

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7361701号
(P7361701)

(45)発行日 令和5年10月16日(2023.10.16)

(24)登録日 令和5年10月5日(2023.10.5)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 15/864(2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	Z N A
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
請求項の数 26 (全59頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-540722(P2020-540722)	(73)特許権者	515289842
(86)(22)出願日	平成31年1月30日(2019.1.30)		リサーチ インスティテュート アット
(65)公表番号	特表2021-512072(P2021-512072 A)		ネーションワイド チルドレンズ ホスピタル
(43)公表日	令和3年5月13日(2021.5.13)		アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5 ,
(86)国際出願番号	PCT/US2019/015779		コロンバス, チルドレンズ ドライブ
(87)国際公開番号	WO2019/152474		7 0 0 , ルーム ダブルユー 1 7 2
(87)国際公開日	令和1年8月8日(2019.8.8)	(74)代理人	100078282
審査請求日	令和4年1月28日(2022.1.28)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	62/624,616	(74)代理人	100113413
(32)優先日	平成30年1月31日(2018.1.31)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 肢帯型筋ジストロフィー 2 C 型のための遺伝子治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体において サルコグリカン異常症の処置、筋力、筋持久力、および/もしくは筋量の増加；または線維症の低減、または収縮誘発性損傷の低減において使用するための、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む組成物であって、前記 rAAVベクターが、配列番号 1 または配列番号 3 に記載するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む、組成物。

【請求項 2】

筋ジストロフィーに罹患している被験体において筋ジストロフィーもしくは筋線維の萎縮および肥大の処置；変性線維、壊死線維、もしくは炎症の低減；クレアチンキナーゼレベルの上昇；またはジストロフィー性石灰化の減少において使用するための、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む組成物であって、前記 rAAVベクターが、配列番号 1 または配列番号 3 に記載するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む、組成物。

【請求項 3】

被験体において脂肪浸潤または中心核形成の減少において使用するための、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む組成物であって、前記 rAAVベクターが、配列番号 1 または配列番号 3 に記載するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む、組成物。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 1 または配列番号 3 に記載するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記 r A A V ベクターが、自己相補性 A A V ベクターゲノムを含む、A A V r e p および c a p DNA を欠くゲノムを含む；血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V r h 7 4 のベクター、またはこれらのバリエーションである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

10

【請求項 7】

前記 r A A V ベクターが、血清型 A A V r h 7 4 のベクターであり；前記 r A A V ベクターが、A A V r h . 7 4 カプシドを含む、請求項 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

前記 A A V r h . 7 4 カプシドが、配列番号 10 に記載するアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記 r A A V ベクターの前記ゲノムが、筋特異的制御エレメントを含み； サルコグリカン をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記筋特異的制御エレメントに動作可能に結合している、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

20

【請求項 10】

前記筋特異的制御エレメントが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 m e f、筋クレアチンキナーゼ (M C K)、切断型 M C K (t M C K)、ミオシン重鎖 (M H C)、M H C K 7、C 5 - 1 2、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニン c 遺伝子エレメント、遅筋トロポニン I 遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメント、およびグルココルチコイド応答エレメント (g r e) からなる群より選択される、請求項 9 に記載の使用のための組成物。

【請求項 11】

前記筋特異的制御エレメントが、切断型 M C K (t M C K) である、請求項 9 に記載の使用のための組成物。

30

【請求項 12】

前記プロモーターが、M H C K 7 プロモーターである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【請求項 13】

前記 M H C K 7 プロモーターが、配列番号 4 に記載するヌクレオチド配列を含む、請求項 12 に記載の使用のための組成物。

【請求項 14】

前記 r A A V ベクターの前記ゲノムが、配列番号 5 に記載するヌクレオチド配列を含むイントロンを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

40

【請求項 15】

前記被験体が、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【請求項 16】

前記肢帯型筋ジストロフィーが、肢帯型筋ジストロフィー 2 C 型である、請求項 15 に記載の使用のための組成物。

【請求項 17】

前記使用が、前記 r A A V ベクター、または前記 r A A V ベクターおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を、筋肉内注射または静脈内注射により投与する；全身投与する

50

、または注射、輸注、もしくは移植により非経口投与するステップを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【請求項 18】

前記使用が、前記被験体の 1 つまたは複数の筋肉の筋力、筋持久力、および/または筋量を増加させる、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【請求項 19】

1 つまたは複数の前記筋肉が、心臓、横隔膜、大腿、下腿、骨盤帯、肩、および腕からなる群より選択される、請求項 18 に記載の使用のための組成物。

【請求項 20】

筋力、筋持久力、および/または筋量が、未処置対照被験体と比較して少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 50%、または少なくとも 80% 増加する、請求項 18 または請求項 19 に記載の使用のための組成物。

10

【請求項 21】

AAV カプシド、およびプロモーターの転写制御下で サルコグリカン をコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含む、組換え AAV (rAAV) ベクターであって、 サルコグリカン をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 1 または配列番号 3 に記載するヌクレオチド配列を含む、 rAAV ベクター。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の rAAV ベクターを含む組成物。

【請求項 23】

薬学的に許容される担体を含む、請求項 22 に記載の組成物。

20

【請求項 24】

請求項 21 に記載の rAAV ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 25】

請求項 22 もしくは 23 に記載の組成物およびコルチコステロイドを含む、併用療法のための医薬。

【請求項 26】

請求項 22 もしくは請求項 23 に記載の組成物または請求項 25 に記載の医薬を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連特許出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下、2018 年 1 月 31 日出願の米国特許仮出願第 62 / 624 , 616 号への優先権を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出されている配列表を含み、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。2019 年 1 月 25 日に作成された前記 ASCII のコピーは、106887-7141_S L . t x t と名付けられ、18,760 バイトのサイズである。

40

【0003】

本発明は、遺伝子治療に関する。より詳細には、本開示では、筋ジストロフィー、例えば、肢帯型ジストロフィー 2C 型 (LGMD2C) を処置するための、遺伝子治療ベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを提供する。

【背景技術】

【0004】

筋ジストロフィー (MD) は、遺伝性疾患の 1 つの群である。この群は、運動を制御する骨格筋の進行性衰弱および変性により特徴づけられる。乳児期または小児期に発生する

50

型のMDも存在すれば、中年以降まで現れない可能性のある型のMDも存在する。この障害は、筋衰弱の分布および程度の点で異なり、一部のMD型はまた、心筋、発症年齢、進行速度、および遺伝のパターンに影響する。

【0005】

MDの1つの群は、MDの肢帯型の群(LGMD)である。LGMDは、まれな状態であり、発症年齢、筋衰弱の部位、心臓および呼吸器への影響、進行速度ならびに重症度に関して、異なる人々において異なって現れる。LGMDは、小児期、思春期、青年期またはさらにそれ以降に始まり得る。男女ともに平等に発症する。LGMDは、肩および骨盤帯の衰弱を引き起こし、大腿および腕の付近の筋肉も経時的に衰弱していくことがある。脚の衰弱は、腕が衰弱する前に現れることが多い。顔面筋では、通常、発症しない。状態が進行するにつれて、発症した個体は、歩行に問題を生じる可能性があり、徐々に車椅子を使用する必要がある可能性がある。肩および腕の筋肉への影響は、頭上に腕を上げること、および物を持ち上げることに困難を生じ得る。一部の型のLGMDでは、心筋および呼吸筋に影響し得る。

10

【0006】

LGMD2C(肢帯型ジストロフィー2C型)は、ガンマ()サルコグリカン(SGCG)の欠損により引き起こされる。他のサルコグリカン異常症と同様に、これは、進行性筋ジストロフィーとして現れ、肢帯筋から開始した後、下肢および最終的には上肢の筋肉に広がる。症状は、10代半ばから後半に典型的に発生する。LGMD2Cを処置しようとする試みにおいて、コルチコステロイドをも含む、いかなる形態の薬物治療によっても、疾患の経過を変えることはできていない。

20

【0007】

LGMD2Cおよび他の筋ジストロフィーに罹患している患者における機能的向上は、遺伝子修復と線維症の低減の両方を必要とする。当技術分野において、LGMD2Cおよび他の筋ジストロフィーを処置するための、組成物および方法が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

サルコグリカンをコードする、遺伝子治療ベクター、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、およびサルコグリカンをコードするこのようなベクターを筋肉に送達して、筋ジストロフィーに罹患している哺乳動物被験体において、線維症を低減もしくは予防し、筋機能を維持もしくは向上させ、筋力(muscular force)を増加させ、筋持久力(muscle endurance)を増加させ、またはサルコグリカン異常症を処置する方法を本明細書において記載する。

30

【0009】

加えて、本開示では、遺伝子治療ベクターを使用して、サルコグリカンを送達して、LGMD2C(肢帯型ジストロフィー2C型)に認められる遺伝子欠陥に対処する、治療およびアプローチを提供する。一態様では、それを必要とする被験体における、サルコグリカン異常症の処置、筋力、筋持久力、および/もしくは筋量の増加、線維症の低減、収縮誘発性損傷の低減、脂肪浸潤の減少、ならびに/または中心核形成(central nucleation)の減少、ならびに/あるいは筋ジストロフィーに罹患している被験体における、筋ジストロフィーの処置、変性線維もしくは壊死線維の低減、炎症の低減、クレアチンキナーゼレベルの上昇、筋線維の萎縮および肥大の処置、ならびに/またはジストロフィー性石灰化の減少のうちの1つまたは複数のための方法であって、方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法を本明細書にお

40

50

いて提供する。

【0010】

一態様では、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる組換えAAV(rAAV)ベクターを本明細書において記載する。一部の実施形態では、サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1に記載するヌクレオチド配列と例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはこれを超えて同一の配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、サルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードする。一部の実施形態では、サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1に記載するヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。一部の実施形態では、サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1に記載するヌクレオチド配列、または配列番号1に記載するヌクレオチド配列と例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはこれを超えて同一の配列からなり、サルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードし、これは一態様では、サルコグリカンをコードする野生型ヒトポリヌクレオチドの対応するヌクレオチドと比較して、配列番号1のヌクレオチドの変化を保持する。

10

20

【0011】

別の態様では、本明細書に記載するrAAVベクターは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には少なくとも90%、91%、92%、93%または94%、およびさらにより典型的には少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する、サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、このタンパク質は、サルコグリカン活性を保持する。

30

【0012】

サルコグリカン活性は、筋機能に重要である。サルコグリカンは、ジストロフィンと相互作用し、ジストロフィン-糖タンパク質複合体を形成する、いくつかの筋細胞膜貫通糖タンパク質のうちの一つであり、これは、筋細胞膜にわたり、ジストロフィン、シントロフィン、ジストログリカンおよびジストログリカン、ならびにサルコグリカンを含むサルコグリカンで構成される。ジストロフィン-糖タンパク質複合体は、筋細胞膜下細胞骨格と筋細胞の細胞外基質との間に構造的結合をもたらす。筋細胞の非限定的な例としては、心臓、横隔膜、脚、骨盤帯、肩および腕の筋細胞が挙げられる。サルコグリカン活性のさらなる非限定的な例およびサルコグリカン異常症の結果は、Blake et al. (2002) *Physiol Rev.*; 82(2): 291-329およびTarakci et al. (2016) *Front Biosci (Landmark Ed)*; 21: 744-56に記載されている。

40

【0013】

別の態様では、本明細書に記載するrAAVベクターは、発現が筋肉に制限されるように、プロモーターおよび/または筋特異的制御エレメントに動作可能に結合していてもよい。例えば、筋特異的制御エレメントは、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント(GenBank受託番号NG_006672.1)、心筋アクチン遺伝子エレメント(GenBank受託番号NG_007553.1)、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF(GenBank受託番号NG_016443.2)、筋クレアチンキナーゼ(MCK)(

50

GenBank 受託番号 AF188002.1)、tMCK (切断型MCK)、ミオシン重鎖 (MHC)、MHCK7 (MHCおよびMCKのハイブリッドバージョン)、C5-12 (合成プロモーター)、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメントまたはグルココルチコイド応答エレメント (GRE) である。

【0014】

一部の実施形態では、筋特異的プロモーターは、MHCK7 (配列番号4) またはその等価物である。本明細書に記載する、例となるrAAVベクターは、配列番号3のヌクレオチド配列もしくはその等価物を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになるpAAV.MHCK7.hSCGCであり、この場合、このMHCK7プロモーターがヌクレオチド136~927にわたり、CMVイントロンがヌクレオチド937~1084にわたり、サルコグリカン配列がヌクレオチド1094~1968にわたり、ポリAがヌクレオチド1976~2028にわたる。ある特定の場合では、pAAV.MHCK7.hSCGCは、AAV rh74カプシドにパッケージングされる。

10

【0015】

AAVは、任意の血清型、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13またはAAV rh74であり得る。一部の実施形態では、rAAVベクターは、AAV2の逆位末端反復 (ITR) 配列を含む。

20

【0016】

偽型rAAVの生成は、例えば、国際公開第01/83692号に記載されている。また、他の型のrAAV改変体、例えば、カプシドの変異を有するrAAVが、検討されている。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014)を参照されたい。

【0017】

また、本明細書に記載するrAAVベクターのいずれかを含むか、またはこれから本質的になる組成物を検討する。

【0018】

また、組換えAAVベクター粒子を生成する方法であって、本明細書に記載する任意の組換えAAVベクターをトランスフェクトした細胞を培養するステップ、およびトランスフェクトした細胞の上清から組換えAAV粒子を回収するステップを含む方法を提供する。また、本明細書に記載する組換えAAVベクターのいずれかを含むか、またはこれから本質的になるウイルス粒子を検討する。

30

【0019】

また、それを必要とする哺乳動物被験体において線維症を低減する方法を提供する。この点に関しては、方法は、治療有効量の本明細書に記載するAAVベクター (または本明細書に記載するAAVベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物) を哺乳動物被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。一部の実施形態では、哺乳動物被験体は、筋ジストロフィーに罹患している。一部の実施形態では、本明細書に記載するAAVベクター (または本明細書に記載するAAVベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物) を投与すると、被験体の骨格筋または心筋において線維症が低減される。

40

【0020】

別の態様では、哺乳動物被験体において筋力または筋量または筋持久力を増加させる方法であって、治療有効量の本明細書に記載するAAVベクター (または本明細書に記載するAAVベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物) を哺乳動物被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる方法を本明細書において記載する。

【0021】

50

本開示の方法のいずれかでは、被験体は、筋ジストロフィー、例えば、肢帯型筋ジストロフィーまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィーに罹患している可能性がある。

【0022】

また、哺乳動物被験体において筋ジストロフィーを処置する方法であって、治療有効量の本明細書に記載するAAVベクター（または本明細書に記載するAAVベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物）を哺乳動物被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる方法を提供する。一部の実施形態では、筋ジストロフィーは、肢帯型ジストロフィーである。

【0023】

本開示の方法のいずれかでは、rAAVは、適切な任意の投与様式、例えば、筋肉内注射または静脈内注射により投与する。加えて、本開示の方法のいずれかでは、rAAVは、全身投与し、例えば、注射、輸注または移植により非経口投与する。

【0024】

本開示の組成物は、筋肉内注射または静脈内注射用に製剤化する。加えて、本開示の組成物は、全身投与、例えば、注射、輸注または移植による非経口投与用に製剤化する。

【0025】

加えて、組成物のいずれかは、筋ジストロフィー（例えば、肢帯型筋ジストロフィーまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィー）に罹患している被験体への投与用に製剤化する。また、本明細書に記載する組成物の1つまたは複数およびコルチコステロイドを含むか、またはこれから本質的になる併用療法を本明細書において記載する。本開示のrAAVベクターを含む宿主細胞を本明細書において提供する。本明細書に開示する1つまたは複数の実施形態のいずれか、および使用のための指示を含むキットを本明細書において、さらに提供する。キットは、本明細書に開示する組成物の1つもしくは複数およびコルチコステロイド、または本明細書において提供する併用療法の1つもしくは複数を含み得るか、またはこれから本質的になり得る。本開示の使用のいずれかでは、医薬は、投与用、例えば、筋肉内注射または静脈内注射用に製剤化する。加えて、本開示の使用のいずれかでは、医薬は、全身投与、例えば、注射、輸注または移植による非経口投与用に製剤化する。加えて、医薬のいずれかは、筋ジストロフィー（例えば、肢帯型筋ジストロフィーまたは任意の他のジストロフィン関連筋ジストロフィー）に罹患している被験体への投与用に調製し得る。

【0026】

前述の段落では、本発明のあらゆる態様を定義することを意図しておらず、さらなる態様は、他の節、例えば、発明を実施するための形態において記載する。文書全体は、統合された開示として言及することを意図しており、特徴の組合せが、この文書の同一の文、または段落、または節中にも見出されなくても、本明細書に記載する特徴のすべての組合せを検討していることが理解されるべきである。本発明は、さらなる態様として、上記の特定の段落により定義された変形形態よりも範囲が多少制限された、本発明のすべての実施形態を含む。例えば、1つの属として記載される本発明のある特定の態様の場合では、1つの属のあらゆるメンバーが、それぞれに、本発明の態様であることが理解されるべきである。

特定の~~実施形態~~では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

被験体においてサルコグリカン異常症を処置する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目2)

被験体において筋力、筋持久力、および/または筋量を増加させる方法であって、前記

10

20

30

40

50

方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目3)

被験体において線維症を低減する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

10

(項目4)

被験体において収縮誘発性損傷を低減する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目5)

筋ジストロフィーに罹患している被験体において筋ジストロフィーを処置する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

20

(項目6)

筋ジストロフィーに罹患している被験体において変性線維または壊死線維を低減する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目7)

筋ジストロフィーに罹患している被験体において炎症を低減する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

30

(項目8)

筋ジストロフィーに罹患している被験体においてクレアチンキナーゼレベルを上昇させる方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

40

(項目9)

筋ジストロフィーに罹患している被験体において筋線維の萎縮および肥大を処置する方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目10)

筋ジストロフィーに罹患している被験体においてジストロフィー性石灰化を減少させる方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写

50

制御下で サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目11)

被験体において脂肪浸潤を減少させる方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

(項目12)

被験体において中心核形成を減少させる方法であって、前記方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを前記被験体に投与するステップを含み、前記rAAVベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含み、前記カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、方法。

10

(項目13)

サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号1と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む、項目1~12のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号1に記載するヌクレオチド配列を含む、項目13に記載の方法。

20

(項目15)

前記rAAVベクターが、自己相補性AAVベクターゲノムを含む、項目1~14のいずれか1項に記載の方法。

(項目16)

前記rAAVベクターが、AAV repおよびcap DNAを欠くゲノムを含む、項目1~15のいずれか1項に記載の方法。

(項目17)

前記rAAVベクターが、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13またはAAV rh74のベクターである、項目1~16のいずれか1項に記載の方法。

30

(項目18)

前記rAAVベクターが、血清型AAV rh74のベクターであり、前記rAAVベクターが、AAV rh.74カプシドを含む、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記AAV rh.74カプシドが、配列番号10に記載するアミノ酸配列を含む、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記rAAVベクターの前記ゲノムが、筋特異的制御エレメントを含み、サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記筋特異的制御エレメントに動作可能に結合している、項目1~19のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目21)

前記筋特異的制御エレメントが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子mef、筋クレアチンキナーゼ(MCK)、切断型MCK(tMCK)、ミオシン重鎖(MHC)、MHCK7、C5-12、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメント、およびグルココルチコイド応答エレメント(gre)からなる群より選択される、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記筋特異的制御エレメントが、切断型MCK(tMCK)である、項目21に記載の

50

方法。

(項目 23)

前記プロモーターが、MHCK7プロモーターである、項目1～22のいずれか1項に記載の方法。

(項目 24)

前記MHCKプロモーターが、配列番号3に記載するヌクレオチド配列を含む、項目23に記載の方法。

(項目 25)

前記rAAVベクターの前記ゲノムが、配列番号5に記載するヌクレオチド配列を含むイントロンを含む、項目1～24のいずれか1項に記載の方法。

(項目 26)

サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号2のアミノ酸配列をコードする、項目1～25のいずれか1項に記載の方法。

(項目 27)

前記rAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を投与するステップを含む、項目1～26のいずれか1項に記載の方法。

(項目 28)

前記被験体が、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している、項目1～27のいずれか1項に記載の方法。

(項目 29)

前記肢帯型筋ジストロフィーが、肢帯型筋ジストロフィー2C型である、項目28に記載の方法。

(項目 30)

前記rAAVベクター、または前記rAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含む前記組成物を、筋肉内注射または静脈内注射により投与するステップを含む、項目1～29のいずれか1項に記載の方法。

(項目 31)

前記rAAVベクター、または前記rAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含む前記組成物を、全身投与するステップを含む、項目1～30のいずれか1項に記載の方法。

(項目 32)

前記rAAVベクター、または前記rAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含む前記組成物を、注射、輸注、または移植により非経口投与するステップを含む、項目1～31のいずれか1項に記載の方法。

(項目 33)

前記被験体の1つまたは複数の筋肉の筋力、筋持久力、および/または筋量を増加させる、項目1～32のいずれか1項に記載の方法。

(項目 34)

1つまたは複数の前記筋肉が、心臓、横隔膜、大腿、下腿、骨盤帯、肩、および腕からなる群より選択される、項目33に記載の方法。

(項目 35)

筋力、筋持久力、および/または筋量が、未処置対照被験体と比較して少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、または少なくとも約80%増加する、項目33または項目34に記載の方法。

(項目 36)

AAVカプシド、およびプロモーターの転写制御下でサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットを含む、組換えAAV(rAAV)ベクター。

(項目 37)

前記遺伝子発現カセットが、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する、項目3

10

20

30

40

50

6のrAAVベクター。

(項目38)

サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号1と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む、項目36または項目37に記載のrAAVベクター。

(項目39)

サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号1に記載するヌクレオチド配列を含む、項目36~38のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

(項目40)

血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13またはAAVrh74のベクターである、項目36~39のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

10

(項目41)

前記rAAVベクターのゲノムが、筋特異的制御エレメントを含み、前記ポリヌクレオチド配列が、前記筋特異的制御エレメントに動作可能に結合している、項目36~40のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

(項目42)

前記筋特異的制御エレメントが、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子mef、筋クレアチンキナーゼ(MCK)、切断型MCK(tMCK)、ミオシン重鎖(MHC)、MHCK7、C5-12、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋トロポニンi遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメント、およびグルココルチコイド応答エレメント(gre)からなる群より選択される、項目41に記載のrAAVベクター。

20

(項目43)

前記筋特異的制御エレメントが、切断型MCK(tMCK)である、項目42に記載のrAAVベクター。

(項目44)

前記プロモーターが、MHCK7である、項目36~43のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

30

(項目45)

前記MHCKプロモーターが、配列番号3に記載するヌクレオチド配列を含む、項目44に記載のrAAVベクター。

(項目46)

前記rAAVベクターの前記ゲノムが、配列番号5に記載するヌクレオチド配列を含む、項目36~45のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

(項目47)

サルコグリカンをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号2と少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一のアミノ酸配列をコードする、項目36~46のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

40

(項目48)

項目36~47のいずれか1項に記載のrAAVベクターを含む組成物。

(項目49)

薬学的に許容される担体を含む、項目48に記載の組成物。

(項目50)

被験体においてサルコグリカン異常症を処置するための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目51)

被験体において筋力、筋持久力、および/または筋量を増加させるための、項目48または項目49に記載の組成物。

50

(項目52)

被験体において線維症を低減するための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目53)

被験体において収縮誘発性損傷を低減するための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目54)

筋ジストロフィーに罹患している被験体における筋ジストロフィーのための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目55)

筋ジストロフィーに罹患している被験体において変性線維または壊死線維を低減するための、項目48または項目49に記載の組成物。

10

(項目56)

筋ジストロフィーに罹患している被験体において炎症を低減するための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目57)

筋ジストロフィーに罹患している被験体においてクレアチンキナーゼレベルを上昇させるための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目58)

筋ジストロフィーに罹患している被験体における筋線維の萎縮および肥大のための、項目48または項目49に記載の組成物。

20

(項目59)

筋ジストロフィーに罹患している被験体においてジストロフィー性石灰化を減少させるための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目60)

被験体において脂肪浸潤を減少させるための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目61)

被験体において中心核形成を減少させるための、項目48または項目49に記載の組成物。

(項目62)

乳酸リンゲル液(LRS)を含む、項目48~61のいずれか1項に記載の組成物。

30

(項目63)

項目36~47のいずれか1項に記載のrAAVベクターを含む、宿主細胞。

(項目64)

項目48~62のいずれか1項に記載の組成物およびコルチコステロイドを含む、併用療法。

(項目65)

項目48~62のいずれか1項に記載の組成物およびコルチコステロイドまたは項目64に記載の併用療法を含む、キット。

(項目66)

コルチコステロイドを含む、項目65に記載のキット。

40

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、コドン最適化完全長ヒトサルコグリカン(hSCGB)cDNA(配列番号1)を含むAAVベクター(scAAVrh74.MHCK7.hSGCG)を示す。構築物は、2つのAAV逆位末端反復(ITR)約100bpと隣接し、コドン最適化ヒトサルコグリカンcDNA(hSGCG)、キメライントロン(Intron)、合成ポリアデニル化シグナル(pA)を含み、骨格筋および心筋特異的MHCK7プロモーターにより駆動される。

【0028】

【図2】図2は、8週齢のBL6WTマウスおよびサルコグリカンノックアウト(

50

- S G K O) マウス由来の前脛骨 (T A) 筋のヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) 染色を示し、罹患マウスにおいてジストロフィー表現型を示す。

【 0 0 2 9 】

【 図 3 - 1 】 図 3 A ~ 3 C は、 *i n v i v o* でのベクター効力を示す。 *s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C G* を総用量 $3 e 1 0 v g$ で - S G K O マウスの前脛骨 (T A) 筋に注射した。図 3 A は、 - S G K O マウスにおける T A 筋の免疫蛍光染色を示す。ほぼ 1 0 0 % の サルコグリカンタンパク質発現が、筋細胞膜において、ベクター送達により生じた。図 3 B は、処置したマウス # 7 9 4、7 9 5 由来の注射した T A 筋における サルコグリカン発現についてのウエスタンブロットを示す。図 3 C は、対照野生型マウス (「 B L 6 W T T A 」) または未注射対照 - S G K O マウス (「 G S G K O T A 」) における T A 筋の免疫蛍光染色、ならびに未染色サンプル (「 G S G K O 、一次抗体なし」) を示す。

10

【 図 3 - 2 】 図 3 A ~ 3 C は、 *i n v i v o* でのベクター効力を示す。 *s c A A V r h 7 4 . M H C K 7 . h S G C G* を総用量 $3 e 1 0 v g$ で - S G K O マウスの前脛骨 (T A) 筋に注射した。図 3 A は、 - S G K O マウスにおける T A 筋の免疫蛍光染色を示す。ほぼ 1 0 0 % の サルコグリカンタンパク質発現が、筋細胞膜において、ベクター送達により生じた。図 3 B は、処置したマウス # 7 9 4、7 9 5 由来の注射した T A 筋における サルコグリカン発現についてのウエスタンブロットを示す。図 3 C は、対照野生型マウス (「 B L 6 W T T A 」) または未注射対照 - S G K O マウス (「 G S G K O T A 」) における T A 筋の免疫蛍光染色、ならびに未染色サンプル (「 G S G K O 、一次抗体なし」) を示す。

20

【 0 0 3 0 】

【 図 4 】 図 4 A ~ 4 B は、 B L 6 野生型 (W T) マウスにおける *i n v i v o* でのベクター効力および毒性を示す。図 4 A は、膜および細胞内染色により サルコグリカンの過剰発現を示す免疫蛍光染色を示す。図 4 B は、注射した L T A 筋において サルコグリカンの過剰発現を示すウエスタンブロットを示す。

【 0 0 3 1 】

【 図 5 】 図 5 は、 B L 6 野生型 (W T) マウスにおける *i n v i v o* でのベクター効力および毒性を示す。未注射および注射した B L 6 W T T A 筋の H & E 染色により毒性は示されず、中心核、壊死線維、炎症性浸潤、または線維性組織のいずれも完全に存在しない。

30

【 0 0 3 2 】

【 図 6 】 図 6 は、 T A、腓腹筋 (G A S)、四頭筋 (Q U A D)、殿筋 (G L U T)、 P S O A S、三頭筋、横隔膜、および心筋についての サルコグリカンの免疫蛍光染色を示し、 サルコグリカンの広範な発現を実証する。

【 0 0 3 3 】

【 図 7 】 図 7 は、 I V 効力組織の免疫蛍光染色を示す。種々の骨格筋、横隔膜、および心臓における サルコグリカンについての I F 染色により、 *s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G* の全身送達後 6 週に、陰性線維がほとんどない、ロバストな発現が実証される。

40

【 0 0 3 4 】

【 図 8 】 図 8 A ~ 8 B は、 I V 処置動物における S G C G の発現を示す。総用量 $1 e 1 3 v g$ の *s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G* を静脈内注射した S G C G - / - マウス由来の骨格筋、横隔膜、および心臓の免疫蛍光イメージングを、代表的 2 0 x 画像により示す (図 8 A)。ウエスタンブロットにより、 *s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G* を静脈内送達したマウス由来のすべての骨格筋および心臓における h S G C G 発現を示す (図 8 B)。

【 0 0 3 5 】

【 図 9 】 図 9 A ~ 9 B は、全身処置後の組織の組織学的評価を示す。 B L 6 W T、未処置 S G C G - / -、および A A V . M H C K 7 . h S G C G 処置 S G C G - / - マウスに

50

おけるTRIおよびDIA骨格筋のヘマトキシリン&エオシン染色により、処置後のジストロフィー病理の逆転が示される(図9A)。中心核形成を有する線維のパーセンテージの定量により、処置した筋肉の減少が示される。BL6 WT (n=5)、未処置SGCG-/-(n=6)、AAV.MHCK7.hSGCG処置(n=5)(図9B)。** = p < 0.001、**** = p < 0.0001。

【0036】

【図10-1】10A~10Fは、線維径の定量を示す。BL6 WT (n=5)、未処置SGCG-/-(n=6)、およびAAV.MHCK7.hSGCG処置SGCG-/-(n=5)マウスのGAS(図10A)、PSOAS(図10B)、およびTRI(図10C)における線維径の定量、および処置後の線維径分布の正規化を実施した。平均線維径は、未処置SGCG-/マウスのGAS(図10D)、PSOAS(図10E)、およびTRI(図10F)筋において減少し、SGCG-/マウスのAAV.MHCK7.hSGCG処置後の各筋肉においてWTのレベルまで増加する。**** = p < 0.0001。

10

【図10-2】10A~10Fは、線維径の定量を示す。BL6 WT (n=5)、未処置SGCG-/-(n=6)、およびAAV.MHCK7.hSGCG処置SGCG-/-(n=5)マウスのGAS(図10A)、PSOAS(図10B)、およびTRI(図10C)における線維径の定量、および処置後の線維径分布の正規化を実施した。平均線維径は、未処置SGCG-/マウスのGAS(図10D)、PSOAS(図10E)、およびTRI(図10F)筋において減少し、SGCG-/マウスのAAV.MHCK7.hSGCG処置後の各筋肉においてWTのレベルまで増加する。**** = p < 0.0001。

20

【0037】

【図11】図11A~11Cは、TAおよび横隔膜の生理学を示す。BL6 WT (n=5)、未処置SGCG-/-(n=6)、およびAAV.MHCK7.hSGCG処置(n=5)マウスのTAおよびDIA筋を正規化した比筋力(specific force)発生の測定に供した。TA筋を伸張性収縮損傷プロトコル(eccentric contraction injury protocol)に供した(図11A)。処置したSGCG-/マウスにおけるTA比筋力出力および収縮誘発性損傷に対する耐性の向上を観察した(図11B)。DIA比筋力出力は、処置したSGCG-/マウスにおいてWTのレベルまで回復した(図11C)。* = p < 0.05、**** = p < 0.0001。

30

【0038】

【図12】図12は、オープンフィールドのケージ活動のレーザーモニタリングを示す。xおよびy面における全歩行運動は、SGCG-/マウスにおいて減少し、AAV.MHCK7.hSGCG処置マウスにおいて向上する。BL6 WT (n=6)、未処置SGCG-/-(n=6)、およびAAV.MHCK7.hSGCG処置(n=5)。

【0039】

【図13】図13は、ベクターゲノムの体内分布を示す。1マイクログラムゲノムDNA(gDNA)あたりの平均vgコピーのベクターゲノム分布を、総用量1e13vgのscAAVrh.74.MHCK7.hSGCGのIV送達3カ月後に、SGCG-/マウス2匹由来の種々の組織において測定した。

40

【0040】

【図14】図14A~14Bは、血清ALTおよびASTの比較を示す。BL6 WTマウス(n=6)、未処置SGCG-/マウス(n=6)、およびAAV.MHCK7.hSGCG IV処置SGCG-/マウス(n=5)(総用量1e13vg)由来の血清を、生化学成分レベルについて解析した。肝臓酵素アルカリアミノトランスフェラーゼ(ALT、図14A)およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST、図14B)は、罹患SGCG-/マウスにおいて上昇し、処置後にWTレベル付近まで戻った。* = p < 0.05。破線は、正常範囲の下限および上限を表す。

50

【発明を実施するための形態】**【0041】**

本開示は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している個体における筋線維症の低減または完全な逆転のための、サルコグリカンを発現するポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターの投与に関する。実施例において実証するように、本明細書に記載するrAAVベクターを投与すると、ロックアウトマウスにおいてサルコグリカン発現が回復した。本明細書に記載するrAAVベクターを投与すると、伸張性収縮から防御され、力の発生が増加することにより、より少ない変性線維、炎症の低減、および機能回復の向上を含むジストロフィーの特徴が逆転する。本開示は、本明細書に記載するrAAVベクターを投与することによる、被験体(例えば、ヒト被験体)における肢帯型筋ジストロフィーの処置を包含する。

10

【0042】

本明細書では、任意の濃度の範囲、パーセンテージの範囲、比の範囲、または整数の範囲は、他に指示しない限り、列挙する範囲内の任意の整数の値、および適切な場合、この分率(例えば、整数の10分の1および100分の1)を含むと理解されるべきである。用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、本明細書において使用する場合、他に指示しない限り、列挙する成分の「1つまたは複数」を指すことが理解されるべきである。選択肢(例えば、「または」)の使用は、選択肢のいずれか1つ、両方、またはこれらの任意の組合せを意味すると理解されるべきである。本明細書において使用する場合、用語「含む(include)」および「含む(comprise)」は、同義的に使用する。本明細書において使用する場合、「複数」は、1つまたは複数の成分(例えば、1つまたは複数のmiRNA標的配列)を指し得る。本出願では、「または」の使用は、他の提示がない限り、「および/または」を意味する。

20

【0043】

本出願において使用する場合、用語「約(about)」および「約(approximately)」は、等価物として使用する。約(about/approximately)を使用して、または使用せずに、本出願において使用する任意の数字は、関連する技術分野の当業者により理解される、任意の正常変動を包含することを意味する。ある特定の実施形態では、用語「約(approximately)」または「約(about)」は、そうでないと提示しない限り、または文脈から、そうでないことが明白でない限り(このような数が可能値の100%を超える場合を除いて)、提示する基準値の両方向性で(それを超えて、またはそれ未満の)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはこれ未満に入る値の範囲を指す。

30

【0044】

「減少」または「低減」は、基準値と比較して少なくとも5%、例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特定の値の減少または低減を指す。また、特定の値の減少または低減は、基準値と比較した値の変化倍率、例えば、基準値と比較して少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000分の1またはこれを超える減少として表し得る。

40

【0045】

「増加」は、基準値と比較して少なくとも5%、例えば、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99、100、200、300、400、500%またはこれを超える特定の値の増加を指す。また、特定の値の増加は、基準値と比較した値の変化倍率、例えば、基準値のレベルと比較して少なくとも1倍、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍またはこれを超える増加として表し得る。

50

【 0 0 4 6 】

「相補性」は、天然に存在するまたは天然に存在しない（例えば、上記のように修飾した）塩基（ヌクレオチド）またはその類似体を含む2つの配列間の、塩基スタッキングおよび特異的水素結合により対形成するための能力を指す。例えば、核酸のある位置の塩基が、標的の対応する位置の塩基と水素結合可能である場合、塩基は、この位置で相互に相補性であると考えられる。核酸は、ユニバーサル塩基、または水素結合に正にも負にも寄与しない不活性脱塩基スペーサーを含み得る。塩基対形成は、正準のワトソン-クリック塩基対形成と非ワトソン-クリック塩基対形成（例えば、ゆらぎ塩基対形成およびフーグスティーン塩基対形成）の両方を含み得る。相補性塩基対形成では、アデノシン型塩基（A）が、チミジン型塩基（T）またはウラシル型塩基（U）に相補性であり、シトシン型塩基（C）が、グアノシン型塩基（G）に相補性であり、ユニバーサル塩基、例えば、3-ニトロピロールまたは5-ニトロインドールが、A、C、UまたはTのいずれかとハイブリダイズし、これに相補性であると考えられ得ることが理解される。Nichols et al., Nature, 1994; 369: 492-493およびLoakes et al., Nucleic Acids Res., 1994; 22: 4039-4043。また、イノシン（I）は、ユニバーサル塩基であると当技術分野において考えられており、A、C、UまたはTのいずれかに相補性であると考えられる。Watkins and Santa Lucia, Nucl. Acids Research, 2005; 33 (19): 6258-6267を参照されたい。

10

【 0 0 4 7 】

用語「被験体」は、動物、例えば、哺乳動物等を含む。一部の実施形態では、哺乳動物は、霊長類である。一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。一部の実施形態では、被験体は、家畜、例えば、ウシ類（cattle）、ヒツジ、ヤギ、ウシ（cow）、ブタ等、または飼育動物、例えば、イヌおよびネコである。一部の実施形態（例えば、特には、研究的文脈）では、被験体は、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、ウサギ、霊長類、またはブタ、例えば、近交系ブタ等である。用語「被験体」および「患者」は、本明細書において互換的に使用する。

20

【 0 0 4 8 】

「投与」は、本明細書において、薬剤または組成物を被験体に導入することを指す。

【 0 0 4 9 】

「処置」は、本明細書において使用する場合、薬剤または組成物を被験体に送達して、生理学的転帰に影響することを指す。一部の実施形態では、処置は、（a）疾患の阻害、例えば、疾患発生の停止または疾患進行の予防、（b）疾患の軽減、例えば、疾患状態の退行を引き起こすこと、（c）疾患の治癒、および（d）疾患発症の予防、例えば、遺伝的欠陥のキャリアであると同定された無症状の被験体における疾患発生の停止を含む、被験体、例えば、ヒトにおける疾患の処置を指す。一態様では、処置は、予防または防止を除外する。

30

【 0 0 5 0 】

疾患が筋ジストロフィーである場合、次の臨床エンドポイント：比筋力の減少、損傷に対する耐性の増加、筋力の増加、筋持久力の増加、筋量の増加、収縮誘発性損傷の低減、脂肪浸潤の減少、中心核形成の減少、変性線維もしくは壊死線維の低減、炎症の低減、クレアチンキナーゼレベルの上昇、筋線維の萎縮および肥大の減少ならびに/またはジストロフィー性石灰化の減少は、処置の非限定的な例である。

40

【 0 0 5 1 】

疾患が線維症である場合、次の臨床エンドポイント：線維性組織の低減、炎症の低減、線維芽細胞病変の低減、活性化線維芽細胞増殖の低減、筋線維芽細胞発生の低減、努力肺活量（FVC）の低下率の低減（ここで、FVCは肺機能検査中の呼気の総量である）、FVCのベースラインからの絶対的および相対的増加、FVCのベースラインからの絶対的増加（%予測）、無増悪生存期間の増加、セントジョージ呼吸器アンケート（SGRQ）総スコアのベースラインからの減少（ここで、SGRQは、3つの成分：症状、活性お

50

よび影響に分類される健康に関連した生活の質アンケートであり、総スコア（重みの合計）は、0～100の範囲に及び、スコアが低いほど健康状態が良好となることを表し得る）、ならびに高分解能コンピュータ断層撮影（HRC T）による定量的肺線維症（QLF）スコアのベースラインからの相対的減少（ここで、QLFスコアは、0～100%の範囲に及び、値が高いほど肺線維症の量が多くなることを表し、健康状態が悪化すると考えられる）は、処置の非限定的な例である。前記臨床エンドポイントを測定するために実施され得る、線維症の処置および試験の臨床エンドポイントの非限定的な例は、次の臨床試験：NCT03733444（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03733444）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT00287729（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287729）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT00287716（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287716）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT02503657（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02503657）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT00047645（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00047645）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT02802345（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02802345）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT01979952（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01979952）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT00650091（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00650091）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT01335464（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01335464）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT01335477（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01335477）（最終アクセス2019年1月9日）、NCT01366209（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01366209）（最終アクセス2019年1月9日）に記載されている。前記臨床エンドポイントを測定するために実施され得る、線維症の処置および試験の臨床エンドポイントのさらなる非限定的な例は、King et al., (2014) N Engl J Med. May 29; 370(22): 2083-92およびRicheldi et al., (2014) N Engl J Med. May 29; 370(22): 2071-82に記載されている。

【0052】

用語「有効量」または「治療有効量」は、特定の生理学的作用を生じるのに必要とされる薬剤または組成物の最小量（例えば、特定の生理学的作用の増加、活性化、または増強に必要とされる量）を指す。特定の薬剤の有効量または治療有効量は、薬剤の性質、例えば、質量/容量、細胞の数/容量、粒子数/容量、（薬剤の質量）/（被験体の質量）、細胞の数/（被験体の質量）、または粒子数/（被験体の質量）に基づく多様な方法により表し得る。また、特定の薬剤の有効量または治療有効量は、最大半量の有効濃度（EC₅₀）として表すことがあり、これは、基準レベルと最大応答レベルの間にある、特定の生理学的応答の大きさを生じる薬剤の濃度を指す。

【0053】

細胞の「集団」は、1を超える任意の数の細胞を指すが、好ましくは、少なくとも 1×10^3 細胞、少なくとも 1×10^4 細胞、少なくとも 1×10^5 細胞、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞、少なくとも 1×10^{10} 細胞、またはこれより多い細胞である。細胞の集団は、in vitroでの集団（例えば、培養下の細胞集団）またはin vivoでの集団（例えば、特定の組織に存在する細胞集団）を指す。

【0054】

句「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内にあり、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症もなく、ヒトおよび動物の組織と接触す

10

20

30

40

50

る使用に適し、合理的なベネフィット/リスク比に見合った、化合物、物質、組成物、および/または剤形を指すために、本明細書において用いる。

【0055】

本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤」は、ヒトおよび/または飼育動物における使用に許容されるものとして米国食品医薬品局により認可されている、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、保存剤、色素/着色剤、香味増強剤 (flavor enhancer)、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤を含むが、これらに限定されない。

【0056】

本明細書において使用する場合、「ベクター」は、1つまたは複数のウイルスタンパク質、例えば、ウイルスを被包するためのウイルスカプシドとともに、ウイルスペクターにより核酸分子を細胞に導入または輸送することが可能な核酸分子を指す。導入された核酸は一般に、ベクター核酸分子に結合しており、例えば、挿入されている。ベクターは、細胞内で自律複製もしくは逆転写を方向づける配列を含むことがあり、または宿主細胞DNAへの組込みを可能とするのに十分な配列を含むことがある。「ベクター」は、遺伝子治療ベクターを含む。本明細書において使用する場合、用語「遺伝子治療ベクター」は、遺伝子治療の実施、例えば、治療ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の被験体への送達における使用が可能なベクターを指す。遺伝子治療ベクターは、タンパク質、例えば、サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド(「導入遺伝子」)を含み得る。

【0057】

本明細書において使用する場合、用語「発現カセット」は、前記発現カセットに組み込むタンパク質(例えば、サルコグリカン)をコードするポリヌクレオチド(例えば、導入遺伝子)の発現を駆動する適切な設定において有能なDNA断片を指す。宿主細胞に導入する場合、とりわけ発現カセットは、導入遺伝子をRNAに転写し、次いで、これが通常さらにプロセッシングされ、最終的に、治療的に活性なポリペプチドに翻訳されるように細胞機構を方向づけることが可能である。遺伝子治療ベクターは、発現カセットを含むか、またはこれから本質的になり得る。用語、発現カセットは、5' ITRに対して5'にあるポリヌクレオチド配列および3' ITRに対して3'にあるポリヌクレオチド配列を除外する。本開示のrAAVベクターを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる宿主細胞を本明細書において提供する。細胞は、任意の適切な種、例えば、哺乳動物の細胞であり得る。

【0058】

本明細書において使用する場合、ポリヌクレオチドに関する句「動作可能に結合」または「転写制御下」は、プロモーター、または筋特異的制御エレメント、およびポリヌクレオチドがプロモーターに結合可能なポリメラーゼにより転写されることを可能とするポリヌクレオチドの構成を互換的に指す。一態様では、筋特異的制御エレメントは、発現を筋肉に制限するためのものである。筋特異的制御エレメントの非限定的な例は、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント(GenBank受託番号NG_006672.1)、心筋アクチン遺伝子エレメント(GenBank受託番号NG_007553.1)、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF(GenBank受託番号NG_016443.2)、筋クレアチンキナーゼ(MCK)(GenBank受託番号AF188002.1)、tMCK(切断型MCK)、ミオシン重鎖(MHC)、MHCK7(MHCおよびMCKのハイブリッドバージョン)、C5-12(合成プロモーター)、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメントまたはグルココルチコイド応答エレメント(GRE)である。

【0059】

分子細胞生物化学における一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al

10

20

30

40

50

. , HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kapliff & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); および Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998) のような標準的教科書に見出すことができ、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0060】

本明細書において使用する場合、用語「AAV」は、アデノ随伴ウイルスの標準的略称である。アデノ随伴ウイルスは、同時感染するヘルパーウイルスにより、ある特定の機能がもたらされる細胞のみにおいて増殖する、一本鎖DNAパルポウイルスである。AAVの一般的情報および総説は、例えば、Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169 - 228、および Berns, 1990, Virology, pp. 1743 - 1764, Raven Press, (New York) において見出すことができる。種々の血清型が、構造と機能の両方において、さらに遺伝子レベルにおいても、非常に密接に関連していることが周知であるため、このような総説に記載されている同一の原理が、総説の公開日後に特徴づけられた、さらなるAAV血清型に適用可能であることが十分に期待されている(例えば、Blacklowe, 1988, pp. 165 - 174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; および Rose, Comprehensive Virology 3: 1 - 61 (1974) を参照)。例えば、すべてのAAV血清型は、相同な rep 遺伝子により媒介される、非常に類似した複製特性を示すとみられ、すべては、3つの関連するカプシドタンパク質、例えば、AAV2において発現するカプシドタンパク質を有する。関連性の程度は、ヘテロ2本鎖解析によりさらに示唆され、これにより、ゲノム長による血清型間の大規模なクロスハイブリダイゼーション、および「逆位末端反復配列」(ITR) に対応する、類似性の自己アニーリングセグメントの末端における存在が明らかとなる。また、類似の感染パターンは、各血清型における複製機能が、類似の制御管理下にあることを示唆する。

20

30

【0061】

「AAVベクター」は、本明細書において使用する場合、AAV末端反復配列(ITR)と隣接する1つまたは複数の目的のポリヌクレオチド(または導入遺伝子)を含むベクターを指す。このようなAAVベクターは、repおよびcap遺伝子産物をコードし発現するベクターをトランスフェクトされている宿主細胞に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。

40

【0062】

「AAVピリオン」または「AAVウイルス粒子」または「AAVベクター粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質およびカプシド形成されたポリヌクレオチドAAVベクターで構成されるウイルス粒子を指す。粒子が異種ポリヌクレオチド(すなわち、野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド、例えば、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子)を含む場合、これは典型的に「AAVベクター粒子」または単に「AAVベクター」と呼ばれる。したがって、AAVベクター粒子の生成は、AAVベクターの生成を必然的に含み、したがって、ベクターは、AAVベクター粒子に含まれる。

【0063】

50

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、複製欠損パルボウイルスであり、この1本鎖DNAゲノムは、2つの逆位末端反復 (ITR) 145ヌクレオチドを含む、約4.7 kbの長さである。複数のAAV血清型が存在する。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、公知である。例えば、AAV-1の全ゲノムは、GenBank受託番号NC_002077により提供され、AAV-2の全ゲノムは、GenBank受託番号NC_001401およびSrivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983)により提供され、AAV-3の全ゲノムは、GenBank受託番号NC_1829により提供され、AAV-4の全ゲノムは、GenBank受託番号NC_001829により提供され、AAV-5ゲノムは、GenBank受託番号AF085716により提供され、AAV-6の全ゲノムは、GenBank受託番号NC_001862により提供され、AAV-7およびAAV-8ゲノムの少なくとも一部分は、GenBank受託番号AX753246およびAX753249によりそれぞれ提供され、AAV-9ゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)により提供され、AAV-10ゲノムは、Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006)により提供され、AAV-11ゲノムは、Virology, 330(2): 375-383 (2004)により提供されている。AAV rh.74ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,434,928号において提供されている。ウイルスDNA複製 (rep)、カプシド形成/パッケージングおよび宿主細胞染色体の組込みを方向づける cis作用配列は、AAV ITRに含まれる。3つのAAVプロモーター (それらの相対的マップ位置からp5、p19、およびp40と名付けられる) により、repおよびcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現が駆動される。2つのrepプロモーター (p5およびp19) は、(ヌクレオチド2107および2227で) 単一AAVイントロンの差次的スプライシングと組み合わせ、rep遺伝子からの4つのrepタンパク質 (rep78、rep68、rep52およびrep40) の産生を生じる。repタンパク質は、最終的にウイルスゲノム複製の原因となる、複数の酵素特性を有する。cap遺伝子は、p40プロモーターから発現し、3つのカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連するカプシドタンパク質の産生の原因となる。単一のコンセンサスポリアデニル化部位は、AAVゲノムのマップ位置95に位置する。AAVの生活環および遺伝学は、Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992) に総説が記載されている。

【0064】

AAVは、例えば、遺伝子治療において、外来DNAを細胞へ送達するためのベクターとして、これを魅力的とするユニークな特徴を有する。培養下の細胞のAAV感染は、非細胞傷害性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染は、サイレントであり無症候性である。その上、AAVは、多くの哺乳動物細胞に感染し、多種多様な組織をin vivoで標的とする可能性を与える。その上、AAVは、分裂および非分裂細胞に緩徐に形質導入し、このような細胞の生存期間中、転写的に活性な核エピソード (染色体外エレメント) として本質的に持続し得る。AAVプロウイルスゲノムは、クローン化DNAとしてプラスミドに挿入し、これにより組換えゲノムの構成が実現可能となる。さらに、AAV複製およびゲノムのカプシド形成を方向づけるシグナルがAAVゲノムのITRに含まれるため、内部の約4.3 kbのゲノム (複製および構造カプシドタンパク質、rep-capをコードする) の一部またはすべては、外来DNAで置換し得る。AAVベクターを生成するために、repおよびcapタンパク質をトランスに提供し得る。AAVの別の顕著な特徴は、これが非常に安定かつ強力なウイルスであることである。これは、アデノウイルスの不活化に使用される条件 (56 ° ~ 65 ° で数時間) に容易に耐え、AAVの低温保存がそれほど必要不可欠でなくなる。AAVは、さらに凍結乾燥し得る。最終的には、AAV感染細胞は、重感染に耐性ではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

複数の研究では、筋肉における長期 (> 1.5 年) の組換え AAV 媒介タンパク質発現を実証している。Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659 - 669 (1997); Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 14082 - 14087 (1996); および Xiao et al., J Virol, 70: 8098 - 8108 (1996) を参照されたい。また、Chao et al., Mol Ther, 2: 619 - 623 (2000) および Chao et al., Mol Ther, 4: 217 - 222 (2001) を参照されたい。その上、筋肉が高度に血管新生されるため、Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804 - 5809 (1997) および Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13921 - 13926 (1997) に記載するように、組換え AAV 形質導入により、筋肉内注射後に体循環において導入遺伝子産物の出現が生じた。その上、Lewis et al., J Virol, 76: 8769 - 8775 (2002) は、骨格筋筋線維が、正しい抗体グリコシル化、フォールディング、および分泌に必要な細胞因子を有することを実証し、筋肉が、分泌タンパク質治療薬を安定に発現させることが可能であることを示した。本開示の組換え AAV (rAAV) ゲノムは、サルコグリカンにコードする核酸分子 (例えば、配列番号 1) およびこの核酸分子と隣接する 1 つまたは複数の AAV ITR を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。rAAV ゲノムの AAV DNA は、組換えウイルスが由来し得る任意の AAV 血清型に由来することがあり、AAV 血清型 AAV - 1、AAV - 2、AAV - 3、AAV - 4、AAV - 5、AAV - 6、AAV - 7、AAV - 8、AAV - 9、AAV - 10、AAV - 11、AAV - 12、AAV - 13 および AAV rh74 を含むが、これらに限定されない。偽型 rAAV の生成は、例えば、国際公開第 01/83692 号に開示されている。また、他の型の rAAV 改変体、例えば、カプシド変異を有する rAAV が、検討されている。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900 - 1909 (2014) を参照されたい。種々の AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当技術分野において公知である。骨格筋特異的発現を促進させるために、AAV1、AAV5、AAV6、AAV8 または AAV9 を使用し得る。したがって、一態様では、プロモーターおよび/または筋特異的制御エレメントの転写制御下で、サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になる組換え AAV ベクターを本明細書において記載する。一部の実施形態では、サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 に記載する (表 1 を参照) コドン最適化ヒトサルコグリカンのヌクレオチド配列と例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88% または 89%、より典型的には 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% またはこれを超えて同一の配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、サルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードする。一部の実施形態では、サルコグリカンにコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 に記載するヌクレオチド配列、またはサルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードする配列番号 1 と例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88% もしくは 89%、より典型的には 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一の配列を含む。

【 0 0 6 6 】

用語「配列同一性」は、2 つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の塩基またはアミノ酸の、同一であり、同一の相対位置に存在するパーセンテージを指す。したがって、1 つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して、ある特定のパーセンテージの配列同一性を有する。配列比較

10

20

30

40

50

では、典型的に、1つの配列は、試験配列を比較する基準配列として作用する。用語「基準配列」は、試験配列を比較する分子を指す。ある特定のパーセンテージ（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%）の基準配列との「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、アラインメントする場合、試験配列における各位置の塩基（またはアミノ酸）のパーセンテージが、基準配列における同一の位置の塩基（またはアミノ酸）と同一であることを意味する。このアラインメントおよび相同性のパーセントまたは配列同一性は、当技術分野において公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ausubel et al., eds., (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*に記載されているものを使用して決定することができる。好ましくは、アラインメントのためにデフォルトのパラメータを使用する。1つのアラインメントプログラムは、BLASTであり、デフォルトのパラメータを使用する。特に、プログラムは、BLASTNおよびBLASTPであり、次のデフォルトパラメータ：Genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss Protein + SPUupdate + PIRを使用する。このようなプログラムの詳細は、次のインターネットアドレス：ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgiに見出すことができる。ポリペプチドまたはタンパク質の「等価物」は、その基準ポリペプチドまたはタンパク質との、ある特定の配列同一性（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の基準との同一性）を有し、基準ポリペプチドまたはタンパク質と比較して類似の活性または機能を保持するものである。

【0067】

「含む (comprising)」または「含む (comprises)」は、組成物、例えば、培地、および方法が、列挙した要素を含むが、他を除外しないことを意味することを意図する。「から本質的になる」は、組成物および方法を定義するために使用する場合、提示された目的のために、組合せに対して任意の本質的意義を有する他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書に定義する要素から本質的になる組成物は、特許請求する発明の基本的かつ新規の特性（複数可）に実質的に影響しない、他の物質またはステップを除外しない。「からなる」は、他の成分の、わずかではない要素、および実質的方法ステップを除外することを意味するものとする。このような移行用語のそれぞれにより定義する実施形態は、本開示の範囲内である。

【0068】

一態様では、本開示のrAAVベクターの遺伝子発現カセットは、1つまたは複数のAAV逆位末端反復と隣接する。別の態様では、rAAVベクターのサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列、および/または配列番号1に記載するヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、サルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードする。さらなる態様では、rAAVベクターのサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一のアミノ酸配列をコードし、サルコグリカン活性を保持するタンパク質をコードする。

【0069】

一部の実施形態では、本明細書に開示するrAAVベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13またはAAVrh74のベクターである。他の実施形態では、rAAVベクターのゲノムは、筋特異的制御エレメントを含むか、またはこれ

10

20

30

40

50

から本質的になり、この場合、筋特異的制御エレメントは、ポリヌクレオチド配列に動作可能に結合している。筋特異的制御エレメントの非限定的な例は、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子 *me f*、筋クレアチンキナーゼ (MCK)、切断型 MCK (tMCK)、ミオシン重鎖 (MHC)、MHC7、C5-12、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンc 遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンc 遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI 遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメント、およびグルココルチコイド応答エレメント (*gre*) である。一態様では、rAAVベクターの筋特異的制御エレメントは、切断型MCK (tMCK) である。別の態様では、rAAVベクターのプロモーターおよび/または筋特異的制御エレメントは、MHC7プロモーターである。さらなる態様では、MHC7プロモーターは、配列番号3に記載するヌクレオチド配列またはその等価物を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、プロモーター機能を提供する。一実施形態では、本明細書に開示するrAAVベクターのゲノムは、配列番号5に記載するヌクレオチド配列を含むイントロンを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。

【0070】

一部の実施形態では、サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1に記載するヌクレオチド配列、または配列番号1と少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%もしくは89%、より典型的には少なくとも90%、91%、92%、93%もしくは94%およびより典型的には少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列からなり、サルコグリカン活性を保持する。

【0071】

別の態様では、本明細書に記載する組換えAAVベクターは、配列番号2に記載する(表1を参照)ヒトサルコグリカンのアミノ酸配列と少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には少なくとも90%、91%、92%、93%、または94%、およびさらにより典型的には少なくとも95%、96%、97%、98%または99%配列同一性を有するサルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になり、このタンパク質は、サルコグリカン活性を保持する。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1:タンパク質およびヌクレオチド配列の非限定的な例

配列の説明	配列	配列番号
ヒトヤサルコグリカン ヌクレオチド配列 (コドン最適化)	ATGGTGAGGGAGCAGTACACCACAGCAACCGAGG GAATCTGCATCGAGAGGCCAGAGAACCAGTACGT GTATAAGATCGGCATCTACGGCTGGCGGAAGAGA TGCTGTATCTGTTCTGCTGCTGCTGCTGATCATC CTGGTGGTGAATCTGGCCCTGACCATCTGGATCCT GAAAGTGTATGTGGTTTTCCCAGCAGGAATGGGA CACCTGTGCGTGACAAAGGACGGACTGCGGCTGG AGGGAGAGTCTGAGTTCCTGTTTTCCCCTGTATGCC AAGGAGATCCACAGCAGAGTGGATAGCTCCCTGC TGCTGCAGTCCACCCAGAACGTGACAGTGAACGC AAGGAATAGCGAGGGAGAGGTTGACCGGCAGACT GAAGGTCGGCCCCAAGATGGTGGAGGTGCAGAAT CAGCAGTCCAGATCAACTCCAATGACGGCAAGC CTCTGTTTACAGTGGATGAGAAGGAGGTGGTGGT GGGCACCGACAAGCTGAGGGTGACAGGACCTGAG GCGCCCTGTTCTGAGCACTCTGTGGAGACCCCACT GGTGCGCGCAGACCCTTTTCAGGATCTGAGGCTG GAGAGCCCAACACGCAGCCTGTCCATGGACGCAC CCAGAGGCGTGCACATCCAGGCACACGCAGGCAA GATCGAGGCCCTGAGCCAGATGGATATCCTGTTCC ACTCTAGCGACGGCATGCTGGTGTGGATGCCGA GACCGTGTGCCTGCCTAAGCTGGTGCAGGGCACA TGGGGCCCATCTGGCTCCTCTCAGAGCCTGTACGA GATCTGCGTGTGCCAGATGGCAAGCTGTATCTGT CCGTGGCCGGCGTGTCTACCACATGCCAGGAGCA CAACCACATCTGTCTGTGA	1
ヒトヤサルコグリカン、 アミノ酸配列	MVREQYTTATEGICIERPENQYVYKIGIYGWRKRC LYLVLVLLLIILVNVNLAITWILKVMWFSPAGMGHLC VTKDGLRLEGESEFLFPLYAKEIHSRVDSSLLQLSTQ NVTVNARNSEGEVTVGRLKVGPKMVEVQNQQFQINS NDGKPLFTVDEKEVVVGTDKLRVTGPEGALFEHSV ETPLVRADPFQDLRLESPTRSLSDAPRGVHIQAHA GKIEALSQMDILFHSSDGMVLVDAETVCLPKLVQGT WGPSGSSQSLYEICVCPDGKLYLSVAGVSTTCQEHN HICL	2
5' ITR-MHCK7-キメラ イントロン-HSGCG- ポリA-3' ITR (ITR間の全配列)	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGGGTTAACCAATTGGCGCGGCCGCAAGCTTG CATGTCTAAGCTAGACCCTTCAGATTAATAAATAAC TGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGA GACGCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCCATCGGCC CTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCCAAGGACTAAAA AAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGGCAACA GACCTTTCATGGGCAAACTTGGGGCCCTGCTGTC	3

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	<p>TAGCATGCCCACTACGGGTCTAGGCTGCCATGT AAGGAGGCAAGGCCCTGGGGACACCCGAGATGCCT GGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCC CCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAATAACCCCTG TCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGAAGATCTTCGA ACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAAC AGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGA CTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGGCAA GGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCAC TTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTTG GGGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAG CTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCC GGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGG GCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCA CACCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCAC AGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCACCTCCACAGC ACAGACAGACACTCAGGAGCAGCCAGCGGCGCGC CCAGGTAAGTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAAG TCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACT GTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCT GTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGG AATTGTACCCGGTACCACCATGGTGAGGGAGCAG TACACCACAGCAACCGAGGGAATCTGCATCGAGA GGCCAGAGAACCAGTACGTGTATAAGATCGGCAT CTACGGCTGGCGGAAGAGATGTCTGTATCTGTTTCG TGCTGCTGCTGCTGATCATCCTGGTGGTGAATCTG GCCCTGACCATCTGGATCCTGAAAGTGATGTGGTT TTCCCCAGCAGGAATGGGACACCTGTGCGTGACA AAGGACGGACTGCGGCTGGAGGGAGAGTCTGAGT TCCTGTTTCCCCTGTATGCCAAGGAGATCCACAGC AGAGTGGATAGCTCCCTGCTGCTGCAGTCCACCCA GAACGTGACAGTGAACGCAAGGAATAGCGAGGG AGAGGTGACCGGCAGACTGAAGGTGCGCCCCAAG ATGGTGGAGGTGCAGAATCAGCAGTTCAGATCA ACTCCAATGACGGCAAGCCTCTGTTTACAGTGGAT GAGAAGGAGGTGGTGGTGGGCACCGACAAGCTGA GGGTGACAGGACCTGAGGGCGCCCTGTTTCGAGCA CTCTGTGGAGACCCCACTGGTGCGCGCAGACCCTT TTCAGGATCTGAGGCTGGAGAGCCCAACACGCAG CCTGTCCATGGACGCACCCAGAGGCGTGCACATC CAGGCACACGCAGGCAAGATCGAGGGCCCTGAGCC AGATGGATATCCTGTTCCACTCTAGCGACGGCATG CTGGTGTGGATGCCGAGACCGTGTGCCTGCCTAA GCTGGTGCAGGGCACATGGGGCCCATCTGGCTCC TCTCAGAGCCTGTACGAGATCTGCGTGTGCCAGA TGGCAAGCTGTATCTGTCCGTGGCCGGCGTGTCTA CCACATGCCAGGAGCACAACCACATCTGTCTGTG ACTCGAGGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCAT TAGATCTGTGTGTGGTTTTTTGTGTGTCTCTGCAG GGGCGCGCCTAATCTAGAGCATGGCTACGTAGAT</p>	
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

	AAGTAGCATGGCGGGTAAATCATTAACTACAAGG AACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA AGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC		
MHOK7プロモーター	AAGCTTGCATGTCTAAGCTAGACCCTTCAGATTAA AAATAACTGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGT GGTGTGAGACGCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCC ATCGGCCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCAAAGG ACTAAAAAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAG GGCAACAGACCTTTCATGGGCAAACCTTGGGGCC CTGCTGTCTAGCATGCCCCACTACGGGTCTAGGCT GCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCG AGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCT GCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAA TAACCCTGTCCCTGGTGGATCCCCGCATGCGAAG ATCTTCGAACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAG GCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGT GCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTT CCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGA CTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTC AGCCCTTGGGGCAGCCATAACAAGGCCATGGGGC TGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCA CGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGC TCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGCCCCCTCTG GCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCC AGGGGCACAGGGGCTGCCCTCATCTACCACCAC CTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCAGCCA GC	4	10 20
キメライントロン	AGGTAAGTTTGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTC CCGGATCCGGTGGTGGTGC AAATCAAAGAACTGC TCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGT ACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGA ATTGTACCC	5	
ポリA	GGCCGCAATAAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCT GTGTGTTGGTTTTTTGTG	6	30
5' ITR	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC AAAGCCCAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGGGTT	7	
3' ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG C	8	
ヒトαサルコグリカン ヌクレオチド配列(野生型). GenBank U84976.1	ATGGTGCGTGAGCAGTACACTACAGCCACAGAAG GCATCTGCATAGAGAGGCCAGAGAATCAGTATGT CTACAAAATTGGCATTATGGCTGGAGAAAGCGC	9	40

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	<p>TGTCCTACTTGTTTGTCTTTACTCATCATC CTCGTTGTGAATTTAGCTCTTACAATTTGGATTCTT AAAGTGATGTGGTTTTCTCCAGCAGGAATGGGCC ACTTGTGTGTAACAAAAGATGGACTGCGCTTGGGA AGGGGAATCAGAATTTTTATTCCCATTGTATGCCA AAGAAATACACTCCAGAGTGGACTCATCTCTGCT GCTACAATCAACCCAGAATGTGACTGTAATGCG CGCAACTCAGAAGGGGAGGTCACAGGCAGGTTAA AAGTCGGTCCAAAATGGTAGAAGTCCAGAATCA ACAGTTTCAGATCAACTCCAACGACGGCAAGCCA CTATTTACTGTAGATGAGAAGGAAGTTGTGGTTGG TACAGATAAACTTCGAGTAACTGGGCCTGAAGGG GCTCTTTTGAACATTCAGTGGAGACACCCCTTGT CAGAGCCGACCCGTTTCAAGACCTTAGATTAGAA TCCCCACTCGGAGTCTAAGCATGGATGCCCAA GGGGTGTGCATATTC AAGCTCACGCTGGGAAAAT TGAGGCGCTTTCTCAAATGGATATTCTTTTTCATA GTAGTGATGGAATGCTTGTGCTTGATGCTGAAACT GTGTGCTTACCC AAGCTGGTGCAGGGGACGTGGG GTCCCTCTGGCAGCTCACAGAGCCTCTACGAAATC TGTGTGTGTCCAGATGGGAAGCTGTACCTGTCTGT GGCCGGTGTGAGCACACGTGCCAGGAGCACAGC CACATCTGCCTCTGA</p>		10
AAV rh74カプシド アミノ酸配列	<p>MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWL GDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND NTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNW GFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQ VFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFSY NFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQ STGGTAGTQQLLFSQAGPNMSAQAKNWLPGPCYR QQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNP GVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVD YSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNA APIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLGPIWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTT FNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNP EIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTR NL</p>	10	10 30
rAAVベクター ポリヌクレオチド配列	<p>ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGA GGACAACCTCTCTGAGGGCATTGCGGAGTGGTGG GACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCA ACCAGCAAAAGCAGGACAACGGCCGGGGTCTGGT GCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGA CGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGAC CAGCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGC GGTATAATCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCG TCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCG</p>	11	40

別の態様では、ストリンジェントな条件下で配列番号1の核酸配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列、またはその相補体を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、機能性サルコグリカンを含むポリヌクレオチド配列を含む組換えAAVベクターを本明細書において記載する。機能性サルコグリカンは、サルコグリカン活性を保持するサルコグリカンポリペプチドを意味する。サルコグリカン活性は、筋機能に重要である。サルコグリカンは、ジストロフィンと相互作用し、ジストロフィン-糖タンパク質複合体を形成する、いくつかの筋細胞膜貫通糖タンパク質のうちの一つであり、これは、筋細胞膜にわたり、ジストロフィン、シントロフィン、ジストログリカンおよびジストログリカン、ならびにサルコグリカンを含むサルコグリカンで構成される。ジストロフィン-糖タンパク質複合体は、筋細胞膜下細胞骨格と筋細胞の細胞外基質との間に構造的結合をもたらす。筋細胞の非限定的な例としては、心臓、横隔膜、脚、骨盤帯、肩および腕の筋細胞が挙げられる。サルコグリカン活性のさらなる非限定的な例およびサルコグリカン異常症の結果は、Blake et al. (2002) *Physiol Rev.*; 82(2): 291-329およびTarakci et al. (2016) *Front Biosci (Landmark Ed)*; 21: 744-56に記載されている。

【0073】

用語「ストリンジェント」は、ストリンジェントであるとして当技術分野において一般に理解される条件を指すために使用する。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは主に、温度、イオン強度、および変性剤、例えば、ホルムアミドの濃度により決定する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジェントな条件の例は、65~68の0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、または42の0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、および50%のホルムアミドである。Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)を参照されたい。また、さらにストリンジェントな条件(例えば、さらに高い温度、さらに低いイオン強度、さらに高濃度のホルムアミドまたは他の変性剤)を使用し得るが、ハイブリダイゼーション率に影響する。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが関係する場合は、さらに例となるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件として、37(14塩基オリゴ用)、48(17塩基オリゴ用)、55(20塩基オリゴ用)、および60(23塩基オリゴ用)の6×SSC、0.05%のピロリン酸ナトリウムによる洗浄が挙げられる。

【0074】

非特異的および/またはバックグラウンドハイブリダイゼーションを低減する目的のために、他の薬剤をハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液に含み得る。例としては、0.1%のウシ血清アルブミン、0.1%のポリビニル-ピロリドン、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム、NaDodSO₄(SDS)、フィコール、デンハート液、超音波処理サケ精子DNA(または他の非相補性DNA)、およびデキストラン硫酸であるが、他の適する薬剤も使用し得る。このような添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響することなく、変更することができる。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8~7.4で実行するが、典型的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーション率は、pHにほとんど依存しない。Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England)を参照されたい。ハイブリダイゼーション条件は、当業者により調整して、このような変数を適応させ、種々の配列関連性を有するDNAのハイブリッド形成を可能とすることができる。

【0075】

別の態様では、本明細書に記載する組換えAAVベクターは、プロモーターおよび/ま

たは筋特異的制御エレメントに動作可能に結合している、サルコグリカンをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。例えば、筋特異的制御エレメントは、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF、筋クレアチンキナーゼ(MCK)、tMCK(切断型MCK)、ミオシン重鎖(MHC)、MHCK7(MHCおよびMCKのハイブリッドバージョン)、C5-12(合成プロモーター)、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンC遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメントまたはグルココルチコイド応答エレメント(GRE)である。一実施形態では、rAAVベクターは、MHCK7プロモーター(配列番号4)を含む。

10

【0076】

本明細書に記載する例となるrAAVベクターは、pAAV.MHCK7.hSCGCであり、これは、配列番号3のヌクレオチド配列を含み、この場合、MHCK7プロモーターは、ヌクレオチド136~927(配列番号4)にわたり、イントロンは、ヌクレオチド937~1084(配列番号5)にわたり、サルコグリカン配列は、ヌクレオチド1094~1969(配列番号1)にわたり、ポリAは、ヌクレオチド1976~2028(配列番号6)にわたる。図1を参照されたい。一部の 경우에는、rAAVベクターに含まれる唯一のウイルス配列は、逆位末端反復であり、これは、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要とされる。一部の 경우에는、7~116ヌクレオチドにわたるイントロン(配列番号5)、および2128~2231ヌクレオチドにわたる5'UTR(配列番号7)は、プラスミドpCMV(Clontech)に由来する。ある特定の 場合には、3'UTRは、配列番号8に記載する配列を含む。ある特定の 場合には、pAAV.MHCK7.hSCGCは、AAVrh.74カプシドにパッケージングする。

20

【0077】

本開示のDNAプラスミドは、rAAVゲノムを含む。DNAプラスミドは、AAVのヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルス、E1欠失アデノウイルスまたはヘルペスウイルス)による感染に耐えられる細胞に導入して、rAAVゲノムを感染性ウイルス粒子内に集合させる。パッケージングしようとしているAAVゲノム、repおよびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が細胞にもたらされる、rAAV粒子を生成する技術は、当技術分野において標準的である。rAAVの生成では、次の成分:rAAVゲノム、rAAVゲノムから分離した(すなわちゲノム内に存在しない)AAVrepおよびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が、単一細胞(本明細書においてパッケージング細胞として表す)内に存在することが必要とされる。AAVrepおよびcap遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型由来であってもよく、rAAVゲノムITRと異なるAAV血清型由来であってもよく、AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13およびAAVrh.74を含むが、これらに限定されない。一部の 実施形態では、rAAVベクターは、AAV2の逆位末端反復(ITR)配列を含む。偽型rAAVの生成は、例えば、国際公開第01/83692号に開示されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の 態様では、rAAVベクターは、AAV2の逆位ITR配列を含み、AAVrh.74のカプシドによりカプシド形成される。ある特定の 場合には、rAAVベクターのゲノムは、配列番号11に記載するポリヌクレオチド配列を含む。ある特定の 場合には、AAVrh.74カプシドは、配列番号10に記載するアミノ酸配列を含む。一部の 実施形態では、rAAVベクターは、配列番号11に記載するヌクレオチド配列と例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはこれを超えて同一の配列を含むか、またはこれから本質的

30

40

50

になるか、またはこれからまたさらになるポリヌクレオチドを含み、rAAVのカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3をコードする。一部の実施形態では、rAAVベクターは、配列番号10に記載するAAV rh.74VP3のアミノ酸配列と例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはこれを超えて同一の配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになるポリペプチドを含む。

【0078】

パッケージング細胞系を生成する方法は、AAV粒子生成に必要なすべての成分を安定に発現する細胞系を作製することである。例えば、AAV repおよびcap遺伝子を欠くrAAVゲノム、rAAVゲノムから分離したAAV repおよびcap遺伝子、ならびに選択可能なマーカー、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド（または複数のプラスミド）を細胞のゲノムに組み込む。AAVゲノムは、GCテーリング（Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む合成リンカーの追加（Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73）などの手順により、または直接的平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666）により、細菌プラスミドに導入されている。次いで、パッケージング細胞系を、ヘルパーウイルス、例えば、アデノウイルスにより感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、rAAVの大規模な生成に適することである。適する方法の他の例では、プラスミドではなく、アデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いて、rAAVゲノムならびに/またはrepおよびcap遺伝子をパッケージング細胞に導入する。ある特定の場では、rAAVベクターのゲノムは、配列番号11に記載するポリヌクレオチド配列を含む。ある特定の場では、AAV rh.74カプシドは、配列番号10に記載するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、rAAVベクターは、配列番号11に記載するヌクレオチド配列と例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはこれを超えて同一の配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになるポリヌクレオチドを含み、rAAVのカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3をコードする。一部の実施形態では、rAAVベクターは、配列番号10に記載するAAV rh.74VP3のアミノ酸配列と例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より典型的には90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはこれを超えて同一の配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになるポリペプチドを含む。

【0079】

rAAV生成の一般的原理は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; および Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial, and Immunol., 158:97-129に総説が記載されている。種々のアプローチは、Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); および Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol.,

10

20

30

40

50

7:349 (1988)に記載されている。Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); 米国特許第5,173,414号; 国際公開第95/13365号および対応する米国特許第5,658,776号; 国際公開第95/13392号; 国際公開第96/17947号; 国際出願PCT/US第98/18600号; 国際公開第97/09441号(国際出願PCT/US第96/14423号); 国際公開第97/08298号(国際出願PCT/US第96/13872号); 国際公開第97/21825号(国際出願PCT/US第96/20777号); 国際公開第97/06243号(国際出願PCT/FR第96/01064号); 国際公開第99/11764号; Perrin et al. (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3: 1124-1132; 米国特許第5,786,211号; 米国特許第5,871,982号; ならびに米国特許第6,258,595号。前述の文書は、本出願により、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれ、rAAV生成に関する文書の節に特に重点を置く。

10

【0080】

したがって、本開示では、感染性rAAVを生成するパッケージング細胞を提供する。一実施形態では、パッケージング細胞は、安定に形質転換するがん細胞、例えば、HeLa細胞、293細胞およびPerC.6細胞(同族の293株)であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換しないがん細胞、例えば、低継代293細胞(アデノウイルスのE1により形質転換したヒト胎児腎細胞)、MRC-5細胞(ヒト胎児線維芽細胞)、WI-38細胞(ヒト胎児線維芽細胞)、Vero細胞(サル腎細胞)およびFRhL-2細胞(アカゲザル胎児肺細胞)の細胞である。

20

【0081】

本開示の組換えAAV(すなわち、感染性カプシド形成rAAV粒子)は、rAAVゲノムを含む。実施形態は、配列番号3に記載するポリヌクレオチド配列を含む、pAAV.MHCK7.hSCGCと名付けられたrAAVを含むが、これらに限定されない。

【0082】

rAAVは、当技術分野において標準的な方法により、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配により精製し得る。rAAVベクターをヘルパーウイルスから精製するための方法は、当技術分野において公知であり、例えば、Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69427-443 (2002); 米国特許第6,566,118号および国際公開第98/09657号に記載されている方法を含む。

30

【0083】

別の実施形態では、本開示では、本開示のrAAVを含むか、またはこれから本質的になる組成物を検討する。本明細書に記載する組成物は、薬学的に許容される担体中にrAAVを含むか、またはこれから本質的になる。特定の一実施形態では、本開示の組成物は、乳酸リンゲル液(LRS)を含むか、またはこれから本質的になる。また、組成物は、他の成分、例えば、希釈剤およびアジュバントを含み得る。許容される担体、希釈剤およびアジュバントは、レシピエントに対して無毒であり、好ましくは、用いる用量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸、クエン酸、もしくは他の有機酸の緩衝液; 抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸; 低分子量ポリペプチド; タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン; 親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン; アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン; 単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物; キレート剤、例えば、EDTA; 糖アルコール、例えば、マンニトールもしくはソルビトール; 塩形成対イオン、例えば、ナトリウム; ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えば、Tween、プルロニック(登録商標)もしくはポリエチレングリコ

40

50

ール (P E G) を含む。開示する組成物は、それを必要とする被験体におけるサルコグリカン異常症の処置；筋力、筋持久力、および/もしくは筋量の増加、線維症の低減、収縮誘発性損傷の低減、脂肪浸潤の減少、ならびに/または中心核形成の減少、ならびに/または筋ジストロフィーに罹患している被験体における筋ジストロフィーの処置、変性線維もしくは壊死線維の低減、炎症の低減、クレアチンキナーゼレベルの上昇、筋線維の萎縮および肥大の処置、ならびに/またはジストロフィー性石灰化の減少のうちの1つまたは複数に使用することができる。

【 0 0 8 4 】

本開示の方法において投与する r A A V の力価は、例えば、特定の r A A V、投与様式、処置目標、個体、および標的とする細胞型 (複数可) に応じて変化し、当技術分野において標準的な方法により決定し得る。r A A V の力価は、1 m l あたり約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} ~ 約 1×10^{14} またはこれを超える D N a s e 耐性粒子 (D R P) の範囲に及び得る。また、用量は、ウイルスゲノム (v g) 単位で表し得る。

10

【 0 0 8 5 】

i n v i v o または i n v i t r o で標的細胞を r A A V により形質導入する方法を本開示により検討する。用語「形質導入」は、i n v i v o または i n v i t r o のいずれかで、目的のポリヌクレオチド (例えば、サルコグリカンコードするポリヌクレオチド配列) を、記載する複製欠損 r A A V によりレシピエント細胞へ投与/送達して、レシピエント細胞によるサルコグリカンの発現を生じさせることを指すために使用する。

20

【 0 0 8 6 】

一態様では、それを必要とする被験体における、サルコグリカン異常症の処置、筋力、筋持久力、および/もしくは筋量の増加、線維症の低減、収縮誘発性損傷の低減、脂肪浸潤の減少、ならびに/または中心核形成の減少、ならびに/あるいは筋ジストロフィーに罹患している被験体における、筋ジストロフィーの処置、変性線維もしくは壊死線維の低減、炎症の低減、クレアチンキナーゼレベルの上昇、筋線維の萎縮および肥大の処置、ならびに/またはジストロフィー性石灰化の減少のうちの1つまたは複数のための方法であって、方法が、治療有効量の組換えアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり、r A A V ベクターが、プロモーターの転写制御下でサルコグリカンコードするポリヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる遺伝子発現カセットであって、1つまたは複数の A A V 逆位末端反復と隣接する、遺伝子発現カセットを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、方法を本明細書において提供する。一部の実施形態では、前記プロモーターは、筋特異的制御エレメントである。一実施形態では、本明細書において開示する方法では、被験体の1つまたは複数の筋肉の筋力、筋持久力、および/または筋量が増加する。筋肉の非限定的な例としては、心臓、横隔膜、大腿、下腿、骨盤帯、肩、および腕の筋肉が挙げられる。特定の一実施形態では、筋力、筋持久力、および/または筋量は、未処置対照被験体と比較して少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 50 %、または少なくとも約 80 % 増加する。

30

40

【 0 0 8 7 】

特定の一態様では、被験体は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。さらなる態様では、被験体は、肢帯型筋ジストロフィー 2 C 型である肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。

【 0 0 8 8 】

ポリヌクレオチドの被験体への送達に関する用語「投与 (a d m i n i s t e r i n g)」または「投与 (a d m i n i s t r a t i o n)」は、意図する機能を果たすようにポリヌクレオチドを被験体に導入または送達する任意の経路を含む。投与は、任意の適する経路により行うことができ、経口、鼻腔内、非経口 (静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下)、頭蓋内、または局所を含む。さらなる投与経路は眼窩内、輸注、動脈内、関節内

50

、心臓内、皮内、肺内、脊髄内、胸骨内、髄腔内、子宮内、静脈内、くも膜下、被膜下、皮下、経粘膜、または経気管を含む。投与は、自己投与および他己投与を含む。

【0089】

一態様では、本明細書に開示する方法は、rAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる組成物を投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。さらなる態様では、本明細書に開示する方法は、rAAVベクター、またはrAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含むか、もしくはこれから本質的になるか、もしくはこれからまたさらになる組成物を、筋肉内注射または静脈内注射により投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。またさらなる態様では、本明細書に開示する方法は、rAAVベクター、またはrAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含むか、もしくはこれから本質的になるか、もしくはこれからまたさらになる組成物を全身投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。特定の一態様では、本明細書に開示する方法は、rAAVベクター、またはrAAVベクターおよび薬学的に許容される担体を含むか、もしくはこれから本質的になるか、もしくはこれからまたさらになる組成物を、注射、輸注、または移植により非経口投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。

10

【0090】

一態様では、本明細書に記載する方法における使用のためのrAAVベクターのサルコグリカンコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1に記載するヌクレオチド配列を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。別の態様では、rAAVベクターのサルコグリカンコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号2のアミノ酸配列をコードする。また別の態様では、本明細書に開示する方法において使用するrAAVベクターは、自己相補性AAVベクターゲノムを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。特定の一実施形態では、rAAVベクターは、AAV repおよびcap DNAを欠くゲノムを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。別の実施形態では、rAAVベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13またはAAV rh74のベクターである。さらなる態様では、rAAVベクターは、血清型AAV rh74であり、rAAVベクターは、AAV rh.74カプシドを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。またさらなる態様では、rAAVベクターのAAV rh.74カプシドは、配列番号10に記載するアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。

20

30

【0091】

本明細書に開示する方法において使用するrAAVベクターは、プロモーターおよび/または筋特異的制御エレメントをさらに含むか、またはこれから本質的になることがあり、この場合、筋特異的制御エレメントは、サルコグリカンコードするポリヌクレオチドに動作可能に結合している。一部の筋特異的制御エレメントの非限定的な例は、ヒト骨格筋アクチン遺伝子エレメント、心筋アクチン遺伝子エレメント、筋細胞特異的エンハンサー結合因子me f、筋クレアチンキナーゼ(MCK)、切断型MCK(tMCK)、ミオシン重鎖(MHC)、MHCK7、C5-12、マウスクレアチンキナーゼエンハンサーエレメント、骨格筋速筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋心筋トロポニンc遺伝子エレメント、遅筋トロポニンI遺伝子エレメント、低酸素誘導核因子、ステロイド誘導エレメント、およびグルココルチコイド応答エレメント(gre)である。一態様では、rAAVベクターの筋特異的制御エレメントは、切断型MCK(tMCK)である。別の態様では、rAAVベクターのプロモーターおよび/または筋特異的制御エレメントは、MHCK7プロモーターである。さらなる態様では、MHCKプロモーターは、配列番号3に記載するヌクレオチド配列またはその等価物を含むか、またはこれから本質的になるか

40

50

、またはこれからまたさらになる。

【0092】

一実施形態では、本明細書に開示する rAAV ベクターのゲノムは、配列番号 5 に記載するヌクレオチド配列を含むイントロンを含む。

【0093】

in vivo での方法は、本開示の rAAV を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、有効な単回用量の、または有効な複数回用量の組成物を、それを必要とする動物（ヒトを含む）に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。障害 / 疾患の発生前に用量を投与する場合、投与は、予防的である。障害 / 疾患の発後に用量を投与する場合、投与は、治療的である。本開示の実施形態では、有効な単回用量は、処置する障害 / 疾患の状態と関連する少なくとも 1 つの症状を軽減（除去もしくは低減）し、障害 / 疾患の状態への進行を遅延もしくは予防し、障害 / 疾患の状態の進行を遅延もしくは予防し、疾患の程度を弱め、疾患の寛解（部分的もしくは完全に）を生じ、および / または生存を延ばす用量である。本開示の方法による予防または処置について検討する疾患の例は、筋ジストロフィー、例えば、肢帯型筋ジストロフィーである。一部の実施形態では、本開示の方法による予防または処置について検討する疾患は、肢帯型筋ジストロフィー 2 C 型（LGMD 2 C）である。

10

【0094】

用語「筋ジストロフィー」は、本明細書において使用する場合、強度および筋量（*muscle bulk*）が徐々に低下する障害を指す。筋ジストロフィー疾患の非限定的な例としては、ベッカー型筋ジストロフィー、脛骨筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、エメリ・ドレフュス方筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、サルコグリカン異常症、先天性筋ジストロフィー、例えば、LAMA 2 の部分的欠損による先天性筋ジストロフィー、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー、ID 型先天性筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、肢帯 1 A 型筋ジストロフィー、肢帯 2 A 型筋ジストロフィー、肢帯 2 B 型筋ジストロフィー、肢帯 2 C 型筋ジストロフィー、肢帯 2 D 型筋ジストロフィー、肢帯 2 E 型筋ジストロフィー、肢帯 2 F 型筋ジストロフィー、肢帯 2 G 型筋ジストロフィー、肢帯 2 H 型筋ジストロフィー、肢帯 2 I 型筋ジストロフィー、肢帯 2 I 型筋ジストロフィー、肢帯 2 J 型筋ジストロフィー、肢帯 2 K 型筋ジストロフィー、肢帯 I C 型筋ジストロフィー、単純型先天性表皮水疱症を伴う強直性脊椎筋ジストロフィー（*rigid spine muscular dystrophy*）、眼咽頭型筋ジストロフィー、ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー、およびウルリッヒ型硬化性筋ジストロフィー（*Ullrich scleroatonic muscular dystrophy*）が挙げられ得る。一部の実施形態では、被験体は、肢帯型筋ジストロフィーに罹患している。一部の実施形態では、被験体は、肢帯型筋ジストロフィー 2 C 型（LGMD 2 C）に罹患している。

20

30

【0095】

少なくとも 19 種の LGMD 型が存在し、型は、それらの関連する遺伝的欠陥により分類される。

40

【表 1 - 7】

型	遺伝のパターン	遺伝子または染色体	
LGMD1A	常染色体優性	ミオチリン(Myotilin)遺伝子	
LGMD1B	常染色体優性	ラミン A/C 遺伝子	
LGMD1C	常染色体優性	カベオリン遺伝子	
LGMD1D	常染色体優性	第 7 染色体	10
LGMD1E	常染色体優性	第 6 染色体	
LGMD1F	常染色体優性	第 7 染色体	
LGMD1G	常染色体優性	第 4 染色体	
LGMD2A	常染色体劣性	カルパイン 3 遺伝子	
LGMD2B	常染色体劣性	ジスフェリン遺伝子	
LGMD2C	常染色体劣性	ガンマ-サルコグリカン遺伝子	20
LGMD2D	常染色体劣性	アルファ-サルコグリカン遺伝子	
LGMD2E	常染色体劣性	ベータ-サルコグリカン遺伝子	
LGMD2F	常染色体劣性	デルタ-サルコグリカン遺伝子	
LGMD2G	常染色体劣性	テレトニン(Telethonin)遺伝子	30
LGMD2H	常染色体劣性	TRIM32	
LGMD2I	常染色体劣性	FKRP 遺伝子	
LGMD2J	常染色体劣性	タイチン遺伝子	
LGMD2K	常染色体劣性	POMT1 遺伝子	
LGMD2L	常染色体劣性	ANO5 遺伝子	40

【 0 0 9 6 】

一部の態様では、本開示は、被験体において筋ジストロフィー（例えば、LGMD2C）を処置する方法であって、本明細書に記載するサルコグリカンをコードする治療有効量の rAAV ベクター、またはこのような rAAV ベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物を被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、方法に関する。

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、本開示では、筋ジストロフィー（例えば、LGMD2C）に罹患している被験体において筋力、筋持久力および/または筋量を増加させる方法であって、

本明細書に記載する サルコグリカンをコードする治療有効量の r A A V ベクター、またはこのような r A A V ベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物を被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、方法を提供する。

【 0 0 9 8 】

ある特定の態様では、本開示は、筋ジストロフィー（例えば、L G M D 2 C）に罹患している被験体において収縮誘発性損傷を低減する方法であって、本明細書に記載する サルコグリカンをコードする治療有効量の r A A V ベクター、またはこのような r A A V ベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物を被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、方法を包含する。

10

【 0 0 9 9 】

ある特定の態様では、本開示は、被験体において サルコグリカン異常症を処置する方法であって、本明細書に記載する サルコグリカンをコードする治療有効量の r A A V ベクター、またはこのような r A A V ベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物を被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、方法を包含する。

【 0 1 0 0 】

また、本開示は、筋ジストロフィー（例えば、L G M D 2 C）に罹患している被験体において線維症を低減する方法であって、本明細書に記載する サルコグリカンをコードする治療有効量の r A A V ベクター、またはこのような r A A V ベクターを含むか、もしくはこれから本質的になる組成物を被験体に投与するステップを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、方法を包含する。用語「線維症」は、本明細書において使用する場合、骨格筋、心筋、肝臓、肺、腎臓、および膵臓を含む損傷時の組織における、細胞外基質（E C M）成分の過剰または無制御な堆積、および修復過程の異常を指す。堆積する E C M 成分は、コラーゲン、例えば、コラーゲン 1、コラーゲン 2 またはコラーゲン 3、およびフィブロネクチンを含む。

20

【 0 1 0 1 】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する方法により処置する被験体は、哺乳動物であり得る。一部の場合では、被験体は、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウスまたはラットである。被験体は、ヒト女性またはヒト男性であり得る。一部の場合では、被験体は、1 ~ 7、7 ~ 15、16 ~ 25、26 ~ 50、50 ~ 70 歳の間または 70 歳を超える年齢のヒト被験体である。他の年齢範囲を検討し、これは、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、25 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、60 ~ 70 または 70 歳を超える年齢、ならびに前述に含まれる任意の範囲を含むが、これらに限定されない。

30

【 0 1 0 2 】

本明細書において使用する場合、用語「必要とする患者」または「必要とする被験体」は、本明細書において提供する、サルコグリカンをコードする核酸配列を含む r A A V、またはこのような r A A V を含むか、もしくはこれから本質的になる組成物による処置または好転 (a m e l i o r a t i o n) に適する疾患、障害または状態のリスクを有するか、またはこれに罹患している患者または被験体を指す。必要とする患者または被験体は、例えば、サルコグリカンの機能不全と関連する疾患、例えば、L G M D 2 C と診断された患者または被験体であり得る。被験体は、サルコグリカン遺伝子またはタンパク質の変異または機能不全を有し得る。「被験体」および「患者」は、本明細書において互換的に使用する。

40

【 0 1 0 3 】

また、本明細書に開示する組成物の 1 つまたは複数およびコルチコステロイドを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる、併用療法を本開示により検討する。本明細書において使用する組合せは、同時処置または逐次処置を含む。本開示の方法の標準的薬物処置（例えば、コルチコステロイド）との組合せは、新規治療と

50

の組合せと同様に、詳細に検討する。一部の実施形態では、被験体は、ステロイド（例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、デフラザコート）により処置して、本明細書に記載する r A A V の投与に対する免疫応答を予防または低減し得る。ある特定の場合では、被験体が、本明細書に記載する r A A V に対する抗体を発現する場合、被験体に、アフアレ-シスまたは別の免疫調節因子を施し得る。

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、治療有効量の r A A V ベクターは、1 回または複数回の範囲に及ぶ投与において、約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 5×10^{14} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 2×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 3×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 4×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 5×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 6×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 7×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 8×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 9×10^{13} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 1×10^{14} vg / kg、または約 1×10^{13} vg / kg ~ 約 2×10^{14} vg / kg、または 1×10^{13} vg / kg ~ 約 3×10^{14} vg / kg、または約 1×10^{13} ~ 約 4×10^{14} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 4×10^{13} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 5×10^{13} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 6×10^{13} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 7×10^{13} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 8×10^{13} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 9×10^{13} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 1×10^{14} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 2×10^{14} vg / kg、または 3×10^{13} vg / kg ~ 約 3×10^{14} vg / kg、または約 3×10^{13} ~ 約 4×10^{14} vg / kg、または約 3×10^{13} vg / kg ~ 約 5×10^{14} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 6×10^{13} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 7×10^{13} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 8×10^{13} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 9×10^{13} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 1×10^{14} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 2×10^{14} vg / kg、または 5×10^{13} vg / kg ~ 約 3×10^{14} vg / kg、または約 5×10^{13} ~ 約 4×10^{14} vg / kg、または約 5×10^{13} vg / kg ~ 約 5×10^{14} vg / kg、または約 1×10^{14} vg / kg ~ 約 2×10^{14} vg / kg、または 1×10^{14} vg / kg ~ 約 3×10^{14} vg / kg、または約 1×10^{14} ~ 約 4×10^{14} vg / kg、または約 1×10^{14} vg / kg ~ 約 5×10^{14} vg / kg の範囲の用量の r A A V である。また、本開示は、このような範囲の r A A V ベクターを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる組成物を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。

【 0 1 0 5 】

例えば、治療有効量の r A A V ベクターは、 1×10^{13} vg / kg、約 2×10^{13} vg / kg、約 3×10^{13} vg / kg、約 4×10^{13} vg / kg、約 5×10^{13} vg / kg、約 6×10^{13} vg / kg、約 7×10^{13} vg / kg、約 8×10^{13} vg / kg、約 9×10^{13} vg / kg、約 1×10^{14} vg / kg、約 2×10^{14} vg / kg、約 3×10^{14} vg / kg、約 4×10^{14} vg / kg および 5×10^{14} vg / kg の用量である。また、本開示は、このような用量の r A A V ベクターを含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる組成物を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになる。

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態では、治療有効量の r A A V は、約 1×10^{14} vg / kg ~ 約 1×10^{15} vg / kg または約 1×10^{15} vg / kg ~ 約 1×10^{16} vg / kg の範囲に及ぶ用量の r A A V である。本開示では、一部の実施形態において、約 1×10^{14} vg / kg、約 1.5×10^{14} vg / kg、約 2×10^{14} vg / kg、約 2.5×10^{14} vg / kg、約 3×10^{14} vg / kg、約 3.5×10^{14} vg / kg、約 4×10^{14} vg / kg、約 4.5×10^{14} vg / kg、約 5×10^{14} vg / kg、約 5.5×10^{14} vg / kg、約 6×10^{14} vg / kg、約 6.5×10^{14} vg / kg、約 7×10^{14} vg / kg、約 7.5×10^{14} vg / kg、約 8×10^{14} vg / kg、約 8.5×10^{14} vg / kg、約 9×10^{14} vg / kg、約 9.5×10^{14} vg / kg、約

約 1.5×10^{15} v g / k g、約 2.5×10^{15} v g / k g、約 3.5×10^{15} v g / k g、約 4.5×10^{15} v g / k g、または約 5×10^{15} v g / k g の用量で本開示の r A A V ベクターを被験体に投与する方法を提供する。本開示では、一部の実施形態において、約 4.0×10^{14} v g / k g、約 4.1×10^{14} v g / k g、約 4.2×10^{14} v g / k g、約 4.3×10^{14} v g / k g、約 4.4×10^{14} v g / k g、約 4.5×10^{14} v g / k g、約 4.6×10^{14} v g / k g、約 4.7×10^{14} v g / k g、約 4.8×10^{14} v g / k g、約 4.9×10^{14} v g / k g、約 5.0×10^{14} v g / k g、約 5.1×10^{14} v g / k g、約 5.2×10^{14} v g / k g、約 5.3×10^{14} v g / k g、約 5.4×10^{14} v g / k g、約 5.5×10^{14} v g / k g、約 5.6×10^{14} v g / k g、約 5.7×10^{14} v g / k g、約 5.8×10^{14} v g / k g、約 5.9×10^{14} v g / k g、または約 6×10^{14} v g / k g の総用量で本開示の r A A V ベクターを被験体に投与する方法を提供する。

10

【0107】

種々の実施形態では、投与するステップは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはこれを超える分割用量で総用量を投与することを含み得る。例えば、総用量は、被験体の複数の部位へ、または数分、数時間、もしくは数日にわたる間隔をあけた被験体への注射により送達し得る。

【0108】

有効量の組成物の投与は、それらに限定されないが、筋肉内、非経口、静脈内、経口、頬側、鼻、肺、頭蓋内、骨内、眼内、直腸、または腔を含む、当技術分野において標準的な経路によってであり得る。投与経路（複数可）、および本開示の r A A V の A A V 成分（特に、A A V I T R およびカプシドタンパク質）の血清型（複数可）は、処置する感染症および/または疾患の状態、ならびに サルコグリカンを発現させる標的細胞/組織（複数可）を考慮して、当業者により選択および/または適合され得る。

20

【0109】

本開示では、有効用量の本開示の r A A V および組成物の局所投与および全身投与を提供する。例えば、全身投与は、循環系へ投与して全身に影響させることである。全身投与は、腸内投与、例えば、胃腸管による吸収、および注射、輸注または移植による非経口投与を含む。

【0110】

特に、本開示の r A A V の実際の投与は、r A A V 組換えベクターを動物の標的組織内に輸送する任意の物理的方法を使用することにより達成し得る。本開示による投与は、筋肉、血流および/または直接肝臓への注射を含むが、これらに限定されない。リン酸緩衝食塩水中への r A A V の単純な再懸濁は、筋組織発現に有用なビヒクルの提供に十分であることが実証されており、担体または r A A V と同時投与され得る他の成分に対する公知の制限は存在しない（しかし、DNA を分解する組成物は、r A A V を用いる通常の方法において回避すべきである）。

30

【0111】

r A A V のカプシドタンパク質は、修飾して、r A A V を目的の特定の標的組織、例えば、筋肉に対して標的化し得る。例えば、国際公開第 02 / 053703 号を参照されたく、この開示は、参照により本明細書に組み込まれる。医薬組成物は、注射製剤または局所製剤として調製して、経皮輸送により筋肉に送達することができる。筋肉内注射と経皮輸送の両方のための多数の製剤が、これまでに開発されており、本開示の実施において使用することができる。r A A V は、任意の薬学的に許容される担体とともに使用して、投与および取扱いを容易とすることができる。

40

【0112】

筋肉内注射の目的のために、アジュバント、例えば、ゴマもしくはピーナツ油中、または水性プロピレングリコール中の溶液を、無菌水溶液とともに用いることができる。このような水溶液は、必要に応じて緩衝することができ、はじめに液体希釈剤を食塩水またはグルコースにより等張化する。遊離酸（DNA が酸性リン酸基を含む）または薬理的に

50

許容される塩としての r A A V の溶液は、界面活性剤、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース (h y d r o x p r o p y l c e l l u l o s e) と適切に混合した水中に調製することができる。また、r A A V の分散物は、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物中、ならびに油中に調製することができる。保管および使用の通常の条件下では、このような調製物は、保存剤を含み、微生物の増殖を防ぐ。これに関して、用いる無菌水性媒体はすべて、当業者に周知の標準的技術により容易に入手可能である。

【 0 1 1 3 】

注射による使用に適する薬学的形態は、無菌注射用溶液または分散物の即時調製のための、無菌水溶液または分散物および無菌粉末を含む。あらゆる場合において、形態は、注射針を容易に通過可能である範囲において、無菌でなければならず、流動性でなければならぬ。これは、製造および保存条件下で安定でなければならず、微生物、例えば、細菌および真菌の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、適するこれらの混合物、および植物油を含む、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング剤、例えば、レシチンの使用により、分散物の場合、必要とする粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等により、もたらしうことができる。多くの場合、これは、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用により、もたらしうことができる。

【 0 1 1 4 】

無菌注射用溶液は、必要量の r A A V を、適切な溶媒に、上に列挙する種々の他の成分とともに組み入れ、必要に応じて、その後、ろ過滅菌することにより調製する。一般に、分散物は、塩基性分散媒および上に列挙するものの中から必要とする他の成分を含む無菌ビヒクルに、滅菌した活性成分を組み入れることにより調製する。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合では、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これにより、活性成分と任意のさらなる所望の成分の粉末が、これまでに無菌ろ過したその溶液から得られる。

【 0 1 1 5 】

また、r A A V による形質導入は、i n v i t r o で実行し得る。一実施形態では、所望の標的筋細胞は、被験体から取り出し、r A A V により形質導入し、被験体に再導入する。あるいは、同系または異種の筋細胞を使用することができ、この場合、このような細胞は、被験体において不適切な免疫応答を生じない。

【 0 1 1 6 】

被験体への形質導入および形質導入細胞の再導入に適する方法は、当技術分野において公知である。一実施形態では、細胞は、r A A V を筋細胞と、例えば、適切な培地中で混合し、従来の技術、例えば、サザンブロットおよび/もしくは P C R を使用して、または選択マーカーを使用して、目的の D N A を含む細胞についてスクリーニングすることにより i n v i t r o で形質導入することができる。次いで、形質導入細胞は、医薬組成物に製剤化することができ、組成物は、種々の技術により、例えば、筋肉内、静脈内、皮下および腹腔内注射により、または例えば、カテーテルを使用した平滑筋および心筋への注射により、被験体に導入することができる。

【 0 1 1 7 】

本開示の r A A V により細胞に形質導入すると、サルコグリカンの発現が持続する。したがって、本開示では、サルコグリカンを発現する r A A V を、哺乳動物被験体、好ましくは、ヒトに投与/送達する方法を提供する。このような方法は、本開示の 1 つまたは複数の r A A V により、組織（組織、例えば、筋肉、臓器、例えば、肝臓および脳、ならびに腺、例えば、唾液腺を含むが、これらに限定されない）に形質導入するステップを

10

20

30

40

50

含む。形質導入は、組織特異的制御エレメントを含む遺伝子カセットにより行い得る。例えば、本開示の一実施形態では、それらに限定されないが、アクチンおよびミオシン遺伝子ファミリーに由来するもの、例えば、myoD遺伝子ファミリー [Weintraub et al, Science, 251: 761-766 (1991)] を参照]、筋細胞特異的エンハンサー結合因子MEF-2 [Cserjesi and Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)]、ヒト骨格筋アクチン遺伝子に由来する制御エレメント [Muscat et al, Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)]、心筋アクチン遺伝子、筋クレアチンキナーゼ配列エレメント [Johnson et al, Mol Cell Biol, 9: 3393-3399 (1989)] を参照] およびマウスクレアチンキナーゼエンハンサー (mCK) エレメント、骨格筋速筋トロポニンC遺伝子、遅筋心筋トロポニンC遺伝子および遅筋トロポニンI遺伝子：低酸素誘導核因子 (Semenza et al, Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)) に由来する制御エレメント、ステロイド誘導エレメント、およびグルココルチコイド応答エレメント (GRE) を含むプロモーター (Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)) を参照)、ならびに他の制御エレメントを含む筋特異的制御エレメントにより方向づけられた形で、筋細胞および筋組織に形質導入する方法を提供する。

【0118】

筋組織は、必須な臓器ではなく接触が容易であるため、in vivoでのDNA送達において魅力的な標的である。本開示では、形質導入された筋線維からの導入遺伝子 (例えば、サルコグリカン) の持続発現を検討する。

【0119】

「筋細胞」または「筋組織」により、任意の種類 of 筋肉 (例えば、消化管、膀胱、血管または心臓組織に由来する、例えば、骨格筋および平滑筋) に由来する細胞または細胞の群を意味する。このような筋細胞は、分化または未分化であり、例えば、筋芽細胞、筋細胞、筋管、心筋細胞および心筋芽細胞であり得る。

【0120】

したがって、サルコグリカンをコードする有効用量 (または本質的に同時に投与する用量もしくは間隔を置いて与えられる用量) の rAAV を、それを必要とする哺乳動物被験体に投与する方法をまた本明細書において記載する。

【0121】

本明細書に開示する実施形態の1つまたは複数のいずれか、および必要に応じて使用のための指示を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになるキットを本明細書において、さらに提供する。キットは、本明細書に開示する組成物の1つまたは複数およびコルチコステロイドまたは本明細書において提供する併用療法の1つもしくは複数および必要に応じて使用のための指示を含むか、またはこれから本質的になるか、またはこれからまたさらになり得る。

【0122】

本開示が、記載する特定の態様に制限されず、したがって、言うまでもなく、変化し得ることが理解される。また、本開示の範囲が、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書において使用する用語は、特定の実施形態を説明する目的のものであり、限定することを意図しないことが理解される。

【0123】

本開示の多数の実施形態が記載されている。それにもかかわらず、種々の修飾形態が、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、行われ得ることが理解される。したがって、以下の例では、特許請求の範囲に記載する開示の範囲を、例示することを意図するが、限定することは意図しない。

【0124】

明示的に記載せず、他に意図しない限り、本技術が、ポリペプチド、タンパク質、ポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドまたは抗体に関する場合、このようなものの等価物または生物学的等価物が、本技術の範囲内であることを意図することが推測されるべきである。

【0125】

任意の特許、特許出願、刊行物または他の任意の文書の引用は、前述のいずれかが、関連先行技術であることを承認するものでもなく、このような刊行物または文書の内容または日付に関して任意の承認を成すものでもない。

【0126】

本明細書において開示する特徴のすべては、任意の組合せで併用し得る。本明細書において開示する各特徴は、同一に作用する代替の特徴、等価物、または類似の目的により置換し得る。したがって、他に明示的に指示しない限り、開示する特徴（例えば、抗体）は、等価物または類似の特徴の一属の例である。

10

【0127】

本明細書において使用する場合、すべての数値または数値範囲は、文脈上他に明らかに指示しない限り、このような範囲内の整数および範囲内の値または整数の分率を含む。さらに、値のリストを本明細書において記載する場合（例えば、約50%、60%、70%、80%、85%または86%）、リストは、すべてのその中間値および小数値を含む（例えば、54%、85.4%）。したがって、例えば、80%またはこれを超える同一性への参照は、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%等、ならびに81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%等、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%等、およびその他を含む。

20

【0128】

それを超える（それよりも大きい）、またはそれ未満の整数の参照は、それぞれ基準数よりも大きいまたは小さい任意の数字を含む。したがって、例えば、100未満への参照は、99、98、97等から減少して1の数に至るまでを含み、10未満は、9、8、7等から減少して1の数に至るまでを含む。

【0129】

本明細書において使用する場合、すべての数値または範囲は、文脈上他に明らかに指示しない限り、このような範囲内の値および整数の分率、ならびにこのような範囲内の整数の分率を含む。したがって、例えば、数値範囲、例えば、1~10への参照は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10ならびに1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等、およびその他を含む。したがって、1~50の範囲への参照は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等、50を含むそれ以下、ならびに1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等、およびその他を含む。

30

【0130】

一連の範囲への参照は、その連続内の種々の範囲の境界値を組み合わせた範囲を含む。したがって、例えば、一連の範囲、例えば、1~10、10~20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~75、75~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~400、400~500、500~750、750~1,000、1,000~1,500、1,500~2,000、2,000~2,500、2,500~3,000、3,000~3,500、3,500~4,000、4,000~4,500、4,500~5,000、5,000~6,000、6,000~7,000、7,000~8,000または8,000~9,000の範囲への参照は、10~50、50~100、100~1,000、1,000~3,000、2,000~4,000等の範囲を含む。

40

【0131】

前述への修飾は、本技術の基本的態様から逸脱することなく、加えることができる。本技術は、1つまたは複数の特定の実施形態を参照して、実質的に詳細に記載されているが、当業者は、本出願において詳細に開示する実施形態に変更を加えることができ、なお、

50

このような修飾および改良は、本技術の範囲および趣旨の内であることを認識する。

【0132】

本明細書において例示的に記載する技術は、本明細書において詳細には開示しない任意のエレメント（複数可）の非存在下で、適切に実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各場合において、用語「含む」、「から本質的になる」および「からなる」のいずれも、他の2つの用語のいずれかと置換することができる。用いられている用語および表現は、説明するための用語であり非限定的な用語として使用し、このような用語および表現の使用は、示し記載する特徴の任意の等価物またはその断片を除外せず、種々の修飾修態が、特許請求する本技術の範囲内で可能である。

【0133】

本明細書において言及する、すべての刊行物および特許は、個々の刊行物または特許のそれぞれが参照により組み込まれると詳細かつ個別に示すのと同様に、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合は、本明細書の任意の定義を含む本出願が優先される。しかし、本明細書において引用する任意の参考文献、論文、刊行物、特許、特許公開、および特許出願への言及は、それらが、有効な先行技術を構成するか、または世界の任意の国における共通の一般知識の一部を形成するという、承認または任意の形態の示唆として解釈せず、解釈するべきではない。

【0134】

本明細書では、任意の濃度の範囲、パーセンテージの範囲、比の範囲、または整数の範囲は、他に指示しない限り、列挙する範囲内の任意の整数の値、および適切な場合、その分率（例えば、整数の10分の1および100分の1）を含むと理解されるべきである。用語「約」は、数または数値の前に直接付く場合、数または数値が、プラスマイナス10%の範囲に及ぶことを意味する。用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、本明細書において使用する場合、他に指示しない限り、列挙する成分の「1つまたは複数」を指すことが理解されるべきである。選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢のいずれか1つ、両方、またはこれらの任意の組合せを意味すると理解されるべきである。用語「および/または」は、選択肢のいずれか1つ、または両方を意味することが理解されるべきである。本明細書において使用する場合、用語「含む(include)」および「含む(comprise)」は、同義的に使用する。

【0135】

本明細書において使用する節の見出しは、単なる構成目的のためのものであり、記載する主題を限定するものとして解釈されない。

【0136】

本開示は、以下の実施例において、さらに記載し、これは、特許請求の範囲に記載する本開示の範囲を限定しない。

【実施例】

【0137】

（実施例1：scAAVrh74.tMCK.hSGCBの構築およびベクター効力）
 コドン最適化完全長ヒトサルコグリカン(SCGB)cDNA（配列番号1）を含むSGCGAAV構築物を、図1に示すように構築した。形質導入効率をより効率的にするために、自己相補性AAV骨格を使用してパッケージングされるようにSGCGAAV構築物を構成した。SGCGcDNA(969)を、MHCK7プロモーター(792bp)により駆動させるように構成した。イントロンおよび5'UTRは、プラスミドpCMV(Clontech)に由来した。SGCGAAV構築物は、ATG開始コドンの直前にコンセンサスコザックを有し、またmRNA終結のための小型の53bp合成ポリAシグナルを有した。cDNAは、ヒトへの使用のためにコドン最適化され、GenScript(Piscataway, NJ)により合成された。このベクターに含まれる唯一のウイルス配列は、AAV2の逆位末端反復であり、これは、ウイルスDNA複製とパッケージングの両方に必要であった。

【0138】

この試験のためのベクターは、研究グレード条件下で、HEK293細胞の3重トランスフェクション方法を利用して生成した。生成後のベクターの特徴付けは、スーパーコイルの標準物質を用いたqPCRによる力価の決定、エンドキシニンレベル(EU/mL)の決定および無菌性の評価を含んだ。生成したベクターは、SDS-PAGEにより解析して、予想されるrAAVとのバンド形成パターンの一貫性を検証した。ベクター調製物は、線状プラスミド標準物質を用いて力価を測定し、スーパーコイルのプラスミド標準物質により力価を再測定した。ベクターは、完全長ヒトサルコグリカンcDNA(NC_000013.11)、発現を駆動する筋特異的MHCK7プロモーター、コンセンサスコザック配列(CCACCC)、SV40キメライントロン、合成ポリアデニル化部位(53bp)を含むプラスミドを使用して生成した(図1)。SGCG発現カセットは、自己相補性(sc)AAVrh.74ベクターにパッケージングしたAAV2 ITR間にクローン化して、心臓組織への形質導入を増強する。

【0139】

この試験デザインの概要を表2に提供する。用量値は、ベクターゲノム(vg)の総数のqPCR評価により決定する。ベクター調製物に、部分的な完全AAVカプシドが少なくともいくらか含まれると、qPCR方法により、用量の過剰評価が生じ得る。したがって、所与の用量(例えば、5E+13)における有効性の決定では、ベクターを精製して部分的な完全AAVカプシドを除去すると、qPCRにより測定した低いベクター用量において、有効性が認められ得ることを示唆する。表2におよび実施例を通して列挙した総用量(vg)および被験体1キログラムあたりのベクターゲノムに関する用量(vg/kg)は、部分的な完全AAVカプシドを考慮に入れていない。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2: scAAVrh74.MHCK7.hSGCG 試験デザインの概要

試験アーム	送達経路	動物系統	総用量 (vg)	用量 (vg/kg)	マウス数	処置エン ドポイント (月)	解析
効力	IM	SGCG ^{-/-}	3E+11	N/A	2	1	IF
効力	IV	SGCG ^{-/-}	1E+13	5E+14	1	1.5	IF
有効性	IV	SGCG ^{-/-}	1E+12	5E+13	6	3	IF, H&E, ウエスタン ブロット, TA Phys, Dia Phys, 活 動ケージ, Histopath, 体内分布 qPCR, 血 清化学
有効性	IV	SGCG ^{-/-}	4E+12	2E+14	6	3	IF, H&E, ウエスタン ブロット, TA Phys, Dia Phys, 活 動ケージ, Histopath, 体内分布 qPCR, 血 清化学
有効性	IV	SGCG ^{-/-}	1E+13	5E+14	5	3	IF, H&E, ウエスタン ブロット, TA Phys, Dia Phys, 活 動ケージ, Histopath, 体内分布 qPCR, 血 清化学
有効性	IV	SGCG ^{-/-}	--	--	6	--	IF, H&E, ウエスタン ブロット, TA Phys, Dia Phys, 活 動ケージ, Histopath, 血清化学
有効性	IV	C57BL/6	LRS	--	6	3	IF, H&E, ウエスタン ブロット, TA

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

							Phys, Dia Phys, 活 動ケージ Histopath, 血清化学
--	--	--	--	--	--	--	--

N/A:該当なし

IF:免疫蛍光; H&E:ヘマトキシリン&エオシン染色; TA Phys: TA 筋における比筋力測定および ECC 損傷に対する耐性; Dia Phys:横隔膜筋における比筋力測定; Histopath: 組織病理の公式検査; 「-」:未注射。

10

【 0 1 4 0】

すべての有効動物は、4 ~ 8 週齢で処置し、注射後 3 カ月に剖検した。SGCG - / - 陰性対照マウスは、4 カ月齢で剖検した。

【 0 1 4 1】

scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG 試験物質の効力決定は、SGCG - / - マウスへのベクターの筋肉内および全身注射を実施することにより達成した。乳酸リンゲル液 (LRS) を注射した野生型マウスは、陽性対照として作用し、未注射の SGCG - / - マウスは、陰性対照として作用する。

20

【 0 1 4 2】

8 週齢の BL6 野生型 (WT) マウスおよび サルコグリカンノックアウト (- SGKO) マウス由来の前脛骨 (TA) 筋を抽出し、組織切片をヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) で染色して、各筋肉の組織学を検査した。このような非常に若年齢であっても、 - SGKO マウスは、筋肉において、筋線維の壊死、炎症性浸潤物、および線維性組織の存在により疾患表現型を実証した (図 2)。

【 0 1 4 3】

SGCG AAV 構築物を rh.74 血清型の AAV にパッケージングして、組換え AAV (rAAV) を生成し、scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG と名付けた。合計 3 匹のマウスに注射して、scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG の効力を決定した。LRS を注射した C57BL / 6 WT マウス 1 匹、および未注射の SGCG - / - マウス 1 匹は、それぞれ陽性および陰性対照として作用した。残りのマウス 3 匹は、SGCG - / - であり、LTA への IM (n = 2) または尾静脈への IV (n = 1) のいずれかにより scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG を注射して、ベクターのロットが効力を有するかどうかを決定した。試験デザインを表 3 に要約する。

30

【表 3】

表 3: scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG 効力アッセイ

マウスの数	マウス系統	注射物質	用量(vg 合計)	送達経路	容量(μL)
1	SGCG-/-	N/A	陰性対照	N/A	N/A
1	C57BL/6	LRS	陽性対照	IV	200
2	SGCG-/-	AAV.hSGCG	3x10 ¹¹ vg	IM	30
1	SGCG-/-	AAV.hSGCG	1x10 ¹³ vg	IV	460 (230/230)

40

【 0 1 4 4】

50

4週齢の - S G K Oマウスに筋肉内 (I M) 注射により T A筋へ s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C Gを総用量 3×10^6 v g の用量で注射した。注射後4週 (8週齢) にマウスを安楽死させ、 T A筋を抽出し、液体窒素で冷却したメチルブタン中に新鮮凍結させた。サルコグリカンについての免疫蛍光 (I F) 染色により、未注射の右 T A (R T A) 筋においてサルコグリカンの非存在が示され、注射した左 T A (L T A) 筋において膜サルコグリカントタンパク質発現のほぼ完全な回復が示された (図 3 A)。

サルコグリカンについてのウエスタンブロット (図 3 B) により、2匹の B L 6 W T T A筋におけるサルコグリカン発現、 - S G K O T A筋におけるタンパク質の非存在、および注射したマウス # 7 9 4 および # 7 9 5 由来の T A筋におけるサルコグリカントタンパク質発現の回復が示された。

【 0 1 4 5 】

総用量 3×10^6 v g の特定用量の s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G を I M により S G C G - / - マウスへ送達すると、注射した L T A筋において 9 3 . 0 3 % の h S G C G 発現が生じた。これは、本発明者らのこれまで試験したサルコグリカン (s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C B) ベクターのレベルに類似している。ベクターを投与したマウス (動物 I D : 7 9 4 , 7 9 5) の免疫蛍光イメージングにより、 h S G C G 導入遺伝子の発現が確認される (図 3 A) 。 2 0 × 画像を含めて、注射した筋肉における発現量を可視化する。予想されたように、 C 5 7 B L / 6 W T マウスは、 1 0 0 % のサルコグリカントタンパク質発現を示し、 S G C G - / - マウスでは、サルコグリカン発現が完全に存在しなかった (図 3 C) 。

【 0 1 4 6 】

尾静脈を介して S G C G - / - マウス1匹 (# 7 9 7) へ全身注射すると、高レベルの h S G C G 導入遺伝子発現が生じた。出願人は、総用量 1×10^{13} v g (5×10^{14} v g / k g) の s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G で処置した、このような有効マウスのすべての骨格筋において 9 4 . 0 0 % の形質導入を達成することが可能であった。 A A V により送達された h S G C G 導入遺伝子発現の、解析した骨格筋のすべてを平均化したパーセントは、 9 5 . 9 8 % であった。また、出願人は、非常に高レベルの、全身送達時の心臓への形質導入を達成することができた。 h S G C G の広範な発現を示す、すべての骨格筋ならびに横隔膜および心臓の代表的 2 0 × 免疫蛍光画像を図 7 に示す。

【 0 1 4 7 】

(実施例 2 : B L 6 W T マウスにおける s c A A V r h 7 4 . t M C K . h S G C B ベクターの効力および毒性)

4週齢の B L 6 W T マウスの T A筋に、筋肉内 (I M) 注射により総用量 3×10^6 v g の用量の s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G を注射した。注射後4週 (8週齢) にマウスを安楽死させ、 T A筋を抽出し、液体窒素で冷却したメチルブタン中に新鮮凍結させた。サルコグリカンについての免疫蛍光 (I F) 染色により、未注射の右 T A (R T A) 筋においてサルコグリカンについての膜染色が示され、注射した左 T A (L T A) 筋においてサルコグリカントタンパク質の過剰発現を意味する細胞内染色が示された (図 4 A) 。サルコグリカンについてのウエスタンブロット (図 4 B) により、注射した L T A筋におけるサルコグリカントタンパク質の過剰発現が示された。 T A筋の H & E 染色により、毒性は示されず、未注射の R T A または注射した L T A のいずれにおいても、中心核、壊死線維、炎症性浸潤、または線維性組織のいずれも完全に存在しなかった (図 5) 。

【 0 1 4 8 】

(実施例 3 : s c A A V r h . 7 4 . t M C K . h S G C B の全身送達後の遺伝子発現)

4 ~ 5 週齢の - S G K O マウスの尾静脈に総用量 1×10^{12} v g (5×10^{13} v g / k g) を静脈内注射した。処置の6週後にマウスを安楽死させた。 T A 、腓腹筋 (G A S) 、四頭筋 (Q U A D) 、殿筋 (G L U T) 、 P S O A S 、三頭筋、横隔膜、および心筋に対する免疫蛍光染色により、サルコグリカンの広範な発現が実証された (図 6) 。

【 0 1 4 9 】

s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G 試験物質の有効性の決定は、単回用量（総用量 1×10^{13} v g、 5×10^{14} v g / k g）を使用した、S G C G - / - マウス（遺伝子型：s g c g C 5 7）への全身注射を実施することにより達成した。臨床用量（総用量 1×10^{12} v g（ 5×10^{13} v g / k g））、中間用量（総用量 4×10^{12} v g（ 2×10^{14} v g / k g））、および高用量（総用量 1×10^{13} v g（ 5×10^{14} v g / k g））の s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G を S G C G - / - マウスの尾静脈へ全身注射し、注射後3カ月に安楽死させた。

【 0 1 5 0 】

本発明者らの s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G 効力アッセイの結果に従って、出願人は、S G C G - / - マウス5匹への尾静脈注射によりベクターを総用量 1×10^{13} v g（ 5×10^{14} v g / k g）の発明者らによる有効用量で送達して、3カ月の延長時点で全身送達された場合の、本発明者らのベクターの導入遺伝子発現および有効性を評価した。4週齢のマウスに注射し、注射後3カ月に完全な剖検を実施した。効力アッセイにおいて上に考察したすべての骨格筋ならびに横隔膜および心臓を抽出して解析した。また、肺、腎臓、肝臓、脾臓、および生殖腺を含む臓器を採取して、毒性学および体内分布試験を行った。要するに、h S G C G 導入遺伝子発現は、3カ月の処置後も高いままであり、処置したマウス由来のすべての筋肉は、再び高度に形質導入された。これは、筋肉の組織病理の改善ならびに T A および横隔膜筋の機能の改善により達成された。s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G ベクターの全身送達により、筋肉または臓器において、いかなる毒性も誘導されなかった。

【 0 1 5 1 】

サルコグリカン発現

ヒト サルコグリカンについての免疫蛍光染色を使用して、s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G ベクターを全身注射した、すべての S G C G - / - マウスの左右両方の骨格筋6種に加えて横隔膜および心臓において h S G C G 導入遺伝子発現を決定した。このような筋肉は、T A、G A S、Q U A D、G L U T、P S O A S、T R I を含んだ。発現解析および形質導入効率の目的のために、処置したマウス5匹由来の左右の筋肉の画像を利用して定量した。各筋肉の $20 \times$ 画像を4つ取得し、h S G C G 陽性線維のパーセント（陽性発現線維の数 / 線維の総数）を各画像について決定して、各マウス由来の各筋肉についての形質導入パーセントの平均を結果として生じさせた。図 8 A は、処置したマウスから取得した代表的画像を示し、横隔膜を含む定量したすべての筋肉を平均化した 92.26% の高レベルの発現を実証する。また、出願人は再び、ベクターで処置したすべてのマウスの心筋において高レベルの形質導入を確認した。図 8 B は、s c A A V r h . 7 4 . M H C K 7 . h S G C G ベクターを静脈送達したマウス由来の、すべての骨格筋および心臓における h S G C G 導入遺伝子の発現を確認するウエスタンブロットを示す。表 4 では、各マウスの各筋肉についての4つの $20 \times$ 画像間の発現パーセントの平均、ならびにすべてのマウス5匹にわたる各筋肉の平均を列挙する。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. γ サルコグリカン導入遺伝子発現パーセントの平均

動物 ID	5229	5230	5231	5232	5233	平均
筋肉						
TA	97.79	97.79	99.54	99.13	96.59	98.17
GAS	90.88	90.88	74.14	97.67	93.49	89.41
QUAD	88.37	88.37	96.85	95.01	76.15	88.95
GLUT	96.19	96.19	91.12	100	92.83	95.27
PSOAS	97.55	97.55	99.01	49.88	97.92	88.38
TRI	97.32	97.32	99.31	94.98	93.31	96.45
DIA	93.02	93.02	75.56	97.14	87.22	89.19

10

20

【0152】

処置した筋肉の組織病理

骨格と心臓の両方のSGCG-/-マウス由来の筋肉は、複数の限局性壊死部を有する明白な筋線維の萎縮および肥大を含む広範なミオパシーを示す。また、増え続ける単核細胞炎症数（リンパ球およびマクロファージと、点在する好中球）、ならびにジストロフィー性石灰化、脂肪浸潤、中心核形成、および線維症の増加が存在する。図9Aのヘマトキシリン&エオシン染色では、正常WTマウスと比較した場合のSGCG-/-マウスにおけるこのジストロフィー表現型、および処置後の筋病理の改善を示す。組織学的パラメータの定量により、SGCG-/-マウスの骨格筋における中心的に核形成した線維の数の有意な増加の後、サルコグリカン遺伝子導入の結果として、多種多様な骨格筋における中心核形成の低減が示される（図9B）。さらに徹底的な筋組織病理解析により、ベクターで処置した罹患SGCG-/-マウスの調べた筋肉3つすべて（GAS、PSOASおよびTRI）において、平均線維径の増加を伴う線維サイズ分布の正常化が明らかとなる（図10A~10F）。種々の筋肉についての個々の中心核数および平均線維径を各マウスから解析した。

30

【0153】

（実施例4：-SGKOマウスの生理学的欠乏）

シリウスレッド染色を実施して、線維性組織の量を定量する。4カ月齢の-SGKOMマウスおよびBL6WTマウスを試験して、骨格筋における力の欠乏が存在するかどうかを評価する。前脛骨（TA）筋は、比筋力および損傷に対する耐性の顕著な減少について、対照と比較して試験する。また、横隔膜筋は、類似の方法で試験して、任意の顕著な減少を検出する。この測定可能な減少により、AAV.hSGCB療法の有効性を確立する機能的転帰尺度がもたらされる。

40

【0154】

（実施例5：scAAVrh74.tMCK.hSGCB処置後の機能的転帰）

定期的な3カ月の試験に基づいて-SGKOMマウスのコホートに注射して、有効性および毒性を定量する（表5）。マウスを活動ケージ解析に供した後、安楽死させて、処置したマウスの全体的活動を-SGKO対照と比較して決定する。TAおよび横隔膜筋を生理学的解析に供して、比筋力出力および損傷/疲労に対する耐性を決定する。

50

SGCKO筋をBL6WT対照と比較して、処置したマウスにおける処置有効性の決定に使用する機能的転帰尺度を確立する。すべての骨格筋は、サルコグリカンの発現についてIF（免疫蛍光）染色し、組織病理についてH&E染色する。定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）を、注射したマウス由来の筋肉および臓器について実施して、ベクターゲノムの体内分布を決定する。

【表5】

表5

マウス系統	試験物質	ヒト用量	サンプルサイズ	エンドポイント
C57/BL6	LR*	NA	6	12週間
SGCG KO	LR	NA	6	12週間
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	5×10^{13} vg/kg	6	12週間
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	1×10^{14} vg/kg	6	12週間
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	2×10^{14} vg/kg	6	12週間

【0155】

（実施例6：全身送達の機能的評価）

hSGCG遺伝子導入により罹患筋肉に機能的利点がもたらされるかどうかを決定するために、出願人は、scAAVrh74.MHCK7.hSGCGで処置したSGCG-/-マウス由来のTAおよび横隔膜筋の機能特性を評価した。実施例1～5に概要を述べるように、はじめに、出願人は、マウスの四肢骨格筋および横隔膜の組織病理を、サルコグリカンの非存在下で実証した。未処置SGCG-/-マウスのTA筋のin situでの解析により、正規化した比筋力の発生において、BL6WT TA筋と比較して、37.68%の統計学的に有意な減少が明らかとなった（BL6WT：291.65 mN/mm²対SGCG-/-：181.77 mN/mm²）。比筋力出力は、処置後、SGCG-/-筋と比較して、正常WTレベルまで有意に増加した（SGCG-/-：181.77 mN/mm²対処置：266.02 mN/mm²）（図11Aおよび図11C）。hSGCG遺伝子導入の機能的利点を決定する、さらなる一機能的転帰尺度は、伸張性収縮の回復後のTA筋における収縮誘発性損傷に対する耐性を評価することである。正常BL6WTマウスのTA筋は、10回の伸張性収縮ラウンドの後に、未処置SGCG-/-TA筋における37%の力の喪失と比較して、18%の力の発生を失ったのみであった。ベクター処置SGCG-/-筋は、WTを超えるレベルまで向上し、この場合、伸張性収縮（ECC）プロトコールの後にほんの10%の力の喪失を確認した（図11B）。

【0156】

治療的hSGCG導入遺伝子の全身送達から生じ、最終的に、SGCG-/-マウスの疾患表現型を改善させる機能的利点の可能性をさらに試験するために、オープンフィールドケージ活動のレーザーモニタリングをマウスのすべての群に実施した。図12のグラフは、正常BL6WTと比較して、SGCG-/-マウスのxおよびy面における全歩行運動の23.64%の減少を示す（BL6WT：7655.42ビームブレイク/時対SGCG-/-：5846.00ビームブレイク/時）。scAAVrh74.MHCK7.hSGCG処置マウスは、定性的観察により、SGCG-/-マウスと比較して、全体的にさらに活動性であり、オープンフィールドのケージ活動の定量的測定では、24.

90%の歩行運動の増加を示した（SGCG-/- : 5846.00 ビームブレイク/時
対処置 : 7301.80 ビームブレイク/時）。また、個々のマウスにおける各パラメータの詳細値を測定した。

【0157】

（実施例7：毒性学およびベクター体内分布）

この試験の目的は、試験物質 scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG の送達後3カ月の SGCG-/- マウスにおける hSGCG 遺伝子治療の潜在的毒性または安全性への懸念を、上記と同一の動物を利用して評価することであった。総用量 1.0×10^{13} vg (5×10^{14} vg/kg) の試験物質を、午前と午後の2回の別々の注射 230 μ L に分割した 460 μ L の容量で、静脈内 (IV) 経路により、4週齢の SGCG-/- 5匹に与えた。未注射の SGCG-/- マウス6匹は、未処置罹患対照として作用し、C57BL/6WT マウス5匹は、正常健常対照として作用した（表6）。完全な剖検をすべてのマウスについて実施して、6種の骨格筋（TA、GAS、QUAD、GLUT、PSOAS および TRI）を左右両側、横隔膜および心臓、ならびに肺、腎臓、肝臓、脾臓、および生殖腺を含む内臓とともに抽出した。本発明者らのベクターの安全性を評価するために、筋組織の凍結切片についてヘマトキシリン&エオシン染色を実施し、回収したすべての臓器をホルマリンで固定し、また、ヘマトキシリン&エオシンで染色した。次いで、このような切片は、独立した獣医病理学者により、毒性について公式に検査したところ、有害作用は検出されなかった。結果を以下の表7に要約する。組織病理報告の詳細も作成した。定量的PCRを実施して、ベクターの体内分布を評価した。このような結果を以下の表7および図13に示す。

【0158】

ベクター形質導入組織の組織病理検査

scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG の安全性および毒性学プロファイルを、全身送達を使用して決定するために、この前臨床試験由来のベクター投与 SGCG-/- マウスおよび対照の群から回収した、横隔膜、ならびに心臓および他の5種の臓器を含む、すべての骨格筋をH&Eで染色し、各組織の切片を、独立した獣医病理学者により公式に検査した。群の詳細および試験デザインを表6に示す。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6. scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG 遺伝子導入組織病理検査のコホートの要約

	遺伝子型	コホート	用量(vg)	性別	注射時の月齢	剖検時の月齢	処置時間
1	SGCG ^{-/-}	試験物質	1.0x10 ¹³	雌	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雌	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雌	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雌	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雌	1 カ月	4 カ月	3 カ月
2	BL6 WT	ビヒクル 対照	LRS	雄	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雄	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雄	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雄	1 カ月	4 カ月	3 カ月
				雄	1 カ月	4 カ月	3 カ月
3	SGCG ^{-/-}	疾患対照	N/A	雌	N/A	4 カ月	N/A
				雌	N/A	4 カ月	N/A
				雄	N/A	4 カ月	N/A
				雄	N/A	4 カ月	N/A

【 0 1 5 9 】

要約すれば、scAAVrh.74.MHCK7.hSGCGのIV注射により、調べた任意の骨格筋の筋線維において、いかなる顕微鏡的变化も誘発されなかった(表7)。加えて、処置に関連する病変は、組織学的に評価した組織のいずれにおいても確認されず、試験物質の耐容性が良いことを示した。補遺Jの詳細を参照されたい(レポート番号AAVrh74-SGCG-MOUSE-001.1)。顕著な任意の変化は、処置マウスと対照マウスの両方において確認され、偶発的所見であると考えられた。その上、独立した検査により、対照マウス由来の基準検体と比較して、試験物質scAAVrh.74.MHCK7.hSGCGを投与すると、筋線維の萎縮、変性、および破壊が実質的に低減することが示され、ベクターにより、罹患マウスにおけるSGCGの非存在と関連するミオパシーの程度が好転可能であることを示唆した。

【表 7】

表 7. *SGCG*-/-マウスにおける *scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG* の安全性試験の組織病理結果

試験物質 (ベクター用量)	注射時の 月齢	処置期間	解析した組 織	公式な組織 病理
<i>scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG</i> (総用量 $1e13$ vg - $5e14$ vg/kg) 動物 5 匹を解析	1 カ月	3 カ月	骨格筋、心 臓、肺、腎 臓、肝臓、 脾臓、生殖 腺	所見なし

10

【0160】

ベクターゲノム体内分布

試験物質特異的 DNA 配列の存在を、リアルタイム定量的 PCR アッセイ (qPCR) を使用して調べた。ベクターを投与した *SGCG* - / - 動物 2 匹から採取した組織サンプルについて、体内分布解析を実施した。陽性シグナルは、検出されたゲノム DNA $1 \mu\text{g}$ 当たりの 1 本鎖 DNA 100 コピーと同等か、またはこれを超えるあらゆるものである。組織を剖検において回収し、*MHCK7* プロモーターの配列に対して特異的なベクター特異的プライマープロブセットを利用した。表 8 および図 13 では、*scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG* 注射マウス由来の各組織サンプルにおいて検出されたベクターゲノムコピーを示す。

20

【0161】

scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG 転写物を、採取したすべての組織において、様々なレベルで検出した。予想されたように、静脈内送達経路の性質のため、ベクターは、肝臓において高レベルで検出されたが、骨格筋および心臓において最も高いレベルで確認された。最も低いレベルは、肺、腎臓、および脾臓において検出された。このようなデータは、試験物質が、ベクター投与マウスの調査したすべての組織に効率的に送達されたことを示す。

30

40

50

【表 8】

表 8. *SGCG*^{-/-}マウスにおける高用量 *scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG* 全身送達後の定量的 PCR の結果

組織	ベクターゲノムコピー/ μg	
	5229	5231
心臓	1.56E+06	1.30E+06
肺	1.15E+05	2.29E+05
腎臓	1.74E+05	2.48E+05
肝臓	9.23E+06	1.50E+07
脾臓	1.58E+05	9.05E+04
横隔膜	4.63E+05	1.60E+06
TRI	3.35E+05	3.48E+05
TA	6.23E+05	6.70E+05

10

20

【0162】

血清化学の解析

肝機能をさらに評価するために、出願人は、通常血清化学パラメータである2つの肝臓酵素、アルカリアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) のレベルを評価した。このような酵素のいずれかの上昇は、肝細胞の損傷および肝機能障害を意味し得る。出願人は、C57BL/6WTマウス全6匹、未処置SGCG^{-/-}マウス全6匹、およびscAAVrh.74.MHCK7.hSGCG投与マウス全5匹の由来の血清を解析した。図14Aは、未処置SGCG^{-/-}マウスにおけるALTが上昇して、健常BL6WTマウスにおいて確認されるレベルの2倍となることを示す (BL6WT: 44.20 U/L 対 SGCG^{-/-}: 89.00 U/L)。scAAVrh.74.MHCK7.hSGCGをSGCG^{-/-}マウスへIV送達すると、ALTレベルの32.02%の減少が生じた (SGCG^{-/-}: 89.00 U/L 対 処置: 60.50 U/L)。図14Bは、マウスの3群すべてにおけるASTレベルが、未処置SGCG^{-/-}マウスにおいて113.27%の有意な上昇を示したことを示す (BL6WT: 326.00 U/L 対 SGCG^{-/-}: 695.25 U/L)。このようなASTレベルは、scAAVrh.74.MHCK7.hSGCGの全身送達後に41.10%低減した (図14B)。まとめると、肝臓損傷のバイオマーカーであると考えられる肝臓酵素が、罹患SGCG^{-/-}マウスにおいて上昇するが、SGCG^{-/-}罹患マウスにおいて全身hSGCG遺伝子導入を行うと、ALTとASTの両方のレベルが正常化される。すべてのマウスにおいて、各酵素についての個々の値を決定した。

30

40

【0163】

結論として、hSGCB導入遺伝子を保有する2つの異なる用量のAAVウイルスの全身送達は、安全かつ無毒であると示された。試験した用量は、総用量 $1.2 \times 10^{13} \text{ v g}$ ($6.0 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$) および総用量 $1.0 \times 10^{13} \text{ v g}$ ($5.0 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$) を含む。特に、高用量 (総用量 $1.0 \times 10^{13} \text{ v g}$ - $5.0 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$) のscAAVrh.74.MHCK7.hSGCGの、SGCG^{-/-}の尾静脈を介する全身送達は、罹患筋肉における、サルコグリカン発現の回復およびジストロフィー組織病理の逆転において安全かつ有効である。

50

【図面】

【図 1】

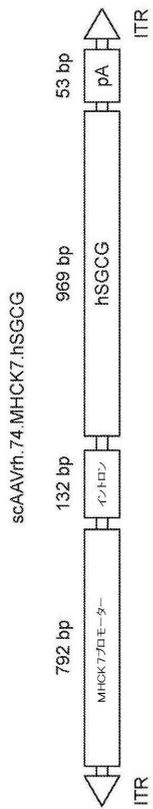
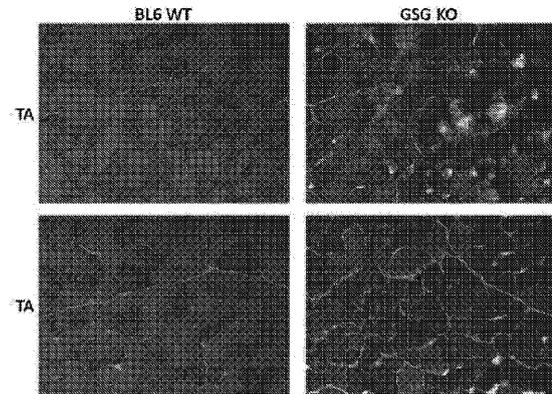


FIG. 1

【図 2】

FIGURE 2

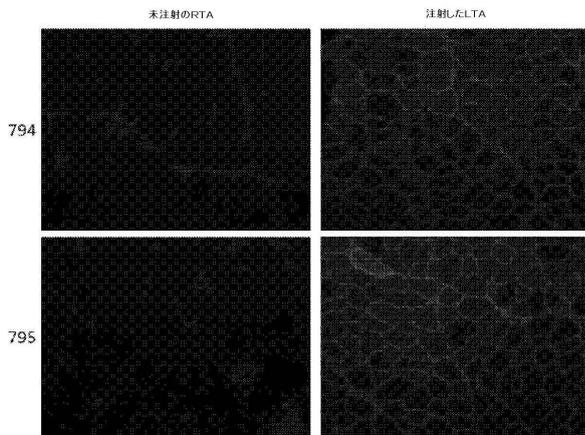


10

20

【図 3 - 1】

FIGURE 3A



【図 3 - 2】

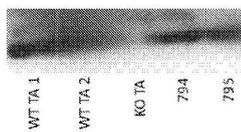
FIGURE 3C



30

40

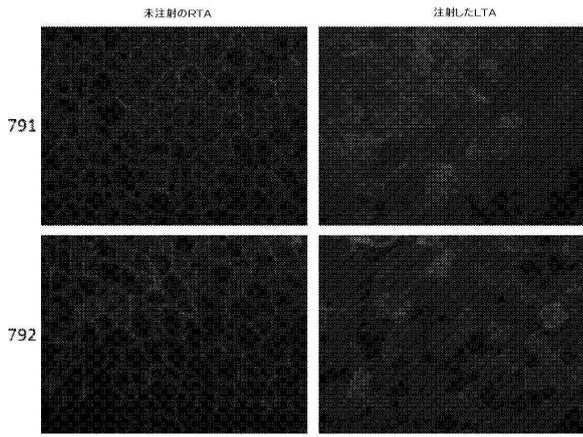
FIGURE 3B



50

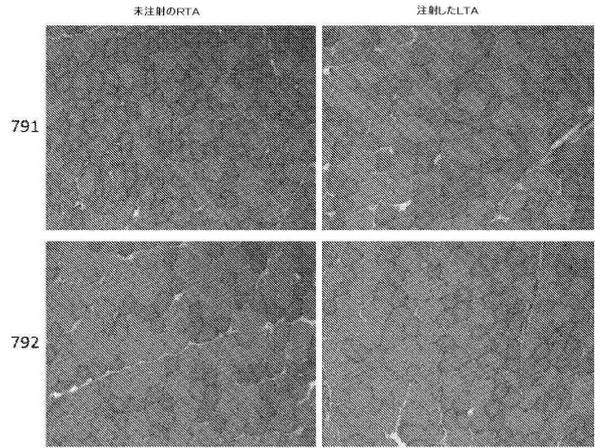
【 図 4 】

FIGURE 4A



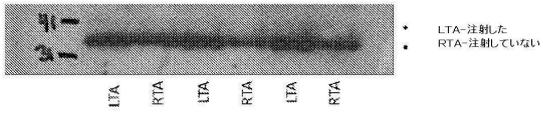
【 図 5 】

FIGURE 5



10

FIGURE 4B



20

【 図 6 】

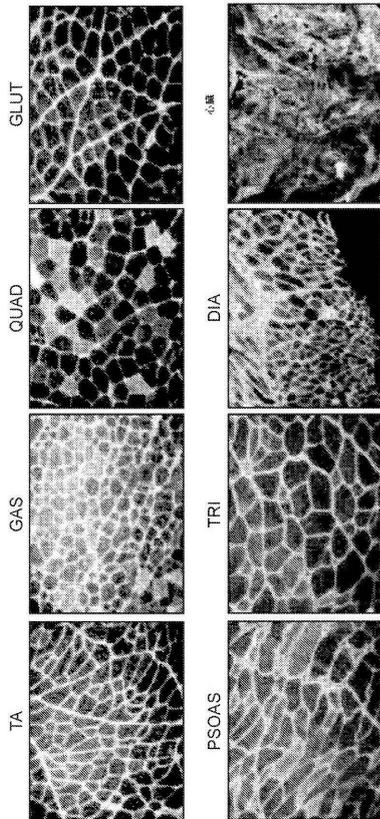
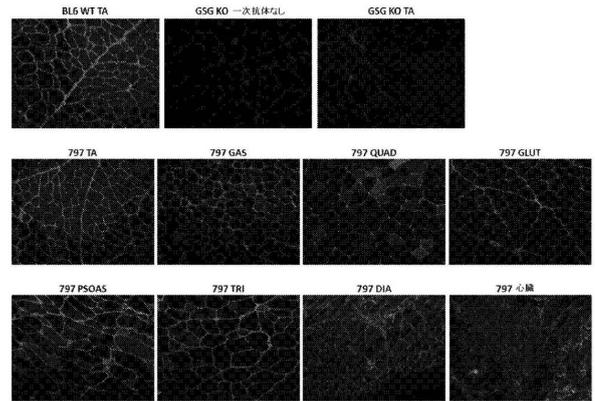


FIG. 6

【 図 7 】

FIGURE 7



30

40

50

【 図 8 】

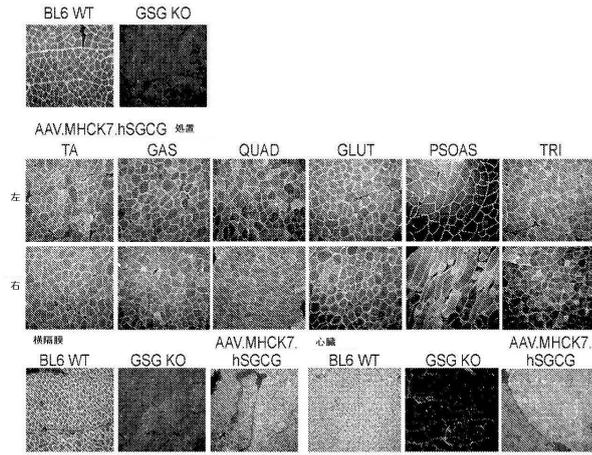


FIG. 8A

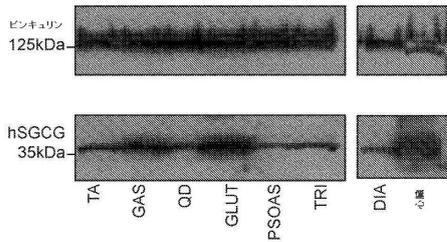


FIG. 8B

【 図 9 】

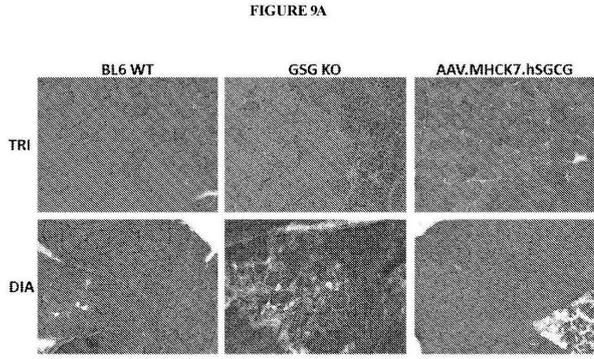
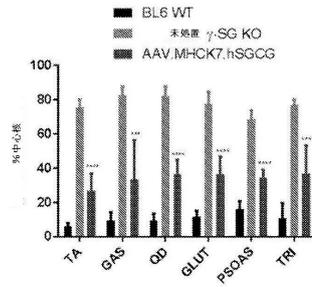


FIGURE 9B



10

20

【 図 10 - 1 】

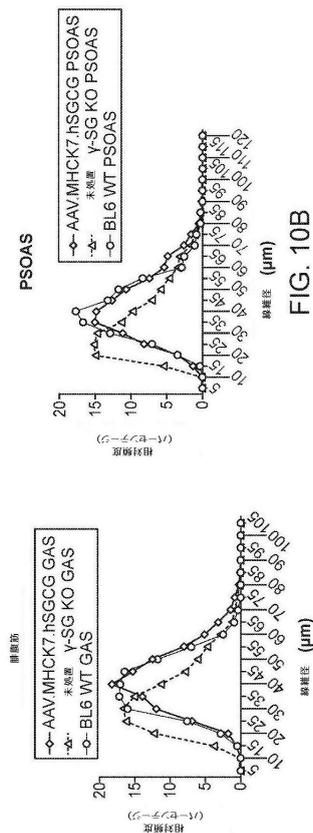


FIG. 10B

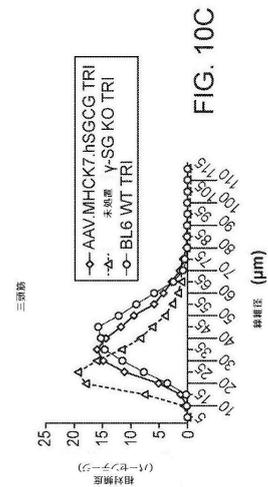


FIG. 10C

FIG. 10A

【 図 10 - 2 】

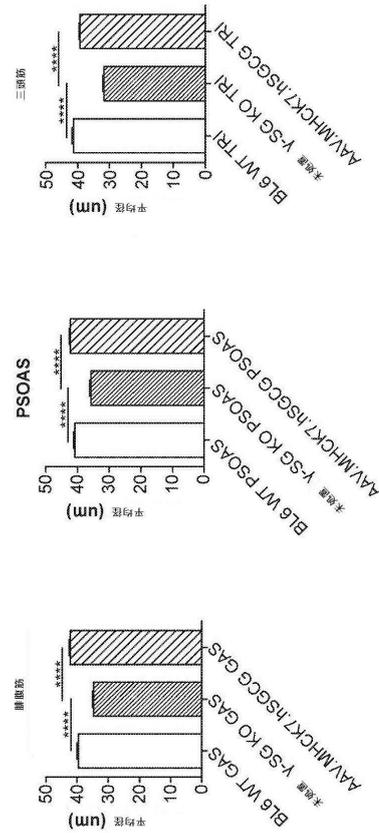


FIG. 10F

FIG. 10E

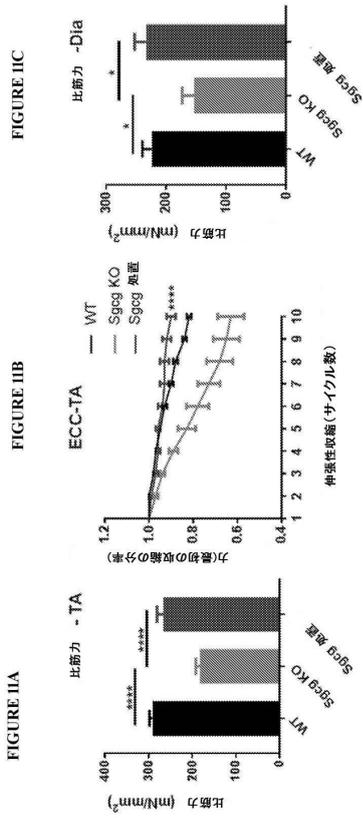
FIG. 10D

30

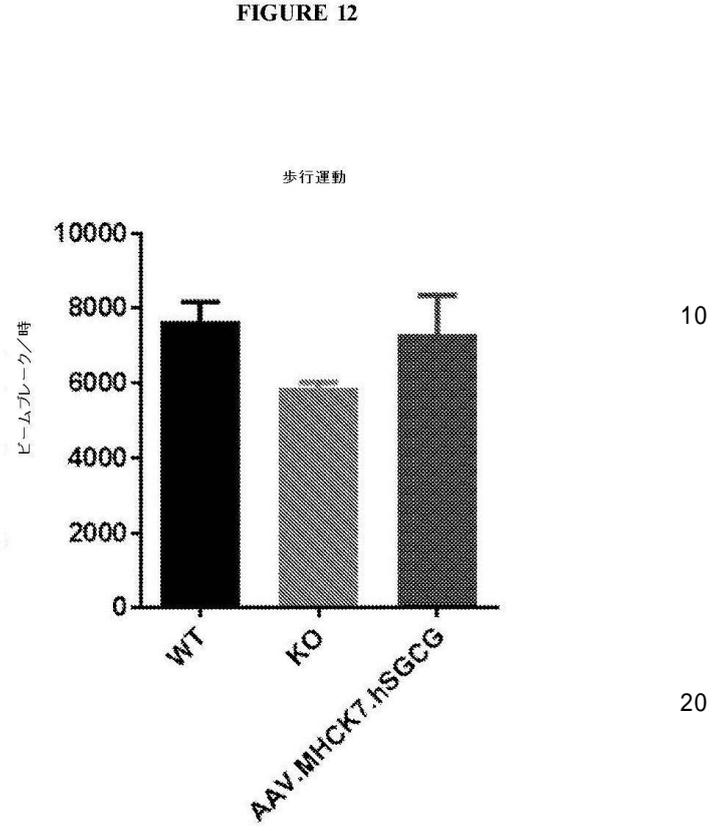
40

50

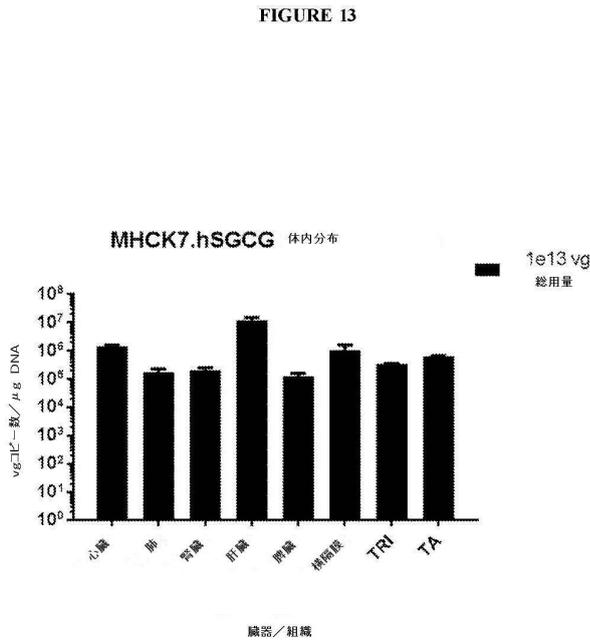
【 図 1 1 】



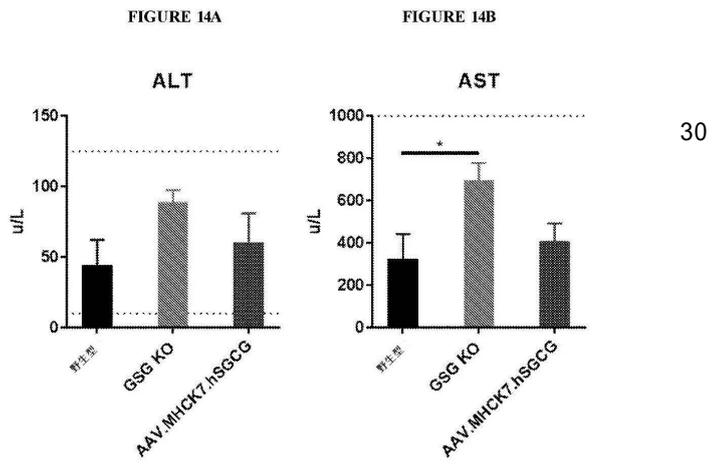
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

0007361701000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 14/47 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/56 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 14/47
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 K 31/56
 A 6 1 P 43/00 1 2 1

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ロディノ - カラパック, ルイズ アール.

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 7 0 0, リサーチ
 インスティテュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル 気付

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 1 2 7 4 (W O , A 2)

Serge HERSON et al. , “ A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1- -sarcoglycan g
 ene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C ” , Brain , 2011年01月10日 , Vol.
 135、 No. 2 , p.483-492 , DOI: 10.1093/brain/awr342

Laurence CORDIER et al. , “ Rescue of Skeletal Muscles of -Sarcoglycan- Deficient Mice wi
 th Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer ” , Molecular Therapy , 2000年02月 ,
 Vol. 1、 No. 2 , p.119-129 , DOI: 10.1006/mthe.1999.0019

Database DDBJ [online], Accession No. U34976 , 1995年11月08日 , [http://getentry.ddbj
 .nig.ac.jp/getentry/na/U34976/?filetype=html](http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/U34976/?filetype=html) , [retrieved 2023-01-24]

Laurence CORDIER et al. , “ Muscle-Specific Promoters May Be Necessary for Adeno-Associa
 ted Virus-Mediated Gene Transfer in the Treatment of Muscular Dystrophies ” , Human Gene
 Therapy , 2001年01月20日 , Vol. 12、 No. 2 , p.205-215 , DOI: 10.1089/104303401750
 061267

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K、 C 1 2 N、 C 0 7 K、 A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q