



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0084542
(43) 공개일자 2023년06월13일

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7015552
(22) 출원일자(국제) 2021년10월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년05월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/053908
(87) 국제공개번호 WO 2022/076648
국제공개일자 2022년04월14일
(30) 우선권주장
63/089,951 2020년10월09일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
테나야 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코, 스위트 500, 171 오이스터 포인트 블러바드</p> <p>(72) 발명자
양 지홍 제인
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오이스터 포인트 블러바드 171 스위트 500
호 재클린
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오이스터 포인트 블러바드 171 스위트 500
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김진희, 김태홍</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

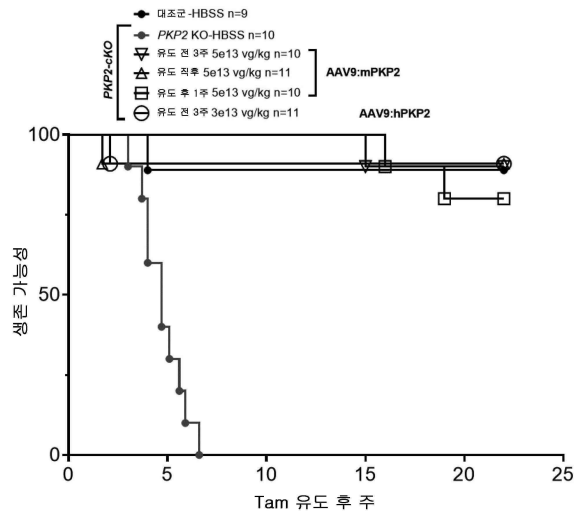
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 플라코필린 2 유전자 치료 방법 및 조성물

(57) 요약

부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)과 같은 심장 질환을 치료하기 위한 플라코필린 2 유전자 치료를 위한 방법 및 조성물이 본원에서 제공된다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

A61K 48/0058 (2013.01)
A61P 9/00 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2830/48 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(72) 발명자

리드 크리스

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오
이스터 포인트 블러바드 171 스위트 500

양 진

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오
이스터 포인트 블러바드 171 스위트 500

(30) 우선권주장

63/172,053	2021년04월07일	미국(US)
63/216,322	2021년06월29일	미국(US)
63/227,801	2021년07월30일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

심장 질환 또는 장애의 치료가 필요한 개체에서 심장 질환 또는 장애를 치료 하는 방법으로서, 적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2(PKP2) 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 포함 하는 유전자 치료 벡터 및 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는 AAV9 또는 이의 유도체인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, AAV9는 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포를 표적으로 하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 심장 질환 또는 장애는 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물은 정맥내로, 심장내로, 심낭으로, 또는 동맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로모터는 심장 특이적 프로모터인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 심장 특이적 프로모터는 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 유전자 발현을 지시하는 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 심장 특이적 프로모터는 트로포닌 프로모터, 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로모터는 PKP2 프로모터인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로모터는 구성적 프로모터인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 구성적 프로모터는 베타 액틴 프로모터인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 심장 특이적 인핸서를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 3' 요소를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 3' 요소는 우드릭 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE), 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGH 폴리A) 서열, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 서열 번호: 5에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 방법은 섬유지방 조직 대체, 심근 위축, 무제한 우심실 확장, 심실 부정맥, 심장 돌연사, 또는 운동 촉발 심장 사건 중 적어도 하나를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 방법은 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 섬유지방 조직 대체를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 하나의 항에 있어서, 방법은 테스모숨 구조 및/또는 기능을 복원시키는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 있어서, 방법은 PKP2 단백질 및 활성 수준을 복원시키는 것인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, 방법은 PKP2 유도된 유전자 발현을 복원시키는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 방법은 리아노딘 수용체 2(Ryr2), 안키린-B(Ank2), Cacna1c(CaV1.2), 트리아딘(Trdn), 또는 칼세퀘스트린-2(Casq2) 중 하나 이상의 발현을 복원시키는 것인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 하나의 항에 있어서, 개체는 테스모숨 단백질에 적어도 하나의 변이를 가진 것으로 확인되는 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 테스모숨 단백질은 PKP2인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 변이는 결실, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 변이, 또는 카피 수 변이를 포함하는 것인 방법.

청구항 34

적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2 유전자를 포함하는 유전자 치료 벡터.

청구항 35

제34항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함하는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 36

제35항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스인 유전자 치료 벡터.

청구항 38

제37항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 39

제38항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는 AAV9 또는 이의 유도체인 유전자 치료 벡터.

청구항 40

제39항에 있어서, AAV9는 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 41

제34항 내지 제40항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포를 표적으로 하는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 42

제34항 내지 제41항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로모터는 심장 특이적 프로모터인 유전자 치료 벡터.

청구항 43

제42항에 있어서, 심장 특이적 프로모터는 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 유전자 발현을 지시하는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 심장 특이적 프로모터는 트로포닌 프로모터 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터인 유전자 치료 벡터.

청구항 45

제43항에 있어서, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 46

제34항 내지 제45항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로모터는 PKP2 프로모터인 유전자 치료 벡터.

청구항 47

제46항에 있어서, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 48

제34항 내지 제41항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로모터는 구성적 프로모터인 유전자 치료 벡터.

청구항 49

제48항에 있어서, 구성적 프로모터는 베타 액틴 프로모터인 유전자 치료 벡터.

청구항 50

제34항 내지 제49항 중 어느 하나의 항에 있어서, 심장 특이적 인헨서를 추가로 포함하는 유전자 치료 벡터.

청구항 51

제34항 내지 제50항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 3' 요소를 추가로 포함하는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 52

제51항에 있어서, 3' 요소는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE), 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGH 폴리아) 서열, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 53

제34항 내지 제52항 중 어느 하나의 항에 있어서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 서열을 가지는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 54

제34항 내지 제53항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 서열 번호: 5에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 포함하는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 55

제34항 내지 제54항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함하는 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제에서 제제화되는 것인 유전자 치료 벡터.

청구항 56

심장 질환 또는 장애의 치료가 필요한 개체에서 심장 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, (a) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2(PKP2) 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 및 3' 요소를 포함하는 유전자 치료 벡터; 및 (b) 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된 바이러스 벡터를 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포를 표적으로 하는 것인 방법.

청구항 61

제59항에 있어서, 아데노 관련 바이러스는, 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 AAV9인 방법.

청구항 62

제56항에 있어서, 심장 질환 또는 장애는 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)인 방법.

청구항 63

제56항에 있어서, 프로모터는, 심장을 포함한 조직에서 발현을 유발하는 프로모터 또는 심장 특이적 프로모터인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 심장 특이적 프로모터는 심근, 심외막, 또는 둘 다에서의 유전자 발현을 지시하는 것인 방법.

청구항 65

제63항에 있어서, 심장 특이적 프로모터는 PKP2 프로모터, 트로포닌 프로모터, 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 68

제56항에 있어서, 3' 요소는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE), 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGH 폴리A) 서열, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제56항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 심장 특이적 인핸서를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제56항에 있어서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 서열을 가지는 것인 방법.

청구항 71

제56항에 있어서, 유전자 치료 벡터는 서열 번호: 5에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제56항에 있어서, 핵산은 약 4.7 kb 이하의 크기를 가지는 것인 방법.

청구항 73

제56항에 있어서, 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 74

제56항에 있어서, 방법은 섬유지방 조직 대체; 심근 위축; 미세한 우심실 확장; 심실 부정맥; 심장 돌연사; 운동 촉발 심장 사건; 우심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 좌심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 심방 부정맥; 실신; 심계항진; 호흡 곤란; 또는 흉통 중 적어도 하나를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 방법은 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 섬유지방 조직 대체를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 76

제56항에 있어서, 방법은 데스모솜 구조 및/또는 기능을 복원시키는 것인 방법.

청구항 77

제56항에 있어서, 방법은 PKP2 mRNA 발현 및/또는 PKP2 단백질 및 활성 수준을 복원시키는 것인 방법.

청구항 78

제56항에 있어서, 방법은 심장 질환의 하나 이상의 증상에 대해 직접 또는 간접 효과를 갖는 하나 이상의 유전자의 발현을 복원시키는 것인 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 유전자는 리아노딘 수용체 2(Ryr2), 안키린-B(Ank2), Cacna1c(CaV1.2), 트리아딘(Trdn), 또

는 칼세퀘스트린-2(Casq2) 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제56항에 있어서, 개체는 테스모숨 단백질에 적어도 하나의 변이를 가진 것으로 확인되는 것인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 테스모숨 단백질은 PKP2인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 변이는 결실, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 변이, 또는 카피 수 변이를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001]

상호 참조

[0002]

본 특허 출원은 2020년 10월 9일에 출원된 미국 가출원 제63/089,951호, 2021년 4월 7일에 출원된 미국 가출원 제63/172,053호, 2021년 6월 29일에 출원된 미국 가출원 제63/216,322호, 및 2021년 7월 30일에 출원된 미국 가출원 제63/227,801호의 이익을 주장하며, 이들 출원의 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

배경 기술

[0004]

부정맥 유발성 우심실 심근병증(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(arrhythmogenic cardiomyopathy, ACM)은 1/2000명 내지 1/5000명에게서 발견되는 유전성 심장 질환이다. ARVC는 심근의 섬유지방 조직 대체, 심근 위축, 우세한 우심실 확장, 심실 부정맥, 및 심장 돌연사를 특징으로 한다(Wang et al., 2018). 질환은 특히 초기 단계에서 이의 무증상 표현으로 인해 종래의 이미징 및 ECG에 의해서 진단하기가 어렵다. 후기 단계에서, 질환은 심실 부정맥 및 심실의 형태학적 이상과 같은 보다 명백한 징후로 진행된다. 젊은이와 운동 선수의 급성 심정지는 ARVC 및 운동 관련 심벽 스트레스와 관련이 있는 것으로 나타난다. 지금까지, ARVC의 효과적인 치료법은 없다(Wang et al., 2018).

발명의 내용

[0005]

한 측면으로, 필요로 하는 개체에서 심장 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 (a) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2(PKP2) 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 및 3' 요소를 포함하는 유전자 치료 벡터; 및 (b) 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스이다. 일부 구현예에서, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 아데노 관련 바이러스는 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가진 AAV9이다. 일부 구현예에서, 심장 질환 또는 장애는 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 심장을 포함한 조직에서 발현을 유발하는 프로모터 또는 심장 특이적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 심근, 심외막(epicardium), 또는 둘 다에서의 발현을 유발한다. 일부 구현예에서, 심장 특이적 프로모터는 PKP2 프로모터, 트로포닌 프로모터, 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터이다. 일부 구현예에서, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 3' 요소는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE), 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGH 폴리A) 서열, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 심장 특이적 인핸서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 핵산은 약 4.7 kb 이하의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 제약학적으로 허용 가

능한 담체 또는 부형제는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 섬유지방 조직 대체; 심근 위축; 우세한 우심실 확장; 심실 부정맥; 심장 돌연사; 운동 촉발 심장 사건; 우심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 좌심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 심방 부정맥; 실신; 심계항진(palpitation); 호흡 곤란; 또는 흉통 중 적어도 하나를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 섬유지방 조직 대체를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 데스모솜(desmosome) 구조 및/또는 기능을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 PKP2 mRNA 발현 및/또는 PKP2 단백질 및 활성 수준을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 심장 질환의 하나 이상의 증상에 대해 직접 또는 간접 효과를 미치는 하나 이상의 유전자의 발현을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 유전자는 리아노딘(Ryanodine) 수용체 2(Ryr2), 안키린-B(Ank2), Cacna1c(CaV1.2), 트리아딘(Trdn), 또는 칼세퀘스트린-2(Casq2) 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 개체는 데스모솜 단백질에 적어도 하나의 변이를 갖는 것으로 확인된다. 일부 구현예에서, 데스모솜 단백질은 PKP2이다. 일부 구현예에서, 변이는 결실, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 변이, 또는 카피 수 변이를 포함한다.

[0006]

한 측면으로, 본원에는 필요로 하는 개체에서 심장 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2(PKP2) 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자 치료 벡터 및 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스이다. 일부 구현예에서, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 아데노 관련 바이러스는 AAV9 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, AAV9는 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 심장 질환 또는 장애는 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)이다. 일부 구현예에서, 조성물은 정맥 내로, 심장내로, 심낭으로, 또는 동맥내로 투여된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 심장 특이적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 심근, 심외막, 또는 둘 다에서의 발현을 유발한다. 일부 구현예에서, 심장 특이적 프로모터는 트로포닌 프로모터, 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터이다. 일부 구현예에서, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 프로모터는 PKP2 프로모터이다. 일부 구현예에서, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 구성적 프로모터는 베타 액틴 프로모터이다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 심장 특이적 인핸서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 섬유지방 조직 대체; 심근 위축; 우세한 우심실 확장; 심실 부정맥; 심장 돌연사; 또는 운동 촉발 심장 사건; 우심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 좌심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 심방 부정맥; 실신; 심계항진; 호흡 곤란; 또는 흉통 중 적어도 하나를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 섬유지방 조직 대체를 반전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 데스모솜 구조 및/또는 기능을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 PKP2 mRNA 발현 및/또는 PKP2 단백질 및 활성 수준을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 PKP2 유도된 유전자 발현을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 심장 질환의 하나 이상의 증상에 대해 직접 또는 간접 효과를 미치는 하나 이상의 유전자의 발현을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 리아노딘 수용체 2(Ryr2), 안키린-B(Ank2), Cacna1c(CaV1.2), 트리아딘(Trdn), 또는 칼세퀘스트린-2(Casq2) 중 하나 이상의 발현을 복원시킨다. 일부 구현예에서, 개체는 데스모솜 단백질에 적어도 하나의 변이를 갖는 것으로 확인된다. 일부 구현예에서, 데스모솜 단백질은 PKP2이다. 일부 구현예에서, 변이는 결실, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 변이, 또는 카피 수 변이를 포함한다.

[0007]

또 다른 측면으로, 적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2 유전자를 포함하는 유전자 치료 벡터가 제공된다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스이다. 일부 구현예에서, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 아데노 관련 바이러스는 AAV9 또는 이의 유도체이다. 일부 구현예에서, AAV9는 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 프로모터는 심장 특이적 프로모터이다.

일부 구현예에서, 프로모터는 심근, 심의막, 또는 둘 다에서 발현을 유발한다. 일부 구현예에서, 심장 특이적 프로모터는 트로포닌 프로모터 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터이다. 일부 구현예에서, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 프로모터는 PKP2 프로모터이다. 일부 구현예에서, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 구성적 프로모터는 베타 액틴 프로모터이다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 심장 특이적 인헨서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 2에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함하는 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제에 제제화된다.

[0008] **참조에 의한 포함**

[0009] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적인 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시되는 것과 동일한 정도로 참조로 본원에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)이 포함된 본 특허 또는 특허 출원 간행물의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불 시 기관에 의해 제공될 것이다.

본 개시의 특징 및 장점의 이해는 본 개시의 원리가 활용되는 예시적인 구현예를 제시하는 다음의 상세한 설명, 및 수반되는 도면을 참조로 얻어질 것이다:

도 1은 심장 데스모솜이 세포를 함께 묶는 방법을 예시한다.

도 2는 ARVC 질환 적응증 및 가능한 질환 메커니즘의 요약을 도시한다.

도 3a-3c는 8일 짜에 iPSC에서 PKP2의 급성 침묵(acute silencing)의 결과를 도시한다. 도 3a는 세포막으로부터 DSP의 소멸을 도시한다. 도 3b는 근절(sarcomere) 밀도의 감소를 예시하는 그래프를 도시한다. 도 3c는 패턴화된 iPSC에서 세포 압축의 혼란을 도시한다.

도 4는 PKG와의 공동 국지화에 의해 측정되는 바 DSP 막 국지화의 정량적 분석을 도시한다.

도 5는 PKP2가 침묵하는 세포에서, 주로 불용성 분획에서 검출되는 DSP 단백질의 감소된 총량을 예시하는 면역블롯을 도시한다.

도 6a-6c는 AAV에 의한 PKP2 형질도입의 결과를 도시한다. 도 6a는 AAV 구성물의 벡터 지도를 도시한다. 도 6b는 DSP 막 국지화의 복원의 면역형광 이미지를 도시한다. 도 6c는 PKP2 침묵 및 AAV-PKP2 이식유전자 구제 후 총 DSP 밀도의 정량화를 도시한다.

도 7a-7b는 수축 속도에 대한 AAV에 의한 PKP2 형질도입의 결과를 도시한다. 도 7a는 실험 타임라인을 도시한다. 도 7b는 PKP2 침묵 후 감소된 속도의 기능적 구제를 입증하는 수축성 검정을 도시한다.

도 8은 인간 및 마우스 PKP2 α 의 AAV 발현 카세트의 제2 세대 개략도를 도시한다. 좌측 패널은 발현 카세트의 모든 요소를 도시한다. 우측 패널은 발현 카세트에서 요소의 배열을 도시한다.

도 9a 및 도 9b는 iPSC 심근세포에서 PKP2 침묵 후 수축 속도의 제2 세대 AAV-hPKP2 α 구제의 결과를 도시한다. 도 9a는 상이한 다중 감염도로 형질도입된 세포에서 가용성 및 불용성 분획에서의 발현을 도시한다. 도 9b는 PKP2 침묵 후 세포에서 수축 속도의 구제를 도시한다.

도 10은 야생형 마우스에서 제2 세대 AAV-PKP2 α 의 발현을 도시한다.

도 11a-11g는 야생형 마우스에서 제2 세대 AAV9 인간 및 마우스 PKP2 α 의 파일럿 발현 안전성 연구 결과를 도시한다. 도 11a는 AAV9 주사 전 및 후의 체중을 도시한다. 도 11b는 AAV9 인간 또는 마우스 PKP2 α 로 치료된 마우스에서의 박출률을 도시한다. 도 11c 및 도 11d는 확장기말 및 수축기말의 내부 직경에 의해 측정된 LV 구조를 도시한다. 도 11e, 도 11f, 및 도 11g는 QRS(도 11e), QT 간격(도 11f), 및 P/R 진폭(도 11g)에 의한 전기생리학적 활성을 도시한다.

도 12는 PKP2-cKO 마우스의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시한다.

도 13a-13b는 PKP2-cKO 마우스의 우심실(RV) 확장성 심근병증(dilated cardiomyopathy)을 도시한다. 도 13a(좌

측 패널)는 *PKP2-cKO* 마우스에서 이완기 말에 증가된 RV 내부 치수(RVIDd)를 예시하는 이미지를 도시한다. **도 13a**(우측 패널)는 *PKP2-cKO* 마우스에서 시간 경과에 따른 RVIDd의 그래프를 도시한다. **도 13b**(좌측 패널)는 *PKP2-cKO* 마우스에서 RV 영역의 증가를 예시하는 이미지를 도시한다. **도 13b**(우측 패널)는 *PKP2-cKO* 마우스에서 시간 경과에 따른 RV 영역의 그래프를 도시한다.

도 14a-14b는 대조군과 비교하여 *PKP2-cKO* 마우스의 좌심실(LV) 확장성 심근병증의 발달을 도시한다. **도 14a**(좌측 패널)는 *PKP2-cKO* 마우스에서 수축기말(LVIDs) 및 확장기말(LVIDd)에서 증가된 LV 내부 치수의 이미지를 도시한다. **도 14a**(우측 패널)는 시간 경과에 따라 *PKP2-cKO* 마우스에서 LVIDs 및 LVIDd의 증가를 보여주는 그래프를 도시한다. **도 14b**는 시간 경과에 따라 퍼센트 박출물에 의해 측정되는 LV 성능의 그래프를 도시한다.

도 15는 대조군과 비교된 *PKP2-cKO* 마우스의 중증의 전기생리학적 표현형의 발생, 구체적으로 *PKP2-cKO* 마우스에서 연장된 QRS 간격 및 증가된 P/R 진폭 비율을 도시한다. 상부 패널은 대조군 및 *PKP2-cKO* 마우스의 예시적인 심전도를 도시한다. 하단 패널은 대조군과 비교된 *PKP2-cKO* 마우스에서 QRS 간격의 증가 및 P/R 진폭의 증가의 그래프를 도시한다.

도 16a-16c는 섬유증(fibrosis)의 향상된 발현, 조직 리모델링 유전자, 및 심부전 마커를 도시한다. **도 16a**는 대조군과 비교된 *PKP2-cKO* 마우스의 RV 및 LV(상부) 및 데스모솜 및 Cx43 단백질 발현(하단)에서의 PKP2 RNA 발현을 도시한다. **도 16b**는 대조군과 비교된 *PKP2-cKO* 마우스에서 섬유증 유전자: TGF β 1, Col1a1, 및 Col3a1; 및 조직 리모델링 유전자: Timp1 및 Mmp2의 향상된 발현을 도시한다. **도 16c**는 대조군 마우스와 비교된 *PKP2-cKO* 마우스에서 심부전 마커, NPPA 및 NPPB의 향상된 발현을 도시한다.

도 17은 *PKP2-cKO* ARVC 마우스 모델에서 유전자 치료로서 PKP2 효능을 평가하기 위한 실험 설계를 도시한다.

도 18a는 인간 및 마우스 PKP2 α 에 대한 AAV 발현 카세트의 개략도를 도시한다. **도 18b**는 AAV9:PKP2로 치료된 마우스로부터 마우스 및 인간 PKP2 α 의 단백질 발현의 면역블롯을 도시한다.

도 19는 AAV9:PKP2로 치료된 *PKP2-cKO* 마우스의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시한다.

도 20a-20c는 RV 및 LV 확장을 감소시키고 심장 기능을 유지하는데 있어 *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:PKP2 치료 효능을 도시한다. **도 20a**는 AAV9:PKP2 치료된 마우스에서 박출물의 개선을 예시하는 그래프를 도시한다. **도 20b**는 AAV9:PKP2 치료된 마우스에서 RV 확장의 감소를 예시하는 그래프를 도시한다. **도 20c**는 LVIDd(상부) 및 LVIDs(하단)에서 개선을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 21a-21b는 AAV:PKP2로 치료된 *PKP2-cKO* 마우스의 ECG 매개변수의 개선을 도시한다. **도 21a**는 AAV9:mPKP2 및 완충액으로 치료된 대조군 및 *PKP2-cKO* 마우스의 예시의 미가공 ECG 트레이스를 도시한다. **도 21b**는 완충액으로의 치료와 비교하여 AAV9:PKP2로 치료된 *PKP2-cKO* 마우스에서 P/R 비율, QT 간격, 및 QRS 간격의 개선을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 22a-22b는 *PKP2-cKO* 마우스에서 부정맥의 AAV9:PKP2 치료 개선을 도시한다. **도 22a**(상부)는 부정맥의 중증도의 등급 표를 도시한다. **도 22a**(하단)는 대조군과 비교하여 AAV9:PKP2로 치료된 *PKP2-cKO* 마우스의 부정맥 점수의 개선을 요약하는 그래프를 도시한다. **도 22b**는 대조군과 비교하여 AAV9:PKP2로 치료된 *PKP2-cKO* 마우스에서 부정맥의 중증도의 개선을 보여주는 분포 그래프를 도시한다. 각각의 점은 동물을 나타낸다.

도 23은 *PKP2-cKO* ARVC 마우스 모델을 사용하여 유전자 치료로서 인간 PKP2 효능을 평가하기 위해 사용된 실험 설계를 도시한다.

도 24a-24d는 *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 유전자 치료 처치의 결과를 도시한다. **도 24a**는 박출물의 결과를 도시한다. **도 24b**는 우심실 크기의 결과를 도시한다. **도 24c**는 LVIDd에 의해 측정된 LV 확장을 도시한다. **도 24d**는 LVIDs에 의해 측정된 LV 확장을 도시한다.

도 25는 QT 간격(상부), P/R 비율(중간), 및 부정맥 점수(하단)에 대한 *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 유전자 치료 처치의 결과를 도시한다.

도 26a-26b는 우심실(**도 26a**) 및 좌심실(**도 26b**)에서 심부전 마커, 섬유증 및 조직 리모델링 마커의 발현을 감소시키는데 있어 *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 치료의 결과를 도시한다.

도 27a-27b는 섬유증 발생을 감소시키는데 있어 *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 치료의 결과를 도시한다. **도 27a**는 AAV9:hPKP2 치료가 있거나 없는 대조군 및 *PKP2-cKO* 마우스로부터의 근육의 조직학적 이미지를 도시한다. **도 27b**는 AAV9:hPKP2 치료가 있거나 없는 대조군 및 *PKP2-cKO* 마우스로부터의 콜라겐 양성 조직의 그래프를 도시한다.

다.

도 28a-28b는 가용성 분획(도 28a) 및 불용성 분획(도 28b)에서 PKP2 및 다른 데스모솜 단백질의 발현을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC)의 가장 일반적인 유전적 기준은 데스모솜 단백질을 암호화하는 유전자의 돌연변이이다. 기능적으로, 데스모솜은 삽입된 심근세포를 함께 붙잡는 접착성 세포간 연결이다. 데스모솜 유전자 중 하나인 플라코필린 2(PKP2)는 ARVC에 대한 유발 인자로서 가장 빈번하게 확인된다. 막에 위치한 복합체의 내부에 있는 PKP2는 데스모솜 단백질인 플라코글로빈(PKG) 및 데스모플라킨(DSP)과 상호작용한다. DSP는 심장 세포, 근절, 및 기타 소기관의 수축 단위를 안정화하기 위해 짜여진 네트워크를 형성하는 중간 필라멘트인 데스민을 고정시킨다(도 1, Brodehl et al., 2018; Moncayo-Arlandi and Brugada, 2017). 데스모솜의 손실은 세포-세포 부착, 신호 변환, 및 심근세포의 전기적 결합에 영향을 미치는 것으로 여겨진다(Wang et al., 2018). 나아가, 손실된 신호 변환 및 전기적 결합은 코백신 함유 간극 연결(GJ)의 추가 붕괴에 의한 연결부 결합 결과이다. GJ는 세포를 전기적으로 결합시키는데 필수적이고 세포 사이에서 소분자의 흐름을 허용함으로써 동시 박동을 용이하게 한다(Green et al., 2019)(도 2 ARVC 질환 적응증 및 가능한 질환 메커니즘에 대한 요약). 더불어, 심외막 분화는 ARVC 또는 ACM 환자에서 관찰되는 섬유지방 리모델링에 기여할 수 있다(Kohela et al., 2021).

[0012] 데스모솜의 기능성을 설명하기 위해, 유전적 마우스 계통 및 환자 유래 iPSCM 모델이 생성되었다. PKP2의 심장 녹아웃 마우스 모델(Delmar 마우스 모델, Cerrone et al., 2017)은 양심실(biventricular) 확장, 섬유증, 및 Ca²⁺ 항상성을 조절하는 유전자의 유의한 감소의 현저한 초기 발생을 보여, 아마도 명백한 구조적 변화 전에 부정맥에 대한 기저 메커니즘을 드러냈다. PKP2 돌연변이를 은닉하고 있는 여러 환자 유래 iPSCM 계통은 PKP2 발현의 감소, Ca²⁺ 취급 결함, 및 지방 생성 유도 배지에서 배양에 의한 지질 방울 축적을 나타냈다(Brodehl et al., 2019).

[0013] mRNA 및 단백질 수준 둘 다에서 PKP2의 감소는 PKP2 돌연변이가 있는 ARVC 환자 심장 샘플에서 보고되었다(Akdis et al., 2016; Asimaki et al., 2009). 넌센스 매개 mRNA 붕괴(NMD)는 PKP2 돌연변이를 포함한 일부 데스모솜 유전자 돌연변이에 대해 제안되었고, 이것은 돌연변이된 전사체 및 단백질의 균형잡힌 발현에서 훨씬 덜 알려진 세포 메커니즘을 시사한다(Gerull and Brodehl, 2020; Mura et al., 2003). 이들 관찰은 심장에서 WT PKP2의 발현 수준을 복원시킴으로써 유전자 치료 기반 개입의 가능성을 시사한다.

[0014] 치료 방법

[0015] 본원에 제공된 PKP2 유전자 치료 벡터는 다양한 측면으로 심장 질환 또는 병태를 가진 개체를 치료하는데 유용하다. "치료하는" 또는 "필요로 하는 병태 또는 대상체의 치료"는 (1) 증상의 감소와 같은 임상 결과를 포함한 유익한 또는 원하는 결과를 얻기 위한 대책을 취하는 것; (2) 질환 예방, 예를 들어, 질환의 성향이 있는, 예를 들어, PKP2와 같은 데스모솜 유전자에 유전자 돌연변이의 보균자이지만, 아직 질환을 경험하거나 질환의 증상을 나타내지 않는 환자에서 질환의 임상 증상이 발생하지 않도록 유발하는 것; (3) 질환의 억제, 예를 들어, 질환 또는 이의 임상 증상의 발생의 저지 또는 감소; (4) 질환의 완화, 예를 들어, 질환 또는 이의 임상 증상의 퇴행 유발; 또는 (5) 질환의 지연을 지칭한다. 한 측면으로, 본원에는 필요로 하는 개체에서 심장 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 경우에, 방법은 적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2(PKP2) 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자 치료 벡터 및 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 경우에, 심장 질환 또는 장애는 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)이다. 일부 경우에, 본원의 치료 방법은 부정맥 유발성 심근병증의 적어도 하나의 증상을 감소시키며, 이를테면 한정하는 것은 아니지만 방법은 섬유지방 조직 대체; 심근 위축; 우세한 우심실 확장; 심실 부정맥; 심장 돌연사; 또는 운동 촉발 심장 사건; 우심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 좌심실 심근병증, 확장, 또는 심부전; 심방 부정맥; 실신; 심계항진; 호흡 곤란; 또는 흉통 중 적어도 하나를 발전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 일부 구현예에서, 방법은 심근, 심외막, 또는 둘 다에서 섬유지방 조직 대체를 발전시키거나, 감소시키거나, 또는 예방한다. 일부 경우에, 방법은 데스모솜 구조 및/또는 기능을 복원시킨다. 일부 경우에, 방법은 PKP2 mRNA 발현 및/또는 PKP2 단백질 및 활성 수준을 복원시킨다. 일부 경우에, 방법은 PKP2 유도 유전자 발현을 복원시킨다. 일부 경우에, PKP2 유도 유전자 발현은 발현이 하나 이상의 질환 표현형으로 이어지는 직접 또는 간접 유발 요인인 유전자의 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 심장 질환의 하나 이상의 증상에 대해 직접 또는 간접 효과를 갖는 하나 이상의

유전자의 발현을 복원시킨다. 일부 경우에, 방법은 리아노딘 수용체 2(Ryr2), 안키린-B(Ank2), Cacna1c(CaV1.2), 트리아딘(Trdn), 또는 칼세퀘스트린-2(Casq2) 중 하나 이상의 발현을 복원시킨다.

[0016] 본원에 제공된 치료 방법의 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함한다. 한정하는 것은 아니지만 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 포크스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된 바이러스 벡터를 포함한 임의의 적합한 바이러스 벡터가 본원의 방법에 사용하는 것이 고려된다. 일부 경우에, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스이다. 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 AAV9 또는 이의 유도체이다. 일부 경우에, AAV9는 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 가진 핵산 서열을 가진다. 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 심근 또는 심외막의 영향을 받는 세포, 예컨대 심근세포의 형질도입을 개선하기 위해 변형되며, 예를 들어, 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 또는 AAV9의 유도체이다. 일부 경우에, 유도체는 전문이 참조로 본원에 포함되는 미국 특허 출원 제63/012,703호에서 기술된 임의의 AAV이다.

[0017] 본원에 제공된 치료 방법의 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터를 포함하는 조성물은 영향을 받은 세포에 도달하기 위한 임의의 적합한 경로를 통해 투여된다. 예를 들어, 일부 경우에, 조성물은 정맥내로, 심장내로, 심낭으로, 또는 동맥내로 투여된다.

[0018] 본원에 제공된 치료 방법의 일부 구현예에서, PKP2는 심근 또는 심외막의 영향을 받은 세포 및 조직, 예를 들어 심근세포에서의 발현에 적합한 임의의 프로모터에 의해 발현된다. 예를 들어, 일부 경우에, 프로모터는 심장 특이적 프로모터이다. 일부 경우에, 심장 특이적 프로모터는 트로포닌 프로모터 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터이다. 일부 경우에, 프로모터는 PKP2 프로모터이다. 일부 경우에, 심장 특이적 인핸서는 프로모터와 조합된다. 일부 경우에, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 경우에, PKP2 프로모터는 서열 번호:4에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 경우에, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 경우에, 구성적 프로모터는 베타 액틴 프로모터이다.

[0019] 본원에 제공된 치료 방법의 일부 구현예에서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 PKP2 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 적합한 서열, 예를 들어, 서열 번호: 8의 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 핵산을 갖는다. 예를 들어, 일부 경우에, PKP2 유전자는 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 경우에, PKP2 유전자는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 경우에, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산 서열은 코돈 최적화된다.

[0020] 본원에 제공된 치료 방법의 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 약 3 kb 내지 약 5 kb의 크기를 갖는 유전자 발현 카세트를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4 kb 내지 약 5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.2 kb 내지 약 4.8 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 5 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.9 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.8 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.7 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.6 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.5 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.4 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.3 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.2 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.1 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.9 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.8 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.7 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.6 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.5 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.1 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.3 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.7 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.9 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.1 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.2 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.3 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자

발현 카세트는 적어도 약 4.4 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.6 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.7 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.8 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.9 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 5 kb의 크기를 가진다.

[0021] 본원의 방법의 다양한 구현예에서, PKP2 유전자를 포함하는 유전자 치료 벡터는 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물에 제제화된다. 예를 들어, 일부 경우에, 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0022] 본원에 제공된 치료 방법의 일부 구현예에서, 개체는 데스모솜 단백질에 적어도 하나의 변이를 가진 것으로 확인된다. 일부 경우에, 데스모솜 단백질은 PKP2이다. 일부 경우에, 변이는 결실, 삽입, 단일 뉴클레오타이드 변이, 또는 카피 수 변이를 포함한다. 일부 경우에, 개체는 DNA 서열분석, PCR, qPCR, 제자리 혼성화, 또는 개체에서 유전자 변이를 확인하는 또 다른 기타 적합한 방법을 통해 데스모솜 단백질에 적어도 하나의 변이를 가진 것으로 확인된다.

[0023] **유전자 치료 벡터**

[0024] 또 다른 측면으로, 적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 플라코필린 2 유전자를 포함하는 유전자 치료 벡터가 제공된다. 일부 경우에, 유전자 치료 벡터는 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 바이러스 벡터는 심장 질환 또는 병태를 치료하기 위한 임의의 적합한 바이러스 벡터이다. 일부 경우에, 바이러스 벡터는 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포에 유전자를 전달하기에 적합하다. 일부 경우에, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 폭스 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 유전자 치료 벡터는 아데노 관련 바이러스이다. 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 AAV6, AAV8, 및 AAV9, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 AAV9 또는 이의 유도체이다. 일부 경우에, AAV9는 서열 번호: 7에 대해 적어도 95% 동일성을 가진 핵산 서열을 가진다. 일부 경우에, 아데노 관련 바이러스는 본원의 치료 방법에 따라 세포를 형질 도입하기 위해 최적화된 AAV6, AAV8, 또는 AAV9의 유도체이다. 일부 경우에, 유도체는 전문가 참조로 본원에 포함되는 미국 특허 출원 제63/012,703호에서 기술된 임의의 AAV이다.

[0025] 본원에 제공된 유전자 치료 벡터의 일부 구현예에서, PKP2는 영향을 받은 세포 및 조직, 예를 들어 심근세포에서의 발현에 적합한 임의의 프로모터에 의해 발현된다. 일부 경우에, PKP2는 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포에서 활성인 프로모터에 의해 발현된다. 예를 들어 일부 경우에, 프로모터는 심장 특이적 프로모터이다. 일부 경우에, 심장 특이적 프로모터는 트로포닌 프로모터 또는 알파 미오신 중쇄 프로모터이다. 일부 경우에, 프로모터는 PKP2 프로모터이다. 일부 경우에, 심장 특이적 인헨서는 프로모터와 조합된다. 일부 경우에, 트로포닌 프로모터는 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 경우에, PKP2 프로모터는 서열 번호: 4에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 가진다. 일부 경우에, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 경우에, 구성적 프로모터는 베타 액틴 프로모터이다.

[0026] 본원에 제공된 유전자 치료 벡터의 일부 구현예에서, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산은 PKP2 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 적합한 서열, 예를 들어, 서열 번호: 8의 서열을 가지는 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 핵산을 가진다. 예를 들어, 일부 경우에, PKP2 유전자는 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 경우에, PKP2 유전자는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 경우에, PKP2 유전자를 암호화하는 핵산 서열은 코돈 최적화된다.

[0027] 본원에 제공된 유전자 치료 벡터의 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 3' 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 요소는 유전자 치료 벡터의 전사 생성물(예컨대, PKP2 전사체)을 안정화시킨다. 일부 구현예에서, 3' 요소는 소 성장 호르몬(BGH) 폴리아데닐화 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 요소는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)를 포함한다.

[0028] 본원에 제공된 유전자 치료 벡터의 일부 구현예에서, 유전자 치료 벡터는 약 3 kb 내지 약 5 kb의 크기를 갖는 유전자 발현 카세트를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4 kb 내지 약 5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.2 kb 내지 약 4.8 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자

발현 카세트는 약 4.5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 5 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.9 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.8 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.7 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.6 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.5 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.4 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.3 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.2 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4.1 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 4 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.9 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.8 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.7 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.6 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 약 3.5 kb보다 크지 않은 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.1 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.3 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.7 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 3.9 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.1 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.2 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.3 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.4 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.5 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.6 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.7 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.8 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 4.9 kb의 크기를 가진다. 일부 구현예에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 약 5 kb의 크기를 가진다.

[0029] 본원에 제공된 유전자 치료 벡터의 다양한 구현예에서, PKP2 유전자를 포함하는 유전자 치료 벡터는 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물에 제제화된다. 예를 들어, 일부 경우에, 제약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는 완충제, 중합체, 염, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, 본원의 유전자 치료 벡터는 아래의 표 1에 제공된 핵산 서열을 포함한다.

표 1

표 1: 서열		
명칭	서열	서열 번호:
인간 PKP2	ATGGCAGCCCCCGGCGCCCCAGCTGAGTACGGCTACATCCGGAC CGTCTGGGCCAGCAGATCCTGGGACAACCTGGACAGCTCCAGCC TGGCGCTGCCCTCCGAGGCCAAGCTGAAGCTGGCGGGGAGCAGC GGCCGCGGGCCAGACAGTCAAGAGCCTGCGGATCCAGGAGC AGGTGCAGCAGACCCTCGCCCGGAAGGGCCGAGCTCCGTGGGC AACGAAATCTTCACCGAACCAAGCAGTGTTCCTGAGTATGTCTA CAACCTACACTTGGTTGAAAATGATTTTGTGGAGGCCGTTCCCC TGTTCCTAAAACCTATGACATGCTAAAGGCTGGCACAACCTGCCA CTTATGAAGTTCGCTGGGGAAGAGGAACAGCACAGTACAGCTCC CAGAAGTCCGTGGAAGAAAGTCTTGGAGCATCCTCTGAGGAG ACTGGAGATTTCTCCTGACAGCAGCCCGGAGAGGGCTCACTACA CGCACAGCGATTACCAGTACAGCCAGAGAAGCCAGGCTGGGCA CACCTGCACCAAGAAAGCAGGCGGGCCGCCCTCCTAGTGC CACCGAGATATGCTCGTTCCGAGATCGTGGGGTTCAGCCGTGCT GGCACCACAAGCAGCAGCGCCACTTTGACACATACCACAGACA GTACCAGCATGGCTCTGTTAGCGACACCGTTTTTGGACAGCATCCC TGCCAACCCGGCCCTGCTCACGTACCCAGGCCAGGACCAGCC GCAGCATGGGCAACCTCTTGGAGAAGGAGAACTACCTGACGGC AGGGCTCACTGTCGGGCAGGTCAGGCCGCTGGTGGCCCTGCAGC CCGTCACTCAGAACAGGGCTTCCAGGTCCTCCTGGCATCAGAGC TCCTTCCACAGCACCCGCACGCTGAGGGAAGCTGGGCCCCAGTGT CGCCGTGGATTCCAGCGGGAGGAGAGCGCACTGACTGTCGGCC AGGCGGCCGAGGGGGAAGTGGGAATCTGCTCACTGAGAGAAG CACTTCACTGACTCCCAGCTGGGGAATGCAGACATGGAGATGA CTCTGGAGCGAGCAGTGAATGCTCGAGGCAGACCACATGCTG CCATCCAGGATTTCTGCTGCAGCTACTTTCATACAGCACGAGTGC TTCCAGAAATCTGAAGCTCGGAAGAGGGTTAACCAGTTCGTGG CATCCTCAAGCTTCTGCAGCTCCTAAAAGTTCAGAATGAAGAGC TTCAGCGAGCTGTGTGTGGGGCCTTGAGAAACTTAGTATTTGAA GACAATGACAACAATTGGAGGTGGCTGAACTAAATGGGGTAC CTCGGCTGCTCCAGGTGCTGAAGCAAACCAGAGACTTGGAGACT AAAAAACAATAACAGGTTTGTGTGGAATTTGTCATCTAATGA CAAACTCAAGAATCTCATGATAACAGAAGCATTGCTTACGCTGA CGGAGAATATCATCATCCCTTTTCTGGGTGGCCTGAAGGAGAC TACCCAAAAGCAAATGGTTTGTCTCGATTTTGGACATATTCTACAAC GTCAGTGGATGCCTAAGAAACATGAGTTCTGCTGGCGCTGATGG GAGAAAAGCGATGAGAAGATGTGACGGACTCATTGACTCACTG GTCCATTATGTCAGAGGAACCATTGCAGATTACCAGCCAGATGA CAAGGCCACGGAGAATTGTGTGTGCATTCTTCATAACCTCTCCTA CCAGCTGGAGGCAGAGCTCCAGAGAAATATCCAGAAATATCT ATATTCAAAACCGAATATCCAGACTGACAACAACAAAAGTATT GGATGTTTTGGCAGTCGAAGCAGGAAAAGTAAAAGAGCAATACC AGGACGTGCCGATGCCGGAGGAAAAGAGCAACCCCAAGGGCGT GGAGTGGCTGTGGCATTCCATTGTTATAAGGATGTATCTGTCTT GATCGCCAAAAGTGTCCGCAACTACACACAAGAAGCATCCTTAG GAGCTCTGCAGAACCTCACGGCCGGAAGTGGACCAATGCCGACA TCAGTGGCTCAGACAGTTGTCCAGAAGGAAAGTGGCCTGCAGCA CACCCGAAAAGATGCTGCATGTTGGTGACCCAAGTGTGAAAAAGA CAGCCATCTCGCTGCTGAGGAATCTGTCCCGAATCTTCTCTGCTG	1

[0031]

	<p>AGAATGAAATTGCCAAAGAAACTCTCCCTGATTTGGTTCCATC ATTCTGACACAGTCCCGAGTACTGACCTTCTCATTGAAACTACA GCCTTGCCTGTTACACATTGAACAACATAATCCAAAACAGTTA CCAGAATGCACGGGACCTTCTAAACACCGGGGGCATCCAGAAAA TTATGGCCATTAGTGCAGGGGATGCCTATGCCTCCAACAAAGCA AGTAAAGCTGCTTCCGTCCTTCTGTATTCTCTGTGGGCACACAG GAACTGCATCATGCCTACAAGAAGGCTCAGTTTAAGAAGACAGA TTTTGTCAACAGCCGGACTGCCAAAGCCTACCACTCCCTTAAAG ACTGA</p>	
<p>인간 PKP2 (코돈 최적화됨)</p>	<p>ATGGCTGCTCCTGGTGTCTCTGCCGAGTACGGCTACATCAGAAC AGTGCTGGGCCAGCAGATCCTGGGACAGCTGGATTCTAGCTCTC TGGCCCTGCCTTCTGAGGCCAAGCTGAAACTGGCCGGCAGTTCT GGAAGAGCGGCCAGACAGTGAAGTCCCTGCGGATCCAAGAAC AGGTGCAGCAGACCTGGCCAGAAAGGGCAGATCTTCTGTGGC AACGGCAACCTGCACAGAACCAGCTCTGTGCCGAGTACGTGTA CAATCTGCACCTGGTGGAAAACGACTTCTGTCGGCGGCAGATCCC CTGTGCCTAAGACCTACGATATGCTGAAGCCGGCACCACGGCC ACCTATGAAGGCAGATGGGGAAGAGGCACAGCCCAGTACAGCA GGCAGAAAAGCGTGGAAAGAGAGAAGCCTGCGGCACCCTGTGCG GAGACTGGAAATCAGCCCTGATAGCAGCCCAGAGAGAGCCCAC TACACCCACAGCGACTACCAGTACTCCCAGAGATCTCAGGCCGG CCACACACTGCACCACCAAGAGTCTAGAAGGGCCGCTCTGCTGG TGCTCCTAGATACGCCAGATCTGAGATCGTGGGCGTGTCCAGA GCCGGCACAACAAGCAGACAGAGACACTTCGACACCTACCACC GGCAGTATCAGCAGGCAGCGTGTCCGATACCGTGTTCGATAGC ATCCCCGCCAATCCTGCTCTGCTGACATACCCTAGACCTGGCACC TCCAGATCCATGGGCAATCTGCTGAAAAAGAGAACTACCTGAC CGCCGACTGACCGTGGGACAAGTTCGACCTCTGGTTCTCTGC AGCCCGTGACACAGAACAGAGCCAGCAGAAGCAGCTGGCACCA GTCCAGCTTCCACAGCACCAGAACTGAGAGAAGCTGGCCCTA GCGTGGCCGTGGATTCTTCTGGTAGAAGGGCTCACCTGACAGTT GGCCAAAGCAGCTGCAGGCGGAAGCGGAAATCTGCTGACCGAGA GAAGCACCTTACCGACAGCCAGCTGGGCAACCGCCACATGGA AATGACACTGGAACGGGCGGTGTCATGTGGAAGCCGATCACA TGCTGCCAGCAGAATTAGCGCCGCTGCCACCTTTATCCAGCAC GAGTGCTTCCAGAAGTCTGAGGCCCGGAAGAGAGTGAACCAGCT GAGAGGCATCCTGAAGCTGCTGCAGCTCCTGAAGGTGCAGAACG AGGATGTGCAGAGGGCTGTGTGTGGGGCCCTGAGAAATCTGGTG TTCGAGGACAACGACAACAAGCTGGAAGTGGCCGAGCTGAACG GCGTGCCAAGACTGCTGCAGGTCTGAAACAGACCCGCGACCTG GAAACAAAAGAAGCAGATCACCGCCCTGCTCTGGAACCTGAGCA GCAACGACAAGCTGAAGAACCTGATGATCACAGAGGCCCTGCTG ACCCTGACAGAGAACATCATCATCCCTTTCAGCGGCTGGCCCGA GGGCGATTACCCTAAAGCTAATGGCCTGCTGGACTTCGACATCT TCTACAACGTGACCGGCTGCCTGAGAAACATGTCTAGCGCTGGC GCCGATGGCAGAAAGGCCATGAGAAGATGTGACGGCCTGATCG ACAGCCTGGTGCACATATGTGCGGGGCACAATCGCCGATTACCAG CCTGATGATAAGGCCACCGAGAAGTGCATCCTGCACAA CCTGAGCTACCAGCTGGAAGCAGAGCTGCCCGAGAAGTACAGCC AGAACATCTACATCCAGAACCAGAACATCCAGACCGACAACAA CAAGAGCATCGGCTGCTTCGGCAGCCGCAGCCGAAAAGTGA GAACAGTACCAGGACGTGCCATGCCTGAGGAAAAGTCTAACCC CAAAGCGGTGGAATGGCTGTGGCACAGCATCGTATCCGGATGT ACCTGAGCCTGATCGCCAAGAGCGTGGGAATTACACCCAAAGAG GCATCTCTGGGCGCCCTGCAGAATCTGACAGCAGGATCTGGCCC</p>	<p>2</p>

[0032]

	TATGCCACCTCTGTGGCTCAGACCGTGGTGAGAAAGAGTCTG GCCTGCAGCACACCCGGAAGATGCTGCATGTGGGAGATCCCAGC GTGAAGAAAACCGCCATCAGCCTGCTGAGAAAACCTGAGCCGGA ATCTGTCTCTGCAGAATGAGATCGCCAAAGAGACACTGCCCGAC CTGGTGTCTATCATCCCTGACACCGTGCCTAGCACCGACCTGCTG ATTGAGACAACAGCCAGCGCCTGTACACCCCTGAACAACATCAT TCAGAACTCCTACCAGAACGCCCGCGATCTGCTGAACACAGGCG GCATCCAGAAAATCATGGCCATCTCTGCCGGCGACGCCTACGCC TCTAACAAGGCCCTCTAAAGCCGCCAGCGTGTGTATTCTCTG TGGGCCATACCGAGCTGCACCATGCCTATAAGAAGGCCAGTT CAAAAAGACCGACTTCGTGAACAGCCGACCGCCAAGGCCTACC ACTCTCTGAAAGAT	
pcTNT 프로모터	GTCATGGAGAAGACCCACCTTGCAGATGTCCTACTGGGGCTGG CAGAGCCGGCAACCTGCCTAAGGCTGCTCAGTCCATTAGGAGCC AGTAGCCTGGAAGATGTCTTTACCCCAAGCATCAGTTCAAGTGG AGCAGCACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGTG GAGACTTATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCCCAACCC TGCTCCCAGCTGGCCCTCCAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTT TATCAGGATTCTCAAGAGGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACT GTTCCCTGCATATCTGCTCTGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAG CTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGTTCTT GTAGCCTTGTCCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCC CCACCCCAACCGCATCCCCCTGCCCAACCCGTCCTGTCGCAC ATTCCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCAGGCCCAAGCCACAT GCCTGCTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTGCCTCACCAGTCCCCGC TGAGACTGAGCAGACGCCTCCA	3
PKP2 프로모터	CATCTCAGCATCATGGTTGGATGTTTTCCACCTGGCTACATAAGCA AGCTTTACACAAGGTGTAATTTGCCTAAATAGTGGTCCATTCTAT TGGGGTGGGAGCAATTGCTTCCAGGACTCACATCCATATGGCTC CCACTTAGCCATGTGGCCTGCTGACAAAGGTTGGCGGAACCTGC ACTACTCTGTTGTCCACGCTTTCAGTCTTTGGTTTCCCTCTTCACT CCCTGGACGCTCATGTAAAAAGGGAGGCCATATACTGTGCATT GTGTGTCTAAGCATTCAAGTGTGTCTAAAGGCAGAAGGGTGTG GGTAGGAAAACAAAGACGAGGGAAGCTGCGTTCTCCAAACACT TCAGACTTGAGTAAGTGGGGTTTTGCAGCAATTGAGTGATTTGA GGGAAAGTGAACATACAAACCCAAGCAATCAAAGGGAATATTA TCTTAATACCAGGGATACATGTTTTCTTTCTGCCTCTTAAGTCC AAAGAGGCAAATCAGGACAAGTGGCTTTGGTTGTAACCTTAAAG GTCAAGGATCCTTTCTGTTGAGCTTAGCTCTCAAGTTCTCAGTAG TCAACTGCGGTGAAACATAATTAATAGCACGATAAATACAAGTT GTGGAAGATTGATTGAAAGTTGGAGGCCCTCTCCGTGGATCTC TCTACAAAGAGCCTGTAATAAAGAGGACTTAATCAACGTTAGCA GGGCTATTTAAAAAGCATCGTCTATTAATAATCATTCTTCTCTA GAGCCTCTTGTGGAGTTTCTCTGTGTGGGTGTGTTTCGTAAGAGA GGAATGGGTTAGCAAGAGTACTGGGTACAATTTGTGTATCCAAG AGAAAACAGAAGCTCTCAATGAGGAAGAACATATGTTTCTGGGA CTGCATCTGTGCAAAAAGTACATAGTCTGACGTTGTAATAAGA AAAAAACACTCTCTTTAGAAAAGTCTTTTATTTACACGTTATCT TCTTGGCACATTTCCCTCATATTGCCCTTTCCGCCTGACCAATA GCCCTTTCTCACCTCAGGTCCAGGAAAACCAGGAAAACGTTTCC AACAGTGCACAAAAGCCTGACTAACAGACATACTACTCGCTCG GGATCCCGGAGGCAAGCCTCAGTCCAAGAACAGGAGTACTCT CGAGGGCTCACCTGCCTGCAGGGCAGCCCTCCCTGCATCGAGC GGAAATCCATCCTGTCCAGCGCGGGGCGTGGGCAGAGCGGGGC GCGGCCCGGCAGGCGGTATCCGCTGGGACTCCGACAACGTGCG	4

[0033]

	<p>CGACCCAGGCGAACCGCGCCCTCTCCCCACCTCCCCGCGGGC GGGTACAAGTCTCCAGGTGTCCGCGCGCTCAGCGGGTCCGGCCC GCCCCGCCCCCGCCCCGGGCCCCGACTGCGCGTGCCCCGCGG AGCCGCGCCCCCTCCTCAGGGAAGGCCGGGGCTCCGGCCACGA GGCCGAGTCCCCCGGCCCGGGCCTCTACCGGCGGGGGGG CGGGCCAGGGGCGGGCCGACTCGAGCGGGGCGGGGCTCGCG CCAGCGCCCCAGCTCCGTGGCGGCTTCGCCCGGAGTCCAGAG GCAGGCGAGCAGCTCGGTGCCCCACCGGCCCC</p>	
<p>AAV 인간 PKP2a 발현 카세트 (pcTnT 프로모터, 코돈 최적화됨)</p>	<p>ctgCGcgtcgtcgtcactgagccgcccgggcaagcccggcgctgggagaccttgggtgcccg gctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggcaactccatcactagggttcctgtagtaa tgattaaccgcatgctacttactctacgtagccatgcttaggaagatcggaattcGCCCTTAAGT CATGGAGAAGACCCACCTTGCAGATGTCCTCACTGGGGCTGGCA GAGCCGGCAACCTGCCCAAGGCTGCTCAGTCCATTAGGAGCCAG TAGCCTGGAAGATGTCTTTACCCCCAGCATCAGTTCAGTGGAG CAGCACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGTGA GACTTATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTCTGCCCCCAACCCTG CTCCAGCTGGCCCTCCAGGCTGGGTTGCTGGCCCTCTGCTTTA TCAGGATTCTCAAGAGGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACTGTT CCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAGCTG GAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGGTACATGTTCCGTGA GCCTTGTCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCCA CCCCACCGCCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTGCGACATT CCTCCCTCCGCAAGGGCTGGCTCACCAGGCCCCAGCCCACATGCC TGCTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTGCCTCACCCAGTCCCCGCTGA GACTGAGCAGACGCCTCCAGCCACCATGGCTGCTCCTGGTGTCT CTGCCGAGTACGGCTACATCAGAACAGTGTGGGCCAGCAGATC CTGGGACAGCTGGATTCTAGCTCTCTGGCCCTGCCTTCTGAGGCC AAGCTTCGTCGCGCGGCAGATTCTGGAAGAGGCGGCCAGACAG TGAAGTCCCTGCGGATCCAAGAACAGGTGCAGCAGACCCTGGCC AGAAAGGGCAGATCTTCTGTGCGCAACCGCAACCTGCACAGAAC CAGCTCTGTGCCCCGAGTACGTGTACAATCTGCACCTGGTGGAAA ACGACTTCGTCGCGCGGCAGATCCCCTGTGCTTAAGACCTACGAT ATGTGAAGGCCGGCACACCAGCCACCTATGAAGGCAGATGGG GAAGAGGCACAGCCAGTACAGCAGCCAGAAAAGCGTGGAGA GAGAAGCCTGCGGCACCCTCTGCGGAGACTGGAAATCAGCCCTG ATAGCAGCCCAGAGAGAGCCCACTACCCACAGCGACTACCA GTACTCCAGAGATCTCAGGCCGGCCACACACTGCACCACCAAG AGTCTAGAAGGGCCGCTCTGCTGGTGCCTCTAGATACGCCAGA TCTGAGATCGTGGCGTGTCCAGAGCCGGCACAAACAAGCAGACA GAGACACTTCGACACCTACCACCGGCAGTATCAGCACGGCAGCG TGCCGATACCGTGTTCGATAGCATCCCCGCAATCCTGCTCTGC TGACATACCCTAGACCTGGCACCTCCAGATCCATGGGCAATCTG CTGAAAAAGAGAACTACCTGACCGCCGACTGACCGTGGGAC AAGTTCGACCTCTGGTTCCCTCTGCAGCCCGTGACACAGAACAGA GCCAGCAGAAGCAGCTGGCACCAGTCCAGCTTCCACAGCACCAG AACACTGAGAGAAGCTGGCCCTAGCGTGGCCGTGGATTCTTCTG GTAGAAGGGCTCACCTGACAGTTGGCCAAGCAGCTGCAGGCGG AAGCGGAAATCTGCTGACCGAGAGAAGCACCTTACCAGCAGCC AGCTGGCAACCGCCGACATGGAATGACACTGGAACGGGCCGT GTCCATGCTGGAAGCCGATCACATGCTGCCAGCAGAAATTAGCG CCGTGCCACCTTATCCAGCACGAGTGTCCAGAAGTCTGAG GCCCGAAGAGAGTGAACCAGCTGAGAGGCATCCTGAAGCTGC TGCAGCTCCTGAAGGTGCAGAACGAGGATGTGCAGAGGGCTGTG TGTGGGGCCCTGAGAAATCTGGTGTTCGAGGACAACGACAACAA GCTGGAAGTGGCCGAGCTGAACGGCGTGCCAAGACTGCTGCAG</p>	<p>5</p>

[0034]

	<p>GTTCTGAAACAGACCCGCGACCTGGAAACAAAGAAGCAGATCA CCGGCCTGCTCTGGAACCTGAGCAGCAACGACAAGCTGAAGAAC CTGATGATCACAGAGGCCCTGTGACCCTGACAGAGAATCATCAT CATCCCTTTCAGCGGCTGGCCCGAGGGCGATTACCCTAAAGCTA ATGGCCTGCTGGACTTCGACATCTTCTACAACGTGACCGGCTGCC TGAGAAACATGTCTAGCGCTGGCGCCGATGGCAGAAAGGCCATG AGAAGATGTGACGGCCTGATCGACAGCCTGGTGCACATATGTGCG GGGCACAATCGCCGATTACCAGCCTGATGATAAGGCCACCGAGA ACTGCGTGTGCATCCTGCACAACCTGAGCTACCAGCTGGAAGCA GAGCTGCCGAGAAGTACAGCCAGAATCTACATCCAGAACCG GAACATCCAGACCGACAACAACAAGAGCATCGGCTGCTTCGGCA GCCGACGGCGAAAGTGAAGAAGCAGTACCAGGACGTGCCAT CCTGTAGGAAAAGTCTAACCCCAAAGGCGTGGAATGGCTGTGGC ACAGCATCGTGATCCGGATGTACCTGAGCCTGATCGCCAAGAGC GTGCGGAATTACACCCAAGAGGCATCTCTGGGCGCCCTGCAGAA TCTGACAGCAGGATCTGGCCCTATGCCTACCTCTGTGGCTCAGAC CGTGGTGCAGAAAGAGTCTGGCCTGCAGCACACCCGGAAGATGC TGCATGTGGGAGATCCAGCGTGAAGAAAACCGCCATCAGCCTG CTGAGAAAACCTGAGCCGGAATCTGTCTCTGCAGAATGAGATCGC CAAAGAGACACTGCCGACCTGGTGTCTATCATCCCTGACACCG TGCCTAGCACCGACCTGCTGATTGAGACAACAGCCAGCGCCTGC TACACCCTGAACAACATCATTAGAACTCCTACCAGAACGCCCG CGATCTGTGAACACAGGCGGCATCCAGAAAATCATGGCCATCT CTGCCGCGACGCCTACGCCTTAACAAGGCCTCAAAGCGCGC AGCGTGCTGCTGTATTCTCTGTGGGCCCATACCGAGCTGCACCAT GCCTATAAGAAGGCCAGTTCAAAAAGACCGACTTCGTGAACAG CCGGACCGCAAGGCCTACCACTCTCTGAAAGATTAAtaagcttgatc caatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgcctctttacgctatgtg gatacgtcttaaatgctttgtatcatgctattgcttccctgatgctttcattttctctctgtataaatctg gttgctgtctttatgaggagttgtgcccgtgtcaggcaactggtgctgtgactgtttgtgctgacg caacccccactggttgggcttccaccactgtcagctcttccgggacttcttccccctccctatt gccacggcggaactatcgccgctgcttgcctgcccgtctgacaggggctcggctgttgggactgaca atccgtgtgtgtcgggaaATCATcgtctttccTtggctgctcgcctgtgttgcactggtgattctg cggggactctctctctactgctccctcggccctcaatccagcggactctctcccggcctgctccg gctctggcctctccgctctctcagactgctccttctagtgcacccatctgttgttgc cctccccgtgcttctctgacctggaagggtccactccactgtcttcttaataaaatgaggaaattgca tcgattgtctgagtaggtgctattctatctgggggtgggtgggagacagcaaggggaggaattg ggaagacaatagcagcatctggggaCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCgaattccc ataaggatctctagagcatggctacgataaagtagcatggcggttaactaactacaaggaaacc ctagttaggagttggccactccctctctcgcgctcctcctcactgaggccggcgaccaaaaggtcgc ccgacgcccggctttgcccggcgccctcagttagcagcagcgcgcag</p>	
<p>AAV 인간 PKP2a 발현 카세트 (PKP2 프로모터, 코돈 최적화됨)</p>	<p>ctgcgctcgtcctcactgagccgcccgggcaaagcccggcgtcggcgacctttgctgccc gcctcagttagcagcagcgcgcagagaggagtgcccaactccactaggggttctgtatgtaa tgattaaccgcatgctactatctacgtagccatgcttaggaagatcggaaatcGCCTTAACA TCTCAGCATATGGTTGGATGTTTCCACCTGGCTACATAAGCAAG CTTTACACAAGGTGTAATTTGCCTAAATAGTGGTCCATTCTATTG GGGTGGGAGCAATTGCTTCCAGGACTCACATCCATATGGTCCC ACTTAGCCATGTGGCCTGCTGACAAAGGGTGGCGGAACCTGTAC TACTCTGTTGCCACGCTTTCAGTCCTTTGGTTTCTTCTTCACTCC CTGGACGCTCATGTA AAAAGGGAGGCCATATACCTGTGCATTGT GTGTCTAAGCAATTCAGTGTGTGTCTAAAGGCAGAAGGGTGTGGG TAGGAAAACAAAAGACGAGGGAAAGCTGCGTTTCTCCAAACACTTCA GACTTGAGTAAGTGGGTTTTGAGCAATTGAGTGATTGAGGG AAAGTGAACATACAAAACCCAAGCAATCAAAGGGAATATTATCTT AATACCAGGGATACATGTTTTTCTTCTGCTCTTAAGTCCAAAG</p>	<p>6</p>

[0035]

AGGCAAATCAGGACAAGTGGCTTTGGTTGTAACTTTAAGGTCA
 AGGATCCTTTCTGTTGAGCTTAGCTCTCAAGTTCTCAGTAGTCAA
 CTGCGGTGAAACATAATTAATAGCACGATAAAATACAAGTTGTGG
 AAGATTGATTGAAAAGTTGGAGGCCCTCTCCGTGGATCTCTAC
 AAAGAGCCTGTAATAAAGAGGACTTAATCAACGTTAGCAGGGCT
 ATTTAAAAAGCATCGTCTATTAATAATTCATTCTCTCTAGAGCC
 TCTTGTGGAGTTTCTCTGTGTGGGTGTGTTTCGTAAGAGAGGAAT
 GGGTTAGCAAGAGTACTGGGTACAATTTGTGTATCCAAGAGAAA
 ACAGAAGCTCTCAATGAGGAAGAACATATGTTTCTGGGACTGCA
 TCTGTGCAAAAAGTACATAGTCTGACGTTGACTAAGAAAAAA
 AACACTCTCTTAGAAAAGTCTTTTATTTCACACGTTATCTTCTTGG
 CACATTTCCCTCATATTGCCCTTTCCGCTGACCAAATAGCCCTT
 TCTCACCTCAGGTCCAGGAAAACCAGGAAACGTTTCCAACAGT
 GCGACAAAAGCCTGACTAACCAGACATACTACTCGCTCGGGGATC
 CCGGAGGCAAGCCTCAGTCCAAGAACAGGAGTACTCTCGAGG
 GCTCACCTGCCTGCAGGGCAGCCCTCCCTGCATCGAGCGGAAA
 TCCATCCTGTCCAGCGCGGGCGTGGGCAGAGCGGGGCGCGGC
 CCGGCAGGCGGTATCCGCTGGGACTCCGACAACGTGCGCGACCC
 CAGGCGAACCGCGCCCTCTCCCCACCTCCCCGCGGGCGGGTAC
 AAGTCTCCAGGTGTCCGCGCGCTCAGCGGGTCCGGCCCCCCCC
 GCCCCCGCCCCGGGCCGACTGCGCGTGCCTGGCCGCGAGCCGC
 GCCCCTCCTCAGGAAGGCCGGCGTCCGGCCACGAGGCCGA
 GCTCCCCCCCCGGCCCGCTCTACCGCGCGGGGGGCGGGCC
 AGGGCGGGGCCGACTCGAGCGGGGCGGGGCTCGCGCCAGCG
 CCCCCAGCTCCGTGGCGGTTTCGCCCCGAGTCCAGAGGCAGGC
 GAGCAGCTCGGTGCCCCACCAGCCCCATGGCTGCTCCTGGTG
 CTCTGCGGAGTACGGCTACATCAGAACAGTGTGGGCCAGCAG
 ATCTGGGACAGCTGGATTCTAGCTCTTGCCCTGCCTCTGAG
 GCCAAGCTGAAACTGCCCGCAGTTCTGGAAGAGCGGCCAGA
 CAGTGAAGTCCCTGCGGATCCAAGAACAGGTGCAGCAGACCCTG
 GCCAGAAAAGGCGAGATCTTCTGTGCGCAACGGCAACCTGCACAG
 AACAGCTCTGTGCCCGAGTACGTGTACAATCTGCACCTGGTGG
 AAAACGACTTCGTGCGCGCAGATCCCCTGTGCCTAAGACCTAC
 GATATGCTGAAGGCCGGCACCACCACCCTATGAAGGCAGATG
 GGAAGAGGCACAGCCCAGTACAGCAGCCAGAAAAGCGTGGAA
 GAGAGAAGCCTGCGGCACCCTCTGCGGAGACTGGAATCAGCCC
 TGATAGCAGCCCAGAGAGAGCCCACTACACCCACAGCGACTACC
 AGTACTCCCAGAGATCTCAGGCCGGCCACACTGCACCACCAA
 GAGTCTAGAAGGGCCGCTCTGTGGTGCCTCCTAGATACGCCAG
 ATCTGAGATCGTGGGCGTGTCCAGAGCCGGCACAACAAGCAGAC
 AGAGACACTTCGACACCTACCACCGGCAGTATCAGCACGGCAGC
 GTGTCCGATACCGTGTTCGATAGCATCCCCGCCAATCCTGCTCTG
 CTGACATACCTTAGACCTGGCACCTCCAGATCCATGGGCAATCT
 GCTGAAAAAAGAGAACTACCTGACCGCCGACTGACCGTGGGA
 CAAGTTCGACCTCTGGTTCTCTGCAGCCCGTGACACAGAACAG
 AGCCAGCAGAAGCAGCTGGCACCAAGTCCAGTTCCACAGCACC
 GAACACTGAGAGAAGCTGGCCCTAGCGTGGCCGTGGATTCTTCT
 GGTAGAAGGGCTCACCTGACAGTTGGCCAAGCAGCTGCAGGCG
 GAAGCGGAAATCTGTGACCGAGAGAAGCACCTTCACCGACAG
 CCAGCTGGGCAACCGCGACATGGAATGACACTGGAACGGGCC
 GTGTCCATGCTGGAAGCCGATCACATGCTGCCAGCAGAATTAG
 CGCCGCTGCCACCTTTATCCAGCACGAGTGCTTCCAGAAGTCTG
 AGGCCCCGAAGAGAGTGAACCAGCTGAGAGGCATCCTGAAGCT
 GCTGCAGCTCCTGAAGGTGCAGAACGAGGATGTGCAGAGGGCT
 GTGTGTGGGCCCTGAGAAATCTGGTGTTCGAGGACAACGACAA

[0036]

	<p>CAAGCTGGAAGTGGCCGAGCTGAACGGCGTGCCAAGACTGCTGC AGGTTCTGAAACAGACCCGCGACCTGGAAACAAAGAAGCAGAT CACCGGCTGCTCTGGAACCTGAGCAGCAACGACAAGCTGAAGA ACCTGATGATCACAGAGGCCCTGCTGACCCTGACAGAGAACATC ATCATCCCTTTCAGCGGCTGGCCCGAGGGCGATTACCCTAAAGC TAATGGCCTGCTGGACTTCGACATCTTCTACAACGTGACCGGCTG CCTGAGAAACATGTCTAGCGCTGGCGCCGATGCGAGAAAGGCCA TGAGAAAGATGTGACGGCCTGATCGACAGCCTGGTGCACTATGTG CGGGGCACAATCGCCGATTACCAGCCTGATGATAAAGGCCACCGA GAACTGCGTGTGCATCCTGCACAACCTGAGTACCAGCTGGAAG CAGAGCTGCCCGAGAAGTACAGCCAGAACATCTACATCCAGAAC CGGAACATCCAGACCGACAACAACAAGAGCATCGGCTGCTTCGG CAGCCGACGCCGGAAAAGTGAAAGAACAGTACCAGGACGTGCC ATGCCTGAGGAAAAGTCTAACCCCAAGGGCTGGAATGGCTGTG GCACAGCATCGTGATCCGGATGTACCTGAGCCTGATCGCCAAGA GCGTGGGAATTACACCCAAGAGGCATCTCTGGGCGCCCTGCAG AATCTGACAGCAGGATCTGGCCCTATGCCTACCTCTGTGGCTCA GACCGTGGTGCAGAAAGAGTCTGGCCTGCAGCACACCCGGAAG ATGTGCATGTGGGAGATCCCAGCGTGAAGAAAACCGCCATCAG CCTGCTGAGAAAACCTGAGCCGGAATCTGTCTCTGCAGAATGAGA TCGCCAAAGAGACACTGCCCGACCTGGTGTCTATCATCCCTGAC ACCGTGCCTAGCACCGACCTGCTGATTGAGACAACAGCCAGCGC CTGCTACACCCCTGAACAACATCATTGAGAACTCCTACCAGAACG CCCGGGATCTGCTGAACACAGGGCGCATCCAGAAAATCATGGCC ATCTCTGCCGGCGACGCCTACGCCTCTAACAAGGCCTCTAAAGC CGCCAGCGTGCTGCTGTATTCTCTGTGGGCCATACCGAGCTGCA CCATGCCTATAAGAAGGCCAGTTCAAAAAGACCGACTTCGTGA ACAGCCGGACCGCCAAAGCCTACCACTCTCTGAAAGATGTCGAC GGATCCGGTACCGATTACAAGGACGACGATGACAAGTGAAGCTT AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTGT GTGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCgaattcccataaggatctctagatgagc tacgtagataagtagcatggcgggtaataactaactacaaggaaccctagtgtgagttggccactcct ctctgcgcgctcgtcactgagggcggcgaccacaaaggtcggccgacgcccggccttggccggg cggcctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>	
<p>AAV9 계놈 서열</p>	<p>ACGGCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCT TGACGAGCATCTGCCCGCATTCTGACAGCTTTGTGAAGTGGGT GGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATC TGAATCTGATTGAGCAGGCACCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTG CAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCC GGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACT TCCACATGCACGTGCTCGTGGAAAACCACCGGGGTGAAATCCATG GTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTCGCGAAAAACTGATTCA GAGAATTTACCGCGGATCGAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTG CGGTACAAAAGACCAGAAATGGCGCCGAGGCGGGAACAAGGT GGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCC AGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTA AGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCA GCATCTGACGCACGTGTGCGACAGCAGGAGCAGAACAAAGAG AATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTATCAGATCAAAAAC TTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTGGGTGGCTCGTGGACAAGG GGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTC ATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGTCCCAAAATCAA GGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAGATTATGAGCTGACTAAAA CCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATT TCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGA</p>	<p>7</p>

[0037]

TCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAA
 AGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCTGCAACT
 ACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCC
 CTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCA
 ACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAA
 GATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAG
 GAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCCGGCCCA
 GATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGT
 GCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTCGAACACCAGCAG
 CCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCGTCT
 GGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACT
 TTTTCCGTTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAA
 TTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCA
 GTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTT
 GCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGC
 AGACAGGTACCAAAAACAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATC
 TGATCGTGTTCCTGACAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAAT
 TCAAATATCTGCTTCACTACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTG
 CTTTCCCGTGTGAGAATCTAACCCGTTTCTGTCGTAAAAAGGC
 GTATCAGAAACTGTGCTACATTCATCATAATCATGGGAAAGGTGC
 CAGACGCTTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGAT
 GACTGCATCTTTGAACAATAAatgactaaaccaggtATGGCTGCCGATG
 GTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTAGTGAAGGAATT
 CGCGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCCTCAACCCAAAGC
 AAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGAGGTCTTGCTTCCGG
 GTTACAAATACCTTGACCCGCAACGGACTCGACAAGGGGGA
 GCCGGTCAACGCAGCAGACGCGGCGGCCCTCGAGCACGACAAG
 GCCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGAGACAACCCGTACCTCAA
 GTACAACCACGCCGACGCGGAGTCCAGGAGCGGCTCAAAGAA
 GATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTCCAGGC
 CAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGG
 CTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCAGTCTCCT
 CAGGAACCCGACTCCTCCGCGGGTATTGGCAAATCGGGTGCACA
 GCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTCGGTCACTGGCGACACAG
 AGTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCC
 CCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGC
 ACCAGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGT
 TCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCCAATGGCTGGGGGACAG
 AGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACA
 ACAATCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGA
 TCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGG
 GTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTACCACGTGA
 CTGGCAGGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCTAAGC
 GACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTAGGTCAAAGAGGTTACG
 GACAACAATGGAGTCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCAC
 GGTCCAGGTCTTACGGACTCAGACTATCAGTCCCGTACGTGCT
 CGGTTCGGCTCAGAGGGCTGCCTCCCGCGTTCACAGCGGACG
 TTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAA
 GCCAGGCGGTGGGTGTTCTGCTCTTTACTGCCTGGAATATTCC
 CGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAAACAATTCCAGTTCAGCTAC
 GAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCA
 AAGCCTGGACCGACTAATGAATCCAATCATCGACCAATACTTGT
 ACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTCTGGACAGAATCAACAA
 ACGCTAAAATTCAGTGTGGCCGGACCCAGCAACATGGCTGTCCA
 GGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGT

[0038]

	GTCTCAACCACCTGTGACTCAAACAACAACAGCGAATTTGCTTGGCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACCGTTTCTTCCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTGGCAAACAAGGA ACTGGAAGAGAGACAACGTGGATGCGGACAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTAATACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACAGAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCCGGTGGGTTCAAACAAGGAATACTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTACCCCTTCTCCGCTGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGCCTTCAACAA GGACAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAGTACACTTCCAACATTACAAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAA	
PKP2 단백질	MAAPGAPAEYGYRTVLGQQILGQLDSSSLALPSEAKLKLAGSSRGGQTVKSLRIQEQQVQLARKGRSSVGNLHRTSSVPEYVYNLHLVENDFVGGRSFVPKTYDMLKAGTTATYEGRWGRGTAQYSSQKSVEERSLRHPLRRLEISPDSSPERAHYTHSDYQYSQRSQAGHTLHHQESRRAALLVPPRYARSEIVGVSRAGTTSRQRHFDTYHROYQHGSVSDTVFDSIPANPALLTYPRPQTSRSMGNLLEKENYLTAGLTVGQVRPLVPLQPVQNRASRSSHQSSFHSTRTLREAGPSVAVDSSGRRHLTVGQAAAGGSGNLLTERSTFTDSQLGNADMENMLERAVSMLEADHMLPSRISAAATFIQHECFQKSEARKRVNQLRGILKLLQLLKVNEDVQRAVCGALRNLFEDNDNKLEVAELNGVPRLLQVLKQTRDLETKKQITGLLWNLSSNDKLNLMITEALLTLTENIIPFSGWPEGDYPKANGLLDFDIFYNVTGCLRNMSAGADGRKAMRRCDGLIDSLVHYVRGTIADYQPDCKATENCVCILHNL SYQLEAELPEKYSQNYIQNRNIQT DNNKSIGCFGSRSRKVKQYQDVMPPEEKSNNPKGVEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNVTQEASLGALQNLTAGSGMPMPTVAQTVVQKESGLQHTRKMLHVGDPVSKKTAISLLRNLSRNLSLQNEIAKETLPDLVSIIPDTPSTDLLIETTASACYTLNIIQNSYQNARDLLNTGGIQKIMAISAGDAYASNKASKAASVLLYSLWAHTELHHAHYKKAQFKKIDFVNSRTAKAYHSLKD	8
WPRE	TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAATGCCITTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGGTGGTGTGTCGGGAAATCATCGTCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGACGCTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCCGCTCTGCCGCTCTTCCGCGTCTTCG	9
hGH 폴리 A 신호	CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCCTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTGGGGA	10

[0039]

WPRE - hGH 폴리 A 신호 카세트	<p>TCAACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATTCT TAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAT GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCC TCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG CCGGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGAC GCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT TCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC ATCGCCGCTGCTTGCCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTT GGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCCT TTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGA CGTCTTCTGCTACGTCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTC CTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTC GAGATCTGCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT TTGCCCTCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC CACTGTCCTTCTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA CTGGGACTCGAGTTAAGGGCGAATCCCGATAAGGATCTTCT AGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATT ACTACA</p>	11
AAV9 캡시드 아미노산 서열	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNAR GLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGD NPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKKRLLLEPLGLV EEAATAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKKRLNFGQTGD TESVPDPQPIGEPAAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSS SGNWHCDSQWLGDVVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSN DNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDRWQRLINNNWGRFRKRLNF KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLSAHE GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPQSMLRT GNNFQFSYEFENVFHSYAHQSQSLDRLMNLIDQYLYLSKTINGS GQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVQNNNS EFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFPLSGSLIFGK QGTGRDNDVADKVMITNEEIKTTPVATESYQVATNHQSAQAQ AQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSP MGGFGMKHPPQILKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSV EIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSNVVEFAVNTGEGVYSEPRPI GTRYLTRNL</p>	12

[0040]

[0041]

바이러스 벡터

[0042]

본원에 제공된 방법 및 유전자 치료 벡터에 적합한 바이러스 벡터에는, 한정하는 것은 아니지만, 바이러스 벡터 (예컨대 백시니아바이러스; 폴리오바이러스; 아데노바이러스(예컨대, Li et al. (1994) Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543-2549; Borrás et al. (1999) Gene Ther 6:515-524; Li and Davidson,(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7700-7704; Sakamoto et al. (1999) Hum Gene Ther 5: 1088-1097; WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655); 아데노 관련 바이러스(예컨대, Ali et al. (1998) Hum Gene Ther 9(1):81-86, 1998, Flannery et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:6916-6921; Bennett et al. (1997) Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857-2863; Jomary et al. (1997) Gene Ther 4:683-690; Rolling et al. (1999), Hum Gene Ther 10:641-648; Ali et al. (1996) Hum Mol Genet. 5:591-594; WO 93/09239, Samulski et al. (1989) J. Vir. 63 :3822-3828; Mendelson et al. (1988) Virol. 166: 154-165; 및 Flotte et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10613-10617); SV40; 단순 헤르페스 바이러스; 인간 면역결핍 바이러스(예컨대, Miyoshi et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 10319-10323; Takahashi et al. (1999) J Virol 73 :7812-7816)를 기반으로 한 바이러스 벡터; 레트로바이러스 벡터(예컨대, 쥐과 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 및 라우스 육종 바이러스, Harvey 육종 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 렌티바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 골수증식성 육종 바이러스, 및 유방 종양 바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터); 등이 포함된다. 수많은 적합한 발현 벡터가 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있고, 많은 것이 상업적으로 이용 가능하다. 다음의 벡터가 예로서 제공된다; 진핵 세포의 경우: pXT1, pSG5(Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40(Pharmacia), 및 pAd(Life Technologies). 그러나, 임의의 다른 벡터가 본 개시의 방법에 부합할 수 있는 한 사용이 고려된다.

[0043]

특정 바이러스가 세포를 감염시키거나 수용체 매개 세포내이입을 통해 세포에 진입하며, 바이러스 유전자를 안정적이고 효율적으로 발현하는 능력은 바이러스를 외래 핵산의 세포(예컨대, 포유류 세포)에의 전달을 위한 매력적인 후보로 만들었다. 바이러스 벡터는 관심의 폴리펩타이드의 발현을 위한 프로모터와 같은 제어 서열을 포함하는 것으로 고려된다. 비록 많은 바이러스 벡터가 숙주 세포 계능에 통합되지만, 필요하다면, 그러한 통합을 방지하기 위하여 그러한 통합을 허용하는 분절이 제거되거나 변경될 수 있다. 더욱이, 일부 구현예에서, 벡터는 포유류 복제 기원을 함유하지 않는다. 선택된 세포에 PKP2를 암호화하는 핵산을 전달하는데 사용하기 위해 고려

되는 바이러스 벡터의 비제한적인 예가 아래에서 기술된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 복제 결핍 바이러스로부터 유래된다.

- [0044] 일반적으로, 다른 유용한 바이러스 벡터는 비필수 유전자가 관심의 폴리펩타이드로 대체되어 있는 비세포변성 진핵 바이러스를 토대로 한다. 비세포변성 바이러스에는 특정 레트로바이러스가 포함되며, 이의 생애 주기는 게놈 바이러스 RNA의 DNA로의 역전사와 후속되는 숙주 세포 DNA로의 프로바이러스 통합을 포함한다. 일반적으로, 레트로바이러스는 복제 결핍성이다(예컨대, 원하는 전사체의 합성을 지시할 수 있지만, 감염성 입자를 제조할 수 없음). 그러한 유전적으로 변경된 레트로바이러스 발현 벡터는 생체내에서 폴리뉴클레오타이드의 고효율 형질도입을 위해 일반적인 유용성을 가지고 있다.
- [0045] 일부 구현예에서, PKP2를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 특정 결합 리간드를 발현하도록 조작된 감염성 바이러스 내에 수용된다. 바이러스 입자는 그로써 표적 세포의 동족 수용체에 특이적으로 결합하여 세포에 내용물을 전달할 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스는 특정 바이러스 항성을 부여하기 위해 변형되는데, 예컨대, 바이러스는 섬유모세포, 심장 세포, 또는 보다 구체적으로 심장 섬유모세포(CF)를 우선적으로 감염시킨다. AAV의 경우, 일부 경우에, 캡시드 단백질은 바이러스 벡터의 항성을 변경하기 위해 돌연변이된다. 예를 들어, 렌티바이러스 항성은 종종 상이한 엔벨로프 단백질을 사용함으로써 변형되며; 이것은 "슈도타이핑(pseudotyping)"으로서 알려져 있다.
- [0046] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 레트로바이러스는 종종 이의 유전자를 숙주 게놈에 통합시키고, 대량의 외래 유전자 물질을 전달하며, 광범위한 종 및 세포 유형을 감염시키고, 종종 특수한 세포주에 포장된다(Miller et al., Am. J. Clin. Oncol., 15(3):216-221, 1992). 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 숙주 세포 게놈에 통합되지 않도록 변경된다.
- [0047] 일부 구현예에서, 재조합 레트로바이러스는 표적 세포에의 진입을 보조하기 위해 바이러스 폴리펩타이드(예컨대, 레트로바이러스 env)를 포함한다. 그러한 바이러스 폴리펩타이드는 기술분야, 예를 들어, 미국 특허 제5,449,614호에 잘 확립되어 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 폴리펩타이드는 원래의 숙주 종의 외부의 세포를 포함한, 다수의 종으로부터 유래된 세포로의 진입을 보조하는 양쪽성 바이러스 폴리펩타이드, 예를 들어, 양쪽성 env이다. 일부 구현예에서, 바이러스 폴리펩타이드는 원래의 숙주 종의 외부의 세포로의 진입을 보조하는 이종성 바이러스 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 바이러스 폴리펩타이드는 원래의 숙주 종의 세포로의 진입을 보조하는 에코트로픽(ecotropic) 바이러스 폴리펩타이드, 예를 들어, 에코트로픽 env이다.
- [0048] 레트로바이러스의 세포로의 진입을 보조할 수 있는 바이러스 폴리펩타이드의 예로는, 한정하는 것은 아니지만: MMLV 양쪽성 env, MMLV 에코트로픽 env, MMLV 이종성 env, 수포성 구내염 바이러스-g 단백질(VSV-g), HIV-1 env, 긴팔 원숭이(Gibbon Ape) 백혈병 바이러스(GALV) env, RD114, FeLV-C, FeLV-B, MLV 10A1 env 유전자, 및 키메라를 포함한 이의 변이체를 들 수 있다[Yee et al. (1994) Methods Cell Biol, Pt A:99-112(VSV-G); 미국 특허 제5,449,614호]. 일부 경우에, 바이러스 폴리펩타이드는 발현 또는 수용체의 향상된 결합을 촉진하기 위하여 유전적으로 변형된다.
- [0049] 구현예에서, 레트로바이러스 구성물은 다양한 레트로바이러스, 예컨대, MMLV, HIV-1, SIV, FIV, 또는 본원에 기술된 다른 레트로바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 구성물은 특정 바이러스의 하나 이상의 복제 사이클에 필요한 모든 바이러스 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 경우에, 바이러스 진입의 효율은 다른 요인 또는 다른 바이러스 폴리펩타이드의 첨가에 의해 개선된다. 다른 경우에, 레트로바이러스 구성물에 의해 암호화된 바이러스 폴리펩타이드는 하나 이상의 복제 사이클을 지지하지 않는다[예컨대, 미국 특허 제 6,872,528호]. 그러한 상황에서, 다른 요인 또는 다른 바이러스 폴리펩타이드의 첨가는 종종 바이러스 진입을 용이하게 하는 것을 돕는다. 예시의 구현예에서, 재조합 레트로바이러스는 VSV-g 폴리펩타이드를 포함하지만, HIV 1 env 폴리펩타이드를 포함하지 않는 HIV-1 바이러스이다.
- [0050] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 구성물은: 프로모터, 다중 클로닝 부위, 및/또는 내성 유전자를 포함한다. 프로모터의 예로는 한정하는 것은 아니지만 CMV, SV40, EF1a, β 액틴; 레트로바이러스 LTR 프로모터, 및 유도성 프로모터를 들 수 있다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 구성물은 포장 신호(예컨대, MFG 벡터로부터 유래된 포장 신호; psi 포장 신호)를 포함한다. 기술분야에 알려져 있는 일부 레트로바이러스 구성물에는 한정하는 것은 아니지만: pMX, pBabeX 또는 이들의 유도체가 포함된다[Onishi et al. (1996) Experimental Hematology, 24:324-329]. 일부 경우에, 레트로바이러스 구성물은 자체 비활성화 렌티바이러스 벡터(SIN) 벡터이다[Miyoshi et al. (1998) J. Virol 72(10):8150-8157]. 일부 경우에, 레트로바이러스 구성물은 LL-CG, LS-CG, CL-CG, CS-CG, CLG 또는 MFG이다[Miyoshi et al. (1998) J. Virol 72(10):8150-8157; Onishi et al. (1996)

Experimental Hematology, 24:324-329; Riviere et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., 92:6733-6737].

- [0051] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 복제 결핍인 바이러스를 생성하기 위해 일부 바이러스 서열 대신 핵산 (예컨대, 관심의 폴리펩타이드를 암호화하는 것 또는 RNA)을 바이러스 게놈에 삽입함으로써 구성된다. 비리온을 생성하기 위해, gag, pol, 및 env 유전자를 함유하지만, LTR 및 포장 구성요소가 없는 포장 세포주가 구성된다 (Mann et al., Cell 33:153-159, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 포장 서열과 함께 cDNA를 함유한 재조합 플라스미드가 특수한 세포주에 도입될 때(예컨대, 칼슘 포스페이트 침전 또는 지질 형질감염에 의해), 포장 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자에 포장되는 것을 허용하고, 바이러스 입자는 나중에 배양 배지로 분비된다(Nicolas and Rubinstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati(ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986; Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983). 그런 후 재조합 레트로바이러스를 함유한 배지는 수집되고, 선택적으로 농축되고, 유전자 전달에 사용된다. 레트로바이러스 벡터는 광범위한 다양한 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 그러나, 통합 및 안정적인 발현은 전형적으로 숙주 세포의 분열을 포함한다(Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975).
- [0052] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 렌티바이러스는 복잡한 레트로바이러스로, 일반적인 레트로바이러스 유전자인 gag, pol, 및 env 외에, 조절 또는 구조적 기능을 가진 다른 유전자를 함유한다. 렌티바이러스 벡터에 대한 정보는, 예를 들어, 문헌[Naldini et al., Science 272(5259):263-267, 1996; Zufferey et al., Nat Biotechnol 15(9):871-875, 1997; Blomer et al., J Virol. 71(9):6641-6649, 1997; 미국 특허 제6,013,516호 및 제5,994,136호]에서 기술되고, 이들 문헌의 각각의 전문이 참조로 본원에 포함된다. 렌티바이러스의 일부 예에는 인간 면역결핍 바이러스: HIV-1, HIV-2 및 유인원 면역결핍 바이러스: SIV가 포함된다. 렌티바이러스 벡터는 HIV 병독성 유전자를 약독화시킴으로써 생성되었고, 예를 들어, 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef가 결실되어 생물학적으로 안전한 벡터가 만들어진다. 사용된 렌티바이러스는 때로 복제 및/또는 통합 결핍성이다.
- [0053] 재조합 렌티바이러스 벡터는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고 때로 생체내 및 생체외 유전자 전달 및 핵산 서열의 발현에 모두 사용된다. 예를 들어, 적합한 숙주 세포가 포장 기능, 즉 gag, pol 및 env, 뿐만 아니라 rev A 및 tat를 운반하는 둘 이상의 벡터로 형질감염된 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스가 전문이 참조로 본원에 포함되는 미국 특허 제5,994,136호에 기술된다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스는 엔벨로프 단백질과 항체 또는 특정 세포 유형의 수용체를 표적화하기 위한 특정 리간드와의 결합에 의해 표적화된다. 예를 들어, 표적 특이적 벡터는 때로 관심의 핵산 분절(조절 영역 포함)을, 특정 표적 세포 유형 상의 수용체에 대한 리간드를 암호화하는 또 다른 유전자와 함께 바이러스 벡터에 삽입함으로써 생성된다.
- [0054] 렌티바이러스 벡터는 기술분야에 알려져 있다. 문헌[Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, 미국 특허 제6,013,516호; 및 제5,994,136호]을 참고하며, 이들 문헌은 모두 본원에 참조로 포함된다. 일반적으로, 이들 벡터는 플라스미드 기반 또는 바이러스 기반이며, 외래 핵산 통합, 핵산 선택 및 핵산의 숙주 세포로의 전달을 위한 필수 서열을 운반하도록 구성된다. 일부 경우에, 렌티바이러스 벡터는, 제한 없이, pMD2.G, pRSV-rev, pMDLg-pRRE, 및 pRRL-GOI를 포함하는, 하나 이상의 렌티바이러스 포장 플라스미드와 동시에 세포에 도입된다. 렌티바이러스 벡터 단독 또는 렌티바이러스 포장 플라스미드와 조합된 렌티바이러스의 세포로의 도입은, 일부 구현예에서 렌티바이러스 벡터가 렌티바이러스 입자에 포장되는 것을 유발한다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 비통합 렌티바이러스(NIL) 벡터이다. NIL 벡터를 생성하기 위한 예시적인 방법, 예컨대 통합 유전자에서 D64V 치환은 US 8,119,119에서 제공된다.
- [0055] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터이다. 아데노바이러스의 유전자 구성에는 대략 36 kb, 선형, 이중 가닥 DNA 바이러스가 포함되어, 최대 7 kb의 외래 서열로 아데노바이러스 DNA의 큰 조각이 치환되는 것을 허용한다(Grunhaus et al., Seminar in Virology 200(2):535-546, 1992). 일부 경우에, PKP2는 아데노바이러스 보조 형질감염을 사용하여 세포에 도입된다. 아데노바이러스 결합 시스템을 사용하는 세포 시스템에서 증가된 형질감염 효율이 보고되었다(Kelleher and Vos, Biotechniques, 17(6):1110-7, 1994; Cotten et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89(13):6094-6098, 1992; Curiel, Nat Immun, 13(2-3):141-64, 1994.).
- [0056] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터이다. AAV는 그것이 낮은 통합 빈도를 가지며 비분열 세포를 감염시킬 수 있으므로, 예를 들어, 조직 배양에서(Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97-129, 1992) 또는 생체내에서 폴리뉴클레오타이드의 포유류 세포에의 전달에 유용하게 만들기 때문에 매력적인 벡터 시스템이다. rAAV 벡터의 생성 및 용도에 관련된 세부 사항은 미국 특허 제5,139,941호 및 제

4,797,368호에서 기술되며, 이들 각각은 전문이 참조로 본원에 포함된다.

[0057]

AAV는 복제 결핍 파보바이러스이며, 이의 단일 가닥 DNA 게놈은 2개의 145개 뉴클레오타이드 반전 말단 반복부 (ITR)를 포함하여 길이가 약 4.7 kb이다. AAV에는 다수의 혈청형이 있다. AAV 혈청형의 게놈의 뉴클레오타이드 서열은 알려져 있다. 예를 들어, AAV-1의 완전한 게놈은 GenBank 수탁 번호 NC_002077로 제공되고; AAV-2의 완전한 게놈은 GenBank 수탁 번호 NC_001401 및 문헌[Srivastava et al., *J. Virol.*, 45: 555-564(1983)]에 제공되며; AAV-3의 완전한 게놈은 GenBank 수탁 번호 NC_1829로 제공되고; AAV-4의 완전한 게놈은 GenBank 수탁 번호 NC_001829로 제공되며; AAV-5 게놈은 GenBank 수탁 번호 AF085716으로 제공되고; AAV-6의 완전한 게놈은 GenBank 수탁 번호 NC_001862로 제공되며; AAV-7 및 AAV-8 게놈의 적어도 일부는 각각 GenBank 수탁 번호 AX753246 및 AX753249로 제공되고; AAV-9 게놈은 문헌[Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388(2004)]에서 제공되며; AAV-10 게놈은 문헌[Mol. Ther., 13(1): 67-76(2006)]에서 제공되고; AAV-11 게놈은 문헌[Virology, 330(2): 375-383(2004)]에서 제공된다. AAV rh.74 게놈의 서열은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제 9,434,928호에 제공된다. 바이러스 DNA 복제(rep), 캡시드화/포장 및 숙주 세포 염색체 통합을 지시하는 시스템 서열은 AAV ITR 내에 함유된다. 3개의 AAV 프로모터(상대적인 지도 위치에 대해 p5, p19, 및 p40으로 명명됨)가 rep 및 cap 유전자를 암호화하는 2개의 AAV 내부 오픈 리딩 프레임의 발현을 구동시킨다. 단일 AAV 인트론의 상이한 스플라이싱(뉴클레오타이드 2107 및 2227에서)과 결합되어 있는 2개의 rep 프로모터(p5 및 pi 9)는 rep 유전자로부터 4개의 rep 단백질(rep 78, rep 68, rep 52, 및 rep 40)의 생성을 초래한다. Rep 단백질은 궁극적으로 바이러스 게놈 복제를 담당하는 다수의 효소적 특성을 가지고 있다. cap 유전자는 p40 프로모터로부터 발현되고 3개의 캡시드 단백질 VP1, VP2, 및 VP3을 암호화한다. 대체 스플라이싱 및 비공통 번역 출발 부위는 3개의 관련된 캡시드 단백질의 생성을 담당한다. 단일 공통 폴리아데닐화 부위는 AAV 게놈의 지도 위치 95에 위치한다. AAV의 생애 주기 및 유전학은 문헌[Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129(1992)]에서 검토된다.

[0058]

AAV는 예를 들어, 유전자 치료에서 외래 DNA를 세포에 전달하기 위한 벡터로서 AAV를 매력적으로 만드는 독특한 특징을 가지고 있다. 배양 중에 세포의 AAV 감염은 비세포 변성적이며, 인간 및 다른 동물의 자연적인 감염은 조용하고 무증상이다. 더욱이, AAV는 많은 포유류 세포를 감염시켜서 생체내에서 많은 상이한 조직을 표적화하는 가능성을 허용한다. 더욱이, AAV는 느리게 분열하는 세포 및 비분열 세포를 형질도입하며, 종종 본질적으로 전사 활성 핵 에피솜(염색체 외 요소)으로서 해당 세포의 수명 동안 지속된다. 본 개시에 특히 중요한 것은, AAV, 특히 AAV9가 심장, 예컨대 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포를 감염시킬 수 있다는 것이다(Prasad et al, 2011; Piras et al, 2016; Ambrosi et al., 2019). AAV 프로바이러스 게놈은 플라스미드에 클로닝된 DNA로서 삽입되어 제조할 게놈의 구성을 가능하게 만든다. 나아가, AAV 복제 및 게놈 캡슐화를 지시하는 신호가 AAV 게놈의 ITR 내에 함유되기 때문에, 일부 경우에, 내부의 대략 4.3 kb의 게놈(복제 및 구조 캡시드 단백질, rep-cap를 암호화함)의 일부 또는 전부가 외래 DNA로 대체된다. AAV 벡터를 생성하기 위하여, 일부 경우에, rep 및 cap 단백질은 트랜스로 제공된다. AAV의 또 다른 중요한 특징은 그것이 매우 안정적이고 왕성한 바이러스라는 것이다. 그것은 아데노바이러스를 비활성화하기 위해 사용된 조건(수 시간 동안 56°C 내지 65°C)을 쉽게 견뎌서 AAV의 저온 보존을 덜 중요하게 만든다. 일부 경우에, AAV는 심지어 동결건조된다. 마지막으로, AAV 감염 세포는 중복감염에 대한 내성이 없다. 본 개시의 AAV 벡터는 자체 상보적인, 듀플렉스 AAV 벡터, 합성 ITR, 및/또는 포장 호환성이 증가된 AAV 벡터를 포함한다. 예시적인 방법은 US 8,784,799; US 8,999,678; US 9,169,494; US 9,447,433; 및 US 9,783,824에 제공되며, 이들 각각은 전문이 참조로 포함된다.

[0059]

rAAV 게놈의 AAV DNA는, 한정하는 것은 아니지만, AAV 혈청형 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 및 AAV rh74를 포함한, 제조할 바이러스가 유래될 수 있는 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래되는 것으로 고려된다. 슈도타입 rAAV의 생성은, 예를 들어, WO 01/83692에서 개시된다. 다른 유형의 rAAV 변이체, 예를 들어 캡시드 돌연변이가 있는 rAAV가 또한 고려된다. 예를 들어, 문헌[Marsic et al., *Mol. Therapy*. 22):1900-09(2014)]을 참고한다. 다양한 AAV 혈청형의 게놈의 뉴클레오타이드 서열이 기술분야에 알려져 있다. 본 개시의 AAV 벡터에는 혈청형 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV39, AAV43, AAV.rh74, 및 AAV.rh8의 AAV 벡터가 포함된다. 예시적인 AAV 벡터는 US 63/012,703; US 7,105,345; US 15/782,980; US 7,259,151; US 6,962,815; US 7,718,424; US 6,984,517; US 7,718,424; US 6,156,303; US 8,524,446; US 7,790,449; US 7,906,111; US 9,737,618; 미국 출원 15/433,322; US 7,198,951에서 제공되며, 이들의 각각은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0060]

일부 구현예에서, AAV 발현 벡터는 표적화를 향상시키기 위하여 슈도타입된다. 유전자 전달을 촉진하고 심근 세포에서의 발현을 지속시키기 위하여, AAV6, AAV8, 및 AAV9가 사용되는 것이 고려된다. 일부 경우에, AAV2 게

논문 문헌[Balaji et al. J Surg Res. 184:691-98 (2013)]에서 기술된 것과 같이, 슈도타이핑된 벡터 AAV2/5, AAV2/7, 및 AAV2/8을 각각 생성하는 캡시드에 포장된다. 일부 구현예에서, AAV9는 문헌[Piras et al. Gene Therapy 23:469-478 (2016)]에서 기술된 것과 같이, 근섬유모세포 유사 계통에서의 발현을 표적화하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, AAV1, AAV6, 또는 AAV9가 사용되며, 일부 구현예에서, AAV는 문헌[Asokari et al. Hum Gene Ther. 24:906-13 (2013); Pozsgai et al. Mol Ther. 25:855-69 (2017); Kotterman et al. Nature Reviews Genetics 15:445-51 (2014); 및 Schaffer 등에 대한 US20160340393A1]에서 기술된 것과 같이 조작된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 US20180066285A1에서 기술된 표적 세포 감염성을 증가시키기 위해 조작된 AAV이다.

[0061] 일부 구현예에서, 본 개시의 AAV 벡터는, 특히 심장 세포, 또는 보다 구체적으로 심근세포의 생체내 또는 생체외 형질도입을 향상 또는 촉진하기 위해 조작된; 또는 대상체의 면역 체계를 회피하는; 또는 개선된 생체분포를 가지는 캡시드로서 변형된 캡시드를 포함한다. 예시적인 AAV 캡시드는 US 7,867,484; US 9,233,131; US 10,046,016; WO 2016/133917; WO 2018/222503; 및 WO 20019/060454에서 제공되며, 이들 각각은 그 전문이 참조로 포함된다. AAV 캡시드에서(또는 특히 AAV9 캡시드에서), 심근, 심외막, 또는 둘 다의 세포를 향한 감염성을 증가시키기 위하여 하나 이상의 치환이 고려된다. 보다 구체적으로, 일부 구현예에서, 개시의 AAV 벡터, 선택적으로 AAV9 기반 벡터는 이의 캡시드 단백질에 하나 이상의 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 개시의 AAV 벡터는 AAV-A9 캡시드 및/또는 혈청형을 포함한다. 이들 치환 및 삽입은 본 개시에 유용한 다양한 캡시드 단백질을 생성하기 위하여 함께 조합될 것으로 고려되는 것이 인정될 것이다.

[0062] **바이러스 벡터의 제조 방법**

[0063] 일반적으로, 바이러스 벡터는 바이러스 DNA 또는 RNA 구성물을 생산자 세포에 도입시킴으로써 제조된다. 일부 경우에, 생산자 세포는 외인성 유전자를 발현하지 않는다. 다른 경우에, 생산자 세포는 하나 이상의 외인성 유전자, 예컨대, 하나 이상의 gag, pol, 또는 env 폴리펩타이드 및/또는 하나 이상의 레트로바이러스 gag, pol, 또는 env 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자를 포함하는 "포장 세포"이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 포장 세포는 표적 세포로의 진입을 보조하는 바이러스 폴리펩타이드, 예컨대, VSV-g를 암호화하는 유전자를 포함한다. 일부 경우에, 포장 세포는 하나 이상의 렌티바이러스 단백질, 예컨대, gag, pol, env, vpr, vpu, vpx, vif, tat, rev, 또는 nef를 암호화하는 유전자를 포함한다. 일부 경우에, 포장 세포는 E1 A 또는 E1 B와 같은 아데노바이러스 단백질 또는 다른 아데노바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 포장 세포에 의해 공급된 단백질은 gag, pol, 및 env와 같은 레트로바이러스 유래 단백질; gag, pol, env, vpr, vpu, vpx, vif, tat, rev, 및 nef와 같은 렌티바이러스 유래 단백질; 및 E1 A 및 E1 B와 같은 아데노바이러스 유래 단백질이다. 많은 예에서, 포장 세포는 바이러스 벡터가 유래되는 바이러스와 상이한 바이러스로부터 유래된 단백질을 공급한다. 포장 세포로부터 재조합 바이러스를 제조하는 방법 및 이의 용도는 잘 확립되어 있다; 예컨대, 미국 특허 제5,834,256호; 제6,910,434호; 제5,591,624호; 제5,817,491호; 제7,070,994호; 및 제6,995,009호를 참고한다.

[0064] 포장 세포주에는 한정하는 것은 아니지만 임의의 쉽게 형질감염 가능한 세포주가 포함된다. 포장 세포주는 종종 293T 세포, NIH3T3, COS 또는 HeLa 세포주를 기반으로 한다. 포장 세포는 종종 바이러스 포장에 필요한 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 유전자가 결핍된 바이러스 벡터 플라스미드를 포장하기 위해 사용된다. 그러한 바이러스 벡터 또는 플라스미드에 의해 암호화된 단백질로부터 결여된 단백질 또는 폴리펩타이드를 공급하는 임의의 세포가 포장 세포로서 사용되는 것이 고려된다. 포장 세포주의 예로는, 한정하는 것은 아니지만: 백금-E(Plat-E), 백금-A(Plat-A), BOSC 23(ATCC CRL 11554) 및 Bing(ATCC CRL 11270)을 들 수 있다[Morita et al. (2000) Gene Therapy 7(12): 1063-1066; Onishi et al. (1996) Experimental Hematology, 24:324-329; 미국 특허 제6,995,009호]. 상업적인 포장 계통, 예컨대, Ampho-Pak 293 세포주, Eco-Pak 2-293 세포주, RetroPack PT67 세포주, 및 Retro-X 범용 포장 시스템(모두 Clontech로부터 이용 가능함)이 또한 유용하다.

[0065] 바이러스 벡터 플라스미드(또는 구성물)에는: 레트로바이러스 시스템으로서 pMX, pMx-IB, pMX-퓨로, pMX-네오(pMX-IB는 pMX-퓨로의 퓨로마이신 내성 유전자 대신 블라스티시딘 내성 유전자를 운반하는 벡터임)[Kimura et al. (2003) Experimental Hematology 31 : 1007-1014; MFG Riviere et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., 92:6733-6737; pBabePuro; Morgenstern et al. (1990) Nucleic Acids Research 18:3587-3596; LL-CG, CL-CG, CS-CG, CLG Miyoshi et al. (1998) J. Vir. 72:8150-8157] 등, 및 아데노바이러스 시스템으로서 pAdex1[Kanegae et al. (1995) Nucleic Acids Research 23 :3816-3821] 등이 포함된다. 예시의 구현예에서, 레트로바이러스 구성물은 블라스티시딘(예컨대, pMX-IB), 퓨로마이신(예컨대, pMX-퓨로, pBabePuro), 또는 네오마

이신(예컨대, pMX-neo)을 포함한다[Morgenstern et al. (1990) *Nucleic Acids Research* 18:3587-3596].

[0066] **프로모터 및 인핸서**

[0067] 일부 구현예에서, PKP2를 암호화하는 핵산은 PKP2의 발현을 용이하게 하기 위하여 프로모터 및/또는 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 활용된 숙주/백터 시스템에 따라, 구성적, 조직 특이적, 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서 요소, 전사 종결자, 등을 포함한 많은 적합한 전사 및 번역 대조군 요소 중 임의의 것이 발현 백터에서 사용하기에 적합하다(예컨대, Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

[0068] 적합한 진핵 프로모터(진핵 세포에서 기능적인 프로모터)의 비제한적인 예로는 CMV, CMV 즉시 초기, HSV 티미딘 키나제, 초기 및 후기 SV40, 레트로바이러스로부터의 긴 말단 반복부(LTR), 및 마우스 메탈로티오네인-I을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 심근, 심외막, 또는 둘 다에서의 발현을 부여하는 프로모터를 포함한, 심장 특이적 발현을 부여할 수 있는 프로모터가 사용될 것이다(Prasad et al., 2011). 적합한 심장 특이적 프로모터의 비제한적인 예로는 알파 미오신 중쇄(α -MHC), 미오신 경쇄 2(MLC-2), 심장 트로포닌 T(cTnT), 및 심장 트로포닌 C(cTnC)를 들 수 있다. 일부 구현예에서, PKP2 또는 데스민 프로모터가 사용된다. 일부 경우에, 심장 특이적 발현을 갖는 키메라 프로모터가 사용된다. 일부 경우에, 심장 특이적 인핸서가 프로모터와 조합된다.

[0069] PKP2 발현을 구동하기에 적합한 프로모터의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 레트로바이러스 긴 말단 반복부(LTR) 요소; CMV, HSV1-TK, SV40, EF-1a, β -액틴, 포스포글리세롤 키나제(PGK)와 같은 구성적 프로모터; 유도성 프로모터, 예컨대 Tet-오퍼레이터 요소를 함유한 프로모터; 및 심장 특이적 프로모터, 예컨대 알파 미오신 중쇄(α -MHC), 미오신 경쇄 2(MLC-2), 심장 트로포닌 T(cTnT), 및 심장 트로포닌 C(cTnC)를 들 수 있다. 일부 구현예에서, PKP2 또는 데스민 프로모터가 사용된다. 일부 구현예에서, 심장 특이적 발현을 갖는 키메라 프로모터가 사용된다. 일부 경우에, 심장 특이적 인핸서가 프로모터와 조합된다.

[0070] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 세포 유형 특이적 전사 조절 요소(TRE)에 작동 가능하게 연결되며, 여기서 TRE는 프로모터 및 인핸서를 포함한다. 적합한 TRE에는, 한정하는 것은 아니지만, 다음 유전자로부터 유래된 TRE가 포함된다: 미오신 경쇄-2, α -미오신 중쇄, AE3, 심장 트로포닌 C, 심장 액틴[Franz et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins et al. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn et al. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek et al. (1994) *Cell. Biol.* 14: 1870-1885; Hunter et al. (1993) *Hypertension* 22:608-617; 및 Sartorelli et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4047-4051].

[0071] 대안적으로, 자연적인 환경에서 핵산과 정상적으로 회합되지 않는 프로모터를 지칭하는 재조합 또는 이중성 프로모터의 제어 하에 코딩 핵산 분절을 위치시킴으로써 특정 장점이 얻어질 것이다. 재조합 또는 이중성 인핸서는 또한 자연적인 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 회합되지 않는 인핸서를 지칭한다. 그러한 프로모터 또는 인핸서는 종종 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 원핵, 바이러스, 또는 진핵 세포로부터 분리된 프로모터 또는 인핸서, 및 "자연적으로 발생"하지 않는, 즉, 상이한 전사 조절 영역의 상이한 요소, 및/또는 발현을 변경시키는 돌연변이를 함유한 프로모터 또는 인핸서를 포함한다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성에 의해 제조하는 것 외에, 본원에 기술된 조성물과 관련하여, 서열은 때로 PCR을 포함한 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 제조된다(미국 특허 제4,683,202호, 미국 특허 제5,928,906호를 참고하며, 이들 각각은 참조로 포함된다).

[0072] 일부 구현예에서, 개시의 백터는 하나 이상의 폴리A 신호를 포함한다. 개시의 백터에 유용한 예시적인 폴리A 신호에는 짧은 폴리A 신호 및 bGH 폴리A 신호가 포함된다. 일부 구현예에서, 개시의 백터는 하나 이상의 3' 요소를 포함한다. 예시적인 3' 요소에는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)가 포함된다.

[0073] **유전자 치료 백터 조성물**

[0074] 조성물을 제조하기 위하여, 백터 및/또는 세포가 생성되고, 백터 또는 세포는 필요에 따라 또는 원하는 대로 정제된다. 백터, 및/또는 다른 작용제는 때로 제약학적으로 허용 가능한 담체에 현탁된다. 일부 구현예에서, 조성물은 동결건조된다. 이들 화합물 및 세포는 종종 적절한 농도로 조정되고, 선택적으로 다른 작용제와 조합된다. 단위 용량에 포함된 주어진 화합물 및/또는 다른 작용제의 절대 중량은 광범위하게 달라진다. 투여 용량 및 횟수는 기술분야에 숙련된 사람들에게 의해 최적화될 것으로 고려된다.

[0075] 예를 들어, 일부 구현예에서, 약 10^2 - 10^{10} 백터 계놈(vg)이 투여된다. 일부 구현예에서, 용량은 적어도 약 10^2 vg, 약 10^3 vg, 약 10^4 vg, 약 10^5 vg, 약 10^6 vg, 약 10^7 vg, 약 10^8 vg, 약 10^9 vg, 약 10^{10} vg, 또는 그 이상의 백터 계놈이다. 일부 구현예에서, 용량은 약 10^2 vg, 약 10^3 vg, 약 10^4 vg, 약 10^5 vg, 약 10^6 vg, 약 10^7

vg, 약 10^8 vg, 약 10^9 vg, 약 10^{10} vg, 또는 그 이상의 벡터 계놈이다.

- [0076] 화합물의 일일 용량 역시 달라진다. 그러한 일일 용량은 종종, 예를 들어, 적어도 약 10^2 vg/일, 약 10^3 vg/일, 약 10^4 vg/일, 약 10^5 vg/일, 약 10^6 vg/일, 약 10^7 vg/일, 약 10^8 vg/일, 약 10^9 vg/일, 약 10^{10} vg/일, 또는 그 이상의 벡터 계놈/일의 범위이다.
- [0077] 일부 구현예에서, 개시의 방법은 개시의 벡터 또는 벡터 시스템(예컨대 rAAV 벡터)를 심장내 주사, 심근내 주사, 심장 내부 주사, 심장내 카테터 삽입, 또는 전신 투여에 의해 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체(예컨대, 인간)는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} GC의 벡터(예컨대, AAV 벡터 또는 렌티바이러스 벡터)를 심장내 주사, 심근내 주사, 심장 내부 주사, 심장내 카테터 삽입, 또는 전신 투여에 의해 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} GC, 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} GC, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} GC, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} GC, 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{12} GC, 또는 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{13} GC의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{10} GC, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{11} GC, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12} GC, 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{13} GC, 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{14} GC, 또는 약 1×10^{13} 내지 약 1×10^{15} GC의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 적어도 1×10^8 , 적어도 약 1×10^9 , 적어도 약 1×10^{10} , 적어도 약 1×10^{11} , 적어도 약 1×10^{12} , 적어도 약 1×10^{13} , 또는 적어도 약 1×10^{15} GC의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 최대 1×10^8 , 최대 약 1×10^9 , 최대 약 1×10^{10} , 최대 약 1×10^{11} , 최대 약 1×10^{12} , 최대 약 1×10^{13} , 또는 최대 약 1×10^{15} GC의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체(예컨대, 인간)는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} GC/kg의 벡터(예컨대, AAV 벡터 또는 렌티바이러스 벡터)를 심장내 주사에 의해 또는 전신적으로 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} GC/kg, 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} GC/kg, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} GC/kg, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} GC/kg, 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{12} GC/kg, 또는 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{13} GC/kg의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 약 1×10^8 내지 약 1×10^{10} GC/kg, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{11} GC/kg, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12} GC/kg, 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{13} GC/kg, 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{14} GC/kg, 또는 약 1×10^{13} 내지 약 1×10^{15} GC/kg의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 적어도 1×10^8 , 적어도 약 1×10^9 , 적어도 약 1×10^{10} , 적어도 약 1×10^{11} , 적어도 약 1×10^{12} , 적어도 약 1×10^{13} , 또는 적어도 약 1×10^{15} GC/kg의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 일부 구현예에서, 대상체는 최대 1×10^8 , 최대 약 1×10^9 , 최대 약 1×10^{10} , 최대 약 1×10^{11} , 최대 약 1×10^{12} , 최대 약 1×10^{13} , 또는 최대 약 1×10^{15} GC/kg의 벡터를 투여함으로써 치료된다. 치료에 사용하기 위한 벡터의 양은 선택된 특정 담체뿐만 아니라 투여 경로, 치료되는 병태의 본질 및 환자의 연령 및 상태에 따라 달라질 것임이 인정될 것이다. 궁극적으로, 일부 구현예에서, 간병 의료 제공자는 적절한 투여량을 결정할 것이다. 제약학적 조성물은 투여를 위한 단일 단위 투여 형태에서 각각의 화합물의 적절한 비율로 체제화되는 것으로 고려된다.
- [0078] 조성물은 때로 지속적인 방출을 위해 제제화된다(예를 들어, 마이크로캡슐화를 사용함, WO 94/07529, 및/또는 미국 특허 제4,962,091호 참고). 적절하다면 제제는 분리된 단위 투여 형태로 편리하게 제공되며, 일부 구현예에서, 제약학 기술분야에 잘 알려져 있는 임의의 방법에 의해 제조된다. 그러한 방법에는 종종 치료제를 액체 담체, 고체 매트릭스, 반고체 담체, 미세하게 분할된 고체 담체 또는 이들의 조합과 혼합하는 단계, 및 그런 후, 필요하다면, 생성물을 원하는 전달 시스템에 도입하거나 성형하는 단계가 포함된다.
- [0079] 화합물을 함유하는 하나 이상의 적합한 단위 투여 형태는, 일부 구현예에서, 비경구(피하, 정맥내, 근육내 및 복강내 포함), 심장내, 심낭, 경구, 직장, 피부, 경피, 흉강내, 폐내, 및 비강내(호흡기) 경로를 포함한 다양한 경로에 의해 투여된다.
- [0080] 본원에 제공된 유전자 치료 벡터는 수성 용액, 현탁액, 정제, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐, 및 리포솜을 포함하는 많은 형태 및 다른 서방성 제제, 예컨대 성형 중합체 겔로 제조된다. 유전자 치료 벡터의 투여는 종종 수성

용액으로 비경구 또는 국소 투여를 포함한다. 유사하게, 유전자 치료 벡터를 함유한 조성물은 때로 장치, 스키펠드로, 또는 지속성 방출 제제로서 투여된다. 상이한 유형의 제제화 과정은 미국 특허 제6,306,434호 및 그 안에 포함된 참고문헌에서 기술된다.

[0081] 벡터는, 일부 구현예에서, 비경구 투여(예컨대, 주사, 예를 들어, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의해)를 위해 제제화되며 종종 보존제가 첨가되어 있는 앰플, 사전 충전된 주사기, 소량 부피 주입 용기 또는 다중 용량 용기에 단위 투여 형태로 제공된다. 제약학적 조성물은 종종 현탁액, 용액, 또는 유성 또는 수성 비히클 중의 에멀션의 형태를 가지며, 때로 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화제를 함유한다. 적합한 담체에는 식염수 용액, 인산염 완충 식염수, 및 기술분야에서 일반적으로 사용되는 다른 물질이 포함된다.

[0082] 조성물은 때로 또한 심장 질환, 병태 및 손상의 치료에 유용한 작용제, 예컨대, 예를 들어, 항응고제(예컨대, 달테파린(프라그민), 다나파로이드(오르가란), 에녹사파린(로베녹스), 헤파린, 틴자파린(이노헵), 및/또는 와파린(쿠마딘)), 항혈소판제(예컨대, 아스피린, 티클로피딘, 클로피도그렐, 또는 다이피리다몰), 안지오텐신 전환효소 억제제(예컨대, 베나제프릴(로텐신), 캡토프릴(캡토텐), 에날라프릴(바스테크), 포시노프릴(모노프릴), 리시노프릴(프리니빌, 제스트릴), 모엑시프릴(유니바스크), 페린도프릴(아세온), 퀴나프릴(아큐프릴), 라미프릴(알타스), 및/또는 트란돌라프릴(마빅)), 안지오텐신 II 수용체 차단제(예컨대, 칸데사르탄(아타칸드), 예프로사르탄(데베텐), 이르베사르탄(아바프로), 로사르탄(코자), 텔미사르탄(미카르디스), 및/또는 발사르탄(디오반)), 베타 차단제(예컨대, 아세부톨롤(섹트랄), 아테놀롤(테노르민), 베타솔롤(케를론), 비소프롤롤/하이드로클로로티아지드(Ziac), 비소프롤롤(제베타), 카르테올롤(카르트롤), 메토프롤롤(로프레스, 토프롤 XL), 나돌롤(코르가르트), 프로프라놀롤(인데랄), 소탈롤(베타페이스), 및/또는 티몰롤(블로카드렌)), 칼슘 채널 차단제(예컨대, 암로디핀(노르바스크, 로트렐), 베프리딜(바스코르), 딜티아젠펜(카르디젠펜, 티아자크), 펠로디핀(플렌딜), 니페디핀(아달라트, 프로카르디아), 니모디핀(니모탑), 니솔디핀(술라), 베라파밀(칼란, 이소프틴, 베렐란)), 이노제(예컨대, 아밀로리드(미다모르), 부메타니드(부맥스), 클로로티아지드(디우렐), 클로르탈리돈(하이드로톤), 푸로세미드(라식스), 하이드로-클로로티아지드(데시드릭스, 하이드로디우렐), 인다파미드(로졸) 및/또는 스피로놀락톤(알다톤)), 혈관확장제(예컨대, 이질산 이소소르비드(이소르딜), 네시리티드(나트레코르), 하이드릴라진(아프레솔린), 질산염 및/또는 미녹시딜), 스타틴, 니코틴산, 캄피브로질, 클로피브레이트, 디곡신, 디기톡신, 라녹신 또는 이것들의 조합과 같은 다른 성분을 함유한다.

[0083] 항박테리아제, 항미생물제, 항바이러스제, 생물학적 반응 변형제, 성장 인자; 면역 조절제, 단클론성 항체 및/또는 보존제와 같은 추가 작용제가 때로 포함된다. 본원에 제공된 조성물은 또한 다른 형태의 치료법과 함께 사용되는 것으로 고려된다.

[0084] 본원에 기술된 바이러스 벡터는 질환 또는 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여하기에 적합하다. 일부 구현예에서, 그러한 조성물은 예를 들어, 수형체의 생리적 조건, 투여 목적이 외상성 손상에 대한 반응인지 또는 보다 지속적인 치료 목적인지, 그리고 숙련된 전문가에게 알려져 있는 다른 요인에 따라 연속 또는 간헐적 방식으로 단일 용량으로, 다중 용량으로 존재한다. 본원에 제공된 화합물 및 조성물의 투여는, 일부 구현예에서, 연속적으로 미리 선택된 기간에 걸쳐 투여되거나 또는 대안적으로 일련의 간격을 둔 용량으로 투여된다. 국소 및 전신적 투여가 모두 고려된다. 일부 구현예에서, 바이러스 또는 비바이러스 벡터의 국지화된 전달이 달성된다. 일부 구현예에서, 세포 및/또는 벡터의 국지화된 전달은 심장 내 세포의 집단을 생성하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 그러한 국지화된 집단은 심장에 대한 "심박 조율 세포"로서 작동한다.

[0085] 정의

[0086] 본원에서 사용되는 바, 용어 "심근병증"은 심장이 비정상적으로 커지고, 두꺼워지고/거나 경직되는 심근(심장 근육)의 임의의 질환 또는 기능장애를 지칭한다. 그 결과로서, 심장 근육의 혈액을 펌핑하는 능력은 일반적으로 약해진다. 질환 또는 장애의 병인은, 일부 경우에, 염증성, 대사성, 독성, 침윤성, 섬유조직 형성성, 혈액학적, 유전적이거나, 기원이 알려지지 않았다. 심근병증에는 두 가지 일반 유형: 허혈성(산소 결핍으로부터 비롯됨) 및 비허혈성이 있다. 일부 경우에, 심근병증은 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)이다.

[0087] "심부전(HF)"은 좌심실 충전압을 과도하게 증가시키지 않으면서 신체의 대사 요구를 충족시키기에 부적합한 진성 관류를 유발하는 임의의 구조적 또는 기능적 심혈관 장애로부터 종종 비롯되는 복잡한 임상 증후군이다. 그것은 특징적인 증상, 예컨대 호흡곤란 및 피로, 및 체액 저류와 같은 징후를 특징으로 한다. 본원에서 사용되는 바, "만성 심부전" 또는 "울혈성 심부전" 또는 "CHF"는, 상호교환적으로, 진행 중이거나 지속적인 형태의 심부전을 지칭한다. CHF에 대한 일반적인 위험 요인에는 고령, 당뇨병, 고혈압 및 과체중이 포함된다. CHF는 좌심

실의 수축기 기능에 따라 박출률이 감소되거나 보존된 HF(HFrEF 및 HFpEF)로 광범위하게 분류된다. 용어 "심부전"은 심장이 정지하였거나 완전히 쇠약해지고 있는 것을 의미하는 것은 아니지만, 건강한 사람의 정상적인 것보다 약한 것을 의미한다. 일부 경우에, 병태는 경미하여 운동할 때 눈에 띄는 증상을 유발하고, 다른 경우에, 병태는 더 중증이어서 일부 경우에 휴식 중에도 생명을 위협하는 증상을 유발한다. 만성 심부전의 가장 흔한 증상에는 호흡 곤란, 피로, 다리와 발목의 붓기, 흉통 및 기침이 포함된다. 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 CHF(예컨대, HFrEF)를 앓고 있거나 발병의 위험이 있는 대상체에서 CHF(예컨대, HFrEF)의 하나 이상의 증상을 감소, 예방, 또는 개선한다. 일부 구현예에서, 본 개시는 CHF 및 때로 CHF로 이어지는 병태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0088] 본원에서 사용되는 바 "급성 심부전" 또는 "비대상성 심부전(decompensated heart failure)"은, 상호교환적으로, 심장이 정상 충만 압력에서 신체의 필요에 상응하는 속도로 혈액을 펌핑하지 못하는 무능력을 반영하는 징후 및 증상이 악화되는 증후군을 지칭한다. AHF는 전형적으로 며칠 내지 몇 주에 걸쳐 점진적으로 전개되고 그런 후 대상부전이 되어 이들 징후 또는 증상의 증중도로 인해 긴급 또는 응급 치료를 필요로 한다. 일부 경우에, AHF는 심장의 수축기 또는 이완기 기능의 일차적 장애 또는 비정상적인 정맥 또는 동맥 혈관수축의 결과이지만, 일반적으로 체적 과부하를 포함한 다수의 요인의 상호작용을 나타낸다. AHF 환자의 대부분은 만성 심부전(CHF)의 대상부전을 가지며 결과적으로 CHF의 병태생리학, 표현, 및 진단에 대한 많은 논의가 AHF에 대한 이해와 직접적으로 관련된다. 다른 경우에, AHF는 심장에 대한 손상 또는 심장 기능에 손상을 입히는 사건, 예컨대 급성 심근 경색, 중증의 고혈압, 심장 판막 손상, 비정상적인 심장 박동, 심장의 염증 또는 감염, 독소 및 약물치료로부터 비롯된다. 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 AHF를 앓고 있거나 발병의 위험이 있는 대상체에서 AHF의 하나 이상의 증상을 감소, 예방, 또는 개선한다. 일부 구현예에서, 본 개시는 AHF 및 때로 AHF로 이어지는 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 경우에, AHF는 심근 경색과 관련된 허혈의 결과이다.

[0089] 본원에서 사용되는 바, 용어 "대상체" 또는 "개체"는 임의의 동물, 예컨대 가축, 동물원 동물, 또는 인간을 지칭한다. 일부 경우에, "대상체" 또는 "개체"는 개, 고양이, 말, 가축, 동물원 동물, 또는 인간과 같은 포유류이다. 대안적으로 또는 조합하여, 대상체 또는 개체는 새, 애완동물, 또는 농장 동물과 같은 가축이다. "대상체" 및 "개체"의 구체적인 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 심장 질환 또는 장애가 있는 개체, 및 심장 장애 관련 특징 또는 증상, 예컨대 부정맥 유발성 우심실 심근병증(ARVC) 또는 부정맥 유발성 심근병증(ACM)이 있는 개체를 들 수 있다.

[0090] 본 개시의 실시는, 달리 표시되지 않는 한, 기술분야의 기술범위 내에 있는 조직 배양, 면역학, 분자 생물학, 세포 생물학 및 재조합 DNA의 종래 기법을 사용할 것이다. 예컨대 문헌[Sambrook and Russell eds. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology(Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach(IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney(2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; 미국 특허 제4,683,195호; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; IRL Press (1986) Immobilized Cells and Enzymes; Perbal(1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd edition (2002) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sohail (2004) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC Press); Sell (2013) Stem Cells Handbook]을 참고한다.

[0091] 맥락이 다르게 표시하지 않는 한, 본원에 기술된 개시의 다양한 특징은 임의의 조합으로 사용될 수 있는 것이 구체적으로 의도된다. 더욱이, 개시는 또한 일부 구현예에서, 본원에 제시된 임의의 특징 또는 특징의 조합이 배제되거나 생략될 수 있음을 고려한다. 예를 들어, 명세서에서 복합체가 구성요소 A, B 및 C를 포함한다고 기술된다면, A, B 또는 C 중 임의의 것, 또는 이들의 조합이 생략될 수 있고 단독으로 또는 임의의 조합으로 거부될 수 있다고 구체적으로 의도된다.

[0092] 범위를 포함한 모든 숫자 지정, 예컨대, pH, 온도, 시간, 농도, 및 분자량은 적절하게 1.0 또는 0.1의 증분, 또

는 대안적으로 +/- 15%, 또는 대안적으로 10%, 또는 대안적으로 5%, 또는 대안적으로 2%의 변동에 의해 (+) 또는 (-)로 달라지는 근사값이다. 비록 언제나 분명하게 명시되지는 않지만, 모든 숫자 지정은 용어 "약"이 선행되는 것이 이해되어야 한다. 그러한 범위 방식은 편리함과 간결성을 위해 사용되는 것이 이해되어야 하며 범위의 한계로서 분명하게 명시된 수치를 포함하지만, 또한 그 범위 내에 포함된 모든 개별 수치 또는 하위 범위를 각각의 수치 및 하위 범위가 분명하게 명시되는 것처럼 포함하는 것이 유연하게 이해되어야 한다. 예를 들어, 약 1 내지 약 200의 범위의 비율은 약 1과 약 200의 분명하게 인용된 한계를 포함할뿐만 아니라 약 2, 약 3, 및 약 4와 같은 개별 비율, 및 약 약 10 내지 약 50, 약 20 내지 약 100, 등과 같은 하위 범위를 포함하는 것이 이해되어야 한다. 또한 비록 언제나 분명하게 명시되지는 않지만, 본원에 기술된 시약은 단지 예시적인 것이고 이의 등가물은 기술분야에 알려져 있는 것이 이해되어야 한다.

[0093] 본원에서 및 첨부되는 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수를 나타내는 형태("a", "an", 및 "the")는 맥락이 분명하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 대상물을 포함하는 것에 유의하여야 한다. 그러므로, 예를 들어, "심근세포"에 대한 언급은 복수의 심근세포를 포함한다.

[0094] 또한 본원에서 사용되는 바, "및/또는"은 하나 이상의 관련된 열거된 항목의 임의의 및 모든 가능한 조합뿐만 아니라 대안적으로("또는") 해석될 때 조합의 결여를 지칭하며 포함한다.

[0095] "투여", "투여하는" 등은, 본원에 제공된 유전자 치료 벡터 또는 이의 조성물과 관련하여 사용될 때 일부 경우에 시험관내에서 비심근세포에 대한 투여, 생체내에서 비심근세포에 대한 투여, 의료 전문가에 의한 또는 대상체에 의한 자가 투여에 의한 대상체에 대한 투여를 포함하는 직접 투여 및/또는 일부 경우에 본원에 제공된 유전자 치료 벡터를 포함하는 조성물을 처방하는 행위인 간접 투여를 모두 지칭한다. 세포와 관련하여 본원에서 사용될 때에는 세포에 조성물을 도입하는 것을 지칭한다. 전형적으로, 유효량이 투여되며, 유효량은 종종 기술 분야에 숙련된 사람에 의해 결정될 것이다. 임의의 적합한 투여 방법이 사용되는 것이 고려된다. 일부 경우에, 유전자 치료 벡터는, 예를 들어, 유전자 치료 벡터의 세포 배양 배지에의 첨가 또는 생체내에서 심장 손상 부위의 주사에 의해 세포에 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 대한 투여는, 예를 들어, 혈관내 주사, 심근내 전달, 등에 의해 달성된다.

[0096] 본원에서 사용되는 바 용어 "심장 세포"는 심장 기능, 예컨대 심장 수축 또는 혈액 공급을 제공하거나, 또는 달리 심장 구조를 유지하기 위해 작용하는 심장에 존재하는 임의의 세포를 지칭한다. 본원에서 사용되는 심장 세포는 심외막, 심근, 또는 심장 내막에 존재하는 세포를 포함한다. 심장 세포에는 또한, 예를 들어, 심장 근육 세포 또는 심근세포, 및 심장 혈관구조의 세포, 예컨대 관상 동맥 또는 정맥의 세포가 포함된다. 심장 세포의 다른 비제한적인 예로는 심장 근육, 혈관 및 심장 세포 지지 구조를 구성하는 상피 세포, 내피 세포, 섬유모세포, 심장 줄기 또는 전구체 세포, 심장 전도 세포 및 심장 심박 조율 세포를 들 수 있다. 일부 경우에, 심장 세포는 예를 들어, 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능 줄기 세포를 포함한 줄기 세포로부터 유래된다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "심근세포" 또는 "심근세포들"은 골격 근육 세포와 반대로, 포유류 심장에서 자연적으로 발견되는 근절 함유 횡문근 세포를 지칭한다. 심근세포는 특수 분자, 예컨대, 미오신 중쇄, 미오신 경쇄, 심장 α-액티닌과 같은 단백질의 발현을 특징으로 한다. 본원에서 사용되는 용어 "심근세포"는 임의의 심근세포 하위집단 또는 심근세포 하위유형, 예컨대, 심방, 심실 및 심박 조율 심근세포를 포함하는 포괄적 용어이다.

[0098] 용어 "배양" 또는 "세포 배양"은 인공적인, 시험관내 환경에서 세포의 유지를 의미한다. "세포 배양 시스템"은 본원에서 세포 집단이 단층으로서 또는 현탁액 중에 성장하는 배양 조건을 지칭하기 위해 사용된다. "배양 배지"는 본원에서 세포의 배양, 성장, 또는 증식을 위한 영양 용액을 지칭하기 위해 사용된다. 배양 배지는, 일부 경우에, 한정하는 것은 아니지만, 세포를 특정 상태(예컨대, 만능 상태, 정지 상태, 등)로 유지하거나, 또는 일부 구현예에서, 전구체 세포의 특정 계통의 세포(예컨대, 심근세포)로의 분화를 촉진하는 것과 같이 세포를 성숙시키는 능력과 같은 기능적 특성을 특징으로 한다.

[0099] 본원에서 사용되는 바, 용어 "발현" 또는 "발현하다"는 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드가 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA가 후속해서 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 만약 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산이 게놈 DNA로부터 유래된다면, 일부 경우에, 발현은 진핵 세포에서의 mRNA의 스플라이싱을 포함한다. 일부 경우에, 유전자의 발현 수준은 세포 또는 조직 샘플에서 mRNA 또는 단백질의 양을 측정함으로써 결정된다.

[0100] 본원에서 사용되는 바, "발현 카세트"는 숙주 세포에서 폴리뉴클레오타이드를 발현하도록 구성된 단백질(들) 또는 핵산(들)을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산을 포함하는 DNA 폴리뉴클레오타이드이다. 진

형적으로, 폴리뉴클레오타이드(들)의 발현은 구성적 또는 유도성 프로모터, 조직 특이적 조절 요소, 및 인헨서를 포함한 특정 조절 요소의 제어 하에 놓인다. 그러한 폴리뉴클레오타이드는 조절 요소(예컨대, 프로모터)에 "작동 가능하게 연결된" 또는 "작동적으로 연결된"다고 할 수 있다.

- [0101] 문구 "제약학적으로 허용 가능한"은 본원에서 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 기타 문제나 합병증 없이, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 인간 및 동물의 조직과 접촉하는데 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 지칭한다.
- [0102] "치료", "치료하는", 및 "치료하다"는 질환, 장애, 병태 및/또는 이들의 증상의 유해한 또는 임의의 다른 바람직하지 않은 효과를 감소 또는 개선하기 위한 작용제로 질환, 장애, 또는 병태에 작용하는 것으로 정의된다.
- [0103] 본원에서 사용되는 바, 용어 "유효량" 등은 원하는 생리적 결과(예컨대, 질환의 치료)를 유도하기에 충분한 양을 지칭한다. 유효량은 때로 하나 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 투여된다. 그러한 전달은 개별 투여 단위가 사용될 기간, 조성물의 생체이용률, 투여 경로, 등을 포함한 많은 변수에 따라 달라진다. 그러나, 임의의 특정 대상체에 대한 특정한 양의 조성물(예컨대, 유전자 치료 벡터)은 사용된 구체적인 작용제의 활성, 대상체의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 및 식단, 투여 시간, 배설률, 조성물 조합, 치료되는 특정 질환의 중증도 및 투여 형태를 포함한 다양한 요인에 따라 달라진다.
- [0104] 본원에서 사용되는 바, 폴리펩타이드 또는 핵산 서열과 관련하여 용어 "이의 동등물"은 참조 폴리펩타이드 또는 핵산 서열과 상이하지만, 필수 특성(예컨대, 생물학적 활성)을 유지하는 폴리펩타이드 또는 핵산을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드의 전형적인 변이체는 또 다른 참조 폴리뉴클레오타이드와 뉴클레오타이드 서열이 상이하다. 변이체의 뉴클레오타이드 서열의 변화는, 일부 경우에, 참조 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 변경시킨다. 일부 경우에, 뉴클레오타이드 변화는 참조 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 아미노산 치환, 결실, 첨가, 융합 및 절단을 초래한다. 일반적으로, 차이는 참조 폴리펩타이드 및 변이체의 서열이 전체적으로 매우 유사하고, 많은 영역에서 동일하도록 제한된다.
- [0105] 본원에서 사용되는 바, 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되며 임의의 길이의 테옥시 리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중 어느 하나인 뉴클레오타이드, 또는 이의 유사체의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예로는 선형 및 원형 핵산, 메신저 RNA(mRNA), cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 프롬브, 및 프라이머를 들 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 유전자 명칭이 선행되는 단어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"(예를 들어, "PKP2 핵산")은 상응하는 단백질(예를 들어, "PKP2 단백질")을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0106] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며 때로 유전적으로 코딩되고 비유전적으로 코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 또는 유도된 아미노산, 및 변형된 펩타이드 백본을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태를 지칭한다. 용어는, 한정하는 것은 아니지만, 이종성 아미노산 서열이 있는 융합 단백질, N 말단 메티오닌 잔기가 있거나 없는 이종성 및 상동성 리더 서열과의 융합, 번역학적으로 태그 부착된 단백질, 등을 포함한 융합 단백질을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 유전자 명칭이 선행되는 단어 "단백질"(예를 들어, "PKP2 단백질")은 천연 단백질 또는 이의 기능성 변이체를 지칭한다. "천연 단백질"은, 유전자의 기능적 동형 또는 기능적 대립유전자 변이 중 어느 것에서, 유기체, 바람직하게는 그것을 위한 벡터가 의도되는 유기체(예컨대, 인간, 설치류, 영장류, 또는 수의학적으로 관심이 있는 동물)의 유전자의 게놈 카피에 의해 암호화된 단백질이다.
- [0107] 본원에서 사용되는 바, 단백질의 "기능적 변이체" 또는 "변이체"는 예컨대, 다른 요인과 조합된, 테스모솜의 조직화를 유도하는 단백질의 능력을 포함한, 단백질의 기능적 속성을 유지하는 임의의 수의 아미노산 치환, 삽입, 절단, 또는 내부 결실이 있는 변이체이다. 일부 경우에, 기능적 변이체는 보존적 치환만을 가진 변이체, 또는 시험관내 또는 생체내 검정을 실험적으로 사용하는 것과 같이, 컴퓨터로 확인된다.
- [0108] 본원에서 사용되는 바, 폴리뉴클레오타이드 서열의 "코돈 변이체"는 하나 이상의 동의 코돈 치환을 갖는 참조 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일한 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 동의 코돈의 선택은 기술분야 사람들의 숙련된 기술범위 내에 있으며, 유전자 코드로서의 코딩은 알려져 있다. 일부 경우에, 코돈 최적화는 다양한 전산 도구(예컨대 www.genscript.com에서 이용 가능한 GENSMART™ 코돈 최적화 도구)를 사용하여 수행된다. 일반적으로 코돈 최적화는, 예를 들어 인간 코딩 서열이 박테리아 시스템에서 발현될 때 이종성 시스템에서 단백질의 발현을 증가시키기 위해 사용된다. 용어 "코돈 변이체"는 이런 방식으로 최적화되는 서열 및 다른 목적, 예컨대 CpG 섬 및/또는 숨겨진 출발 부위의 제거를 위해 최적화된 서열 모두를 포함하도록

의도된다.

- [0109] 용어 "백터"는 시험관내에서 또는 생체내에서 숙주 세포에 전달될 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 포함하는 거대분자 또는 분자 복합체를 지칭한다. 백터는 때로 변형된 RNA, 지질 나노입자(DNA 또는 RNA를 캡슐화함), 트랜스포존, 아데노 관련 바이러스(AAV) 백터, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 통합 렌티바이러스 백터(LVV), 또는 비통합 LVV이다. 그러므로, 본원에서 사용되는 바와 같이 "백터"는 형질전환에 사용된 네이키드 폴리뉴클레오타이드(예컨대 플라스미드)뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드를 세포에 전달하기 위해 사용된 임의의 다른 조성물을 포함하며, 세포를 형질도입할 수 있는 백터 및 세포의 형질감염에 유용한 백터를 포함한다.
- [0110] 본원에서 사용되는 바, 용어 "바이러스 백터"는 전형적으로 핵산 분자의 전달 또는 세포의 게놈으로의 통합을 용이하게 하는 바이러스 유래 핵산 요소를 포함하는 핵산 분자 또는 핵산 전달을 매개하는 바이러스 입자를 지칭한다. 바이러스 입자는 전형적으로 다양한 바이러스 구성요소 및 때로는 또한 핵산(들) 외에 세포 구성요소를 포함할 것이다.
- [0111] 용어 "유전자 변형"은 새로운 핵산(즉, 세포에 대해 외인성인 핵산)의 도입을 허용하는 세포에서 유도된 영구적인 또는 일시적인 유전자 변화를 지칭한다. 유전자 변화는 종종 새로운 핵산의 심장 세포의 게놈으로의 통합에 의해, 또는 염색체외 요소로서 새로운 핵산의 일시적인 또는 안정적인 유지에 의해 이루어진다. 세포가 진핵 세포인 경우, 영구적인 유전자 변화는 종종 세포의 게놈으로의 핵산의 도입에 의해 달성된다. 적합한 유전자 변형 방법에는 바이러스 감염, 형질감염, 콘주게이션, 원형질체 융합, 전기천공, 입자 총 기술, 인산 칼슘 침전, 직접 마이크로주입, 등이 포함된다.
- [0112] 도 1은 심장 데스모솜이 세포를 함께 묶는 방법을 도시한다(Brodehl et al., 2018; Moncayo-Arlandi and Brugada, 2017). 상부 패널의 적색 선은 근절 및 다른 소기관을 안정화시키기 위한 네트워크를 형성하는 중간 필라멘트인 데스민으로서 도시된다. 데스모솜의 EM 사진은 왼쪽 모서리에 도시된다.
- [0113] 도 2는 ARVC 질환 적응증 및 가능한 질환 메커니즘의 요약을 도시한다.
- [0114] 도 3a-3c는 8일 제에 iPSC에서 PKP2의 급성 침묵의 결과를 도시하며 중요한 세포 표현형을 나타냈다. 도 3a 및 도 3c에서, PKP2는 녹색이고, DSP는 적색이며, 핵은 청색이다. 도 3b에서, 근절 단백질 Actn2는 녹색이고 MyBPC는 자홍색이다.
- [0115] 도 4는 침묵 8일 제에 다양한 투여량의 siPKP2에 대한 반응으로, 또 다른 데스모솜 단백질인 PKG와의 공동 국지화에 의해 추정되는 DSP 막 국지화의 정량적 측정을 도시한다.
- [0116] 도 5는 PKP2 침묵이 침묵 대조군인 siNeg와 비교하여 PKP2가 침묵하는 세포에서, 주로 불용성 분획에서 검출된, 데스모솜으로부터의 DSP 단백질의 감소된 총량으로 이어지는 것을 보여주는 면역블롯을 도시한다.
- [0117] 도 6a는 AAV-PKP2 유전자 치료에 대한 백터 지도를 도시한다. 도 6b는 PKP2 침묵 10일 제에 및 AAV 형질도입 후 8일 제에 iPSC에 대한 AAV 매개 유전자 전달을 사용하여 PKP2 이식유전자를 발현함으로써 DSP 막 위치의 복원을 도시한다. GFP는 플래그 태그 부착된 PKP2와 공동 발현된다. 플래그 태그는 청록색이며, DSP는 적색이고, 핵은 청색이다. 도 6c는 iPSC 심근세포에서 PKP2 침묵 후 총 DSP의 발현의 AAV-PKP2 이식유전자 복원을 도시한다. 면역형광 신호에서 총 DSP 밀도의 정량화는 AAV-PKP2 이식유전자 구제의 부재 또는 존재 하에 PKP2 침묵 후에 도시된다.
- [0118] 도 7a-7b는 AAV PKP2 이식유전자 발현이 PKP2 침묵 후 iPSC의 수축 속도를 구제한 것을 도시한다. 도 7a는 PKP2 침묵, AAV 형질도입, 및 수축성 기록 일정을 도시한다. 도 7b는 AAV-PKP2 이식유전자가 PKP2 침묵 후 수축 속도를 부분적으로 복원시키는 것을 도시한다. 핵 수에 대해 정규화된 수축 속도는 AAV-PKP2 이식유전자 구제의 부재 또는 존재 하에 PKP2 침묵 후에 도시된다.
- [0119] 도 8은 인간 및 마우스 PKP2 α 의 제2 세대 AAV 발현 카세트의 개략도를 도시한다. 좌측 표는 발현 카세트의 모든 요소를 보여준다. 우측 패널은 마우스 및 인간 발현 카세트를 보여준다.
- [0120] 도 9a-9b는 제2 세대 AAV-hPKP2 α 가 iPSC 심근세포에서 PKP2 침묵 후 수축 속도를 부분적으로 구제하는 것에 대한 예비 결과를 도시한다. 도 9a는 인간 PKP2 α 이식유전자가 iPSC 심근세포에서 용량 의존성 방식으로 발현된 것을 도시한다. 도 9b는 인간 PKP2 α 이식유전자가 30K MOI에서 PKP2 침묵 후 수축 속도의 부분적 구제를 보인 것을 도시한다.
- [0121] 도 10은 생후 12주령 C57BL/6 동물에서 제2 세대 AAV9 인간 및 마우스 PKP2 α 의 발현 분석을 도시한다. 상부 패

널은 HBSS 대조군 마우스에서의 내인성 마우스 PKP2 α 의 발현 및 각각 1E13 및 5E13의 2개의 AAV9 주사 용량에서의 내인성 및 형질도입된 마우스 PKP2 α 둘 다의 발현을 도시한다. 하부 패널은 약간 더 긴 상동체인 형질도입된 인간 PKP2 α 의 상응하는 발현 분석을 도시한다.

- [0122] **도 11a-g**는 생후 12주령 C57BL/6 동물에서 제2 세대 AAV9 인간 및 마우스 PKP2 α 의 파일럿 발현 안전성 연구를 도시한다. **도 11a**는 AAV9 주사 전 체중 및 AAV9 주사 후 3주째의 체중을 도시한다. **도 11b**는 마우스 또는 인간 PKP2 α 의 AAV9 주사 후 3주째에 박출물의 백분율에 의해 측정된 심장 기능을 도시한다. **도 11c** 및 **도 11d**는 확장기말 및 수축기말의 내부 직경 둘 다에 의해 측정된 LV 구조를 도시한다. **도 11e-11g**는 QRS(**도 11e**), QT 간격(**도 11f**), 및 P/R 진폭(**도 11g**)에 의해 측정된 전기생리학적 활성을 도시한다.
- [0123] **도 12**는 타목시펜 유도 후 PKP2-cKO 마우스의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시한다. 곡선은 PKP2-cKO 마우스가 유도 후 3주째에 감소하기 시작하고 한 마리만(7마리 중에서)이 6주까지 생존한 것을 보여준다.
- [0124] **도 13a-13b**는 PKP2-cKO 마우스의 우심실(RV) 확장성 심근병증을 도시한다. **도 13a**(좌측 패널)는 대조군 마우스와 비교하여 타목시펜 유도 후 3주째에 PKP2-cKO 마우스에서 이완기 말에 증가된 RV 내부 치수(RVIDd)를 예시하는 이미지를 도시한다. **도 13a**(우측 패널)는 대조군 마우스와 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 시간 경과에 따른 RVIDd의 그래프를 도시한다. **도 13b**(좌측 패널)는 PKP2-cKO 마우스에서 RV 영역의 증가를 예시하는 이미지를 도시한다. RV 영역은 유도 후 1주째, 3주째, 및 유도 후 4주째에 시작하여 영역의 증가를 보여주는 점선에 의해 도시된다. **도 13b**(우측 패널)는 대조군 마우스와 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 시간 경과에 따른 RV 영역의 그래프를 도시한다.
- [0125] **도 14a-14b**는 대조군과 비교하여 PKP2-cKO 마우스의 좌심실(LV) 확장성 심근병증의 발달을 도시한다. **도 14a**(좌측 패널)는 대조군과 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 수축기말(LVIDs) 및 확장기말(LVIDd)에서 증가된 LV 내부 치수의 이미지를 도시한다. LVIDs는 좌측에 황색 선으로서 도시되고 LVIDd는 우측에 적색 선으로서 도시된다. **도 14a**(우측 패널)는 대조군 마우스와 비교하여 시간 경과에 따라 PKP2-cKO 마우스에서 LVIDs 및 LVIDd의 증가를 보여주는 그래프를 도시한다. **도 14b**는 대조군 마우스와 비교하여 시간 경과에 따라 퍼센트 박출물에 의해 측정되는 LV 성능의 그래프를 도시한다.
- [0126] **도 15**는 대조군과 비교된 PKP2-cKO 마우스의 중증의 전기생리학적 표현형의 발생, 구체적으로 PKP2-cKO 마우스에서 연장된 QRS 간격 및 증가된 P/R 진폭 비율을 도시한다. 상부 패널은 대조군(상부) 및 PKP2-cKO 마우스(하단)의 예시적인 심전도를 도시한다. 증가된 P파 진폭은 대조군과 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 나타난다. 심전도는 또한 대조군 마우스와 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 감소된 R파 진폭을 나타낸다. 더불어, QRS 간격은 대조군과 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 연장된다. 하단 패널은 대조군과 비교된 PKP2-cKO 마우스에서 QRS 간격의 증가 및 P/R 진폭의 증가의 그래프를 도시한다.
- [0127] **도 16a-16c**는 섬유증의 향상된 발현, 조직 리모델링 유전자, 및 심부전 마커를 도시한다. **도 16a**는 대조군과 비교된 PKP2-cKO 마우스의 RV 및 LV(상부) 및 데스모솜 및 Cx43 단백질 발현(하단)에서의 PKP2 RNA 발현을 도시한다. PKP2-cKO 마우스는 LV 및 RV에서 모두 대조군과 비교하여 PKP2의 발현의 약 절반을 보인다. 하단 패널은 데스모솜에서 PKP2, DSP, 및 PKG의 LV 단백질 수준 및 간극 연결에서 Cx43의 감소를 보여주는 면역블롯을 도시한다. **도 16b**는 대조군과 비교된 PKP2-cKO 마우스에서 섬유증 유전자: TGF β 1, Col1a1, 및 Col3a1; 및 조직 리모델링 유전자: Timp1 및 Mmp2의 향상된 발현을 도시한다. 여기서, TGF β 1 및 Timp1의 발현은 RV 및 LV에서 모두 대조군과 PKP2-cKO 마우스 간에 증가된다. Col1a1 및 Col3a1은 또한 대조군 마우스와 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 크게 증가하며 RV와 비교하여 LV에서 발현이 약간 더 상승된다. Mmp2는 대조군 마우스와 비교하여 PKP2-cKO 마우스에서 증가되는 것으로 나타나며 LV와 비교하여 RV에서 발현이 약간 더 상승된다. Mmp9는 대조군과 PKP2-cKO 마우스 사이에서 차이가 없는 것으로 나타났다. **도 16c**는 대조군 마우스와 비교된 PKP2-cKO 마우스에서 심부전 마커, NPPA 및 NPPB의 향상된 발현을 도시한다. NPPA 및 NPPB 발현에서 모두 PKP2-cKO 마우스에서 RV와 비교하여 LV에서 약간 더 상승된다.
- [0128] **도 17**는 PKP2-cKO ARVC 마우스 모델에서 유전자 치료로서 PKP2 효능을 평가하기 위한 실험 설계를 도시한다. 총 6개의 개별 치료 그룹이 연구에 포함되었고 모든 그룹은 연속 3일 동안 타목시펜으로 치료되었다. 그것은 다음과 같다: HBSS 완충액으로 치료된 6마리의 WT 마우스; HBSS 완충액으로 치료된 10마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 타목시펜 유도 전 3주에 3E13 vg/kg의 AAV9:인간 PKP2로 치료된 10마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 타목시펜 유도 전 3주에 5E13 vg/kg의 AAV9:마우스 PKP2로 치료된 10마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 타목시펜 유도 직후 5E13 vg/kg의 AAV9:마우스 PKP2로 치료된 10마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 및 타목시펜 유도 후 1주째에 5E13 vg/kg의 AAV9:마우스 PKP2로 치료된 10마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스. 체중, 심장 초음파, 및 EKG의 기준선 판

독값은 타목시펜 유도 전에 수집되었다. 부정맥을 정량화하고 전기생리학적 매개변수를 평가하기 위하여 B-모드, M-모드(RV, LV), 및 구조(LV 내부 직경)의 심장 초음파 및 30분 ECG를 포함한 타목시펜 유도 후 모든 관독값은 매주 기록되었다.

- [0129] **도 18a**는 인간 및 마우스 PKP2 α 에 대한 AAV 발현 카세트의 개략도를 도시한다. AAV-pTnT600-mPKP2-WPRE는 5' 단부 및 3' 단부 상의 반전 말단 반복부(ITR), 마우스 PKP2 α 에 대한 코딩 서열이 뒤따르는 pcTNT 프로모터, 그 후에 3' ITR 앞 3' 단부에 WPRE 및 bGH를 포함하는 4199개의 염기쌍을 가진다. AAV-pTnT600-hPKP2op-WPRE는 5' 단부 및 3' 단부 상의 반전 말단 반복부(ITR), 인간 PKP2 α 에 대해 코돈 최적화된 코딩 서열이 뒤따르는 pcTNT 프로모터, 그 후에 3' ITR 앞 3' 단부에 WPRE 및 bGH를 포함하는 4324개의 염기쌍을 가진다. **도 18b**는 AAV9:PKP2로 치료된 야생형 마우스로부터 마우스 및 인간 PKP2 α 의 단백질 발현의 면역블롯을 도시한다(도 10의 전체 블롯 참고). 완충액 치료된 마우스는 좌측 패널에 있다. 중간 패널은 상부 면역블롯에서 AAV9:mPKP2로 및 하단 면역블롯에서 AAV9:hPKP2(코돈 최적화됨)로 kg당 1E13 바이러스 게놈으로 치료된 마우스로부터의 면역블롯을 도시한다. 우측 패널은 상부 면역블롯에서 AAV9:mPKP2로 및 하단 면역블롯에서 AAV9:hPKP2(코돈 최적화됨)로 kg당 5E13 바이러스 게놈으로 치료된 마우스로부터의 면역블롯을 도시한다.
- [0130] **도 19**는 AAV9:PKP2로 치료된 PKP2-cKO 마우스의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시한다. 완충액으로 치료된 마우스는 적색 선으로 도시되며 타목시펜 유도 후 3주 째에 감소하기 시작하여 타목시펜 유도 후 6주 째에는 생존 확률이 거의 0이다. 치료된 그룹은 모두 타목시펜 유도 후 6주 째에 90% 이상의 생존 확률을 가진다.
- [0131] **도 20a-20c**는 RV 및 LV 확장을 감소시키고 심장 기능을 유지하는데 있어 PKP2-cKO 마우스의 AAV9:PKP2 치료 효능을 도시한다. **도 20a**는 AAV9:PKP2 치료된 마우스에서 박출물의 개선을 예시하는 그래프를 도시한다. 이 그래프에서 완충액 치료된 PKP2-cKO 마우스는 야생형 및 AAV9:PKP2 치료된 마우스와 비교하여 박출물의 34% 감소를 나타낸다. **도 20b**는 야생형 마우스 및 AAV9:PKP2 치료된 마우스와 비교하여 그래프에서 적색 선으로 나타낸, 완충액 치료된 마우스와 비교된 AAV9:PKP2 치료된 마우스에서 RV 확장의 감소를 예시하는 그래프를 도시한다. **도 20c**는 LVIDd(상부) 및 LVIDs(하단)에서 개선을 예시하는 그래프를 도시한다. 각각의 치료 그룹은 좌측에 야생형 및 완충액 치료된 PKP2-cKO 마우스가 있는 별도의 막대 그래프로 도시된다.
- [0132] **도 21a-21b**는 AAV:PKP2로 치료된 PKP2-cKO 마우스의 ECG 매개변수의 개선을 도시한다. **도 21a**는 AAV9:PKP2 및 완충액으로 치료된 대조군 및 PKP2-cKO 마우스의 예시의 미가공 ECG 트레이스를 도시한다. 완충액 치료된 대조군 및 PKP2-cKO 마우스의 ECG 트레이스는 상부의 두 패널에서 도시된다. AAV9:PKP2 치료된 PKP2-cKO 마우스는 하단의 두 트레이스에 도시된다. **도 21b**는 완충액으로의 치료와 비교하여 AAV9:PKP2로 치료된 PKP2-cKO 마우스에서 P/R 비율(상부 그래프), QT 간격(중간 그래프), 및 QRS 간격(하단 그래프)의 개선을 예시하는 그래프를 도시한다. 각각의 경우에, 완충액 치료된 PKP2-cKO 마우스는 치료된 마우스 및 야생형 마우스의 이상치(outlier)이다.
- [0133] **도 22a-22b**는 PKP2-cKO 마우스에서 부정맥의 AAV9:PKP2 치료 개선을 도시한다. **도 22a**(상부)는 부정맥의 중증도의 등급 표를 도시한다. 등급 5는 S-VT/VF/심장 돌연사를 나타내고; 4는 NSVT를 나타내며; 3은 >100 PVC, 커플렛 및 트리플렛을 나타내고; 2는 >50, <100 PVC를 나타내며; 1은 <50 PVC, PJC, 및 AV 차단을 나타내고; 0은 <10 PVC를 나타낸다. **도 22a**(하단)는 대조군과 비교하여 AAV9:PKP2로 치료된 PKP2-cKO 마우스에서 부정맥 점수의 개선을 요약하는 그래프를 도시한다. 타목시펜 유도 후 3주부터 시작하여 심실 부정맥 점수가 증가한 완충액 치료된 PKP2-cKO 마우스. **도 22b**는 대조군과 비교하여 AAV9:PKP2로 치료된 PKP2-cKO 마우스에서 부정맥의 중증도의 개선을 보여주는 분포 그래프를 도시한다. 야생형 마우스는 가장 왼쪽 막대 그래프로 도시되고 이어서 완충액 치료된 PKP2-cKO 마우스는 평균 점수 3을 보였다. 치료된 마우스는 평균적으로, 점수의 극적인 감소를 보여주는 4개의 막대 그래프로 표시된다.
- [0134] **도 23**은 PKP2-cKO ARVC 마우스 모델을 사용하여 유전자 치료로서 인간 PKP2 효능을 평가하기 위해 사용된 실험 설계를 도시한다. PKP2-cKO 마우스는 타목시펜으로 연속 3일 동안 치료된 후 다양한 용량의 AAV9:hPKP2 또는 HBSS로 치료되었다.
- [0135] **도 24a-24d**는 PKP2-cKO 마우스의 AAV9:hPKP2 유전자 치료 처치의 결과를 도시한다. **도 24a**는 대조군 마우스가 타목시펜 유도로 감소되고 HBSS 치료에 의해 영향을 받지 않는 높은 박출율을 보이는 박출물의 결과를 도시한다. 증가하는 용량의 AAV9:hPKP2로의 치료는 치료된 마우스에서 박출물을 상당히 증가시킨다($P < 0.05$). **도 24b**는 우심실 크기의 결과를 도시한다. 대조군 마우스는 타목시펜 유도로 증가되고 HBSS 치료에 의해 영향을 받지 않는 상대적으로 작은 RV 크기를 가진다. AAV9:hPKP2 치료는 RV 크기의 용량 관련 감소를 나타낸다. (낮은 두 용량 $P < 0.05$, 최고 용량 $P < 0.01$). **도 24c**는 LVIDd에 의해 측정된 LV 확장을 도시한다. **도 24d**는 LVIDs에 의

해 측정된 LV 확장을 도시한다. AAV9:hPKP2 치료는 LVIDd(P<0.05) 및 LVIDs(P<0.05, 1e14 용량에 대해서만)에 의해 측정된 바 좌심실 확장의 증가를 상당히 감소시켰다.

[0136] **도 25**는 QT 간격(상부), P/R 비율(중간), 및 부정맥 점수(하단)에 대한 PKP2-cKO 마우스의 AAV9:hPKP2 유전자 치료 처치의 결과를 도시한다. AAV9:hPKP2 치료는 적색 막대로 도시된 HBSS로 치료된 PKP2-cKO 마우스와 비교하여 타목시펜 유도 후 4주 후에 PKP2-cKO 마우스에서 QT 간격의 상당한 감소(P<0.05), P/R 비율의 감소 추세, 및 부정맥의 감소 추세를 보였다.

[0137] **도 26a-26b**는 우심실(**도 26a**) 및 좌심실(**도 26b**)에서 심부전 마커, 섬유증 및 조직 리모델링 마커의 발현을 감소시키는데 있어 PKP2-cKO 마우스의 AAV9:hPKP2 치료의 결과를 도시한다. PKP2-cKO 마우스의 AAV9:hPKP2 치료는 타목시펜 유도 후 4주 후에 우심실 및 좌심실에서 모두 심부전 마커, 섬유증 및 조직 리모델링 유전자의 발현을 감소시키는데 효능을 나타냈다. PKP2의 내인성 및 이식유전자 mRNA 수준은 WT 대조군, PKP2-cKO, 및 AAV9:hPKP2 형질도입 심장에서 각각 추정되었다. 심부전 마커는 NPPA 및 NPPB이다. 섬유증 유전자는 Col1a1 및 Col3a1이다. 조직 리모델링 유전자는 Timp1이다.

[0138] **도 27a-27b**는 타목시펜 유도 후 4주 후에 우심실 및 좌심실에서 모두 섬유증 발생을 감소시키는데 있어 PKP2-cKO 마우스의 AAV9:hPKP2 치료의 결과를 도시한다. **도 27a**는 적색의 근육 염색 및 청색의 섬유증의 삼색 염색을 도시한다. 황색 화살표는 PKP2-cKO 마우스 심장에서 상당한 섬유증이 있는 영역을 강조한다. **도 27b**는 AAV9:hPKP2 치료가 있거나 없는 대조군 및 PKP2-cKO 마우스에서의 콜라겐 양성 조직을 정량화하는 그래프를 도시한다. 미치료 PKP2-cKO 마우스는 최대량의 콜라겐 양성 조직을 가진 반면, 1e13으로 치료된 마우스는 약 절반으로 감소된 수준을 가진다. 3e13 또는 1e14로 치료된 마우스는 대조군 마우스에 가까운 콜라겐 수준을 가진다.

[0139] **도 28a-28b**는 가용성 분획(**도 28a**) 및 불용성 분획(**도 28b**)에서 PKP2 및 다른 테스모숨 단백질의 발현을 도시한다. 가용성 분획에서 DSP는 검출되지 않는다. 주의: * 이 동물은 심장초음파검사 전에 죽은 채로 발견되었다. ** PKP2 단백질 강도는 동일한 웨스턴 블롯에서 튜블린 강도에 대해 정규화된다. 간결성을 위해, 두 개의 튜블린 블롯 중 하나만이 여기에 도시된다. PKP2는 내인성 마우스 PKP2 및 더 큰 인간 PKP2의 두 밴드로서 도시된다.

[0140] **실시예**

[0141] 다음의 실시예는 본 개시의 다양한 구현예를 예시할 목적으로 제공되며 어떠한 방식으로든 본 개시를 제한하는 것을 의미하지 않는다. 본 실시예는 본원에 기술된 방법과 함께 현재 바람직한 구현예를 대표하며, 예시적이고, 청구범위의 범주를 제한하려는 의도가 아니다. 청구범위의 범주에 의해 정의된 바와 같이 본 개시의 사상 내에 포함되는 변경 및 기타 용도는 기술분야에 숙련된 사람에게 일어날 것이다.

[0142] 실시예 1: PKP2 고갈의 세포 모델

[0143] 개념의 초기 증명으로서, PKP2의 고갈의 세포 모델을 siRNA를 사용하여 생성하였다. PKP2를 유도된 만능 줄기 세포 유래 심근세포(iPSCM)에서 고갈시켰다. siRNA에 의한 PKP2의 급성 침묵을 siPKP2 및 음성 대조군 siRNA를 포함하여 Invitrogen으로부터 구입한 siRNA를 사용하여 수행하였다(4390843 사일런서 선택 음성 대조군 번호 1 siRNA; 4392420 검정 Id s531202 사일런서 선택 사전 설계된 siRNA #1; 4392420 검정 Id s531203 사일런서 선택 사전 설계된 siRNA #2; 4392420 검정 Id s531204 사일런서 선택 사전 설계된 siRNA #3; 및 4392420 검정 Id s10585 사일런서 선택 사전 설계된 siRNA #4). 이 침묵은 도 3A에서 면역형광에 의해 도시된 것과 같이 8일 후에 세포 막으로부터 DSP의 소멸로 이어졌다. DSP 막 국지화를 정량적으로 측정하였고(도 4) DSP-PKG 공동 국지화의 상당한 감소를 나타냈다. 근절 밀도의 감소를 또한 면역형광에 의해 관찰하였다(도 3b). 더불어, 패턴화된 iPSCM에서 세포 압축의 혼란을 면역형광에 의해 볼 수 있었다(도 3c).

[0144] siPKP2 iPSCM 용해물의 면역블롯을 수행하였고 테스모숨으로부터의 DSP 단백질의 감소된 총량은 주로 PKP2가 침묵한 세포의 불용성 분획에서 검출되는 것을 보여주었다(도 5).

[0145] 실시예 2: AAV9-PKP2는 PKP2 고갈 표현형을 구제한다

[0146] 형질도입된 세포를 확인하기 위하여 GFP가 있는 600 nt 심장 트로포닌(TnT) 프로모터에 의해 구동된 AAV9 변이체 CR9-01 플래그 태그 부착된 PKP2 발현을 전달함으로써(도 6a), PKP2 침묵된 iPSCM에서 DSP의 막으로의 재국지화가 관찰되었고(도 6b), 그로써 테스모숨 구조가 복원되었다. PKP2 이식유전자는 siRNA 매개 침묵에 저항하도록 코돈 최적화되었다. 기술적 어려움으로 인해, 얼마나 많은 DSP가 세포 연결이 발생하고 테스모숨이 존재하는 막으로 특이적으로 국지화되었는지를 정확하게 정량화하는 것은 가능하지 않았다. 그러므로, 막으로 국지화

된 DSP의 양 대신, 전체 세포 DSP 강도를 정량화하였다.

- [0147] PKP2 이식유전자가 심근세포의 수축성을 기능적으로 복원시킬 수 있었는지를 입증하기 위하여, iPSCM의 명시야 기반 수축을 SONY 이미징에 의해 기록하고 비디오투영을 DANA Solutions 펄스 분석 소프트웨어에 의해 분석하였다. 실험 타임라인을 도 7a에 도시한다. 이 실험에서, siRNA를 사용하여 1일에 iPSCM에서 내인성 PKP2 발현을 고갈시켰다. siRNA 음성 대조군 또는 siPKP2의 어느 하나에 대해 2가지 siRNA 농도, 5 및 1.25 nM을 사용하였다. 두 siPKP2 #3 및 #4를 조합하여 전사체를 침묵시켰다. 3일 후에, AAV PKP2를 사용하여 고갈된 세포를 형질도입하여 PKP2 이식유전자 발현에 대한 반응으로 iPSCM에서 수축 속도의 구제를 관찰하였다(도 7b). 수축성을 AAV 형질도입 후 3, 4, 5, 6, 7, 및 8일 후에 기록하였다. 수축 속도를 3개의 96 웰 플레이트로부터 및 5 및 1.25 nM siRNA 둘 다에서 AAV 300K MOI 또는 100K MOI의 어느 하나로 각각 형질도입된 세포로부터 평균을 구하였다. 속도 값을 각각 300K 또는 100K MOI에 상응하는 평균 핵 수에 대해 추가로 정규화하였다.
- [0148] 실시예 3: 제2 세대 PKP2 α AAV9로의 치료
- [0149] 인간 또는 마우스 PKP2 α를 발현시키기 위해 제2 세대 AAV 발현 카세트를 개발하였다. 제2 세대 카세트는 우드 칩 감염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE) 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(bGH 폴리(A))를 포함하였다. 제2 세대 벡터를 도 8에 도시한다.
- [0150] 이식유전자 구제 연구를 PKP2 침묵 iPSC 심근세포에서 수행하였다. 예비 결과는 제2 세대 AAV-hPKP2 α가 iPSC 심근세포에서 PKP2 침묵 후 수축 속도를 부분적으로 구제하였음을 시사하였다. 도 9a는 인간 PKP2 α 이식유전자가 상이한 MOI(감염 다중도, 각 세포를 감염시키는 바이러스 입자의 평균 수)에 의해 용량 의존성 방식으로 iPSC 심근세포에서 발현된 결과를 도시한다. PKP2 및 DSP(데스모플라킨) 발현을 AAV 형질도입 후 3일 후에 세포의 가용성 및 불용성 분획에서 모두 평가하였다. 도 9b는 AAV PKP2 이식유전자가 없는 <0.0001의 p 값과 대조적으로 0.0103의 p 값으로 학생 t 테스트에 의해 나타낸 것과 같이 인간 PKP2 α 이식유전자가 30K MOI에서 PKP2 침묵 후 수축 속도의 부분적 구제를 나타낸 것을 도시한다.
- [0151] 생후 12주령 C57BL/6 동물에서 제2 세대 AAV9 인간 및 마우스 PKP2 α의 발현 분석을 연구하기 위한 실험을 수행하였다. 이 실험의 결과를 도 10에 도시한다. 동물을 각각 1E13 및 5E13 vg/kg의 용량의 AAV9-PKP2 α로 후안와 정맥내로 투여하였다. 심장 LV 조직을 주사 후 3.5주에 수득하였다. LV 조직의 가용성 분획을 여기서 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 상부 패널은 HBSS 대조군 마우스에서의 내인성 마우스 PKP2 α의 발현 및 각각 1E13 및 5E13의 두 AAV9 주사 용량에서 내인성 및 형질도입된 마우스 PKP2 α 둘 다의 발현을 도시한다. 하부 패널은 약간 더 큰 상동체인 형질도입된 인간 PKP2 α의 상응하는 발현 분석을 도시한다. 이 인간 상동체는 코돈 최적화된다. 심장초음파에 의해 AAV 주사 후 3.5주 후에 관찰된 유해한 심장 사건은 없었다.
- [0152] 도 11a-g는 생후 12주령 C57BL/6 동물에서 제2 세대 AAV9 인간 및 마우스 PKP2 α의 파일럿 발현 안전성 연구가 심장초음파에 의해 AAV 주사 후 3주에 어떠한 유해한 심장 사건도 나타내지 않은 것을 도시한다. 동물을 각각 1E13 및 5E13 vg/kg의 용량의 AAV9-PKP2 α로 후안와 정맥내로 투여하였다. 도 11a는 AAV9 주사 전 체중 및 AAV9 주사 후 3주 후의 체중을 도시한다. 도 11b는 마우스 또는 인간 PKP2 α의 AAV9 주사 후 3주 후에 박출물의 백분율에 의해 측정된 심장 기능을 도시한다. 도 11c 및 도 11d는 확장기말 및 수축기말의 내부 직경 둘 다에 의해 측정된 LV 구조를 도시한다. 도 11e-11g는 QRS, QT 간격, 및 P/R 진폭에 의해 측정된 전기생리학적 활성을 도시한다.
- [0153] 실시예 4: PKP2-cKO ARVC 마우스 모델 특성화
- [0154] 생후 약 3개월의 4마리의 야생형 및 7마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스, *aMYHC-Cre-ER(T2)*, PKP2^{f1/f1}를 연속 4일 동안 타목시펜(옥수수유 100 μl/마우스(대략 75 mg/kg)에 20 mg/ml)으로 복강내로 주사하였다. 체중, 심장 초음파, 및 EKG의 기준선 판독값을 타목시펜 유도 전에 수집하였다. 부정맥을 정량화하고 전기생리학적 매개변수를 평가하기 위하여 B-모드, M-모드(RV, LV), 및 구조(LV 내부 직경)의 심장 초음파 및 30분 ECG를 포함한 타목시펜 유도 후 모든 판독값을 매주 기록하였다. 심장 및 폐를 포함한 말단 조직을 연구가 끝났을 때 수집하였다.
- [0155] 생존 분석을 마우스에 대해 수행하였다(도 12). 카플란-마이어 생존 곡선은 타목시펜 유도 후 3주에 PKP2-cKO 마우스의 생존율의 급격한 감소를 보였지만, 한 마리 동물만이 타목시펜 유도 후 6주에 도달하였다. 동물은 유도 후 3주에 돌연사, 부종, 감소된 활동, 아이소플루란에 대한 내성 감소를 포함한 중증의 임상 증상을 보였다.
- [0156] PKP2-cKO 마우스는 타목시펜 유도 후 1주 정도로 초기에 RV 확장성 심근병증이 발생하였다. 좌측 패널의 도 13a는 타목시펜 유도 후 3주에 PKP2-cKO 마우스가 이완기 말에 증가된 RV 내부 치수(RVIDd)를 발생시킨 것을 도

시한다. 도 13a의 우측 패널은 타목시펜 유도 4주 동안 체중에 대해 정규화된 RVIDd의 연속적인 증가를 요약한다. 좌측 패널의 도 13b는 RV 확장을 시사하는 RV 영역의 매주 증가의 이미지를 도시한다. 도 13b의 우측 패널은 체중에 대해 정규화된 RV 영역 증가를 요약한다. P 값: 학생 t 테스트. 오차 막대: s.e.m. *P<0.05, **P<0.01 대비 대조군.

[0157] *PKP2-cKO* 마우스는 타목시펜 유도 후 LV 확장성 심근병증이 발생하였다. 도 14a 좌측 패널은 타목시펜 유도 후 3주 째에, *PKP2-cKO*가 수축기말(LVIDs) 및 이완기말(LVIDd)에 증가된 LV 내부 치수를 발생시킨 것을 도시한다. 도 14a의 우측 패널은 타목시펜 유도의 4주 동안 체중에 대해 정규화된 LVIDs 및 LVIDd의 연속적인 증가를 요약한다. 도 14b는 타목시펜 유도 후 2주에 급격히 감소된 % 박출물에 의해 측정된 LV 성능을 도시한다. P 값: 학생 t 테스트. 오차 막대: s.e.m. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 대비 대조군.

[0158] *PKP2-cKO* 마우스는 심실 전도 장애 및 심실내 차단을 시사하는 연장된 QRS 간격 및 증가된 P/R 진폭 비율이 발생하였다. 도 15 상부 패널은 타목시펜 유도 후 3주 째에, *PKP2-cKO* 마우스가 증가된 P 파 진폭 및 감소된 R 파 진폭을 발생시킨 것을 도시한다. 도 15의 하단 좌측 그래프는 타목시펜 유도의 4주 동안 QRS 간격의 연속 증가를 도시하며 하부 우측 그래프는 P/R 진폭 비율의 증가를 도시한다. P 값: 학생 t 테스트. 오차 막대: s.e.m. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 대비 대조군.

[0159] *PKP2-cKO* 마우스는 자발적인 조기 심실 수축(PVC)이 발생하였다. 표 2는 연속 기록되는 30분 동안 얻어진 데이터를 제시하며, PVC는 1주 째에 거의 없었던 반면, 2주 째에는 모든 *PKP2-cKO* 동물에서 간헐적으로 추가 수축이 감지되었다. PVC의 발생은 100회 이상의 PVC를 보이는 동물의 대부분에서 나중에 추가로 증가하였다. 3주부터 시작하여, 심장 돌연사를 *PKP2-cKO* 동물에서 관찰하였다.

표 2

동물 ID	타목시펜 유도 후 주			
	1 주	2 주	3 주	4 주
121	0	5	>100	죽음
125	0	12	12	죽음
130	0	2	죽음	죽음
137	0	66	>100	N/A
138	0	20	>100	죽음
150	0	1	11	>100
152	4	5	>100	>100

[0160]

[0161] *PKP2-cKO* 마우스는 섬유증, 조직 리모델링 유전자, 심부전 마커의 향상된 발현을 나타냈다. 도 16a 상부 패널은 야생형 및 *PKP2-cKO* 마우스의 RV 및 LV 모두에서의 *PKP2* mRNA 발현을 보여준다. 적색 및 청색 점은 각각의 개별 마우스를 나타낸다. 도 16a의 하단 패널은 테스트모습에서 *PKP2*, *DSP*, 및 *PKG* 및 간극 연결에서 *Cx43*의 LV 단백질 수준의 감소의 대표적인 면역블롯을 도시한다. 도 16b는 *PKP2-cKO* 마우스가 섬유증 유전자인 *TGFβ1*, *Col1a1*, 및 *Col3a1*, 및 조직 리모델링 유전자인 *Timp1* 및 *Mmp2*의 향상된 발현을 보인 것을 도시한다. 도 16c는 *PKP2-cKO* 마우스가 심부전 마커인 *NPPA* 및 *NPPB*의 향상된 발현을 보인 것을 도시한다.

[0162] 실시예 5: *PKP2-cKO* ARVC 마우스 모델에서 *PKP2* 유전자 치료 효능

[0163] 도 17은 *PKP2-cKO* ARVC 마우스 모델을 사용하는 유전자 치료 표적으로서의 *PKP2* 효능을 평가하기 위해 사용된 실험 설계를 도시한다. 총 6개의 개별 치료 그룹을 연구에 포함시켰고 모든 그룹은 연속 3일 동안 타목시펜으로 치료하였다. 치료 그룹은 다음과 같다: HBSS 완충액으로 치료된 6마리의 야생형 마우스; HBSS 완충액으로 치료된 10마리의 *PKP2-cKO* ARVC 마우스; 타목시펜 유도 전 3주에 3E13 vg/kg의 AAV9:인간 *PKP2*로 치료된 10마리의 *PKP2-cKO* ARVC 마우스; 타목시펜 유도 전 3주에 5E13 vg/kg의 AAV9:마우스 *PKP2*로 치료된 10마리의 *PKP2-cKO* ARVC 마우스; 타목시펜 유도 직후 5E13 vg/kg의 AAV9:마우스 *PKP2*로 치료된 10마리의 *PKP2-cKO* ARVC 마우스;

및 타목시펜 유도 후 1주 째에 5E13 vg/kg의 AAV9:마우스 PKP2로 치료된 10마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스.

- [0164] 체중, 심장 초음파, 및 EKG의 기준선 판독값을 타목시펜 유도 전에 수집하였다. 부정맥을 정량화하고 전기생리학 적 매개변수를 평가하기 위하여 B-모드, M-모드(RV, LV), 및 구조(LV 내부 직경)의 심장 초음파, 및 30분 ECG를 포함한 타목시펜 유도 후 모든 판독값을 매주 기록하였다. 말단 조직(심장 및 폐)을 연구가 끝났을 때 수집 하였다.
- [0165] AAV9:PKP2 단백질 발현은 야생형 마우스 LV 심장 조직에서 관찰되었다. 도 18a는 인간 및 마우스 PKP2 α 의 제2세대 AAV 발현 카세트의 개략도를 도시한다. 도 18b는 AAV9:PKP2의 후안와 주사 후 3주 째의 마우스 및 인간 PKP2의 발현을 보여주기 위해 수행된 대표적인 면역블롯을 도시한다(전체 블롯은 도 10에 도시됨). 총 5마리의 생후 8주령의 C57BL6 야생형 마우스를 각 치료에 대해 HBSS, 1E13 vg/kg, 또는 5E13 vg/kg으로 주사하였다.
- [0166] 카플란-마이어 생존 곡선은 AAV9:PKP2가 모든 AAV9:PKP2 치료 그룹에서 타목시펜 유도 후 6주에 PKP2-cKO 마우스의 수명을 연장시켰음을 보여주었다. 인간 및 마우스 PKP2는 모두 치료된 PKP2-cKO 마우스의 수명을 연장시키는데 효능을 입증하였다. 도 19에서, 적색 선은 타목시펜 유도 후 3주에 급격한 감소를 보이는 HBSS 완충액으로 치료된 PKP2-cKO 마우스이다. 대조적으로, 모든 AAV9-PKP2 치료된 마우스는 타목시펜 유도 후 20주까지 생존하였다.
- [0167] PKP2-cKO 마우스의 AAV9:PKP2 치료는 RV 및 LV 확장을 감소시키고 심장 기능을 유지하는데 효능을 나타냈다. 도 20a는 AAV9:PKP2 치료가 HBSS 치료 마우스(적색 선으로 도시됨)와 비교하여 퍼센트 박출률의 감소를 예방한 것을 도시한다. 도 20b는 AAV9:PKP2 치료가 체중에 대해 정규화된 RV 영역에 의해 추정된 바 주간 기준으로 RV 확장의 감소를 나타낸 것을 도시한다. 도 20c는 타목시펜 유도 후 4주 째에, AAV9:PKP2 치료가, 체중에 의해 정규화된 이완기말의 LV 내부 치수(LVIDd)(상부 그래프) 및 수축기말의 LV 내부 치수(LVIDs)(하단 그래프) 둘 다에 의해 측정된 바 PKP2-cKO 마우스의 LV 확장을 상당히 감소시킨 것을 도시한다. 오차 막대: s.e.m. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 대비 대조군.
- [0168] AAV9:PKP2 치료는 또한 PKP2-cKO 마우스의 ECG 매개변수를 상당히 개선시켰다. 도 21a는 AAV9:mPKP2 치료된 PKP2-cKO 마우스 심장의 전기생리학적 행동의 상당한 개선을 보인 미가공 ECG 트레이스의 예를 도시한다. 도 21b는 AAV9:PKP2 치료가 적색 선으로 도시된 HBSS로 치료된 PKP2-cKO 마우스와 비교하여 P/R 비율(상부 그래프), QT 간격(중간 그래프), 및 QRS 간격(하단 그래프)의 상당한 개선을 보인 것을 도시한다.
- [0169] AAV9:PKP2 치료는 또한 PKP2-cKO 마우스에서 부정맥을 상당히 감소시켰다. 도 22a(상부)는 마취된 AAV9:PKP2 치료에서 기록하는 30분 동안 자발적인 부정맥의 중증도를 분류하기 위한 등급 차트가 있는 표를 도시한다. 조기 심실 수축(IPVC), 조기 연결 복합체(PJC), AV 차단(방실(atrioventricular) 차단), 비지속성 심실 빈맥(tachycardia)(NSVT), 상심실성 빈맥(S-VT), 및 심실 세동(ventricular fibrillation). 도 22a(하단)는 AAV9:PKP2로 치료된 PKP2-cKO 마우스에서 부정맥의 개선을 보여주는 등급 차트를 토대로 평균화된 점수를 요약한다. 도 22b는 타목시펜 유도 후 4주 째에 각각의 치료 그룹의 개별 마우스의 분포를 도시한다. AAV9:PKP2 치료는 적색 막대로 도시된 HBSS 완충액으로 치료된 PKP2-cKO 마우스와 비교하였을 때 개선된 부정맥 점수로 표시된 바와 같이 부정맥 사건 빈도 및 중증도 모두의 감소를 나타냈다.
- [0170] 실시예 6: PKP2-cKO ARVC 마우스 모델에서 AAV9:hPKP2를 사용하는 PKP2 유전자 치료 효능 연구
- [0171] 유전자 치료 표적으로서의 인간 PKP2의 효능을 PKP2-cKO ARVC 마우스 모델을 사용하여 측정하였다. 총 5개의 개별 치료 그룹을 연구에 포함시켰다. 모든 그룹을 연속 3일 동안 타목시펜으로 치료하였다. 그룹에는 다음이 포함되었다: HBSS 완충액으로 치료된 4마리의 야생형 마우스; HBSS 완충액으로 치료된 4마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 타목시펜 유도 후 1주에 1E13 vg/kg의 AAV9:인간 PKP2로 치료된 4마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 타목시펜 유도 후 1주에 3E13 vg/kg의 AAV9:인간 PKP2로 치료된 3마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스; 및 타목시펜 유도 후 1주에 1E14 vg/kg의 AAV9:인간 PKP2로 치료된 3마리의 PKP2-cKO ARVC 마우스. 체중, 심장 초음파, 및 EKG의 기준선 판독값을 타목시펜 유도 전에 수집하였다. 부정맥을 정량화하고 전기생리학적 매개변수를 평가하기 위하여 B-모드, M-모드(RV, LV), 및 구조(LV 내부 직경)의 심장 초음파 및 30분 ECG를 포함한 타목시펜 유도 후 모든 판독값을 매주 기록하였다. 말단 심장 조직을 타목시펜 유도 후 4주에 수집하였다. 도 23은 실험 설계를 도시한다.
- [0172] PKP2-cKO 마우스의 AAV9:hPKP2 치료는 타목시펜 유도 후 4주 째에 우심실(RV) 및 좌심실(LV) 확장을 감소시키고 심장 기능을 유지하는데 효능을 보였다. 도 24a-24d는 이 점정에 대한 결과를 도시한다. AAV9:hPKP2 치료는 HBSS 치료 마우스와 비교하여 퍼센트 박출률 감소를 예방하였다(도 24a). AAV9:hPKP2 치료는 체중에 대해 정규

화된 RV 영역에 의해 추정된 바 RV 확장의 감소를 나타냈다(도 24b). AAV9:hPKP2 치료는 체중에 대해 정규화된 확장기말의 LV 내부 치수(LVIDd)(도 24c) 및 수축기말의 LV 내부 치수(LVIDs)(도 24d)에 의해 측정된 바 *PKP2-cKO* 마우스의 LV 확장을 상당히 감소시켰다. P 값을 학생 t 테스트, 오차 막대: s.e.m에 의해 측정하였다. 대조군과 비교하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

[0173] AAV9:hPKP2 치료는 HBSS로 치료된 *PKP2-cKO* 마우스와 비교하여 *PKP2-cKO* 마우스에서 타목시펜 유도 4주 째에 QT 간격의 상당한 감소(도 25 상부 패널), P/R 비율의 감소 추세(도 25 중간 패널), 및 부정맥의 감소 추세(도 25 하단 패널)를 나타냈다. P 값을 학생 t 테스트에 의해 측정하였고, 오차 막대는 s.e.m이다. 대조군과 비교하여 * $P < 0.05$. 이 연구에 적은 수의 동물이 포함되었기 때문에, P/R 비율 및 부정맥 점수는 통계학적 유의성이 도달하지 못하였다. 더불어, HBSS 치료 그룹에서 한 마리의 동물이 ECG 기록 후 타목시펜 유도 후 약 4주 째에 인도적 종점에 도달하였다. 1e13 투여량 그룹의 한 마리 동물은 심장초음파 검사 전에 죽은 채로 발견되었다. 전체적으로, 이 연구 결과는 최적 효력 용량이 3e13 vg/kg인 것을 시사한다.

[0174] *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 치료는 타목시펜 유도 후 4주 째에 우심실(도 26a) 및 좌심실(도 26b)에서 모두 심부전 마커, 섬유증 및 조직 리모델링 유전자의 발현을 감소시키는데 효능을 나타냈다. PKP2의 내인성 및 이식 유전자 mRNA 수준을 야생형 대조군, *PKP2-cKO*, 및 AAV9:hPKP2 형질도입 심장에서 각각 추정하였다. 심부전 마커는 NPAA 및 NPPB이다. 섬유증 유전자는 Col1a1 및 Col3a1이다. 조직 리모델링 유전자는 Timp1이다.

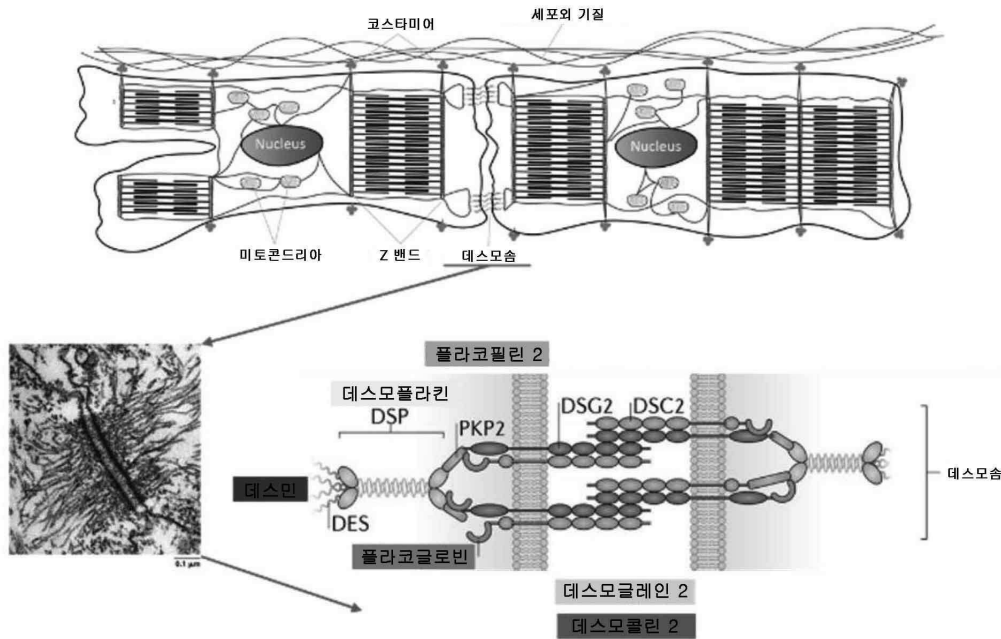
[0175] *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 치료는 타목시펜 유도 후 4주 째에 우심실 및 좌심실에서 모두 섬유증 발생을 감소시키는데 효능을 나타냈다(도 27a). 근육 염색은 적색으로 도시하며 섬유증의 삼색 염색은 청색이다. 화살표는 *PKP2-cKO* 마우스 심장에서 상당한 섬유증이 있는 영역을 강조한다. 콜라겐을 도 27b에서 정량화하였고, AAV9:hPKP2로의 치료가 콜라겐을 대조군 수준으로 감소시킨 것을 나타낸다.

[0176] *PKP2-cKO* 마우스의 AAV9:hPKP2 치료는 인간 PKP2 이식유전자의 용량 의존성 발현을 나타냈다. PKP2 및 다른 데스모솜 단백질인 DSP 및 PKG의 총 발현 수준을 타목시펜 유도 후 4주 째에 LV 조직의 가용성(도 28a) 및 불용성(도 28b) 분획에서 모두 추정하였다. DSP는 가용성 분획에서 검출되지 않는다. 주의 * 이 동물은 심장초음파검사 전에 죽은 채로 발견되었다. ** PKP2 단백질 강도는 동일한 웨스턴 블롯에서 튜블린 강도에 대해 정규화된다. 간결성을 위해, 두 개의 튜블린 블롯 중 하나만이 도 28a-b에 도시된다. PKP2는 내인성 마우스 PKP2 및 더 큰 인간 PKP2의 두 밴드로서 도시된다.

[0177] 본 개시의 바람직한 구현예가 본원에 제시되고 기술되었지만, 그러한 구현예는 예로서만 제공되는 것임이 기술 분야에 숙련된 사람들에게는 명백할 것이다. 수많은 변동, 변화, 및 치환이 이제 개시로부터 벗어나지 않으면서 기술분야에 숙련된 사람들에게 일어날 것이다. 본원에 기술된 구현예에 대한 다양한 대안이 사용될 수 있는 것이 이해되어야 한다. 다음의 청구범위는 본 개시의 범주를 정의하며 그로써 이들 청구범위 및 이의 등가물의 범주 내에 있는 방법 및 구조가 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1



도면2

확장 및 수축기/이완기 결합

- ▶ 주로 우심실에 영향을 주지만 양심실성일 수 있다
 - 양심실 확장을 보여주고 AAV 이식유전자 데이터를 더 쉽게 연구할 수 있게 하는 마우스 cKO 모델
- ▶ 영향을 받은 근질 매개 긴장 생성, 데스모솜 품질의 저하로 인한 감소된 세포-세포 통신
 - 근질 품질에 영향을 미치는 근질 유전자의 잘못된 조절
 - 전기적 결합에 영향을 미치는 Ca²⁺ 및 Na⁺ 채널 유전자의 잘못된 조절
- ▶ 세포 사멸
 - 심근 위축
- ▶ 심근세포 사멸로 인한 심근세포 탈분화 또는 침윤:
 - 지방생성 및 섬유화 유전자의 잘못된 조절

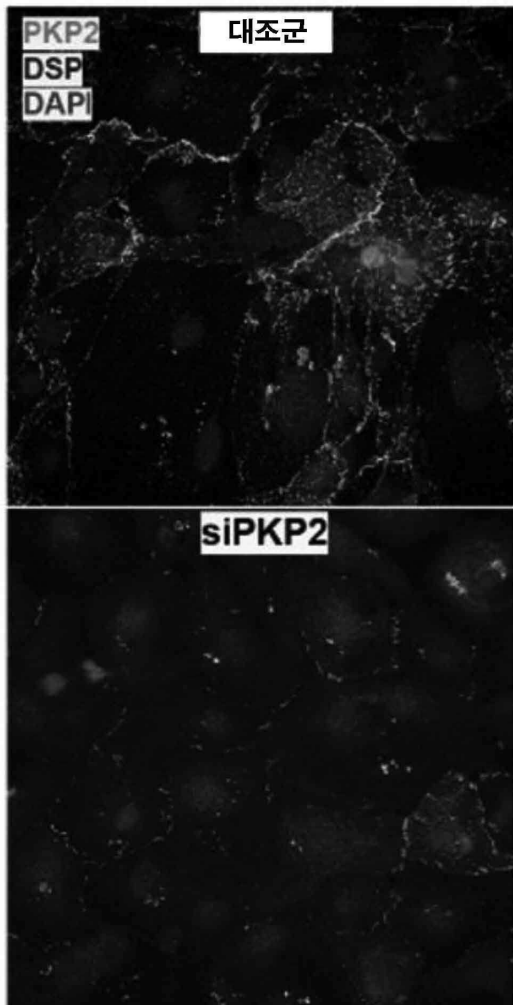
부정맥, 전도 지연, 전기적 불안정

- ▶ Ca²⁺ 잘못된 취급 및 다른 이온 채널 결합
 - 마우스 모델 PKP2 cKO는 Ca²⁺ 잘못된 취급으로 인한 부정맥 표현형을 가진다
- ▶ GJ 단백질 코복신 43의 감소
- ▶ 전도 결합으로 이어지는 섬유지방 조직
 - iPSC에서 지방생성 또는 섬유화 유전자의 발현

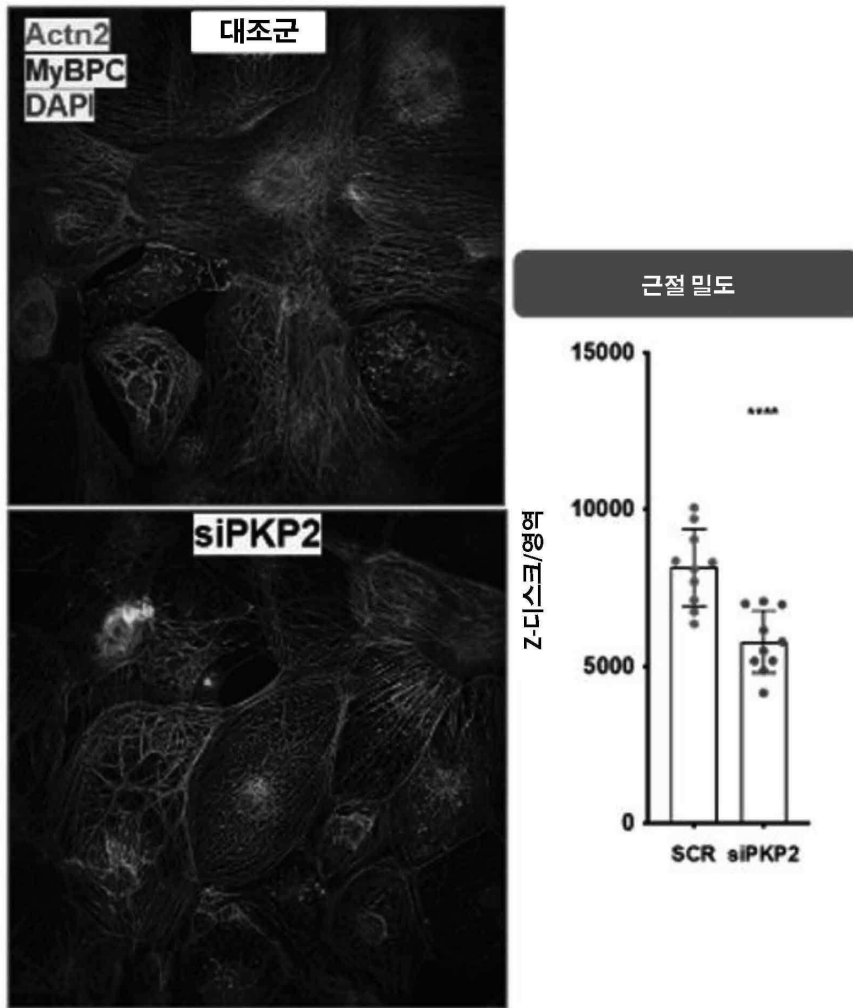
섬유지방 조직 대체

- ▶ 장기 배양된 환자 유래 iPSC에서 지방생성
- ▶ 마우스 PKP2 cKO만이 섬유증 표현형을 가진다

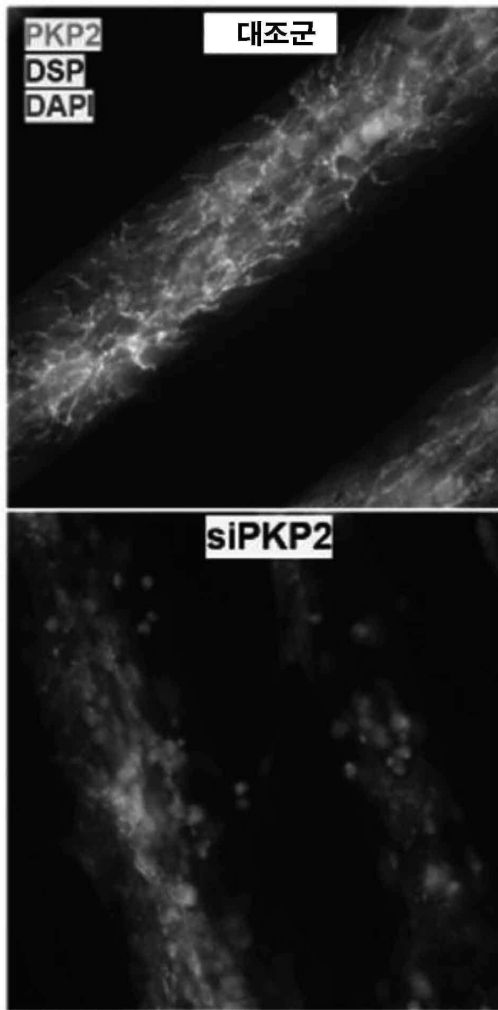
도면3a



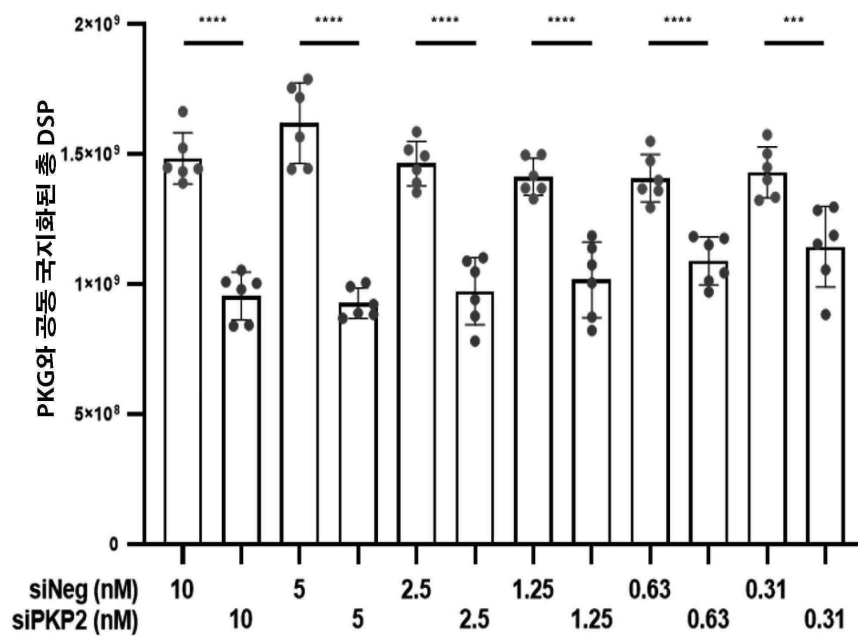
도면3b



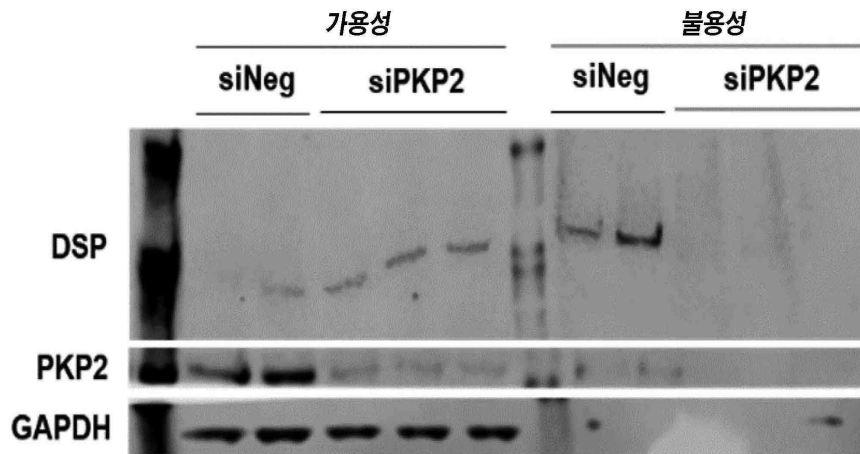
도면3c



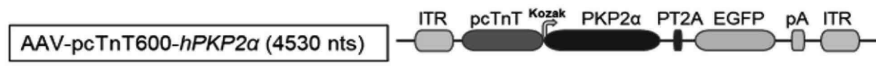
도면4



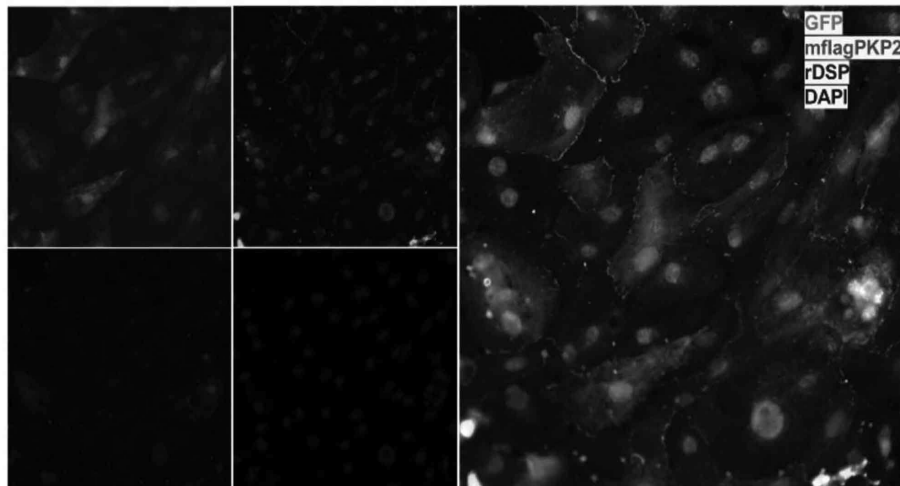
도면5



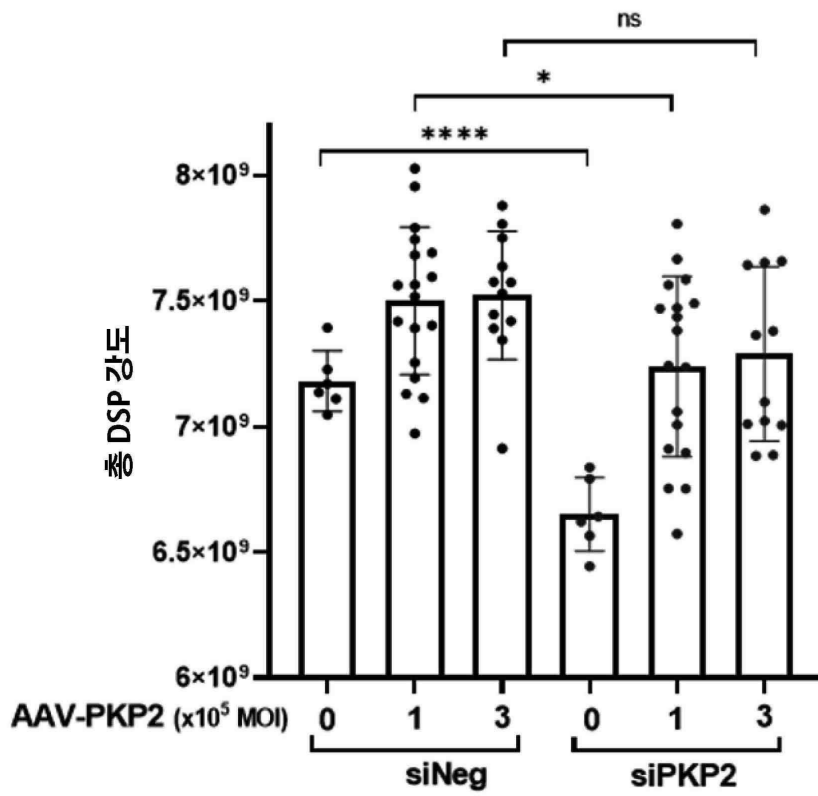
도면6a



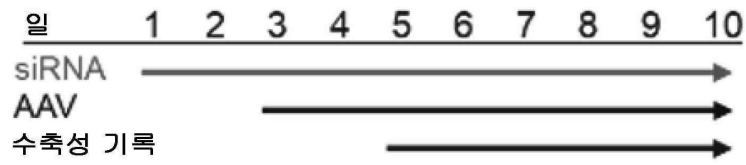
도면6b



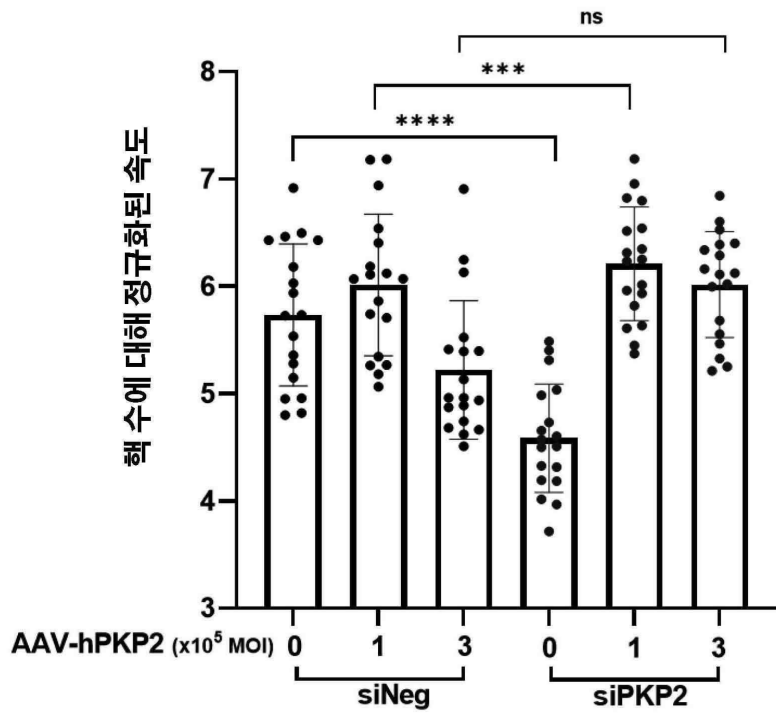
도면6c



도면7a

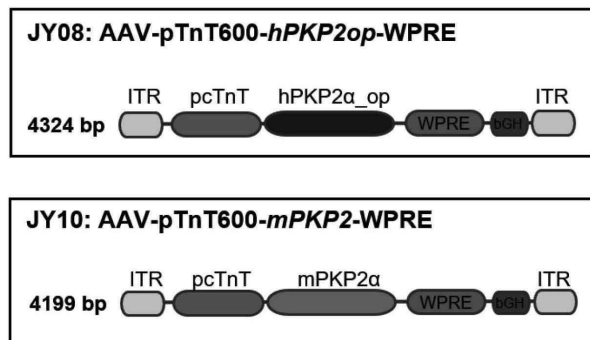


도면7b

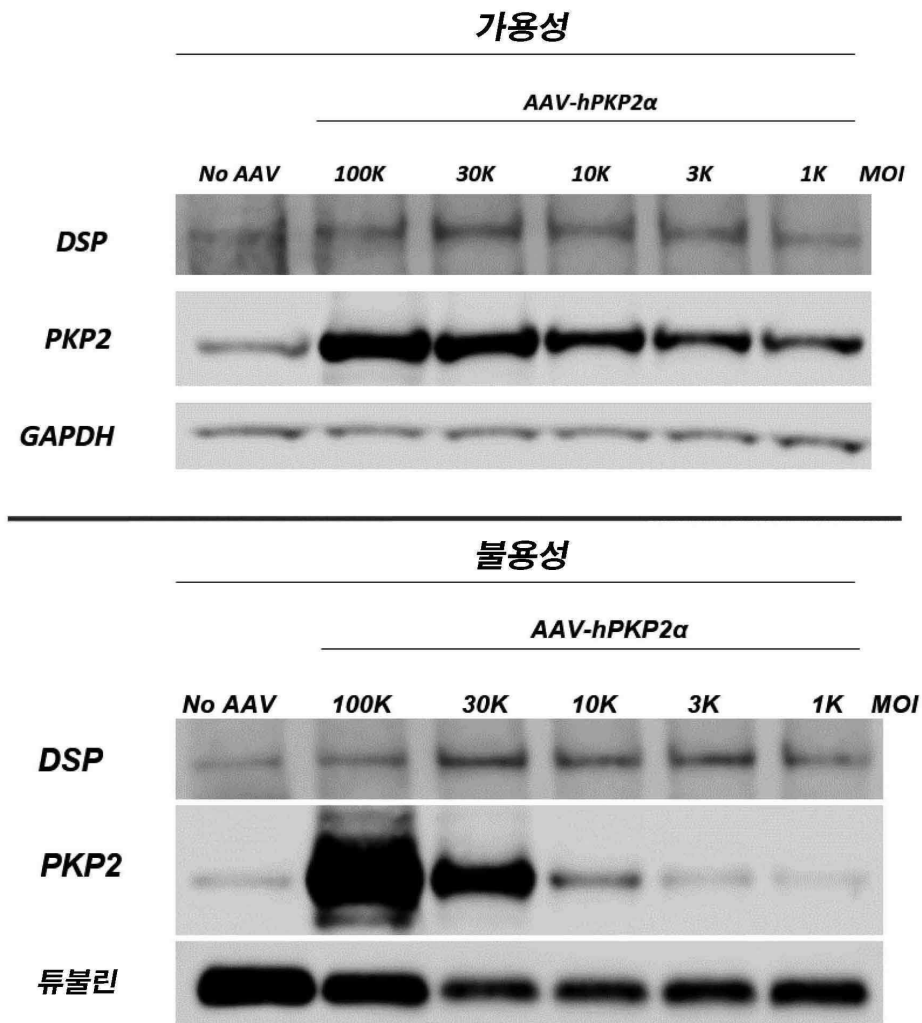


도면8

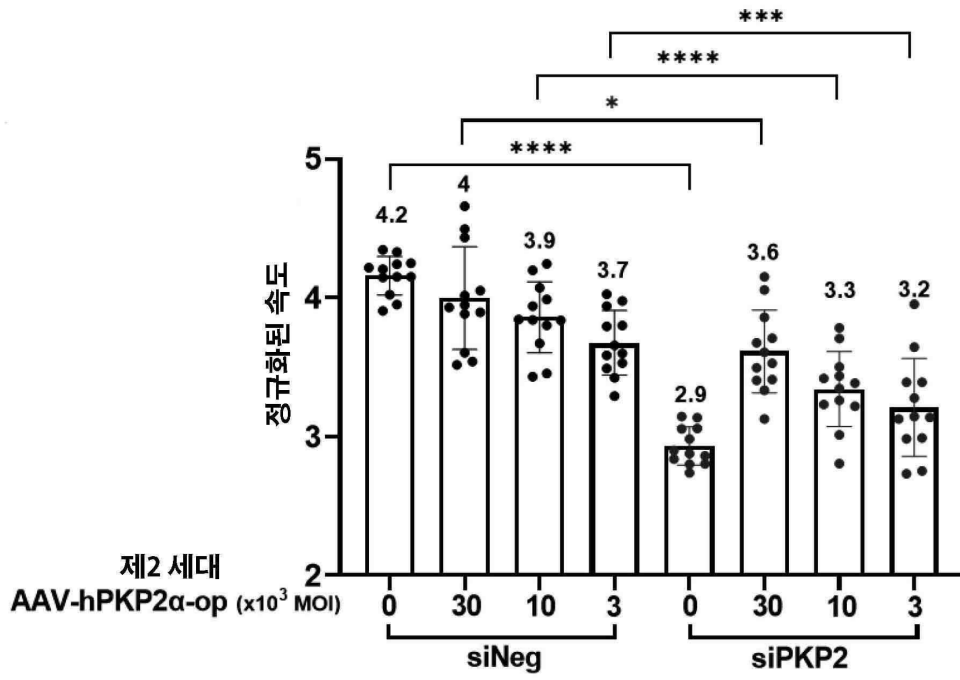
AAV 카세트 요소	크기 (nt)
ITR	260
cTnT 프로모터	600
hPKP2 α _op	2514
mPKP2 α	2387
WPRE	540
bGH 폴리(A)	215



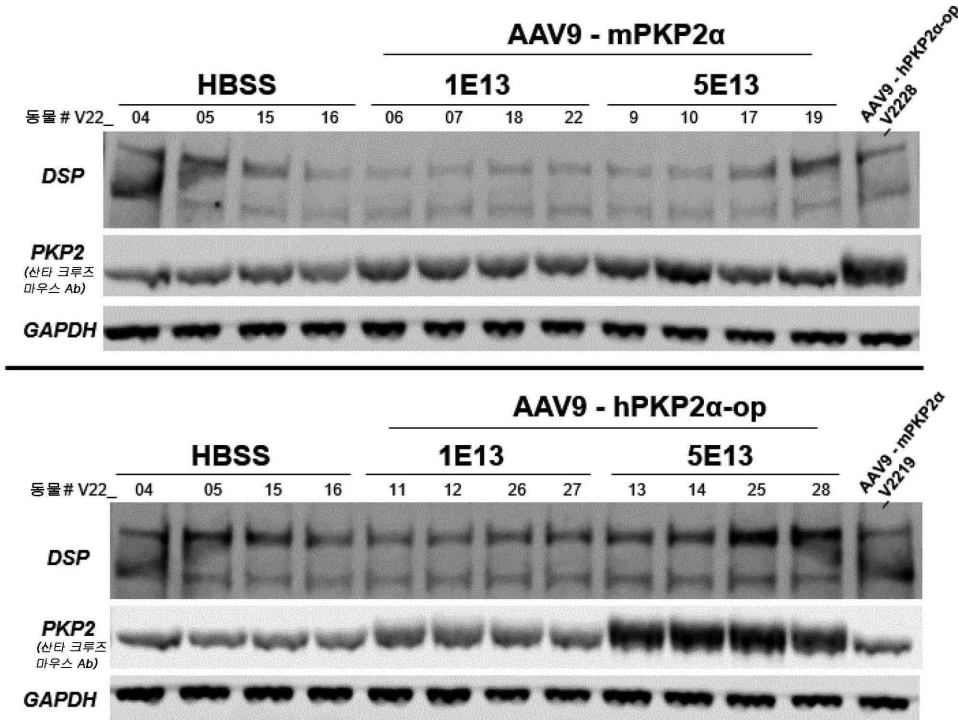
도면9a



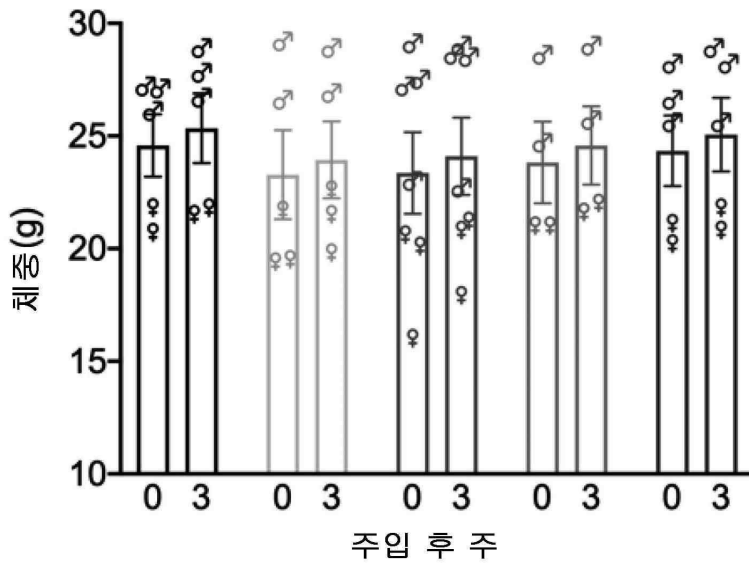
도면9b



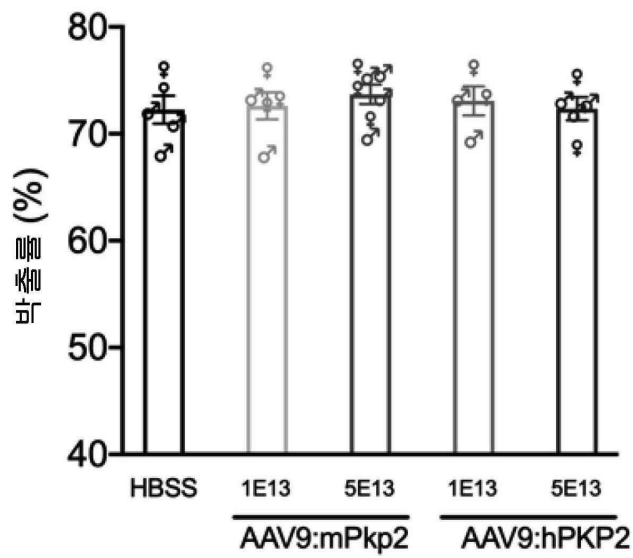
도면10



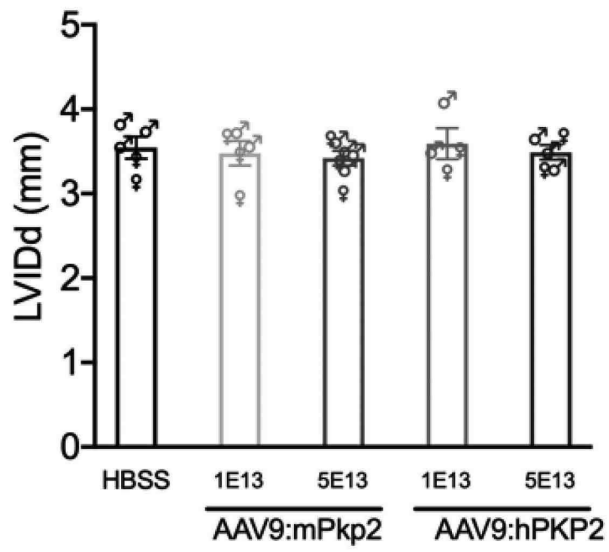
도면11a



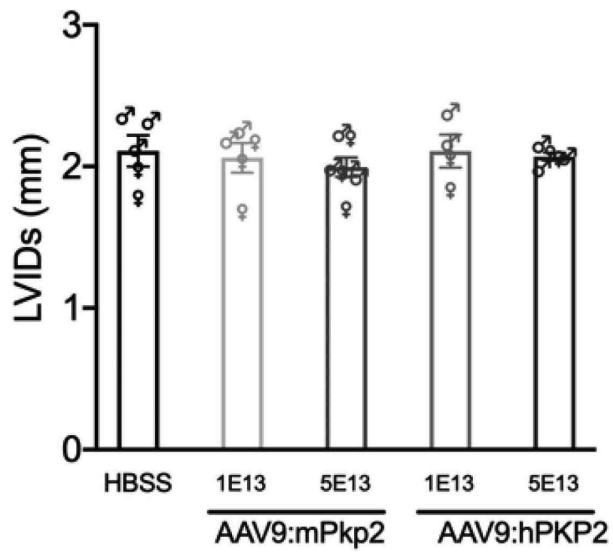
도면11b



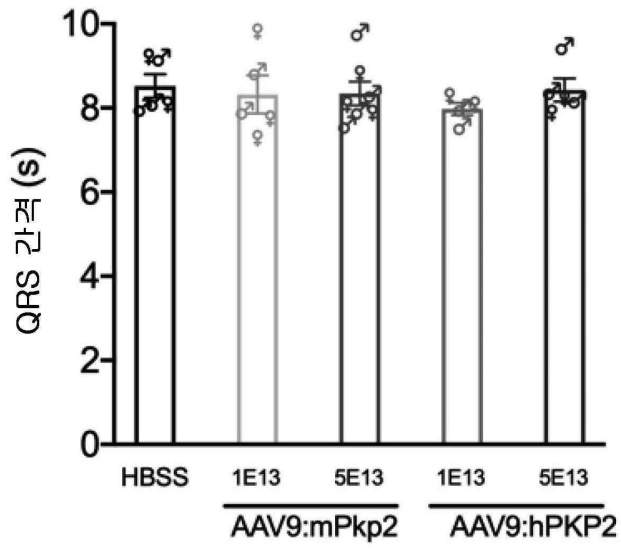
도면11c



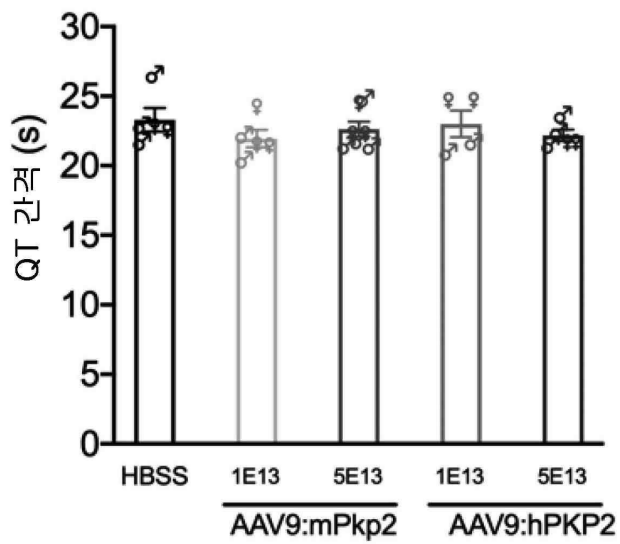
도면11d



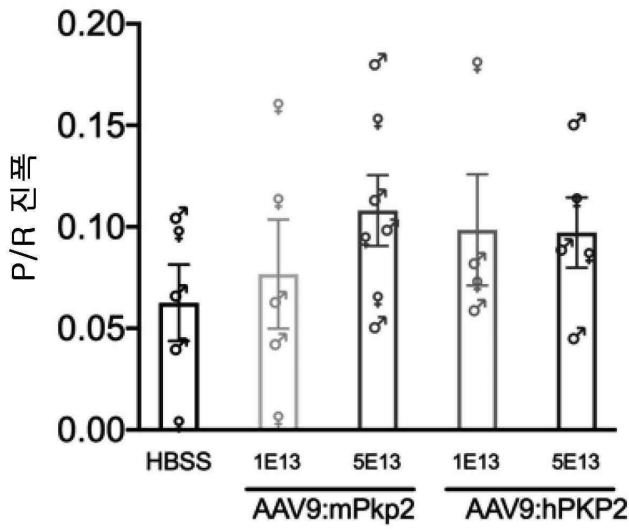
도면11e



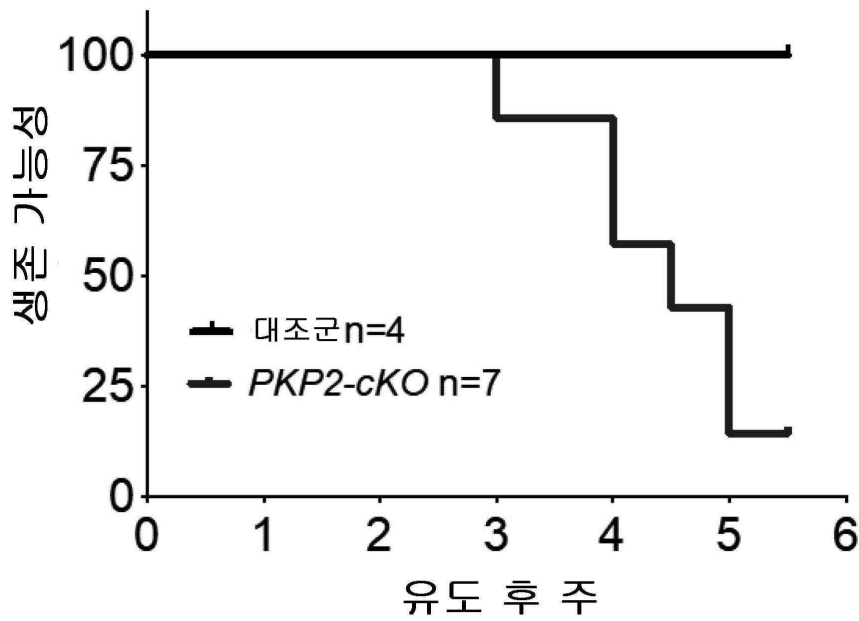
도면11f



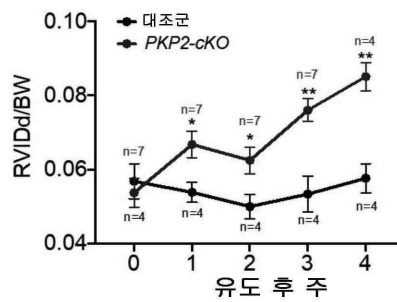
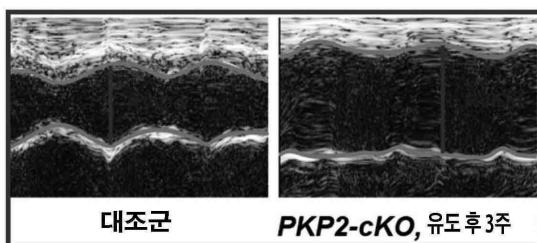
도면11g



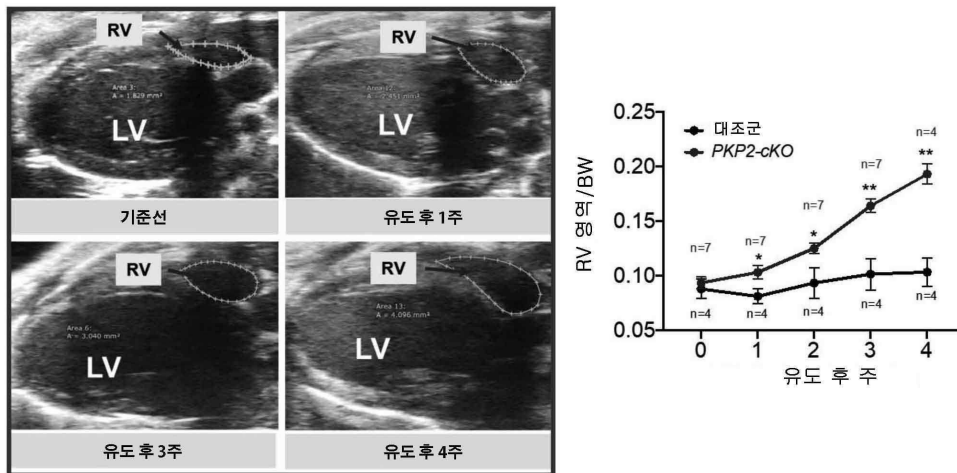
도면12



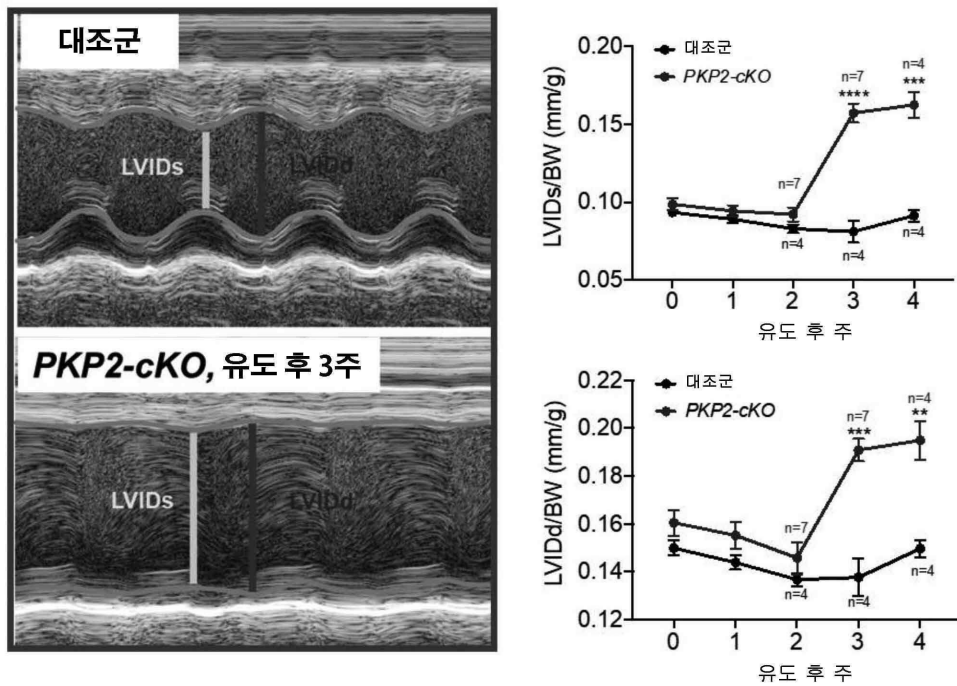
도면13a



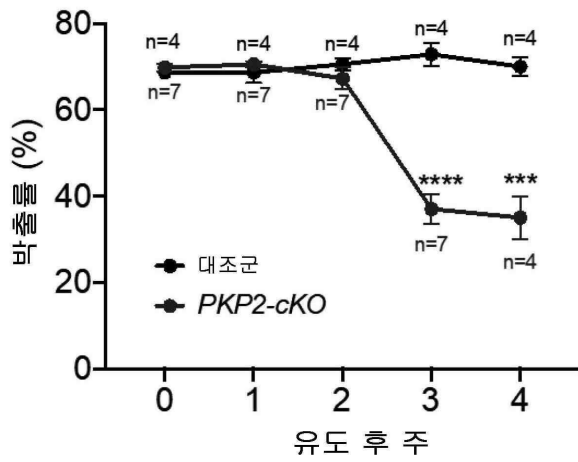
도면13b



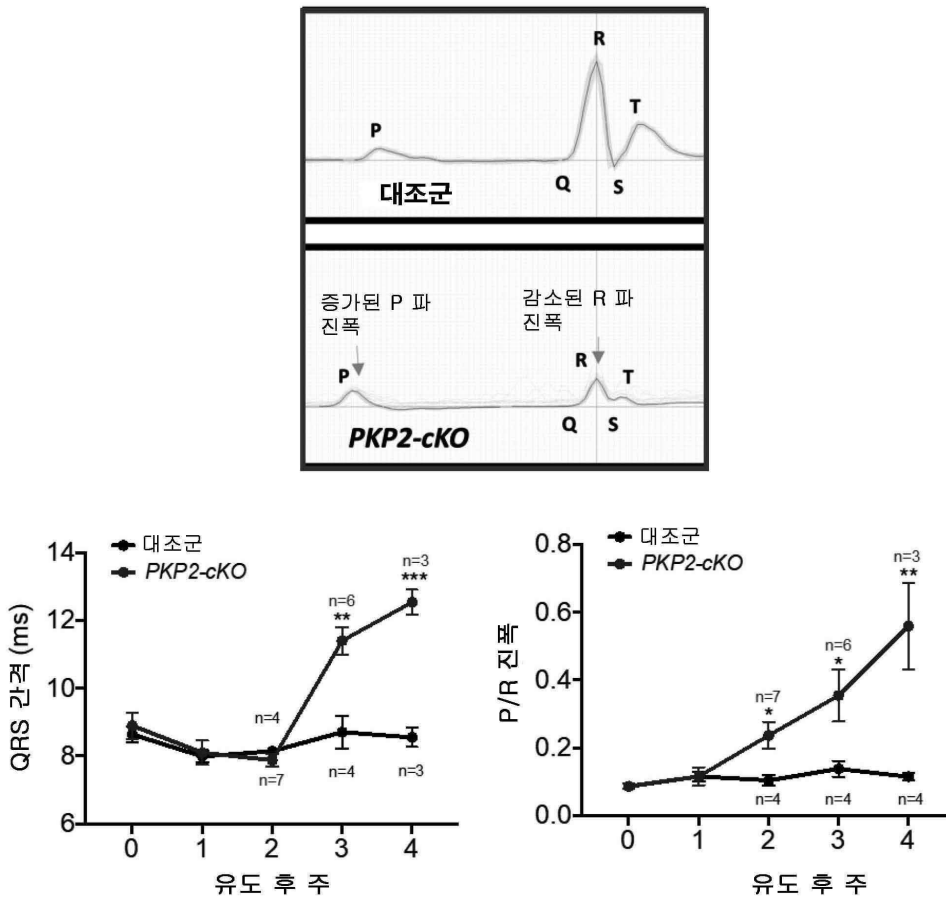
도면14a



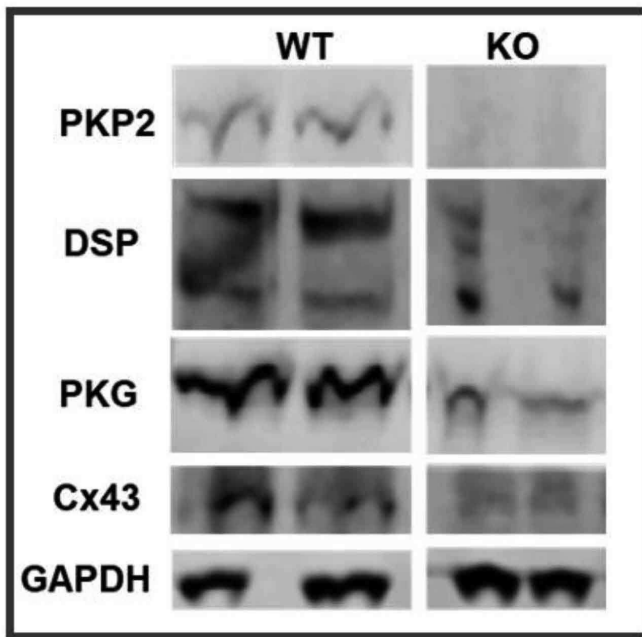
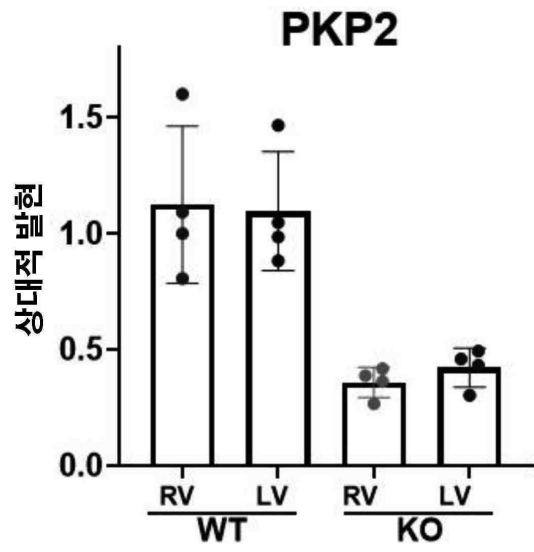
도면14b



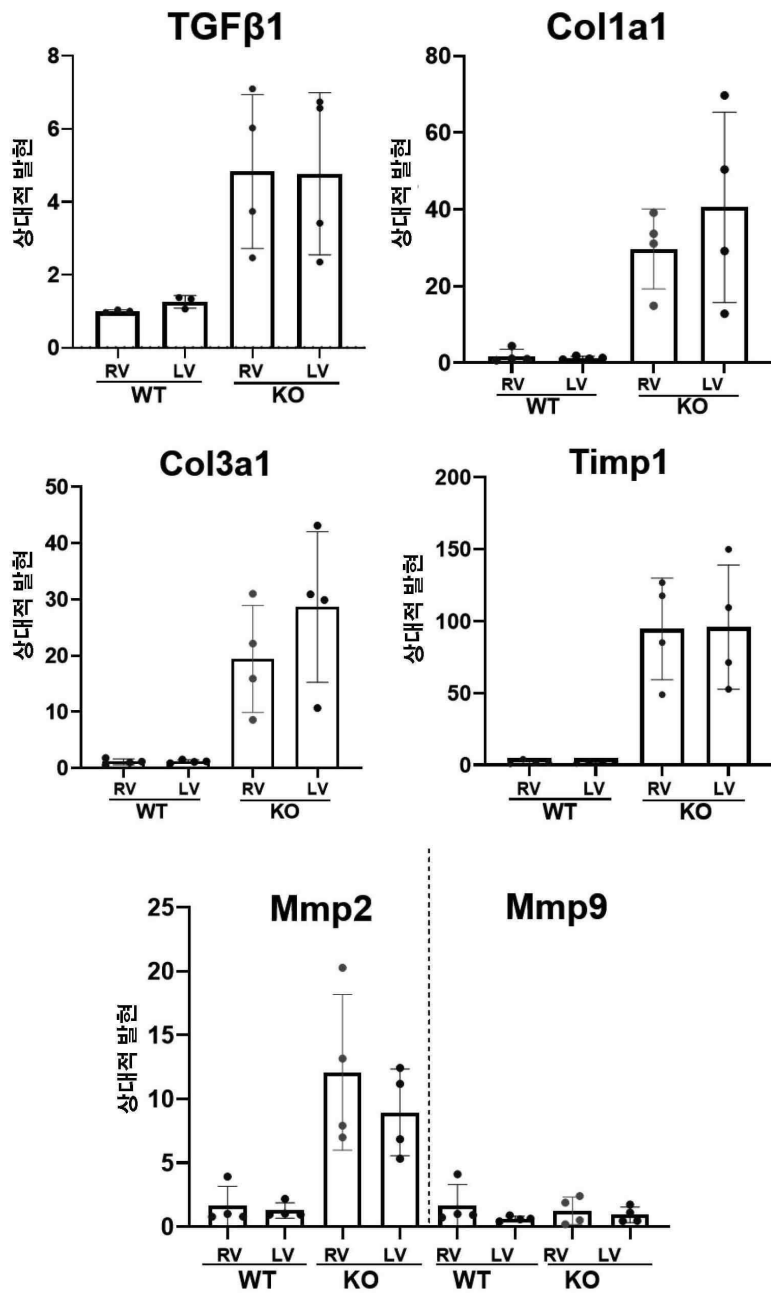
도면15



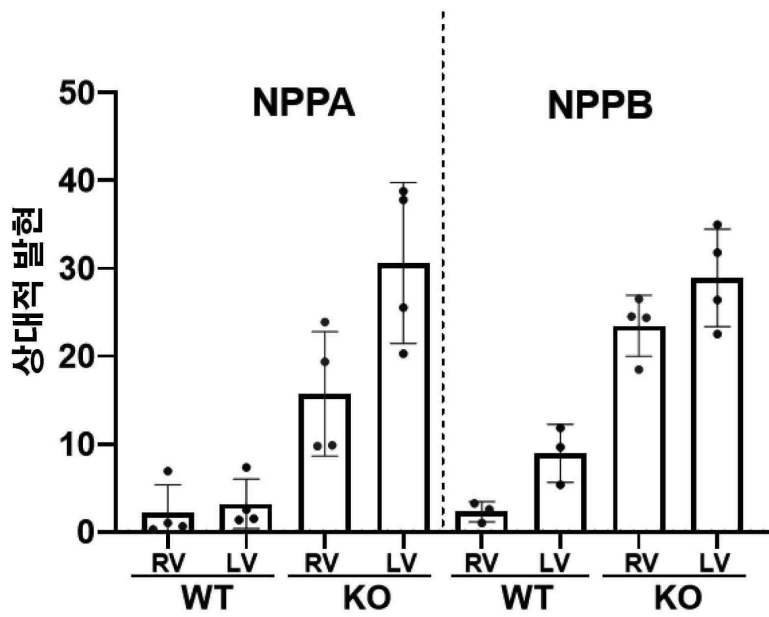
도면16a



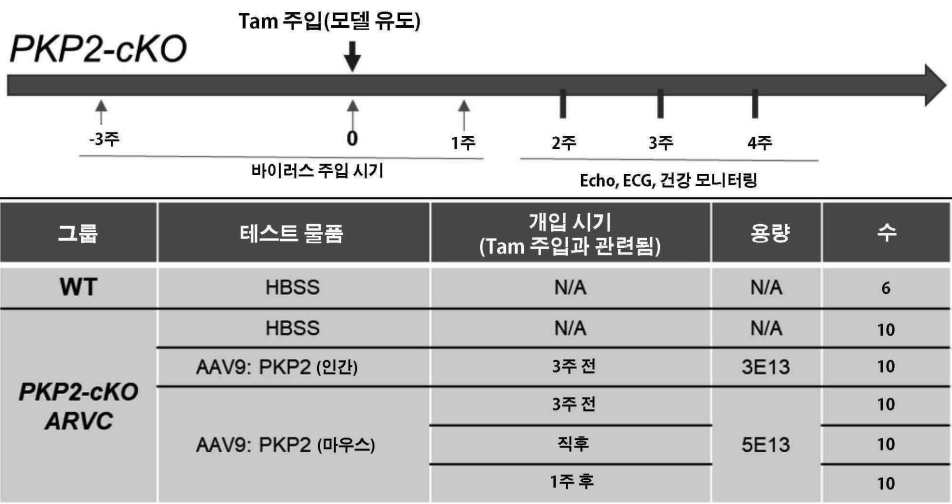
도면16b



도면16c



도면17



도면18a

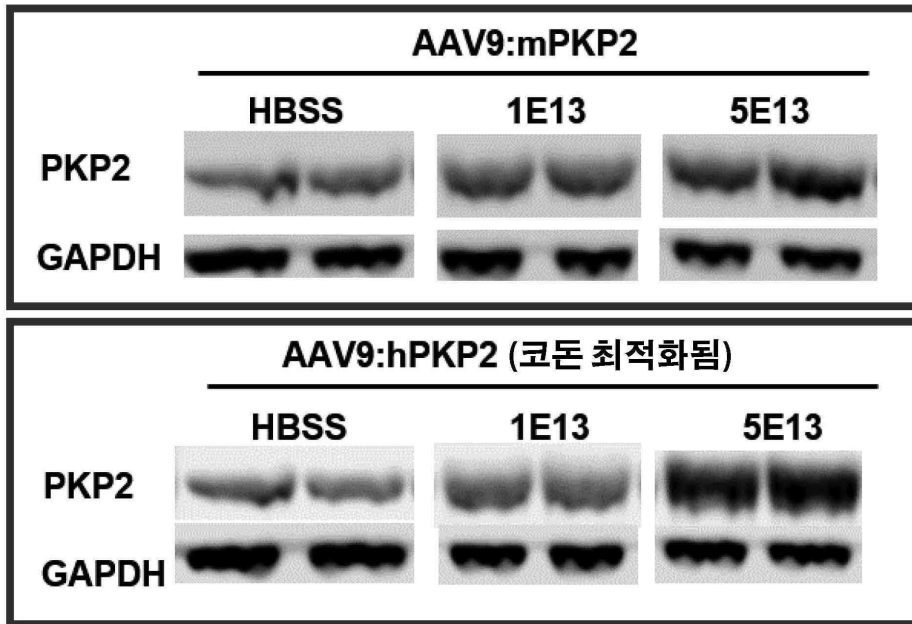
AAV-pTnT600-mPKP2-WPRE



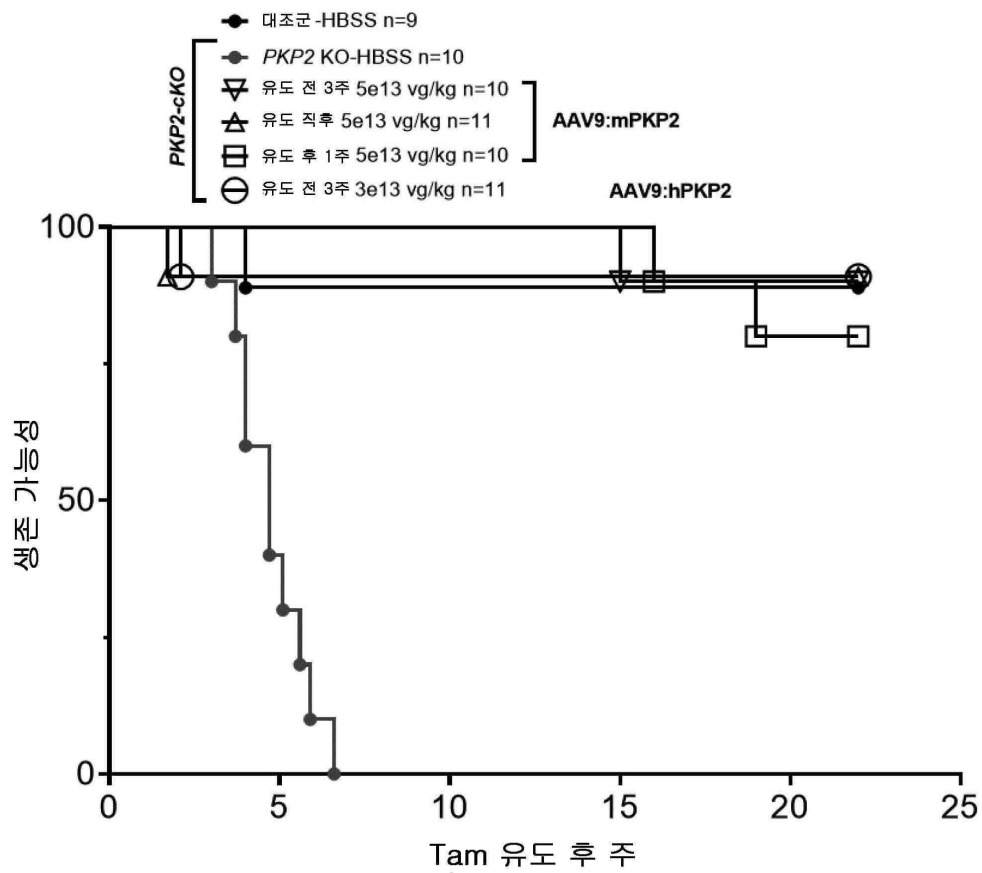
AAV-pTnT600-hPKP2op-WPRE



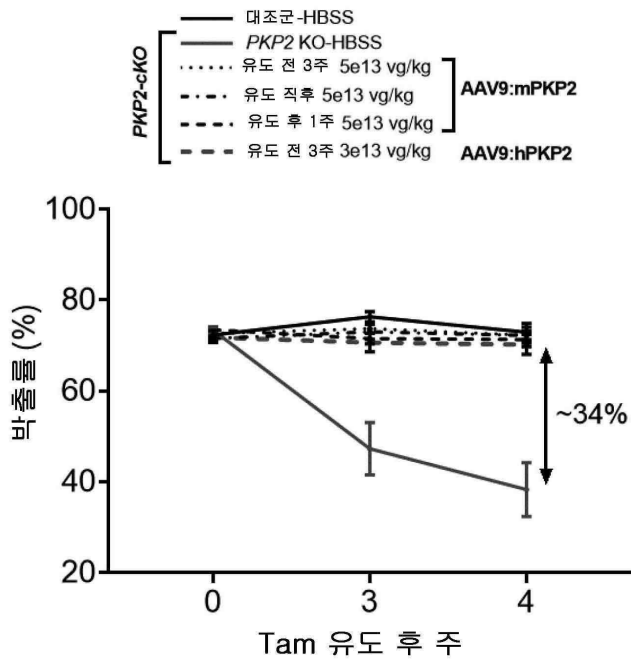
도면18b



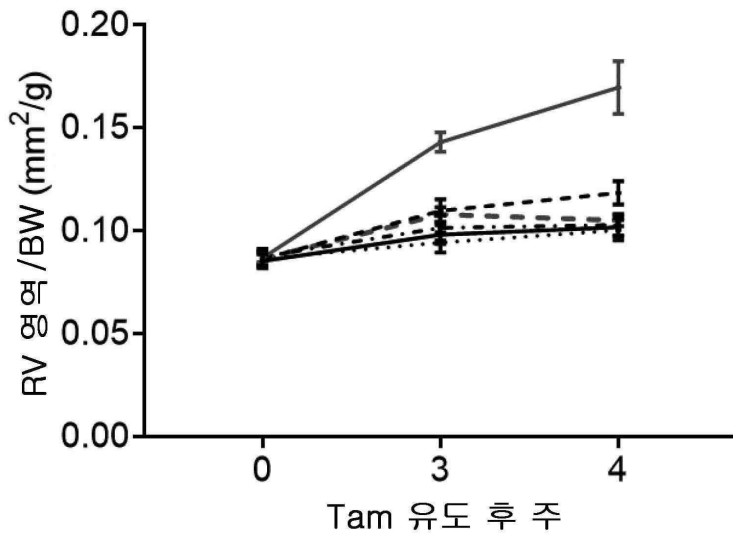
도면19



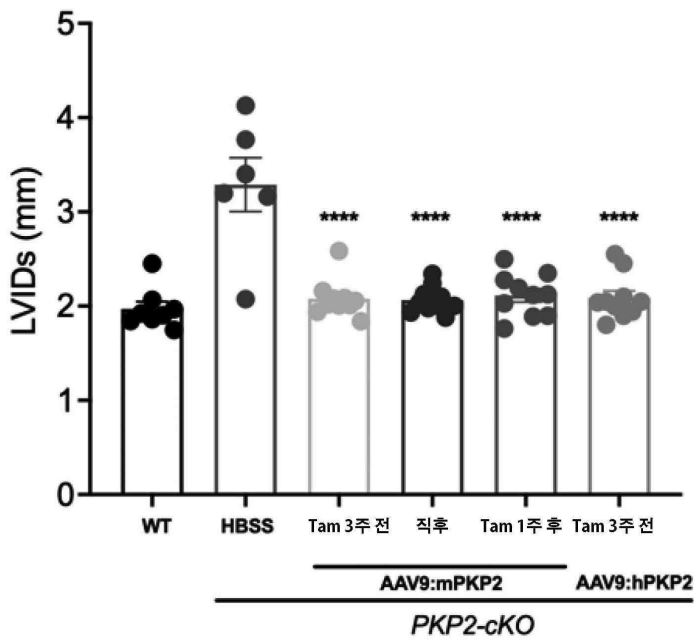
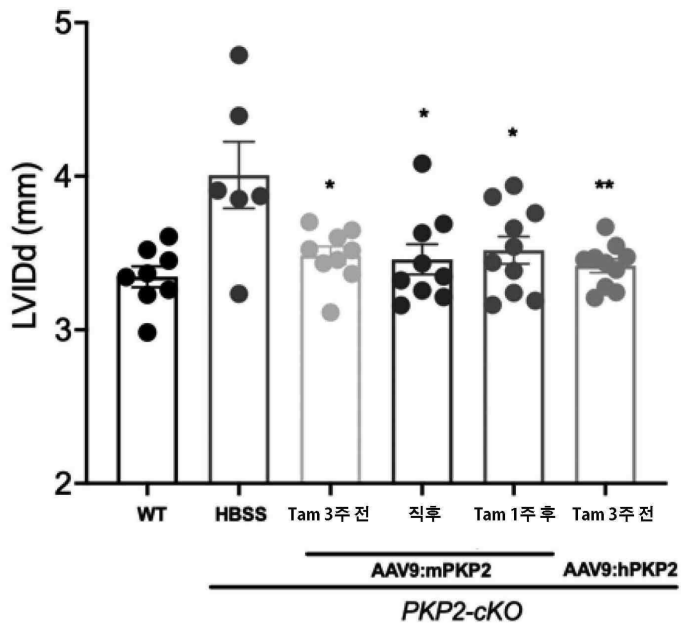
도면20a



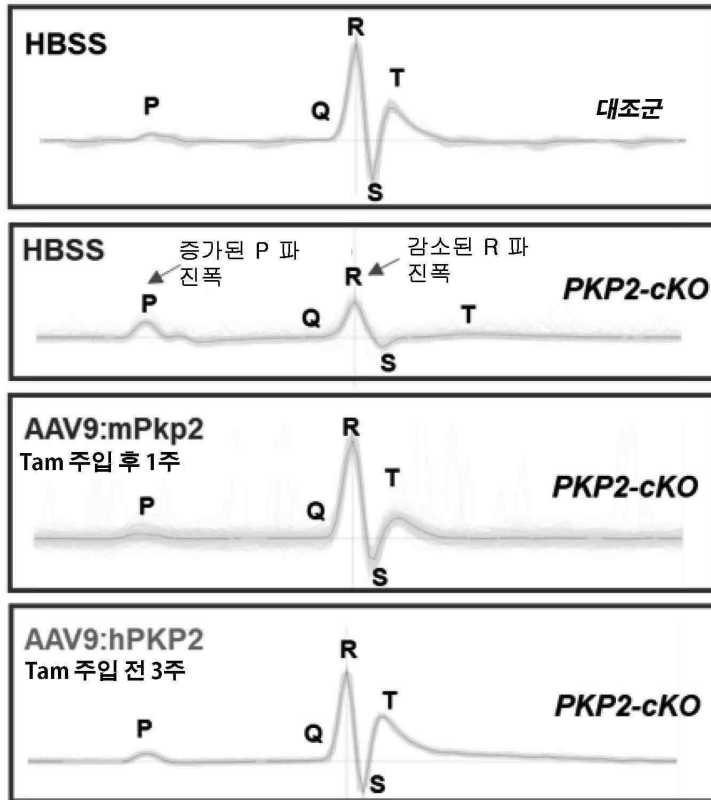
도면20b



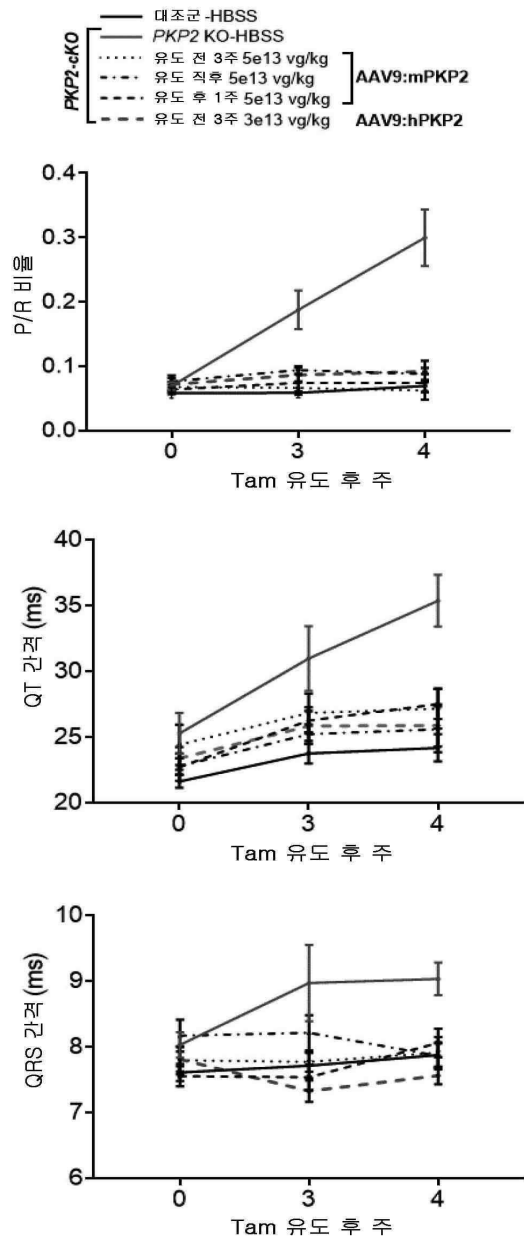
도면20c



도면21a

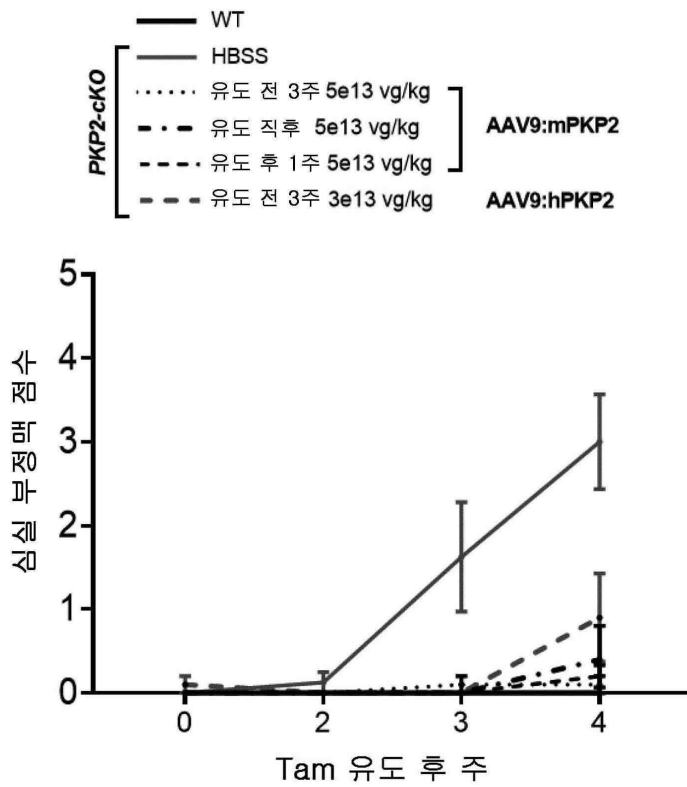


도면21b

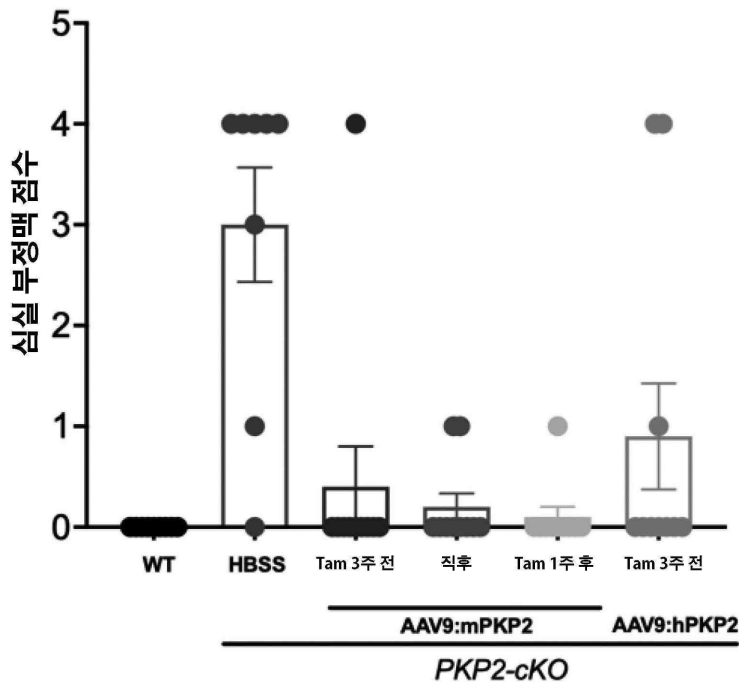


도면22a

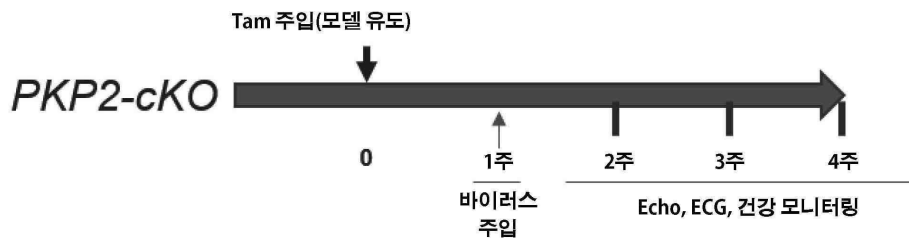
등급	부정맥
5	S-VT/VF/심장 돌연사
4	NSVT
3	>100PVCs, 커플릿 및 트리플렛
2	>50, <100 PVCs
1	<50 PVCs, PJs, AV 차단
0	<10 PVCs



도면22b

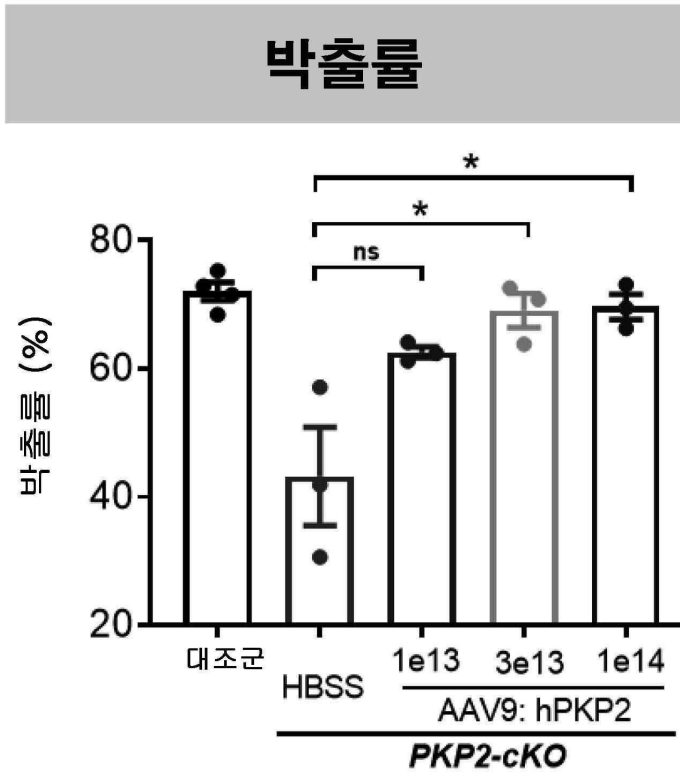


도면23

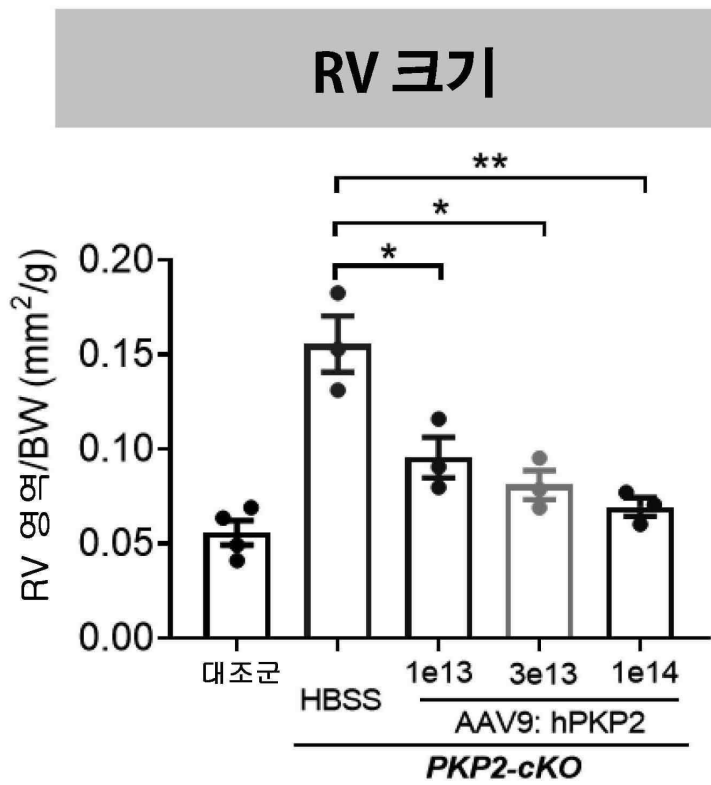


그룹	테스트 물품	용량	수
WT	HBSS	N/A	4
PKP2-cKO ARVC	HBSS	N/A	4
	AAV9: hPKP2 (인간 오르토로그)	1e13	4
		3e13	3
		1e14	3

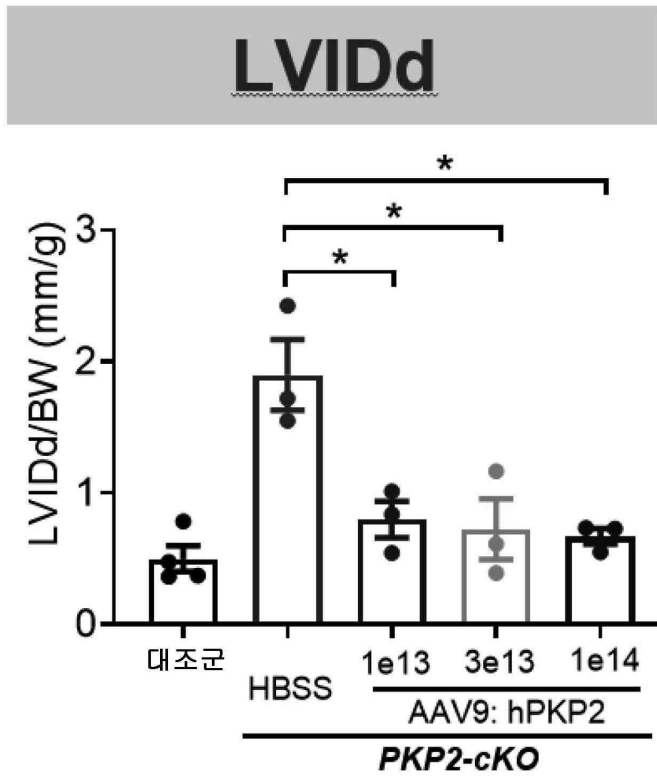
도면24a



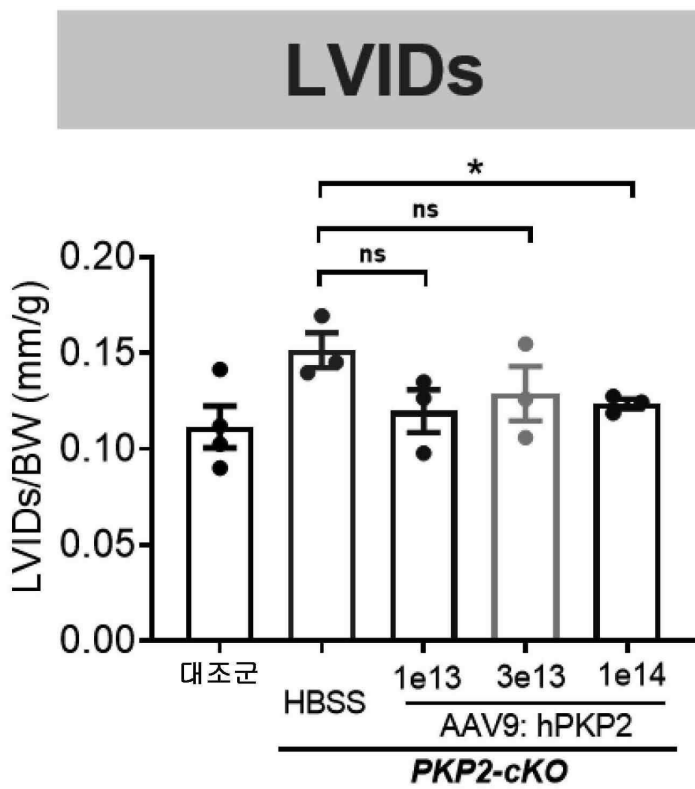
도면24b



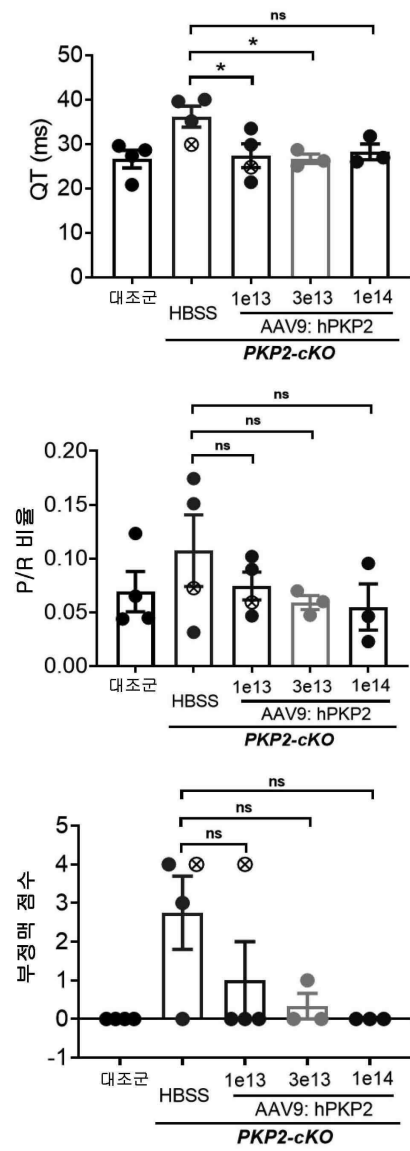
도면24c



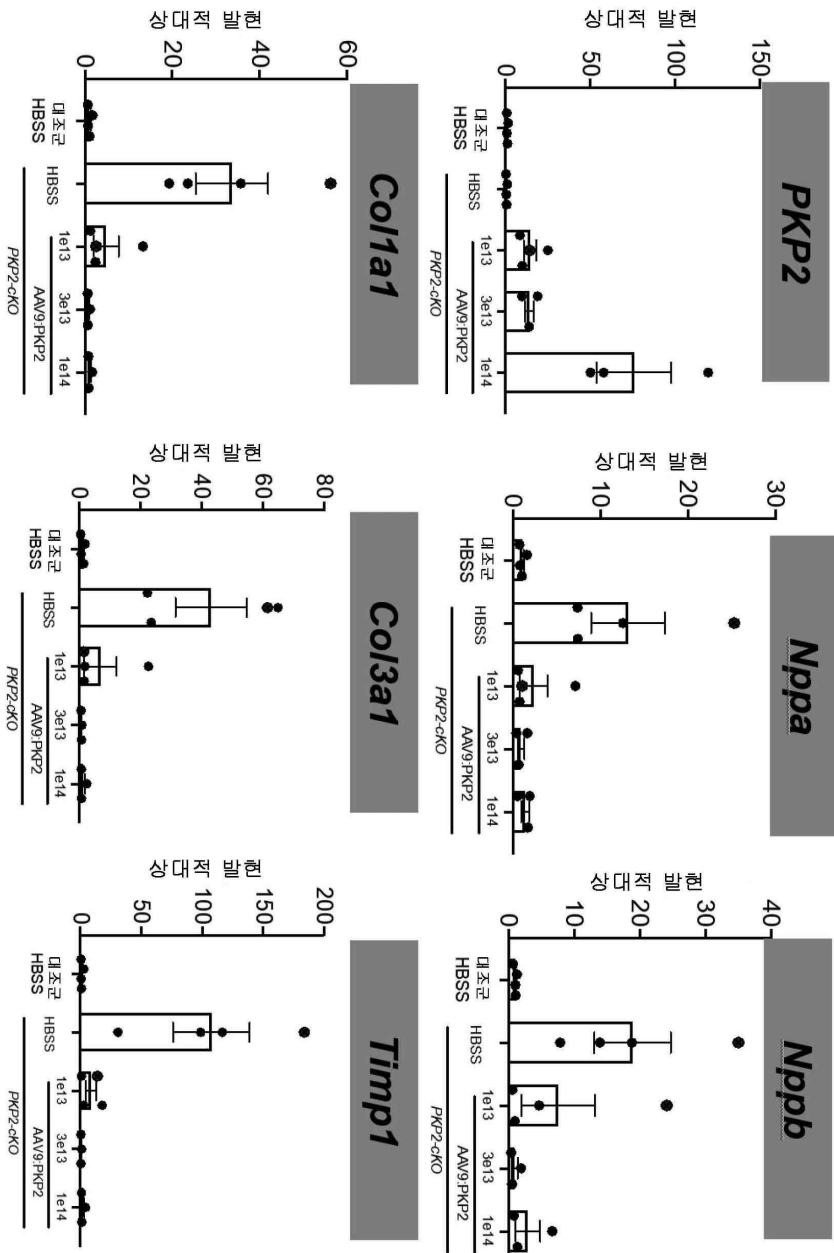
도면24d



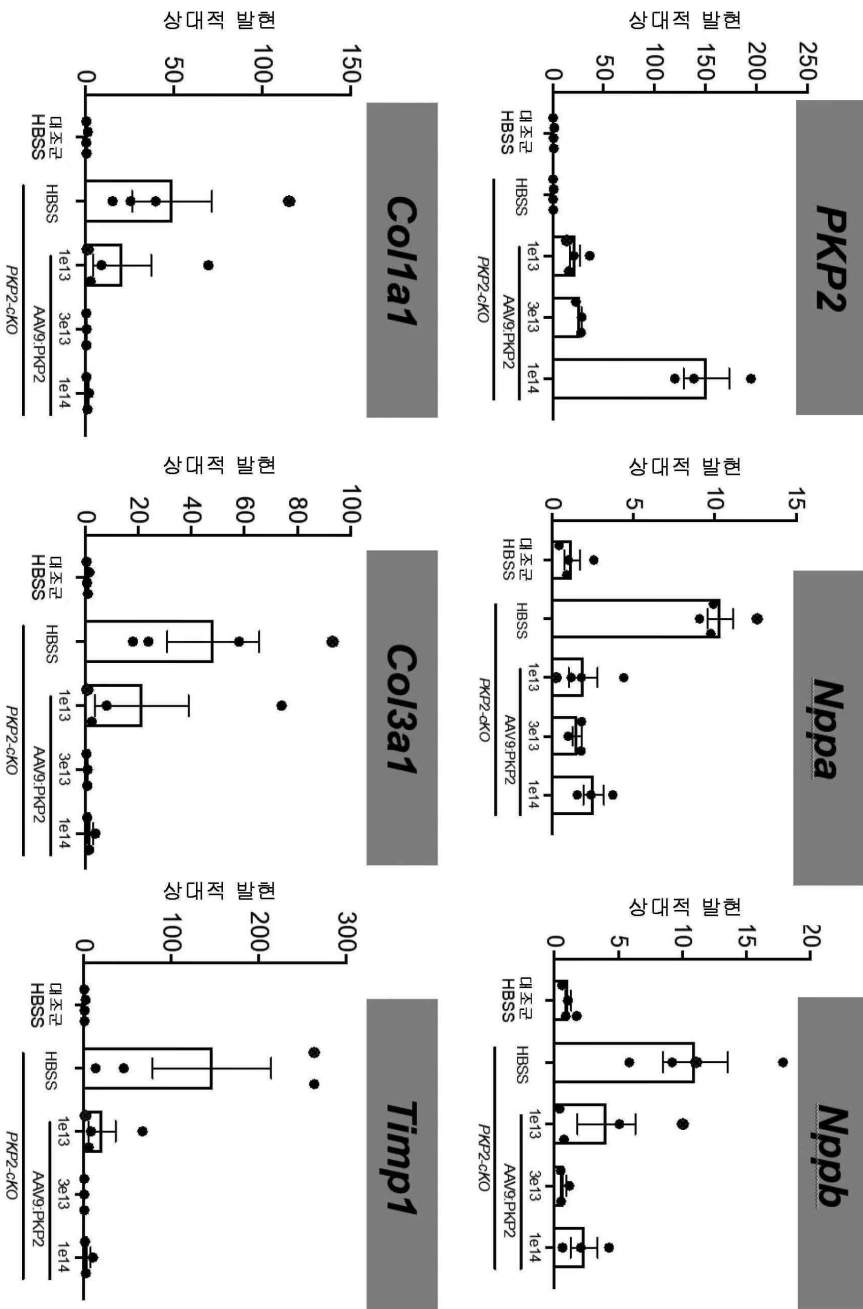
도면25



도면26a



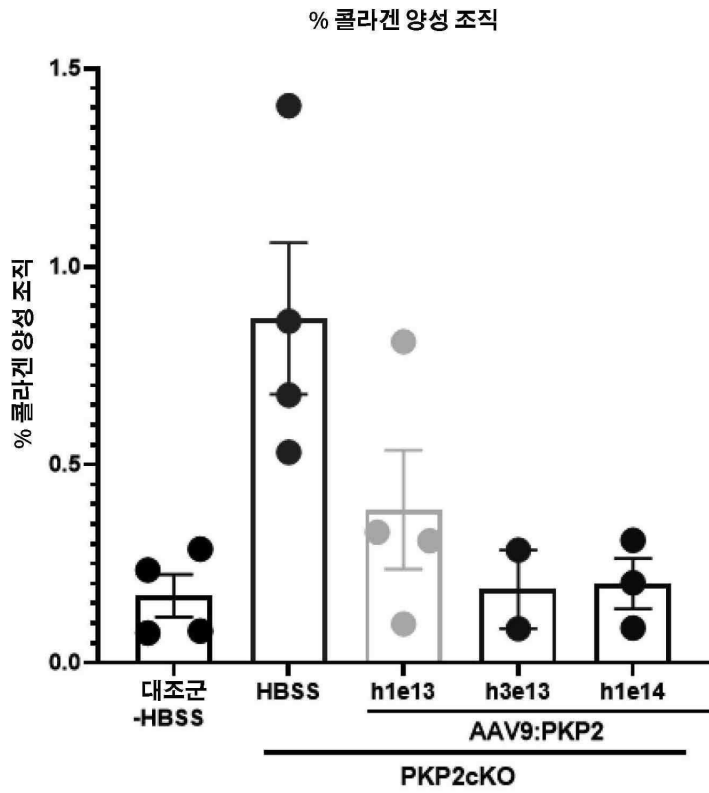
도면26b



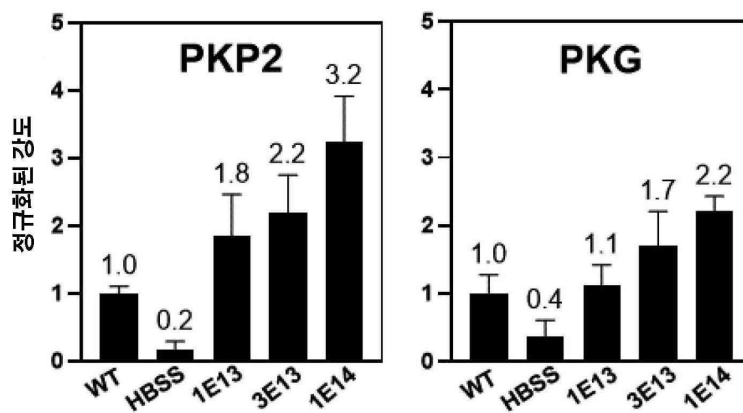
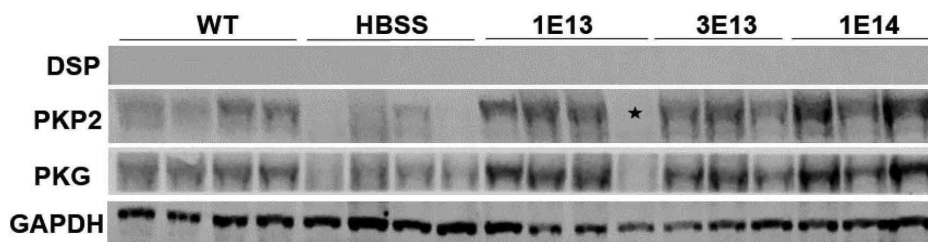
도면27a



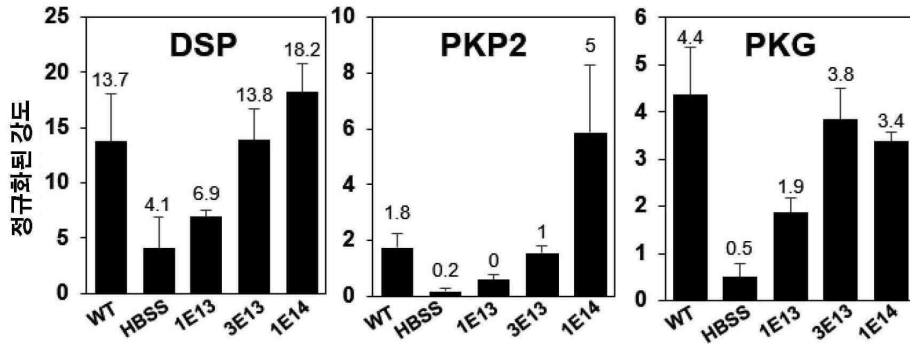
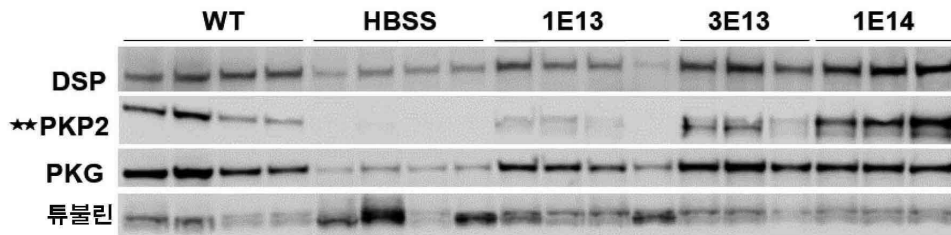
도면27b



도면28a



도면28b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> TENAYA THERAPEUTICS, INC.

<120> PLAKOPHILLIN-2 GENE THERAPY METHODS AND COMPOSITIONS

<130> 50971-701.601

<140> PCT/US2021/053908

<141> 2021-10-07

<150> 63/227,801

<151> 2021-07-30

<150> 63/216,322

<151> 2021-06-29

<150> 63/172,053

<151> 2021-04-07

<150> 63/089,951

<151> 2020-10-09

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2514

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcagccc ccggcgcccc agctgagtac ggctacatcc ggaccgtcct gggccagcag 60

atcctgggac aactggacag ctccagcctg gcgctgcctt ccgaggccaa gctgaagctg 120

gcggggagca gcggccgcgg cggccagaca gtcaagagcc tgcggatcca ggagcaggtg 180

cagcagaccc tcgcccggaa gggccgcagc tccgtgggca acggaatct tcaccgaacc 240

agcagtgttc ctgagtaigt ctacaaccta cacttggttg aaaatgatit tgttgaggc 300

cgttcccctg ttctaaaaac ctatgacatg ctaaaggctg gcacaactgc cacttatgaa 360

ggtcgcctggg gaagaggaac agcacagtac agctcccaga agtccgtgga agaaaggtcc 420

ttgaggcatc ctctgaggag actggagatt tctcctgaca gcagcccga gagggctcac 480

tacacgcaca gcgattacca gtacagccag agaagccagg ctgggcacac cctgcaccac 540

caagaaagca ggcgggcccgc ctcctagtgt ccaccgagat atgctcgttc cgagatcgtg 600

ggggtcagcc gtgctggcac cacaagcagg cagcgcactt ttgacacata ccacagacag 660

taccagcatg gctctgttag cgacaccgtt tttgacagca tccctgccc cccggccctg 720

ctcacgtacc ccaggccagg gaccagcccgc agcatgggca acctcttggga gaaggagaac 780

tacctgacgg cagggtcac tgtcgggcag gtcaggcccgc tgggtcccct gcagcccgtc 840

actcagaaca gggcttccag gtcctcctgg catcagagct ccttccacag caccgcacg 900

ctgaggggaag ctgggcccag tgtcgcctgt gattccagcg ggaggagagc gcacttgact 960

gtcggccagg cggccgcagg gggaaagtggg aatctgctca ctgagagaag cactttcact 1020

gactcccagc tggggaatgc agacatggag atgactctgg agcagcaggt gactatgctc 1080

gaggcagacc acatgctgcc atccaggatt tctgctgcag ctactttcat acagcacgag 1140

tgcttccaga aatctgaagc tcggaagagg gtttaaccagc ttcgtggcat cctcaagctt 1200

ctgcagctcc taaaagtcca gaatgaagac gttcagcgag ctgtgtgtgg ggccttgaga 1260

aacttagtat ttgaagacaa tgacaacaaa ttggaggtgg ctgaactaaa tggggtacct 1320

cggctgctcc aggtgctgaa gcaaaccaga gacttgagaa ctaaaaaaca aataacaggt 1380

ttgctgtgga atttgtcatc taatgacaaa ctcaagaatc tcatgataac agaagcattg 1440

cttacgctga cggagaatat catcatcccc ttttctgggt ggcctgaagg agactacca 1500

aaagcaaatg gtttgcctga ttttgacata ttctacaacg tcactggatg cctaagaaac 1560

atgagtctct ctggcgtgca tgggagaaaa gcgatgagaa gatgtgacgg actcattgac 1620

tacttggtcc attatgtcag aggaaccatt gcagattacc agccagatga caaggccacg 1680

gagaattgtg tgtgcattct tcataacctc tcctaccagc tggaggcaga gctcccagag 1740

aaatattccc agaatatcta tattcaaac cggaatatcc agactgacaa caacaaaagt 1800

attggatggt ttggcagtcg aagcaggaaa gtaaaagagc aataccagga cgtgccgatg 1860

ccggaggaaa agagcaacct caagggcgtg gagtggctgt ggcatccat tgttataagg 1920

atgtatctgt ccttgatcgc caaaagtgtc cgcaactaca cacaagaagc atccttagga 1980

gctctgcaga acctcacggc cggaagtgga ccaatgccga catcagtggc tcagacagtt 2040

gtccagaagg aaagtggcct gcagcacacc cgaaagatgc tgcatgttgg tgaccaagt 2100

gtgaaaaaga cagccatctc gctgctgagg aatctgtccc ggaatcttc tctgcagaat 2160

gaaattgcca aagaaactct ccctgatttg gtttccatca ttcctgacac agtcccagat 2220

actgacctc tcattgaac tacagcctct gcctgttaca cattgaacaa cataatcaa 2280

aacagttacc agaatgcacg cgaccttcta aacaccgggg gcatccagaa aattatggcc 2340

attagtgcag gcgatgccta tgcctccaac aaagcaagta aagctgctc cgtccttctg 2400

tattctctgt gggcacacac ggaactgcat catgcctaca agaaggctca gtttaagaag 2460

acagattttg tcaacagccg gactgccaaa gcctaccact cccttaaaga ctga 2514

<210> 2

<211> 2511

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 2

atggtctgctc ctggtgetcc tgccgagtac ggetacatca gaacagtget gggccagcag 60

atcctgggac agctggattc tagctctctg gcctgcctt ctgaggccaa gctgaaactg 120

gccggcagtt ctggaagagg cggccagaca gtgaagtccc tgcggatcca agaacaggtg 180

cagcagacce tggccagaaa gggcagatct tctgtcggca acggcaacct gcacagaacc 240

agctctgtgc ccgagtacgt gtacaatctg cacctggtgg aaaacgactt cgtcggcggc 300

agatcccctg tgcctaagac ctacgatatg ctgaaggccg gcaccaccgc cacctatgaa 360

ggcagatggg gaagaggcac agcccagtac agcagccaga aaagcgtgga agagagaagc 420

ctgcggcacc ctctgcggag actggaatc agccctgata gcagcccaga gagagcccac 480

tacaccaca gcgactacca gtactcccag agatctcagg ccggccacac actgcaccac 540

caagagtcta gaagggccgc tctgctggtg cctcctagat acgccagatc tgagatcgtg 600

ggcgtgtcca gagccggcac aacaagcaga cagagacact tcgacaccta ccaccggcag 660
 tatcagcacg gcagcgtgtc cgataccgtg ttcgatagca tccccccaa tctgtctctg 720
 ctgacatacc ctagacctgg cacctccaga tccatgggca atctgtctgga aaaagagaac 780

 tacctgaccg ccggactgac cgtgggacaa gttcgacctc tggttcctct gcagcccgtg 840
 acacagaaca gagccagcag aagcagctgg caccagtcca gcttccacag caccagaaca 900
 ctgagagaag ctggccctag cgtggccgtg gattcttctg gtagaagggc tcacctgaca 960
 gttggccaag cagctgcagg cggaagcggg aatctgtctga ccgagagaag caccttcacc 1020
 gagaccagc tgggcaacgc gcacatggaa atgacactgg aacgggcccgt gtccatgctg 1080
 gaagccgatc acatgctgcc cagcagaatt agcgcgctg ccacctttat ccagcacgag 1140
 tgcttccaga agtctgaggc ccggaagaga gtgaaccagc tgagaggcat cctgaagctg 1200

 ctgcagctcc tgaaggtgca gaacgaggat gtgcagaggg ctgtgtgtgg ggccctgaga 1260
 aatctggtgt tcgaggacaa cgacaacaag ctggaagtgg ccgagctgaa cggcgtgccca 1320
 agactgctgc aggttctgaa acagaccgc gacctgaaa caaagaagca gatcaccggc 1380
 ctgctctgga acctgagcag caacgacaag ctgaagaacc tgatgatcac agaggccctg 1440
 ctgacctga cagagaacat catcatcct ttcagcggct ggcccagagg cgattacct 1500
 aaagctaag gcctgctgga cttcgacatc ttctacaacg tgaccggctg cctgagaaac 1560
 atgtctagcg ctggcgccga tggcagaaaag gccatgagaa gatgtgacgg cctgatcgac 1620

 agcctggtgc actatgtcgc gggcacaatc gccgattacc agcctgatga taaggccacc 1680
 gagaactcgc tgtgcatcct gcacaacctg agctaccagc tggaagcaga gctgcccag 1740
 aagtacagcc agaacatcta catccagaac cggaacatcc agaccgacaa caacaagagc 1800
 atcggctgct tcggcagccg cagccgaaa gtgaaagaac agtaccagga cgtgcccag 1860
 cctgaggaaa agtctaacc caaaggcgtg gaatggetgt ggcacagcat cgtgatccgg 1920
 atgtacctga gcctgatcgc caagagcgtg cggaattaca cccaagagc atctctgggc 1980
 gcctgcaga atctgacagc aggatctgac cctatgccta cctctgtggc tcagaccgtg 2040

 gtgcagaaaag agtctggcct gcagcacacc cggaagatgc tgcatgtggg agatcccagc 2100
 gtgaagaaaa ccgccatcag cctgctgaga aacctgagcc ggaatctgtc tctgcagaat 2160
 gagatcgcca aagagacact gcccagctg gtgtctatca tccctgacac cgtgcctagc 2220
 accgacctgc tgattgagac aacagccagc gcctgctaca ccctgaacaa catcattcag 2280
 aactcctacc agaacgcccg cgatctgtg aacacaggcg gcatccagaa aatcatggcc 2340
 atctctgccg gcgagccta cgcctctaac aaggcctcta aagccgccag cgtgctgctg 2400

tattctctgt gggcccatc cgagctgcac catgcctata agaaggcca gttcaaaaag 2460

accgacttcg tgaacagccg gaccgccaag gcctaccact ctctgaaaga t 2511

<210> 3

<211> 600

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

pcTNT promoter sequence

<400> 3

gtcatggaga agaccacct tgcagatgtc ctactgggg ctggcagagc cggcaacctg 60

cctaaggctg ctacgtccat taggagccag tagcctggaa gatgtcttta cccccagcat 120

cagttcaagt ggagcagcac ataactcttg ccctctgcct tccaagattc tgggtctgag 180

acttatggag tgtcttggag gttgccttct gcccccaac cctgctcca gctggcctc 240

ccaggcctgg gttgctggcc tctgetttat caggattctc aagagggaca getggtttat 300

gttgcattgac tgttccctgc atatctgctc tggttttaa tagcttatct gacagctgg 360

aggaccacat gggcttatat ggcgtgggg acatgttct gtagccttgt ccttggcacc 420

tgccaaaata geagccaaca cccccacc ccaccgcat cccctgccc caccegtccc 480

ctgtcgaca ttctccctc cgcagggtg gctcaccagg cccagccca catgcctgct 540

taaagcctc tccatctct gcctcacca gtccccctg agactgagca gacgcctcca 600

<210> 4

<211> 1624

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

PKP2 promoter sequence

<400> 4

catctcagca tcatggttgg atgtttccac ctggctacat aagcaagctt tacacaaggt 60

gtaatttgc taaatagtg tccattctat tggggtggga gcaattgctt ccaggactca 120

catccatag gctcccactt agccatgtgg cctgctgaca aagggtggcg gaactgtcac 180

tactctgtt tccacgttt cagtcctttg gtttctctt cactccttg acgtcatgt 240

aaaaaggag gccatatacc tgtgcattgt gtgtctaagc attcagtgtg tgtctaagg 300

cagaagggtg tgggtaggaa aacaaagacg agggaagctg cgttctcaa acattcaga 360

cttgagtaag tggggttttg cagcaattga gtgatttgag ggaaagtga catacaaacc 420

caagcaatca aagggaatat tatcttaata ccagggatac atgtttttct tctgcctct 480

taagtccaaa gaggcaaatc aggacaagtg gctttggttg taaactttaa ggtcaaggat 540

cctttctgtt gagcttagct ctcaagttct cagtagtcaa ctgcggtgaa acataattaa 600

tagcacgata aatacaagtt gtggaagatt cgattgaaag ttggaggccc tctccgtgga 660

tctctctaca aagagcctgt aataaagagg acttaatcaa cgttagcagg gctatttaaa 720

aagcatcgtc tattaaaatt catttcttct ctagagcctc ttgttggagt ttctctgtgt 780

gggtgtgttc gtaagagagg aatgggttag caagagtact gggtacaatt tgtgtatcca 840

agagaaaaca gaagctctca atgaggaaga acatatgttt ctgggactgc atctgtgcaa 900

aaagtacata gtctgacgt tgtactaaga aaaaaaacac tctctttaga aagtctttta 960

ttcacacgt tatcttcttg gcacatttcc ctcatattgc ctttccgcc tgaccaaata 1020

gccctttctc accctcaggt ccaggaaaac caggaaactt ttccaacagt gcgacaaagc 1080

ctgactaacc agacatacta ctctctcggg gatcccggag gcaagcctca gtccaagaac 1140

aggagtgact ctgagggct cacctgcctg cagggcagcc cctccctgca tcgagcggaa 1200

atccatcctg tccagcgcgg ggcgtgggca gagcggggcg cggccccggc aggcggtatc 1260

cgctgggact ccgacaactg gcgcgacccc aggcgaaccg cgcccctctc cccacctccc 1320

cgcgggcggg tacaagtctc caggtgtccg cgcgctcagc gggctcggcc cgccccgcc 1380

cccgccccgg gcccgcactg cgcgtgcccg gccggagccg cgccccctcc tcagggaagg 1440

ccgggcgtcc ggcccacgag gccgagctcc cccccggccc gggcctctca ccggcgcggg 1500

gggcggggcca gggcgggggc cggactcgag cggggcgggg ctgcgccag cgccccagc 1560

tccgtggcgg cttcgccccg gagtcagag gcaggcgagc agctcggtcg cccccaccgg 1620

cccc 1624

<210> 5

<211> 4324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 5

ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccggcgtcg ggcgacctt 60

ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
 aggggttct ttagttaat gattaaccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
 aggaagatcg gaattcgccc ttaagtcatg gagaagacc acctgcaga tgtcctcact 240

 ggggctggca gagccggcaa cctgcccaag gctgctcagt ccattaggag ccagtagcct 300
 ggaagatgtc ttaccacca gcatcagttc aagtggagca gcacataact ctgcccctct 360
 gccttccaag attctggtag tgagacttat ggagtgtctt ggaggttgcc ttctgcccc 420
 caacctgct ccagctggc cctcccaggc ctgggttgct ggcctctgct ttatcaggat 480
 tctcaagagg gacagctggt ttatgttga tgaactgtcc ctgcatact gctctggttt 540
 taaatagctt atctgagcag ctggaggacc acatgggctt atatggcgtg gggtagatgt 600
 tcctgtagcc ttgtccctgg cacctgcaa aatagcagcc aacaccccc acccccaccg 660

 ccateccct gcccccaccg tccctgtcg cacattctc cctccgagg getggetcac 720
 caggccccag cccacatgcc tgcttaaagc cctctccatc ctctgcctca cccagtcccc 780
 gctgagactg agcagacgcc tccagccacc atggctgtc ctggtgtcc tgccgagtac 840
 ggctacatca gaacagtgt gggccagcag atcctgggac agctggatc tagctctctg 900
 gccctgcctt ctgaggccaa gctgaaactg gccggcagtt ctggaagagg cggccagaca 960
 gtgaagtccc tgcggatcca agaacaggtg cagcagacc tggccagaaa gggcagatct 1020
 tctgtcggca acggcaacct gcacagaacc agctctgtgc ccgagtacgt gtacaatctg 1080

 cacctggtgg aaaacgactt cgtcggcggc agatcccctg tgcctaagac ctacgatatg 1140
 ctgaaggcgg gcaccaccg cacctatgaa ggcagatggg gaagaggcac agcccagtac 1200
 agcagccaga aaagcgtgga agagagaagc ctgcggcacc ctctgcggag actggaatc 1260
 agccctgata gcagcccaga gagagccac tacaccaca gcgactacca gtactcccag 1320
 agatctcagg ccggccacac actgcaccac caagagtcta gaaggccgc tetgctggtg 1380
 cctcctagat acgccagatc tgagatcgtg ggcgtgtcca gagccggcac aacaagcaga 1440
 cagagacact tcgacaccta ccaccggcag tatcagcag gcagcgtgtc cgataccgtg 1500

 ttcgatagca tccccgcaa tctgctctg ctgacatacc ctagacctgg cacctcaga 1560
 tccatgggca atctgctgga aaaagagaac tacctgaccg ccggactgac cgtgggacaa 1620
 gttegacctc tggttcctct gcagcccgtg acacagaaca gagccagcag aagcagctgg 1680
 caccagtcca gctccacag caccagaaca ctgagagaag ctggccctag cgtggccgtg 1740
 gattcttctg gtagaagggc tcacctgaca gttggccaag cagctgcagg cggaagcggg 1800
 aatctgctga ccgagagaag caccttacc gacagccagc tgggcaacgc cgacatggaa 1860

atgacactgg aacgggccgt gtccatgctg gaagccgata acatgctgcc cagcagaatt 1920

agcggcctg ccacctttat ccagcacgag tgcttccaga agtctgagc cgggaagaga 1980

gtgaaccage tgagaggcat cctgaagctg ctgcagetcc tgaaggtgca gaacgaggat 2040

gtgcagaggg ctgtgtgtgg ggcctgaga aatctggtgt tcgaggacaa cgacaacaag 2100

ctggaagtgg ccgagctgaa ggcgctgcca agactgctgc aggttctgaa acagaccgc 2160

gacctggaaa caaagaagca gatcaccggc ctgctctgga acctgagcag caacgacaag 2220

ctgaagaacc tgatgatcac agaggccctg ctgaccctga cagagaacat catcatcct 2280

ttcagcggtt ggcccagggt cgattacctt aaagctaatt gcctgctgga ctctgacatc 2340

ttctacaacg tgaccggctg cctgagaaac atgtctagcg ctggcgccga tggcagaaag 2400

gccatgagaa gatgtgacgg cctgatcgac agcctggtgc actatgtgcg gggcacaatc 2460

gccgattacc agcctgatga taaggccacc gagaactgcg tgtgcatcct gcacaacctg 2520

agctaccagc tggaagcaga gctgcccag aagtacagcc agaacatcta catccagaac 2580

cggaacatcc agaccgacaa caacaagagc atcggctgct tcggcagccg cagccggaaa 2640

gtgaaagaac agtaccagga cgtgcccatt cctgaggaaa agtctaacc caaaggcgtg 2700

gaatggctgt ggcacagcat cgtgatccgg atgtacctga gcctgatcgc caagagcgtg 2760

cggaattaca cccaagaggc atctctgggc gcctgcaga atctgacagc aggatctggc 2820

cctatgccta cctctgtggc tcagaccgtg gtgcagaaag agtctggcct gcagcacacc 2880

cggaagatgc tgcatgtggg agatcccagc gtgaagaaaa ccgccatcag cctgctgaga 2940

aacctgagcc ggaatctgtc tctgcagaat gagatcgcca aagagacact gcccgacctg 3000

gtgtctatca tcctgacac cgtgcctagc accgacctgc tgattgagac aacagccagc 3060

gcctgtaca cctgaacaa catcattcag aactcctacc agaacgccg cgatctgctg 3120

aacacaggcg gcattcagaa aatcatggcc atctctgccg gcgagccta cgcctctaac 3180

aaggcctcta aagccgccg cgtgctgctg tattctctgt gggcccatc cgagctgcac 3240

catgcctata agaaggccca gttcaaaaag accgacttgc tgaacagccg gaccgccaag 3300

gectaccact ctctgaaaga ttaataagct tggatccaat caacctctgg attacaaaat 3360

ttgtgaaaga ttactggtg ttcttaacta tgttgcctct tttacgctat gtggatagc 3420

tgctttaatg cctttgtatc atgetattgc tteccgtatg gctttcattt tctctcctt 3480

gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca ggcaactgg 3540

ctggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac cccactggt tggggcattg ccaccacctg 3600

tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc 3660
 cgctgcctt gcccctgct ggacaggggc tcggctgttg ggactgaca attccgtggt 3720
 gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct 3780
 gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg 3840
 cggcctgctg ccggctctgc ggccctcttc gcgtcttcga gatctgcctc gactgtgcct 3900
 tctagtggcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgc cttccttgac cctggaaggt 3960
 gccactccca ctgtcctttc ctaataaaaat gaggaaattg catcgattg tctgagtagg 4020

tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac 4080
 aatagcaggc atgctgggga ctggggactc gagttaaggg cgaattcccg ataaggatct 4140
 tcctagagca tggctacgta gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac 4200
 ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc 4260
 gaccaaaggt cgcccagcgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 4320
 gcag 4324

<210> 6

<211> 4662

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 6

ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc ccggcgtcg ggcgacctt 60
 ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctccatcact 120
 aggggttct tgiagttaat gattaaccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
 aggaagatcg gaattcgccc ttaacatctc agcatcatgg ttggatgtt ccacctggct 240
 acataagcaa gctttacaca aggtgtaatt tgccaaata gtggtccatt ctattggggt 300
 gggagcaatt gcttccagga ctacatcca tatggctccc acttagccat gtggcctgct 360

gacaaaggt ggcggaactg tcaactact gttgtccag ctttcagtcc tttggtttcc 420
 tcttactcc ctggacgctc atgtaaaaag ggaggccata tacctgtgca ttgtgtgtct 480
 aagcattcag tigtgttcta aaggcagaag ggtgtgggta ggaaaacaaa gacgagggaa 540
 gctgcgttct ccaaacactt cagacttgag taagtggggt tttgcagcaa ttgagtatt 600
 tgagggaaag tgaacataca aaccaagca atcaaaggga atattatctt aataccaggg 660
 atacatgttt ttctttctgc ctcttaagtc caaagaggca aatcaggaca agtggccttg 720

gttgtaaact ttaaggtcaa ggatcctttc tgttgagctt agctctcaag ttctcagtag 780

tcaactgCGG tgaaacataa ttaatagcac gataaataca agttgtggaa gattcgattg 840

aaagtTGGag gccctctccg tggatctctc tacaagagc ctgtaataaa gaggacttaa 900

tcaacgttag cagggtcatt taaaaagcat cgtctattaa aattcatttc ttctctagag 960

cctctTgttG gaggtttctc gtgtgggtgt gttcgtaaga gaggaatggg ttagcaagag 1020

tactgggtac aatttTgtg tccaagagaa aacagaagct ctcaatgagg aagaacatat 1080

gtttctggga ctgcatctgt gcaaaaagta catagtctg acgttgtact aagaaaaaa 1140

acactctctt tagaaagtct tttatttcac acgttatctt cttggcacat ttccctcata 1200

ttgcctttc cgctgacca aatagccctt tctcacctc aggtccagga aaaccaggaa 1260

acgtttcaa cagTgcgaca aagcctgact aaccagacat actactcgct cggggatccc 1320

ggaggcaagc ctcagtcaa gaacaggagt gactctcgag ggctcacctg cctgcagggc 1380

agcccctccc tgcctcgagc ggaaatccat cctgtccagc gcggggcgtg ggcagagcgg 1440

ggcgcggccc cggcaggcgg tatccgctgg gactccgaca acgtgcgca ccccaggcga 1500

accgcgcccc tctccccacc tcccccggg cgggtacaag tctccaggtg tccgcgct 1560

cagcgggtcc ggccccccc cccccgcc cccgggcccg actgcgctg cccggccgga 1620

gcccgcccc ctctcaggg aaggccgggc gtccggcca cgaggccgag ctccccccc 1680

gccccggcct ctaccggcg cggggggcgg gccaggggcg gggccggact cgagcggggc 1740

ggggctcgcg ccagcgcgcc cagctccgtg gcggcttcgc ccgcgagtcc agaggcagc 1800

gagcagctcg gtcgccccca ccggcccat ggtgctcct ggtgctcctg ccgagtacgg 1860

ctacatcaga acagtgtgg gccagcagat cctgggacag ctggattcta gctctctggc 1920

cctgccttct gaggccaagc tgaactggc cggcagttct ggaagaggcg gccagacagt 1980

gaagtcctg cggatccaag aacaggtgca gcagacctg gccagaaagg gcagatcttc 2040

tgtcggaac ggcaacctgc acagaaccag ctctgtgcc gactacgtgt acaatctgca 2100

cctggTggaa aacgacttgc tggcggcag atccccgtg cctaagacct acgatatgct 2160

gaaggccggc accaccgcca cctatgaagg cagatgggga agaggcacag cccagTacag 2220

cagccagaaa agcgtggaag agagaagcct gcggcacct ctgcggagac tggaaatcag 2280

ccctgatagc agcccagaga gageccacta ccccacagc gactaccagt actcccagag 2340

atctcaggcc ggccacacac tgcaccacca agagtctaga agggccgctc tgctggtgcc 2400

tcctagatac gccagatctg agatcgtggg cgtgtccaga gccggcaca caagcagaca 2460

gagacacttc gacacctacc accggcagta tcagcacggc agcgtgtccg ataccgtgtt 2520
cgatagcatc cccgccaatc ctgctctgct gacatacct agacctggca cctccagatc 2580
catgggcaat ctgctggaaa aagagaacta cctgaccgcc ggactgaccg tgggacaagt 2640
tcgacctctg gttcctctgc agcccgtgac acagaacaga gccagcagaa gcagctggca 2700
ccagtccage ttccacagca ccagaacact gagagaagct ggccttagcg tggccgtgga 2760
ttcttctggt agaagggctc acctgacagt tggccaagca gctgcaggcg gaagcggaaa 2820
tctgctgacc gagagaagca ccttcaccga cagccagctg ggcaacgccg acatggaaat 2880

gacactggaa cgggccgtgt ccatgctgga agccgatcac atgctgccca gcagaattag 2940
cgccgctgcc acctttatcc agcacgagt gttccagaag tctgaggccc ggaagagagt 3000
gaaccagctg agaggcatcc tgaagctgct gcagctcctg aaggtgcaga acgaggatgt 3060
gcagagggct gtgtgtgggg ccttgagaaa tctggtgttc gaggacaacg acaacaagct 3120
ggaagtggcc gagctgaacg gcgtgccaag actgctgcag gttctgaaac agaccgcga 3180
cctggaaca aagaagcaga tcaccggcct gctctggaac ctgagcagca acgacaagct 3240
gaagaacctg atgatcacag aggcctgct gaccctgaca gagaacatca tcatcccttt 3300

cagcggtg cccgagggcg attaccctaa agctaatggc ctgctggact tcgacatctt 3360
ctacaacgtg accggctgcc tgagaaacat gtctagcgt ggcgccgatg gcagaaaggc 3420
catgagaaga tgtgacggcc tgatecagag cctggtgcac tatgtgcggg gcacaatcgc 3480
cgattaccag cctgatgata aggccaccga gaactgcgtg tgcctcctgc acaacctgag 3540
ctaccagctg gaagcagagc tgcccagaaa gtacagccag aacatctaca tccagaaccg 3600
gaacatccag accgacaaca acaagagcat cggctgcttc ggcagccgca gccggaaagt 3660
gaaagaacag taccaggacg tgcccatgcc tgaggaaaag tctaacccca aaggcgtgga 3720

atggctgtgg cacagcatcg tgatecggat gtacctgagc ctgatcgcca agagcgtgcg 3780
gaattacacc caagaggcat ctctgggcgc cctgcagaat ctgacagcag gatctggccc 3840
tatgcctacc tctgtggctc agacctggt gcagaaaagag tctggcctgc agcacaccg 3900
gaagatgctg catgtgggag atcccagcgt gaagaaaacc gccatcagcc tgctgagaaa 3960
cctgagccgg aatctgtctc tgcagaatga gatcgccaaa gagacactgc ccgacctggt 4020
gtctatcacc cctgacaccg tgccctagcac cgacctgctg attgagacaa cagccagcgc 4080
ctgctacacc ctgaacaaca tcattcagaa ctctaccag aacgcccgcg atctgctgaa 4140

cacagcggc atccagaaaa tcatggccat ctctgccggc gacgcctacg cctctaacia 4200
ggcctctaaa gccccagcg tgctgctgta ttctctgtgg gcccataccg agctgcacca 4260
tgccataag aaggcccagt tcaaaaagac cgacttcgtg aacagccgga ccgccaaggc 4320

ctaccactct ctgaaagatg tcgacggatc cggtagccgat tacaaggacg acgatgacaa 4380
 gtgaagctta ataaaagatc tttattttca ttagatctgt gtgttggttt tttgtgtgct 4440
 ggggactcga gttaaggcg aattcccgat aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga 4500
 taagtagcat ggcgggttaa tcattaaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac 4560

tcctctctg cgcgctcgt cgctcactga ggccggcgga ccaaaggtcg cccgacgccc 4620
 gggctttgcc cggcgccct cagtgagega gcgagcgcgc ag 4662

<210> 7
 <211> 4093
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated virus
 <400> 7

acggcggggt ttiacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60
 ggcatctctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120
 tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag 180
 cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct tttctttgtg 240

caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg 300
 aatccatgg ttttgggacg tttctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360
 taccgcgga tcgagccgac tttgccaac tggttcgcgg tcacaaagac cagaaatggc 420
 gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctccccaaa 480
 acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag gcctgtttg 540
 aatctcacgg agcgtaaac gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600
 gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcgc cggatgatcag atcaaaaact 660

tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctggaca aggggattac ctcgagaag 720
 cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcgg 780
 tcccaaatca agctgcctt ggacaatgcg gaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840
 cccgactacc tggtaggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900
 attttggac taaacgggta cgatcccaa tatgcgctt cctcttttct gggatgggcc 960
 acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac taccgggaag 1020
 accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080

aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg 1140
 aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caagtgcgc 1200

gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccga ctcccgtgat cgtcacctcc 1260
aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320
ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc accgcgctc tggatcatga ctttgggaag 1380
gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cggtagggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440
gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaaagaaa gaccgcgcc cagtgcgca 1500

gatataagtg agcccaaacg ggtgcgagag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560
gaagcttcca tcaactacgc agacaggtag caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620
aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaatc aaatatctgc 1680
ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc tcaaccgctt 1740
tctgtcgtca aaaaggcgtg tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaagggtg 1800
ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa 1860
caataaatga cttaaaccag gtatggctgc cgatggttat cttccagatt ggctcgagga 1920

caaccttagt gaaggaattc gcgagtgggt ggctttgaaa cctggagccc ctcaacccaa 1980
ggcaaatcaa caacatcaag acaacgctcg aggtcttgtg cttccgggtt acaataacct 2040
tggaccgggc aacggactcg acaaggggga gccggtcaac gcagcagacg cggcggccct 2100
cgagcacgac aaggcctacg accagcagct caaggccgga gacaaccgt acctcaagta 2160
caaccacgcc gacgcccagt tccaggagcg gctcaaagaa gatacgtctt ttgggggcaa 2220
cctcgggcca gcagtcttcc aggccaaaaa gaggcttctt gaacctcttg gtcgtgttga 2280
ggaagcggct aagacggctc ctggaagaa gaggcctgta gagcagtctc ctcaggaacc 2340

ggactcctcc gcgggtattg gcaaatcggg tgacacagccc gctaaaaaga gactcaattt 2400
cggtcagact ggcgacacag agtcagtcct agacctcaa ccaatcgag aacctcccgc 2460
agccccctca ggtgtgggat ctcttacaat ggcttcaggt ggtggcgac cagtggcaga 2520
caataacgaa ggtgccgatg gagtgggtag ttctcggga aattggcatt gcgattccca 2580
atggctgggg gacagagtca tcaccaccag caccgaacc tgggcctgc ccactaaa 2640
caatcacctc tacaagcaaa tctcaacag cacatctgga ggatcttcaa atgacaacgc 2700
ctacttcggc tacagacccc cctgggggta tttgacttc aacagattcc actgccactt 2760

ctcaccagct gactggcagc gactcatcaa caacaactgg ggattccggc ctaagcgact 2820
caacttcaag ctcttcaaca ttcaggtaa agaggttacg gacaacaatg gactcaagac 2880
catcgccaat aacctacca gcacggcca ggtcttcacg gactcagact atcagctccc 2940
gtacgtgctc gggctggctc acgagggtg cctcccggc tteccagcgg acgttttcat 3000
gattcctcag tacgggtatc tgacgcttaa tgatggaagc caggccgtgg gtcgttcgtc 3060

cttttactgc ctggaatatt tcccgtcgca aatgctaaga acgggtaaca acttccagtt 3120
cagctacgag ttgagaacg tacctttcca tagcagctac gctcacagcc aaagcctgga 3180

ccgactaatg aatccactca tgcaccaata cttgtaactat ctctcaaaga ctattaacgg 3240
ttctggacag aatcaacaaa cgctaaaatt cagtgtggcc ggaccagca acatggctgt 3300
ccaggggaaga aactacatac ctggaccag ctaccgacaa caactgtct caaccactgt 3360
gactcaaac aacaacagcg aatttgcttg gctggagct tcttcttggg ctctcaatgg 3420
acgtaatagc ttgatgaatc ctggacctgc tatggccagc cacaagaag gagaggaccg 3480
tttctttcct ttgtctggat ctttaatttt tggcaacaa ggaactggaa gagacaacgt 3540
ggatgcggac aaagtcatga taaccaacga agaagaaatt aaaactacta acccggtagc 3600

aacggagtcc tatggacaag tggccacaaa ccaccagagt gccaagcac aggcgcagac 3660
cggctgggtt caaaaccaag gaatacttcc gggtatggtt tggcaggaca gagatgtgta 3720
cctgcaagga cccatttggg ccaaaattcc tcacacggac ggcaacttc accttctcc 3780
gctgatggga gggtttggaa tgaagcacc gcctcctcag atcctcatca aaaacacacc 3840
tgtacctgcg gatcctcaa cggccttcaa caaggacaag ctgaactctt tcatcaccea 3900
gtattctact ggccaagta gcgtggagat cgagtgggag ctgcagaagg aaaacagcaa 3960
gcgctggaac cgggatcc agtacacttc caactattac aagtctaata atgttgaatt 4020

tgctgtaat actgaagtg tatatagta accccgccc attggcacca gatactgac 4080
tcgtaatctg taa 4093

<210> 8
<211> 837
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Met Ala Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu Tyr Gly Tyr Ile Arg Thr Val
1 5 10 15
Leu Gly Gln Gln Ile Leu Gly Gln Leu Asp Ser Ser Ser Leu Ala Leu
 20 25 30
Pro Ser Glu Ala Lys Leu Lys Leu Ala Gly Ser Ser Gly Arg Gly Gly
 35 40 45
Gln Thr Val Lys Ser Leu Arg Ile Gln Glu Gln Val Gln Gln Thr Leu
50 55 60

805 810 815
 Gln Phe Lys Lys Thr Asp Phe Val Asn Ser Arg Thr Ala Lys Ala Tyr
 820 825 830
 His Ser Leu Lys Asp
 835
 <210> 9
 <211> 540
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 9
 tcaacctctg gattacaaaa ttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc 60
 ttttacgcta tgtggatagc ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat 120

 ggctttcatt ttctcctct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagtgtg 180
 gcccggtgtc aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg 240
 ttggggcatt gccaccact gtcagctcct ttcggggact ttcgctttcc cctcctctat 300
 tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccctgc tggacagggg ctcggctgtt 360
 gggcactgac aattccgtgg tgttgcggg gaaatcatcg tcctttcctt ggctgctcgc 420
 ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccctctgc tacgtccctt cggccctcaa 480
 tccagcggac ctctcttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg 540

 <210> 10
 <211> 221
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 10
 cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttct 60
 tgacctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aatgaggaa attgcatcgc 120
 attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg 180
 aggattggga agacaatagc aggcattgctg ggactgggg a 221
 <210> 11

<211> 855

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 11

tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc	60
ttttacgcta tgtggatagc ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat	120
ggctttcatt ttctctctct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagtgtg	180
gcccgttgtc aggcaactg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg	240
ttggggcatt gccaccact gtcagctcct ttcggggact ttcgctttcc cctcctcat	300
tgccacggcg gaactcatcg ccgctgcct tgcccctgc tggacagggg ctcggtgtt	360
gggcactgac aattccgtgg tgtgtcggg gaaatcatcg tcctttcctt ggctgctgc	420
ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttetgc taegtccctt cggccctcaa	480
tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg	540
agatctgcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgcc ctccccctg	600
ccttccttga cctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt	660
gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc	720
aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg actggggact cgagttaagg	780
gcaattccc gataaggatc ttctagagc atggctacgt agataagtag catggcgggt	840
taatattaa ctaca	855

<210> 12

<211> 736

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus

<400> 12

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1		5		10		15									
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro
		20		25		30									
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

 485 490 495
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

