【0149】

候補化合物は、候補化合物の存在下におけるDUX4の量が、候補化合物の不在下における量よりも少ない(例えば、これと比較して低下している)場合に、DUX4のエピジェネティックな修飾因子として同定することができる。DUX4のエピジェネティックな修飾因子の存在下において発現されるDUX4の量は、DUX4のエピジェネティックな修飾因子の不在下において発現されるDUX4の量よりも、約1%~約100%少ない、約5%~約50%少ない(例えば、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、または約50%少ない)、約10%~約40%少ない、または約20%~約30%少ない範囲であってよい。いくつかの態様において、DUX4は、DUX4のエピジェネティックな修飾因子の存在下においては発現されず(例えば、転写的に不活性であるか、またはサイレンシングされている)、DUX4のエピジェネティックな修飾因子の不在下において発現される(例えば、転写的に活性である)。

10

【0150】

例

例1

この例は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)の処置のために、DUX4の転写の異常な増大を支配する制御機構をターゲティングすることを記載する。正常な対象(例えば、FSHDを有さない対象)において、DUX4発現は、通常オフである。ここでは、FSHDを有する対象の筋肉においてDUX4をオンにする制御因子の同定を記載する。かかる制御因子は、いくつかの態様において、FSHDを処置するための小分子治療のための標的である。

20

【0151】

DUX4発現に関与する遺伝子(例えば、FSHD筋細胞においてこれらの遺伝子の発現が低下している場合、DUX4発現もまた減少する)を同定するためのスクリーニングを行った。簡単に述べると、FSHDを有する対象に由来する初代分化筋細胞を、候補遺伝子を標的とするshRNAで処置し、病原性DUX4-flのmRNAの発現レベルを定量した。DUX4ロックダウンの間接的効果を評価するために、他の筋原性制御因子(例えば、ミオゲニン、MyoD、MyHC)および他の標的(例えば、FRG1、UTRN、および18S)の発現レベルもまた定量した。試料スクリーニングプロトコルを、以下に示す：

30

例のスクリーニングプロトコル

1. 低継代初代FSHD筋芽細胞を増殖させる。
2. 6ウェルプレート中に播種する。
3. 細胞をコンフルエンスに達させ、分化させる(約48時間)。
4. 細胞にレンチウイルスshRNAコンストラクトを感染させ、24時間にわたりインキュベートする。
5. 細胞にレンチウイルスshRNAコンストラクトを再感染させる。
6. 第2の感染の4日後に細胞を収集する。
7. RNAを細胞から抽出して、DUX4-flおよび他の目的の遺伝子の発現レベルについてアッセイする。

40

【0152】

候補遺伝子の非限定的な例を提供するリストを、表2において提供する。合計で39個の表2からの候補遺伝子をスクリーニングした；各々の候補遺伝子に、また表2において示される2~3種の異なるshRNAを感染させた。DUX4、ミオゲニン、MyoD、MyHC、FRG1、UTRN、および18Sについての相対的遺伝子発現を、表3において示す。

表2

50

【表 2】

遺伝子座	名称	shRNA		SET 1- KD	SET 2- KD
TRCN0000016169	ASH1L	PJ1	AAD02 C 3	x	
TRCN0000016168		PJ2	AAD02 C 2	x	
TRCN0000016172		PJ3	AAD02 C 6		X
TRCN0000016818	BPTF	PJ6	AAD09 D 10		X
TRCN0000016819		PJ7	AAD09 D 11		X
TRCN0000006308	BRD2	PJ11	AAC04 H 2	x	
TRCN0000006309		PJ12	AAC04 H 3	x	
TRCN0000006311		PJ14	AAC04 H 5		X
TRCN0000021374	BRD3	PJ16	AAD57 A 1	x	
TRCN0000021375		PJ17	AAD57 A 2	x	
TRCN0000021376		PJ18	AAD57 A 3		X
TRCN0000021424	BRD4	PJ21	AAD57 E 3	x	
TRCN0000021425		PJ22	AAD57 E 4	x	
TRCN0000006303	BRDT	PJ26	AAC04 G 9	x	
TRCN0000006304		PJ27	AAC04 G 10	x	
TRCN0000021909	BRPF1	PJ31	AAD62 H 2		X

10

20

30

40

50

TRCN0000021912		PJ32	AAD62 H 5		X
TRCN0000021101	BRPF3	PJ40	AAD53 H 4		X
TRCN0000021099		PJ41	AAD53 H 2		X
TRCN0000007168	CARM1	PJ45	AAC15 B 7	x	
TRCN0000007167		PJ46	AAC15 B 5	x	
TRCN0000007169		PJ47	AAC15 B 8		X
TRCN0000020211	DOT1L	PJ50	AAD44 A 8		
TRCN0000107760	KDM6A	PJ55	AAN23 C 7		X
TRCN0000107761		PJ56	AAN23 C 8		X
V3LHS_301324	KDM6B	PJ60	172_1333 B 3		X
V3LHS_301328		PJ61	172_1356 B 1		X
TRCN0000013493	KDM4A	PJ62	AAC71 E 3	x	
TRCN0000013494		PJ63	AAC71 E 4	x	
TRCN0000018017	KDM4B	PJ67	AAD22 G 3	x	
TRCN0000018015		PJ69	AAD22 G 1	x	
TRCN0000022056	KDM4C	PJ73	AAD64 E 5	x	
TRCN0000022058		PJ74	AAD64 E 7	x	
TRCN0000022054		PJ75	AAD64 E 3		X
TRCN0000148192	KDM4D	PJ78	AAQ74 F 10	x	
TRCN0000147186		PJ79	AAQ74 F 8	x	
TRCN0000005955	KMT2A	PJ83	AAB99 F 3	x	
TRCN0000005956		PJ84	AAB99 F 4	x	
TRCN0000008746	KMT2C	PJ89	AAC37 A 10		X
TRCN0000008744		PJ90	AAC37 A 8		X
TRCN0000154711	KMT2E	PJ94	AAQ81 F 3		X
TRCN0000155824		PJ95	AAQ81 F 5		X
TRCN0000001723	NEK6	PJ99	AAB48 G 9		X
TRCN0000001724		PJ100	AAB48 G 10		X
TRCN0000019184	PHF2	PJ104	AAD32 F 1		X
TRCN0000019185		PJ105	AAD32 F 2		X
TRCN0000035929	PRMT1	PJ109	AAF20 F 6		X
TRCN0000035930		PJ110	AAF20 F 7		X
TRCN0000150815	SETD1A	PJ114	AAR37 A 12		X
TRCN0000152242		PJ115	AAR37 B 1		X

10

20

30

40

50

V2LHS_18585	SETD1B	PJ119	172_0404 B 9		X
V3LHS_316056		PJ120	172_1039 B 1		X
TRCN0000123289	SMYD3	PJ121	AAO79 C 12		X
TRCN0000123292		PJ122	AAO79 D 3		X
TRCN0000013338	BAZ1B	PJ142	AAC69 G 4	x	
TRCN0000013339		PJ143	AAC69 G 5	x	
TRCN0000004814	HDAC1	PJ147	AAB86 C 2		
TRCN0000034279	BAZ1A	PJ152	AAF02 C 12	x	
TRCN0000034280		PJ153	AAF02 D 1	x	
TRCN0000034281		PJ154	AAF02 D 2		X
TRCN0000015568	BAZ2A	PJ157	AAC94 E 8	x	
TRCN0000015569		PJ158	AAC94 E 9	x	
TRCN0000000075	SF3B1	PJ162	AAA01 G 5		X
TRCN0000000076		PJ163	AAA01 G 6		X
TRCN0000007928	PARP1	PJ167	AAC25 B 9		
TRCN0000007933	PARP2	PJ172	AAC25 C 2		
TRCN0000052938	PARP3	PJ177	AAH09 C 12		
TRCN0000122062	UFL1	PJ182	AAQ11 A 10		X
TRCN0000122630		PJ183	AAQ11 A 7		X
TRCN0000010503	SMARCB1	PJ187	BH-004 G 8	x	
TRCN0000039583		PJ188	AAF61 A 11		X
TRCN0000010504		PJ190	BH-004 G 9	x	
TRCN0000013213	SMARCA5	PJ195	AAC68 D 5	x	x
TRCN0000013214		PJ196	AAC68 D 6	x	
TRCN0000013215		PJ197	AAC68 D 7		X
TRCN0000007370	BAP1	PJ200	AAC17 F 1	x	
TRCN0000007371		PJ201	AAC17 F 2	x	
TRCN0000007604	USP3	PJ205	AAC20 C 2		
TRCN0000007608		PJ209	AAC20 C 6		X
TRCN0000010845	USP7	PJ210	AAB77 A 11		X
TRCN0000007594	USP16	TS30	AAC20 B 4		X
TRCN0000007595		TS31	AAC20 B 5		X
TRCN0000004347	USP21	TS6	AAB80 E 8		
TRCN0000046924	USP22	TS143	AAG41 F 7		

10

20

30

40

V3LHS_311636	MYSM1	TS190	172_1593 B 4		X
V2LHS_87333		TS191	172_0592 C 6		X
V3LHS_311640		TS192	172_1393 D 4		
TRCN 対照	TRCN 対照			X	X
ウイルスなしのモック	ウイルスなしのモック				x

50

【 0 1 5 3 】

表 3

【表 3】

05Abic		D4-fl	Myog	MyoD	MyHC	FRG1	Utr	18S
ASH1L	PJ1	0.339864916	1.795183167	0.723770281	1.065673257	1.051082754	0.699398352	1.372396234
	PJ2	0.137087067	0.884454216	0.850293889	0.722058184	1.172117454	0.814964952	1.310589724
	PJ3	0.243399646	0.721807474	0.989491359	1.341208221	1.140980999	1.128078955	1.18473858
BRD2	PJ11	0.124003902	1.026423141	0.927702908	0.734217035	1.249955089	0.606707767	1.111712256
	PJ12	0.11270391	1.087513313	0.903981253	0.792653631	1.177865629	0.675476924	1.099042238
	PJ14	1.569559486	0.291130929	0.950277519	1.097925476	0.91354105	0.82051485	0.832829365
BRD3	PJ16	0.073308504	0.588032277	0.659660138	0.400760054	1.064750605	0.61837148	0.779623083
	PJ17	0.139921704	1.20855815	0.865477595	0.633576884	1.202664941	0.697405138	0.922625539
	PJ18	0.199308304	0.256805957	1.020418879	1.321564191	1.042463976	0.86120469	0.704754346
BRD4	PJ21	0.586975241	1.797809057	0.849640707	0.853974583	1.244427436	0.706568049	0.998072459
	PJ22	0.392497933	2.123199302	0.939840515	0.74989233	1.233460535	0.630999335	0.858984128
BRDT	PJ26	0.182233541	1.647598037	0.869932672	0.675990268	0.991533271	0.716637895	1.183553643
	PJ27	0.39409226	1.184659362	0.75864719	0.3912232	1.141864481	0.673184416	1.083000707
CARM1	PJ45	0.108241628	0.345409202	0.884104443	0.34384743	1.100175048	0.682696489	0.954703793
	PJ46	0.150324814	0.985263418	0.974628758	0.517851974	0.936585175	0.686617911	1.085577325
KDM4A	PJ47	0.468247646	1.661923124	0.978851217	1.130851995	1.193312199	1.355174788	1.494285831
	PJ62	0.426541187	0.676601566	0.962821736	0.552724982	1.013914728	0.711841551	0.790506216
KDM4B	PJ63	0.08675943	1.020997568	0.806759564	0.755325783	1.099330519	0.803152975	0.888975846
	PJ67	0.286994951	1.431846337	0.959265959	0.546698746	1.014645521	0.843096956	0.852762632
KDM4C	PJ69	0.582612869	1.103597624	0.81591101	0.51460761	1.058393612	0.666273446	0.793717254
	PJ73	0.110105085	1.337908478	0.904501387	0.796780248	1.043171089	0.639320374	1.253018728
KDM4D	PJ74	0.088012999	1.810313807	0.762119329	0.764225297	1.210660137	0.712059103	1.12920813
	PJ75	0.181231368	1.318365665	1.048477015	0.982589446	0.776565473	1.017900514	0.978062388
KMT2A	PJ78	0.144577649	0.958008541	0.893532182	0.420034943	0.946288614	0.584311635	0.943638793
	PJ79	0.087273652	0.330498385	0.712642262	0.272765272	1.10889068	0.632335355	1.185206261
BAZ1B	PJ83	0.297635255	0.848764546	0.888701658	0.444414898	0.940745416	0.507323792	1.086741033
	PJ84	0.214732055	0.41663781	0.750070477	0.321423293	1.032027996	0.535478448	1.075179933
BAZ1A	PJ142	0.320102383	0.892311433	0.806914582	0.487302003	1.037467533	0.600594634	0.989367297
	PJ143	0.175941092	0.744950932	0.765959818	0.408717935	0.917156321	0.635906852	0.793088613
BAZ2A	PJ152	0.18918597	1.317628835	0.991031696	0.850315179	0.904681646	0.954007328	1.312164074
	PJ153	0.266404431	1.583787478	0.959111923	1.368107943	1.215016404	0.935474645	1.424058282
SMARCB1	PJ154	0.628471886	0.503660235	0.840463254	1.57238077	1.231852169	1.25972346	1.097606432
	PJ157	0.450227643	0.75628977	1.079852527	0.731142973	1.074586647	0.876043058	1.130700205
SMARCA5	PJ158	0.102728776	0.841755833	0.878376729	0.749914044	1.022222937	0.833687955	1.094352491
	PJ187	0.149552771	1.016336933	0.939840515	0.655898598	1.025120796	0.666070461	1.038033989
SMARCA5	PJ188	1.1293311	3.56373827	1.212760975	1.144165153	0.904361535	1.098546976	0.793253449
	PJ190	1.087974504	1.158982971	0.9200568	0.76057949	0.844097822	1.00700364	1.068475609
SMARCA5	PJ195	0.168001339	0.800281293	0.898085556	0.780342703	0.98647348	1.023684011	0.990512326

10

20

30

40

50

	PJ196	0.108533259	0.924670334	0.721965982	0.469023371	0.897351593	0.826143034	0.98074374
	PJ196(反復配列)	0.196691569	0.929251089	0.910255442	0.592649529	0.920929641	1.231136865	1.047732055
	PJ197	0.759851475	3.20850592	1.290950658	0.600207491	1.20282491	1.086519425	1.060370731
BAP1	PJ200	0.212467816	1.759563167	0.941014407	1.711392816	0.984321925	0.534605168	0.845146883
	PJ201	0.148130686	0.610314851	1.11293147	0.922039855	0.930531976	1.09067825	1.042772209
	PJ202	0.510554576	0.537384483	0.999101867	1.014196772	1.060064726	0.800039661	1.422790092
BPTF	PJ6	0.228481901	0.619358718	1.209276723	0.994229145	1.132881945	1.036153723	1.105612584
	PJ7	8.84566039	0.710024754	1.091582222	1.602193581	1.006635556	0.985193449	0.955521898
BRPF1	PJ31	0.16564683	0.550832652	1.053943685	0.64261253	1.149110327	1.113301155	0.871727828
	PJ32	1.199737759	0.654927934	1.090011508	1.01068546	1.088378081	1.147487899	1.038249306
BRPF3	PJ40	0.434389237	0.98976198	1.141214284	0.820548576	1.06855752	0.81469057	1.032118072
	PJ41	0.256716096	1.011753695	1.210059043	1.053079053	1.162242786	1.145393054	1.401916912
KDM6A	PJ55	0.226084689	1.309479185	1.337150168	1.404742944	0.972653282	1.248450517	1.339243894
	PJ56	0.287660242	0.985635843	0.926583425	0.930421992	0.958453588	1.12238212	1.117295273
KDM6B	PJ60	0.679110105	0.607373393	0.999035001	1.227193435	0.976997415	0.960958518	0.983234894
	PJ61	0.212640692	1.242673545	1.100282377	1.198420473	1.046064301	1.18681485	1.207438468
KMT2C	PJ89	0.157680244	2.463045313	1.29662295	1.050299486	0.939764596	0.962212923	1.172252104
	PJ90	0.341522916	0.350124817	1.099702159	1.090341551	1.129267588	0.989264411	1.051504267
KMT2E	PJ94	0.291530232	1.177674813	1.063138748	1.2259326	1.037253338	1.298194358	1.086507919
	PJ95	0.54276446	0.642339495	0.967114224	1.142362888	1.08300571	0.989549583	1.065809554
NEK6	PJ99	0.192094471	0.789435776	0.942129271	1.250790527	0.818057845	1.024273754	0.917126328
	PJ100	0.237130444	0.654268485	0.850154988	1.461879519	0.933031394	0.916750689	0.689753562
PHF2	PJ104	0.151333308	0.560545139	0.834101718	1.063690799	0.861653342	0.913827211	0.924436924
	PJ105	0.171838437	0.759976425	1.081702597	1.20853231	1.129104856	1.328039558	1.010877389
PRMT1	PJ109	0.295747472	0.640034943	1.094725915	0.988176188	1.227450266	1.105611022	1.101251698
	PJ110	0.183760248	0.560388696	0.995512843	1.383420734	1.275293342	1.174906589	1.137296184
SETD1A	PJ114	0.143188509	1.486481641	1.244942519	0.913727589	1.120507539	1.042108905	1.390811066
	PJ115	0.172598238	0.544693539	1.027787877	0.828241032	1.129755831	1.198104075	1.126120475
SETD1B	PJ119	0.213909702	0.588365643	1.070533463	0.949087984	0.992253381	0.936659482	1.034675878
	PJ120	0.188838685	0.542621182	0.951512975	0.941922794	1.169091123	1.021005865	0.992527445
SMYD3	PJ121	0.918747691	0.707428191	0.999101867	0.736027478	1.079304166	1.647567517	1.093749887
	PJ122	0.717941338	0.752490768	1.324312717	0.82739557	1.133099667	1.172947662	1.148706718
SF3B1	PJ162	0.270115821	1.90743841	1.130076786	0.644089947	1.181217607	1.278632217	1.296056991
	PJ163	0.493760658	0.623550066	0.999035001	1.005539781	1.288475022	1.245360936	1.270320361
UFL1	PJ182	0.270757616	1.567331031	1.21380994	0.845469383	1.283018046	1.234449695	1.227814695
	PJ183	0.200269298	1.209332663	0.968197459	0.845712955	1.12265253	1.338240664	0.990406606
USP3	PJ209	0.233387444	1.195860264	1.100709575	1.063485913	1.156769563	1.179748175	1.020798907
USP7	PJ211	0.415591698	1.259502206	1.389686068	0.736378535	1.189433625	1.208407515	1.14707669
USP16	TS30	0.413693083	1.792221738	1.364813371	1.225638253	1.22554702	1.202891394	1.060829187
	TS31	0.279686747	1.396516052	0.989823935	1.003899904	0.989075362	0.958843611	0.936981743
MYSM1	TS190	0.172394942	0.343070554	0.96192541	1.362229766	1.062094011	0.928224743	0.980744789
	TS191	0.185232585	0.604956142	1.026998347	1.089313656	1.058616325	0.905360288	0.942276403
CTL	TRN/TRCNS	0.963383755	0.322830129	0.981712992	0.869489182	1.149662323	0.969458381	0.966238572
	モック	1	1	1	1	1	1	1

10

20

30

【 0 1 5 4 】

図 1 は、D u x 4 (D U X 4 - f 1)、他の筋原性因子 (ミオゲニン、M y o D、M y H C)、F R G 1、U T R N、および 1 8 S の発現に対する B R D 2、B R D 3、B R D 4、および B R D T の s h R N A ノックダウンの効果を示す。データは、2 つの異なる s h R N A による B R D 2 のノックダウンは、D U X 4 - f 1 発現を低下させることを示す。しかし、B R D 4 のノックダウンは、D U X 4 発現に対してほとんど効果を有さない。

40

【 0 1 5 5 】

図 2 は、D u x 4 (D U X 4 - f 1)、およびさらなる目的の遺伝子のパネル (ミオゲニン、M y o D、M y H C、F R G 1、U T R N、および 1 8 S) の発現に対する、C A R M 1、K M T 2 A、および K D M 4 A - 4 D の s h R N A ノックダウンの効果を示す。データは、2 つの異なる s h R N A による C A R M 1 のノックダウンが、各々、D U X 4 - f 1 発現の低下をもたらすことを示す。C A R M 1 を標的とする第 3 の s h R N A は、D U X 4 - f 1 発現の低下をもたらさなかった。3 つの異なる s h R N A を用いた K D M 4 C のノックダウンは、D U X 4 - f 1 発現の低下をもたらした。

【 0 1 5 6 】

50

図3は、DUX4 (DUX4 - f1)、他の筋原性因子(ミオゲニン、MyoD、MyHC)、FSHD領域遺伝子1 (FRG1)、ユートロフィン(UTRN)、および18Sの発現に対する、ジンクフィンガードメイン隣接プロモドメイン1B (BAZ1B)、ジンクフィンガードメイン隣接プロモドメイン1A (BAZ1A)、ジンクフィンガードメイン隣接プロモドメイン2A (BAZ2A)、SWI/SNF関連マトリックス結合型アクチン依存性クロマチン制御因子サブファミリーBメンバー1 (SMARCB1)、SWI/SNF関連マトリックス結合型アクチン依存性クロマチン制御因子サブファミリーAメンバー5 (SMARCA5)、BRCA1関連タンパク質1 (BAP1)、およびASH1様タンパク質 (ASH1L)の、shRNAノックダウンの効果を示す。各々の遺伝子を、2つの異なるレンチウイルスにより発現されるshRNAによりノックダウンした。

10

【0157】

図4は、上記のスクリーニングから、以下の基準に適合する5つの候補遺伝子(SMARCA5、BRD2、KDM4C、ASH1L、およびBAZ1A)が同定されたことを示す：1) 候補遺伝子が別々の経路において機能し、各々の遺伝子のノックダウンが、個別にDUX4発現を減少させる；2) これらの候補遺伝子各々を標的とする複数のshRNAが、類似のDUX4発現のノックダウンを生じる(例えば、起こり得るオフターゲット効果を最小化するために)；3) これらの候補遺伝子のターゲティングは、細胞の形態学または筋肉特異的遺伝子の発現に有害な影響を及ぼさなかった；ならびに、4) 候補遺伝子によりコードされるタンパク質が、小分子ドラッグブル(druggable)ドメインを含む。

20

【0158】

したがって、いくつかの態様において、小分子を用いる、これらの候補遺伝子(または上記のスクリーニング方法により同定される別の候補遺伝子)のうちの任意の1つまたは組み合わせの阻害またはノックダウンは、DUX4の転写を阻害するかまたは低下させ、D4Z4反復配列アレイにおいて、抑制性のクロマチン環境を誘導することができる。

【0159】

発明者の知識の及ぶ限りにおいて、このスクリーニングにおいて同定される遺伝子は、先には認識されていないDUX4発現の制御因子であり、FSHDのための治療標的である。加えて、この例において記載されるスクリーニングは、他のスクリーニングにおいては存在しない可能性が高いいくつかの重要な実験的側面を組み入れる：1) FSHD患者からの初代筋細胞の使用；2) 最終分化した筋細胞(患者の筋肉におけるもののような)においてスクリーニングを行うこと；3) レポーターまたは下流の標的ではなく、病原性のDUX4アイソフォーム(DUX4 - f1)のmRNAのレベルを直接的にアッセイすること；4) 筋原性遺伝子に影響を及ぼす候補を排除すること；ならびに、5) D4Z4反復配列アレイクロマチンを非病原性状態に戻すこと(これは、いくつかの態様において、同定された候補遺伝子を標的とする治療をより安定かつ長期的なものにする)。

30

【0160】

例2

この例は、遺伝子編集複合体を用いたDUX4クロマチンモディファイアの阻害によるDUX4発現の修飾を記載する。簡単に述べると、DUX4発現のクロマチンモディファイア(例えば、KDM4C、ASH1L、SMARCA5、BAZ1A、BRD2)を標的とするシングルガイドRNA (sgRNA)を用いて、KRAB抑制因子に融合したdCas9を含む遺伝子編集分子を用いたDUX4の転写の修飾を指揮した。図5は、この例において記載されるCRISPR/dCas9/KRAB転写修飾系の図説である。

40

【0161】

FSHD患者に由来する筋原性細胞である17Abic細胞において、ノックダウンを行った。各々の候補遺伝子について、6~8種のsgRNAを試験した。表4は、DUX4のクロマチンモディファイアを標的とするガイドRNAの例を記載する。

表4：ガイドRNA (gRNA)

50

【表 4】

遺伝子	遺伝子 ID 番号:	配列番号	sgRNA 配列 + Sa/Sp PAM (NNGRR / NGG)	オンターゲットスコア	オフターゲットスコア	特異性
KDM4C	NC_000009.12	12	<u>CGTTACCGGGTGGAGCCTCGGAAT</u>	0.08	76	高い
		13	CTTGCCCGGAAGCGCTGGCTGGGGT	0.06	81	高い
SMARCA5	NC_000004.12	14	AAAACCGTGAGACTTCACTGGGGT	0.13	78	高い
		15	TGTGTCTTCTGTGCCTGACAGGGGT	0.01	59	高い
BAZ1A	NC_000014.9	16	<u>ATACAAGTAAATCGTAATTGGAAT</u>	0.09	70	高い
		17	TTGACTACACGATGGGAAAAGGGAT	0.05	77	高い
BRD2	NC_000006.12	18	GCCAAAGCAGGGAAACGGGAGGGGT	0.36	64	高い
ASH1L	NC_000001.11	19	GCCCTCACGCTACCTCAACGG			高い

* sgRNA は、各々遺伝子のプロモーターまたはエクソン 1 を標的とする。

** sgRNA は、SaCas9 および SpCas9 の両方により認識される二重 PAM に隣接する配列を標的とする。

*** スコアおよび特異性は、sgRNA Designer scores (CRISPR Design Tool ; <http://crispr.mit.edu>) である。

【0162】

各々の候補遺伝子、DUX4-f1 (D4-f1)、FRG1、MyoG、MyHC、18S および MyoD についての相対的発現レベルを定量した。一般に、遺伝子特異的ノックダウンのレベルは、当該分野において報告される CRISPR/Cas9 媒介型ノックダウン (例えば、Radzishchanskaya et al. (2016) Nucleic Acids Research 1 ; doi:10.1093/nar/gkw583 により記載されるもの) と一致した。

【0163】

図 6 は、17A1c 細胞における KDM4C のレンチウイルスベースの dCas9-KRAB ノックダウンについての代表的なデータを示す。2つの異なるガイド RNA (gRNA) を用いた実験からのデータを示す。各々のガイド鎖は、DUX4-f1 (D4-f1) の減少を媒介した。KDM4C の発現レベルは、ノックダウンの後で約 80% であり、このことは、DUX4 の発現が、KDM4C の発現レベルの変化に対して非常に感受性であることを示している。

図 7 は、17A1c 細胞における ASH1L のレンチウイルスベースの dCas9-KRAB ノックダウンについての代表的なデータを示す。シングルガイド RNA (gRNA) を用いた実験からのデータを示す。ASH1L のノックダウン (約 20%) は、DUX4-f1 の発現の減少をもたらした。MyoG および MyoD の発現レベルは、顕著には変化しなかった。

【0164】

図 8 は、17A1c 細胞における SMARCA5 のレンチウイルスベースの dCas9-KRAB ノックダウンについての代表的なデータを示す。2つの異なるガイド RNA (gRNA) を用いた実験からのデータを示す。各々のガイド鎖は、DUX4-f1 (D4-f1) の減少を媒介した。SMARCA5 の発現レベルは、ノックダウンの後で約 75% であり、このことは、DUX4 の発現が、SMARCA5 の発現レベルの変化に対して非常に感受性であることを示している。MyoG および MyoD の発現レベルは、顕著には変化しなかった。

図 9 は、17A1c 細胞における BAZ1A のレンチウイルスベースの dCas9-KRAB ノックダウンについての代表的なデータを示す。2つの異なるガイド RNA (gRNA) を用いた実験からのデータを示す。各々のガイド鎖は、DUX4-f1 (D4-f1) の減少を媒介し、これは、BAZ1A の発現レベルの低下と相関する。BAZ1A

10

20

30

40

50

のノックダウンは、試験された任意の遺伝子のうちで、D U X 4 の発現レベルの最大の減少をもたらした。

【 0 1 6 5 】

図 1 0 は、1 7 A B i c 細胞における B R D 2 のレンチウイルスベースの d C a s 9 - K R A B ノックダウンについての代表的なデータを示す。シングルガイド RNA (g R N A) を用いた実験からのデータを示す。D U X 4 の発現レベルの減少を観察した。

まとめると、遺伝子編集複合体を用いた K D M 4 C 、 A S H 1 L 、 S M A R C A 5 、 B A Z 1 A 、 B R D 2 のノックダウンは、D U X 4 のクロマチンモディファイアーを阻害することにより D U X 4 発現レベルを低下させることに関して、例 1 において記載される R N A i の結果を確認する。

【 0 1 6 6 】

例 3

プラスミドおよび抗体。

pHAGE EF1-dCas9-KRAB (Addgene plasmid # 50919) および pLKO.1-puro U6 sgRNA BfuAI stuffer レンチウイルスプラスミドを入手した。この例において使用される C h I P - グレードの抗体、 - H 3 K 9 m e 3 (ab8898) および - ヒストン H 3 (a b1791) は、市販のソースから購入した。

【 0 1 6 7 】

s g R N A の設計およびプラスミド構築。

公共で利用可能な s g R N A 設計ツールを用いて、ヒト B A Z 1 A 、 B R D 2 、 K D M 4 C および S M A R C A 5 (表 4) のプロモーター/エクソン 1 領域を標的とする候補一本鎖ガイド RNA (s g R N A) を同定した。本研究の範囲を超えて実験の適応性を構築するために、S a c a s 9 および S p C a s 9 の両方により認識可能な二重のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接する配列を標的とする s g R N A に優先順位を付けた。予測されるオフターゲットマッチを、CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu>) を用いて決定した。各々の標的遺伝子について 6 ~ 8 種の s g R N A を、個々に、pLKO.1-puro U6 sgRNA BfuAI stuffer プラスミド中の B f u A I 部位中にクローニングして、配列を検証した。

【 0 1 6 8 】

細胞培養、一過性遺伝子導入、およびレンチウイルス感染。

無関係な F S H D 1 患者 (0 5 A b i c 、 1 7 A b i c および 1 8 A b i c) の二頭筋に由来する筋原性培養を、2 0 % F B S (Hyclone) 、 0 . 5 % ニワトリ胚抽出物、1 % 抗生物質 & 抗真菌薬、および 1 . 2 m M の C a C l 2 を添加したハム F - 1 0 培地中で増殖させた。2 9 3 T パッケージング細胞を、

D M E M + 1 0 % F B S + 0 . 1 % ペニシリン - ストレプトアビジン中で増殖させた。s h R N A ノックダウン実験のために、2 9 3 T 細胞に、レンチウイルスパッケージングプラスミド (pCMV-dR8.91) 、エンベローププラスミド (VSV-G) 、および SIGMA MISSION s h R N A 発現プラスミドで遺伝子導入した。レンチウイルス上清を収集し、定量分割し、- 8 0 で冷凍した。F S H D 1 骨格筋芽細胞を、コラーゲンコートされた 6 ウェルプレート (遺伝子発現分析のために) または 1 0 - c m プレート (C h I P のために) 中に播種し、コンフルーエンスまで増殖させ、次いで、増殖培地中で約 4 8 時間にわたり自己分化させた。細胞を、2 ラウンドの感染に供した。簡単に述べると、レンチウイルス上清 + 8 μ g / m l のポリブレンを培養に添加して、プレートを 1 5 分間にわたり 3 7 でインキュベートし、次いで、パラフィルムでラップして、その後 3 0 分間にわたり 1 1 0 0 g で遠心分離した (3 2) 。遠心分離の後で、ウイルス上清を、増殖培地で置き換えた。細胞を、増殖培地中で維持し、最後のラウンドの感染の 4 日後に収集した。d C a s 9 - K R A B 感染について、2 9 3 T 細胞に、TransIT-LT1 遺伝子導入試薬を用いて、レンチウイルスパッケージングプラスミド (pCMV-dR8.91) 、エンベローププラスミド (VSV-G) 、および d C a s 9 - K R A B 発現プラスミド (# 50919) または s g R N A 発現プラスミドのいずれかで遺伝子導入した。レンチウイルス上清を遺伝子導入後 7 2

10

20

30

40

50

~ 108時間、11時間の間隔で収集した。FSDH1骨格筋芽細胞を、コラーゲンコートされた6ウェルプレート中に播種し、約80%のコンフルーエンスまで増殖させ、次いで、2日間にわたり4回の連続感染に供した。細胞を、増殖培地中で約8時間にわたり回復させ、その後、次のラウンドの感染を行った。最後の感染の後に、これらの自己分化した培養を、増殖培地中で72時間にわたり維持し、その後、収集した。

【0169】

定量逆転写PCR (qRT-PCR)。

TRIzol (Invitrogen) を用いて全RNAを抽出し、カラム上でのDNase I消化の後で、RNeasy Miniキット (Qiagen) を用いて精製した。Superscript III逆転写酵素 (Invitrogen) を用いるcDNA合成のために全RNA (2 μg) を用い、qPCR分析のために200 ngのcDNAを用いた。オリゴヌクレオチドプライマー配列を、表5において提供する。

表5

10

20

30

40

50

【表 5】

プライマー名称	配列	qPCR/ChIP	配列番号
DUX4-fl-F	GCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGA	qPCR	28
DUX4-fl-R	GCAGGTCTGCWGGTACCTGG	qPCR	29
ミオゲニン-F	TCGTGGACAGCATCACAGT	qPCR	30
ミオゲニン-R	CTTCCTAGCATCAGGGCAG	qPCR	31
MyoD-F	GTAGCAGGTGTAACCGTAACC	qPCR	32
MyoD-R	CAGAGATAAATACAGCCCCAGG	qPCR	33
ミオシン重鎖 1-F	ACAGAAGCGCAATGTTGAAG	qPCR	34
ミオシン重鎖 1-R	CACCTTTGCTTGCGATTTGT	qPCR	35
FRG1-F	TCTACAGAGACGTAGGCTGTCA	qPCR	36
FRG1-R	CTTGAGCACGAGCTTGGTAG	qPCR	37
18S-F	AGTAAGTGCGGTCATAAGCT	qPCR	38
18S-R	CCTCACTAAACCATCCAATCGG	qPCR	39
SMARCA5-F	TGCGACAGTGTATTGCAAC	qPCR	40
SMARCA5-R	GGCTTTGGTCCTCGTTTCTT	qPCR	41
KDM4C-F	GCTCATTCCAGCACCAATTC	qPCR	42
KDM4C-R	CCATTCATCCACACCCTCAT	qPCR	43
BRD2-F	AAACACTCAAGCCATCCACA	qPCR	44
BRD2-R	GCTTTTCTAATTCCTCGCTTTT	qPCR	45
BAZ1A-F	CACCGAAAGCCGTTTGTGAG	qPCR	46
BAZ1A-R	TCTACCCGTCACAGCACAAC	qPCR	47
4-spec D4Z4-F	TCTGCTGGAGGAGCTTTAG	ChIP	48
4-spec D4Z4-R	GAATGGCAGTTCTCCGCG*	ChIP	49
ミオゲニン prom-F	CCTATACCCACCAGCTTCTT	ChIP	50
ミオゲニン prom-R	GATGTGATTCCTTCTTTTC	ChIP	51
5' D4Z4-flank-F	ATCTGGTTGTGGTAGTGTGC	ChIP	52
5' D4Z4-flank-R	TGAGGGTGTCTGAAAGAATG	ChIP	53
4p アレイ-F	TGGGAAATACCTGCTACGTG	ChIP	54
4p アレイ-R	GTGACGATGACACGTTTGAG	ChIP	55

*この位置における G は、染色体 10 (T) と比較して、染色体 4 (G) に特異的である。

【 0 1 7 0 】

クロマチン免疫沈降 (ChIP)。

レンチウイルスに感染した 17A b i c 分化筋細胞により、Fast ChIP法 (Nelson) をいくつかの改変により用いて、ChIPアッセイを行った。細胞を、DME M中の1%ホルムアルデヒド中で10分間にわたり固定し、10回ダウンス (dounce) し、その後超音波処理した。細胞を、Branson Sonifier 450 (VWR Scientific) において65%の出力で、12ラウンドにわたり15秒間のパルスで超音波処理し、DNAを約200~800bpのラダーに剪断し、アガロースゲル電気泳動により、剪断の効率を検証した。クロマチンを、2μgの特異的抗体を用いて免疫沈降させた。94 で15秒間、55 で30秒間、および72 で30秒間を40サイクルにわたり、SYBRグリーン定量PCRアッセイを行った。PCR生成物を、1.5%アガロースゲル上で分析し、生成物の正

10

20

30

40

50

確なサイズおよびプライマーアニーリングの特異性を検証した。オリゴヌクレオチドプライマー配列を、表 5 において提供する。

【 0 1 7 1 】

F S H D 筋細胞において複数のエピジェネティックな経路が D U X 4 - f 1 の発現を制御する。

D U X 4 をコードする D 4 Z 4 マクロサテライトアレイは、成体の体細胞においては、通常、強力なエピジェネティック抑制下にある。一般に、F S H D 患者は、この抑制の喪失を示し、4 q の D 4 Z 4 アレイにおける DNA の低メチル化、ならびに 4 q および 1 0 q の両方における D 4 Z 4 アレイにおけるクロマチンの弛緩（抑制性 H 3 K 9 m e 3 マーク、H P 1 およびコヒーシンのエンリッチメントの低下）を示す。3 6 個の D U X 4 - f 1 の候補アクチベーターを、潜在的な薬物標的として調べた（表 3）。これらの候補は、転写制御因子、クロマチンリモデラ（remodeler）、およびヒストン修飾酵素を含む。最初のスクリーニングのために、F S H D 1 患者（0 5 A b i c）からの、最終分化した場合に一貫して相対的に高いレベルの D U X 4 - f 1 を発現する骨格筋細胞を用いた。レンチウイルスによりコードされる s h R N A を用いて、各々の候補を、最終分化した培養中でノックダウンし、次いで、4 日後に細胞を収集し、D U X 4 - f 1 および他の遺伝子の発現について評価した。

【 0 1 7 2 】

データは、これらの候補のうちの多くが、D U X 4 - f 1 の発現を制御することにおいて役割を果たすと考えられることを示す。例えば、ポリコム媒介型遺伝子サイレンシングを相殺するショウジョウバエのトライソクス群タンパク質の哺乳動物の相同体である A S H 1 L は、F S H D において D U X 4 発現を活性化することができるヒストンメチルトランスフェラーゼである。いくつかの態様において、A S H 1 L は、DBE-T lncRNA により D 4 Z 4 アレイの近傍に動員され、H 3 K 3 6 m e 2 のエンリッチメントおよび F S H D 遺伝子座の抑制解除をもたらす。3 種の異なる s h R N A による A S H 1 L のノックダウンが、D U X 4 - f 1 発現を約 7 0 ~ 8 0 % 低下させることが観察された（図 1 1 A）。同様に、エピジェネティックリーダー B R D 2（図 1 1 C）、リジン特異的ヒストンデメチラーゼ K D M 4 C（図 1 1 D）、およびクロマチンリモデリング因子である B A Z 1 A および S M A R C A 5 のノックダウンは、D U X 4 - f 1 のレベルを実質的に低下させた（図 1 1 B および 1 1 E）。重要なことに、これらのノックダウンは、重要な筋転写因子である M y o D および ミオゲニン、または筋肉の構造タンパク質である ミオシン 重鎖 1 の発現に対して、最少の効果を有した（図 1 1 A ~ 1 1 E）。D 4 Z 4 アレイの近傍に存在する F S H D 候補遺伝子である F R G 1 の発現はまた、相対的に不変であった（図 1 1 A ~ 1 1 E）。ユートロフィンの発現の低下もまた、F S H D 筋細胞における B R D 2 のノックダウンの後で観察された（図 1 1 C）。

【 0 1 7 3 】

これらのデータは、F S H D において D U X 4 - f 1 の発現を制御する特定のエピジェネティック経路が、分化した筋細胞に対して主要な有害効果を伴うことなく修飾され得ることを示す。F S H D 患者コホートにわたって候補を確認するために、2 つの他の無関係な F S H D 1 患者（1 8 A b i c および 1 7 A b i c）あらの筋細胞において、A S H 1 L、B R D 2、K D M 4 C および S M A R C A 5 の s h R N A ノックダウンを試験し、類似の結果を得た。s h R N A が D U X 4 - f 1 の発現を低下させることができなかった場合についての原因である可能性が高いウイルスのプレップにおける差異にもかかわらず、各々の標的についての少なくとも 1 つの s h R N A は、3 つ全ての患者コホートにおいて、筋細胞における D U X 4 - f 1 のレベルを実質的に低下させた（図 1 1 F）。

【 0 1 7 4 】

d C a s 9 - K R A B による候補制御因子の転写の抑制は、F S H D 筋細胞における D U X 4 - f 1 発現を低下させる。

少なくとも 2 種の s h R N A による 8 種の候補のノックダウン（例えば、1 候補あたり 2 種の s h R N A）は、> 7 0 % の D U X 4 - f 1 の発現の低下をもたらし、他の試験さ

10

20

30

40

50

れた遺伝子に対しては効果は最小限であった。候補のうちの5つ、ASH1L、BAZ1A、BRD2、KDM4C、およびSMARCA5を、第2の遺伝子サイレンシングモダリティーによる調査のために選択した。適切なsgRNAによりガイドされ、転写エフェクター(KRAB、LSD1、VP64、p300)に融合した酵素的に不活性なdCas9は、哺乳動物細胞における内在標的遺伝子発現を修飾することができる。活性な遺伝子の転写開始部位(TSS)の近傍の領域に動員された場合(例えば、-50~+250塩基対)、dCas9-KRABは、有効な転写抑制因子となり得る。したがって、各々の候補について、プロモーターまたはエクソン1を標的とする6~8種のsgRNAを設計した。sgRNAおよびdCas9-KRABを、4回の連続した遠心分離による共感染を用いて、17Abic筋細胞中に形質導入した。72時間後に細胞を収集し、遺伝子発現の変化についてアッセイした。

10

【0175】

ASH1Lを標的とする試験されたsgRNAのうちのいずれも、この候補遺伝子の発現に対して一貫して影響を及ぼさなかった。BRD2を標的とする1つの機能的sgRNA(図12B)、ならびにBAZ1A(図12A)、KDM4C(図12C)、およびSMARCA5(図12D)についての2つの独立した機能的sgRNAを同定した。しかし、shRNAノックダウンを用いた場合と同様に、標的遺伝子発現のわずかな低下ですら、DUX4-f1のレベルを実質的に(約30~60%)低下させるために十分であることが証明された(図12A~12D)。対照的に、他の遺伝子(FRG1、MyoD、ミオゲニン、ミオシン重鎖1、および18S)の発現レベルは、候補制御因子の低下によって著しくは影響を受けなかった(図12A~12D)。DUX4-f1は、両方の抑制の方法(shRNAノックダウンおよびCRISPR阻害)により実質的に低下することが試験された唯一の遺伝子であった。

20

【0176】

候補制御因子のノックダウンは、D4Z4マクロサテライトにおいてクロマチン抑制を増大する。

病原性遺伝子座におけるクロマチンの変化を調べた。DUX4は、4qおよび10qの両方のアレルにおいて、全てのD4Z4反復単位において存在するが、これらのアレルのうちの3つにおけるクロマチンは、既に圧縮されたヘテロクロマチン状態にある。したがって、短縮したアレルにおける抑制を評価する試みは、他の3つのアレルの存在により弱められ得る。分析から10qアレルを取り除くために、DUX4のエクソン2中の染色体4に特異的な配列多型・対・染色体10に特異的な配列多型を、プライマーを設計する場合に、計算に入れた。

30

【0177】

17Abic FSHD筋細胞において、ASH1L(図13A)、BRD2(図13B)、KDM4C(図13C)、またはSMARCA5(図13D)のいずれかのshRNAノックダウンの後で、いくつかのヒストン修飾について、クロマチン免疫沈降(ChIP)を行った。試験した全てのFSHDコホートにわたる各々の標的遺伝子の強力な一貫したノックダウンを提供するshRNAを、評価した。プロモーターH3K4me3マーク、活性なH3K27acマーク、および抑制性H3K9me3マークの相対的占有率を、染色体4のDUX4エクソン1/イントロン1、D4Z4アレイ、ヘテロクロマチンの4pマクロサテライトアレイ、および活性なミオゲニンプロモーターに近い領域において調べた。各々のエピジェネティック標的のノックダウンは、D4Z4遺伝子座におけるH3K4me3またはH3K27acのレベルに対して検出可能な効果を有さなかったが、抑制性H3K9me3マークのレベルは増大した(図13A~13D)。エンリッチメントのレベルは、約40%~2倍であり、ヘテロクロマチンの4q反復配列のバックグラウンドの中でも、遠位の抑制解除された病原性反復配列における抑制の増大を示す。このことに関して、患者17Aは、短縮した4A161アレルにおいて約5個の反復単位、および短縮していない4A~L161アレルにおいて約26個の反復単位を有する。

40

【0178】

50

B R D 2、K D M 4 C、またはS M A R C A 5 がロックダウンされた細胞において、増強された抑制は、概ね、D 4 Z 4 マクロサテライトに対して特異的であると考えられる。なぜならば、他の試験した領域におけるH 3 K 9 m e 3 レベルは、対照s h R N Aを用いて観察されたものよりも高くはならなかったからである(図13A~13D)。このことは、これらのD U X 4 制御因子のロックダウンが、ミオゲニンを含む他の遺伝子に対して、非常にわずかな効果しか有しないことを示す。

【0179】

4 特異的D 4 Z 4 (例えば、Rプライマーの3'末端における染色体4に特異的な多型・対・染色体10に特異的な多型)、D 4 Z 4の5'隣接配列(flank)(アレイの上流)、ミオゲニンプロモーター(活性な筋特異的遺伝子プロモーター)、および4pアレイ(c h 4上の別のヘテロクロマチンアレイ)におけるH 3 K 3 6 m e 3の相対的占有率もまた、B R D 2(図14A)、A S H 1 L(図14B)、S M A R C A 5(図14C)、およびK D M 4 C(図14D)のロックダウンの後で評価した。データは、B R D 2およびK D M 4 Cロックダウン細胞における4特異的D 4 Z 4における著しいエンリッチメントを示す(図14Aおよび14D)。ミオゲニンプロモーターにおけるエンリッチメントは、空ベクター対照と比較して有意ではなく、ヘテロクロマチン4pアレイにおいては、エンリッチメントはほとんど~全く存在しなかった。

【0180】

まとめると、この例において記載されるデータは、複数のクロマチン制御因子の独立したロックダウンが、D 4 Z 4におけるクロマチン抑制、およびF S H D筋細胞におけるD U X 4 - f 1発現の実質的な減少をもたらすこと、ならびに、特定のエピジェネティック経路の適度な阻害により、D U X 4 - f 1のレベルを実質的に低下させることができることを示し、このことは、F S H Dのための新規の薬物標的としてのそれらの潜在能力を実証している。

【0181】

例4

この例は、エピジェネティックな因子を標的とする小分子が、D U X 4の発現を修飾することができることを示す。トリコスタチンA(T S A)は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤であり、5'-アザ-2'-デオキシシチジン(5' A D C)は、DNAメチル化阻害剤であり、カエトシン(chaeocin: C H)は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤である。F S H D 1を罹患する患者(例えば、コホート28A、29A、30A、および15A)ならびにF S H D無症候の患者(例えば、コホート28B、29B、30B、および15B)から単離した初代筋芽細胞の、D 4 Z 4反復配列のエピジェネティック状態に影響を及ぼす小分子のみ、または組み合わせにおける処置は、D U X 4の発現に影響を及ぼす(図15)。

【0182】

筋分化を改変することによりD U X 4の発現に影響を及ぼす小分子は、間接的に作用しており、F S H Dのための実行可能な候補ではない。

J Q 1は、初代F S H D筋細胞(09Abic)においてD U X 4の発現および下流の遺伝子T R I M 4 3およびZ S C A N 4を阻害すると考えられる小分子エピジェネティック薬である。しかし、処置の時間経過は、D U X 4のJ Q 1制御は間接的であり、いくつかの重要な筋原性制御遺伝子であるミオゲニン(M y o g)、m y o D、ミオシン重鎖(M y H C)、およびミオスタチン(M y o s t)の発現を阻害することにより達成されることを示す(図16)。D U X 4の発現は、筋分化の間に誘導され、このプロセスを遮断することまたは遅延させることは、J Q 1を用いる場合、D U X 4の発現を見かけ上阻害するが、このとき、実際には、それはあくまで筋原性分化の動力学を改変させているのである。重要なことに、これらの遺伝子は、F S H Dおよび健康なヒト骨格筋筋芽細胞(H S M M)の両方において、J Q 1により誤制御される(図17)。したがって、J Q 1は、非特異的小分子の例であり、F S H D治療薬としての使用のためには適切ではない。

【0183】

例 5

この例は、DUX-4、SMARCA5、およびKDM4CのノックダウンによるZSCAN4の発現の修飾を記載する。ZSCAN4は、テロメア維持および胚性幹細胞の多能性の制御において役割を果たす。簡単に述べると、FSHDの骨格筋の筋管を、DUX-4、SMARCA5、またはKDM4Cを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、示された遺伝子の相対的発現を、RT-PCRを用いて決定した。

以下の材料を、例5において用いた。含まれた細胞：FTCE-00016-01（不死化FSHD筋芽細胞株、6.3反復配列）、同質遺伝子系統A4対照、健康な正常な、およびC12FSHDの筋芽細胞。

【0184】

含まれた培地構成成分および組織培養材料：骨格筋増殖培地（PromoCell、C-23160）に15% FBS（Hyclone、SH30071）およびPen/Strep（Gibco、15140148）を添加したもの。骨格筋細胞分化培地（PromoCell、C-23061）に、20%のKnockOut血清置換物（Gibco、10828010）およびPen/Strepを添加したもの（分化培地）。EmbryoMax 0.1%ゼラチン溶液（EMDmillipore ES-006-B）。PBS（Gibco、10010023）組織培養物処理された96ウェルマイクロプレート（Corning、CLS3595）、TC処理されたマルチウェル細胞培養プレート（Falcon、353046）。

【0185】

リアルタイムPCR試薬は、以下を含んだ：溶解バッファー - Roche Realtime Ready 溶解バッファー 19.5 uL（20 uLのために）（Roche、07248431001）、DNase I（Ambion、AM2222）0.25 uL、Protector RNase阻害剤（Roche、3335402001）0.25 uL、RNeasy Microキット（Qiagen、74004）、Taqman Preamp Master Mix（ThermoFisher Scientific、4391128）、Taqman Multiplex Master Mix（ThermoFisher Scientific、4484262）、ZSCAN4 Taqmanアッセイ（ThermoFisher Scientific、Hs00537549_m1、FAM-MGB）、MYOG Taqmanアッセイ（ThermoFisher Scientific、Hs01072232_m1、JUN-QSY）、RPLP0 Taqmanアッセイ（ThermoFisher Scientific、Hs99999902_m1）、LEUTX Taqmanアッセイ（ThermoFisher Scientific、Hs00418470_m1）。

アンチセンスオリゴヌクレオチド配列を、表5において示す。

表 6

【表 6】

遺伝子	配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド
KDM4C	24	<u>ATGCTTCGTGATGACC</u>
SMARCA5	25	ATCAGCCTTAATTCGA
DUX-4	26	CAGCGTCGGAAGGTGG
ターゲティング されていない	27	AACACGTCTATACGC

【0186】

図11は、FSHDの骨格筋の筋管におけるZSCAN4の発現が、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたDUX-4のノックダウンにより低下したことを示す。DMSO処置されたFSHDの骨格筋の筋管、および野生型の筋管を、対照として用いた。

図12は、FSHDの骨格筋の筋管におけるZSCAN4の発現が、SMARCA5およびKDM4Cのノックダウンにより低下したことを示す。ターゲティングされていないアンチセンスオリゴヌクレオチドを、対照として用いた。

まとめると、これらの結果は、DUX-4、SMARCA5、またはKDM4Cの阻害またはノックダウンが、ZSCAN4の発現を低下させることができることを示した。

【0187】

配列

S a C a s 9 タンパク質 (配列番号 2 0)

【数 9】

MAPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVEN
 NEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSE
 EEFS AALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK
 DGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRITYEGPGEFS
 PFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLE
 YYEFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITA
 RKEIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAI
 NLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVIN
 AIIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKI
 KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEVVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKK
 GNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINR
 NLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH
 AEDALIINANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIK
 HIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKL
 INKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVI
 KKIYYGNKLN AHL DITDDYPNSRNKVVKLSLKP YRFDVYLDNGVYK FVTVKNL DVIK
 KENYYEVNSKCYEEAKK LKISNQA EFIASFYNNDLIKINGEL YR VIGVNNDLLNR IEVN
 MIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRP
 AATKKAGQAK

10

20

【 0 1 8 8】

S a - d C a s 9 - K R A B (配列番号 2 1)

【数 1 0】

MAPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVEN
 NEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSE
 EEFS AALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK
 DGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRITYEGPGEFS
 PFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLE
 YYEFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITA
 RKEIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAI
 NLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVIN
 AIIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKI
 KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEVVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEEASKK
 GNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINR
 NLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH
 AEDALIINANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIK
 HIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKL
 INKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVI
 KKIYYGNKLN AHL DITDDYPNSRNKVVKLSLKP YRFDVYLDNGVYK FVTVKNL DVIK
 KENYYEVNSKCYEEAKK LKISNQA EFIASFYNNDLIKINGEL YR VIGVNNDLLNR IEVN
 MIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRP
 AATKKAGQAKKKKGS DAKSLTAW SRTLVTFKDVFVDF TREEWKLLDTAQQIVYRNV
 MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEP

30

40

【 0 1 8 9】

S p - d C a s 9 - K R A B (配列番号 2 2)

【数 1 1】

50

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
 EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF
 GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN
 SDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF
 GNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDQYDQYADLFLAAKNLS
 DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN
 GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLG
 ELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN
 FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMR
 KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTRNKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY
 HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRR
 RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV
 SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQK
 GQKNSRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDI
 NRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRKGSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLL
 NAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN
 DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGALIKKYPKLE
 SEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET
 NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVIVKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK
 DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKLKS VKELLGITIMERSSEKPNPIDFLE
 AKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASH
 YEKLKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHHRDK
 PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YSTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDL
 SQLGGDGTGGPKKKRKYVPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSMDAKSLT
 AWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKL DTAQQIVYRNVML ENYKNLVSLGYQLTKPDVILR
 LEKGEEP

10

20

【 0 1 9 0 】

S a - d C a s 9 (配 列 番 号 2 3)

【 数 1 2 】

MAPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVEN
 NEGRRSKRGARRLKRRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSE
 EEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK
 DGEVRSINRFKTSYVKEAKQLLVQKAYHQLDQSFIDTYIDLETRRTY YEGPGEGS
 PFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLE
 YYEKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITA
 RKEIENAEILLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAI
 NLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVIN
 AIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTTGKENAKYLIEKI
 KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEV DHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEEASKK
 GNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINR
 NLVDTRYATRGLMNNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH
 AEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFE EKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIK
 HIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLL
 INKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQY GDEKNPLYKYEETGNYLTKYSKKDNGPVI
 KKIYYGNKLN AHL DITDDYPNSRNKVVKLSLKP YRFDVYLDNGVYK FVTVKNL DVIK
 KENYEVNSKCYEEAKLKKISNQA EFIASFYNNDLIKINGEL YRVIGVNNDLLNRIEVN
 MIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG

30

40

50

【 図 面 】
【 図 1 】

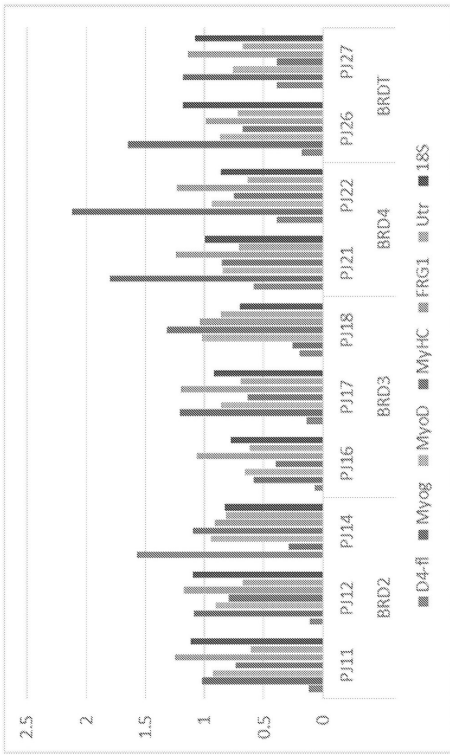


図 1

【 図 2 】

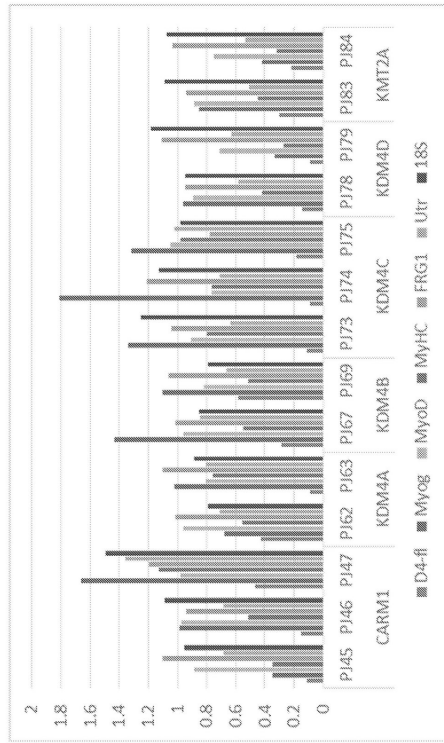


図 2

10

20

【 図 3 】

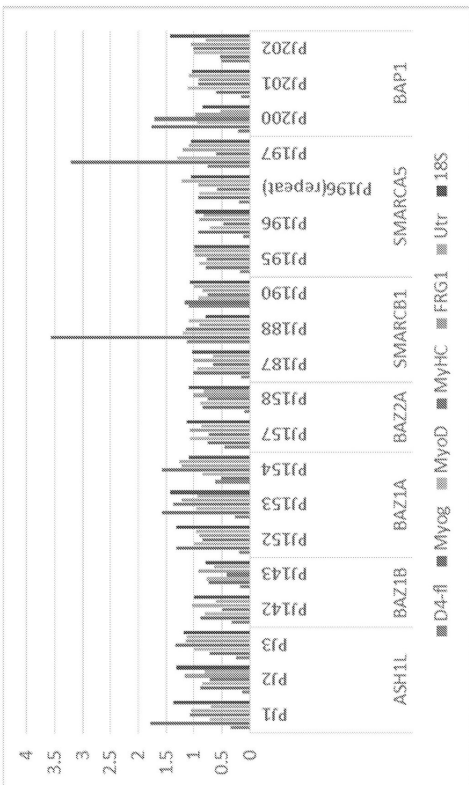
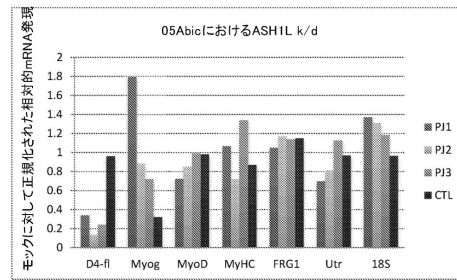


図 3

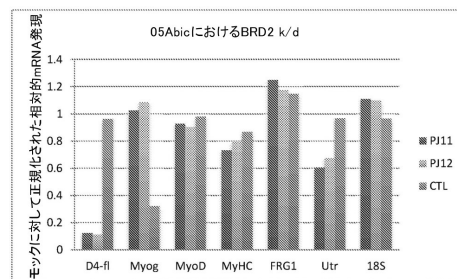
【 図 4 A - B 】

図 4A



30

図 4B



40

50

【 図 4 C - D 】

図 4C

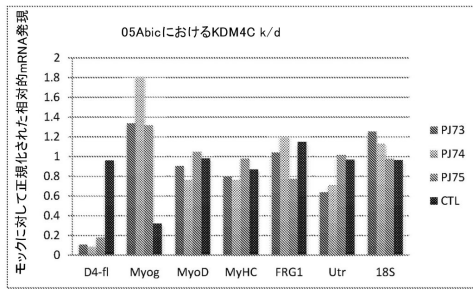
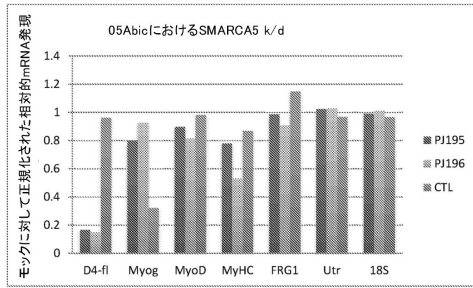
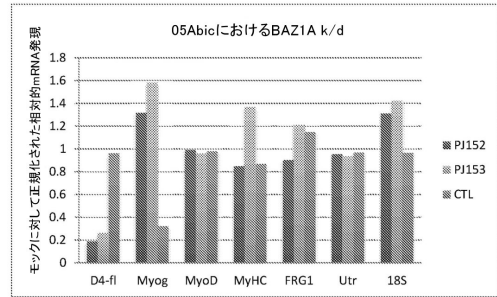


図 4D



【 図 4 E 】

図 4E



10

20

【 図 5 】

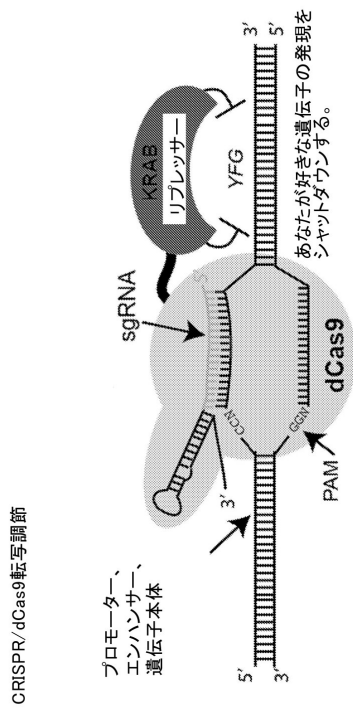


図 5

【 図 6 】

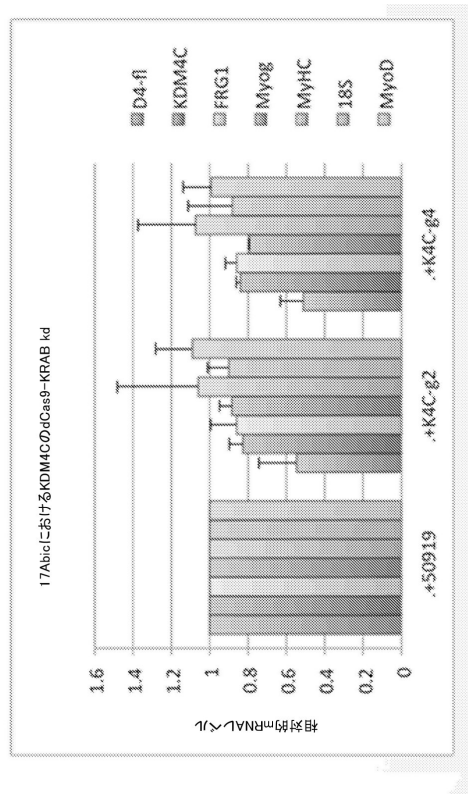


図 6

30

40

50

【 図 7 】

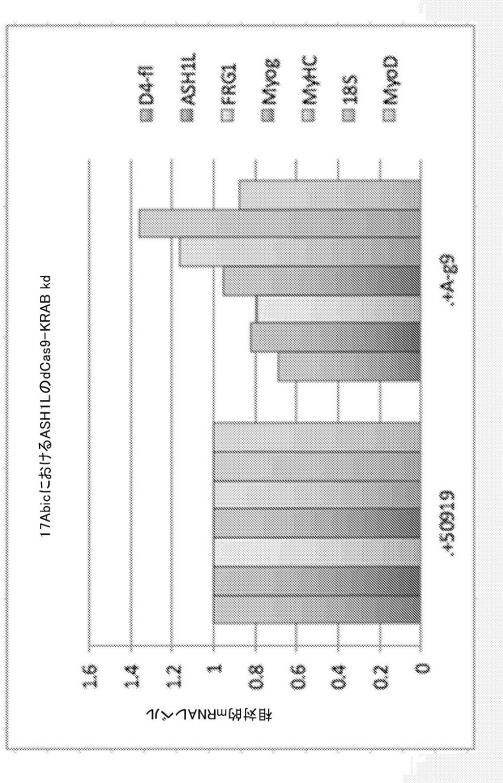


図 7

【 図 8 】

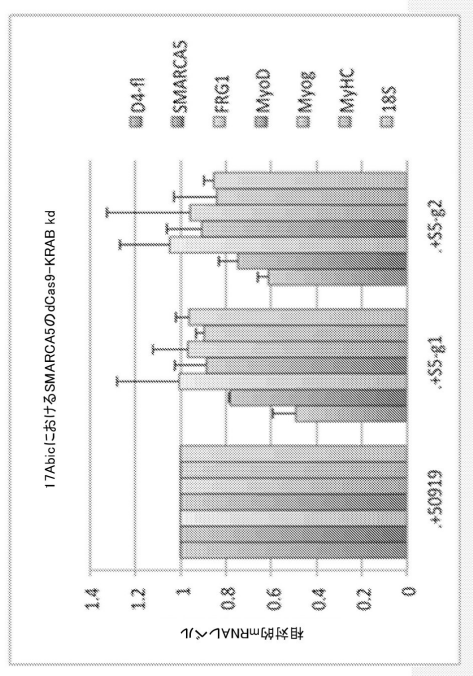


図 8

【 図 9 】

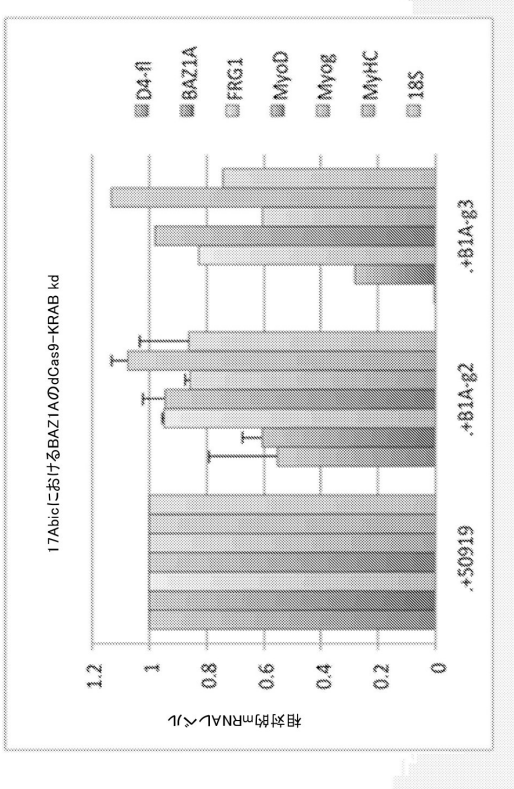


図 9

【 図 10 】

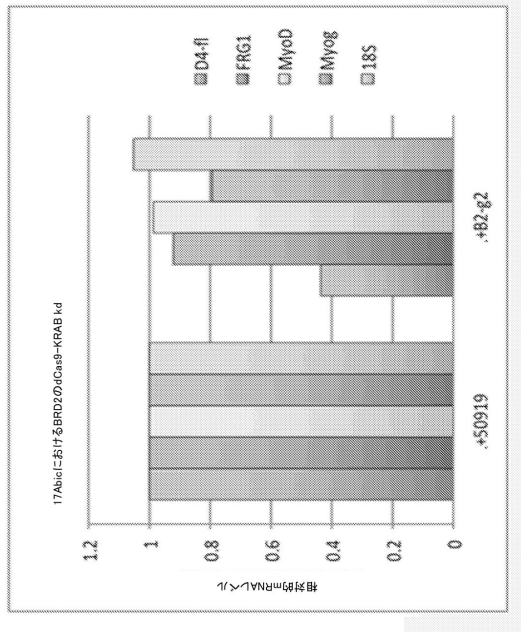


図 10

10

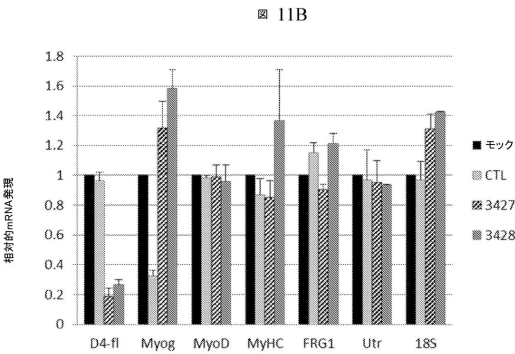
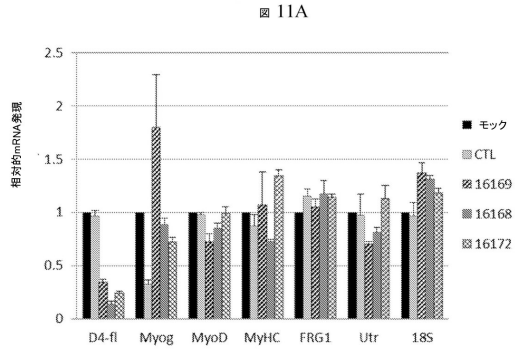
20

30

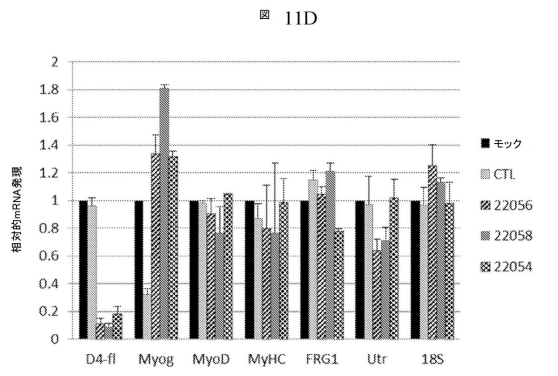
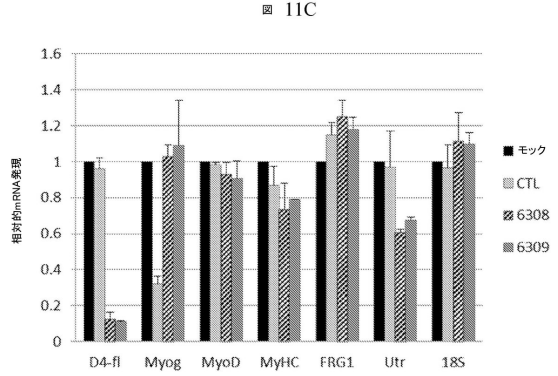
40

50

【図 1 1 A - B】



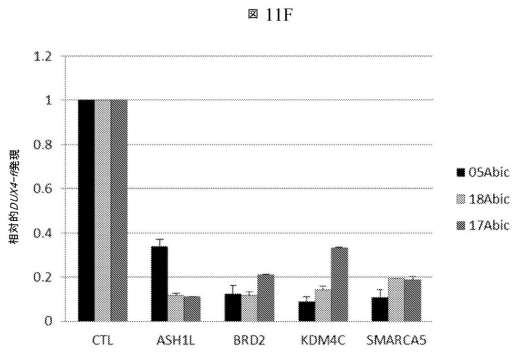
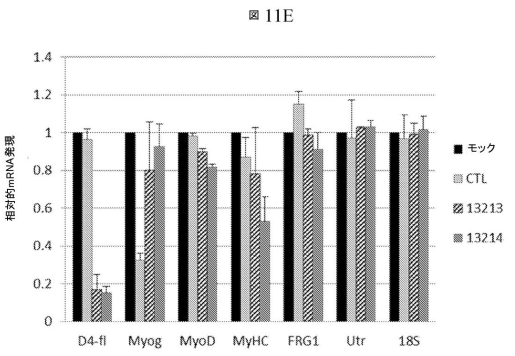
【図 1 1 C - D】



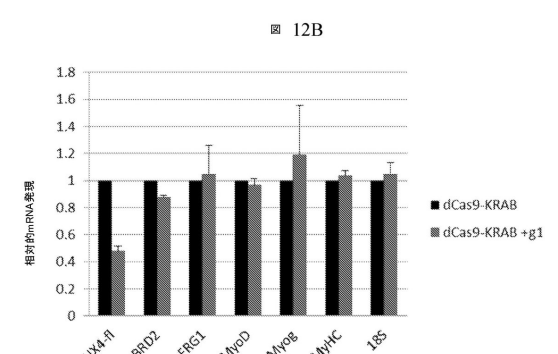
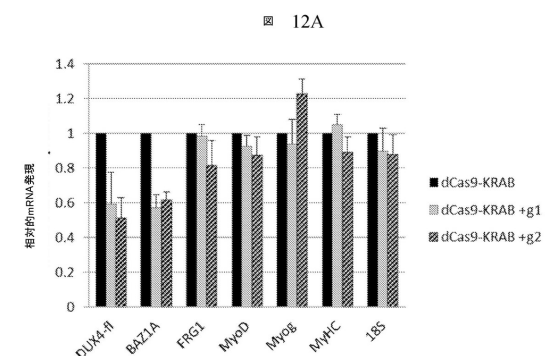
10

20

【図 1 1 E - F】



【図 1 2 A - B】

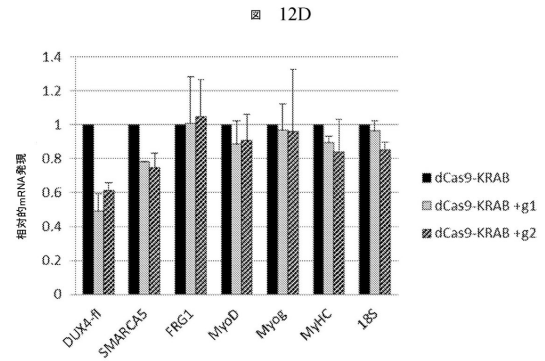
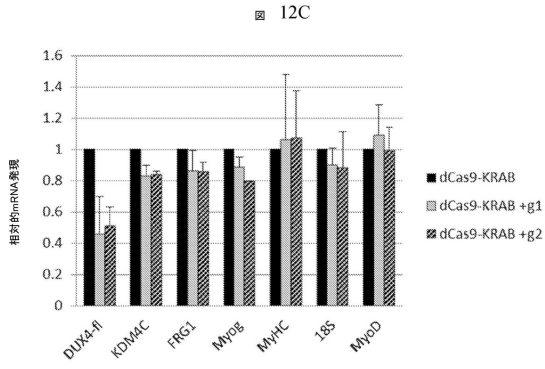


30

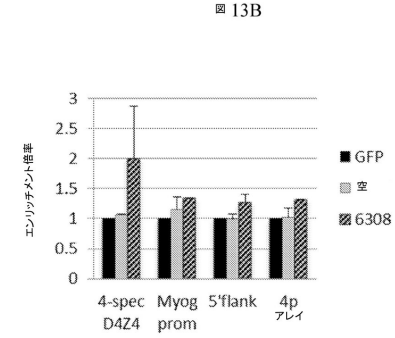
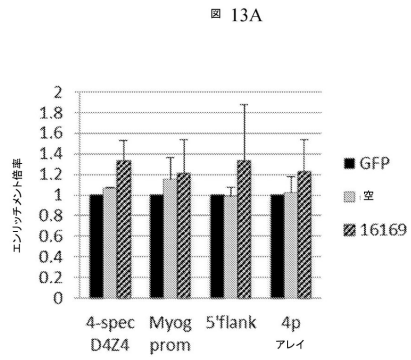
40

50

【 1 2 C - D 】



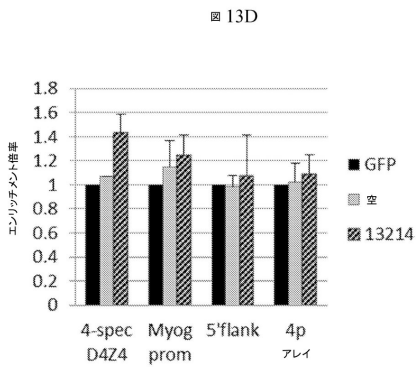
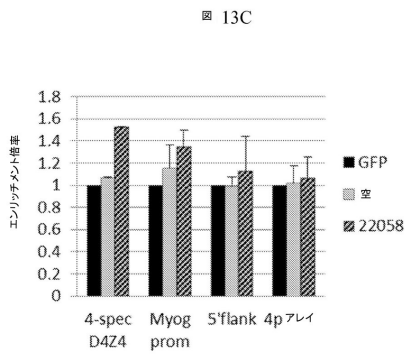
【 1 3 A - B 】



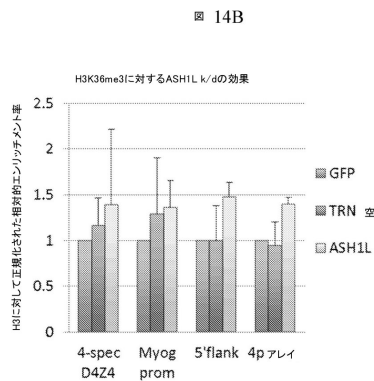
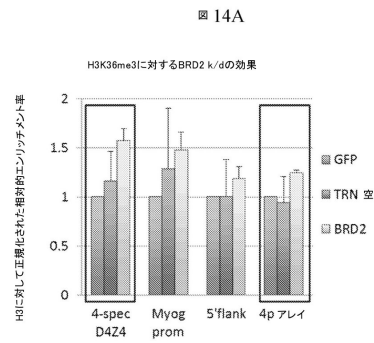
10

20

【 1 3 C - D 】



【 1 4 A - B 】



30

40

50

【 図 1 4 C - D 】

図 14C

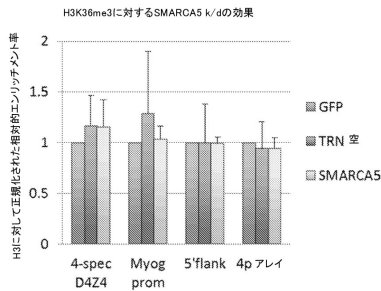
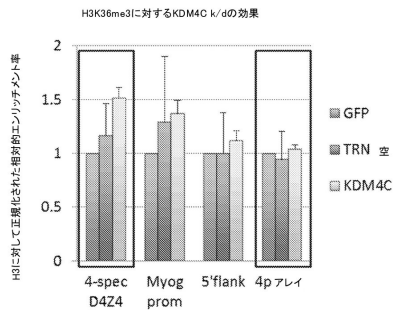
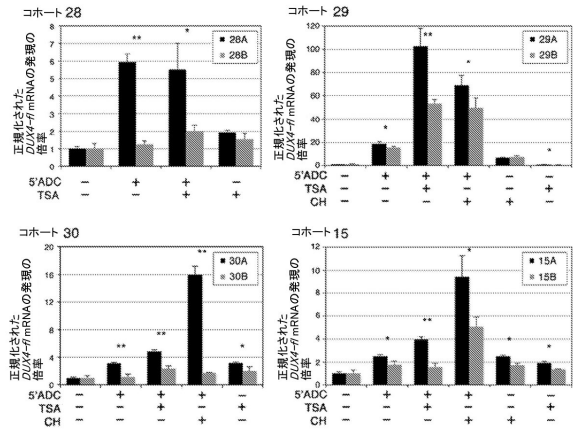


図 14D



【 図 1 5 】

図 15

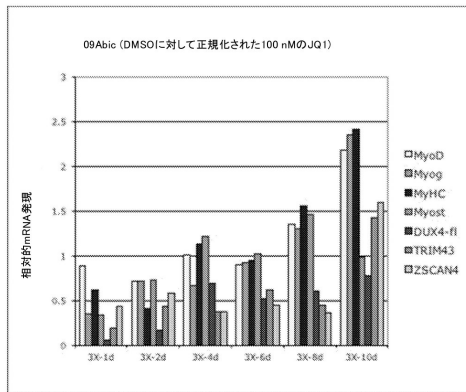


10

20

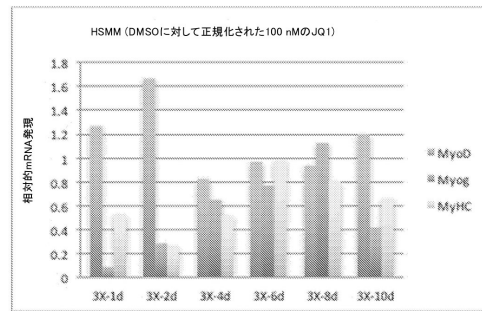
【 図 1 6 】

図 16



【 図 1 7 】

図 17



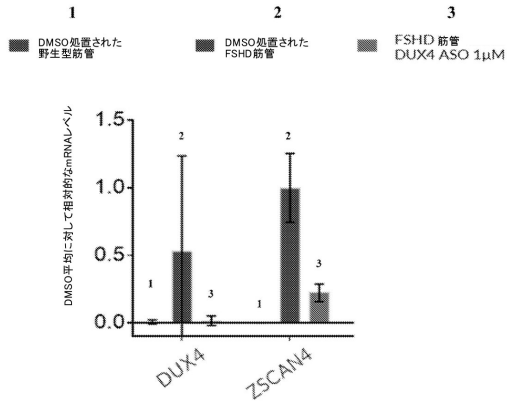
30

40

50

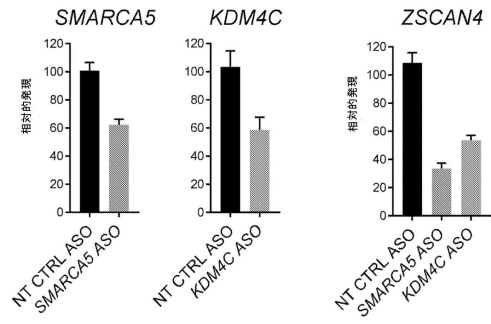
【 図 18 】

図 18



【 図 19 】

図 19



10

【 配列表 】

000723122600001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01505、ボイルストン、グリーン ストリート 368

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0087636(US, A1)

上原記念生命科学財団研究報告集, (2018), 32, Report.159, https://www.ueharazaidan.or.jp/houkokushu/Vol.32/pdf/report/159_report.pdf

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 45/00

A61K 31/00 - 31/80

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)