

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-549140

(P2022-549140A)

(43)公表日 令和4年11月24日(2022.11.24)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 C 0 8 6
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-517343(P2022-517343)	(71)出願人	507299817
(86)(22)出願日	令和2年9月21日(2020.9.21)		ユーシーエル ビジネス リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年4月28日(2022.4.28)		イギリス国 ダブリュシー1イー 6ピー
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/076290		ティー ロンドン, ゴーワー ストリート
(87)国際公開番号	WO2021/053222		, ユニバーシティ カレッジ ロンドン
(87)国際公開日	令和3年3月25日(2021.3.25)	(74)代理人	100092783
(31)優先権主張番号	62/903,103		弁理士 小林 浩
(32)優先日	令和1年9月20日(2019.9.20)	(74)代理人	100120134
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 大森 規雄
(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,A T,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	(74)代理人	100110663
			弁理士 杉山 共永
		(72)発明者	ヴォイト, トーマス
			イギリス国 ダブリュ1ティー 4ティ
			ーピー ロンドン ザ ネットワーク ビル
			ディング トッテナム コート ロード 9
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子療法組成物および不整脈源性右心室心筋症の治療

(57)【要約】

ヒト対象において心筋症を治療または予防するための組成物および方法が開示される。一部の実施形態において、方法は、治療用量の遺伝子療法ベクターをヒト対象の心筋細胞に送達することを含み、遺伝子療法ベクターは、P K P 2 をコードする核酸配列を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト対象において心筋症を治療または予防する方法であって、治療用量の遺伝子療法ベクターを前記ヒト対象の心筋細胞に送達することを含み、前記遺伝子療法ベクターが、プラコフィリン - 2 (PKP2) またはその機能的なバリエーションをコードする核酸配列を含む、方法。

【請求項 2】

前記遺伝子療法ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ウイルスベクターが、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一つまたは複数を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ウイルスベクターが AAV6 または AAV9 を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ウイルスベクターが AAV6 を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸配列が心臓特異的プロモーターをさらにコードする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記治療用量が、前記ヒト対象の前記心筋細胞による前記 PKP2 またはその機能的なバリエーションの産生をもたらすことにより不整脈源性右心室心筋症 (ARVC) を治療または予防するために有効である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記治療用量の前記送達が静脈内に行われる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ヒト対象の心筋細胞内で核酸配列を発現するために適合された遺伝子療法ベクターであって、前記核酸配列が、

PKP2 またはその機能的なバリエーションをコードする第 1 の配列、および心臓特異的プロモーターを含む第 2 の配列を含む、遺伝子療法ベクター。

【請求項 10】

前記遺伝子療法ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 9 に記載の遺伝子療法ベクター。

【請求項 11】

前記ウイルスベクターが、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一つまたは複数を含む、請求項 10 に記載の遺伝子療法ベクター。

【請求項 12】

前記ウイルスベクターが AAV6 または AAV9 を含む、請求項 10 に記載の遺伝子療法ベクター。

【請求項 13】

前記心臓特異的プロモーターが TNNT2 を含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の遺伝子療法ベクター。

【請求項 14】

ヒト対象において心筋症を治療または予防するための治療用製剤であって、薬学的に許容される賦形剤または担体、

10

20

30

40

50

P K P 2 またはその機能的なバリエーションをコードする核酸配列を含むウイルスベクターを含む、治療用製剤。

【請求項 15】

1 つまたは複数の非 P K P 2 サルコメアタンパク質またはその機能的なバリエーションをコードする核酸配列をそれぞれ含む 1 つまたは複数の追加のウイルスベクターをさらに含む、請求項 14 に記載の治療用製剤。

【請求項 16】

非突然変異型 P K P 2 を発現するように P K P 2 突然変異型心筋細胞を遺伝子改変する方法であって、

前記非突然変異型 P K P 2 をコードする核酸配列を前記 P K P 2 突然変異型心筋細胞にトランスフェクトすることを含む、方法。 10

【請求項 17】

前記核酸配列が、A A V 6 または A A V 9 を含むウイルスベクターを介して送達される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ウイルスベクターが A A V 6 を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記核酸配列が心臓特異的プロモーターをさらにコードする、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 20】

前記心臓特異的プロモーターが T N N T 2 を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 P K P 2 が P K P 2 アイソフォーム 2 a である、請求項 1 ~ 8 または 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 P K P 2 が P K P 2 アイソフォーム 2 b である、請求項 1 ~ 8 または 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記 P K P 2 が P K P 2 アイソフォーム 2 a である、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の遺伝子療法ベクターまたは治療用製剤。 30

【請求項 24】

前記 P K P 2 が P K P 2 アイソフォーム 2 b である、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の遺伝子療法ベクターまたは治療用製剤。

【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9月20日に出願された米国仮特許出願第62/903,103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。 40

【0002】

本発明は、心臓疾患（例えば、心筋症）の治療に関し、より特には、心筋症の治療のための遺伝子療法の方法および医薬組成物に関する。

【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 50

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。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ヒト対象の心筋細胞に治療用ポリヌクレオチド配列を送達する方法を提供することが本発明の目的である。

【0005】

アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクター中にプラコフィリン-2 (PKP2) タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列をベクター化することが本発明のある特定の実施形態のさらなる目的である。

10

【0006】

PKP2 突然変異型心筋細胞におけるハプロ不全を矯正するために遺伝子療法の方法を利用することが本発明のある特定の実施形態のさらなる目的である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

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、ヒト対象において心筋症を治療または予防する方法に向けられた本発明により叶えられる。方法は、例えば、治療用量の遺伝子療法ベクターをヒト対象の心筋細胞に送達することを含み、遺伝子療法ベクターは、PKP2 をコードする核酸配列を含む。

【0008】

一部の実施形態において、遺伝子療法ベクターはウイルスベクターを含む。一部の実施形態において、ウイルスベクターは、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一つまたは複数を含む。一部の実施形態において、ウイルスベクターはAAV6またはAAV9を含む。

20

【0009】

一部の実施形態において、治療用量は、ヒト対象の心筋細胞によるPKP2 タンパク質の産生をもたらすことにより不整脈源性右心室心筋症 (ARVC) を治療または予防するために有効である。

【0010】

ある特定の他の実施形態は、ヒト対象の心筋細胞内で核酸配列を発現するために適合された遺伝子療法ベクターに向けられている。核酸配列は、例えば、PKP2 タンパク質をコードする第1の配列およびプロモーターを含む第2の配列を含む。一部の実施形態において、遺伝子療法ベクターはウイルスベクターを含む。一部の実施形態において、ウイルスベクターは、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一つまたは複数を含む。一部の実施形態において、ウイルスベクターはAAV6またはAAV9を含む。

30

【0011】

一部の実施形態において、プロモーターはTNNT2を含む。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

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。

【0013】

50

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 $\pm 10\%$ を含み、その結果、「約10」は9~11を含む。

【0014】

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て使用され、同時におよび/または逐次的に投与され得る。

10

20

【0015】

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。

【0016】

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關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。

30

【0017】

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。

【0018】

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。

40

【0019】

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

50

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。

【0020】

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；他のパルポ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。

10

【0021】

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。

20

30

【0022】

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、特にヒト（但し非ヒトを包含し得る）を指す。

【0023】

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。

【0024】

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。

40

【0025】

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。

【0026】

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态、例えば心臓疾患を指す。

【0027】

50

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。

10

【0028】

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。

【0029】

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。

20

【0030】

詳細な説明

不整脈源性右心室心筋症（ARVC）は、主要な心筋障害であり、若年個体における突然心臓死（SCD）の主因である。それは、心筋の変性および心筋の線維脂肪性の置換えにより特徴付けられ、これらは右心室および/または左心室中に存在して、進行性の心不全に最終的に繋がり得る。臨床的な心臓表現型は、典型的な心電図異常の存在、心室性不整脈の負荷の増加、および心臓磁気共鳴イメージングにおける大規模な心筋瘢痕化により特徴付けられる。

30

【0031】

ARVCは、症例の約50%において家族性であり、通常、常染色体優性の形質として遺伝する。コーカサス人種子孫の患者の約30%は、PKP2遺伝子における優性突然変異を有する。突然変異の大部分は、ハプロ不全を結果としてもたらす、挿入-欠失、ナンセンス、またはスプライス部位突然変異の結果としてもたらされる異常なまたは切断されたタンパク質を結果としてもたらす。

【0032】

ARVCは、心筋細胞の間の機械的な結合を提供する高密度電子の構造物であるデスモソームの疾患と考えられる。PKP2は、デスモソームタンパク質複合体の部分を形成し、ARVCに繋がる突然変異が同定されている、いくつかの遺伝子のうちの1つである。ハプロ不全を通じたPKP2タンパク質の欠如はデスモソームタンパク質複合体を不安定化させ、機械的なおよびシグナル伝達の帰結を伴う。

40

【0033】

機械的な成分は、いくつかの細胞外マトリックス遺伝子、例えば異なるコラーゲンの下方調節ならびに原線維形成性コラーゲン、フィブロネクチン、および他の線維化促進マーカー、例えばTIMP1の強い上方調節を伴う、機械的応力条件下でのPKP2タンパク質の欠如により引き起こされる異常な遺伝子発現パターンにより*in vitro*におい

50

て強調される。前臨床的および臨床的状況において、これは、PKP2 - マウスモデルにおける運動によるARVCの増悪およびヒト、例えばアスリートにおける表現型に対する運動の有害効果により反映される。シグナル伝達のレベルにおいて、プラコフィリンの欠如は核へのプラコグロビンの移行を引き起こし、これはカノニカルなWnt/b-カテニンシグナル伝達の低減ならびに線維形成および脂肪形成遺伝子の発現の増加に繋がる。

【0034】

PKP2の2つの主な形態としては、PKP2アイソフォーム2a(配列番号2)およびPKP2アイソフォーム2b(配列番号4)が挙げられる。PKP2アイソフォーム2aのためのPKP2遺伝子のタンパク質コーディング部分は2764bp cDNA配列(GenBank:BC126199.1;配列番号1)に含有され、これは本発明によってAAV中にベクター化され得る。本明細書において使用される場合、「PKP2」または「PKP2タンパク質」は、他に記載されなければ、または文脈から暗示されなければ、PKP2アイソフォーム2aおよびPKP2アイソフォーム2bを含めて、PKP2のアイソフォームを包含すると解釈されるべきである。

10

【0035】

ある特定の実施形態は、AAV9-TNNT2-PKP2媒介性遺伝子移入を介して正常なアレルを置換することによりPKP2タンパク質のハプロ不全を矯正し得る。ある特定の実施形態において、本発明の組成物および方法は、例えば、(1)PKP2タンパク質を正確にデスモソームに局在化させること；および(2)PKP2突然変異型ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞(iPSC-CM)においてハプロ不全を矯正し、結果的にデスモソームタンパク質複合体を矯正することが可能であり得る。ある特定の実施形態はまた、トランスで2つの病原性突然変異を有するiPSC-CMにおいて完全なまたは完全に近いPKP2欠損を結果としてもたらすことを想定する。心筋細胞へのPKP2ポリヌクレオチドの送達を試験するための非限定的な実例的な実施形態は、(1)TNNT2プロモーターを使用してAAV9および/またはAAV6中にPKP2をベクター化すること；PKP2突然変異(1つの突然変異またはトランスの2つの突然変異のいずれか)を有するiPSC-CMを作出すること；in vitroで2D PKP2突然変異型心筋細胞培養物(1つまたは2つの突然変異を有する)にAAV6-PKP2またはAAV9-PKP2を形質導入し、デスモソーム中への細胞内局在性を試験すること；細胞サイズ、収縮性、およびトランスクリプトーム分析を含む分子的小および生理学的データを試験することを含む。

20

30

【0036】

本明細書における多数の実施形態はPKP2タンパク質に関して記載されるが、追加のタンパク質(例えば、サルコメアタンパク質)の発現が想定されることが理解されるべきである。PKP2に加えて例示的なタンパク質は、非限定的に、SERCA2、MYBPC3、MYH7、MYL3、MYL2、ACTC1、TPM1、TNNT2、TNNI3、TTN、FHL1、ALPK3、ジストロフィン、FKRP、これらのバリエーション、またはこれらの組合せのうちの一つまたは複数を含んでもよい。使用される一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エーションであってもよく、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、「機能的なバリエーション」という用語は、タンパク質のバリエーションが、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エーションは、例えば、一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。

40

50

【0037】

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。

10

【0038】

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エーションと考えられる。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、タンパク質のバリエーションはまた、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。

20

【0039】

最後に、心臓サルコメアタンパク質（例えば、PKP2）のバリエーションはまた、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、例えばプロセッ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。

30

【0040】

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。

【0041】

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、Plasmid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。

40

【0042】

50

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、または組み込みベクター、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。

【0043】

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、これらのパリエーション、およびこれらの組合せに由来することができる。

【0044】

「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。

【0045】

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 $10^9 \sim 10^{11}$ 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み込みを要求しない。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こ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。

【0046】

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。

【0047】

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、ピ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み込みのために要求される。

【 0 0 4 8 】

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。ピリオンを製造するために、g a g、p o l、および/またはe n v 遺伝子を含有するがL T R 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L T R およびパッケージング配列と共にc D N A 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R N A 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。

10

【 0 0 4 9 】

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L T R、t R N A 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D N A への部位特異的組込みのために構築することができる。

20

【 0 0 5 0 】

単純ヘルペスウイルス（H S V）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H S V の能力は、潜伏の間に活性のプロモーターの存在と共に、H S V を魅力的なベクターとしている。大きな注目はH S V 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。

30

【 0 0 5 1 】

H S V 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。H S V 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。

【 0 0 5 2 】

H S V 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（M O I）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。H S V の非病原性バリエーションが開発されており、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。

40

【 0 0 5 3 】

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g a g、p o l、およびe n v 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（H I V - 1、H I V - 2）および類人猿免疫不全ウイルス（S I V）が挙げら

50

れる。倍加によりH I V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。

【0054】

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。

【0055】

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186 kbの直鎖状の二本鎖DNAゲノムを含有する。約10.5 kb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、ボ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。

【0056】

少なくとも25 kb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。

【0057】

パポウイルス、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は膀胱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FII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。

【0058】

AAVは、デPENDウイルス属に属するパルポウイルスである。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。

【0059】

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、組み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

10

20

30

40

50

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。

【0060】

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。

10

【0061】

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むプラスミドおよび/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む発現プラスミド、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む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む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。

20

【0062】

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。

30

【0063】

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一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。

40

50

【0064】

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。

【0065】

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エーション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。

【0066】

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エーション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。

【0067】

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。

【0068】

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。

10

【0069】

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。

20

【0070】

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2 ν 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Ca²⁺-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。

30

【0071】

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。

40

【0072】

50

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。

【0073】

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。

10

【0074】

ある特定の実施形態において、遺伝子療法ベクターは、静脈内送達、動脈内送達、または腹腔内送達を含めて、いくつかの異なる方法を通じて対象に形質導入されてもよい。一部の実施形態において、遺伝子療法ベクターは、例えば、冠内投与により、心臓組織に直接的に投与されてもよい。一部の実施形態において、心筋の組織形質導入は、カテーテル媒介性心筋内送達により達成されてもよく、該送達は、形質導入増強担体に連結されたまたは連結されていないベクターフリーcDNAを心筋に移入するために使用されてもよい。

20

【0075】

ある特定の実施形態において、薬物は、治療的に有効な遺伝子用量を含む。治療的に有効な遺伝子用量は、患者に対して毒性となることなく、患者において特定の心臓状態を予防または治療することができるものである。

【0076】

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Ca²⁺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。

30

【実施例】

【0077】

実例的な予言的な例

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。

40

【0078】

*in vitro*系の実例的な例において、PKP2アイソフォーム2a cDNA配列(2764bp cDNA、GenBank: BC126199.1; 配列番号1)が、AAV2内部末端反復(ITR)を使用して心臓特異的TNNT2プロモーター(配列番号5)下にクローニングされる: ITR-TNNT2-PKP2cDNA-ITR。別の実例的な例として、PKP2をコードする核酸配列は、PKP2アイソフォーム2b(配列番号4)をコードするPKP2遺伝子のコドン最適化バージョン(配列番号3)であってもよい。構築物は、AAV、例えばAAV6およびAAV9中にベクター化されても

50

よい。抗 F l a g によるトランスフェクション後にタンパク質を同定し、かつそれを内因性タンパク質から区別できるように、F l a g を付加した構築物 (F l a g - P K P 2) が調製されてもよい。配列番号 6 は、例えば、P K P 2 アイソフォーム 2 b を発現するための、例示的な構築物配列である。i n v i t r o での P K P 2 の発現は、P K P 2 一次抗体を使用して免疫蛍光顕微鏡法で観察されてもよく、それにより細胞膜および密なブラークにおける P K P 2 の局在性が明らかにされる。

【 0 0 7 9 】

A A V 6 - T N N T 2 - P K P 2 は、正常な心筋細胞；(A R V C 患者からの) 1 つのヘテロ接合 P K P 2 突然変異を有する心筋細胞；およびトランスで 2 つの P K P 2 突然変異を有する心筋細胞を含む 2 D 細胞培養物中の i P S C - C M へのトランスフェクトのために使用される。

10

【 0 0 8 0 】

成功裏のトランスフェクションならびに P K P 2 R N A およびタンパク質レベルの特徴付けの後に、正常 C M と P K P 2 欠損および P K P 2 矯正 C M との比較が、細胞サイズならびに P K P 2 欠損において発現が変更されることが既知の遺伝子 (M Y L 2 、 S C N 5 A (そのタンパク質生成物は N a V 1 . 5 である) 、 G J A 1 、 および T T N) の矯正を含めて、多数のリードアウトについて行われる。

【 0 0 8 1 】

類似した方法論は、ヒト 3 D 培養モデルにおける e x v i v o 処理の他に、P K P 2 突然変異マウスモデルにおける i n v i v o 処理のために適合され得ることが想定される。

20

【 0 0 8 2 】

(F l a g -) P K P 2 タンパク質が発現される場合、それは正確な細胞内局在性 (デスモソーム) となり、またトランスフェクションは P K P 2 ハプロ不全のまたは完全に欠損した細胞を R N A レベルおよびタンパク質レベルで矯正すると考えられる。完全に P K P 2 を欠損した細胞において、P K P 2 トランスフェクションはまた、デスモソーム中のデスモソームタンパク質複合体の回復、特に、P K P 2 が減少された場合に低減されるプラコグロビンの回復が可能であると考えられる。

【 0 0 8 3 】

P K P 2 アイソフォーム 2 a 、 P K P 2 アイソフォーム 2 b 、または両方を発現するための遺伝子療法ベクターは、ヒト対象の心臓組織に送達されてもよいことがさらに想定される。例えば、遺伝子療法ベクターは、1 つまたは複数の遺伝子療法ベクターおよび薬学的に許容される賦形剤または担体を含む治療用製剤に製剤化されてもよい。製剤は、静脈内送達、動脈内送達、または腹腔内送達を含めて、いくつかの異なる方法を通じてヒト対象に導入されてもよい。遺伝子療法ベクターは、例えば、冠内投与により、心臓組織に直接的に投与されてもよい。遺伝子療法ベクターはまた、カテーテル媒介性心筋内送達を介して送達されてもよい。

30

【 0 0 8 4 】

遺伝子療法ベクターは、例えば、対象の全身循環から対象の冠動脈循環を分離して、閉じた回路を形成すること、および流体 (例えば、遺伝子療法ベクターを含む製剤) を対象の分離された冠動脈循環に灌流させることにより、対象の心臓組織に局所的に投与されてもよいことがさらに想定される。灌流は、対象の停止していない鼓動している心臓において行われてもよい。閉じた回路は、例えば、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。そのような局所送達は、2020年8月26日に出版された国際出願第 P C T / I B 2 0 2 0 / 0 0 0 6 9 2 号 (その開示は参照により全体が本明細書に組み込まれる) に関して記載されるように行われてもよい。

40

【 0 0 8 5 】

50

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。

10

【0086】

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。

20

【0087】

以下の配列番号1は、PKP2アイソフォーム2aのタンパク質コーディング配列(GenBank: BC126199.1)を含むmRNA配列のcDNAコピーである：

【0088】

30

40

50

【化 1 - 1】

GAGTCCAGAGGCAGGCGAGCAGCTCGGTGCGCCCCACCGGCCCCATGGCAGCCCC
GGCGCCCCAGCTGAGTACGGCTACATCCGGACCGTCTGGGCCAGCAGATCCTGGG
ACAACTGGACAGCTCCAGCCTGGCGCTGCCCTCCGAGGCCAAGCTGAAGCTGGCGG
GGAGCAGCGGCCGCGGCCAGACAGTCAAGAGCCTGCGGATCCAGGAGCAGGT
GCAGCAGACCCTCGCCCGGAAGGGCCGAGCTCCGTGGGCAACGGAAATCTTCACC
GAACCAGCAGTGTTCCTGAGTATGTCTACAACCTACACTTGGTTGAAAATGATTTTG
TTGGAGGCCGTTCCCTGTTCTAAAACCTATGACATGCTAAAGGCTGGCACAACCTG
CCACTTATGAAGGTCGCTGGGGAAGAGGAACAGCACAGTACAGCTCCCAGAAGTCC
GTGGAAGAAAGGTCCTTGAGGCATCCTCTGAGGAGACTGGAGATTTCTCCTGACAG
CAGCCCGGAGAGGGCTCACTACACGCACAGCGATTACCAGTACAGCCAGAGAAGCC
AGGCTGGGCACACCCTGCACCACCAAGAAAGCAGGCGGGCCGCCCTCCTAGTGCCA
CCGAGATATGCTCGTTCGAGATCGTGGGGGTGAGCCGTGCTGGCACCACAAGCAG
GCAGCGCCACTTTGACACATAACCACAGACAGTACCAGCATGGCTCTGTTAGCGACA
CCGTTTTTGACAGCATCCCTGCCAACCCGGCCCTGCTCACGTACCCAGGCCAGGGA
CCAGCCGCAGCATGGGCAACCTCTTGAGAGAAGGAGAACTACCTGACGGCAGGGCTC
ACTGTCGGGCAGGTCAGGCCGCTGGTGCCCTGCAGCCCGTCACTCAGAACAGGGC
TTCCAGGTCCTCCTGGCATCAGAGCTCCTCCACAGCACCCGCACGCTGAGGGAAGC
TGGGCCCAGTGTGCGCGTGGATTCCAGCGGGAGGAGAGCGCACTTGACTGTGCGCC
AGGCGGCCGCAGGGGGAAGTGGGAATCTGCTCACTGAGAGAAGCACTTTCCTGAC
TCCCAGCTGGGGAATGCAGACATGGAGATGACTCTGGAGCGAGCAGTGAGTATGCT
CGAGGCAGACCACATGCTGCCATCCAGGATTTCTGCTGCAGCTACTTTCATACAGCA
CGAGTGCTTCCAGAAATCTGAAGCTCGGAAGAGGGTTAACCAGCTTCGTGGCATCCT
CAAGCTTCTGCAGCTCCTAAAAGTTCAGAATGAAGACGTTTCAGCGAGCTGTGTGTGG
GGCCTTGAGAACTTAGTATTTGAAGACAATGACAACAAATTGGAGGTGGCTGAAC
TAAATGGGGTACCTCGGCTGCTCCAGGTGCTGAAGCAAACCAGAGACTTGGAGACT
AAAAAACAATAACAGGTTTGCTGTGGAATTTGTATCTAATGACAAACTCAAGAA
TCTCATGATAACAGAAGCATTGCTTACGCTGACGGAGAATATCATCATCCCCTTTTC
TGGGTGGCCTGAAGGAGACTACCCAAAAGCAAATGGTTTGCTCGATTTTGACATATT
CTACAACGTCCTGGATGCCTAAGAAACATGAGTTCTGCTGGCGCTGATGGGAGAA
AAGCGATGAGAAGATGTGACGGACTCATTGACTCACTGGTCCATTATGTCAGAGGA
ACCATTGCAGATTACCAGCCAGATGACAAGGCCACGGAGAATTGTGTGTGCATTCTT
CATAACCTCTCCTACCAGCTGGAGGCAGAGCTCCCAGAGAAATATTCCCAGAATATC
TATATTCAAACCGGAATATCCAGACTGACAACAACAAAAGTATTGGATGTTTTGGC

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

50

【化 1 - 2】

AGTCGAAGCAGGAAAGTAAAAGAGCAATACCAGGACGTGCCGATGCCGGAGGAAA
AGAGCAACCCCAAGGGCGTGGAGTGGCTGTGGCATTCCATTGTTATAAGGATGTAT
CTGTCCTTGATCGCCAAAAGTGTCCGCAACTACACACAAGAAGCATCCTTAGGAGCT
CTGCAGAACCTCACGGCCGGAAGTGGACCAATGCCGACATCAGTGGCTCAGACAGT
TGTCCAGAAGGAAAGTGGCCTGCAGCACACCCGAAAGATGCTGCATGTTGGTGACC
CAAGTGTGAAAAAGACAGCCATCTCGCTGCTGAGGAATCTGTCCCGGAATCTTTCTC
TGCAGAATGAAATTGCCAAAGAACTCTCCCTGATTTGGTTTCCATCATTCTGACA 10
CAGTCCCGAGTACTGACCTTCTCATTGAAACTACAGCCTCTGCCTGTTACACATTGA
ACAACATAATCCAAAACAGTTACCAGAATGCACGCGACCTTCTAAACACCGGGGGC
ATCCAGAAAATTATGGCCATTAGTGCAGGCGATGCCTATGCCTCCAACAAAGCAAG
TAAAGCTGCTTCCGTCCTTCTGTATTCTCTGTGGGCACACACGGAAGTGCATCATGC
CTACAAGAAGGCTCAGTTTAAGAAGACAGATTTTGTCAACAGCCGGACTGCCAAAG
CCTACCACTCCCTTAAAGACTGAGGAAAATGACAAAGTATTCTCGGCTGCAAAAAT 20
CCCCAAAGGAAAACACCTATTTTTCTACTACCCAGCCCAAGAAACCTCAAAAGCAT
GCCTTGTTTCTATCCTTCTCTATTTCCGTGGTCCCCTGAATCCAGAAAACAAATAGAA
CATAATTTTATGAGTCTTCCAGAAGACCTTTGCAAGTTTGCCACCAGTAGATACCGG
CC

【 0 0 9 0 】

以下の配列番号 2 は、PKP2 アイソフォーム 2 a のアミノ酸配列である：

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

【化 2】

MAAPGAPAEYGYIRTVLGQQILGQLDSSSLALPSEAKLKLKLAGSSGRGGQTVKSLRIQEQ
VQQLARKGRSSVGNLHRTSSVPEYVYNLHLVENDFVGGRRSPVPKTYDMLKAGTT
ATYEGRWGRGTAQYSSQKSVEERSLRHPLRRLEISPDSSPERAHYTHSDYQYSQRSQAG
HTLHHQESRRAALLVPPRYARSEIVGVSRAAGTTSRQRHFDYHRQYQHGSVSDTVFDSI
PANPALLTYPRPGTSRSMGNLLEKENYLTAGLTVGQVRPLVPLQPVTQNRASRSSHQ
SFHSTRTLREAGPSVAVDSSGRRRAHLTVGQAAAGGSGNLLTERSTFTDSQLGNADMEM
TLERAVSMLEADHMLPSRISAAATFIQHECFQKSEARKRVNQLRGILKLLQLLKVNED
VQRAVCGALRNLVFEDNDNKLEVAELNGVPRLLQVLKQTRDLETKKQITGLLWNLSSN
DKLKNLMITEALLTLTENIIIPFSGWPEGDYPKANGLLDFDIFYNVTGCLRNMSAGADG
RKAMRRCDGLIDSLVHYVRGTIADYQPDDKATENCVCILHNLSYQLEAELPEKYSQNIY
IQNRNIQTDNNKSIGCFGSRSRKVKEQYQDVPMPEEKSNPKGVEWLWHSIVIRMYLSLIA
KSVRNYTQEASLGALQNLTAGSGPMPTSAQTVVQKESGLQHTRKMLHVGDPSVKKT
AISLLRNLSRNLSLQNEIAKETLPDLVSIIPDTPSTDLLIETTASACYTLNIIQNSYQ
NAR
DLLNTGGIQKIMASAGDAYASNKASKAASVLLYSLWAHTELHHAYKKAQFKKTDFVN
SRTAKAYHSLKD

10

20

【0092】

以下の配列番号3は、PKP2アイソフォーム2bをコードするコドン最適化cDNA配列である：

【0093】

30

40

50

【化 3 - 1】

ATGGCCGCCCCGGAGCACCTGCCGAGTATGGCTACATTCGCACCGTCCTGGGACA
 GCAGATTCTGGGACAGCTGGATTCATCAAGCCTGGCCCTGCCTTCTGAGGCCAAGCT
 GAAGCTGGCAGGAAGCTCCGGAAGGGGAGGACAGACCGTGAAGAGCCTGAGAATC
 CAGGAGCAGGTGCAGCAGACACTGGCCCCGGAAGGGCAGATCTAGCGTGGGCAACG
 GCAATCTGCACAGGACCTCCTCTGTGCCAGAGTACGTGTATAACCTGCACCTGGTGG
 AGAATGACTTCGTGGGAGGCCGCAGCCCAGTGCCAAAGACATACGATATGCTGAAG
 GCCGGCACACAGCAACCTATGAGGGCAGGTGGGGAAGAGGAACAGCACAGTACA
 GCTCCCAGAAGTCTGTGGAGGAGCGGAGCCTGAGACACCCTCTGCGGAGACTGGAG
 ATCAGCCCAGACTCTAGCCCTGAGAGGGCACACTATACCCACTCCGATTACCAGTAT
 TCTCAGAGAAGCCAGGCAGGACACACACTGCACCACCAGGAGAGCAGGAGGGCCG
 CCCTGCTGGTGCCACCTAGATACGCCCGCTCTGAGATCGTGGGCGTGAGCAGGGCA
 GGAACCACATCCCAGGACAGACTTCGACACCTACCACAGACAGTATCAGCACGG
 CTCTGTGAGCGACACAGTGTGGATTCCATCCCTGCCAACCCAGCCCTGCTGACCTA
 TCCTCGGCCAGGCACATCCAGATCTATGGGCAACCTGCTGGAGAAGGAGAATTACC
 TGACCGCAGGCCTGACAGTGGGACAGGTGAGGCCCTGGTGCCTCTGCAGCCAGTG
 ACCAGAATCGGGCCAGCAGATCCTCTTGGCACCAGAGCTCCTTCCACTCTACCAG
 AACTGAGGGAGGCAGGACCAAGCGTGGCAGTGGACTCTAGCGGCCGGAGAGCCC
 ACCTGACCGTGGGACAGGCAGCAGCAGGAGGATCCGGCAACCTGCTGACAGAGAG
 GTCCACCTTTACAGACTCTCAGCTGGGCAATGCCGATATGGAGATGACCCTGGAGA
 GGGCCGTGAGCATGCTGGAGGCAGACCACATGCTGCCATCCAGGATCTCTGCCGCA
 GCCACATTCATCCAGCACGAGTGCTTTCAGAAGTCCGAGGCAAGGAAGAGGGTGAA
 CCAGCTGAGGGGCATCCTGAAGCTGCTGCAGCTGCTGAAGGTGCAGAACGAGGATG
 TGCAGAGGGCCGTGTGCGGCGCCCTGAGGAATCTGGTGTTCGAGGACAACGATAAT
 AAGCTGGAGGTGGCAGAGCTGAACGGAGTGCCAAGGCTGCTGCAGGTGCTGAAGCA
 GACCCGCGACCTGGAGACAAAGAAGCAGATCACCGATCACACAGTGAACCTGCGGA
 GCAGAAATGGATGGCCTGGAGCAGTGGCACACGCATGCAATCCAAGCACCCCTGGGA
 GGACAGGGAGGAAGGATCACAAGATCCGGCGTGCGGGACCAGCCTGATCAGCACG
 GCCTGCTGTGGAACCTGTCCTTAATGACAAGCTGAAGAACCTGATGATCACCGAG
 GCCCTGCTGACCCTGACAGAGAATATCATCATCCCTTTTAGCGGCTGGCCAGAGGGC
 GATTATCCCAAGGCCAACGGCCTGCTGGACTTCGATATCTTTTACAACGTGACCGGC
 TGCCTGAGGAATATGAGCTCCGCCGGAGCAGACGGAAGAAAGGCCATGAGGCGCTG
 TGACGGCCTGATCGATTCCCTGGTGCACACTACGTGCGGGGCACCATCGCCGATTATCA
 GCCCCAGATAAGGCCACAGAGAACTGCGTGTGCATCCTGCACAATCTGTCTTATCA

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

50

【化 3 - 2】

GCTGGAGGCCGAGCTGCCTGAGAAGTACAGCCAGAACATCTATATCCAGAACAGAA
 ATATCCAGACCGACAACAATAAGAGCATCGGCTGCTTCGGCAGCAGGTCCCAGCAAG
 GTGAAGGAGCAGTACCAGGATGTGCCATGCCTGAGGAGAAGTCCAATCCCAAGGG
 CGTGGAGTGGCTGTGGCACTCTATCGTGATCAGGATGTATCTGAGCCTGATCGCCAA
 GTCCGTGCGCAACTACACCCAGGAGGCATCTCTGGGCGCCCTGCAGAATCTGACAG
 CAGGATCTGGACCAATGCCACCAGCGTGGCCAGACAGTGGTGCAGAAGGAGTCC
 GGCCTGCAGCACACCCGGAAGATGCTGCACGTGGGCGACCCATCCGTGAAGAAGAC
 AGCCATCTCTGCTGAGGAACCTGAGCCGCAATCTGTCCCTGCAGAACGAGATCGC
 CAAGGAGACACTGCCCCGATCTGGTGAGCATCATCCAGACACCGTGCCCTCCACAG
 ATCTGCTGATCGAGACAACAGCCTCCGCCTGTTACACCCTGAACAATATCATCCAGA
 ACTCTTATCAGAATGCCCGGGACCTGCTGAACACAGGCGGCATCCAGAAGATCATG
 GCAATCTCCGCCGGCGATGCATACGCATCTAATAAGGCCAGCAAGGCCGCCTCCGT
 GCTGCTGTATTCTCTGTGGGCACACCCGAGCTGCACCACGCATACAAGAAGGCC
 AGTTTAAGAAGACTGATTTTCGTGAATAGCAGAACAGCCAAAGCCTACCACAGCCTG
 AAGGAC

10

20

【0095】

以下の配列番号4は、PKP2アイソフォーム2bのアミノ酸配列である：

【0096】

【化4】

MAAPGAPAEYGYIRTVLGQQILGQLDSSSLALPSEAKLKLKLAGSSGRGGQTVKSLRIQEQ
 VQQLARKGRSSVGNLHRTSSVPEYVYNLHLVENDFVGGRRSPVPKTYDMLKAGTT
 ATYEGRWGRGTAQYSSQKSVEERSLRHPLRRLEISPDSSPERAHYTHSDYQYSQRSQAG
 HTLHHQESRRAALLVPPRYARSEIVGVSRAAGTTSRQRHFDYHRQYQHGSVSDTVFDSI
 PANPALLTYPRPGTSRSMGNLLEKENYLTAGLTVGQVRPLVPLQPVTQNRASRSSWHQS
 SFHSTRTLREAGPSVAVDSSGRRRAHLTVGQAAAGGSGNLLTERSTFTDSQLGNADMEM
 TLERAVSMLEADHMLPSRISAAATFIQHECFQKSEARKRVNQLRGILKLLQLLKVNED
 VQRAVCGALRNLFEDNDNKLEVAELNGVPRLLQVLKQTRDLETKKQITDHTVNLRSR
 NGWPGAVAHACNPSTLGGQGGRITRSGVRDQPDQHGLLWNLSSNDKLNLMITEALLT
 LTENIIPFSGWPEGDYPKANGLLDFDIFYNVTGCLRNMSSAGADGRKAMRRCGLIDSL
 VHIVRGTIADYQPDDKATENCVCILHNLSYQLEAELPEKYSQNIYIQNRNIQTDNNKSIG
 CFGSRSRKVKEQYQDVPMPEEKSNPKGVEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNYTQEASLG
 ALQNLTAGSGPMPTSVAAQTVVQKESGLQHTRKMLHVGDPVSKKTAISLLRNLSRNLSL
 QNEIAKETLPDLVSIIPDTPSTDLLETTASACYTLNIIQNSYQNARDLLNTGGIQKIMA
 ISAGDAYASNKASKAASVLLYSLWAHTELHHAYKKAQFKKTDVNSRTAKAYHSLKD

30

40

【0097】

50

以下の配列番号 5 は、T N N T 2 プロモーターをコードする核酸配列である：

【 0 0 9 8 】

【 化 5 】

GTCATGGAGAAGACCCACCTTGCAGATGTCCTCACTGGGGCTGGCAGAGCCGGCAA
 CCTGCCTAAGGCTGCTCAGTCCATTAGGAGCCAGTAGCCTGGAAGATGTCTTTACCC
 CCAGCATCAGTTCAAGTGGAGCAGCACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATTC
 TGGTGCTGAGACTTATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTGCTC
 CCAGCTGGCCCTCCCAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTCTCAAGA
 GGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATA
 GCTTATCTGAGCAGCTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGTTCC
 TGTAGCCTTGTCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCCACCACCACCG
 CCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTCGCACATTCCCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTC
 ACCAGGCCCCAGCCCACATGCCTGCTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTGCCTCACCCAG
 TCCCCGCTGAGACTGAGCAGACGCCTCCA

10

【 0 0 9 9 】

20

以下の配列番号 6 は、心筋細胞中で P K P 2 アイソフォーム 2 b を発現するための例示的なベクター構築物である：

【 0 1 0 0 】

30

40

50

【化 6 - 1】

GGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAA
ACTGGGCTTGTGCGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCT
TACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGC
TCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGGTACCGGTGCGCCAC
CATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGG
ATGACGATGACAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGGCCGCCCGGAGCACCT
GCCGAGTATGGCTACATTCGCACCGTCCTGGGACAGCAGATTCTGGGACAGCTGGA
TTCATCAAGCCTGGCCCTGCCTTCTGAGGCCAAGCTGAAGCTGGCAGGAAGCTCCGG
AAGGGGAGGACAGACCGTGAAGAGCCTGAGAATCCAGGAGCAGGTGCAGCAGACA
CTGGCCCGGAAGGGCAGATCTAGCGTGGGCAACGGCAATCTGCACAGGACCTCCTC
TGTGCCAGAGTACGTGTATAACCTGCACCTGGTGGAGAATGACTTCGTGGGAGGCC
GCAGCCCAGTGCCAAAGACATACGATATGCTGAAGGCCGGCACCACAGCAACCTAT
GAGGGCAGGTGGGGAAGAGGAACAGCACAGTACAGCTCCCAGAAGTCTGTGGAGG
AGCGGAGCCTGAGACACCCTCTGCGGAGACTGGAGATCAGCCCAGACTCTAGCCCT
GAGAGGGCACACTATACCCACTCCGATTACCAGTATTCTCAGAGAAGCCAGGCAGG
ACACACACTGCACCACCAGGAGAGCAGGAGGGCCGCCCTGCTGGTGCCACCTAGAT
ACGCCCCGCTCTGAGATCGTGGGCGTGAGCAGGGCAGGAACCACATCCCGGCAGAGA
CACTTCGACACCTACCACAGACAGTATCAGCACGGCTCTGTGAGCGACACAGTGTTC
GATTCCATCCCTGCCAACCCAGCCCTGCTGACCTATCCTCGGCCAGGCACATCCAGA
TCTATGGGCAACCTGCTGGAGAAGGAGAATTACCTGACCGCAGGCCTGACAGTGGG
ACAGGTGAGGCCCTGGTGCCTCTGCAGCCAGTGACCCAGAATCGGGCCAGCAGAT
CCTCTTGGCACCAGAGCTCCTTCCACTCTACCAGGACACTGAGGGAGGCAGGACCA
AGCGTGGCAGTGGACTCTAGCGGCCGGAGAGCCACCTGACCGTGGGACAGGCAGC
AGCAGGAGGATCCGGCAACCTGCTGACAGAGAGGTCCACCTTTACAGACTCTCAGC
TGGGCAATGCCGATATGGAGATGACCCTGGAGAGGGCCGTGAGCATGCTGGAGGCA
GACCACATGCTGCCATCCAGGATCTCTGCCGAGCCACATTCATCCAGCACGAGTGC
TTTCAGAAGTCCGAGGCAAGGAAGAGGGTGAACCAGCTGAGGGGCATCCTGAAGCT
GCTGCAGCTGCTGAAGGTGCAGAACGAGGATGTGCAGAGGGCCGTGTGCGGCGCCC
TGAGGAATCTGGTGTTCGAGGACAACGATAATAAGCTGGAGGTGGCAGAGCTGAAC
GGAGTGCCAAGGCTGCTGCAGGTGCTGAAGCAGACCCGCGACCTGGAGACAAAGA
AGCAGATCACCGATCACACAGTGAACCTGCGGAGCAGAAATGGATGGCCTGGAGCA
GTGGCACACGCATGCAATCCAAGCACCCCTGGGAGGACAGGGAGGAAGGATCACAA
GATCCGGCGTGCGGGACCAGCCTGATCAGCACGGCCTGCTGTGGAACCTGTCCTCTA

10

20

30

40

【 0 1 0 1】

50

【化 6 - 2】

ATGACAAGCTGAAGAACCTGATGATCACCGAGGCCCTGCTGACCCTGACAGAGAAT
 ATCATCATCCCTTTTAGCGGCTGGCCAGAGGGCGATTATCCCAAGGCCAACGGCCTG
 CTGGACTTCGATATCTTTTACAACGTGACCGGCTGCCTGAGGAATATGAGCTCCGCC
 GGAGCAGACGGAAGAAAGGCCATGAGGGCGCTGTGACGGCCTGATCGATTCCCTGGT
 GCACTACGTGCGGGGCACCATCGCCGATTATCAGCCCGACGATAAGGCCACAGAGA
 ACTGCGTGTGCATCCTGCACAATCTGTCTTATCAGCTGGAGGCCGAGCTGCCTGAGA
 AGTACAGCCAGAACATCTATATCCAGAACAGAAATATCCAGACCGACAACAATAAG
 AGCATCGGCTGCTTCGGCAGCAGGTCCCGCAAGGTGAAGGAGCAGTACCAGGATGT
 GCCCATGCCTGAGGAGAAGTCCAATCCCAAGGGCGTGGAGTGGCTGTGGCACTCTA
 TCGTGATCAGGATGTATCTGAGCCTGATCGCCAAGTCCGTGCGCAACTACACCCAGG
 AGGCATCTCTGGGCGCCCTGCAGAATCTGACAGCAGGATCTGGACCAATGCCACC
 AGCGTGGCCCAGACAGTGGTGCAGAAGGAGTCCGGCCTGCAGCACACCCGGAAGAT
 GCTGCACGTGGGCGACCCATCCGTGAAGAAGACAGCCATCTCTCTGCTGAGGAACC
 TGAGCCGCAATCTGTCCCTGCAGAACGAGATCGCCAAGGAGACTGCCCAGATCTG
 GTGAGCATCATCCCAGACACCGTGCCTCCACAGATCTGCTGATCGAGACAACAGC
 CTCCGCTGTTACACCCTGAACAATATCATCCAGAACTCTTATCAGAATGCCCGGGA
 CCTGCTGAACACAGGCGGCATCCAGAAGATCATGGCAATCTCCGCCGGCGATGCAT
 ACGCATCTAATAAGGCCAGCAAGGCCCGCTCCGTGCTGCTGTATTCTCTGTGGGCAC
 ACACCGAGCTGCACCACGCATACAAGAAGGCCAGTTTAAGAAGACTGATTTCTGTG
 AATAGCAGAACAGCCAAAGCCTACCACAGCCTGAAGGACCTCGAGGGATCTGGAGC
 AACAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGGCCTA
 AGCTTATGAAAACCTTCAACATCTCTCAGCAGGATCTGGAGCTGGTGGAGGTCGCCA
 CTGAGAAGATCACCATGCTCTATGAGGACAACAAGCACCATGTCGGGGCGGCCATC
 AGGACCAAGACTGGGGAGATCATCTCTGCTGTCCACATTGAAGCCTACATTGGCAG
 GGTCACTGTCTGTGCTGAAGCCATTGCCATTGGGTCTGCTGTGAGCAACGGGCAGAA
 GGACTTTGACACCATTGTGGCTGTCAGGCACCCCTACTCTGATGAGGTGGACAGATC
 CATCAGGGTGGTCAGCCCCTGTGGCATGTGTAGAGAGCTGATCTCTGACTATGCTCC
 TGACTGCTTTGTGCTCATTGAGATGAATGGCAAGCTGGTCAAACCACCATTGAGGA
 ACTCATCCCCCTCAAGTACACCAGGAACTAATAAGCGGCCGCTTCCCTTTAGTGAGG
 GTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATAATTGATGAGTTTGGACAAACCACAA
 CTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATT
 TGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTAT
 GTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACA

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

50

【化 6 - 3】

AATGTGGTAAAATCCGATAAGGGACTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGG
 CGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT
 GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCGGGCT
 TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
 GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAATTC
 CAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCCGTTGCAATGG
 CTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTA
 CTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGC
 GTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGG
 ATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCG
 CTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACG
 CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
 GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTTCGTTTTCTTCCCTTCCTTCTCG
 CCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC
 GATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCAC
 GTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT
 TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT
 ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
 GATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTCTACAATTTAAAT
 ATTTGCTTATAACAATCTTCTGTTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACAT
 ATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCTTGTGTTGCTCCAGAC
 TCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTC
 CGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGT
 CTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTT
 AAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTTATCCTTGCCTTGAATAAAGGCTTCTCCC
 GCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCT
 GAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGT
 TGGAATCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCA
 TATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGAC
 ACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
 ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCAT
 CACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAAT
 GTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC

10

20

30

40

【 0 1 0 3 】

50

【化 6 - 4】

GGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
 AATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
 CATTTCCTGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCTCA
 CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAG
 AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCC
 GTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACT
 TGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
 GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAACGTCGGCCAACCTTACTTCTG
 ACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCA
 TGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACG
 AGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC
 GGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
 TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAG
 ATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGG
 ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA
 CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAAT
 TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAAC
 GTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
 GAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTAC
 CAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTG
 GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCC
 ACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
 CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
 AGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCC
 AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
 AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG
 GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
 TAGTCCTGTGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA
 GGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
 CTTTTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
 ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGC

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

50

【化 6 - 5】

GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC
 CCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
 CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCCTCAGTGAGCGAG
 CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTGTAGTTAAT
 GATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGATGTCATGGAGAAGA
 CCCACCTTGCAGATGTCCTCACTGGGGCTGGCAGAGCCGGCAACCTGCCTAAGGCTG
 CTCAGTCCATTAGGAGCCAGTAGCCTGGAAGATGTCTTTACCCCCAGCATCAGTTCA
 AGTGGAGCAGCACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGCTGAGACTT
 ATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTGCTCCCAGCTGGCCCTCC
 CAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTCTCAAGAGGGACAGCTGGTTT
 ATGTTGCATGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAG
 CTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCTTGTCCC
 TGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCACCCCCACCGCCATCCCCCTGCC
 CACCCGTCCCCTGTCGCACATTCCCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCAGGCCCCAGC
 CCACATGCCTGCTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTGCCTCACCCAGTCCCCGCTGAGACT
 GAGCAGACGCCTCCAGAGCTCGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGAC

10

20

【配列表】

202254914000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/86 C07K14/47 A61K48/00 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) C12N C07K A61K		
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, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANCISCO M. CRUZ ET AL: "Exercise Triggers ARVC Phenotype in Mice Expressing a Disease-Causing Mutated Version of Human Plakophilin-2", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 65, no. 14, April 2015 (2015-04), pages 1438-1450, XP055755865, NEW YORK, NY ISSN: 0735-1097, DOI: 10.1016/j.jacc.2015.01.045 figure 1	9-13,23
Y	----- WO 2019/060619 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 28 March 2019 (2019-03-28) claims 1-22; example 1 -----	6,19-22, 24
Y	----- WO 2019/060619 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 28 March 2019 (2019-03-28) claims 1-22; example 1 -----	1-5,7,8, 14-18
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 3 December 2020		Date of mailing of the international search report 14/12/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Deleu, Laurent

2

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

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/208998 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 15 November 2018 (2018-11-15) paragraph [0148] -----	1-8, 14-22,24
Y	KYLE CHAMBERLAIN ET AL: "Cardiac gene therapy with adeno-associated virus-based vectors", CURRENT OPINION IN CARDIOLOGY., vol. 32, no. 3, May 2017 (2017-05), pages 275-282, XP055755932, GB ISSN: 0268-4705, DOI: 10.1097/HCO.0000000000000386 page 2 - page 5; table 1 -----	1-8, 14-22,24
Y	WO 2017/083750 A1 (INTREXON CORP [US]) 18 May 2017 (2017-05-18) paragraph [0186]; figure 1 -----	15
X,P	WO 2019/207132 A1 (UNIV HEIDELBERG [DE]) 31 October 2019 (2019-10-31) page 11 - page 12; claims 1-31 -----	1-4,14

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2020/076290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019060619 A1	28-03-2019	AU 2018335401 A1	02-04-2020
		CA 3076227 A1	28-03-2019
		CN 111107880 A	05-05-2020
		EP 3684422 A1	29-07-2020
		JP 2020534314 A	26-11-2020
		US 2020215155 A1	09-07-2020
		WO 2019060619 A1	28-03-2019

WO 2018208998 A1	15-11-2018	AU 2018265022 A1	21-11-2019
		CA 3062595 A1	15-11-2018
		CN 110869498 A	06-03-2020
		EP 3622062 A1	18-03-2020
		JP 2020519269 A	02-07-2020
		US 2018334685 A1	22-11-2018
		WO 2018208998 A1	15-11-2018

WO 2017083750 A1	18-05-2017	AU 2016353342 A1	24-05-2018
		BR 112018009645 A2	13-11-2018
		CA 3004742 A1	18-05-2017
		CN 108713025 A	26-10-2018
		EP 3387010 A1	17-10-2018
		HK 1259137 A1	29-11-2019
		JP 2018536405 A	13-12-2018
		KR 20180069081 A	22-06-2018
		RU 2018117674 A	13-12-2019
		SG 11201803934Y A	28-06-2018
		US 2018360992 A1	20-12-2018
		WO 2017083750 A1	18-05-2017

WO 2019207132 A1	31-10-2019	AU 2019258830 A1	03-12-2020
		CA 3097375 A1	31-10-2019
		WO 2019207132 A1	31-10-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	9/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/06	
C 0 7 K	14/78 (2006.01)	C 0 7 K	14/78	Z N A
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	

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,N
E,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,K
E,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,N
G,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. T R I T O N

7 ユーシーエル ビジネス リミテッド内

(72)発明者 デュモンセオー, ジュリー

イギリス国 ダブリュー 1 ティー 4 ティーピー ロンドン ザ ネットワーク ビルディング トッテ
ナム コート ロード 97 ユーシーエル ビジネス リミテッド内

(72)発明者 エリオット, ペリー

イギリス国 ダブリュー 1 ティー 4 ティーピー ロンドン ザ ネットワーク ビルディング トッテ
ナム コート ロード 97 ユーシーエル ビジネス リミテッド内

(72)発明者 マリオット, ヴァージニー

イギリス国 ダブリュー 1 ティー 4 ティーピー ロンドン ザ ネットワーク ビルディング トッテ
ナム コート ロード 97 ユーシーエル ビジネス リミテッド内

F ターム (参考) 4B063 QA20 QQ08 QR32 QR33 QS38

4C084 AA13 BA01 BA08 BA22 CA18 DC50 MA65 MA66 NA13 NA14
ZA36

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA36

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA36

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 EA23 FA74