(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-545955
(P2022-545955A)
(43)公表日　令和4年11月1日(2022.11.1)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｍ	*1/36 (2006.01)*	Ａ６１Ｍ	1/36	１００	４Ｃ０７７
Ａ６１Ｐ	*9/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/04		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全38頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-513602(P2022-513602)
(86)(22)出願日　令和2年8月26日(2020.8.26)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月18日(2022.4.18)
(86)国際出願番号　PCT/IB2020/000692
(87)国際公開番号　WO2021/038291
(87)国際公開日　令和3年3月4日(2021.3.4)
(31)優先権主張番号　62/892,164
(32)優先日　令和1年8月27日(2019.8.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　522075221
ディーエヌエークゥオー アーゲー
スイス国，８８０８ ファフィコン エスゼット，チューラーシュトラーセ ７７
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100110663
弁理士　杉山 共永
(72)発明者　ホルツマイスター，ヨハネス
イギリス国，ジービー エスダブリュ３５エイチジェイ，ロンドン，チェイン ウォーク ３８
(72)発明者　リコティ，バレリア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　停止していない鼓動している心臓への薬物灌流

(57)【要約】
患者の停止していない鼓動している心臓に薬物を灌流させることにより心臓状態を治療する方法が開示される。閉じた回路は、患者の右冠動脈に配置された第１の薬物送達カテーテル、患者の左冠動脈主幹部に配置された第２の薬物送達カテーテル、冠静脈洞に配置された薬物収集カテーテル、冠動脈、冠静脈系、ならびに静脈枝および動脈枝の間に差し挟まれた外的な膜型人工肺を用いて形成されてもよい。心臓状態を治療するための薬物が、閉じた回路を通じて灌流させられてもよい。

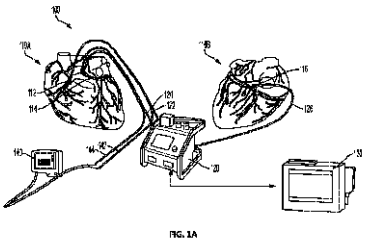


FIG. 1A

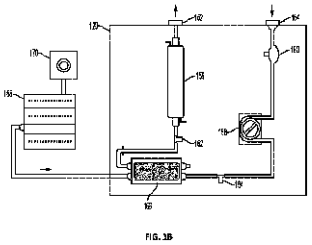


FIG. 1B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者の停止していない鼓動している心臓中で薬物を灌流させる方法であって、
前記心臓の右冠動脈に第１の薬物送達カテーテルを配置すること、
前記心臓の左冠動脈主幹部に第２の薬物送達カテーテルを配置すること、
前記心臓の冠静脈洞に薬物収集カテーテルを配置することであって、前記第１の薬物送達カテーテル、前記第２の薬物送達カテーテル、および前記薬物収集カテーテルが、前記心臓の冠動脈、前記心臓の冠静脈系、および膜型人工肺デバイスと共に、閉じた回路を形成する、前記配置すること、ならびに
前記閉じた回路を通じて前記薬物を灌流させることであって、前記閉じた回路が、前記患者の全身循環から前記患者の冠動脈循環を分離する、前記灌流させること
を含む、方法。
【請求項２】
前記薬物収集カテーテルに陰圧を適用することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記陰圧が約－１００ｍｍＨｇ～０ｍｍＨｇの範囲内である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記第１の薬物送達カテーテル、前記第２の薬物送達カテーテル、または前記薬物収集カテーテルのうちの１つまたは複数が経皮的に導入される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記第１の薬物送達カテーテルおよび／または前記第２の薬物送達カテーテルが順行性の挿管法を介して配置される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記第１の薬物送達カテーテルおよび／または前記第２の薬物送達カテーテルが、大腿大動脈および／または橈骨大動脈にアクセスすることにより前記患者の大動脈を介して配置される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記薬物収集カテーテルが、前記患者の大静脈を介して前記冠静脈洞に配置される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記薬物収集カテーテルが、前記患者の頸静脈または大腿静脈を介して配置される、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記膜型人工肺デバイスが、前記収集カテーテルならびに前記第１の薬物送達カテーテルおよび前記第２の薬物送達カテーテルのうちの１つまたは複数の間に配置される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記閉じた回路を通じて血液を循環させることをさらに含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記血液が、自己血液、ドナーからの適合した血液、またはこれらの組合せを含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
血液成分、例えば血清または血漿が、１つまたは複数のパラメーターに従って選択され、前記１つまたは複数のパラメーターが、選択された抗体の存在または非存在を含む、請求項１０～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
約１０００ｍＬ、約８００ｍＬ、約６００ｍＬ、約４００ｍＬ、約２００ｍＬ、約１００ｍＬ、または約５０ｍＬの血液が、前記閉じた回路を通じて循環させられる、請求項１

０～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記灌流が、約５分～約５時間、約１５分～約４時間、約３０分～約３時間、または約１時間～約２時間の持続期間にかけて行われる、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記灌流が少なくとも６０分間行われる、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記灌流が、約７５ｍＬ／分～約７５０ｍＬ／分、約１５０ｍＬ／分～約５００ｍＬ／分、または約２００ｍＬ／分～約３００ｍＬ／分の流速で行われる、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記薬物が、心臓状態の治療のために好適なものである、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記心臓状態が心不全である、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記心臓状態が、遺伝学的に決定される心臓疾患である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
前記遺伝学的に決定される心臓疾患が、遺伝学的に決定される心筋症である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記薬物が治療用ポリヌクレオチド配列を含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記治療用ポリヌクレオチド配列が１つまたは複数のウイルスベクター中に存在する、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記１つまたは複数のウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ウシパピローマウイルス、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ポリオーマウイルス、センダイウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、パポバウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、これらのバリエーション、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、これらのバリエーション、およびこれらの組合せのうちの１つまたは複数である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記治療用ポリヌクレオチド配列が、心臓状態の治療用のタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項２１～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記タンパク質が、ヒト心臓中で発現される遺伝子に対応する、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記タンパク質が、ＳＥＲＣＡ２、ＭｙＢＰＣ３、ＭＹＨ７、ＰＫＰ２、ジストロフィ

ン、ＦＫＲＰ、またはこれらの組合せもしくはバリエーションのうちの１つまたは複数である、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記治療用ポリヌクレオチド配列がプロモーターを含む、請求項２１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、前記閉じた回路を通じて循環させられる血液が、前記閉じた回路の外側に漏出する、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、前記閉じた回路を通じて灌流させられる薬物が、前記閉じた回路の外側に漏出する、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記第１の薬物送達カテーテル、前記第２の薬物送達カテーテル、または前記薬物収集カテーテルのうちの１つまたは複数がバルーンカテーテルである、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
患者の心臓中の閉じた回路を通じた灌流液の灌流を維持する方法であって、前記心臓が前記灌流の間に停止しておらずかつ鼓動しており、前記方法が、
前記心臓の右冠動脈に第１のカテーテルを配置すること、
前記心臓の左冠動脈主幹部に第２のカテーテルを配置すること、
前記心臓の冠静脈洞に収集カテーテルを配置することであって、前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、および前記収集カテーテルが、冠動脈、冠静脈系、および膜型人工肺デバイスと共に、前記心臓を通じた前記閉じた回路を形成する、前記配置すること、ならびに
前記第１のカテーテルおよび前記第２のカテーテルを介して前記心臓に前記灌流液を導入することにより前記閉じた回路を通じて前記灌流液を流すことおよび前記収集カテーテルを介して前記灌流液を収集することであって、前記閉じた回路が、前記患者の全身循環から前記患者の冠動脈循環を分離する、前記流すことおよび前記収集すること
を含む、方法。
【請求項３４】
前記灌流が少なくとも６０分間維持される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記灌流が少なくとも１２０分間維持される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記収集カテーテルに陰圧を適用することをさらに含み、前記陰圧が約－１００ｍｍＨｇ～０ｍｍＨｇの範囲内である、請求項３３～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、または前記収集カテーテルのうちの１つまたは複数が経皮的に導入される、請求項３３～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記膜型人工肺デバイスが、前記収集カテーテルならびに前記第１の薬物送達カテーテルおよび前記第２の薬物送達カテーテルのうちの１つまたは複数の間に配置される、請求項３３～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】

前記閉じた回路を通じて血液を循環させることをさらに含み、前記血液が、自己血液、ドナーからの適合した血液、またはこれらの組合せを含む、請求項３３～３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４０】

約１０００ｍＬ、約８００ｍＬ、約６００ｍＬ、約４００ｍＬ、約２００ｍＬ、約１００ｍＬ、または約５０ｍＬの血液が、前記閉じた回路を通じて循環させられる、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】

前記灌流が、約７５ｍＬ／分～約７５０ｍＬ／分、約１５０ｍＬ／分～約５００ｍＬ／分、または約２００ｍＬ／分～約３００ｍＬ／分の流速で行われる、請求項３３～４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４２】

約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、前記閉じた回路を通じて循環させられる血液が、前記閉じた回路の外側に漏出する、請求項３３～４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４３】

前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、または前記収集カテーテルのうちの１つまたは複数がバルーンカテーテルである、請求項３３～４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４４】

患者の心臓に流体連結された場合に前記心臓内での局所領域灌流を行うためのシステムであって、

前記心臓の右冠動脈への挿入のために適合された第１のカテーテル、

前記心臓の左冠動脈主幹部への挿入のために適合された第２のカテーテル、

前記心臓の冠静脈洞への挿入のために適合された収集カテーテル、

前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、前記収集カテーテル、および酸素供給源に流体連結される膜型人工肺デバイスであって、前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、前記収集カテーテル、および前記膜型人工肺デバイスが一緒になって、前記第１のカテーテルが前記右冠動脈に挿入され、前記第２のカテーテルが前記左冠動脈主幹部に挿入され、かつ前記収集カテーテルが前記冠静脈洞に挿入された場合に、前記患者の全身循環から分離された、前記心臓を通じた閉じた回路を形成する、前記膜型人工肺デバイス、ならびに

前記第１のカテーテルおよび前記第２のカテーテルを通じた流体流れを駆動するように構成されたポンプ

を含む、システム。

【請求項４５】

局所領域灌流システムであって、

患者の心臓の右冠動脈に挿入される第１のカテーテル、

前記心臓の左冠動脈主幹部に挿入される第２のカテーテル、

前記心臓の冠静脈洞に挿入される収集カテーテル、ならびに

前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、前記収集カテーテル、および酸素供給源に流体連結される膜型人工肺デバイスであって、前記第１のカテーテル、前記第２のカテーテル、前記収集カテーテル、および前記膜型人工肺デバイスが、前記心臓の冠動脈および冠静脈系と共に、前記患者の全身循環から分離された、前記心臓を通じた閉じた回路を形成する、前記膜型人工肺デバイス、ならびに

前記第１のカテーテルおよび前記第２のカテーテルを介する前記心臓へのおよび前記収集カテーテルを介する前記心臓の外への流体流れを駆動するように構成されたポンプ

を含む、局所領域灌流システム。

【請求項４６】
前記膜型人工肺デバイスが、灌流の間に前記閉じた回路に薬物を注入するために構成されたリザーバーを含む、請求項４４または請求項４５のいずれか一項に記載の局所領域灌流システム。
【請求項４７】
前記ポンプが、約－１００ｍｍＨｇ～０ｍｍＨｇの陰圧範囲を生成するように構成されている、請求項４４～４６のいずれか一項に記載の局所領域灌流システム。
【請求項４８】
前記第１の薬物送達カテーテル、前記第２の薬物送達カテーテル、または前記薬物収集カテーテルのうちの１つまたは複数が経皮的に導入される、請求項４４～４７のいずれか一項に記載の局所領域灌流システム。
【請求項４９】
前記第１の薬物送達カテーテルおよび／または前記第２の薬物送達カテーテルが順行性の挿管法を介して配置される、請求項４４～４８に記載の局所領域灌流システム。
【請求項５０】
前記薬物収集カテーテルが、前記患者の大静脈を介して前記冠静脈洞に配置される、請求項４４～４９に記載の局所領域灌流システム。
【請求項５１】
請求項１～４３に記載の方法のいずれかを行うように構成された、請求項４４または請求項４５のいずれか一項に記載の局所領域灌流システム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年８月２７日に出願された米国仮特許出願第６２／８９２，１６４号の優先権の利益を主張し、該出願の開示は参照により全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本発明は、心臓疾患の治療に関し、特に、患者の心臓への治療剤の局在化された送達に関する。
【背景技術】
【０００３】
様々な心臓状態、例えば心不全の治療における薬理学上の進歩にもかかわらず、死亡率、および罹病率は依然として許容できない程度に高い。さらには、ある特定の治療アプローチは多くの患者（例えば、他の併存疾患と関連付けられる進行した心不全状態を有する患者）のために好適でない。代替的なアプローチ、例えば遺伝子療法および細胞療法は、目的に特有に合わせられ、かつ多くの心臓疾患の病理発生の根本的な原因への対処において有効である潜在能力に起因して益々注目を集めている。
【０００４】
それにもかかわらず、ベクター効率、用量、特異性、および安全性を含めて、送達に関する問題が依然として存在する。そのため、有効であり、忍容性良好であり、最小の侵襲性でもある、様々な心臓状態の治療のために好適な、薬物のより標的化された、均質な送達を達成する方法に向けられたさらなる研究に対する必要性が存在する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
最小の侵襲性の方式で患者の停止していない鼓動している心臓中で薬物を灌流させる方法を提供することが本発明の目的である。
【０００６】
灌流液が患者の全身循環から分離されるように患者の停止していない鼓動している心臓を通じて灌流液（血液または薬物のうちの１つまたは複数を含有してもよい）を循環させ

る方法を提供することが本発明の目的である。
【０００７】
薬理遺伝子療法の局所領域送達を提供することが本発明の目的である。
【０００８】
心臓状態を治療するために患者に送達される薬物の全体的な用量を低減させることが本発明の目的である。
【０００９】
心臓状態の治療のために好適な薬物の投与に対するリスクおよび／または有害な免疫応答を低減させることが本発明の目的である。
【００１０】
薬理遺伝子療法薬物を与えるための好適でない候補であったであろう中和抗体を有する患者にそのような薬物を再投薬および／または投薬することを可能とすることが本発明の目的である。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
上記の目的およびその他は、ある特定の実施形態において、患者の停止していない鼓動している心臓中で薬物を灌流させる方法に向けられた本発明により叶えられる。一部の実施形態において、方法は、心臓の右冠動脈に第１の薬物送達カテーテルを配置することを含む。方法は、心臓の左冠動脈主幹部（left main coronary artery）に第２の薬物送達カテーテルを配置することをさらに含む。方法は、心臓の冠静脈洞に薬物収集カテーテルを配置することをさらに含む。一部の実施形態において、第１の薬物送達カテーテル、第２の薬物送達カテーテル、および薬物収集カテーテルは、心臓の冠動脈、心臓の冠静脈系、および膜型人工肺デバイス（membrane oxygenation device）と共に閉じた回路を形成する。方法は、患者の全身循環から患者の冠動脈循環を分離する閉じた回路を通じて薬物を灌流させることをさらに含む。
【００１２】
一部の実施形態において、方法は、薬物収集カテーテルに陰圧を適用することをさらに含む。一部の実施形態において、陰圧は約－１００ｍｍＨｇ～０ｍｍＨｇの範囲内である。
【００１３】
一部の実施形態において、閉じた回路は、薬物収集カテーテルに負の吸引圧をさらに適用して、テベシウス静脈を通じた閉じた回路を通じて循環させられる血液および／または薬物の漏出を予防および／または最小化することを可能とする１つまたは複数の吸引機構をさらに含んでもよい。
【００１４】
一部の実施形態において、第１の薬物送達カテーテル、第２の薬物送達カテーテル、または薬物収集カテーテルのうちの１つまたは複数は経皮的に導入される。一部の実施形態において、第１の薬物送達カテーテルおよび／または第２の薬物送達カテーテルは順行性の挿管法を介して配置される。一部の実施形態において、第１の薬物送達カテーテルおよび／または第２の薬物送達カテーテルは、大腿大動脈および／または橈骨大動脈（aorta radialis）にアクセスすることにより患者の大動脈を介して配置される。一部の実施形態において、薬物収集カテーテルは、患者の大静脈を介して冠静脈洞に配置される。一部の実施形態において、薬物収集カテーテルは、患者の頸静脈または大腿静脈を介して配置される。一部の実施形態において、膜型人工肺デバイスは、収集カテーテルならびに第１の薬物送達カテーテルおよび第２の薬物送達カテーテルのうちの１つまたは複数の間に配置される。一部の実施形態において、第１の薬物送達カテーテル、第２の薬物送達カテーテル、または薬物収集カテーテルのうちの１つまたは複数は、漏出を低減させまたは予防するためにバルーンによりシールされる。
【００１５】
一部の実施形態において、方法は、閉じた回路を通じて血液を循環させることをさらに

含む。一部の実施形態において、血液は、自己血液、ドナーからの適合した血液、またはこれらの組合せを含む。一部の実施形態において、血液成分、例えば血清または血漿は、１つまたは複数のパラメーターに従って選択される。一部の実施形態において、１つまたは複数のパラメーターは、選択された抗体の存在または非存在を含む。一部の実施形態において、約１０００ｍＬ、約８００ｍＬ、約６００ｍＬ、約４００ｍＬ、約２００ｍＬ、約１００ｍＬ、または約５０ｍＬの血液が、閉じた回路を通じて循環させられる。

【００１６】

一部の実施形態において、灌流は、約５分～約５時間、約１５分～約４時間、約３０分～約３時間、または約１時間～約２時間の持続期間にかけて行われる。一部の実施形態において、灌流は少なくとも６０分間行われる。一部の実施形態において、灌流は、約７５ｍＬ／分～約７５０ｍＬ／分、約１５０ｍＬ／分～約５００ｍＬ／分、または約２００ｍＬ／分～約３００ｍＬ／分の流速で行われる。

【００１７】

一部の実施形態において、薬物は、心臓状態の治療のために好適なものである。一部の実施形態において、心臓状態は心不全である。一部の実施形態において、心臓状態は、遺伝学的に決定される心臓疾患である。一部の実施形態において、遺伝学的に決定される心臓疾患は、遺伝学的に決定される心筋症である。

【００１８】

一部の実施形態において、薬物は治療用ポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、治療用ポリヌクレオチド配列は１つまたは複数のウイルスベクター中に存在する。一部の実施形態において、１つまたは複数のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ウシパピローマウイルス、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ポリオーマウイルス、センダイウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、パポバウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、これらのバリエーション、およびこれらの組合せからなる群から選択される。

【００１９】

一部の実施形態において、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である。一部の実施形態において、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、これらのバリエーション、およびこれらの組合せのうちの１つまたは複数である。

【００２０】

一部の実施形態において、治療用ポリヌクレオチド配列は、心臓状態の治療用のタンパク質、アンチセンスＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡをコードする核酸配列を含む。一部の実施形態において、タンパク質は、ヒト心臓中で発現される遺伝子に対応する。一部の実施形態において、タンパク質は、ＳＥＲＣＡ２、ＭｙＢＰＣ３、ＭＹＨ７、ＰＫＰ２、ジストロフィン、ＦＫＲＰ、またはこれらの組合せもしくはバリエーションのうちの１つまたは複数である。一部の実施形態において、治療用ポリヌクレオチド配列はプロモーターを含む。

【００２１】

一部の実施形態において、約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、閉じた回路を通じて循環させられる血液が、閉じた回路の外側に漏出する。一部の実施形態において、約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、閉じた回路を通じて灌流させられる薬物が、閉じた回路の外側に漏出する。

【００２２】

一部の実施形態において、第１の薬物送達カテーテル、第２の薬物送達カテーテル、または薬物収集カテーテルのうちの１つまたは複数はバルーンカテーテルである。

【００２３】

上記の目的およびその他は、ある特定の実施形態において、灌流の間に停止しておらずかつ鼓動している患者の心臓中の閉じた回路を通じた灌流液の灌流を維持する方法に向けられた本発明によりさらに叶えられる。一部の実施形態において、方法は、心臓の右冠動脈に第１のカテーテルを配置することを含む。一部の実施形態において、方法は、心臓の左冠動脈主幹部に第２のカテーテルを配置することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、心臓の冠静脈洞に収集カテーテルを配置することをさらに含む。一部の実施形態において、第１のカテーテル、第２のカテーテル、および収集カテーテルは、冠動脈、冠静脈系、および膜型人工肺デバイスと共に、心臓を通じた閉じた回路を形成する。一部の実施形態において、方法は、第１のカテーテルおよび第２のカテーテルを介して心臓に灌流液を導入することにより閉じた回路を通じて灌流液を流すことならびに収集カテーテルを介して灌流液を収集することをさらに含む。一部の実施形態において、閉じた回路は、患者の全身循環から患者の冠動脈循環を分離する。

【００２４】

一部の実施形態において、灌流は少なくとも６０分間維持される。一部の実施形態において、灌流は少なくとも１２０分間維持される。

【００２５】

一部の実施形態において、方法は、収集カテーテルに陰圧を適用することをさらに含み、陰圧は約－１００ｍｍＨｇ～０ｍｍＨｇの範囲内である。

【００２６】

一部の実施形態において、第１のカテーテル、第２のカテーテル、または収集カテーテルのうちの１つまたは複数は経皮的に導入される。

【００２７】

一部の実施形態において、膜型人工肺デバイスは、収集カテーテルならびに第１の薬物送達カテーテルおよび第２の薬物送達カテーテルのうちの１つまたは複数の間に配置される。

【００２８】

一部の実施形態において、方法は、閉じた回路を通じて血液を循環させることをさらに含み、血液は、自己血液、ドナーからの適合した血液、またはこれらの組合せを含む。一部の実施形態において、約１０００ｍＬ、約８００ｍＬ、約６００ｍＬ、約４００ｍＬ、約２００ｍＬ、約１００ｍＬ、または約５０ｍＬの血液が、閉じた回路を通じて循環させられる。

【００２９】

一部の実施形態において、灌流は、約７５ｍＬ／分～約７５０ｍＬ／分、約１５０ｍＬ／分～約５００ｍＬ／分、または約２００ｍＬ／分～約３００ｍＬ／分の流速で行われる。一部の実施形態において、約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、閉じた回路を通じて循環させられる血液が、閉じた回路の外側に漏出する。

【００３０】

一部の実施形態において、第１のカテーテル、第２のカテーテル、または収集カテーテルのうちの１つまたは複数はバルーンカテーテルである。

【００３１】

上記の目的およびその他は、ある特定の実施形態において、患者の心臓に流体連結された場合に前記心臓内での局所領域灌流を行うためのシステムに向けられた本発明によりさらに叶えられる。一部の実施形態において、システムは、心臓の右冠動脈への挿入のために適合された第１のカテーテル；心臓の左冠動脈主幹部への挿入のために適合された第２

のカテーテル；心臓の冠静脈洞への挿入のために適合された収集カテーテル；第１のカテーテル、第２のカテーテル、収集カテーテル、および酸素供給源に流体連結される膜型人工肺デバイス；ならびに第１のカテーテルおよび第２のカテーテルを通じた流体流れを駆動するように構成されたポンプを含む。一部の実施形態において、第１のカテーテル、第２のカテーテル、収集カテーテル、および膜型人工肺デバイスは一緒になって、第１のカテーテルが右冠動脈に挿入され、第２のカテーテルが左冠動脈主幹部に挿入され、かつ収集カテーテルが冠静脈洞に挿入された場合に、患者の全身循環から分離された、心臓を通じた閉じた回路を形成する。

【００３２】

上記の目的およびその他は、ある特定の実施形態において、局所領域灌流システムであって、患者の心臓の右冠動脈に挿入される第１のカテーテル；心臓の左冠動脈主幹部に挿入される第２のカテーテル；心臓の冠静脈洞に挿入される収集カテーテル；第１のカテーテル、第２のカテーテル、収集カテーテル、および酸素供給源に流体連結される膜型人工肺デバイス；ならびに第１のカテーテルおよび第２のカテーテルを介する心臓へのおよび収集カテーテルを介する心臓の外への流体流れを駆動するように構成されたポンプを含む、前記局所領域灌流システムに向けられた本発明によりさらに叶えられる。一部の実施形態において、第１のカテーテル、第２のカテーテル、収集カテーテル、および膜型人工肺デバイスは、心臓の冠動脈および冠静脈系と共に、患者の全身循環から分離された、心臓を通じた閉じた回路を形成する。

【００３３】

一部の実施形態において、膜型人工肺デバイスは、灌流の間に閉じた回路に薬物を注入するために構成されたリザーバーを含む。

【００３４】

一部の実施形態において、ポンプは、約－１００ｍｍＨｇ～０ｍｍＨｇの陰圧範囲を生成するように構成されている。

【００３５】

一部の実施形態において、第１のカテーテル、第２のカテーテル、または収集カテーテルのうちの１つまたは複数は経皮的に導入される。一部の実施形態において、第１のカテーテルおよび／または第２のカテーテルは順行性の挿管法を介して配置される。一部の実施形態において、収集カテーテルは、患者の大静脈を介して冠静脈洞に配置される。

【００３６】

上記の目的およびその他は、ある特定の実施形態において、上述の方法のいずれかを行うように構成された局所領域灌流システムに向けられた本発明によりさらに叶えられる。

【００３７】

本開示の上記および他の特徴、それらの性質、ならびに様々な利点は、添付の図面と組み合わせて解釈される、以下の詳細な説明を考慮することでより明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１Ａ】本開示の実施形態による例示的な局所領域灌流システムを描写する。

【図１Ｂ】本開示の実施形態による例示的な局所領域灌流デバイスの図式である。

【図２】停止していないブタ心臓の局所領域灌流の間に捕捉されたラジオグラフであり、左冠動脈主幹部カテーテル、右冠動脈カテーテル、および冠静脈洞バルーンの位置を示す。

【図３】局所領域灌流の間に測定されたポンプ速度、流速、および圧力のプロットである。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

定義

本明細書において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が明確に他に指し示さなければ、複数への言及を含む。そのため、例えば、「薬物」（

a drug）への言及は、単一の薬物の他に２つまたはそれより多くの異なる薬物の混合物を含み、「ウイルスベクター」（a viral vector）への言及は、単一のウイルスベクターの他に２つまたはそれより多くの異なるウイルスベクターの混合物を含む、などである。

【００４０】

また、本明細書において使用される場合、「約」は、測定される量との繋がりで使用される場合、測定の実行ならびに測定の目的および測定機器の精度に見合う注意レベルの発揮において当業者に予期されるような、その測定される量における通常のばらつきを指す。ある特定の実施形態において、「約」という用語は、記載される数±１０％を含み、その結果、「約１０」は９～１１を含む。

【００４１】

また、本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチド」は、当該技術分野におけるその通常のおよび習慣的な意味を有し、任意のポリマー核酸、例えばＤＮＡまたはＲＮＡ分子の他に、当業者に公知の化学的誘導体を含む。ポリヌクレオチドは、治療用タンパク質をコードするものを含むだけでなく、当該技術分野における公知の技術を使用して標的化された核酸配列の発現を減少させるために使用され得る配列（例えば、アンチセンス、干渉、または小分子干渉核酸）を含む。ポリヌクレオチドはまた、心臓血管系の細胞内での標的化された核酸配列の発現または標的化されたタンパク質の産生を開始または増加させるために使用され得る。標的化された核酸およびタンパク質としては、標的化された組織中に通常見出される核酸およびタンパク質、そのような天然に存在する核酸もしくはタンパク質の誘導体、標的化された組織中に通常見出されない天然に存在する核酸もしくはタンパク質、または合成核酸もしくはタンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。１つまたは複数のポリヌクレオチドは、１つまたは複数の標的化された核酸配列またはタンパク質を増加および／または減少させるために組合せで使用され、同時におよび／または逐次的に投与され得る。

【００４２】

また、本明細書において使用される場合、「灌流」、「灌流させられる」、および「灌流させる」は、当該技術分野におけるそれらの通常のおよび習慣的な意味を有し、「注射」または「ボーラス注射」の当該技術分野で認識される期間（典型的には分より短い）よりも実質的に長い期間（典型的には分またはより長い）にわたる投与を指す。灌流の流速は、少なくとも部分的に、投与される体積に依存する。

【００４３】

また、本明細書において使用される場合、「外因性」核酸または遺伝子は、核酸移入のために利用されるベクターにおいて天然に存在しない、例えば、ウイルスベクターにおいて天然に見出されないものであるが、該用語は、患者または宿主において天然に存在するタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を除外することは意図されない。

【００４４】

また、本明細書において使用される場合、「心臓細胞」は、心臓の構造の維持または機能の提供に関与する心臓の任意の細胞、例えば心筋細胞、心臓血管系の細胞、または心臓弁中に存在する細胞を含む。心臓細胞としては、心筋細胞（正常および異常の両方の電気的特性を有する）、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、通導組織の細胞、心臓ペースメーカー細胞、ならびにニューロンが挙げられる。

【００４５】

また、本明細書において使用される場合、「分離された」、「実質的に分離された」、「大きく分離された」、およびそれらのバリアントは、冠静脈循環、心臓循環、体静脈循環、または全身循環の完全なまたは絶対的な分離を要求しない用語であり、むしろそれらは、指定される循環の大部分、好ましくは主要な部分またはさらには実質的に全てが分離されていることを意味することが意図される。また、本明細書において使用される場合、「部分的に分離された」は、指定される循環の任意の些細でない部分が分離されていることを指す。

【００４６】
また、本明細書において使用される場合、「非天然に制限された」は、血管を通じた流体の流れを制限する任意の方法、例えば、バルーンカテーテル、縫合などを含むが、天然に存在する制限、例えば、プラーク蓄積（狭窄）を含まない。非天然の制限としては、例えば、冠動脈循環の、実質的なまたは全体的な分離が挙げられる。
【００４７】
また、本明細書において使用される場合、「最小の侵襲性の」は、心臓または心臓と密接に関連付けられる血管への解放外科的アクセスを要求しない任意の手順を含むことが意図される。そのような手順としては、心臓にアクセスするための内視鏡手段、そしてまた大動脈および静脈を介するアクセスに依拠するカテーテルベースの手段の使用が挙げられる。
【００４８】
また、本明細書において使用される場合、「アデノ随伴ウイルス」または「ＡＡＶ」は、全てのサブタイプ、血清型、およびシュードタイプの他に、天然に存在するおよび組換えの形態を包含する。様々なＡＡＶ血清型および株が当該技術分野において公知であり、供給元、例えばＡＴＣＣおよび学術的なまたは商用の供給元から公開されている。代替的に、刊行されたかつ／または様々なデータベースから利用可能なＡＡＶ血清型および株からの配列は、公知の技術を使用して合成されてもよい。
【００４９】
また、本明細書において使用される場合、「血清型」は、定義された抗血清とのカプシドタンパク質反応性により同定され、かつ該反応性に基づいて他のＡＡＶから区別される、ＡＡＶを指す。ＡＡＶ１～ＡＡＶ１２を含めて、ヒトＡＡＶの少なくとも１２の公知の血清型があるが、追加の血清型が発見され続けており、新たに発見された血清型の使用が想定される。
【００５０】
また、本明細書において使用される場合、「シュードタイプ」ＡＡＶは、１つの血清型からのカプシドタンパク質ならびに異なるまたは異種の血清型の５’および３’逆末端反復（ＩＴＲ）を含むウイルスゲノムを含有するＡＡＶを指す。シュードタイプ組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、カプシド血清型の細胞表面結合特性およびＩＴＲ血清型と合致する遺伝学的特性を有することが予期される。シュードタイプｒＡＡＶは、カプシドタンパク質がＩＴＲの血清型に対して異種の血清型である限り、ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３カプシドタンパク質を含めて、ＡＡＶカプシドタンパク質、ならびにＡＡＶ１～ＡＡＶ１２の任意の霊長動物ＡＡＶ血清型を含めて、任意の血清型ＡＡＶからのＩＴＲを含んでもよい。シュードタイプｒＡＡＶにおいて、５’および３’　ＩＴＲは同一または異種であってもよい。シュードタイプｒＡＡＶは、当該技術分野において記載される標準的な技術を使用して製造される。
【００５１】
また、本明細書において使用される場合、「キメラ」ｒＡＡＶベクターは、異種カプシドタンパク質を含むＡＡＶベクターを包含し、すなわち、ｒＡＡＶベクターは、そのカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３に関してキメラであってもよく、その結果、ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３は全て同じ血清型ＡＡＶのものではない。キメラＡＡＶは、本明細書において使用される場合、以下に限定されないが例えば、ＡＡＶ１およびＡＡＶ２からのカプシドタンパク質を含めて、カプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３が血清型において異なるＡＡＶを包含し；他のパルボウイルスカプシドタンパク質の混合物であり、または他のウイルスタンパク質もしくは他のタンパク質、例えば、所望の細胞もしくは組織にＡＡＶの送達を標的化するタンパク質などを含む。キメラｒＡＡＶはまた、本明細書において使用される場合、キメラ５’および３’　ＩＴＲを含むｒＡＡＶを包含する。
【００５２】
また、本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される賦形剤または担体」は

、製剤中の活性剤と合わせられる組成物中の任意の不活性成分を指す。薬学的に許容される賦形剤としては、炭水化物（例えばグルコース、スクロース、またはデキストラン）、抗酸化剤（例えばアスコルビン酸またはグルタチオン）、キレート剤、低分子量タンパク質、高分子量ポリマー、ゲル形成剤、または他の安定化剤および添加剤を挙げることができるがこれらに限定されない。薬学的に許容される担体の他の例としては、湿潤剤、乳化剤、分散剤、または防腐剤が挙げられ、防腐剤は、微生物の増殖または作用を予防するために特に有用である。様々な防腐剤が周知であり、例えば、フェノールおよびアスコルビン酸が挙げられる。担体、安定化剤または佐剤の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)において見出すことができる。

【００５３】

また、本明細書において使用される場合、「患者」は、治療の必要性を示唆する１つもしくは複数の特定の症状の臨床的な徴候を示した、状態に対して予防的に処置される、または治療されるべき状態を有すると診断された、対象、特にはヒト（但し非ヒトを包含し得る）を指す。

【００５４】

また、本明細書において使用される場合、「対象」は、「患者」という用語の定義を包含し、さもなければ健康な個体を除外しない。

【００５５】

また、本明細書において使用される場合、「治療」および「治療する」は、状態、例えば、心臓疾患の重症度を減少させまたは該状態を予防することを意図した薬物の投与を含む。

【００５６】

また、本明細書において使用される場合、「予防」および「予防する」は、状態、例えば、心臓疾患の開始の回避を含む。

【００５７】

また、本明細書において使用される場合、「状態」（condition）または「状態」（conditions）は、対象への有効量の薬物の投与により治療、軽減、または予防され得る医学的状態、例えば心臓疾患を指す。

【００５８】

また、本明細書において使用される場合、「有効量」は、有益なまたは所望の効果を、そのような効果の検出のために一般的に使用される方法により容易に検出可能なレベルで生じさせるために十分な薬物の量を指す。一部の実施形態において、そのような効果は、薬物が投与されない場合の基礎レベルの値からの少なくとも１０％の変化を結果としてもたらす。他の実施形態において、変化は、基礎レベルから少なくとも２０％、５０％、８０％、またはよりいっそう高いパーセンテージである。以下に記載されるように、薬物の有効量は、対象の年齢、全般的健康状態、治療されている状態の重症度、および投与される特定の薬物などに依存して対象毎に変動し得る。任意の個々の症例における適切な「有効」量は、関連するテキストおよび文献を参照することによりかつ／またはルーチンの実験を使用することにより、当業者により決定され得る。

【００５９】

また、本明細書において使用される場合、「活性剤」は、その目的のために政府機関によって承認されているか否かによらず、治療的な、予防的な、または他の意図される効果を生じさせることが意図される任意の材料を指す。

【００６０】

本明細書における値の範囲の記載は、本明細書において他に指し示されなければ、範囲内に入る各別々の値を個々に参照する簡略化された方法として役立つことが単に意図され、各別々の値は、それが本明細書において個々に記載されたかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書において他に指し示されなければ、または他に文脈に明確に矛盾しなければ、任意の好適な順序で行うことができる。本明細書

において提供される任意および全ての例、または例示的な表現（例えば、「例えば」、「など」）の使用は単に、ある特定の材料および方法に光を当てることが意図され、範囲に対する限定を課さない。本明細書中のいかなる表現も、開示される材料および方法の実施にとって必須であるとして任意の主張されない要素を指し示すとして解釈されるべきではない。

【００６１】

詳細な説明

本発明は、最小の侵襲性の方式で心臓状態を治療する方法に向けられている。方法は、患者の全身循環から患者の冠動脈循環を分離すること、および流体、例えば薬物含有流体を、患者の分離されたまたは実質的に分離された冠動脈循環に灌流させることを含んでもよい。灌流は、患者の停止していない鼓動している心臓に行われてもよい。患者の冠動脈循環の分離は、図１Ａおよび図１Ｂを参照して以下においてより詳細に記載される。

【００６２】

冠動脈循環は、心臓の組織への血液供給を提供する。多数の冠動脈が存在する。通常、４つの主な冠動脈が、酸素供給された血液を、心臓組織の全体を通じた分布のために心臓に提供する：左冠動脈主幹部および右冠動脈、左前下行動脈、および左回旋動脈。酸素枯渇血液が冠静脈洞を通じて流れる。

【００６３】

本明細書に開示される実施形態は、第１の薬物送達カテーテル、第２の薬物送達カテーテル、薬物収集カテーテル、冠動脈、冠静脈系、および外的な膜型人工肺を含む（からなるまたはから本質的になる）閉じた回路を形成させることにより患者の全身循環から患者の冠動脈循環を分離するまたは実質的に分離することを想定する。本開示は、ある特定の実施形態において、上記の閉じた回路を用いて患者の全身循環から患者の冠動脈循環を実質的に分離しながら心臓状態の治療のために好適な薬物を心筋に灌流させることをさらに想定する。一部の実施形態において、本明細書に開示される方法は、心臓内の分離された領域ではなく心筋の全体に薬物を送達する。本明細書に開示される方法を用いて心筋に送達された薬物は、心臓の全体を通じて均質に分布されてもよい。

【００６４】

心臓状態を治療する場合に患者の全身循環から患者の冠動脈循環を分離することには多数の利点がある。これらの利点としては、（１）薬物の局所領域送達、他の臓器への薬物の最小の漏出、全体的な薬物用量の低減；（２）標的化された薬物用量の増加；（３）リスクおよび副作用の低減；ならびに（４）選択患者への再投薬またはある特定の療法（例えばウイルスベクターに対する抗体を有する患者へのウイルスベクターを用いる遺伝子療法）のための好適な療法候補でなかった患者集団への投薬の可能性が挙げられるがこれらに限定されない。

【００６５】

図１Ａは、本開示の実施形態による例示的な局所領域灌流（ＬＲＰ）システム１００を描写する。ＬＲＰシステム１００は、心臓１１０と共に閉じた回路構成で示されている（明確性のために前方視野１１０Ａおよび後方視野１１０Ｂの両方が示される）。ＬＲＰシステム１００は、膜型人工肺デバイス１２０、血液気体分析（ＢＧＡ）モニター１３０、および圧力モニター１４０を含む。ＬＲＰシステム１００は、心臓１１０の右冠動脈１１２に第１のカテーテル１２２を配置し、心臓１１０の左冠動脈主幹部１１４に第２のカテーテル１１４を配置し、心臓の冠静脈洞１１６に収集カテーテル１２６を配置することにより組み立てられてもよい。第１のカテーテル１２２、第２のカテーテル１２４、および収集カテーテル１２６は、冠動脈、冠静脈系、膜型人工肺デバイス１２０、および１つまたは複数の任意選択的な追加の構成要素と共に、閉じた回路を形成する。この閉じた回路は、患者の全身循環から患者の冠動脈循環を分離または実質的に分離してもよい。

【００６６】

第１のカテーテル１２２、第２のカテーテル１２４、および収集カテーテル１２６は、経皮的におよび最小の侵襲性の方式で導入されてもよい。一部の実施形態において、第１

のカテーテル１２２および／または第２のカテーテル１２４は、順行性の挿管法を介して導入されてもよい。他の実施形態において、第１のカテーテル１２２および／または第２のカテーテル１２４は、逆行性の挿管法を介して導入されてもよい。カテーテルが心臓への薬物送達のために使用される場合に、第１のカテーテル１２２および第２のカテーテル１２４は本明細書において「薬物送達カテーテル」と称されることがあり、収集カテーテル１２６は本明細書において「薬物収集カテーテル」と称されることがある。

【００６７】

第１のカテーテル１２２および／または第２のカテーテル１２４は、任意選択的に標準的なガイドワイヤおよび注入ポンプを含んでもよい、標準的な注入カテーテルであってもよい。各カテーテルは、心臓１１０に灌流液を送達することができ、灌流液は、例えば、局所領域灌流の間に心臓１１０に送達されるべき薬物を含有してもよい。

【００６８】

第１のカテーテル１２２および／または第２のカテーテル１２４は、例えば、大腿大動脈および／または橈骨大動脈にアクセスすることにより、患者の大動脈を介して配置されてもよい。１つの実施形態において、第１のカテーテル１２２は、大腿大動脈にアクセスすることにより患者の大動脈を介して配置されてもよい。別の実施形態において、第１のカテーテル１２２は、橈骨大動脈にアクセスすることにより患者の大動脈を介して配置されてもよい。１つの実施形態において、第２のカテーテル１２４は、大腿大動脈にアクセスすることにより患者の大動脈を介して配置されてもよい。別の実施形態において、第２のカテーテル１２２は、橈骨大動脈にアクセスすることにより患者の大動脈を介して配置されてもよい。

【００６９】

収集カテーテル１２６はバルーンカテーテルであってもよく、その結果、バルーンは、冠静脈洞１１６内で膨張して、閉じた回路を通じて循環させられる全ての血液が収集カテーテル１２６を通じて流れることを確実にしてもよい。バルーンカテーテルは、Ｆｏｇａｒｔｈｙ（登録商標）カテーテル、または当業者に認められるような本明細書において議論される意図される目的のために好適な任意の他のカテーテルであってもよい。ある特定の実施形態において、収集カテーテル１２６は、患者の大静脈を介して配置されてもよい。１つの実施形態において、収集カテーテル１２６は、患者の頸静脈を介して配置されてもよい。別の実施形態において、収集カテーテル１２６は、患者の大腿静脈を介して配置されてもよい。一部の実施形態において、第１のカテーテル１２２、第２のカテーテル１２４、収集カテーテル１２６、またはこれらの組合せはそれぞれ、漏出の低減を助けるためのバルーンカテーテルであってもよい。

【００７０】

ＬＲＰシステム１００は、１つまたは複数の追加の構成要素、以下に限定されないが例えば、１つまたは複数のポンプ、１つまたは複数の吸引機構、１つまたは複数の灌流液、およびこれらの組合せをさらに含んでもよい。例えば、ＬＲＰシステム１００は、一部の実施形態において、膜型人工肺デバイス１２０に作動可能に連結された、またはその部分である、圧力モニター１４０を含むとして描写される。圧力モニター１４０は、冠動脈圧力を連続的にモニターすることにより灌流速度（すなわち、流速）を制御して安全性を確実にするために使用されてもよい。第１の圧力センサー１４２および第２の圧力センサー１４４は、例えば、右冠動脈内および左冠動脈主幹部内の圧力をそれぞれ測定するためにそれぞれ第１のカテーテル１１２および第２のカテーテル１１４と共に挿入されてもよい。ＬＲＰシステム１００は、ＢＧＡモニターを含むとしてさらに描写され、ＢＧＡモニターは、例えば、第１のカテーテル１２２および第２のカテーテル１２４を介する灌流の前にまたは灌流液が収集カテーテル１２６により収集された後に灌流液中の気体濃度（例えば、灌流液が血液を含有する場合）を測定するために、膜型人工肺デバイス１２０に作動可能に連結される。膜型人工肺デバイス１２０および１つまたは複数の追加の構成要素は、収集カテーテル１２６および第１のカテーテル１２２または第２のカテーテル１２４のうちの１つまたは複数の間に置かれてもよい。

【００７１】
図１Ｂは、膜型人工肺デバイス１２０の図式であり、膜型人工肺デバイス１２０は、灌流液に酸素供給し、灌流液を他の成分（例えば、薬物）と混合し、灌流液から二酸化炭素を除去し、かつ／または第１のカテーテル１２２（右冠動脈１１２中）および／もしくは第２のカテーテル１２４（左冠動脈主幹部１１４中）のうちの１つもしくは複数に灌流液を押し入れるために使用されてもよい。膜型人工肺デバイス１２０は、酸素と血液中に含有される二酸化炭素を交換するための任意の商業的に入手可能な体外膜型人工肺（ＥＣＭＯ）デバイスであってもよい。
【００７２】
図１Ｂに図示されるように、膜型人工肺デバイス１２０は様々な構成要素を含み、該構成要素としては、熱交換器１５６（出口１５２を離れ、第１のカテーテル１２２および第２のカテーテル１２４に入る前に灌流液が通る）、送達ポンプ１５８、リザーバー１６０（成分、例えば血液および／または薬物を、入口１５４を通じて収集カテーテル１２６を通じて戻ってくる灌流液に加えるため）、閉じた回路の様々なステージにおけるセンサー１６２および１６４（例えば、圧力および／または血液気体含有量を測定するため）、ならびに膜型人工肺１６６が挙げられる。一部の実施形態において、脱酸素された血液は膜型人工肺１６６に入り、酸素に富んだ気体と混合される。酸素に富んだ気体は気体ブレンダー１６８から供給されてもよく、気体ブレンダー１６８は、酸素を様々な比で二酸化炭素および窒素気体と混合してもよく、気体調節器１７０により調節される。
【００７３】
灌流液は、血液（もしくはその成分、例えば血漿もしくは血清）および／または心臓状態の治療のために好適な薬物および／または媒体、例えば食塩水もしくはデキストロース溶液のうちの１つまたは複数を含んでもよい。送達ポンプ１５８は、灌流液を第１のカテーテル１２２および／または第２のカテーテル１２４に送達してもよい。一部の実施形態において、灌流液は、ＩＶバッグまたはシリンジ中に含有されてもよく、送達ポンプ１５８を用いてまたは用いずに第１のカテーテル１２４および／または第２のカテーテル１２４に直接的に投与されてもよい。
【００７４】
吸引機構を使用して収集カテーテル１２６に負の吸引圧を適用することでテベシウス静脈系を通じた血液および／または薬物漏出を最小化してもよい。負の吸引圧は、約－１５０ｍｍＨｇ、約－１００ｍｍＨｇ、約－５０ｍｍＨｇ、約－２０ｍｍＨｇ、約－１５ｍｍＨｇ、約－１０ｍｍＨｇ、約－５ｍｍＨｇ、０ｍｍＨｇ、またはこれらの点のいずれかにより定義される部分範囲内であってもよい。
【００７５】
閉じた回路を通じて循環させられる血液は、自己血液、ドナーからの適合した血液、またはこれらの組合せであってもよい。一部の実施形態において、血液成分、例えば血清または血漿は、１つまたは複数のパラメーターに従って選択される。パラメーターのうちの１つは、選択された抗体の存在または非存在であってもよい。例えば、薬物が治療用核酸配列を包含する１つまたは複数のウイルスベクターである場合、患者の自己血液をスクリーニングして、１つまたは複数のウイルスベクターに対する抗体が存在するかどうかを決定してもよい。患者の自己血液中の抗体の存在は、治療の有効性を低減および／もしくは完全に無化させることがあり、かつ／または望ましくない免疫応答を結果としてもたらすことがある。そのため、患者の自己血液をドナーからの血清反応陰性の適合した血液で希釈しまたは置き換え、それにより、薬物に対する患者の免疫応答を低減させかつ薬物の有効性を増強することが可能であり得る。
【００７６】
図１Ｂに図示される様々な構成要素は、膜型人工肺デバイス１２０の部分であるまたはそれとは別々の構成要素を示すが、この図式は単に実例的なものであり、構成要素のうちの１つまたは複数は膜型人工肺デバイス１２０中にまたはそれとは別々（外的）に含まれてもよいことが理解されるべきである。

【００７７】
ＬＲＰシステム１００は、以下のようにセットアップおよび作動されてもよい：（１）収集カテーテル１２６が冠静脈洞１１６中に慎重に置かれ、緊密にシールされて、心臓静脈の（脱酸素された）血液のみの収集を可能にする；（２）第１のカテーテル１２２および第２のカテーテル１２４がシールされた様式で右冠動脈（ＲＣＡ）および左冠動脈主幹部（ＲＣＡ）に置かれる；（３）カテーテルが次に標準的なチューブを使用して膜型人工肺デバイス１２０の動脈系および静脈系に接続される；（４）ＬＲＰシステム１００の作動が開始され、冠動脈が、酸素供給された血液で順行性に灌流され、それと同時に戻ってくる脱酸素血液が穏やかな陰圧を使用して収集カテーテル１２６を介して静脈心臓系から収集される；（５）血液が次にリザーバー１６０に向けられ、その後に膜型人工肺１６６により酸素供給され、第１のカテーテル１２２および第２のカテーテル１２４を介して心臓に順行性に再注入される（送達ポンプ１６０により駆動される）。薬物（例えば、ベクター）が投与される場合、これは、血液または血漿でのプライムの後にリザーバー１６０を介して灌流液に加えることができ、血液試料を採取することができ、または薬物を全体的な灌流プロセスの間にリザーバー１６０を介して適用することができる。
【００７８】
一部の実施形態において、ドナーからの血清反応陰性の適合した血液での患者の抗体含有自己血液の希釈は、有害な免疫応答の低減および／または薬物有効性の向上を結果としてもたらし得る。例えば、患者の免疫応答という逆境は、自己血液の希釈または置換えなしでの患者の免疫応答と比較してドナーからの血清反応陰性の適合した血液での自己血液の希釈または置換えで、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％低減されてもよく、または完全に軽減されてもよい。投与される薬物の有効性は、自己血液の希釈または置換えなしでの患者における薬物の有効性と比較してドナーからの血清反応陰性の適合した血液での自己血液の希釈または置換えで、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約１００％、約１５０％、約２００％、約３００％、約４００％、または約５００％増加されてもよい。
【００７９】
一部の実施形態において、灌流液の血液部分は、約５ｍＬ～約５０００ｍＬ、約５０ｍＬ～約２５００ｍＬ、約１００ｍＬ～約１０００ｍＬ、約１５０ｍＬ～約５００ｍＬ、約５０ｍＬ、約７５ｍＬ、約１００ｍＬ、約１２５ｍＬ、約１５０ｍＬ、約１７５ｍＬ、約２００ｍＬ、約２２５ｍＬ、約２５０ｍＬ、約２７５ｍＬ、約３００ｍＬ、約３２５ｍＬ、約３５０ｍＬ、約３７５ｍＬ、約４００ｍＬ、約４２５ｍＬ、約４５０ｍＬ、約４７５ｍＬ、約５００ｍＬ、約５５０ｍＬ、約６００ｍＬ、約６５０ｍＬ、約７００ｍＬ、約７５０ｍＬ、約８００ｍＬ、約８５０ｍＬ、約９００ｍＬ、約９５０ｍＬ、または約１０００ｍＬの範囲内であってもよい。
【００８０】
閉じた回路を通じて循環させられる血液中のドナーからの適合した血液に対する自己血液の比は、必要に応じて、薬物に対して最も受容性であり、かつ薬物の導入で最小の免疫応答を生成する、血液混合物を得るように調整されてもよい。一部の実施形態において、比は、約１：１００～約１００：１、約１：８０～約８０：１、約１：５０～約５０：１、約１：３０～約３０：１、約１：２０～約２０：１、約１：１０～約１０：１、約１：８～約８：１、約１：５～約５：１、約１：３～約３：１、または約１：２～約２：１の（自己血液の体積）：（ドナーからの適合した血液の体積）の範囲内であってもよい。
【００８１】
閉じた回路を通じた灌流液の流速は、患者の血流速度に適合するように調整されてもよい。当業者に認められるように、血流速度は患者毎に変動し、任意の所与の患者について、１日の全体を通じて変動する。よって、閉じた回路を通じて循環させられる灌流液の流速はｉｎ　ｓｉｔｕで調整されてもよい。流速は、閉じた回路にかけて測定されてもよい。ある特定の実施形態において、流速は、遷音速プローブ（transonic probe）（例え

ばチュービングにかけてのクランプ）を用いて測定されてもよい。一部の実施形態において、灌流の間の任意の所与の時点における灌流液の流速は、ｍＬ／分の単位に基づいて、患者の血流速度の約２０％以内、約１５％以内、約１０％以内、約８％以内、約５％以内、約３％以内、約２％以内、約１％以内、または約０．５％以内であってもよい。閉じた回路を通じて循環させられる灌流液の流速は、虚血を回避するためにかつ／または灌流下で患者自身の血流速度から著しく逸脱しないことが重要である。

【００８２】

閉じた回路を通じて循環させられる灌流液の例示的な流速は、非限定的に、約７５ｍＬ／分～約７５０ｍＬ／分、約１００ｍＬ／分～約６５０ｍＬ／分、約１２５ｍＬ／分～約６００ｍＬ／分、約１５０ｍＬ／分～約５００ｍＬ／分、約１７５ｍＬ／分～約４００ｍＬ／分、約２００ｍＬ／分～約３００ｍＬ／分、約１５０ｍＬ／分、約１７５ｍＬ／分、約２００ｍＬ／分、約２２５ｍＬ／分、約２５０ｍＬ／分、約２７５ｍＬ／分、約３００ｍＬ／分、約３２５ｍＬ／分、または約３５０ｍＬ／分の範囲内であってもよい。

【００８３】

灌流液は、非限定的に、約５分～約５時間、約１５分～約４時間、約３０分～約３時間、または約１時間～約２時間の範囲内の持続期間で閉じた回路を通じて循環させられてもよい。一部の実施形態において、治療持続期間は、日のスパン、例えば、１日、２日、３日、４日、５日、６日、および７日などにかけて行われてもよい。

【００８４】

本明細書に開示されるシステムを用いることで、一部の実施形態において、それなしで全身送達を通じて安全に投与され得るであろう薬物よりも高い用量が、心臓に直接的におよび心臓のみに投与され得る。一部の実施形態において、（全身循環に供されたまたは冠動脈循環の部分的に過ぎない分離に供されたより大きい用量で達成されるものと）同じ治療効果を達成するために薬物のより低い全体的な用量が要求されることがあり、その理由は、心臓の外側および／またはテベシウス静脈系への灌流液の漏出が実質的に存在しない可能性があるためである。

【００８５】

一部の実施形態において、約５０％ｖ／ｖよりも低い、約４０％ｖ／ｖよりも低い、約３０％ｖ／ｖよりも低い、約２０％ｖ／ｖよりも低い、約１５％ｖ／ｖよりも低い、約１０％ｖ／ｖよりも低い、約５％ｖ／ｖよりも低い、約４％ｖ／ｖよりも低い、約３％ｖ／ｖよりも低い、約２％ｖ／ｖよりも低い、約１％ｖ／ｖよりも低い、約０．５％ｖ／ｖよりも低い、または実質的に０％ｖ／ｖの、閉じた回路を通じて循環させられる灌流液（例えば、血液および／または薬物）が、灌流プロセスの間に閉じた回路の外側に漏出する。

【００８６】

（当該技術分野において開示される他の方法と比較した）閉じた回路の外側への灌流液漏出の低減は、閉じた回路内および閉じた回路中で利用される各個々の構成要素内に形成される緊密なシールに起因し得る。

【００８７】

ある特定の実施形態において、閉じた回路からの何らかの灌流液漏出が残存してもよい。例えば、最大で約０．５％ｖ／ｖ、約１％ｖ／ｖ、約２％ｖ／ｖ、約３％ｖ／ｖ、約４％ｖ／ｖ、約５％ｖ／ｖ、約１０％ｖ／ｖ、約１５％ｖ／ｖ、約２０％ｖ／ｖ、約３０％ｖ／ｖ、約４０％ｖ／ｖ、または約５０％ｖ／ｖの、閉じた回路を通じて循環させられる灌流液が、閉じた回路の外側に漏出し得る。灌流液の漏出を通じて喪失される任意の薬物量は、算出される曝露時間にかけて一定の心臓への薬物曝露を保つために灌流液中で置き換えられてもよい。算出される曝露時間は、ある特定の実施形態において、約５分～約５時間、約１５分～約４時間、約３０分～約３時間、約１時間～約２時間の範囲内、またはこれらの間の任意の部分的範囲内であってもよい。

【００８８】

治療用組成物

心臓状態の治療のために好適な薬物（すなわち、灌流液中に含まれる薬物）は治療用ポ

リヌクレオチド配列を含んでもよい。一部の実施形態において、治療用ポリヌクレオチド配列は、心臓状態の治療用のタンパク質をコードしてもよい。心臓状態の治療用のタンパク質は、ヒト起源であってもよく、または異なる種（例えば、非限定的に、マウス、ネコ、ブタもしくはサル）に由来してもよい。一部の実施形態において、治療用ポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質は、ヒト心臓中で発現される遺伝子に対応してもよい。

【００８９】

例示的なタンパク質は、非限定的に、ＳＥＲＣＡ２、ＭＹＢＰＣ３、ＭＹＨ７、ＰＫＰ２、ＭＹＬ３、ＭＹＬ２、ＡＣＴＣ１、ＴＰＭ１、ＴＮＮＴ２、ＴＮＮＩ３、ＴＴＮ、ＦＨＬ１、ＡＬＰＫ３、ジストロフィン、ＦＫＲＰ、これらのバリアント、またはこれらの組合せのうちの１つまたは複数を含んでもよい。使用される１つまたは複数のタンパク質はまた、本明細書において言及されるタンパク質の機能的なバリアントであってもよく、元々のタンパク質と比較して著しいアミノ酸配列同一性を呈してもよい。例えば、アミノ酸同一性は、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％であってもよい。この文脈において、「機能的なバリアント」という用語は、タンパク質のバリアントが、天然に存在する対応するタンパク質の機能を部分的にまたは完全に遂行できることを意味する。タンパク質の機能的なバリアントは、例えば、１つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または付加によりそれらの天然に存在する対応物とは異なるタンパク質を含んでもよい。

【００９０】

アミノ酸置換は保存的または非保存的なものであることができる。置換は、保存的置換、すなわち、機能的な同等物として作用する類似した極性のアミノ酸によるアミノ酸残基の置換であることが好ましい。好ましくは、代用物として使用されるアミノ酸残基は、置換されるアミノ酸残基と同じ群のアミノ酸から選択される。例えば、疎水性残基は別の疎水性残基で置換することができ、または極性残基は、同じ電荷を有する別の極性残基で置換することができる。保存的置換のために使用されてもよい、機能的に同種のアミノ酸は、例えば、非極性アミノ酸、例えばグリシン、バリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、およびトリプトファンを含む。非荷電性極性アミノ酸の例は、セリン、スレオニン、グルタミン、アスパラギン、チロシンおよびシステインを含む。荷電性極性（塩基性）アミノ酸の例は、ヒスチジン、アルギニン、およびリジンを含む。荷電性極性（酸性）アミノ酸の例は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。

【００９１】

１つまたは複数（例えば、２、３、４、５、１０、または１５）の追加のアミノ酸により天然に存在する対応物とは異なるタンパク質もまたバリアントと考えられる。これらの追加のアミノ酸は、元々のタンパク質のアミノ酸配列内に（すなわち、挿入として）存在してもよく、またはそれらは、タンパク質の１つもしくは両方の末端に付加されてもよい。基本的に、アミノ酸の付加が、治療される対象において天然に存在するタンパク質の機能を遂行するポリペプチドの能力を損なわない場合に、挿入は任意の位置で起こることができる。さらに、タンパク質のバリアントはまた、元々のポリペプチドと比較して１つまたは複数のアミノ酸が欠失しているタンパク質を含む。そのような欠失は、タンパク質の正常な機能を遂行する能力を損なわない限り、任意のアミノ酸位置に影響してもよい。

【００９２】

最後に、心臓サルコメアタンパク質のバリアントはまた、構造的修飾、例えば修飾アミノ酸により天然に存在するタンパク質とは異なるタンパク質を指す。修飾アミノ酸は、天然プロセス、例えばプロセシングもしくは翻訳後修飾、または当該技術分野において公知の化学修飾プロセスのいずれかにより修飾されたアミノ酸である。典型的なアミノ酸修飾

は、リン酸化、グリコシル化、アセチル化、Ｏ結合型Ｎ－アセチルグルコサミン化、グルタチオン化、アシル化、分枝化、ＡＤＰリボース化、架橋、ジスルフィドブリッジ形成、ホルミル化、ヒドロキシル化、カルボキシル化、メチル化、脱メチル化、アミド化、環化、および／またはホスファチジルイノシトール、フラビン誘導体、リポタイコ酸、脂肪酸、もしくは脂質への共有もしくは非共有結合を含む。

【００９３】

標的タンパク質をコードする治療用ポリヌクレオチド配列は、遺伝子療法ベクター、すなわち、外因性核酸の発現を提供するために要求される他の配列、例えばプロモーター、ｋｏｚａｋ配列、およびポリＡシグナルなどの近くに、翻訳および終止コドンを含めて、コーディング配列を含む、核酸構築物の形態で、治療されるべき対象に投与されてもよい。

【００９４】

例えば、遺伝子療法ベクターは哺乳動物発現系の部分であってもよい。有用な哺乳動物発現系および発現構築物は商業的に入手可能である。また、いくつかの哺乳動物発現系は異なる製造者により配給されており、本発明において用いることができ、これは例えば、プラスミドまたはウイルスベクターベースのシステム、例えば、ＬＥＮＴＩ－Ｓｍａｒｔ（商標）（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（商標） Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒｓ、ｐＡｄＶＡｎｔａｇｅ（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＶｉｒａＰｏｗｅｒ（商標） Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ、Ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、およびアデノ随伴ウイルス発現系（Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌａｂｓ）である。

【００９５】

本発明の外因性治療用ポリヌクレオチド配列を発現するための遺伝子療法ベクターは、例えば、細胞に外因性治療用ポリヌクレオチド配列を、前記核酸によりコードされるタンパク質のその後の発現のために導入するために好適なウイルスまたは非ウイルス発現ベクターであることができる。発現ベクターは、エピソームベクター、すなわち、宿主細胞内で自律的に自己複製できるもの、または組込みベクター、すなわち、細胞のゲノムに安定的に組み込まれるものであることができる。宿主細胞中での発現は、構成的または調節性（例えば、誘導性）であることができる。

【００９６】

ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはウイルス発現ベクターである。本発明における使用のためのウイルスベクターは、ウイルスの感染力を破壊することなく異種ポリヌクレオチドを導入するためにネイティブな配列の部分が欠失されたウイルスゲノムを含んでもよい。ウイルス成分および宿主細胞受容体の間の特異的相互作用に起因して、ウイルスベクターは、標的細胞への遺伝子の効率的な移入のために高度に好適である。哺乳動物細胞への遺伝子移入を促すための好適なウイルスベクターは、異なる種類のウイルス、例えば、ＡＡＶ、アデノウイルス、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ウシパピローマウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオーマウイルス、センダイウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、パポバウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、または遺伝子療法のために好適な任意の他のウイルスシャトル、これらのバリエーション、およびこれらの組合せに由来することができる。

【００９７】

「アデノウイルス発現ベクター」または「アデノウイルス」は、（ａ）治療用ポリヌクレオチド配列構築物のパッケージングをサポートするため、ならびに／または（ｂ）その中にクローニングされた組織および／もしくは細胞特異的な構築物を最終的に発現するために十分なアデノウイルス配列を含有する構築物を含むことが意味される。本発明の１つの実施形態において、発現ベクターは、遺伝子操作された形態のアデノウイルスを含む。３６キロ塩基（ｋｂ）の直鎖状二本鎖ＤＮＡウイルスであるアデノウイルスの遺伝学的編成の知識は、７ｋｂまでの外来配列でのアデノウイルスＤＮＡの大きい部分の置換を可能

とする。

【００９８】

アデノウイルスの増殖およびマニピュレーションは当業者に公知であり、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで広い宿主範囲を呈する。この群のウイルスは、高い力価、例えば、１ｍＬ当たり10^{9}～10^{11}のプラーク形成単位で得ることができ、高度に感染性である。アデノウイルスのライフサイクルは、宿主細胞ゲノムへの組込みを要求しない。アデノウイルスベクターにより送達される外来遺伝子はエピソーム性であり、したがって、宿主細胞に対して低い遺伝毒性を有する。野生型アデノウイルスでのワクチン接種の研究において副作用は報告されておらず、ｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子移入ベクターとしてのそれらの安全性および／または治療的な潜在能力を実証している。

【００９９】

レトロウイルス（「レトロウイルスベクター」とも称される）は、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大量の外来遺伝材料を移入し、広範な種および細胞種に感染し、ならびに特別な細胞株中でパッケージングされるそれらの能力に起因して遺伝子送達ベクターとして選択されてもよい。

【０１００】

レトロウイルスゲノムは、３つの遺伝子、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖを含有し、これらはカプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をそれぞれコードする。ｇａｇ遺伝子の上流に見出される配列は、ビリオンへのゲノムのパッケージングのためのシグナルを含有する。２つの長鎖末端反復（ＬＴＲ）配列がウイルスゲノムの５’および３’端に存在する。これらは強いプロモーターおよびエンハンサー配列を含有し、これらもまた宿主細胞ゲノムへの組込みのために要求される。

【０１０１】

レトロウイルスベクターを構築するために、関心対象の遺伝子をコードする核酸が、ある特定のウイルス配列の場所でウイルスゲノムに挿入されて、複製欠陥性のウイルスが製造される。ビリオンを製造するために、ｇａｇ、ｐｏｌ、および／またはｅｎｖ遺伝子を含有するがＬＴＲおよび／またはパッケージング成分を有しないパッケージング細胞系が構築される。レトロウイルスＬＴＲおよびパッケージング配列と共にｃＤＮＡを含有する組換えプラスミドが（例えばリン酸カルシウム沈殿により）この細胞系に導入される場合、パッケージング配列により組換えプラスミドのＲＮＡ転写物はウイルス粒子にパッケージングされ、これは次に培養培地に分泌される。組換えレトロウイルスを含有する培地は次に収集され、任意選択的に濃縮され、遺伝子移入のために使用される。レトロウイルスベクターは、広い種類の細胞種に感染することができる。しかしながら、組込みおよび安定発現は宿主細胞の分裂を要求する。

【０１０２】

レトロウイルスは任意のサブファミリーに由来することができる。例えば、マウス肉腫ウイルス、ウシ白血病、ウイルスラウス肉腫ウイルス、マウス白血病ウイルス、ミンク細胞病巣誘導性ウイルス、細網内皮症ウイルス、またはトリ白血病ウイルスからのベクターを使用することができる。当業者は、異なるレトロウイルスに由来する部分、例えばＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、およびパッケージングシグナルを組み合わせて組換えレトロウイルスを得ることができる。これらのレトロウイルスは次に、通常、形質導入コンピテントレトロウイルスベクター粒子を製造するために使用される。この目的のために、ベクターは好適なパッケージング細胞系に導入される。レトロウイルスはまた、キメラインテグラーゼ酵素をレトロウイルス粒子に組み込むことにより宿主細胞のＤＮＡへの部位特異的組込みのために構築することができる。

【０１０３】

単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）は向神経性であるので、神経系障害の治療においてかなりの関心を持たれてきた。さらに、宿主細胞染色体に組み込まれることも、他に宿主細胞の代謝を変更することもなく、非分裂性ニューロン細胞中での潜伏感染を確立するＨＳＶの能力は、潜伏の間に活性のプロモーターの存在と共に、ＨＳＶを魅力的なベクターと

している。大きな注目はＨＳＶの向神経性応用に集中しているが、このベクターはまた、その広い宿主範囲を考慮して他の組織のために活用することができる。

【０１０４】

ＨＳＶを魅力的なベクターとする別の要因はゲノムのサイズおよび編成である。ＨＳＶは大きいので、複数の遺伝子または発現カセットの組込みが、他のより小さいウイルスシステムにおけるよりも問題とならない。追加的に、種々の性能（時間的、強度など）を有する異なるウイルス制御配列の利用可能性により、それは、他のシステムにおけるよりも大きい程度で発現を制御することが可能である。ウイルスが相対的に少ないスプライシングされるメッセージを有し、遺伝子マニピュレーションをさらに容易にすることもまた利点である。

【０１０５】

ＨＳＶはまた、マニピュレートが相対的に容易であり、高い力価に増殖させることができる。そのため、十分な多重感染度（ＭＯＩ）を達成するために必要とされる体積、および繰返しの投薬に対する減少された必要性の両方の観点で、送達がより問題とならない。ＨＳＶの非病原性バリアントが開発されており、遺伝子療法の文脈における使用のために容易に利用可能である。

【０１０６】

レンチウイルスは複雑なレトロウイルスであり、共通のレトロウイルス遺伝子ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖに加えて、調節的または構造的機能を有する他の遺伝子を含有する。より高い複雑性は、潜伏感染の経過におけるように、ウイルスがそのライフサイクルをモジュレートすることを可能にする。レンチウイルスの一部の例としては、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２）および類人猿免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）が挙げられる。倍加によりＨＩＶ病原性遺伝子を弱毒化することによりレンチウイルスベクターが生成されており、例えば、遺伝子ｅｎｖ、ｖｉｆ、ｖｐｒ、ｖｐｕ、およびｎｅｆが欠失されて、ベクターは生物学的に安全なものとされている。

【０１０７】

レンチウイルスベクターは、プラスミドベースまたはウイルスベースであり、外来核酸を組み込むため、選択のため、および宿主細胞への核酸の移入のための必須の配列を有するように構成されている。関心対象のベクターのｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ遺伝子もまた当該技術分野において公知である。そのため、関連する遺伝子が、選択されたベクターにクローニングされ、次に関心対象の標的細胞を形質転換するために使用される。

【０１０８】

ワクシニアウイルスベクターは、構築の容易さ、得られる発現の相対的に高いレベル、広い宿主範囲およびＤＮＡを保有する大きい容量のために大規模に使用されている。ワクシニアは、著明な「Ａ－Ｔ」選好性を呈する約１８６ｋｂの直鎖状の二本鎖ＤＮＡゲノムを含有する。約１０．５ｋｂの逆末端反復がゲノムに隣接する。必須遺伝子の大部分は、ポックスウイルスの間で最も高度に保存された中心領域内にマッピングされるようである。ワクシニアウイルス中の概算されるオープンリーディングフレームの数は１５０～２００である。両方の鎖がコーディング性であるが、リーディングフレームの大規模なオーバーラップは一般的でない。

【０１０９】

少なくとも２５ｋｂをワクシニアウイルスゲノムに挿入することができる。原型的なワクシニアベクターは、相同組換えを介してウイルスチミジンキナーゼ遺伝子に挿入される導入遺伝子を含有する。ベクターは、ｔｋ表現型に基づいて選択される。脳心筋炎ウイルスの非翻訳リーダー配列を含めることは、従来のベクターよりも高い発現のレベルを結果としてもたらし、導入遺伝子は２４時間中に感染細胞のタンパク質の１０％またはより多くで蓄積する。

【０１１０】

パポバウイルス、例えばマウスポリオーマウイルスの空カプシドは、遺伝子移入のための可能なベクターとして注目されている。空ポリオーマの使用は、ポリオーマＤＮＡおよ

び精製された空カプシドが無細胞系においてインキュベートされた場合に最初に記載された。新たな粒子のＤＮＡは膵臓ＤＮａｓｅの作用から保護された。再構成された粒子は、形質転換性ポリオーマＤＮＡ断片をラットＦＩＩＩ細胞に移入するために使用された。空カプシドおよび再構成された粒子は、ポリオーマカプシド抗原ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３の３つ全てからなる。

【０１１１】

ＡＡＶは、デペンドウイルス属に属するパルボウイルスである。それらは、小さい、非エンベロープの、一本鎖ＤＮＡウイルスであり、複製するためにヘルパーウイルスを要求する。機能的に完全なＡＡＶビリオンを形成するためにヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはワクシニアウイルス）との重感染が必要である。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ヘルパーウイルスとの重感染の非存在下で、ＡＡＶは潜伏状態を確立し、潜伏状態においてウイルスゲノムはエピソーム形態で存在するが、感染性ビリオンは産生されない。ヘルパーウイルスによるその後の感染はゲノムを「レスキュー」し、それによりゲノムは複製され、ウイルスカプシドにパッケージングされ、それにより感染性ビリオンが再構成される。ｉｎ　ｖｉｖｏで野生型ＡＡＶおよび組換えＡＡＶの両方は大きいエピソーム性コンカテマーとして主に存在することを最近のデータは指し示す。１つの実施形態において、本明細書において使用される遺伝子療法ベクターはＡＡＶベクターである。ＡＡＶベクターは、精製された、複製インコンピテント、シュードタイプｒＡＡＶ粒子であってもよい。

【０１１２】

ＡＡＶは、いかなる既知のヒト疾患とも関連付けられておらず、一般に病原性とは考えられず、組込みで宿主細胞の生理学的特性を変更しないようである。ＡＡＶは、非分裂細胞を含めて、広範囲の宿主細胞に感染することができ、異なる種からの細胞に感染することができる。細胞性応答および液性応答の両方により急速にクリアランスまたは不活性化される一部のベクターとは対照的に、ＡＡＶベクターは、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて様々な組織中で持続性の導入遺伝子発現を誘導することが示されている。ｉｎ　ｖｉｖｏにおける非分裂細胞中での組換えＡＡＶ媒介性導入遺伝子の持続は、ネイティブなＡＡＶウイルス遺伝子の欠如およびエピソーム性コンカテマーを形成するベクターのＩＴＲ関連能力に帰せられ得る。

【０１１３】

ＡＡＶは、エピソーム性コンカテマーとして高い頻度の持続を有し、かつ心筋細胞を含めて、非分裂細胞に感染することができるため、例えば、組織培養およびｉｎ　ｖｉｖｏにおける、哺乳動物細胞への遺伝子の送達のために有用であることから、本発明の細胞形質導入における使用のための魅力的なベクターシステムである。

【０１１４】

典型的には、ｒＡＡＶは、２つのＡＡＶ末端反復により隣接される関心対象の遺伝子を含有するプラスミドおよび／または末端反復を有しない野生型ＡＡＶコーディング配列を含有する発現プラスミド、例えばｐＩＭ４５を共トランスフェクトすることにより作られる。細胞はまた、ＡＡＶヘルパー機能のために要求されるアデノウイルス遺伝子を有するアデノウイルスおよび／またはプラスミドを用いて感染および／またはトランスフェクトされる。そのような様式で作られるｒＡＡＶのストックはアデノウイルスが夾雑しており、それは（例えば、塩化セシウム密度遠心分離またはカラムクロマトグラフィーにより）ｒＡＡＶ粒子から物理的に分離されなければならない。代替的に、ＡＡＶコーディング領域を含有するアデノウイルスベクターならびに／またはＡＡＶコーディング領域および／もしくはアデノウイルスヘルパー遺伝子のうちの一部もしくは全てを含有する細胞系が使用され得る。組み込まれたプロウイルスとしてｒＡＡＶ　ＤＮＡを有する細胞系もまた使用することができる。

【０１１５】

ＡＡＶの複数の血清型が天然に存在し、少なくとも１２の血清型（ＡＡＶ１～ＡＡＶ１２）がある。高い程度の相同性にもかかわらず、異なる血清型は異なる組織に対するトロ

ピズムを有する。トランスフェクションで、ＡＡＶは宿主中で（あったとしても）軽微な免疫反応のみを誘発する。したがって、ＡＡＶは、遺伝子療法アプローチのために高度に適する。

【０１１６】

本開示は、一部の実施形態において、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ＡＮＣ　ＡＡＶ、これらから誘導されたキメラＡＡＶ、これらのバリエーション、および関心対象の組織中での高い効率の形質導入のためによりいっそう好適なものであるこれらの組合せのうちの１つまたは複数であるＡＡＶベクターを含む薬物に向けられたものであり得る。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型１のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型２のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型３のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型４のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型５のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型６のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型７のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型８のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型９のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型１０のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型１１のベクターである。ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターはＡＡＶ血清型１２のベクターである。

【０１１７】

ヒトのためのＡＡＶの好適な用量は、約1×10^{8}ｖｇ／ｋｇ～約3×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、約1×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、約1×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、約1×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、約1×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、約1×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、約1×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、または約1×10^{14}ｖｇ／ｋｇの範囲内であり得る。ウイルス粒子またはＤＲＰの総量は、約、少なくとも、少なくとも約、多くて、もしくは多くて約、5×10^{15}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{15}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{15}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{15}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{15}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{14}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{13}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{12}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{11}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{10}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、1×10^{9}ｖｇ／ｋｇ、9×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、8×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、7×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、6×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、5×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、4×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、3×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、2×10^{8}ｖｇ／ｋｇ、もしくは1×10^{8}ｖｇ／ｋｇであり、またはこれらの値の任意の２つにより定義される範囲内に入る。上記の列記される投薬量は、心臓組織１ｋｇ当たりのｖｇの単位である。

【０１１８】
本明細書に開示されるシステムおよび方法を用いることで、一部の実施形態において、それなしで全身送達を通じて安全に投与され得るよりも高用量の薬物が心臓に直接的におよび心臓のみに投与され得るが、その理由は、心臓の外側および／またはテベシウス静脈系への灌流液の漏出が実質的に存在しないためである。限定として解釈されるものではないが、ＡＡＶ毒性は、全身性の効果、例えば肝毒性、血小板活性化および喪失、ならびに補体活性化および喪失に起因し得ると考えられる。これらの毒性およびその他の全てが、本明細書に開示される方法およびシステムに記載の局所領域灌流液適用を介して低減、最小化、または完全に回避され得る。そのため、心臓組織１ｋｇ当たり約５×１０^{15}ｖｇまでの用量は忍容性良好であり得る。ある特定の実施形態において、心臓組織１ｋｇ当たりのｖｇとして表される、心臓に対するＡＡＶ用量は、約２～約２００、約５～約１５０、約１０～約１００、またはこれらにおける任意の部分的範囲の係数で最も高い全身に投与される用量を上回ってもよい。

【０１１９】
ウイルスベクター以外に、非ウイルス発現構築物もまた、患者の細胞に標的タンパク質またはその機能性バリアントもしくは断片をコードする遺伝子を導入するために使用されてもよい。標的細胞中でのタンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏ発現を許容する非ウイルス発現ベクターとしては、例えば、プラスミド、修飾ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、アンチセンスオリゴマー、ＤＮＡ－脂質複合体、ナノ粒子、エクソソーム、遺伝子療法のために好適な任意の他の非ウイルスシャトル、これらのバリエーション、およびこれらの組合せが挙げられる。

【０１２０】
ウイルスベクターおよび非ウイルス発現ベクター以外に、ヌクレアーゼシステムもまた、患者の細胞に入り、標的タンパク質またはその機能性バリアントもしくは断片をコードする遺伝子をそこに導入するために、ベクターおよび／またはエレクトロポレーションシステムと組み合わせて、使用されてもよい。例示的なヌクレアーゼシステムとしては、非限定的に、ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　ｓｈｏｒｔ　ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　ｒｅｐｅａｔｓ（ＣＲＩＳＰＲ）、ＤＮＡ切断酵素（例えば、Ｃａｓ９）、メガヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、遺伝子療法のために好適な任意の他のヌクレアーゼシステム、これらのバリエーション、およびこれらの組合せを挙げることができる。例えば、１つの実施形態において、１つのウイルスベクター（例えば、ＡＡＶ）はヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ）のために使用されてもよく、別のウイルスベクター（例えば、ＡＡＶ）はＤＮＡ切断酵素（例えば、Ｃａｓ９）のために使用されてもよく、それにより両方（ヌクレアーゼおよびＤＮＡ切断酵素）が標的細胞に導入される。

【０１２１】
治療用遺伝子をコードする治療用ポリヌクレオチド配列を細胞に送達するために用いられ得る他のベクター送達システムは受容体媒介性送達媒体である。これらは、ほぼ全ての真核細胞中での受容体媒介性エンドサイトーシスによる高分子の選択的な取込みを利用する。様々な受容体の細胞種特異的な分布のため、送達は高度に特異的であり得る。受容体媒介性の遺伝子標的化媒体は、２つの成分：細胞受容体特異的リガンドおよびＤＮＡ結合剤を含んでもよい。

【０１２２】
標的細胞への非ウイルスベクターの移入のための好適な方法は、例えば、リポフェクション法、リン酸カルシウム共沈殿法、ＤＥＡＥデキストラン法ならびにマイクロガラスチューブ、超音波、およびエレクトロポレーションなどを使用する直接的なＤＮＡ導入法である。ベクターの導入の前に、心筋細胞は、透過処理剤、例えばホスファチジルコリン、ストレプトリジン、カプリン酸ナトリウム、デカノイルカルニチン、酒石酸、リゾレシチン、およびＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００などで処理されてもよい。エクソソームもまた、ネイキッドＤＮＡまたはＡＡＶカプシド被包ＤＮＡを移入するために使用されてもよい。

【０１２３】

本発明の遺伝子療法ベクターは、標的タンパク質をコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含んでもよい。プロモーター配列は、コンパクトかつ強い発現を確実にするものでなければならない。好ましくは、プロモーターは、遺伝子療法ベクターを用いて治療された患者の心筋において標的タンパク質の発現を提供する。一部の実施形態において、遺伝子療法ベクターは、標的タンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結された心臓特異的プロモーターを含む。本明細書において使用される場合、「心臓特異的プロモーター」は、心臓細胞におけるその活性が任意の他の非心臓細胞種におけるよりも少なくとも２倍高いプロモーターを指す。好ましくは、本発明のベクターにおいて使用するために好適な心臓特異的プロモーターは、非心臓細胞種中でのその活性と比較して少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも１５倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍、または少なくとも５０倍高い心臓細胞中での活性を有する。

【０１２４】

心臓特異的プロモーターは、選択されたヒトプロモーター、または選択されたヒトプロモーターに対して少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の配列同一性を有する機能的に同等の配列を含むプロモーターであってもよい。使用されてもよい例示的な非限定的なプロモーターは心臓トロポニンＴプロモーター（ＴＮＮＴ２）である。プロモーターの他の非限定的な例としては、アルファミオシン重鎖プロモーター、ミオシン軽鎖２ｖプロモーター、アルファミオシン重鎖プロモーター、アルファ－心臓アクチンプロモーター、アルファ－トロポミオシンプロモーター、心臓トロポニンＣプロモーター、心臓トロポニンＩプロモーター、心臓ミオシン結合性タンパク質Ｃプロモーター、および筋小胞体／小胞体Ｃａ$^{2+}$－ＡＴＰアーゼ（ＳＥＲＣＡ）プロモーター（例えば、このプロモーターのアイソフォーム２（ＳＥＲＣＡ２））が挙げられる。

【０１２５】

本発明において有用なベクターは、種々の形質導入効率を有し得る。結果として、ウイルスまたは非ウイルスベクターは、標的化された血管テリトリーの細胞の約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９９％、または１００％より高く、それに等しく、またはそれ以上で形質導入を行う。１つより多くのベクター（ウイルスもしくは非ウイルス、またはこれらの組合せ）を同時にまたは順次使用することができる。これを使用して、１つより多くのポリヌクレオチドを移入すること、および／または１つより多くの種類の細胞を標的化することができる。複数のベクターまたは複数の剤が使用される場合、１つより多くの形質導入／トランスフェクション効率が結果としてもたらされ得る。

【０１２６】

遺伝子療法ベクターを含有する医薬組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして調製されてもよい。本発明の医薬組成物は、一般的に使用される薬学的に許容される賦形剤、例えば希釈剤および担体を含むことができる。特に、組成物は、薬学的に許容される担体、例えば、水、食塩水、リンゲル溶液、またはデキストロース溶液を含む。担体に加えて、医薬組成物はまた、乳化剤、ｐＨ緩衝化剤、安定化剤、および色素などを含有してもよい。

【０１２７】

ある特定の実施形態において、医薬組成物は、治療的に有効な遺伝子用量を含み、これは、対象に対して毒性となることなく、対象において心筋症を予防または治療することができる用量である。心筋症の予防または治療は、心筋症と関連付けられる表現型的特徴における変化として評価されてもよく、そのような変化は、心筋症を予防または治療するために有効なものである。そのため、治療的に有効な遺伝子用量は、典型的には、生理学的に許容できる組成物中で投与された場合に、治療される対象において病原性の心臓表現型を改善または予防するために十分なものである。

【０１２８】

本明細書に開示される方法により治療され得る心臓状態は、非限定的に、遺伝学的に決定される心臓疾患（例えば、遺伝学的に決定される心筋症）、不整脈心臓疾患、心不全、虚血、不整脈、心筋梗塞、鬱血性心不全、移植片拒絶、異常な心臓収縮、非虚血性心筋症、僧帽弁逆流症、大動脈狭窄症または逆流症、異常なCa^{2+}代謝、先天性心臓疾患、原発性または二次性心臓腫瘍、およびこれらの組合せのうちの１つまたは複数を含んでもよい。

【実施例】

【０１２９】

実例的な実施例

以下の実施例は、本開示の理解を補助するために記載され、当然ながら、本出願において記載およびクレームされる実施形態を特に限定するとして解釈されるべきではない。当業者の認識範囲内にある、公知でありまたは後に開発された全ての同等物の置換を含めて、実施形態のそのようなバリエーション、および製剤における変更または実験設計における軽微な変更は、本明細書に組み込まれる実施形態の範囲内に入ると考えられるべきである。

【０１３０】

[実施例１]

３匹のブタにおける局所領域灌流の実現可能性の研究

３匹のブタ（sus scrofa domestica）において手順を６０分間成功裏に行うことにより確立されたＬＲＰシステムの実現可能性。２匹のブタにおいて、調査目的のために開胸術を行ったが、全てのカテーテルは経皮的に導入した。第３のブタにおいて、開胸術は行わず、全体的なＬＲＰ手順を経皮的に行った。

【０１３１】

図１Ａおよび図１Ｂに図示され、該図に関して記載されるＬＲＰシステム１００を利用して３匹の動物に対してＬＲＰを行った。３匹全ての動物において、いかなる技術的な問題もなく、心臓を自発的に６０分間鼓動させながらＬＲＰ手順を維持することができた。ＬＲＰの間に、全ての動物（ｎ＝３）は、変力剤のいかなる必要性もなしに血行力学的に安定であった。ＬＲＰ後の心臓機能は平凡なものであり、全ての動物についてベースラインと同等であった。冠動脈の全体的な閉塞が許容された：動物１において、ＬＣＡは完全には閉塞できず（漏出は軽度と考えられた）、動物２において、ＲＣＡは完全には閉塞できず（漏出は微量と考えられた）、動物３において、両方の冠動脈を閉塞することができた。

【０１３２】

ブタの可変的な解剖学的形態に起因して冠静脈洞（ＣＳ）の緊密な閉塞は技術的により困難であり、ブタでは、ヒトとは対照的に、奇静脈は冠静脈洞に直接的に挿入され、ヒトの状況をシミュレートするために閉塞される必要がある。完全な閉塞が動物３において達成され（Ｒｅｌｉａｎｔバルーンを使用）、部分的な閉塞が動物１および動物２において達成された（ＰｒｏＰｌｅｄｇｅカテーテル）。１６６ｍＬ／分～２４４ｍＬ／分の範囲内の６０分のＬＲＰ手順の間の流速を達成することができた。意図される使用および本開示の実施形態によるＬＲＰシステムにおける使用を含めて、この実施例において使用された補助的デバイスを列記する。

【０１３３】

図２は、代表的なＬＲＰのｉｎ　ｓｉｔｕの装置のラジオグラフであり、冠動脈カテーテルが矢印により指し示され、冠静脈洞バルーン（収集カテーテル）が三角形により指し示される。

【０１３４】

３匹の動物についてのＬＲＰパラメーター（ポンプ速度、流れ、および圧力）の平均値を図３に要約する（バーは標準偏差を表す）。

【０１３５】

表は、それらの意図される使用および本開示の実施形態によるＬＲＰシステムにおける

使用を含む。

【０１３６】

図２は、代表的なＬＲＰのｉｎ　ｓｉｔｕの装置のラジオグラフであり、冠動脈カテーテルが矢印により指し示され、冠静脈洞バルーン（収集カテーテル）が三角形により指し示される。

【０１３７】

３匹の動物についてのＬＲＰパラメーター（ポンプ速度、流れ、および圧力）の平均値を図３に要約する（バーは標準偏差を表す）。

【０１３８】

【表１】

表 1: LRP 手順のために使用されたデバイス

品目	CE での意図される用途	LRP での用途	ブランド	研究
FlowGate[2]	神経学 血栓切除術	冠動脈灌流	Stryker	動物1 動物2 動物3
ProPledge	逆行性心停止法	冠静脈洞血液還流	Edwards	動物1 動物2 動物3
EndoVent	肺動脈血液ベンティング(吸引)	冠静脈洞血液還流および奇静脈閉塞	Edwards	動物1 動物2 動物3
D100 Oxygenator set	小児心肺バイパス(CPB)セット	血液酸素供給およびチュービング	Dideco-Livanova	動物1 動物2 動物3
Revolution 5	遠心血液ポンプ	遠心血液ポンプ	Sorin-Livanova	
Rotaflow RF-32	遠心血液ポンプ	遠心血液ポンプ	Getinge	動物1 動物2 動物3
BPX-80	遠心血液ポンプ	遠心血液ポンプ	Medtronic	安全性研究
Bio-Medicus 550 Bio-Console	ECMO ポンプコンソール	ECMO ポンプコンソール	Medtronic	動物1 動物2 動物3
PressureWire X	冠動脈圧力ワイヤー	冠動脈圧力ワイヤー	Saint Jude Medical / Abbott	動物1 動物2 動物3
Fractional flow reserve (FFR) console	FFR コンソール	冠動脈圧力コンソール	Saint Jude Medical / Abbott	動物1 動物2 動物3
Reliant	大動脈エンドクランプ	冠静脈洞閉塞	Medtronic	動物3
Fogarty catheter	血栓切除術	冠静脈洞閉塞	Fogarty	

【０１３９】

【表２】

表 2: 60 分の LRP 手順にかけての流れおよび圧力の特徴

動物 1							
時間	0 分	5 分	10 分	15 分	30 分	45 分	60 分
流れ(mL/分)	140	200	190	200	180	220	190
圧力(mm/Hg)	-90	-90	-90	-90	-90	-60	-60
RPM	2650	3020	3020	3020	890	3060	2930
冠動脈圧力	48/28	44/24	44/25	48/28	44/25	47/28	48/20
平均冠動脈圧力	37	32	32	36	32	37	34
全身圧力	77/51	70/47	69/47	76/52	69/48	77/53	70/48
平均全身圧力	62	57	56	62	57	60	58
動物 2							
時間	0 分	5 分	10 分	15 分	30 分	45 分	60 分
流れ(mL/分)	180	-	140	150	170	180	180
圧力(mmHg)	-90	-	-90	-90	-90	-90	-90
RPM	3020	-	2940	2980	3050	3050	3010
冠動脈圧力	65/33	-	61/46	63/47	73/52	70/48	66/41
平均冠動脈圧力	41	-	51	52	60	58	51
全身圧力	70/50	-	60/43	60/43	68/55	67/46	59/42
平均全身圧力	61	-	50	49	62	56	51
心拍数	71	-	74	75	78	80	81
動物 3							
時間	0 分	5 分	10 分	15 分	30 分	45 分	60 分
流れ(mL/分)	260	240	250	250	240	230	240
圧力	-60	-80	-70	-70	-70	-70	-70
RPM	3330	3350	3350	3350	3350	3350	3610
冠動脈圧力	54/44	58/44	53/4	52/41	50/40	50/40	86/56
平均冠動脈圧力	49	49	47	46	45	42	70
全身圧力	71/47	66/43	67/45	67/45	67/39	54/40	57/7
平均全身圧力	57	54	54	54	47	47	30
心拍数	73	74	73	72	77	97	88

【０１４０】

[実施例２]

２匹のブタにおける局所領域灌流システムの安全性研究

２匹のブタ（sus scrofa domestica）において６０分間経皮アプローチを使用してＬＲＰ手順を行い、手順後に２４時間、動物を麻酔下に保ったまま動物を追跡することによりＬＲＰシステムの安全性を確立した。２４時間の期間後に、動物を　　殺し、それらの心臓の肉眼および顕微鏡検査を実行した。追加的に、血液バイオマーカーを得て、心臓の組織損傷を評価した。

【０１４１】

両方の実験において、いかなる深刻な有害効果もなくＬＲＰを成功裏に行うことができた。動物５について技術的な問題が発生し、ポンプヘッドのチュービング接続が１０分後に故障した。ＬＲＰを直ちに中止し、全てのカテーテルを脱着および収縮させた。ポンプ

ヘッドを直ちに置き換え、ＬＲＰシステムを再接続し、脱気し、再開した。この手技の間に、動物は血行力学的に安定であり、深刻な有害効果は観察されなかった。ＬＲＰ手順を次に６０分間維持し、軽微な機器の故障があっても安全性の有効性が実証された。

【０１４２】

ＬＲＰの開始、再開、および２４時間後までを含めて、手順の全体を通じて、動物は変力剤のいかなる必要性もなしに血行力学的に安定であった。

【０１４３】

両方の動物について左冠動脈主幹部および右冠動脈を完全に閉塞し、冠静脈洞を部分的に閉塞（漏出は中程度であった）しながら、１７３ｍＬ／分の平均ＬＲＰ流れを達成することができた。術後および２４時間の心臓機能は平凡なものであり、ベースラインと同等であった。心臓バイオマーカー（ミオグロビンおよびトロポニン）は、ＬＲＰ手順の間および直後にわずかにのみ増加したが、２４時間のフォローアップの間に直ちにベースライン値に向けて低下した。全体的な手順を通じた動物の連続的な血行動態安定性、深刻な有害効果の非存在、ならびに心臓バイオマーカーの軽微かつ一時的に過ぎない増加の他に、２４時間の間の即時の正常化を伴う一時的に過ぎない心電図変化を考慮して、ＬＲＰ手順は安全であることが実証された。表３は、安全性研究において使用された動物４および動物５における６０分のＬＲＰ手順にかけての流れおよび圧力の特徴を編纂する。

【０１４４】

【表３】

表 3:安全性研究のためのパラメーター

動物 4					
時間	0	15 分	30 分	45 分	60 分
流れ(mL/分)	180-190	200	180	180	190
吸引		-70	-70	-70	-70
RPM		3400	3400	3320	3350
冠動脈圧力		93/52	90/63	88/37	82/43
平均		74	77	62	65
全身圧力		104/65	100/64	94/61	94/56
平均		80	78	77	65
動物 5					
時間	5 分	15 分	30 分	45 分	60 分
流れ(mL/分)	150	150	160	150	170
吸引(mmHg)	-80	-80	-80	-80	-80
RPM	2390	2400	2440	2400	2410
冠動脈圧力	76/44	80/40	81/40	90/45	72/24
平均	61	59	58	62	43
全身	86/52	86/53	80/46	100/62	84/47
平均	66	66	60	77	63

【０１４５】

動物４および動物５の心臓を　　殺後に巨視的に調べた。

【０１４６】

動物４の心臓重量は３１２グラムであった。肉眼的な病理は観察されず、特に心筋虚血

の徴候も心筋梗塞の徴候もなかった。動物４の心臓の後部側において、局在化した血腫が右冠動脈の区画に観察されたが、これは手順の間のワイヤー傷害に起因する可能性が最も高い。

【０１４７】

動物５の心臓重量は２９３グラムであった。肉眼的な病理は観察されず、特に心筋虚血の徴候も心筋梗塞の徴候もなかった。動物５の心臓の後部側において、局在化した血腫が遠位右冠動脈および遠位左回旋動脈の区画に観察されたが、これは手順の間のワイヤー傷害に起因する可能性が最も高い。

【０１４８】

心臓組織の生化学的な完全性を確認するために、血清心臓バイオマーカーを得、それを表４に要約する。クレアチンキナーゼ（ＣＫ）レベルはＬＲＰ手順の間に安定なままであったが、最も高い可能性としては仰臥位に動物が横たわったことに起因して、ＬＲＰ後に連続的な上昇を示した。ミオグロビンレベルはＬＲＰ手順の間に安定なままであり、その後に最小に過ぎない増加を示したが、依然として動物４について参照レベル内、動物５について参照レベルよりもごくわずかに高いに過ぎなかった。トロポニンＴはＬＲＰ手順の間に最小に増加し、６０分でのピークに続いて、フォローアップの間にベースライン値まで低下した。

【０１４９】

【表４】

表 4:血清バイオマーカー(クレアチンキナーゼ(CK)、ミオグロビン(Myo)、およびトロポニン T(Trop))値をベースライン、LRP の間の 30 分および 60 分、ならびに LRP 後の様々な間隔において得た。

動物 4	参照値	ベースライン	LRP 30 分	LRP 60 分	4h	8h	12h	16h	20h	24h
CK	<190U/L	871	865	883	937	1293	1285	1270	2068	2640
Myo.	25-72µg/L	<21	<21	<21	<21	<21	<21	24	35	58
Trop.	<14ng/L	53	85	106	56	45	34	28	32	53

動物 5	参照値	ベースライン	LRP 30 分	LRP 60 分	4h	8h	12h	16h	20h	24h
CK	<190U/L	988	899	931	1946	2943	4064	4929	5496	7655
Myo.	25-72µg/L	<21	<21	<21	<21	26	35	37	43	83
Trop.	<14ng/L	37	44	66	138	120	93	72	61	58

【０１５０】

以上の記載において、本発明の徹底的な理解を提供するために、多数の特有の詳細、例えば特有の材料、寸法、プロセスパラメーターなどが記載される。特定の構成、構造、材料、または特徴は、１つまたは複数の実施形態において任意の好適な方式で組み合わせられてもよい。「例」または「例示的な」という語は、例、事例、または実例として役立つことを意味するために本明細書において使用される。「例」または「例示的」として本明細書に記載される任意の態様または設計は、他の態様または設計よりも好ましいまたは有利であるとは必ずしも解釈されない。むしろ、「例」または「例示的な」という語の使用は、具体的な様式で概念を提示することが単純に意図される。本出願において使用される場合、「または」という用語は、排他的な「または」ではなく包含的な「または」を意味することが意図される。すなわち、他に指定されなければ、または文脈から明らかでなけ

れば、「ＸはＡまたはＢを含む」は、自然な包含的な順列組合せのいずれかを意味することが意図される。すなわち、ＸがＡを含むか、ＸがＢを含むか、またはＸがＡおよびＢの両方を含む場合に、「ＸはＡまたはＢを含む」は以上の事例のいずれかの下で満たされる。本明細書の全体を通じて「実施形態」、「ある特定の実施形態」、または「１つの実施形態」への言及は、実施形態との繋がりで記載される特定の構成、構造、または特徴が少なくとも１つの実施形態において含まれることを意味する。そのため、本明細書の全体を通じた様々な場所における「実施形態」、「ある特定の実施形態」、または「１つの実施形態」という語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指すものではない。

【０１５１】

本発明がその特有の例示的な実施形態を参照して記載された。本明細書および図面は、よって、制限的な意味ではなく実例的な意味でみなされるべきである。本明細書に示され、記載されるものに加えて本発明の様々な改変が当業者に明らかとなり、それは添付の請求項の範囲内に入ることが意図される。

【符号の説明】

【０１５２】

１００　ＬＲＰシステム
１１０Ａ　前方視野
１１０Ｂ　後方視野
１１２　右冠動脈
１１４　左冠動脈主幹部
１１６　冠静脈洞
１２０　膜型人工肺デバイス
１２２　第１のカテーテル
１２４　第２のカテーテル
１２６　収集カテーテル
１３０　血液気体分析（ＢＧＡ）モニター
１４０　圧力モニター
１４２　第１の圧力センサー
１４４　第２の圧力センサー
１５２　出口
１５４　入口
１５６　熱交換器
１５８　送達ポンプ
１６０　リザーバー
１６２　センサー
１６４　センサー
１６６　膜型人工肺
１６８　気体ブレンダー
１７０　気体調節器

【図面】

【図１Ａ】

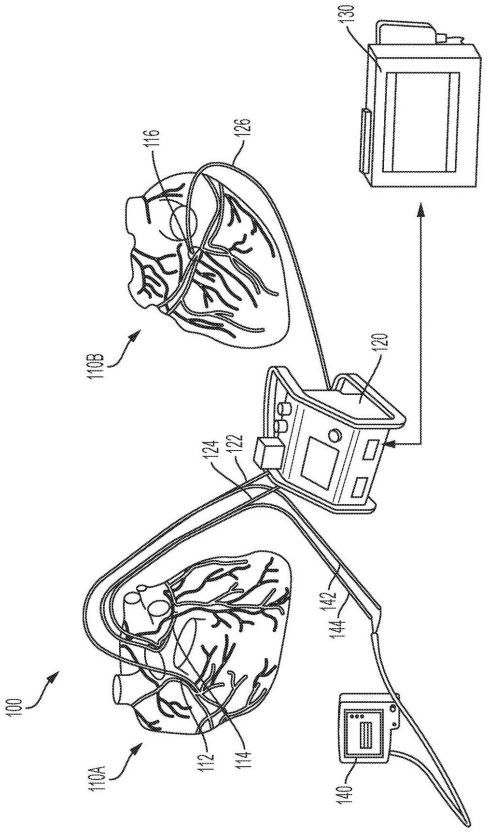


図 1A

【図１Ｂ】

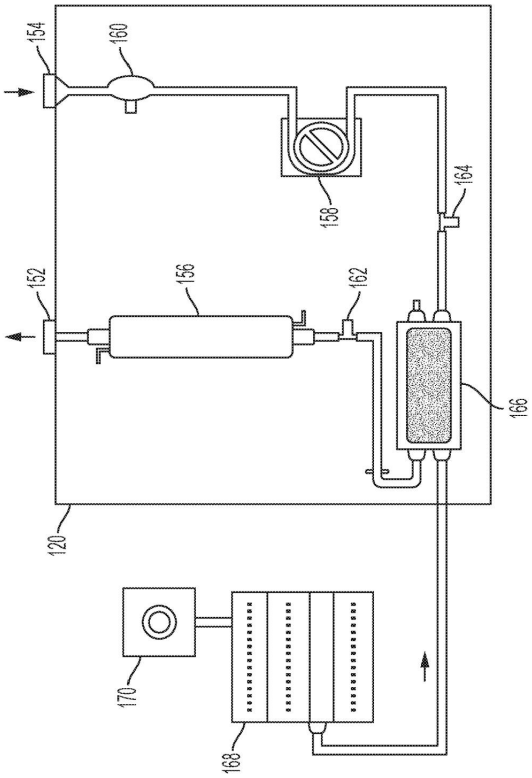


図 1B

【図２】

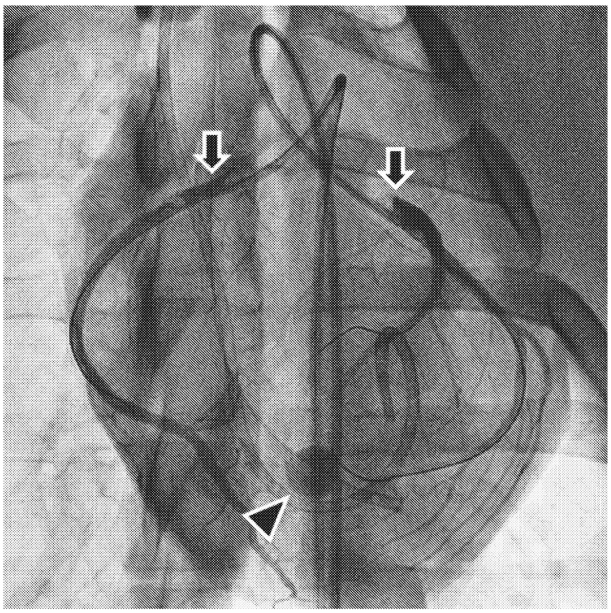


図 2

【図３】

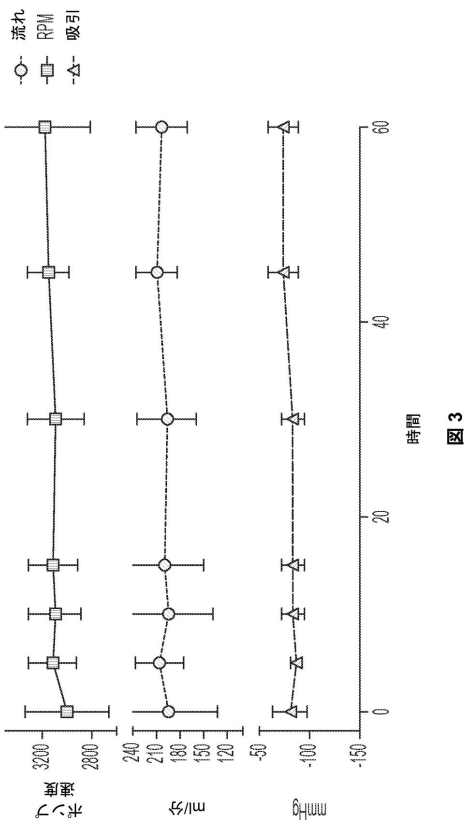


図 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/000692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61M1/16 A61M1/36
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/182684 A1 (OSPREY MEDICAL INC) 2 July 2015 (2015-07-02) claim 4B paragraph [0023] - paragraph [0024] paragraph [0037] paragraph [0057] - paragraph [0061] paragraph [0065] - paragraph [0069] -----	44,46-51
A	US 2004/102732 A1 (NAGHAVI MORTEZA, EFTEKHARI HOSSEIN, CASSCELLS S WARD) 27 May 2004 (2004-05-27) claims 1,6,8,20,53 paragraph [0100] - paragraph [0104] -----	44,46-51

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 December 2020	15/12/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mata Vicente, Teresa

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2020/000692

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

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

1. [X] Claims Nos.: 1-43, 45
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2020/000692

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015182684 A1	02-07-2015	US 2007203445 A1	30-08-2007
		US 2011015558 A1	20-01-2011
		US 2015182684 A1	02-07-2015
		WO 2008027272 A2	06-03-2008
US 2004102732 A1	27-05-2004	AU 2003251567 A1	06-01-2004
		US 2004102732 A1	27-05-2004
		WO 2004000387 A2	31-12-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/IB2020/000692

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 1-43, 45

Claims 1-43 are directed to a method of treatment of the human body by therapy and therefore fall under the provisions of Rule 39.1(iv)/Rule 67.1 PCT. Claim 45 is directed to a system inserted into the beating heart of a patient. This implies that the product comprises a human body and, in consequence, it falls under the provisions of Rule 39.1(ii)/Rule 67.1 PCT.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ	*35/761 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/761	
Ａ６１Ｋ	*35/763 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/763	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

イギリス国，ジービー イー１４ ９アールユー，ロンドン，イースト サウス クエイ スクエア，ディスカバリー ドック ２

Ｆターム（参考） 4C077 AA03 AA25 DD05 EE01 HH03 HH15 JJ03 JJ16 KK30
4C084 AA13 MA66 NA10 ZA36
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 MA66 NA10 ZA36
4C087 AA01 BC83 CA12 MA66 NA10 ZA36