(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-536921
(P2023-536921A)
(43)公表日　令和5年8月30日(2023.8.30)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/04	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*9/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/04	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全284頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-507620(P2023-507620)
(86)(22)出願日　令和3年8月5日(2021.8.5)
(85)翻訳文提出日　令和5年3月31日(2023.3.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/044650
(87)国際公開番号　WO2022/031914
(87)国際公開日　令和4年2月10日(2022.2.10)
(31)優先権主張番号　63/061,342
(32)優先日　令和2年8月5日(2020.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/214,119
(32)優先日　令和3年6月23日(2021.6.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

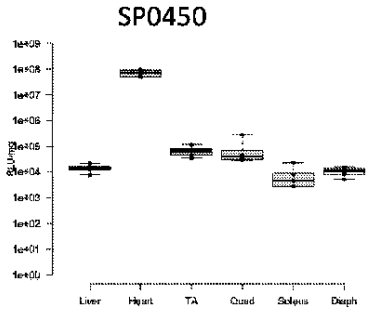
(71)出願人　520375033
アスクレピオス バイオファーマシューティカル， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０９， リサーチ トライアングル パーク， ティー．ダブリュー． アレクサンダー ドライブ ２０， スイート １１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　心障害およびうっ血性心不全を処置する方法ならびにＡＡＶベクターを投与する方法

(57)【要約】
本発明は、単回投与方法でのｒＡＡＶベクターの投与の方法であって、ｒＡＡＶベクターの分割用量の一連の分割投与を含む、方法に関する。本発明は、心特異的プロモーター、心細胞特異的プロモーター、多細胞心特異的プロモーター、およびそれらのエレメントを含むｒＡＡＶベクターにも関する。本発明は、ｒＡＡＶベクター、医薬組成物、ならびに心血管疾患、心臓疾患および心不全を処置することを必要とする対象における心血管疾患、心臓疾患および心不全を処置するための方法におけるその使用にも関する。

FIG. 7M



【特許請求の範囲】
【請求項１】
心不全を有する患者を処置する方法であって、
うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する前記患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与すること
を含み、
前記ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、
投与後少なくとも１２か月、うっ血性心不全の前記分類の改善が存在する、方法。
【請求項２】
前記分類が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、ミネソタＬＩＶＩＮＧ　ＷＩＴＨ　ＨＥＡＲＴ　ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、または２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ｒＡＡＶの投与後１２か月、少なくとも１レベルの前記分類の改善が存在する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルの前記分類の改善が存在する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項５】
投与後１２か月、前記分類における少なくとも２レベルの改善が存在する、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記分類システムが、ＮＹＨＡであり、分類の前記レベルが、クラスＩ、クラスＩＩ、クラスＩＩＩ、およびクラスＩＶからなる群から選択される、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
前記分類システムが、米国心臓病学会／米国心臓協会（ＡＣＣ／ＡＨＡ）補完病期分類システムであり、分類の前記レベルが、ステージＡ、ステージＢ、ステージＣ、ステージＤからなる群から選択される、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
前記分類システムが、ＫＣＣＱであり、分類の前記レベルが、ＫＣＣＱの５０～１００のかなりの～極めて良好なスコア、０～４９の非常に不良～まずまずのスコア、７５～１００の良好～極めて良好なスコア、および０～７４の非常に不良～良好なスコアからなる群から選択されるＫＱＱＣ全体サマリースコア範囲である、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
心筋症を有する患者を処置する方法であって、
前記患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与すること
を含み、
前記ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、
投与後少なくとも１２か月、前記患者におけるベースラインレベルからの少なくとも１つのパラメーターの改善が存在し、

前記少なくとも１つのパラメーターが、
ａ．駆出率（ＥＦ）、
ｂ．収縮終期容積（ＥＳＶ）、
ｃ．駆出率（ＥＦ）および内径短縮率（ＦＳ）から選択される心収縮性、
ｄ．拡張終期容積（ＤＶ）および収縮終期容積（ＥＳＶ）のいずれかから選択される心容積、
ｅ．６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、運動および最大ＶＯ２のいずれかから選択される機能基準、
ｆ．ＢＮＰレベル、
ｇ．プロ－ＢＮＰレベル、
ｈ．バイオマーカーレベルであって、トロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、または肝臓トランスアミナーゼの群から選択される、バイオマーカーレベル、
ｉ．患者報告結果（ＰＲＯ）、例えば、症状の低減、健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＯＬ）、または患者が知覚する健康状態、ならびに
ｊ．心不全に起因する死亡リスク、心不全症状に起因する入院の減少、または心不全の処置のための治療的介入のいずれかの減少
から本質的になる群から選択される、方法。
【請求項１０】
投与後少なくとも１２か月、少なくとも２つのパラメーターの改善が存在する、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
投与後少なくとも１２か月、少なくとも３つのパラメーターの改善が存在する、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
投与後少なくとも１２か月、少なくとも４つのパラメーターの改善が存在する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
投与後少なくとも１２か月、少なくとも５つのパラメーターの改善が存在する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記改善が、
ａ．ベースラインからの駆出率の少なくとも５％もしくはそれよりも高い増加、
ｂ．ベースラインからの収縮終期容積の少なくとも１０％の減少もしくは少なくとも２０ｍｌの減少、
ｃ．ベースラインからの６分間歩行試験の少なくとも５０メートルの増加、
ｄ．ベースラインからの血液におけるＢＮＰレベル（ｐｇ／ｍｌ）の少なくとも４０％の減少、
ｅ．ベースラインからの血液におけるプロ－ＢＮＰレベル（ｐｇ／ｍｌ）の少なくとも３５％の減少、
ｆ．同じバイオマーカーのベースラインレベルからのトロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、もしくは肝臓トランスアミナーゼから選択されるバイオマーカーの少なくとも１０％の低下、
ｇ．ベースラインからの心筋酸素消費量（ＭＶＯ２）の少なくとも１．５ｍｌ／ｋｇ／分の増加、または
ｈ．改善されたＨＦ症状に起因する退院、もしくは対象における改善されたＨＦ症状に起因する変力物質、血管拡張薬、利尿薬のいずれかの使用の減少から選択される低下した介入
のいずれかから選択される、請求項９に記載の方法。
【請求項１５】
前記ｒＡＡＶベクターが、前記ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結された

ＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む、請求項１または１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記総用量が、以下：
ａ．約２０分～約３０分の期間にわたる投与方法、
ｂ．一連の分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与される投与方法、
ｃ．一連の５分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与され、前記５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される投与方法
のいずれかとして投与される、請求項１～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
前記ｒＡＡＶベクターが、肝臓を標的解除するカプシドを含む、請求項１～１６のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
前記ｒＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される、請求項１～１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
前記ｒＡＡＶベクターが、ＡＡＶ２ｉ８である、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
前記ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである、請求項１～１９のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
前記ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質が、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）である、請求項１～２０のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
前記ｓＩ－１ｃが、
ａ．配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～５４を含むポリペプチドであって、配列番号１が、アミノ酸７０、６７、６６、６５、または６１、または５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、
ｂ．配列番号１のアミノ酸１～５４またはその機能的断片を含むポリペプチドであって、前記機能的断片が、配列番号１のアミノ酸残基１～５４と少なくとも８５％の配列同一性を有するか、またはアミノ酸７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチドのいずれかから選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ｒＡＡＶゲノムが、配列番号４１３～４４１からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項１～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２４】
前記Ｉ－１ポリペプチドをコードする前記核酸配列が、
ａ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、
ｂ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、

ｃ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列
から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２５】
前記Ｉ－１タンパク質をコードする前記核酸配列が、コドン最適化された核酸配列である、請求項１～２４のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記Ｉ－１タンパク質をコードする前記核酸配列が、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、請求項１～２５のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
心筋症を有する前記対象が、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する、請求項１～２６のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
心筋症を有する前記対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、請求項１～２７のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する前記対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、請求項２９に記載の方法。
【請求項３０】
心筋症を有する前記対象が、虚血性心筋症を有する、請求項１～２９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
心筋症を有する前記対象が、心不全を有する、請求項１～３０のいずれかに記載の方法。
【請求項３２】
心不全を有する前記対象が、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラス

ＩＩＩに等しいか、またはそれよりも上の分類を有する、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
心不全を有する前記対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する、請求項３０～３２のいずれかに記載の方法。
【請求項３４】
心筋症を有する前記対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）、または保たれた駆出率（ＨＦｐＥＦ）を有する、請求項１～３３のいずれかに記載の方法。
【請求項３５】
前記ｒＡＡＶの投与後少なくとも１２か月、ベースラインレベルからの心不全の分類の少なくとも１クラスの改善が存在し、心不全の前記分類が、以下：
ａ．米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、またはその同等物、あるいは
ｂ．ミネソタＬＩＶＩＮＧ　ＷＩＴＨ　ＨＥＡＲＴ　ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、またはカンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、慢性心不全質問票（ＣＨＦＱ）、重度心不全のためのクオリティオブライフ質問票（ＱＬＱ－ＳＨＦ）、左室機能障害（ＬＶＤ－３６）質問票、および左室疾患質問票（ＬＶＤＱ）のいずれかからなる群から選択される健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＬ）質問票
の少なくとも１つによって評価される、請求項１～３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３６】
前記ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルの前記分類の改善が存在する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記ｒＡＡＶの投与後１２か月以内に、少なくとも２レベルの前記分類の改善が存在する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
前記ベースラインレベルからのクオリティオブライフＭＬＷＨＦＱまたはＫＣＣＱの少なくとも１０ポイントの減少の改善が存在する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３９】
前記対象が、ｒＡＡＶベクターの前記少なくとも１総用量の前記投与と同時に、および／またはその前に、および／またはその後に血管拡張薬を投与される、請求項１～３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４０】
前記対象が、ｒＡＡＶベクターの前記少なくとも１総用量の前記投与と同時に、またはその前に、またはその後に免疫モジュレーターを投与される、請求項１～３９のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
配列番号３８５～４１２のいずれかから選択されるコドン最適化されたＩ－１ｃ核酸配列、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含むＡＡＶベクターを含む医薬組成物。
【請求項４２】
前記コドン最適化された核酸配列が、ＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターに作動可能に連結されている、請求項４１に記載の医薬組成物。

【請求項４３】
配列番号４１～４２からなる群から選択される核酸配列、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項４１に記載の医薬組成物。
【請求項４４】
請求項１～４０のいずれかに記載の方法における使用のための、請求項４１～４３のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項４５】
表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、
心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または
心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーター
のいずれかから選択されるプロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター。
【請求項４６】
心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターが、表５Ａもしくは表１３Ａ、またはそのバリアントから選択される、請求項４５に記載のＡＡＶベクター。
【請求項４７】
前記ＡＡＶが、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される、請求項４５～４６のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項４８】
前記ＡＡＶが、肝臓を標的解除するカプシドを含む、請求項４５～４７のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項４９】
前記ＡＡＶが、ＡＡＶ２ｉ８である、請求項４５～４８のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５０】
前記ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドが、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）である、請求項４５～４９のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５１】
前記Ｉ－１ｃが、
ａ．配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～６５を含むポリペプチドまたはその機能的等価体、
ｂ．配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、残基７０、６７、６６、６５、または６１、または５４から選択されるアミノ酸のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、
ｃ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチド、または配列番号１のアミノ酸残基１～６５と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体、あるいは
ｄ．配列番号５０７もしくは５２７～５３２、または配列番号５０７もしくは５２７～５３２のいずれかのアミノ酸残基と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体のいずれかから選択されるポリペプチド
のいずれかから選択される、請求項４５～５０のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５２】
Ｉ－１ポリペプチドをコードする前記核酸配列が、
ａ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、

ｂ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、
ｃ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列
から選択される、請求項４５～５１のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５３】
前記ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１または１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸（Ｔ３５Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、請求項４５～５２のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５４】
前記Ｉ－１ポリペプチドをコードする前記核酸配列が、コドン最適化された核酸配列である、請求項４５～５０のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５５】
前記コドン最適化された核酸配列が、配列番号１の野生型参照配列またはその断片と比較して、低下したＣｐＧ含有量または低下したＣｐＧアイランドを有する、請求項４５～５４のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５６】
前記Ｉ－１ポリペプチドをコードする前記核酸配列が、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性の核酸配列のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列である、請求項４５～５４のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５７】
前記心特異的プロモーターまたは筋肉特異的プロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする前記核酸配列の５’に位置する少なくとも１つのＩＴＲをさらに含む、請求項４５～５６のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５８】
前記心特異的プロモーターまたは筋肉特異的プロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする前記核酸配列に隣接する少なくとも２つのＩＴＲをさらに含む、請求項４５～５７のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項５９】
前記ＩＴＲ配列が、配列番号７０～７８、または配列番号７０～７８と少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸のいずれか１つまたは複数から選択される、請求項４５～５８のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項６０】
リバースポリＡ配列または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントをさらに含み、前記リバースポリＡ配列または二本鎖終結エレメントが、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする前記核酸配列の３’に位置する、請求項４５～５９のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項６１】
前記リバースポリＡ配列または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントが、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする前記核酸配列の３’および右側ＩＴＲの５’の間に位置する、請求項６０に記載のＡＡＶベクター。
【請求項６２】

前記核酸配列が、少なくとも１つの免疫モジュレーターをコードする核酸配列をさらに含むことができる、請求項４５～６１のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項６３】
組成物または溶液中に存在し、免疫モジュレーターをさらに含む、請求項４５～６１のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項６４】
ＳＶ４０ポリＡ（配列番号３３４）、ＨＧＨポリＡ（配列番号６６）、配列番号２８４～２８７、配列番号３３１～３３５のいずれかから選択されるポリＡ配列をさらに含み、前記ポリＡ配列が、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする前記核酸配列の３’に位置する、請求項４５～６３のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
【請求項６５】
（ｉ）ａ．表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、
ｂ．心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター、または
ｃ．心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターもしくはそのバリアント
のいずれか１つに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、および
（ｉｉ）薬学的に許容される担体
を含む医薬組成物。
【請求項６６】
心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターが、表５Ａもしくは表１３Ａまたはそのバリアントから選択される、請求項６５に記載の医薬組成物。
【請求項６７】
前記ＡＡＶが、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される、請求項６５～６６に記載の医薬組成物。
【請求項６８】
前記ＡＡＶが、肝臓を標的解除するカプシドを含む、請求項６５～６７に記載の医薬組成物。
【請求項６９】
前記ＡＡＶが、ＡＡＶ２ｉ８である、請求項６５～６８のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７０】
前記ＡＡＶが、配列番号４１３～４４０、または配列番号４１３～４４０から選択される配列と少なくとも８０％の配列同一性の核酸配列からなる群から選択される核酸を含み、配列番号４１３～４４０に示される前記核酸が、配列番号３３０のＣＭＶプロモーターを含み、配列番号３３０の前記ＣＭＶプロモーターが、
ａ．表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、
ｂ．心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター、または
ｃ．心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターもしくはそのバリアント
のいずれかによって置き換えられている、請求項６５～６９のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７１】
血管拡張薬をさらに含む、請求項６４～６９のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７２】
免疫モジュレーターをさらに含む、請求項６４～６９のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７３】
前記ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドが、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）である、請求項６５に記載の医薬組成物。

【請求項７４】
前記Ｉ－１ｃが、
ａ．配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～６５を含むポリペプチドまたはその機能的等価体、
ｂ．配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、アミノ酸７０、６７、６６、６５、または６１、または５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、
ｃ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチド、または配列番号１のアミノ酸残基１～６５と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体、あるいは
ｄ．配列番号５０７もしくは５２７～５３２、または配列番号５０７もしくは５２７～５３２のいずれかのアミノ酸残基と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体のいずれかから選択されるポリペプチド
のいずれかから選択される、請求項７３に記載の医薬組成物。
【請求項７５】
Ｉ－１ポリペプチドをコードする前記核酸配列が、
ａ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、
ｂ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、
ｃ．配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列
から選択される、請求項６５～７４のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７６】
前記Ｉ－１タンパク質をコードする前記核酸配列が、コドン最適化された核酸配列である、請求項６５～７４５のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７７】
前記コドン最適化された核酸配列が、参照野生型配列と比較して、低下したＣｐＧ含有量を有する、請求項７６に記載の医薬組成物。
【請求項７８】
前記Ｉ－１ポリペプチドをコードする前記コドン最適化された核酸配列が、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２のいずれかから選択される配列と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、請求項６５～７７のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７９】
心筋症を有する対象の処置のための医薬組成物の製造のための、請求項４５～６４のいずれか一項に記載のＡＡＶベクターの使用。
【請求項８０】
心筋症を有する前記対象が、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する、請求項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。
【請求項８１】
心筋症を有する前記対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、請求項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。
【請求項８２】
先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する前記対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全

身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、請求項８０に記載のＡＡＶベクターの使用。

【請求項８３】

心筋症を有する前記対象が、虚血性心筋症を有する、請求項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。

【請求項８４】

心筋症を有する前記対象が、心不全を有する、請求項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。

【請求項８５】

心不全を有する前記対象が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく心不全の分類を有する、請求項８４に記載のＡＡＶベクターの使用。

【請求項８６】

心不全を有する前記対象が、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩ、またはクラスＩＩＩよりも上の分類を有する、請求項８５に記載のＡＡＶベクターの使用。

【請求項８７】

心不全に関連する状態または疾患を有する対象の処置のための医薬組成物の製造のための、請求項４５～６４のいずれか一項に記載のＡＡＶベクターの使用。

【請求項８８】

前記対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する、請求項８７に記載の使用。

【請求項８９】

分類が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、請求項８７に記載の使用。

【請求項９０】

前記対象が、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する、請求項８７に記載の使用。

【請求項９１】

前記対象が、虚血性心不全または虚血性心筋症を有する、請求項８７に記載の使用。

【請求項９２】

前記対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する、請求項７９または

８７のいずれかに記載の使用。
【請求項９３】
請求項４５～６４のいずれかに記載のＡＡＶベクターを含む細胞。
【請求項９４】
心細胞または筋細胞である、請求項９３に記載の細胞。
【請求項９５】
細胞培養物中にあるか、または対象中に存在する細胞である、請求項９３～９４のいずれかに記載の細胞。
【請求項９６】
心筋症を有する対象の処置における使用のための、請求項４５～６４に記載のＡＡＶベクター、請求項６５～７８のいずれかに記載の医薬製剤、または請求項９３～９５のいずれかに記載の細胞。
【請求項９７】
心筋症を有する前記対象が、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する、請求項９６に記載のＡＡＶベクター。
【請求項９８】
心筋症を有する前記対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、請求項９６に記載のＡＡＶベクター。
【請求項９９】
先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する前記対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、請求項９８に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１００】
心筋症を有する前記対象が、虚血性心筋症を有する、請求項９６に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０１】
心筋症を有する前記対象が、心不全を有する、請求項９６に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０２】
心不全を有する前記対象が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）また

はニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく心不全の分類を有する、請求項１０１に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０３】
心不全を有する前記対象が、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩ、またはクラスＩＩＩよりも上の分類を有する、請求項１０２に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０４】
心不全を有する患者の処置における使用のための、請求項４５～６４に記載のＡＡＶベクター、請求項６５～７８のいずれかに記載の医薬製剤、または請求項９３～９５のいずれかに記載の細胞。
【請求項１０５】
前記対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する、請求項１０４に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０６】
前記分類が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、請求項１０５に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０７】
前記対象が、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する、請求項１０４に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０８】
前記対象が、虚血性心不全または虚血性心筋症を有する、請求項１０４に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１０９】
前記対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する、請求項９６または１０４に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１１０】
心不全を有する前記対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する、請求項１０４に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１１１】
前記対象が、
ａ．非虚血性心不全、
ｂ．非虚血性心筋症、
ｃ．米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づくうっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類、または
ｄ．低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）
の１つまたは複数を有する、請求項１０４に記載のＡＡＶベクター。
【請求項１１２】
心筋症を有する対象においてホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドを発現させる方法であって、心筋症を有する前記対象に、請求項４５～６３のいずれかに記載のＡＡＶベクターの少なくとも１用量を導入すること
を含み、
心筋症を有する前記対象が、心不全の分類を有し、

ｒＡＡＶの前記少なくとも１用量が、約１０^{13}ｖｇ～約１０^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、
投与後少なくとも１２か月、心不全の前記分類の改善が存在する、方法。
【請求項１１３】
心不全の前記分類が、米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
前記ｒＡＡＶの投与後１２か月、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１５】
前記ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１６】
投与後１２か月、
米国心臓協会（ＡＨ）、
米国心臓病学会（ＡＣＣ）、または
ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）
のいずれか１つまたは複数における前記分類の少なくとも２レベルの改善が存在する、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１７】
ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の前記投与と同時に、またはその前に、またはその後に免疫モジュレーターを投与することをさらに含む、請求項１１２～１１６のいずれかに記載の方法。
【請求項１１８】
ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の前記投与と同時に、および／またはその前に、および／またはその後に血管拡張薬を投与することをさらに含む、請求項１１２～１１６のいずれかに記載の方法。
【請求項１１９】
前記対象が、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する、請求項１１２～１１８のいずれかに記載の方法。
【請求項１２０】
非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する前記対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、請求項１１２～１１９のいずれかに記載の方法。
【請求項１２１】
先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する前記対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１

４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、請求項１２０に記載の方法。

【請求項１２２】

心不全を有する前記対象が、虚血性心筋症である、請求項１１１～１１７のいずれかに記載の方法。

【請求項１２３】

心不全を有する前記対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する、請求項１１１～１２０のいずれかに記載の方法。

【請求項１２４】

前記対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する、請求項１１１～１２２のいずれかに記載の方法。

【請求項１２５】

前記心不全が、虚血、不整脈、心筋梗塞、異常な心臓収縮性、または異常なＣａ２＋代謝を含む、請求項１１１～１２３のいずれかに記載の方法。

【請求項１２６】

前記投与が、前記患者の心臓の冠動脈の内腔の中にである、請求項１１１～１２４のいずれかに記載の方法。

【請求項１２７】

前記少なくとも１用量が、１用量または２～５分割用量で投与される、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲である、請求項１１１～１２５のいずれかに記載の方法。

【請求項１２８】

前記総用量が、以下：

ａ．約２０分～約３０分の期間にわたる投与方法、

ｂ．一連の分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与される投与方法、

ｃ．一連の５分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与され、前記５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される投与方法

のいずれかとして投与される、請求項１１１～１２６のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願に対する相互参照

本国際出願は、２０２０年８月５日に出願された米国仮出願第６３／０６１，３４２号および２０２１年６月２３日に出願された同第６３／２１４，１１９号の米国特許法第１１９（ｅ）条の利益を主張し、それらの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０２１年８月４日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、０４６１９２－０９７９８０ＷＯＰＴ＿ＳＬ．ｔｘｔという名称であり、１，０５９，６４６バイトのサイズである。
【０００３】
発明の分野
本明細書の技術は、ＡＡＶベクターおよび調節性核酸配列、特に、心障害、慢性心不全（ＣＨＦ）を含む心不全の処置のための心特異的プロモーター、筋細胞特異的プロモーターおよびそれらのエレメントに関する。本明細書の技術は、心障害の処置のためのＡＡＶベクターを投与する発現方法にも関する。本明細書の技術は、β－アドレナリン応答を改善するためにホスファターゼ活性を減少させるためのそのようなプロモーターを含む構築物、ベクター、ビリオン、医薬組成物および細胞、ならびにそれらの使用の方法にも関する。
【背景技術】
【０００４】
発明の背景
以下の議論は、本開示の理解する際に読者を助けるために提供されるものであって、先行技術の内容または関連に関して任意の自白を構成するものではない。
【０００５】
血液の心室の充満または駆出の任意の構造的なまたは機能的な機能障害から生じる複合臨床症候群としてＡＣＣ／ＡＨＡによって定義される心不全は、米国において、最も一般的で、費用がかかり、衰弱させる疾患の１つのままである。２０１１年から２０１４年の米国国民健康栄養調査のデータに基づいて、２０３０年までに８００万人超の予測とともに、推定で６５０万人の米国成人が心不全を有する。概略で２０％～４５％の心不全が発生する生涯リスクを伴って、９６０，０００超の新たな症例が、毎年生じると考えられる。したがって、うっ血性心不全（ＣＨＦ）とも呼ばれる心不全（ＨＦ）は、米国において蔓延している疾患である。
【０００６】
心不全は、心臓の筋肉の収縮性が減少する障害であり、心臓は、血液を効率的に送り出すその能力を失う。心不全は、ほとんどの場合、慢性の長期間にわたる状態であり、法外な量の医学的介入および人材の金額を消費する。特に、残りの身体の器官への心不全の帰結は、患者の生産寿命の全体的な低下および処置の費用の両方の観点から壊滅的であり得る。この状態は、心臓の右側、左側、または両側に影響を及ぼし得る。心臓のポンプ作用が損なわれるにつれて、血液は、身体の他の領域に逆流し始める。多くの器官および器官系は、酸素および栄養素の欠如からの累積損傷に苦しみ始める。
【０００７】
影響を受けた個体の半分強で、心臓の機能が、駆出率の減少（駆出率が低下した心不全；ＨＦｒＥＦ）によって実証されるように低下し、左室が拡張する。ＨＦの進行に絶対不可欠な経路を標的にする新たな薬物が、植え込み型除細動器および再同期デバイスとともに、過去３０年にわたって導入されている。しかしながら、ＨＦｒＥＦに関連する疾病率および死亡率は両方とも、診断の５年以内に影響を受けた個体の５０％もが死亡する、容認できないレベルのままである。これは、研究者らに、心臓における特異的タンパク質の量を増加させることによってＨＦｒＥＦを緩和または治癒する際の遺伝子治療の役割を評価させる。
【０００８】
プロテインキナーゼおよびそれらのリンタンパク質基質は、心臓のポンプ作用において重要であり、十分に特徴付けられているが、しかしながら、増加した心収縮性を反転させるプロテインホスファターゼも重要である。共通遺伝子ファミリーに端を発して、主要な

Ｓｅｒ／Ｔｈｒホスファターゼ（１型、２Ａ型および２Ｂ型（カルシニューリン））は、心収縮性および肥大の制御において重要な役割を果たす非常に相同なタンパク質である（４０～５０％）（Cohen, P., 1990 Phosphoprotein Res; 24:230-5）。プロテインホスファターゼ２Ａの触媒サブユニットの過剰発現は、心機能を減少させ、病理学的な心肥大に至ることが示されている（Brewis, N. et al., 2000 Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279:H1307-18；Gergs, U. et al., 2004 J Biol Chem.）。さらにまた、カルシウム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンは、ＮＦＡＴ転写因子活性のその調節によって肥大を誘導する。５　興味深いことに、このホスファターゼの阻害は、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏで心肥大をブロックする（Brewis, N. et al., 2000；Molkentin, J. D., 1998 Cell; 93:215-28）。

【０００９】

ヒトおよび実験的心不全では、筋小胞体（ＳＲ）に関連する１型ホスファターゼ（ＰＰ１）の活性が有意に増加し、これが、機能低下、拡張型心筋症および早死の要因であり得ることを示唆する（Huang, B. et al., 1999 Circ Res; 85:848-55；Sande, J. B., et al., 2002 Cardiovasc Res; 53:382-91；Boknik, P. et al., 2000 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 362:222-31；Gupta, R. C. et al., 1997 Circulation; 96 (Suppl 1):I-361；Neumann, J. 1997 J Mol Cell Cardiol; 29:265-72；Carr, A. N. et al., 2002, Mol Cell Biol; 22:4124-35）。

【００１０】

プロテインキナーゼＣアルファ（「ＰＫＣ－α」）活性が、心不全の病的状態において増加することが以前に確立されている。プロテインホスファターゼ－１（「ＰＰ－１」）の活性を阻害することで、増強された心収縮性をもたらす（Pathak, A., et al. 2005 Circ Res 15:756'-66）。

【００１１】

対象における心不全の有効な処置、またその予防に対する必要性が存在する。遺伝子治療は、各種の疾患および障害の処置のために有用であった。しかしながら、遺伝子治療の送達が最適であること、ならびに特定の組織および／または細胞型に対する遺伝子または核酸の発現の両方が重要である。

【００１２】

遺伝子治療は、遺伝性障害を治癒させるだけでなく、ウイルスを使用する後天的疾患および変性疾患の長期間の非侵襲性処置も容易にする可能性を有する。１つの遺伝子治療ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である。ＡＡＶそれ自身は、効率的な複製のためにヘルパーウイルスを必要とする非病原性依存性パルボウイルスである。ＡＡＶは、その安全性および単純性のために、遺伝子治療のためのウイルスベクターとして利用されている。ＡＡＶは、幅広い宿主、および分裂細胞および非分裂細胞の両方に形質導入することができる細胞型向性を有する。

【００１３】

身体内の遺伝子調節の内部機構の広範囲に及ぶ研究後、研究の焦点は、最近、外因性核酸配列を細胞に導入することによる遺伝子発現の調節にシフトした。これは、研究およびバイオプロセシングにおいて慣例的に行われており、ここで、プロモーターに作動可能に連結された所望の発現産物の核酸配列は、多くの場合にベクターの形態で、産生細胞株に導入される。

【００１４】

遺伝子治療の分野では、これは、患者の細胞に対する欠陥遺伝子の存在によって引き起こされる単一遺伝子障害（またはメンデル性障害）などの遺伝性障害のために特に興味深かった。遺伝子治療では、細胞に導入された外因性核酸の発現を制御することが、患者の健康および安全性に対して最も重要である。発現産物のレベルが、治療域内であることが必要であるだけでなく、発現が、必要な組織内またはさらに、有効である処置のために必要な組織内の特定の領域であることも必要である。加えて、発現は、副作用を回避するた

めに、特定の細胞型または複数の細胞型に制限することが必要である場合がある。治療域外の発現（すなわち、より低いまたはより高い）、あるいは治療領域外、またはさらに特定の細胞もしくは細胞の組合せ外の発現は、治療的に有用でないか、またはさらに有害である場合がある。

【００１５】

したがって、心臓、特に心臓の平滑筋または心筋、特に特定の細胞型、例えば心筋細胞などにおける発現を駆動するプロモーターに対する必要性が存在する。心臓における発現には、心細胞、例えば、心筋細胞、および心臓における平滑筋細胞における発現を含む。

したがって、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、ならびに他の心臓疾患および障害を含む心不全の有効な処置に対する必要性が存在する。疾患の処置のためのウイルスベクターの有効な投与に対する必要性も存在する。本発明の１つまたは複数の態様は、上記で言及された問題の１つまたは複数に対処することが意図される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１６】

【非特許文献１】Cohen, P., 1990 Phosphoprotein Res; 24:230-5
【非特許文献２】Brewis, N. et al., 2000 Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279:H1307-18
【非特許文献３】Molkentin, J. D., 1998 Cell; 93:215-28
【非特許文献４】Huang, B. et al., 1999 Circ Res; 85:848-55
【非特許文献５】Sande, J. B., et al., 2002 Cardiovasc Res; 53:382-91
【非特許文献６】Boknik, P. et al., 2000 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 362:222-31
【非特許文献７】Gupta, R. C. et al., 1997 Circulation; 96 (Suppl 1):I-361
【非特許文献８】Neumann, J. 1997 J Mol Cell Cardiol; 29:265-72
【非特許文献９】Carr, A. N. et al., 2002, Mol Cell Biol; 22:4124-35
【非特許文献１０】Pathak, A., et al. 2005 Circ Res 15:756'-66

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１７】

発明の概要

本明細書に記載される技術は、一般に、心血管状態、心臓疾患および心不全の処置のための、遺伝子治療構築物、組成物および投与の方法に関する。ＡＡＶベクターを投与するための方法、ならびに心不全およびうっ血性心不全（ＣＨＦ）を含む心臓障害および疾患の処置のためのＡＡＶベクターを含む組成物および方法も本明細書に開示される。一部の態様では、心臓障害および疾患の処置のためのＡＡＶベクターは、例えば、心障害、例えば、心不全の処置のための心臓細胞におけるホスファターゼ阻害剤の発現のための、例えば、ホスファターゼ阻害剤をコードするＡＡＶベクターを含む。ホスファターゼ活性を減少させることで、β－アドレナリン応答を改善することができる。

【００１８】

特に、本発明の態様は、心不全の分類を有する対象に、ある用量のｒＡＡＶを投与することを含む投与の方法であって、投与後少なくとも１２か月で、心不全の分類が、少なくとも１または少なくとも２ステージまたは分類レベル改善する、方法を含む、心不全を有する対象の処置のための投与の新規方法および新規ｒＡＡＶ組成物を対象とする。一部の実施形態では、本明細書に開示される投与の方法は、他の薬剤と組み合わせて使用することができ、限定されるものではないが、免疫モジュレーターおよび／または血管拡張薬の使用だけでなく、Ｉ－１ｃ（プロテインホスファターゼ１活性を阻害する構成的に活性なトランケートされた阻害剤－１）をコードするコドン最適化された核酸配列を含むｒＡＡＶベクター、および／または新規心特異的筋肉プロモーターを含むｒＡＡＶベクターを含む。また、本発明者らは、心不全を評価するために使用される分類システムにおける対象

のカテゴリー化を有意に改善する能力を有する非虚血性心筋症および虚血性心筋症を有する対象を含む、心不全を有する対象を処置するための異なる方法を実証した。心不全の対象の程度をカテゴリー化する分類システムの範囲を、使用することができ、当技術分野において周知であり、限定されるものではないが、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、ミネソタＬＩＶＩＮＧ　ＷＩＴＨ　ＨＥＡＲＴ　ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、または２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、あるいはその改変された評価もしくは組合せ、または統合された評価が挙げられる。

【００１９】

例示的な目的だけのために、そして理論に限定されることを望まないが、本明細書に開示される心不全を有する対象を処置する方法、または本明細書に開示される投与方法は、本明細書に開示されるｒＡＡＶの投与後１２か月以内に、対象の心不全の分類を、本明細書に開示される心不全分類システムに従って、例えば、カテゴリーＩＶからカテゴリーＩＩもしくはカテゴリーＩＩＩ未満に、または例えば、カテゴリーＩＩＩからカテゴリーＩＩもしくはカテゴリーＩＩ未満に改善することを実証した。一部の実施形態では、ＮＹＨＡもしくはＡＨＡもしくはＡＣＣ分類と同等のシステムが使用されるか、または当業者に公知の任意の他の比較の心不全分類システムが使用される。

【００２０】

本明細書に記載される技術の他の態様は、心特異的プロモーターもしくは心筋特異的プロモーター、または本明細書に開示される心筋において特異的に活性な骨格筋プロモーターに機能的に連結されたＩ－１ｃタンパク質をコードする新規ｒＡＡＶベクターに関する。一部の実施形態では、Ｉ－１ｃタンパク質をコードするｒＡＡＶベクターは、例えば、配列番号３８５～４１２、またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、Ｉ－１ｃをコードするコドン最適化された核酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｉ１ｃタンパク質をコードするｒＡＡＶベクターは、ＣＭＶプロモーター、または心特異的プロモーター、または心筋特異的プロモーター、または本明細書に開示される心筋において活性な骨格筋特異的プロモーターと機能的に連結された、例えば、配列番号３８５～４１２、またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、Ｉ１ｃをコードするコドン最適化された核酸配列を含む。一部の実施形態では、例えば、配列番号３８５～４１２、またはそれと８５％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、Ｉ１ｃをコードするコドン最適化された核酸配列を含むｒＡＡＶベクターは、リバースポリＡ、またはｄｓ　ＲＮＡ終結エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物における使用のためのＩ－１ｃタンパク質をコードするｒＡＡＶベクターは、配列番号４１３～４４０、またはそれと少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される核酸配列を含む。

【００２１】

配列番号３５７～３８４のいずれかの核酸配列を含む閉鎖末端線状二重鎖ＤＮＡ（または本明細書で閉鎖線状ＤＮＡとも称される）も本明細書に提供される。一部の実施形態では、細菌配列を欠き、本明細書に開示される方法および組成物における使用のためのＩ－１ｃタンパク質をコードするｒＡＡＶベクターは、配列番号３５７～３８４の閉鎖末端線状二重鎖ＤＮＡを使用して製造される。

【００２２】

本明細書に記載される技術の一態様は、ｒＡＡＶベクターを投与する方法であって、対象への単一投与であり、単一総用量の投与が、単一投与内の少なくとも２、または３、または４、または５、またはそれよりも多い分割用量を含む、方法に関する。すなわち、別の言い方をすれば、一部の実施形態では、方法は、単一投与で対象にｒＡＡＶベクターを投与することを含み、単一総用量の投与が、少なくとも２、または３、または４、または５、またはそれよりも多くのバイアルからのｒＡＡＶの投与を含み、ここで、総ｒＡＡＶ

用量が、１～５分の間、または５分よりも長い期間にわたってそれぞれのバイアルから我々に投与される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ２ｉ８（ＢＮＰ１１６とも称される）である。さらに別の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、当技術分野において公知のカプシドタンパク質配列もリストする表１１にリストされるＡＡＶ血清型の群から選択される血清型由来のＶＰ１、ＶＰ２、および／またはＶＰ３カプシドタンパク質を含む。

【００２３】

一部の実施形態では、方法は、対象、例えば、ヒト対象の心臓へのｒＡＡＶベクターの投与に関する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心特異的プロモーター、例えば、本明細書の表２Ａに開示されるもののいずれかから選択される例示的な心特異的プロモーター、またはその機能的バリアントもしくは機能的断片、あるいは本明細書の表２および３から選択される任意の心特異的プロモーター（ＣＳＰ）を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心血管状態、心不全、または心臓疾患もしくは障害の処置のための開示される方法に従って投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法に従って投与されるｒＡＡＶベクターは、心不全の処置のための治療剤をコードする核酸を含むｒＡＡＶベクターであり、核酸は、本明細書の表２Ａに開示される心特異的プロモーター、またはその機能的バリアントもしくは機能的断片、あるいは本明細書の表２および３から選択される任意のＣＳＰに機能的に連結されている。

【００２４】

一部の実施形態では、本明細書に記載される技術は、本明細書に開示される、ｒＡＡＶベクターを免疫モジュレーターとともに共投与する方法に関する。

【００２５】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心不全の処置のための、遺伝子治療構築物、方法および組成物に関する。より詳細には、技術は、プロテインホスファターゼ（protein phosphate）１（ＰＰ１）の阻害剤を対象に送達するため、より詳細には、対象の心臓における発現のためにＰＰ１阻害剤を送達するために構成されたアデノ随伴（ＡＡＶ）ビリオンに関する。

【００２６】

したがって、一態様では、本開示は、心臓細胞、例えば、心筋細胞に、細胞におけるホスファターゼ活性、例えば、１型ホスファターゼ活性をモジュレートする薬剤を発現するｒＡＡＶベクターを投与することを含む方法を特色とする。心臓細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏであり得る。例えば、心臓細胞は、対象の心臓中にあり得る。方法を使用して、対象、例えば、心障害、例えば、心不全を有する対象を処置することができる。典型的には、対象は、哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物である。１型ホスファターゼとしては、限定されるものではないが、ＰＰ１ｃα、ＰＰ１ｃβ、ＰＰ１ｃδおよびＰＰ１ｃγが挙げられる。

【００２７】

一実施形態では、薬剤は、ホスファターゼ活性、例えば、１型ホスファターゼ活性を阻害するタンパク質をコードする配列を含む核酸である。ｒＡＡＶベクターは、処置された細胞においてホスファターゼ活性を減少させるおよび／またはβ－アドレナリン応答を増加させるのに有効な量で投与することができる。

【００２８】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ホスファターゼ活性を阻害するタンパク質をコードする内因性核酸の発現を増加させる核酸を発現する。例えば、核酸は、転写因子、例えば、キメラジンクフィンガータンパク質などの操作された転写因子をコードする配列を含むことができる。また別の例では、核酸は、ホスファターゼ活性を阻害するタンパク質をコードする内因性核酸にまたはその近くに、例えば、ホスファターゼ阻害剤－１（「Ｉ－１」）をコードする遺伝子にまたはその近くに組み込まれる調節配列である。

【００２９】
また別の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、遺伝子発現の核酸モジュレーターを提供し得る核酸を発現する。例えば、核酸は、そのような核酸モジュレーター、例えば、ｄｓＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ、またはリボザイムを発現することができる核酸であり得る。
【００３０】
一実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、そのゲノム中に、５’および３’ＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列、ならびに５’および３’ＩＴＲの間に位置して、プロテインホスファターゼ１（ＰＰ１）阻害剤をコードする異種核酸配列を含み、異種核酸は、心特異的プロモーター（ＣＳＰ）に機能的に連結されている。一部の実施形態では、ＰＰ１阻害剤は、阻害剤－１（Ｉ－１）またはその機能的バリアントである。一部の実施形態では、心特異的プロモーターは、本明細書の表２Ａにリストされる任意のプロモーターから選択される合成心特異的プロモーター、またはその機能的バリアントもしくは機能的断片、あるいは本明細書の表２および３から選択される任意のＣＳＰである。
【００３１】
一実施形態では、ｒＡＡＶは、注射、例えば、心臓への直接注射、例えば、左室表面への直接注射によって投与される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、循環系の内腔に、例えば、対象の心臓のチャンバーもしくは内腔または心臓の血管に投与される。例えば、心膜を開くことができ、ｒＡＡＶを、例えば、注射器およびカテーテルを使用して、心臓に注射することができる。ｒＡＡＶは、大動脈、例えば、大動脈根の内腔に投与するか、冠状動脈口に導入するか、または心臓の内腔に導入することができる。ｒＡＡＶは、冠動脈に投与することができる。例えば、順行性または逆行性の封鎖を使用して、血管における、例えば、冠動脈における滞留時間を増加させるように、血流を制限することも可能である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、注射ポンプまたは点滴ポンプを取り付けた注射器を使用して投与される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、手動で制御される注射器を使用して投与される。
【００３２】
一実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、例えば、冠動脈に逆行する大腿動脈から逆行する、経皮注射によって導入される。また別の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、例えば、ステントを使用して導入される。例えば、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、ステント上にコーティングされ、ステントが、冠動脈、末梢血管、または大脳動脈などの血管に挿入される。
【００３３】
一実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターを導入することには、例えば、部分的にまたは完全に、冠状血管を通る血流を制限すること、冠動脈の内腔にウイルス送達系を導入すること、および血液の冠状静脈流出を制限しながら、心臓に送り出させることを含む。冠状血管を通る血流の制限は、例えば、少なくとも１つ、２つ、または３つの血管形成術用バルーンの膨張によって行うことができる。冠状血管を通る血流の制限は、例えば、少なくとも１分間、２分間、３分間、または４分間、持続することができる。ウイルス粒子の冠動脈への導入は、例えば、血管形成術用バルーンの内腔を通じた順行性注射によって行うことができる。制限される冠状血管は、左前下行枝（ＬＡＤ）、遠位回旋動脈（ＬＣＸ）、大冠状静脈（ＧＣＶ）、中心静脈（ＭＣＶ）、または前室間静脈（ＡＩＶ）であり得る。ウイルス粒子の導入は、例えば、少なくとも１つ、２つ、または３つの血管形成術用バルーンを膨張させることにより、例えば、血流を制限することによって、冠状血管の虚血プレコンディショニング後に行うことができる。冠状血管の虚血プレコンディショニングは、少なくとも１分間、２分間、３分間、または４分間、持続することができる。
【００３４】
一実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターを導入することには、例えば、部分的にまたは完全に、心臓からの大動脈の血流を制限すること、循環系の内腔にウイ

ルス送達系を導入すること、および血液の大動脈流出を制限しながら、例えば、閉鎖系（等容的に）に対して、心臓に送り出させることを含む。心臓からの大動脈の血流の制限は、冠動脈、例えば、肺動脈に血流を向け直すことによって行うことができる。大動脈の血流の制限は、クランプすること、例えば、肺動脈をクランプすることによって成し遂げることができる。ウイルス粒子の導入は、例えば、カテーテルの使用により、または例えば、直接注射によって、行うことができる。ウイルス粒子の導入は、大動脈根への送達によって行うことができる。

【００３５】

心特異的プロモーターは、他の細胞において発現することができる。しかしながら、これは、心臓における心筋細胞、および心臓に位置する非心筋細胞などの心細胞においてより高い度合いの発現を有する。例えば、心特異的プロモーターは、心臓外に位置する細胞と比較して、心臓に位置する心筋細胞および非心筋細胞を含む心臓に位置する細胞において、少なくとも２５％、もしくは少なくとも３５％、もしくは少なくとも４５％、もしくは少なくとも５５％、もしくは少なくとも６５％、もしくは少なくとも７５％、もしくは少なくとも８０％、もしくは少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、または２５％～９５％の間の任意の整数高く、遺伝子を発現する。

【００３６】

機能的バリアントは、本明細書で、下記に定義される。好適には、合成心特異的プロモーターは、配列番号３～６４のいずれか１つと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を含み得る。好適には、合成心特異的プロモーターは、配列番号３～３２のいずれか１つと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列に作動可能に連結された、配列番号３～６４のいずれか１つと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を含み得る。

【００３７】

一実施形態では、本明細書に開示される以下のシス調節エレメント（ＣＲＥ）の少なくとも１つを含むか、またはそれからなる合成心特異的プロモーターが提供される。

【００３８】

本明細書に開示される技術の一態様は、心不全を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後６か月、患者の血清におけるＮＴ－プロＢＮＰレベルが、９００ｐｇ／ｍｌを下回る、方法に関する。

【００３９】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心不全を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、（ｉ）ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤タンパク質をコードする核酸配列、（ｉｉ）ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質に機能的に連結された合成プロモーターを含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含む、方法に関する。

【００４０】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心血管状態または心臓疾患を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントに機能的に連結された治療用核酸を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、治療用核酸が、ＲＮＡまたはＤＮＡであり、治療用核酸が、表１８Ａまたは１８Ｂから選択される治療用タンパク質を発現する、方法に関する。

【００４１】

本明細書に記載される技術の別の態様は、うっ血性心不全を有する患者を処置する方法であって、患者に、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１用量を投与することを含み、ｒＡＡＶベクターが、ＡＡＶ２ｉ８であり、ＣＭＶプロモーター、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントから選択されるプロモーターに機能的に連結されたホスファターゼ阻害剤１（Ｉ－１）をコードする核酸を含む、方法に関する。

【００４２】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号２のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含み、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。一部の実施形態では、核酸配列は、配列番号３８５～４１２のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列である。

【００４３】

配列番号３８５～４１２のいずれかの核酸配列を含む閉鎖線状ＤＮＡ構築物も提供される。閉鎖線状ＤＮＡは、細菌ＤＮＡ配列を欠くｒＡＡＶを作製するための方法において使用することができる。そのため、構成的に活性なＩ－１ｃをコードするｒＡＡＶを含む心不全の処置のための医薬組成物であって、ｒＡＡＶ組成物が、細菌核酸配列を欠く、医薬組成物も本明細書に提供される。

【００４４】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結されたＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む。一部の実施形態では、合成プロモーターは、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントである。一部の実施形態では、合成プロモーターは、平滑筋細胞において優先的に治療用核酸またはホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現を引き起こす。一部の実施形態では、合成プロモーターは、心細胞において優先的に治療用核酸またはホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現を引き起こす。一部の実施形態では、心特異的または筋肉特異的プロモーターによる治療用核酸またはホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現は、ＣＭＶプロモーターによって引き起こされる発現と同等であるか、またはそれよりも高い。

【００４５】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、総用量は、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される。一部の実施形態では、総用量は、分割用量で行われ、それぞれの分割用量は、１～５分の期間にわたって投与され、例えば、総用量の投与は、５分割用量で行われ、それぞれの分割用量は、１～５分の期間にわたって投与され、例えば、５分割用量は、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される。

【００４６】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２ｉ８またはＡＡＶ９である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、表１１に開示される任意のＡＡＶ血清型から選択される。

【００４７】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量は、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量は、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの用量範囲から選択される。

【００４８】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ｒＡＡＶ用量の投与後少なくとも約６か月、患者の血清におけるＮＴ－プロＢＮＰレベルが、測定され、９００ｐｇ／ｍｌを下回る。

【００４９】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、方法は、免疫モジュレーターを投与することをさらに含む。一部の実施形態では、投与は、ニトロプルシドまたはニトログリセリンをさらに含む。本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、投与は、患者の心臓の冠動脈の内腔の中に、または全身投与である。

【００５０】

本発明のｒＡＡＶを生成するために使用される配列番号３５７～３８４のいずれかの閉鎖末端線状二重鎖ＤＮＡ（本出願において閉鎖線状ＤＮＡとも称される）も本明細書に提供される。

【００５１】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、方法は、うっ血性心不全（ＣＨＦ）を含む心不全を処置するために有用であり、ＨＦまたはＣＨＦは、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される。

【００５２】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、方法は、心筋症を処置するために有用である。

【００５３】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、方法は、非虚血性心筋症または非虚血性心不全を処置するために有用である。

【００５４】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、方法は、虚血性心筋症または非虚血性心不全を処置するために有用である。

【００５５】

本明細書に記載される技術の一態様は、心不全を有する患者を処置する方法であって、（ｉ）うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後少なくとも１２か月、うっ血性心不全の分類の改善が存在する、方法に関する。

【００５６】

本明細書に開示される方法のすべての態様では、心不全の分類は、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、ミネソタＬＩＶＩＮＧ ＷＩＴＨ ＨＥＡＲＴ ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、もしくは２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、またはその同等の分類システムに基づく。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与後の１２か月後、少なくとも１レベル、または少なくとも２レベルの分類の改善が存在する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルまたは２レベルの分類の改善が存在する。

【００５７】

本明細書に開示される方法のすべての態様では、心不全の分類は、ＮＹＨＡであり、分

類のレベルは、クラスＩ、クラスＩＩ、クラスＩＩＩ、およびクラスＩＶからなる群から選択される。一部の実施形態では、分類システムは、米国心臓病学会／米国心臓協会（ＡＣＣ／ＡＨＡ）補完病期分類システムであり、分類のレベルは、ステージＡ、ステージＢ、ステージＣ、ステージＤからなる群から選択される。一部の実施形態では、分類システムは、ＫＣＣＱであり、分類のレベルは、ＫＣＣＱの５０～１００のまずまず～極めて良好なスコア、０～４９の非常に不良～まずまずのスコア、７５～１００の良好～極めて良好なスコア、および０～７４の非常に不良～良好なスコアからなる群から選択されるＫＱＱＣ全体サマリースコア範囲である。

【００５８】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心筋症を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後少なくとも１２か月、患者におけるベースラインレベルからの少なくとも１つのパラメーターの改善が存在し、少なくとも１つのパラメーターが、（ｉ）駆出率（ＥＦ）、（ｉｉ）収縮終期容積（ＥＳＶ）、（ｉｉｉ）駆出率（ＥＦ）および内径短縮率（ＦＳ）から選択される心収縮性、（ｉｖ）拡張終期容積（ＤＶ）および収縮終期容積（ＥＳＶ）のいずれかから選択される心容積、（ｖ）６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、運動および最大ＶＯ２のいずれかから選択される機能基準、（ｖｉ）ＢＮＰレベル、プロ－ＢＮＰレベル、（ｖｉｉ）バイオマーカーレベルであって、トロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、または肝臓トランスアミナーゼの群から選択される、バイオマーカーレベル、（ｖｉｉｉ）患者報告結果（ＰＲＯ）、例えば、症状の低減、健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＯＬ）、または患者が知覚する健康状態、ならびに（ｉｘ）心不全に起因する死亡リスク、心不全症状に起因する入院の減少、または心不全の処置のための治療的介入のいずれかの減少から本質的になる群から選択される、方法に関する。

【００５９】

本明細書に開示される方法のすべての態様では、投与後少なくとも１２か月、少なくとも２つ、または少なくとも３つ、または少なくとも４つ、または少なくとも５つのパラメーターの改善が存在する。一部の実施形態では、投与後少なくとも６か月、少なくとも２つ、または少なくとも３つ、または少なくとも４つ、または少なくとも５つのパラメーターの改善が存在する。一部の実施形態では、改善は、（ａ）ベースラインからの駆出率の少なくとも５％もしくはそれよりも高い増加、（ｂ）ベースラインからの収縮終期容積の少なくとも１０％の減少もしくは少なくとも２０ｍｌの減少、（ｃ）ベースラインからの６分間歩行試験の少なくとも５０メートルの増加、（ｄ）ベースラインからの血液におけるＢＮＰレベル（ｐｇ／ｍｌ）の少なくとも４０％の減少、（ｅ）ベースラインからの血液におけるプロ－ＢＮＰレベル（ｐｇ／ｍｌ）の少なくとも３５％の減少、（ｆ）同じバイオマーカーのベースラインレベルからのトロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、もしくは肝臓トランスアミナーゼから選択されるバイオマーカーの少なくとも１０％の低下、（ｇ）ベースラインからの心筋酸素消費量（ＭＶＯ２）の少なくとも１．５ｍｌ／ｋｇ／分の増加、または（ｈ）改善されたＨＦ症状に起因する退院、もしくは対象における改善されたＨＦ症状に起因する変力物質、血管拡張薬、利尿薬（diuretcis）のいずれかの使用の減少から選択される低下した介入のいずれかから選択される。

【００６０】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶベクターは、ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結されたＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む。本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、総用量またはｒＡＡＶは、以下：（ａ）約２０分～約３０分の期間にわたる投与方法、（ｂ）一連の分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与される投与方法、または（ｃ）一連の５分割用量で投与され、それぞれの分割用量が

、約１分～約５分の期間にわたって投与され、５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される投与方法のいずれかとして投与される。

【００６１】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶベクターは、肝臓を標的解除するカプシドを含み、すなわち、ｒＡＡＶは、優先的に、肝臓以外の組織を標的にする。本明細書に記載されるすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、限定されるものではないが、心筋および心筋細胞を含む筋細胞を優先的に標的にすることができる。本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９、または表１１から選択される任意のｒＡＡＶからなる群から選択される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ２ｉ８である。

【００６２】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶベクターは、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇであるｒＡＡＶの少なくとも１総用量で投与される。

【００６３】

心筋症の処置のための本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶベクターは、表１８Ａまたは１８Ｂにリストされるタンパク質のいずれかから選択されるタンパク質をコードする。心筋症の処置のための本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶベクターは、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質、例えば、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）をコードする核酸配列を含む。本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、Ｉ－１ｃは、（ａ）配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～５４を含むポリペプチドであって、配列番号１が、アミノ酸７０、６７、６６、６５、または６１、または５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～５４またはその機能的断片を含むポリペプチドであって、機能的断片が、配列番号１のアミノ酸残基１～５４と少なくとも８５％の配列同一性を有するか、またはアミノ酸７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、あるいは（ｃ）配列番号５０７もしくは５２７～５３２、または配列番号５０７もしくは５２７～５３２のいずれかのアミノ酸残基と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体のいずれかから選択されるポリペプチドのいずれかから選択される。

【００６４】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶゲノムは、配列番号４１３～４４１からなる群から選択される核酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列は、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、または（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、もしくはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列から選択される。

【００６５】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、Ｉ－１タンパク質をコードする核酸配列は、コドン最適化された核酸配列、例えば、限定されるものではないが、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択されるＩ－１タンパク質をコードする核酸配列である。

【００６６】
本明細書に記載される技術のすべての態様では、本明細書に開示される方法および組成物を使用して、心筋症を有する対象を処置することができ、心筋症を有する対象は、限定されるものではないが、後天的心筋症、感染症もしくは毒物などの結果として獲得された心筋症、または先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を含む、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する対象は、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症（renoprival hypertension）、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する。

【００６７】
本明細書に記載される技術のすべての態様では、本明細書に開示される方法および組成物を使用して、心筋症を有する対象を処置することができ、心筋症を有する対象は、虚血性心筋症を有する。

【００６８】
本明細書に記載される技術のすべての態様では、本明細書に開示される方法および組成物を使用して、心筋症を有する対象を処置することができ、心筋症を有する対象は、心不全を有する。そのような実施形態では、心不全を有する対象は、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩに等しいか、またはそれよりも上の分類を有する。一部の実施形態では、心不全を有する対象は、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する。

【００６９】
本明細書に記載される技術のすべての態様では、本明細書に開示される方法および組成物を使用して、心筋症を有する対象を処置することができ、心筋症を有する対象は、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）、または保たれた駆出率（ＨＦｐＥＦ）を有する

。

【００７０】

心筋症を有する対象を処置し、対象が心不全を有する方法における一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与後少なくとも１２か月、ベースラインレベルからの心不全の分類の少なくとも１クラスの改善が存在し、心不全の分類は、以下：（ａ）米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、またはその同等物、あるいは（ｂ）ミネソタＬＩＶＩＮＧ ＷＩＴＨ ＨＥＡＲＴ ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、またはカンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、慢性心不全質問票（ＣＨＦＱ）、重度心不全のためのクオリティオブライフ質問票（ＱＬＱ－ＳＨＦ）、左室機能障害（ＬＶＤ－３６）質問票、および左室疾患質問票（ＬＶＤＱ）のいずれかからなる群から選択される健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＬ）質問票の少なくとも１つによって評価される。

【００７１】

本明細書に開示される方法のすべての態様では、ＨＦの分類の改善は、投与後少なくとも１２か月、少なくとも２つ、または少なくとも３つ、または少なくとも４つ、または少なくとも５つのパラメーターの改善である。一部の実施形態では、投与後少なくとも６か月、少なくとも２つ、または少なくとも３つ、または少なくとも４つ、または少なくとも５つのパラメーターの改善が存在する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルまたは少なくとも２レベルの分類の改善が存在する。一部の実施形態では、ベースラインレベルからのクオリティオブライフＭＬＷＨＦＱまたはＫＣＣＱの少なくとも１０ポイントの減少の改善が存在する。

【００７２】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、対象は、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の投与と同時に、および／またはその前に、および／またはその後に血管拡張薬を投与される。本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、対象は、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の投与と同時に、またはその前に、またはその後に免疫モジュレーターを投与される。

【００７３】

本明細書に記載される技術の別の態様は、配列番号３８５～４１２のいずれかから選択されるコドン最適化されたＩ－１ｃ核酸配列、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含むＡＡＶベクターを含む医薬組成物に関する。一部の実施形態では、コドン最適化された核酸配列は、ＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーター、例えば、表２Ａのいずれかから選択される心特異的プロモーター、あるいは心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター、例えば、表５Ａもしくは１３Ａから選択されるプロモーターまたはそのバリアントに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、医薬組成物は、配列番号４１～４２からなる群から選択される核酸配列、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示されるように、非虚血性心筋症または虚血性心筋症を含む心筋症を有する対象を処置する方法において使用することができる。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示される心不全を有する対象を処置する方法において使用することができる。

【００７４】

本明細書に記載される技術の別の態様は、（ａ）表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または（ｂ）心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または（ｃ）心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターのいずれかから選択されるプロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターに関する。ＡＡＶベクターの一部の実施形態では、心筋

および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターは、表５Ａもしくは表１３Ａまたはそのバリアントから選択される。

【００７５】

本明細書に開示される心筋症および／もしくは心不全を有する対象を処置するためのｒＡＡＶ組成物、またはそのために使用する方法のすべての態様では、ＡＡＶは、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される。一部の実施形態では、ＡＡＶは、肝臓を標的解除するカプシドを含む、すなわち、カプシドは、ｉｎｖｉｖｏで、肝臓以外の組織にｒＡＡＶを標的化する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ２ｉ８である。

【００７６】

本明細書に開示されるｒＡＡＶ組成物および方法のすべての態様では、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドは、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）であり、例えば、Ｉ－１ｃは、（ａ）配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～６５を含むポリペプチドまたはその機能的等価体、（ｂ）配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドであって、ポリペプチドが、残基７０、６７、６６、６５、または６１、または５４から選択されるアミノ酸のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチド、または配列番号１のアミノ酸残基１～６５と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体、あるいは（ｄ）配列番号５０７もしくは５２７～５３２、または配列番号５０７もしくは５２７～５３２のいずれかのアミノ酸残基と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体のいずれかから選択されるポリペプチドのいずれかから選択される。本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列から選択されるＩ－１ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。

【００７７】

本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択されるＩ－１ｃポリペプチドをコードし、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸（Ｔ３５Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている。

【００７８】

本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列は、コドン最適化された核酸配列であり、例えば、コドン最適化された核酸配列は、配列番号１の野生型参照配列またはその断片と比較して、低下したＣｐＧ含有量または低下したＣｐＧアイランドを有する。本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％、もしくは少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性の核酸配列のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列である。

【００７９】

本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心特

異的プロモーターまたは筋肉特異的プロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の５’に位置する少なくとも１つのＩＴＲを含むことができる。本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心特異的プロモーターまたは筋肉特異的プロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列に隣接する少なくとも２つのＩＴＲを含むことができる。当業者に公知の任意のＩＴＲ配列を使用することができ、限定されるものではないが、配列番号７０～７８、または配列番号７０～７８と少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性を有する核酸配列のいずれか１つまたは複数から選択されるＩＴＲ配列が挙げられる。

【００８０】

本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、リバースポリＡ配列または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントを含み、リバースポリＡ配列または二本鎖終結エレメントは、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の３’に位置する。一部の実施形態では、リバースポリＡ配列または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントは、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の３’および右側ＩＴＲの５’の間に位置する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、ＳＶ４０ポリＡ（配列番号３３４）、ＨＧＨポリＡ（配列番号６６）、配列番号２８４～２８７、配列番号３３１～３３５、または配列番号３３４、６６、２８４～２８７もしくは３３１～３３５と少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性の核酸配列のいずれかから選択されるポリＡ配列をさらに含み、ポリＡ配列は、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の３’に位置する。

【００８１】

本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、本明細書に開示される少なくとも１つの免疫モジュレーターおよび／または血管拡張薬をコードする核酸配列をさらに含むことができる。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、組成物または溶液中に存在することができ、溶液は、免疫モジュレーターをさらに含む。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、組成物または溶液中に存在することができ、溶液は、血管拡張薬をさらに含む。

【００８２】

本明細書に記載される技術の別の態様は、（ｉ）（ａ）表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、（ｂ）心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター、または（ｃ）心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターもしくはそのバリアントのいずれか１つに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、ならびに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターは、表５Ａもしくは表１３Ａまたはそのバリアント、例えば、表５Ａまたは表１３Ａにリストされるプロモーターと少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有する核酸配列を含むバリアントから選択される。

【００８３】

本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶは、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶは、本明細書に開示されるように、肝臓を標的解除するカプシドを含む。本明細書に開示

される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、ＡＡＶは、ＡＡＶ２ｉ８である。一部の実施形態では、医薬組成物は、配列番号４１３～４４０、または配列番号４１３～４４０から選択される配列と少なくとも８０％、もしくは少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性配列の核酸配列からなる群から選択される核酸を含むＡＡＶを含み、配列番号４１３～４４０に示される核酸は、配列番号３３０のＣＭＶプロモーターを含み、配列番号３３０のＣＭＶプロモーターは、（ａ）表２Ａまたはそのバリアント（例えば、表２Ａにリストされるプロモーターと少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有する核酸配列を含むバリアント）から選択される心特異的プロモーター、（ｂ）心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター、または（ｃ）心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターもしくはそのバリアントのいずれかによって置き換えられており、心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターは、表５Ａもしくは表１３Ａまたはそのバリアント、例えば、表５Ａまたは表１３Ａにリストされるプロモーターと少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有する核酸配列を含むバリアントから選択される。

【００８４】

一部の実施形態では、医薬組成物は、血管拡張薬を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、免疫モジュレーターを含む。

【００８５】

本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、医薬組成物は、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列から選択されるＩ－１ポリペプチドをコードする核酸配列を含むＡＡＶベクターを含む。

【００８６】

本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、医薬組成物は、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択されるＩ－１ｃポリペプチドをコードするｒＡＡＶを含み、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸（Ｔ３５Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている。

【００８７】

本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、医薬組成物は、コドン最適化された核酸配列であるＩ－１ポリペプチドをコードする核酸配列を含み、例えば、コドン最適化された核酸配列は、配列番号１の野生型参照配列またはその断片と比較して、低下したＣｐＧ含有量または低下したＣｐＧアイランドを有する。本明細書に開示されるすべての態様の一部の実施形態では、Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％、もしくは少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性の核酸配列のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列である。

【００８８】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心筋症を有する対象の処置のための医薬組成物の製造のための本明細書に開示されるＡＡＶベクターの使用に関する。本明細書に開示

される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、処置される心筋症を有する対象は、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、心筋症を有する対象は、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害、例えば、限定されるものではないが、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を含む、本明細書に開示される心徴候を有する遺伝性障害を有する。

【００８９】

本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶを使用して、虚血性心筋症を有する心筋症を有する対象を処置することができる。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶを使用して、心不全を有する心筋症を有する対象を処置することができ、例えば、心不全を有する対象は、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく心不全の分類、またはその同等の分類を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶを使用して、心不全を有する対象を処置することができ、例えば、心不全を有する対象は、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩ、またはクラスＩＩＩよりも上の分類を有する。

【００９０】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心不全に関連する状態または疾患を有する対象の処置のための医薬組成物の製造のための本明細書に開示されるＡＡＶベクターの使用に関する。一部の実施形態では、対象は、うっ血性心不全（ＣＨＦ）または心不全（ＨＦ）の分類を有し、例えば、限定されるものではないが、分類は、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、または本明細書に開示される同等の分類システムによって使用される分類システムに基づく。一部の実施形態では、対象は、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、対象は、虚血性心不全または虚血性心筋症を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物に従って処置される対象は、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する。

【００９１】
本明細書に記載される技術の別の態様は、本明細書に開示されるＡＡＶベクターを含む細胞に関する。一部の実施形態では、細胞は、心細胞または筋細胞であり、一部の実施形態では、細胞は、細胞培養物中にあり（すなわち、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）、一部の実施形態では、細胞は、対象中に存在する（例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ）。
【００９２】
本明細書に記載される技術の別の態様は、心筋症を有する対象の処置における使用のための、本明細書に開示されるＡＡＶベクター、または本明細書に開示される医薬製剤、または本明細書に開示される細胞の使用に関する。
【００９３】
本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクター（例えば、ホスファターゼ活性、例えば、１型ホスファターゼ活性をモジュレートする薬剤を発現する）の送達は、非有糸分裂性である細胞（例えば、心筋細胞）である。したがって、導入遺伝子発現は、少なくとも１用量の後、細胞の寿命の間、続き得る。
【００９４】
本明細書に記載される技術の別の態様は、心不全を有する患者の処置における使用のための、本明細書に開示されるＡＡＶベクター、または本明細書に開示される医薬製剤、または本明細書に開示される細胞の使用に関する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、本明細書に開示される方法に従う使用のためのＡＡＶベクターは、うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する対象に投与され、例えば、分類は、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、またはその同等の分類システムに基づく。
【００９５】
本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、対象は、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、対象は、虚血性心不全または虚血性心筋症を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、対象は、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、心不全を有する対象は、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する。本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、心不全を有する対象は、虚血、不整脈、心筋梗塞、異常な心臓収縮性、または異常なＣａ２＋代謝のいずれか１つを有する。
【００９６】
本明細書に開示される組成物および方法のすべての態様の一部の実施形態では、対象は、（ａ）非虚血性心不全、（ｂ）非虚血性心筋症、（ｃ）米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、または同等の分類システムを使用する分類に基づくうっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類、あるいは（ｄ）低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）の１つまたは複数を有する。
【００９７】
本明細書に開示される技術の別の態様は、心筋症を有する対象においてホスファターゼ

阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドを発現させる方法であって、心筋症を有する対象に、本明細書に開示される方法によるＡＡＶベクターの少なくとも１用量を導入することを含み、心筋症を有する対象が、心不全の分類を有し、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後少なくとも１２か月、心不全の分類の改善が存在する、方法に関する。一部の実施形態では、心不全の分類は、米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、または同等の分類システムに基づく。本明細書に開示される方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与後少なくとも１２か月、少なくとも１レベルもしくは少なくとも２レベルの分類の改善が存在するか、または一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与後少なくとも６か月、少なくとも１レベルもしくは少なくとも２レベルの分類の改善が存在する。一部の実施形態では、投与後少なくとも１２か月、米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システム、または同等のＨＦ分類システムのいずれか１つまたは複数における分類の少なくとも１または２レベルの改善が存在する。

【００９８】

本明細書に開示される方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１用量の投与と同時に、またはその前に、またはその後に免疫モジュレーターを投与される。本明細書に開示される方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１用量の投与と同時に、および／またはその前に、および／またはその後に血管拡張薬を投与される。

【００９９】

本明細書に開示される方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶの投与は、患者の心臓の冠動脈の内腔の中にである。ｒＡＡＶの投与が虚血性心筋症を有する対象の処置のためである一部の実施形態では、投与は、直接、心臓の筋肉に対して、例えば、虚血性心筋またはＭＩに対してである。

【０１００】

本明細書に開示される方法のすべての態様の一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１用量の投与は、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲であり、１用量または２～５分割用量で投与することができる。本明細書に開示される方法のすべての態様の一部の実施形態では、総用量は、以下：（ａ）約２０分～約３０分の期間にわたる投与方法、（ｂ）一連の分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与される投与方法、および（ｃ）一連の５分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与され、５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される投与方法のいずれかとして投与される。

【０１０１】

本明細書に記載される技術の別の態様は、心不全を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの用量範囲から選択され、総用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与され、総用量の投与が、分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、方法に関する。一部の実施形態では、心不全は、虚血、不整脈、心筋梗塞、異常な心臓収縮性、または異常なＣａ２＋代謝のいずれか１つまたは複数から選択される。

【０１０２】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結されたＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む。一部の実施形態では、合成プロモーターは、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントである。一部の実施形態では、合成プロモーターは、平滑筋細胞において優先的に治療用核酸またはホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現を引

き起こす。一部の実施形態では、合成プロモーターは、心細胞において優先的に治療用核酸またはホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現を引き起こす。一部の実施形態では、心特異的または筋肉特異的プロモーターによる治療用核酸またはホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現は、ＣＭＶプロモーターによって引き起こされる発現と同等であるか、またはそれよりも高い。

【０１０３】

一部の実施形態では、心不全を有する患者を処置する方法のための方法において、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２ｉ８またはＡＡＶ９である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、表１１に開示される任意のＡＡＶ血清型から選択される。

【０１０４】

一部の実施形態では、心不全を有する患者を処置する方法のための方法において、総用量の投与は、５分割用量で行われ、それぞれの分割用量は、１～５分の期間にわたって投与される。一部の実施形態では、５分割用量は、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される。

【０１０５】

一部の実施形態では、心不全を有する患者を処置する方法のための方法において、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量は、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１分割用量は、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである。一部の実施形態では、少なくとも１用量は、２～５分割用量で投与される、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲である。一部の実施形態では、心不全を有する患者を処置する方法のための方法において、投与は、患者の心臓の冠動脈の内腔の中にである。

【０１０６】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ホスファターゼ阻害剤Ｉ－１は、配列番号１のアミノ酸１～６５またはその機能的断片を含み、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様において、一部の実施形態では、ホスファターゼ阻害剤をコードする核酸は、配列番号１の断片を含むＩ－１（Ｉ－１ｃ）の構成的に活性な断片をコードし、断片は、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７もしくは配列番号１のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。

【０１０７】

本明細書に記載される技術の別の態様は、配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、配列番号１のアミノ酸３５のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられており、前記核酸配列が、ＣＭＶプロモーター、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントのいずれかから選択されるプロモーターに作動可能に連結されている、ＡＡＶベクターに関する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される。一部の実施

形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２ｉ８またはＡＡＶ９である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、表１１に開示される任意のＡＡＶ血清型から選択される。

【０１０８】

本明細書に記載される技術の別の態様は、（ｉ）配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、配列番号１のアミノ酸３５のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられており（Ｔ３５Ｄ）、前記核酸配列が、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントに作動可能に連結されている、ＡＡＶベクター、ならびに（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【０１０９】

一部の実施形態では、医薬組成物のｒＡＡＶベクターは、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択されるポリペプチドをコードする核酸配列を含み、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。一部の実施形態では、医薬組成物中のｒＡＡＶは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２ｉ８またはＡＡＶ９である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、表１１に開示される任意のＡＡＶ血清型から選択される。

【０１１０】

本明細書に開示される方法および組成物のすべての態様では、方法は、１回より多く行うことができる。例えば、患者は、最初の時点、および例えば、約３か月後、または約６か月後、または約１２か月後、または約２年後、または約３年後にｒＡＡＶベクターを投与され得、患者は、２回目に、本明細書に開示される方法に従ってｒＡＡＶベクターを投与され得る。一部の実施形態では、対象または患者は、本明細書に開示される方法に従って、複数回、例えば、少なくとも２回、または少なくとも３回、または少なくとも４回、または少なくとも５回、または少なくとも６回、または６回よりも多く、本明細書に開示される方法に従ってｒＡＡＶベクターを投与され得る。

【０１１１】

技術のすべての他の態様を下記に記載する。

【０１１２】

例として与えられる、しかし記載される特定の実施形態に本発明を限定するように意図されたものではない、以下の詳細な説明は、参照により本明細書に組み込まれる添付の図面と組み合わせることで理解され得る。本発明の様々な好ましい特徴および実施形態が、次に、非限定的な例として、以下の添付の図面に関連して、説明されることになる。

【図面の簡単な説明】

【０１１３】

【図１】図１は、他の対照プロモーター（ＣＢＡおよびＣＫ８ｂイントロン）、または生理食塩水対照と比較して、筋肉特異的プロモーターＳＰ００６７からの心臓組織（心筋）におけるルシフェラーゼ遺伝子のｉｎ　ｖｉｖｏ発現を示す。

【０１１４】

【図２】図２は、他の対照プロモーター（ＣＢＡおよびＣＫ８ｂイントロン）、または生理食塩水対照と比較して、筋肉特異的プロモーターＳＰ００６７からの前脛骨筋（ＴＡ）筋肉におけるルシフェラーゼ遺伝子のｉｎ　ｖｉｖｏ発現を示す。

【０１１５】

【図３】図３は、横隔膜（ｄｉａｐｈ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、前脛骨筋（ＴＡ）、心臓、腸および肝臓における合成心特異的プロモーターＳＰ００６７からのルシフェラーゼ遺伝子のｉｎ　ｖｉｖｏ発現を示す。ＳＰ００６７は、ｉｎ　ｖｉｖｏで心筋において活性であるが、骨格筋（横隔膜（ｄｉａｐｈ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、前脛骨筋（ＴＡ））で

は活性でない。ＳＰ００６７は、肝臓においても、ある程度のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を有する。

【０１１６】

【図４】図４Ａ～４Ｂは、ヒト心筋および骨格筋細胞（Ｈ９Ｃ２またはＨ２Ｋ細胞）における合成心特異的プロモーターの平均ｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現を示す。図４Ａは、Ｈ２Ｋマウス骨格筋細胞における、ＳＰ００６７、ＳＰ０４２４またはＳＰ０４２５合成プロモーターに機能的に連結されたｐＡＡＶ－ＳＹＮＰベクター内のマーカー遺伝子の発現を示し、Ｈ２Ｋ細胞は、骨格筋の筋管に分化したものであり、データは、公知プロモーターＣＢＡの活性に正規化されている。１の相対活性は、ＣＢＡの活性に等しい。エラーバーは、標準偏差である。図４Ｂは、Ｈ９Ｃ２ラット心筋細胞における、ＳＰ００６７、ＳＰ０４２４、ＳＰ０４２５、ＳＰ０４２９、ＳＰ０４３０、ＳＰ０３４４、ＳＰ０４３３、ＳＰ０４３５、ＳＰ０４３６合成プロモーターに機能的に連結されたｐＡＡＶ－ＳＹＮＰベクター内のマーカー遺伝子の平均発現を示し、Ｈ９Ｃ２細胞は、心筋（心臓）の筋管に分化したものであり、公知プロモーターＣＢＡの活性に正規化されている。１の相対活性は、ＣＢＡの活性に等しい。エラーバーは、標準偏差である。このエラーは、少なくとも３回の反復実験の標準偏差である。

【０１１７】

【図５－１】図５Ａ～５Ｆは、骨格筋および心筋において活性である合成筋肉特異的プロモーターのｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図５Ａは、心臓における合成筋肉特異的プロモーター、対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８ならびに生理食塩水陰性対照のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図５Ｂは、横隔膜における合成筋肉特異的プロモーター、対照プロモーターＣＢＡ　ＣＫ８ならびに生理食塩水陰性対照のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図５Ｃは、四頭筋における合成筋肉特異的プロモーター、対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８ならびに生理食塩水陰性対照のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図５Ｄは、腸における合成筋肉特異的プロモーター、対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８ならびに生理食塩水陰性対照のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図５Ｅは、前脛骨筋における合成筋肉特異的プロモーター、対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８ならびに生理食塩水陰性対照のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図５Ｆは、肝臓における合成筋肉特異的プロモーター、対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８ならびに生理食塩水陰性対照のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。

【図５－２】同上。

【図５－３】同上。

【０１１８】

【図６－１】図６Ａ～６Ｋは、心筋および骨格筋において活性である例示的な合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０１７３、ＳＰ０２７０、ＳＰ０２６８、ＳＰ０３２０、ＳＰ０２７９、ＳＰ０１３４、ＳＰ００５７、ＳＰ０２２９、ＳＰ００６７、ＳＰ０３１０およびＳＰ０２６７のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ａは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０１７３のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｂは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０２７０のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｃは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０２６８のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｄは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０３２０のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｅは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０２７９のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｆは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０１３４のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｇは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ００５７のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｈは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０２２９のｉ

ｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｉは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ００６７のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｊは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０３１０のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図６Ｋは、横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋（ｑｕａｄ）および前脛骨筋（ＴＡ）における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０２６７のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。

【図６－２】同上。

【図６－３】同上。

【図６－４】同上。

【図６－５】同上。

【０１１９】

【図７－１】図７Ａ～７Ｐは、心筋、選択された組織（肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）において活性である例示的な合成心筋特異的プロモーターＳＰ００６７、ＳＰ０４５１、ＳＰ０４５２、ＳＰ０４３０、ＳＰ０４５０、ＳＰ０４２９、ＳＰ０４２４、ＳＰ０４３５、ＳＰ０４３６、ＳＰ０４３３、ＳＰ０４４９、ＳＰ０３４４、ＳＰ０４７５のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を、筋肉特異的プロモーターＣＫ８、または心特異的プロモーター対照１もしくは対照２と比較して示す。図７Ａは、1×10^{5}ＲＬＵ／ｍｇでの肝臓発現および1×10^{6}～^{7}ＲＬＵ／ｍｇでの心臓発現を示す、例示的な比較肝臓プロモーターＣＫ８の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｂは、心臓における1×10^{5}ＲＬＵ／ｍｇでの特異的発現および骨格筋または平滑筋組織におけるより低い発現、ならびにまた肝臓における1×10^{4}ＲＬＵ／ｍｇでのより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ００６７の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｃは、心臓における約1×10^{7}ＲＬＵ／ｍｇでの特異的発現および骨格筋または平滑筋組織におけるより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０３４４の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｄは、心臓における1×10^{7}～1×10^{8}ＲＬＵ／ｍｇでの非常に特異的な発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約1×10^{4}ＲＬＵ／ｍｇでのより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０４２４の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｅは、心臓における1×10^{8}ＲＬＵ／ｍｇでの非常に特異的な発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約1×10^{4}～約1×10^{5}ＲＬＵ／ｍｇでのより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０４２９の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｆは、心臓における1×10^{8}ＲＬＵ／ｍｇでの非常に特異的な発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約1×10^{4}～約1×10^{5}ＲＬＵ／ｍｇでのより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０４３０の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｇは、心臓における1×10^{7}ＲＬＵ／ｍｇでの特異的発現ならびに骨格筋または平滑筋組織におけるおよび肝臓におけるより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０４３３の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｈは、心臓における1×10^{7}ＲＬＵ／ｍｇでの発現ならびに骨格筋または平滑筋組織におけるおよび肝臓組織におけるより低い発現を示す、陽性対照心筋プロモーター対照１の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｉは、心臓における1×10^{7}～1×10^{8}ＲＬＵ／ｍｇの間での非常に特異的な発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約1×10^{4}ＲＬＵ／ｍｇでのより低い発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０４３５の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ

筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｊは、心臓における１×１０^{7}ＲＬＵ／ｍｇでの発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約１×１０^{4}および１×１０^{6}ＲＬＵ／ｍｇ未満の発現レベルを示す、心筋プロモーターＳＰ０４３６の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｋは、心臓における１．５×１０^{6}ＲＬＵ／ｍｇでの非常に特異的な発現および骨格筋または平滑筋組織における約１×１０^{4}未満の発現レベルを示す、陽性対照心筋プロモーター対照２の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｌは、心臓における１×１０^{7}ＲＬＵ／ｍｇでの発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約１．５×１０^{5}ＲＬＵ／ｍｇ未満の発現レベルを示す、心筋プロモーターＳＰ０４４９の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｍは、心臓における１．０×１０^{8}ＲＬＵ／ｍｇでの非常に特異的な発現ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約１×１０^{5}未満の発現レベルを示す、心筋プロモーターＳＰ０４５０の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｎは、心臓における１．０×１０^{8}ＲＬＵ／ｍｇを超える特異的発現、および骨格筋または平滑筋組織における約１．５×１０^{5}未満の発現レベルを示す、心筋プロモーターＳＰ０４５１の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示し、肝臓における発現は、約１×１０^{4}ＲＬＵ／ｍｇでさらに低い。図７Ｏは、心臓における１．０×１０^{8}ＲＬＵ／ｍｇを超える特異的発現、および骨格筋または平滑筋組織における約１．５×１０^{5}未満の発現レベル、ならびに肝臓における約１．５×１０^{4}ＲＬＵ／ｍｇでの発現を示す、心筋プロモーターＳＰ０４５２の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。図７Ｐは、心臓における約１×１０^{5}ＲＬＵ／ｍｇを超える発現、ならびに肝臓および骨格筋または平滑筋組織における約１．５×１０^{4}ＲＬＵ／ｍｇ未満の発現レベルを示す、心筋プロモーターＳＰ０４７５の肝臓、心臓、前脛骨筋（ＴＡ）、四頭筋（Ｑｕａｄ）、ヒラメ筋および横隔膜（Ｄｉａｐｈ）におけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を示す。

【図７－２】同上。

【図７－３】同上。

【図７－４】同上。

【図７－５】同上。

【図７－６】同上。

【０１２０】

【図８】図８は、筋肉細胞株Ｈ９Ｃ２における合成筋肉特異的プロモーターＳＰ０５２１およびＳＰ４１６９のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性を、ＣＢＡおよびＣＫ８対照プロモーターと比較して示す。この図は、心臓の筋管に分化したＨ９Ｃ２細胞株における合成の短い筋肉特異的プロモーターＳＰ０５２１およびＳＰ４７６９の、ＣＢＡプロモーターに正規化された、平均活性を示す。エラーバーは、三反復実験からの標準偏差である。

【発明を実施するための形態】

【０１２１】

詳細な説明

ＡＡＶベクターの投与のための方法、ならびに心筋症、心不全およびうっ血性心不全（ＣＨＦ）を含む、心血管疾患および障害、心臓障害および疾患の改善された処置のためのＡＡＶベクターを含む方法および組成物が本明細書に開示される。一部の実施形態では、心不全は、非虚血性心不全であるか、または対象は、非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、心不全は、虚血性心不全であるか、または対象は、虚血性心筋症を有する。非虚血性心不全は、遺伝に基づく不全および栄養的に引き起こされる不全を含む。

【０１２２】

特に、本発明の態様は、心不全の分類を有する対象に、ある用量のｒＡＡＶを投与することを含む投与の方法であって、投与後少なくとも１２か月で、心不全の分類が、少なくとも１または少なくとも２ステージまたは分類レベル改善する、方法を含む、心不全を有する対象の処置のための投与の新規方法および新規ｒＡＡＶ組成物を対象とする。一部の実施形態では、本明細書に開示される投与の方法は、他の薬剤と組み合わせて使用することができ、限定されるものではないが、免疫モジュレーターおよび／または血管拡張薬だけでなく、Ｉ－１ｃをコードするコドン最適化された核酸配列を含むｒＡＡＶベクター、および／または新規心特異的筋肉プロモーターを含むｒＡＡＶベクターの使用を含む。また、本発明者らは、心不全を評価するために使用される分類システムにおける対象のカテゴリー化を有意に改善する能力を有する非虚血性心筋症および虚血性心筋症を有する対象を含む、心不全を有する対象を処置する異なる方法を実証した。心不全の対象の程度をカテゴリー化する分類システムの範囲を、使用することができ、当技術分野において周知であり、限定されるものではないが、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、ミネソタＬＩＶＩＮＧ　ＷＩＴＨ　ＨＥＡＲＴ　ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱまたはＭＬＷＨＦ）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、または２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、あるいはその同等のもしくは改変された評価もしくは組合せ、または統合された評価が挙げられる。

【０１２３】

例示的な目的だけのために、そして理論に限定されることを望まないが、本明細書に開示される心不全を有する対象を処置する方法、または本明細書に開示される投与方法は、本明細書に開示されるｒＡＡＶの投与後１２か月以内に、対象の心不全の分類を、本明細書に開示される心不全分類システムに従って、例えば、カテゴリーＩＶからカテゴリーＩＩＩもしくはカテゴリーＩＩＩ未満に、または例えば、カテゴリーＩＩＩからカテゴリーＩＩもしくはカテゴリーＩＩ未満に改善することを実証した。一部の実施形態では、ＮＹＨＡもしくはＡＨＡもしくはＡＣＣ分類が使用されるか、または当業者に公知の任意の他の比較の心不全分類システムが使用される。

【０１２４】

特に、本明細書に記載される技術の一態様は、一般に、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターを投与する方法であって、対象への単一投与であり、単一投与が、単一投与内の少なくとも２、または３、または４、または５、またはそれよりも多い用量を含む、方法に関する。すなわち、別の言い方をすれば、一部の実施形態では、方法は、例えば、別個の量を特定の期間にわたって、その期間内に小分割用量で投与するボーラスを使用して、複数回用量を構成する単一投与で対象にｒＡＡＶベクターを投与することを含む。単一投与は、少なくとも２、または３、または４、または５、またはそれよりも多くのバイアルまたは注射器からのｒＡＡＶの投与を含むこともでき、それぞれのバイアルまたはそれぞれの注射器からのｒＡＡＶの送達は、１～５分の間、または５分よりも長い。任意の理論に限定されないが、例示的な注射器は、バレルと呼ばれる円筒状管内にしっかりとフィットするプランジャー（最新の注射器では、実際にはピストンである）からなる単純な往復ポンプであり得る。プランジャーは、管の内側に沿って直線的に引かれおよび押され、注射器が、管の前方の（開いた）端で排出オリフィスを通して液体または気体を取り込み、排出することを可能にする。注射器の開いた端は、皮下注射針、ノズルまたはチューブに取り付けられて、流れをバレルに向かわせるか、またはそこから出す。一部の実施形態では、方法は、心臓へのｒＡＡＶベクターの投与に関する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心特異的プロモーター、例えば、本明細書の表１～３に開示される例示的な心特異的プロモーターを含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心血管状態、心不全、または心臓疾患もしくは障害の処置のための開示される方法に従って投与される。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法に従って投与されるｒＡＡＶベクターは、心不全の処置のための治療剤をコードする核酸を含むｒＡＡＶベクターであり、核酸は、

表１～３に開示される心特異的プロモーターに機能的に連結されている。一部の実施形態では、プロモーターは、調節可能なプロモーター、例えば、誘導性プロモーターもしくは抑制性プロモーター、または当技術分野において公知のジンクフィンガーのＴＡＬＯＮＳなどを有するプロモーターであり得る。

【０１２５】

一部の実施形態では、本明細書に記載される技術は、分割用量でのウイルスベクターの単一用量の投与が、本明細書に開示されるように意図され、ウイルスベクターが、本明細書に開示されるように免疫モジュレーターと共投与される方法に関する。

【０１２６】

本明細書に記載される本開示の別の態様は、プロテインホスファターゼ１（ＰＰ１）の阻害剤を対象に送達するための遺伝子治療のためのｒＡＡＶゲノムについての組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターおよび構築物に関する。特に、本明細書に記載される技術は、一般に、ＰＰ１、例えば、Ｉ－１ポリペプチドの阻害剤、またはその機能的断片もしくはバリアントを産生するためのｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶゲノムに関し、これは、心臓、例えば、ヒトの心筋細胞および骨格筋細胞において発現される。例えば、この技術は、心臓、例えば、心筋細胞および平滑筋細胞において導入遺伝子を発現させるためのｒＡＡＶベクターに関する。

【０１２７】

特に、一部の実施形態では、ＰＰ１の阻害剤は、組換えｒＡＡＶベクターにおいて心特異的プロモーター（ＣＳＰ）の制御下で発現される。

【０１２８】

本明細書に記載される技術の一態様は、心血管状態、心臓障害もしくは心臓疾患、例えば、心不全を処置する使用のための、およびさらに心不全の処置のための、逆方向末端反復（ＩＴＲ）、プロモーター、異種遺伝子、ポリＡテール、および潜在的な他の調節エレメントを含有するヌクレオチド配列を含むｒＡＡＶベクターに関し、異種遺伝子は、ＰＰ１の阻害剤であり、ｒＡＡＶ　ＰＰ１阻害剤は、異種遺伝子の発現および疾患の処置のために適切な組織および／または器官に送達される治療有効用量で患者に投与することができる。

【０１２９】

本明細書に記載される技術の一態様は、そのゲノム中に、５’から３’の方向で以下：５’および３’－ＡＡＶ逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列、ならびに５’および３’ＩＴＲの間に位置して、プロテインホスファターゼ１（ＰＰ１）の阻害剤をコードする異種核酸配列を含むｒＡＡＶベクターに関し、異種核酸は、心特異的プロモーター（ＣＳＰ）、例えば、本明細書の表２Ａに開示される心特異的プロモーターまたはその機能的バリアントに機能的に連結されている。

【０１３０】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるｒＡＡＶベクターは、任意の血清型由来である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、限定されるものではないが、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄビリオン、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄ５４９Ａビリオン、ＡＡＶ３ｂ５４９Ａビリオン、ＡＡＶ３ｂＱ２６３Ｙビリオン、またはＡＡＶ３ｂＳＡＳＴＧビリオン（すなわち、Ｑ２６３Ａ／Ｔ２６５突然変異を含むＡＡＶ３カプシドを含むビリオン）を含むＡＡＶ３ｂ血清型である。一部の実施形態では、ビリオンは、ラショナル単数体、またはキメラもしくは任意の突然変異体であり得、例えば、カプシドは、所望の場所、例えば、心臓での増加した更新に適合し得る。他のカプシドは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０などを含む公知のＡＡＶ血清型のいずれか由来のカプシドを含み得る。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、肝臓特異的カプシド、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９／２４１３２４号に開示されるＸＬ３２およびＸＬ３２．１から選択される肝臓特異的カプシドを含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９／２４１３２４号に開示されるＡＡＶＸＬ３２ま

たはＡＡＶＸＬ３２．１である。
Ｉ．心血管状態、心臓疾患および心不全、ならびにＣＨＦを有する対象の処置の方法
Ａ．心臓障害および心臓疾患の処置の方法
【０１３１】
適した対象
【０１３２】
心不全（ＨＦ）は、適切に機能しない心臓によって引き起こされる複合症候群である。心不全の異なる種類は、症状および機能の制限を含む特定の特徴によって分類される。心不全は、同定可能なまたは未知の原因を有し得る。確立されたガイドラインに従った心不全の診断は、症状および兆候の存在、診断検査における低下した心機能の証拠、ならびに／または処置に対する有利な応答を含む基準に基づく。
【０１３３】
心不全の複数の分類が存在するが、２つの主なものは、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、および相補的な分類システムを有する米国心臓病学会／米国心臓協会（ＡＣＣ／ＡＨＡ）である。心不全の重症度は、対象の症状および心臓機能のレベルに依存する。
【０１３４】
本明細書に開示される技術の一態様は、心不全を有する対象をｒＡＡＶで処置する方法であり、または投与後の１２か月後またはより早期に、対象の心不全の分類の少なくとも１レベルの改善が存在する。例示的な目的で、対象は、本明細書に記載されるように、１つまたは複数の心不全分類システムにおいて、例えば、カテゴリーＩＶからカテゴリーＩＩもしくはカテゴリーＩＩＩ未満に、または例えばカテゴリーＩＩＩからカテゴリーＩもしくはカテゴリーＩＩ未満に進むと医師によって評価され得る。一部の実施形態では、ＮＹＨＡもしくはＡＨＡもしくはＡＣＣ分類が使用されるか、または当業者に公知の任意の他の比較の心不全分類システムが使用される。
Ｂ．心不全分類システム
【０１３５】
心不全分類システムは、当技術分野において周知であり、限定されるものではないが、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、ミネソタＬＩＶＩＮＧ ＷＩＴＨ ＨＥＡＲＴ ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、または２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、あるいはその改変された評価もしくは組合せ、または統合された評価が挙げられる。
（ｉ）ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）：
【０１３６】
本明細書に開示される方法において有用な１つの心不全分類システムは、ＮＹＨＡ分類システムである。ＮＹＨＡ（ニューヨーク心臓協会）は、症状の重症度に基づいて、ＨＦを、クラスＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、およびＩＶに分類する。Yancy CW, et al., Circulation 2013;128:e240-e327；Adapted from Dolgin M, Association NYH, Fox AC, Gorlin R, Levin RI, New York Heart Association. Criteria Committee. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9th ed. Boston, MA: Lippincott Williams and Wilkins; March 1, 1994；Original source: Criteria Committee, New York Heart Association, Inc. Diseases of the Heart and Blood Vessels. Nomenclature and Criteria for diagnosis, 6th edition Boston, Little, Brown and Co. 1964, p 114。
【０１３７】
医師は、対象の心不全を、その自己報告症状の重症度に従って分類することができる。ほとんどの場合に使用される分類システムは、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）機能分類である。４つのレベルの臨床分類を使用して、身体活動の間に経験する症状および制限

に従って、人々が分類される。症状の重症度は、正常な呼吸、息切れ、および／またはアンギナ（胸痛または不快感）と比較される。しばしば労作と呼ばれる身体活動の間の機能に基づく心不全の分類は、多くの場合に、予後の重要な指標である。ＮＹＨＡにおける４つのクラスまたはステージが存在し、これは以下の通りである。

【０１３８】

・クラスＩ（軽度）：身体活動の制限なし。通常の身体活動が、過度の疲労、動悸、呼吸困難（息切れ）を引き起こさない。

【０１３９】

・クラスＩＩ（軽度）：身体活動のわずかな制限。安静時には症状がない。通常の身体活動が、疲労、動悸、呼吸困難をもたらす。

【０１４０】

・クラスＩＩＩ（中等度）：身体活動の著しい制限。安静時には症状がない。通常未満の活動が、疲労、動悸、または呼吸困難を引き起こす。

【０１４１】

・クラスＩＶ（重度）：安静時でさえ心不全の症状が起こる。不快感なく任意の身体活動を行うことができない。任意の身体活動に取り掛かると、不快感が増加する。

【０１４２】

クラスＩおよびＩＩは、典型的には、軽度心不全と考えられるが、クラスＩＩＩおよびＩＶは、より重度のまたは進行性心不全と考えられる。人々は、それらが症状に基づいているので、これらのクラスの間を前後に移動し得る。患者が心不全の悪化を有すると、患者は、より多くの症状を有し、より高いクラスである可能性があるが、患者の症状が良好に制御されると、患者は、より低いクラスになる。

【０１４３】

【表１Ａ】

表 1A:ニューヨーク心臓協会(NYHA)分類クラス/ステージ:

NYHA クラス	症状
I	身体活動の制限なし。通常の身体活動が、過度の疲労、動悸、呼吸困難(息切れ)を引き起こさない。
II	身体活動のわずかな制限。安静時には症状がない。通常の身体活動が、疲労、動悸、呼吸困難をもたらす。
III	身体活動の著しい制限。安静時には症状がない。通常未満の活動が、疲労、動悸、または呼吸困難を引き起こす。
IV	不快感なくいかなる身体活動も続けることができない。安静時に心不全の症状。任意の身体活動に取り掛かると、不快感が増加する。

【０１４４】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＮＹＨＡクラスＩＩＩの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも多い月後に、ＮＹＨＡクラスＩＩの患者に改善する。他の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＮＹＨＡクラスＩＩの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも多い月後に、ＮＹＨＡクラスＩの患者に改善する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＮＹＨＡクラスＩＩＩの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも

多い月後に、ＮＹＨＡクラスＩの患者に改善する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＮＹＨＡクラスＩＶの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも多い月後に、ＮＹＨＡクラスＩＩＩの患者またはＮＹＨＡクラスＩＩの患者に改善する。

（ｉｉ）ＡＣＣ／ＡＨＡ分類：

【０１４５】

本明細書に開示される方法において有用な１つの心不全分類システムは、ＡＣＣ／ＡＨＡ分類システムである。米国心臓病学会（ＡＣＣ）および米国心臓協会（ＡＨＡ）は、一緒に取り組んで、ＮＹＨＡアプローチを補完する別の分類システムを作り出した。これは、ＨＦを未だ有していないが、それを発生する高いリスクがある人を考慮する。

【０１４６】

ＡＣＣ／ＡＨＡは、疾患進行に対して心不全を分類し、ＨＦの症状および兆候、ならびに心構造変化の存在に従って、ＨＦをステージＡ、Ｂ、Ｃ、Ｄに分類する。例えば、Yancy CW, et al., Circulation 2013;128: e240-e327、およびHunt SA, et al., Circulation 2001;104:2996-3007を参照されたい。

【０１４７】

米国心臓病学会／米国心臓協会（ＡＣＣ／ＡＨＡ）病期分類システムは、４つのステージを定義する。

【０１４８】

・ステージＡ：心不全の高いリスクがあるが、構造的心臓疾患または心不全の症状なし（心不全前）

【０１４９】

・ステージＢ：構造的心臓疾患であるが、心不全の症状なし（心不全前）

【０１５０】

・ステージＣ：構造的心臓疾患および心不全の症状

【０１５１】

・ステージＤ：専門的な介入を必要とする難治性心不全

【０１５２】

【表１Ｂ】

表 1B: AHA/ACC 2013-心臓の病期分類システム

ステージ	説明	例
A	心不全のリスク因子が存在するが、心臓疾患も症状もない。管理による介入が症状への進行を明らかにし得る「心不全前」を包含する。	CAD (冠動脈疾患)、糖尿病、高血圧症、メタボリックシンドローム、肥満、心毒物またはアルコールの使用、心筋症の家族歴、脳血管障害 (CVA)、リウマチ熱の個人歴。
B	構造的心臓疾患を有する人であるが、心不全の兆候も症状も存在しない (症状が生じる前の心臓の構造的変化) NYHA クラス I	左室肥大 (LVH)または左室駆出率 (LVEF)の低下、無症候性心臓弁膜症、以前の心筋梗塞
C	心不全の以前のまたは現在の症状を有する構造的心臓疾患を有する人 (症状を有するか、または生じている) NYHA クラス II および III	呼吸困難 (息切れ)、疲労、運動不能または運動耐容量の低下を伴う公知の構造的心臓疾患
D	進行性心不全、および標準処置による管理が困難な重度の症状もしくは重度の症状を伴う持続性心不全を有する人、または積極的な薬物治療を必要とする患者。 NYHA クラス IV	最大限の薬物治療にもかかわらず、安静時の顕著な症状、および入院の繰り返し

【０１５３】

ステージは、進行性心不全の発生を通して心不全を発生するリスクのレベルを表す。ステージは、進行性であり、処置計画と相関する。心不全が悪化すると、状態が次のステージに進行する。ステージがもとに戻ることはない。処置により、ステージの進行は遅延し得る。診断的考慮事項には、心不全がいつ始まるか、どこで発生するか、機能がどのように損なわれるか、処置により有効に管理することができるか否かを評価することが含まれる。

【０１５４】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＡＣＣ／ＡＨＡステージＤの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも多い月後に、ＡＣＣ／ＡＨＡステージＣの患者に改善する。他の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＡＣＣ／ＡＨＡステージＣの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも多い月後に、ＡＣＣ／ＡＨＡステージＢの患者に改善する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＡＣＣ／ＡＨＡステージＤの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも多い月後に、ＡＣＣ／ＡＨＡステージＣもしくはＢの患者またはＡＣＣ／ＡＨＡステージＡの患者に改善する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶ投与を受けているＡＣＣ／ＡＨＡステージＣの患者は、ｒＡＡＶ用量の投与後、１か月後、または２か月後、または３か月後、または４か月後、または５か月後、または６か月後、または７か月後、または８か月後、または９か月後、または１２か月

後、またはそれよりも多い月後に、ＡＣＣ／ＡＨＡステージＢまたはステージＡの患者に改善する。

【０１５５】

【表１Ｃ】

表 1C: NYHA 分類および ACC/AHA ガイドライン(Haselhuhn et al., Cleveland Clinic Journal of Medicine February 2019, 86 (2) 123-139 より入手)の比較

NYHA クラス I	NYHA クラス II	NYHA クラス III	NYHA クラス IV
身体的制限なし	身体活動のわずかな制限	身体活動の著しい制限	安静時に症状
ステージ A	ステージ B	ステージ C	ステージ D
心不全のリスクがある患者 構造的疾患なし	構造的疾患 心不全症状なし	構造的疾患 心不全症状	末期疾患

【０１５６】

一部の実施形態では、心不全の管理のためのＡＣＣＦ／ＡＨＡガイドラインを使用することもでき、これは、米国家庭医学会、米国胸部専門医学会、および国際心肺移植学会と共同して開発され、Yancy, Clyde W., et al. "2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America." Journal of the American College of Cardiology 70.6 (2017): 776-803に開示されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。心不全に対する２０１３年ＡＣＣ／ＡＨＡガイドラインの更新に焦点を合わせた２０１７年は、予防に対する重要な推奨、新規バイオマーカーの使用、駆出率が保たれた心不全（ＨＦｐＥＦ）、ならびに高血圧症、鉄欠乏症および睡眠呼吸障害などの併存疾患を含む。急性非代償性心不全の管理のための可能性がある関連事項も探索される（例えば、Haselhuhn et al., Cleveland Clinic Journal of Medicine February 2019, 86 (2) 123-139を参照されたい）。

（ｉｉｉ）２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）

【０１５７】

２０１６年欧州心臓病学会ガイドラインは、参照により本明細書に組み込まれるPiepoli et al., Eur Heart J. 2016 Aug 1;37(29):2315-2381に開示されており、ＮＹＨＡまたはＡＣＣ／ＡＨＡガイドラインの代替としてまたはそれを補完するために、本明細書に開示されるＨＦを処置する方法における使用のために包含される。

（ｉｖ）日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン

【０１５８】

日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドラインは、Yamamoto K, et al., Japanese Heart Failure Society 2018 Scientific Statement on Nutritional Assessment and Management in Heart Failure Patients. Circ J. 2020 Jul 22;84(8):1408-1444に開示されており、ＮＹＨＡまたはＡＣＣ／ＡＨＡガイドラインの代替としてまたはそれを補完するために、本明細書に開示されるＨＦを処置する方法における使用のために包含される。

（ｖ）カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）スコア

【０１５９】

ＫＣＣＱスコアは、０～１００で見積もられ、しばしば２５ポイントの範囲でまとめられ、スコアは、Spertus JA et al., JACC, Volume 76, Issue 20, 17 November 2020, Pages 2379-2390に記載されるように、以下の通り、健康状態を表す：０～２４：非常に不良～不良；２５～４９：不良～まずまず；５０～７４：まずまず～良好；および７５～１００：良好～極めて良好。臨床診療および治験において健康

状態を定量化する最も一般的な手段は、ＮＹＨＡ機能クラスであるので、どのＫＣＣＱスコアがどのＮＹＨＡ機能クラスと相関するかを理解することは価値がある。０～２４のスコアを有する患者の約８５％は、ＮＹＨＡ機能クラスＩＩＩ／ＩＶであり；２５～４９のスコアを有する患者の６０％は、ＮＹＨＡ機能クラスＩＩＩであり；５０～７５のスコアを有する患者の半分は、ＮＹＨＡ機能クラスＩＩＩであり、もう半分はＮＹＨＡ機能クラスＩＩであり；７５を上回るスコアを有する患者の８０％超は、ＮＹＨＡ機能クラスＩまたはＩＩである。

（ｖｉ）他の心不全分類システム

【０１６０】

駆出率：左室駆出率に基づいて、ＨＦｒＥＦ、ＨＦｍｒＥＦ、ＨＦｐＥＦにＨＦを分類する。Ponikowski P, et al., Eur J Heart Fail 2016;18:891-975。

【０１６１】

病因論：Yancy CW, et al., Circulation 2013;128:e240-e327およびPonikowski P, et al., Eur J Heart Fail 2016;18:891-975に開示されるように、ＨＦのステージの特定の病因論、例えば、虚血性／非虚血性、弁、高血圧、浸潤性心筋症、例えば、心アミロイドーシス、周産期心筋症、ウイルス性心筋炎、化学療法誘発性心筋症にＨＦを分類する。

【０１６２】

ＭＯＧＥＳ：形態機能的表現型（Ｍ）、器官関与（Ｏ）、遺伝的継承パターン（Ｇ）、遺伝的欠陥または基礎疾患／物質を含む病因学的アノテーション（Ｅ）、および機能状態（Ｓ）のレベルにＨＦを分類する。例えば、Arbustini E, et al., The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. J Am Coll Cardiol 2014;64:304-318を参照されたい。

【０１６３】

ＩＮＴＥＲＭＡＣＳ（進行性ＨＦのプロファイル）：進行性ＨＦ治療のために考慮される患者に対する症状、機能的能力、血行動態安定性によるプロファイル１から７としてＨＦを分類する。例えば、Stevenson LW, et al., INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current picture. J Heart Lung Transplant 2009;28:535-541を参照されたい。

（ｖｉｉ）クオリティオブライフ（ＱＯＦ）質問票：

【０１６４】

心不全の評価は、例えば、ミネソタＬＩＶＩＮＧ ＷＩＴＨ ＨＥＡＲＴ ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ、またＭＬＷＨＦ、ＬＨＦＱ、ＭＱＯＬとも称される））、（Rector et al.,）；慢性心不全質問票（ＣＨＦＱ、ＣＨＱ）（Guyatt et al.,1989）；重度心不全のためのクオリティオブライフ質問票（ＱＬＱ－ＳＨＦまたはＱＱＬ－ＳＨＦ）（Wiklund et al. ,1987）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）（Spertus et al,1999）、および左室機能障害質問票－３６（ＬＶＤ－３６）（O'Learly et al. ,1998）のいずれかから選択される各種の自己評価質問票を使用してカテゴリー化または分類することができ、これらのそれぞれは、Garin,Olatz,et al. "Disease-specific health-related quality of life questionnaires for heart failure: a systematic review with meta-analyses." Quality of Life Research 18.1(2009): 71-85、およびGarin,O. ,et al. Assessing health-related quality of life in patients with heart failure: a systematic,standardized comparison of available measures. Heart Fail Rev 19,359-367(2014)に概説されており、これらのそれぞれは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１６５】

一部の実施形態では、クオリティオブライフ（ＱＯＬ）質問票の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＱＯＦ質問票スコアと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも６か月または少なくとも１２か月で測定されたＱＯ

Ｆ質問票スコアの１０ポイントの減少または１０ポイントよりも大きな減少である。一部の実施形態では、クオリティオブライフ（ＱＯＬ）質問票スコアの臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月、少なくとも６か月または少なくとも１２か月で測定されたＱＯＬ質問票スコア、例えば、ＫＣＣＱスコアまたはＭＬＷＨＦスコアの１０ポイントの減少、または１１ポイントの減少、または１２ポイントの減少、または１３ポイントの減少、または１４ポイントの減少、または１５ポイントの減少、または１６ポイントの減少、または１７ポイントの減少、または１８ポイントの減少、または１９ポイントの減少、または２０ポイントの減少、または２１ポイントの減少、または２２ポイントの減少、または２３ポイントの減少、または２４ポイントの減少、または２５ポイントの減少、または２５より高いポイントの減少である。

（ｖｉ）処置の評価のための測定

【０１６６】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるＨＦを処置する方法は、患者におけるベースラインレベルからの少なくとも１つのパラメーターの改善であり、少なくとも１つのパラメーターは、（ｉ）駆出率（ＥＦ、または左室駆出率もしくはＬＶＥＦと互換可能に使用される）、（ｉｉ）収縮終期容積（ＥＳＶ）、（ｉｉｉ）駆出率（ＥＦ）および内径短縮率（ＦＳ）から選択される心収縮性、（ｉｖ）拡張終期容積（ＤＶ）および収縮終期容積（ＥＳＶ）のいずれかから選択される心容積、（ｉｖ）６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、運動および最大ＶＯ２（最大ｐＶＯ２または心筋酸素消費量（ＭＶＯ２）（ｍｌ／ｋｇ／分で測定される）とも称される）のいずれかから選択される機能基準、（ｖ）ＢＮＰレベル、（ｖｉ）プロ－ＢＮＰレベル、（ｖｉｉ）バイオマーカーレベルであって、トロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、または肝臓トランスアミナーゼの群から選択される、バイオマーカーレベル、（ｖｉｉｉ）患者報告結果（ＰＲＯ）、例えば、症状の低減、健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＯＬ）、または患者が知覚する健康状態、ならびに（ｉｘ）心不全に起因する死亡リスク、心不全症状に起因する入院の減少、またはＨＦの処置のための治療的介入のいずれかの減少から本質的になる群から選択される。

【０１６７】

一部の実施形態では、収縮終期容積（ＥＳＶ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、または少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの１０％の減少または１０％よりも大きな減少である。一部の実施形態では、ＥＳＶの臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月、または少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの１０％の減少、または約１１％、または約１２％、または約１３％、または約１４％、または約１５％、または１５％よりも大きな減少である。一部の実施形態では、収縮終期容積（ＥＳＶ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、または少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの２０ｍｌの減少または２０ｍｌよりも大きな減少である。

（ａ）ＢＮＰレベルおよびＮＴ－プロＢＮＰレベル

【０１６８】

一部の実施形態では、本明細書に開示される処置の方法は、例えば、投与後少なくとも約１か月、または２か月、または３か月、または４か月、または５か月、または６か月、または９、または１２か月、またはそれよりも長くなどの事前に規定された期間後に対象から得られた血清におけるバイオマーカー、例えば、循環ナトリウム利尿ペプチド（ＢＮＰまたはＮＴ－プロＢＮＰのいずれか）レベルなどを測定することによって評価することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示される処置または投与の方法は、投与前

、および約４～６か月の期間後、または投与後の６か月後、または投与後６か月よりも長く後の血清におけるＢＮＰおよび／またはＮＴ－プロＢＮＰレベルを測定することによって評価することができる。

【０１６９】

ＮＴ－プロＢＮＰレベルを測定する方法は、当技術分野において周知である。対象からの血清におけるＢＮＰのレベルが、１００ｐｇ／ｍｌに等しいか、もしくはそれ未満である場合、または対象からの血清におけるＮＴ－プロＢＮＰが、３００ｐｇ／ｍｌに等しいか、もしくはそれ未満である場合、急性心不全（ＡＨＦ）は、起こりそうにない。ＨＦの診断は、対象からの血清におけるＢＮＰのレベルが、＞４００ｐｇ／ｍｌである場合、または対象からの血清におけるＮＴ－プロＢＮＰが、５０歳未満の対象について＞４５０ｐｇ／ｍｌ、もしくは５０～７５歳の間の対象について＞９００ｐｇ／ｍｌ、もしくは＞７５歳の対象について＞１８００ｐｇ／ｍｌである場合、可能性がある。

【０１７０】

したがって、一部の実施形態では、投与後少なくとも６か月の処置された患者の血清における４００ｐｇ／ｍｌに等しいか、またはそれ未満のＢＮＰレベルは、有効な処置を示す。

【０１７１】

一部の実施形態では、投与後少なくとも６か月の５０歳未満の処置された患者の血清における４５０ｐｇ／ｍｌに等しいか、またはそれ未満のＮＴ－プロＢＮＰレベルは、有効な処置を示す。一部の実施形態では、投与後少なくとも６か月の５０～７５歳の処置された患者の血清における９００ｐｇ／ｍｌに等しいか、またはそれ未満のＮＴ－プロＢＮＰレベルは、有効な処置を示す。一部の実施形態では、投与後少なくとも６か月の≧７５歳の処置された患者の血清における１７００ｐｇ／ｍｌに等しいか、またはそれ未満のＮＴ－プロＢＮＰレベルは、有効な処置を示す。

【０１７２】

一部の実施形態では、ＮＴ－プロＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前に測定されたＮＴ－プロＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、少なくとも３か月、または少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＮＴ－プロＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルの３５％の減少または３５％よりも大きな減少である。一部の実施形態では、ＮＴ－プロＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前に測定されたＮＴ－プロＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、または少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＮＴ－プロＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルの３５％の減少、または約３６％、または約３７％、または約３８％、または約３９％、または約４０％の減少、または約４０～４５％、または約４６～５０％、または５０％よりも大きな減少である。

【０１７３】

一部の実施形態では、投与前のＢＮＰまたはＮＴ－プロＢＮＰレベルと比較して、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月、または少なくとも約６か月の対象の血清におけるＢＮＰレベルまたはＮＴ－プロＢＮＰレベルの約１０％、または約１５％、または約２０％、または約２５％、または約３０％、または＞３０％の減少は、有効な処置を示す。一部の実施形態では、投与前のＢＮＰまたはＮＴ－プロＢＮＰレベルと比較して、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月、または少なくとも約６か月の対象におけるＢＮＰまたはＮＴ－プロＢＮＰの血清レベルの約０．１倍、０．２倍、０．３倍、０．４倍、０．５倍、０．６倍、０．７倍、０．８倍、０．９倍、１．０倍、１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、または２．０倍、または２．０倍よりも高い減少は、有効な処置を示す。

【０１７４】

一部の実施形態では、有効な処置は、（任意の年齢の）対象におけるＢＮＰの血清レベ

ルが、投与前のＢＮＰレベルと比較して、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月または少なくとも約６か月で、４００ｐｇ／ｍｌ未満、または約３５０ｐｇ／ｍｌ、または約３００ｐｇ／ｍｌ、または約２５０ｐｇ／ｍｌ、または約２００ｐｇ／ｍｌ、または約１５０ｐｇ／ｍｌ、または約１００ｐｇ／ｍｌ、または１００ｐｇ／ｍｌ未満である場合と考えられる。

【０１７５】

一部の実施形態では、有効な処置は、５０歳未満の年齢の対象におけるＮＴ－プロＢＮＰの血清レベルが、投与前のＮＴ－プロＢＮＰレベルと比較して、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月または少なくとも約６か月で、４５０ｐｇ／ｍｌ未満、または約４００ｐｇ／ｍｌ、または約３５０ｐｇ／ｍｌ、または約３００ｐｇ／ｍｌ、または約２５０ｐｇ／ｍｌ、または約２００ｐｇ／ｍｌ、または約１５０ｐｇ／ｍｌ、または約１００ｐｇ／ｍｌ、または１００ｐｇ／ｍｌ未満である場合と考えられる。一部の実施形態では、処置される患者の年齢は、５０歳未満、または５０～７５歳の間、または≧７５歳である。

【０１７６】

一部の実施形態では、有効な処置は、５０～７５歳の間の年齢の対象におけるＮＴ－プロＢＮＰの血清レベルが、投与前のＮＴ－プロＢＮＰレベルと比較して、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月または少なくとも約６か月で、９００ｐｇ／ｍｌ未満、または約８５０ｐｇ／ｍｌ、または約８００ｐｇ／ｍｌ、または約７５０ｐｇ／ｍｌ、または約７００ｐｇ／ｍｌ、または約６５０ｐｇ／ｍｌ、または約６００ｐｇ／ｍｌ、または約５５０ｐｇ／ｍｌ、または約５００ｐｇ／ｍｌ、または約４５０ｐｇ／ｍｌ、または４５０ｐｇ／ｍｌ未満である場合と考えられる。一部の実施形態では、処置される患者の年齢は、５０歳未満、または５０～７５歳の間、または≧７５歳である。

【０１７７】

一部の実施形態では、有効な処置は、≧７５歳の年齢の対象におけるＮＴ－プロＢＮＰの血清レベルが、投与前のＮＴ－プロＢＮＰレベルと比較して、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月または少なくとも約６か月で、約１８００ｐｇ／ｍｌ未満、または約１７００ｐｇ／ｍｌ、または約１６００ｐｇ／ｍｌ、または約１５００ｐｇ／ｍｌ、または約１４００ｐｇ／ｍｌ、または約１３００ｐｇ／ｍｌ、または約１２００ｐｇ／ｍｌ、または約１１００ｐｇ／ｍｌ、または約１０００ｐｇ／ｍｌ、または約９００ｐｇ／ｍｌ、または約８００ｐｇ／ｍｌ、または約７００ｐｇ／ｍｌ、または約６００ｐｇ／ｍｌ、または約５００ｐｇ／ｍｌ、または約４５０ｐｇ／ｍｌ、または４５０ｐｇ／ｍｌ未満である場合と考えられる。一部の実施形態では、処置される患者の年齢は、５０歳未満、または５０～７５歳の間、または≧７５歳である。

【０１７８】

一部の実施形態では、ＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前に測定されたＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも６か月または少なくとも１２か月で測定されたＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルの４０％の減少または４０％よりも大きな減少である。一部の実施形態では、ＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前に測定されたＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、または少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＢＮＰ（ｐｇ／ｍｌ）のレベルの４０％の減少、または約４１％、または約４２％、または約４３％、または約４４％、または約４５％、または約４５～５０％、または約５１～５５％の減少、または５６～６０％の減少、または６０％よりも大きな減少である。

（ｂ）駆出率（ＥＦ）（左室駆出率（ＬＶＥＦ）とも互換可能に使用される）

【０１７９】

一部の実施形態では、心肺運動負荷試験は、当技術分野において公知の方法に従って、修正ブルースプロトコールを使用して評価することができる。左室駆出率（ＬＶＥＦ）の心エコー評価におけるベースラインからの観察および変化を使用して、処置を評価するこ

ともでき、ＬＶＥＦは、以下の時点で評価することができる：投与前、投与１８～２４時間後、４週間後、約６か月、および投与後約１２か月。

【０１８０】

一部の実施形態では、駆出率（ＥＦ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前の駆出率（ＥＦ）と比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定された駆出率の５％の増加または５％よりも大きな増加である。一部の実施形態では、駆出率（ＥＦ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前の駆出率（ＥＦ）と比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定された駆出率の５％の増加、または約６％、または約７％、または約８％、または約９％、または約１０％、または１０％よりも大きな増加である。

【０１８１】

一部の実施形態では、改善された機能は、媒体のみを受けているマッチした対照対象の心機能と比較した任意の量の改善であり得る。例えば、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶベクターの投与後少なくとも３か月または少なくとも６か月のＬＶＥＦの改善（すなわち、増加）は、ｒＡＡＶ投与時またはその前に測定されたＬＶＥＦと比較して、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。

【０１８２】

別の例では、処置後のＥ／Ａ比の改善は、ｒＡＡＶ投与時またはその前に測定されたＥ／Ａ比と比較して、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。さらに別の例では、左房容積（ＬＡＶ）の改善は、ｒＡＡＶ投与時またはその前に測定されたＬＡＶのレベルと比較して、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。

【０１８３】

一部の実施形態では、ＬＶＥＦが、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与時および／またはその前に測定されたＬＶＥＦのレベルと比較して、≧５０％、または少なくとも５５％、または少なくとも６０％、または６０％よりも高く保たれる場合、ｒＡＡＶベクターおよび投与方法は、有効な処置と考えられる（例えば、Dokainish, Glob Cardiol Sci Pract. 2015; 2015: 3を参照されたい）。典型的には、正常なＬＶＥＦは、５０％～７５％の範囲であり、女性について５３％、男性について５２％を下回るＬＶＥＦは、低いと考えられ、４９％もしくはそれよりも低い、または約４５％、または約４０％、または約３６％、または３６～４９％の間のＬＶＥＦを有する対象は、心不全を示す。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与時またはその前に測定されたＬＶＥＦと比較して、少なくとも１％、または約２％、または約３％、または約４％、または約５％、または約６％、または約７％、または約８％、または約９％、または約１０％、または約１５％、または約２０％、または約３５％、または約４０％、または約４５％、または約５０％、または５０％よりも大きい対象において測定されたＬＶＥＦの増加は、有効な処置を示す。例えば、実例となる実施形態では、対象が、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶベクターの投与時またはその前に測定された３６％のＬＶＥＦを有する場合、ｒＡＡＶの投与後少なくとも３か月または少なくとも約６か月で測定された、少なくとも１％～３７％のＬＶＥＦ、または約２％～３８％のＬＶＥＦ、または約３％～３９％のＬＶＥＦ、または約４％～４０％のＬＶＥＦ、または約５％～４１％のＬＶＥＦ、または約６％～４２％のＬＶＥＦ、または約７％～４３％のＬＶＥＦ、または約８％～４４％のＬＶＥＦ、または約９％～４５％のＬＶＥＦ、または約１０％～４６％のＬＶＥＦ、または約１５％～５１％のＬＶＥＦ、または約２０％～５６％のＬＶＥＦ、または約２５％～６１％のＬＶＥＦというＬＶＥＦの増加は、有効な処置

を示す。

（ｃ）収縮終期容積（ＥＳＶ）／左室収縮終期期径（ＬＶＥＳＤ）および拡張終期容積（ＤＶ）／左室拡張終期径（ＬＶＥＤＤ）

【０１８４】

一実施形態では、方法は、心リモデリングを減弱するための本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与も含む。心リモデリングは、例えば、心エコー検査などの方法を含む当技術分野において公知の任意の方法によって測定され得る。例として、左室チャンバーサイズは、心リモデリングのための尺度として使用され得る。心リモデリングの減弱の評価では、左室のサイズの増加の減弱は、本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与前の左室サイズと比較した任意の量の減弱であり得る。

【０１８５】

一部の実施形態では、収縮終期容積（ＥＳＶ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの１０％の減少または１０％よりも大きな減少である。一部の実施形態では、ＥＳＶの臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの１０％の減少、または約１１％、または約１２％、または約１３％、または約１４％、または約１５％、または１５％よりも大きな減少である。

【０１８６】

一部の実施形態では、収縮終期容積（ＥＳＶ）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの２０ｍｌの減少または２０ｍｌよりも大きな減少である。一部の実施形態では、ＥＳＶの臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前のＥＳＶと比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたＥＳＶの２０ｍｌの減少、または約２２ｍｌ、または約２３ｍｌ、または約２４ｍｌ、または約２５ｍｌ、または約２６ｍｌ、または約２７ｍｌ、または約２８ｍｌ、または約２９ｍｌ、または約３０ｍｌ、または３０ｍｌよりも大きな減少である。

【０１８７】

一部の実施形態では、左室のサイズの増加の減弱は、媒体のみを受けているマッチした対照対象の左室サイズと比較した任意の量の減弱であり得る。左室チャンバーサイズは、例えば、左室拡張終期径（ＬＶＥＤＤ）または左室収縮終期期径（ＬＶＥＳＤ）をアッセイすることによって測定され得る。ある例では、本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターでの投与後少なくとも３か月または少なくとも６か月のＬＶＥＤＤの変化は、ｒＡＡＶ投与時またはその前に測定されたレベルと比較して、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。別の例では、本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターでの投与後少なくとも３か月または少なくとも６か月のＬＶＥＳＤの変化は、ｒＡＡＶ投与の時またはその前に測定されたＬＶＥＳＤレベルと比較して、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。

（ｄ）最大ＶＯ２（最大ｐＶＯ２または心筋酸素消費量（MVO_2）とも称される）

【０１８８】

一実施形態では、方法は、うっ血性心不全を有する対象における運動能力を改善するための本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与も含

む。運動能力の改善は、当技術分野において公知の任意の方法によって測定され得る。例えば、運動能力の改善は、ピークVO_2取り込み、または運動能力とピーク乳酸との比をアッセイすることによって測定され得る。運動の間のピーク酸素取り込みは、例えば、間接熱量測定によって測定され得る。ある例では、本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターでの投与後少なくとも３か月または少なくとも６か月で測定された運動能力とピーク乳酸との比の変化は、ｒＡＡＶの投与時またはその前に測定されたピーク乳酸比と比較して、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。

【０１８９】

一部の実施形態では、心筋酸素消費量（MVO_2）の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前に測定されたMVO_2と比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたMVO_2の１．５ｍｌ／ｋｇ／分の増加または１．５ｍｌ／ｋｇ／分よりも大きな増加である。一部の実施形態では、MVO_2の臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前に測定されたMVO_2と比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定されたMVO_2の１．５ｍｌ／ｋｇ／分の増加、１．６ｍｌ／ｋｇ／分、または約１．７ｍｌ／ｋｇ／分、または約１．８ｍｌ／ｋｇ／分、または約１．９ｍｌ／ｋｇ／分、または約２．０ｍｌ／ｋｇ／分、または約２．１ｍｌ／ｋｇ／分、または２．１ｍｌ／ｋｇ／分よりも大きな増加である。

【０１９０】

一部の実施形態では、本明細書に開示される処置の方法は、ｒＡＡＶベクターの投与後少なくとも約３か月、または４か月、または５か月、または６か月、または６～１０か月の間、または１２か月で測定されるピーク酸素取り込み（VO_2）を測定することによって評価することができる。一部の実施形態では、中程度のpVO_2は、処置の効果を示し、すなわち、３か月にわたるピークVO_2の中程度の増加は、より好ましい結果に関連する。したがって、処置された対象についてのピークVO_2の変化のモニタリングを使用して、ｒＡＡＶベクターおよび投与の方法の予後および治療効果を評価することができる（Swank et al., Circulation: Heart Failure, Volume 5, Issue 5, September 2012, Pages 579-585）。他の有意な予測因子について調整されたピークVO_2の６％ごとの増加は、原因を問わない死亡率および原因を問わない入院の主要エンドポイントのリスクの５％の低下（危険比＝０．９５；ＣＩ＝０．９３～０．９８；Ｐ＜０．００１）、心血管系死亡率または心血管系入院までの時間の二次エンドポイントのリスクの４％の低下（危険比＝０．９６；ＣＩ＝０．９４～０．９９；Ｐ＜０．００１）、心血管系死亡率または心不全入院のリスクの８％の低下（危険比＝０．９２；ＣＩ＝０．８８～０．９６；Ｐ＜０．００１）、および原因を問わない死亡率の７％の低下（危険比＝０．９３；ＣＩ＝０．９０～０．９７；Ｐ＜０．００１）に関連する。一部の実施形態では、投与後ピークVO_2は、ベースラインピークVO_2から約２％、または約３％、または約４％、または約５％、または約６％、または約７％、または約８％、または約９％、または約１０％、または約１１％、または約１２％、または約１３％、または約１４％、または約１５％、または約１６％、または約１７％、または約１８％、または約１９％、または約２０％、または約２１％、または約２２％、または約２３％、または約２４％、または約２５％、または約２６％、または約２７％、または約２８％、または約２９％、または約３０％増加する。一部の実施形態では、投与後ピークVO_2は、ベースラインピークVO_2から少なくとも２％増加する。一部の実施形態では、投与後ピークVO_2は、ベースラインピークVO_2から少なくとも５％増加する。他の実施形態では、投与後ピークVO_2は、ベースラインピークVO_2から少なくとも１０％増加する。さらに別の実施形態では、投与後ピークVO_2は、ベースラインピークVO_2から少なくとも２０％増加する。ある特定の実施形態では、投与後ピークVO_2は、ベースラインピークVO_2か

ら少なくとも３０％増加する。一部の実施形態では、投与後ピークＶＯ$_2$は、ベースラインピークＶＯ$_2$から約１．１倍、または約１．１５倍、または約１．２倍、または約１．２５倍、または約１．３倍、または約１．３５倍、または約１．４倍、または約１．４５倍、または約１．５倍、または約１．５５倍、または約１．６倍、または約１．６５倍、または約１．７倍、または約１．７５倍、または約１．８倍、または約１．８５倍、または約１．９倍、または約１．９５倍、または約２倍、または約２．５倍、または約３倍、または約３．５倍、または約４倍、または約４．５倍、または約５倍、または約５．５倍、または約６倍、または約６．５倍、または約７倍、または約７．５倍、または約８倍、または約８．５倍、または約９倍、または約９．５倍、または約１０倍増加する。ある特定の実施形態では、投与後ピークＶＯ$_2$は、ベースラインピークＶＯ$_2$から少なくとも１．１倍、または少なくとも１．２倍、または少なくとも１．５倍、または少なくとも２倍、または少なくとも２．５倍、または少なくとも３倍、または少なくとも３．５倍、または少なくとも４倍、または少なくとも４．５倍、または少なくとも５倍、または少なくとも６倍、または少なくとも６．５倍、または少なくとも７倍、または少なくとも８倍、または少なくとも９倍、または少なくとも１０倍、または少なくとも１１倍、または少なくとも１２倍、または少なくとも１３倍、または少なくとも１４倍、または少なくとも１５倍、または少なくとも１６倍、または少なくとも１７倍、または少なくとも１８倍、または少なくとも１９倍、または少なくとも２０倍、または少なくとも２２倍、または少なくとも２５倍、または少なくとも３０倍、または少なくとも３５倍、または少なくとも４０倍、または少なくとも４５倍、または少なくとも５０倍増加する。

【０１９１】

うっ血性心不全に関連する改善された心機能の評価において、改善された機能は、本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与前の心機能と比較した任意の量の改善であり得る。

（ｅ）６分間歩行試験（６ＭＷＴ）

【０１９２】

一部の実施形態では、本明細書に開示される処置の方法は、二次転帰の尺度を測定することによって、例えば、以下の時点：投与前、投与後１８～２４時間、４週間後、約６か月、および投与後約１２か月で６分間歩行距離試験（６分間歩行試験（６ＭＷＴ）とも称される）において対象を評価することによって評価することができる。ある特定の実施形態では、６分間歩行試験（６ＭＷＴ）は、上記の時点のいずれかで行うことができ、ベースラインから少なくとも１５ｍ、または少なくとも２０ｍ、または少なくとも２５ｍ、または少なくとも３０ｍ、または少なくとも４０ｍ、または少なくとも５０ｍ、または少なくとも５５ｍ、または少なくとも６０ｍ、または少なくとも６５ｍ、または少なくとも７０ｍ、または少なくとも７５ｍ、または少なくとも８０ｍ、または少なくとも８５ｍ、または少なくとも９０ｍ、または少なくとも１００ｍ、または少なくとも１２０ｍ、または少なくとも１５０ｍ、または少なくとも１７０ｍ、または少なくとも１８０ｍ、または少なくとも２００ｍ、またはそれよりも大きく改善される。

【０１９３】

一部の実施形態では、６ＭＷＴの臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前の６ＭＷＴで歩行した距離と比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定された６ＭＷＴで歩行した距離の５０メートルの増加または５０メートルよりも大きな増加である。一部の実施形態では、６ＭＷＴの臨床的に重要な変化は、対象へのｒＡＡＶの投与前の６ＭＷＴで歩行した距離と比較して、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの投与後少なくとも１か月、または少なくとも３か月、少なくとも６か月、または少なくとも１２か月で測定された６ＭＷＴで歩行した距離の５０メートルの増加、または約６０ｍ、または約７０ｍ、または約８０ｍ、または約９０ｍ、または約１００ｍ、または約１１０ｍ、または約１２０ｍ、または約１３０ｍ、または約１４０ｍ、または約１５０ｍの増加、または１５０メートルよりも大きな増加である。

【０１９４】
そのような６ＭＷＴは、Giannitsi et al., Ther Adv Cardiovas Disorders, 2019, 2019; 13: 1753944719870084に開示される方法に従って実施することができ、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０１９５】
（ｆ）内径短縮率（ＦＳ）および駆出率（ＥＦ）を含む心収縮性
【０１９６】
一実施形態では、方法は、心収縮性を改善するための本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与も含む。心収縮性の改善は、収縮に利用可能な心筋細胞の数、心筋細胞の収縮能力、またはその両方の任意の増加を含み得る。心収縮性の改善を評価するために、任意の評価の様式が使用され得る。例えば、心拍出量の増加もしくは心拍数の減少、またはその両方などの臨床観察は、増加した心収縮性の決定に至り得る。あるいは、心臓のｉｎ　ｖｉｖｏで増加した収縮性は、左室の増加した内径短縮率の決定によって評価され得る。左室の内径短縮率は、心エコー検査装置などの任意の利用可能な手段によって観察され得る。
【０１９７】
増加した心収縮性の評価において、左室の内径短縮率の増加は、本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与前の内径短縮率と比較した任意の量の増加であり得る。例えば、本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶベクターでの投与後少なくとも３か月または少なくとも６か月で測定された短縮の増加は、ｒＡＡＶの投与時またはその前に測定された短縮のレベルと比較して、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、または約２００％よりも大きくあり得る。さらなる態様では、予防的および治療的方法が提供される。急性または慢性の基礎に対する処置が企図される。加えて、急性の基礎に対する処置は、そのように示される場合、慢性処置に拡張され得る。一態様では、それを必要とする対象におけるうっ血性心不全に関連する状態の処置または予防のための方法が提供される。方法は、一般に、うっ血性心不全を予防または回復させるのに有効な本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの量を対象に投与することを含み、うっ血性心不全に関連する状態は、それによって改善する。
【０１９８】
一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、有効量で、対象の心臓において本明細書に開示されるＩ－１タンパク質またはその機能的バリアントを発現して、既存の心不全を有する対象において、心収縮性を増加させ、心リモデリングに関連する形態学的悪化を低下させる。一部の実施形態では、収縮性の増加は、増加した筋細胞短縮（筋細胞の長さの変化）、筋細胞の短縮（ｄＬ／ｄｔ）および再伸長（－ｄＬ／ｄｔ）の割合、弛緩についてのより低い時定数（ｔａｕ（．ｔａｕ．））、ならびに加速されたカルシウムシグナル減衰によって決定される。
【０１９９】
さらに別の実施形態では、方法は、処置を必要とする対象の同定をさらに含む。有効な基準を使用して、対象が本明細書に開示される方法による本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与から利益を受け得ることが決定され得る。心臓疾患および糖尿病の診断のための方法だけでなく、例えば、これらの状態を発生するリスクがある個体の同定のための手順は、当業者に周知である。そのような手順としては、臨床検査、健康診断、個人面接、および家族歴の評価が挙げられ得る。
（ｇ）バイオマーカー：
【０２００】
血液からのバイオマーカーは、ＨＦの存在を検出する、その重症度を決定する、さらなる事象のリスクを評価する、および本明細書に開示される方法によるｒＡＡＶの処置の有効性を導くのを助け得る。ＢＮＰおよびプロ－ＢＮＰは、ＨＦの分類において一般に評価されるバイオマーカーであるが、他のバイオマーカーを使用して、予後およびＨＦ治療の

有効性をさらに評価することができる。

【０２０１】

一部の実施形態では、バイオマーカーのパネルを使用して、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，４５０，０６９号に開示されるように、処置の有効性を評価することができ、１つまたは複数の血管炎症マーカー、例えば、ＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１７ａと組み合わせてｃＴｎＩおよび／またはＢＮＰのレベルを測定することを含む。

【０２０２】

いくつかのＨＦに関連するバイオマーカーが十分に認識されており、循環中のそれらの濃度の測定は、便利であり、そして、ＨＦの検出、診断、予後および管理における疾患の重症度および援助についての重要な情報を提供する非侵襲的なアプローチである。これらとしては、ナトリウム利尿ペプチド、腫瘍原性２の可溶性抑制因子、高感受性トロポニン、ガレクチン－３、中央領域プロアドレノメデュリン、シスタチン－Ｃ、インターロイキン－６、プロカルシトニンなどが挙げられる。したがって、一部の実施形態では、バイオマーカーは、トロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、または肝臓トランスアミナーゼの群から選択される。これらのバイオマーカーの測定は、Chow, et al. "Role of biomarkers for the prevention, assessment, and management of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association." Circulation 135.22 (2017): e1054-e1091に開示されており、これは、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０２０３】

一部の実施形態では、バイオマーカーは、ｍｉＲＮＡである。いくつかのマイクロＲＮＡバイオマーカーが使用されており、それらは循環中で安定であるので、選択されたｍｉＲＮＡは、冠動脈疾患、心筋梗塞、高血圧症、真性糖尿病、ウイルス性心筋炎、およびＨＦにおける潜在的なバイオマーカーとして使用することができる。例えば、７つのｍｉＲＮＡが、ＨＦ患者の血漿中で富化されていることが検証されており（ｍｉＲ－４２３－５ｐ、ｍｉＲ－１８ｂ＊、ｍｉＲ－１２９－５ｐ、ＨＳ＿２０２．１、ｍｉＲ－６２２、ｍｉＲ－６５４－３ｐ、およびｍｉＲ－１２５４）、その中でも、ｍｉＲ－４２３－５ｐは、ＨＦの臨床診断に最も強く関連した。ｍｉＲ－４２３－５ｐの循環レベルは、駆出率との逆相関およびより高いニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類を有する患者におけるより高いｍｉＲ－４２３－５ｐのレベルによって示されるように、疾患の重症度に関連した。ｍｉＲ－４２３－５ｐは、現在臨床的に使用されているバイオマーカーのＮ末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド（ＮＴ－プロＢＮＰ）のレベルとも相関した（例えば、Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. Eur J Heart Fail 14: 147-154, 2012およびTijsen AJ, et al., Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012; 303:H1085-H1095を参照されたい）。

【０２０４】

３つの他の循環ｍｉＲＮＡが、ＨＦの診断に関連する。内皮特異的なｍｉＲ－１２６は、１０人の患者および１７人の無症候性対照において、年齢、ＢＮＰ、およびＮＹＨＡクラスと負に相関することが見出された（Fukushima Y, et al., Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. Circ J 75: 336-340, 2011.8）。Corsten et al.（Corsten MF, et al., Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. Circ Cardiovasc Genet 3: 499-506, 2010.10）は、ｍｉＲ－４９９およびｍｉＲ－１２２の両方が、健康な対照と比較して急性ＨＦを有する患者の血漿中で富化されていることを見出し、そのうち、ｍｉＲ－４９９は、おそらく、心筋由来である。

【０２０５】

理想的なバイオマーカーの特徴の１つは、治療に応答して、疾患の重症度の変化としてレベルが変化することである。ｍｉＲ－４９９－５ｐおよびｍｉＲ－４２３－５ｐは、ＨＦのラットモデルにおいて治療の効果を示すことが実証された（Montgomery RL, et al., Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. Circulation 124: 1537-1547, 2011）。

【０２０６】

加えて、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－１３３ｂ、およびｍｉＲ－４９９－５ｐは、ＭＩを有する患者において上昇したが、ｍｉＲ－１２２およびｍｉＲ－３７５は低下した（例えば、Tijsen AJ, et al., Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012; 303:H1085-H1095を参照されたい）。

【０２０７】

一部の実施形態では、心リモデリングに関連する形態学的悪化に対する保護は、心臓と体重の比、梗塞面積、および心線維症の存在を測定することによって決定され、前記ヒトホスファターゼ阻害剤－１（Ｉ－１）またはそのバリアントの発現が、対照と比較して低下した心臓と体重の比、減少した梗塞面積、または低下した心線維症をもたらす場合に、保護が存在する。

【０２０８】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターで処置された対象、および本明細書に開示される投与方法に従って処置された対象は、心機能または心細胞機能、例えば、収縮性に関するパラメーターに対する処置の効果を評価することによって、評価することができる。例えば、ＳＲ Ｃａ２＋ ＡＴＰａｓｅ活性または細胞内Ｃａ２＋濃度は、上記に記載される方法を使用して測定することができる。さらにまた、心臓または心臓組織による力発生は、Strauss et al., Am. J. Physiol., 262:1437-45, 1992に記載される方法を使用して測定することができる。

【０２０９】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターで処置された対象、および本明細書に開示される投与方法に従って処置された対象は、例えば、処置の当業者が特定の処置に対する関連性を認識しているであろうパラメーターに従って、対象におけるその効果によって評価することもできる。例えば、心不全の処置において、例示的なパラメーターは、心機能および／または肺機能に関連し得る。心パラメーターとしては、脈、ＥＫＧシグナル、管腔喪失、心拍数、心臓収縮性、心室機能、例えば、左室拡張終期圧（ＬＶＥＤＰ）、左室収縮期圧（ＬＶＳＰ）、Ｃａ２＋代謝、例えば、細胞内Ｃａ２＋濃度もしくはピークもしくは静止Ｃａ２＋、力発生、心臓の弛緩および圧力、力の頻度関係、心細胞の生存もしくはアポトーシスもしくはイオンチャネル活性、例えば、ナトリウムカルシウム交換、ナトリウムチャネル活性、カルシウムチャネル活性、ナトリウムカリウムＡＴＰａｓｅポンプ活性、ミオシン重鎖の活性、トロポニンＩ、トロポニンＣ、トロポニンＴ、トロポミオシン、アクチン、ミオシン軽鎖キナーゼ、ミオシン軽鎖１、ミオシン軽鎖２もしくはミオシン軽鎖３、ＩＧＦ－１受容体、ＰＩ３キナーゼ、ＡＫＴキナーゼ、ナトリウム－カルシウム交換体、カルシウムチャネル（ＬおよびＴ）、ＣＫ－ＭＢ、カルセクエストリン、またはカルレティキュリンが挙げられる。評価には、例えば、処置の前、後またはその間の、血管造影法（例えば、定量的血管造影法）および／または血管内超音波（ＩＶＵＳ）を行うことが含まれ得る。ある特定の実施形態では、ＬＶＥＦ、ＬＶＥＶＤ、ＬＶＥＤＶＩ、ＶＬＥＳＶ、ＬＶＥＶＩ、ＳｐＩ、ＧＬＳ、もしくは僧帽弁逆流の度合い、またはこれらの任意の組合せもしくはこれらのすべての心エコー評価は、本明細書に記載されるｒＡＡＶベクターを投与した４週間後、または６週間後、または８週間後、または１２週間後、または３か月後、または６か月後、または９か月後、または１２か月後、またはそれよりも長い後に行われる。一部の実施形態では、原因を問わない死亡率および／または心不全関連入院の評価は、本明細書に記載されるｒＡＡＶ処置の安全性および／または有効性を示す。一部の実施形態では、生存、心移植、もしくは左室補助装置（Ｌ

ＡＶＤ）埋め込み、またはこれらの任意の組合せは、ｒＡＡＶを投与された患者のモニタリングにおいて評価される。

【０２１０】

本発明による方法の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、筋細胞の短縮、弛緩のための時定数の低下、およびカルシウムシグナル減衰の加速、ならびにこれらの組合せからなる群から選択される状態をもたらすのに有効な量で導入される。さらに別の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、収縮終期圧径の関係またはその組合せを改善するのに有効な量で導入される。

【０２１１】

一部の実施形態では、本明細書に開示される投与および処置の方法は、前記対象の心臓組織においてＰＰ１の阻害剤（Ｉ－１もしくはＩ－１ｃ、またはそのバリアント）の治療量を発現させることを含む。好適には、心臓組織においてＰＰ１の阻害剤の治療量を発現させることで、対象の心不全または心臓障害の症状が低下する。好適には、心臓組織においてＰＰ１の阻害剤の治療量を発現させることで、心リモデリングを減弱し、運動能力を改善し、または心収縮性を改善し得る。好適には、心臓組織においてＰＰ１の阻害剤の治療量を発現させることで、筋細胞の短縮、弛緩のための時定数の低下、およびカルシウムシグナル減衰の加速、収縮終期圧径の関係の改善、またはその組合せをもたらし得る。

【０２１２】

また別の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの投与前もしくは後、またはその両方で、方法は、対象における心臓機能のパラメーターを評価することをさらに含む。心臓機能のパラメーターとしては、限定されないが、心拍数、心代謝、心臓収縮性、心室機能、Ｃａ２＋代謝、および筋小胞体Ｃａ２＋　ＡＴＰａｓｅ活性の１つまたは複数であり得る。

Ｃ．本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターで処置される例示的な対象

【０２１３】

本明細書に開示されるように、本明細書に開示される投与の方法およびｒＡＡＶベクターを、心血管状態または心臓疾患を処置するために使用することができ、ここで、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、患者の心臓を標的にし、それによって、核酸配列、例えば、ＰＰ１の阻害剤、または他の治療剤（例えば、血管新生タンパク質または表１８Ａ～１８Ｂからのタンパク質）が、心筋において発現され、したがって、血流を改善することおよび／または心収縮機能を改善することによって、心機能不全を回復させる。改善された心臓機能は、最終的に、心臓疾患または心不全の１つまたは複数の症状の低下または消失をもたらし、予想される死亡を超えて寿命を延長する。

【０２１４】

同様に、一部の実施形態では、本明細書に開示される投与の方法およびｒＡＡＶベクターを、末梢血管疾患の処置のために使用することができ、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、患者の心臓を標的にし、それによって、核酸配列、例えば、ＰＰ１の阻害剤、または他の治療剤（例えば、血管新生タンパク質）が、影響を受けた組織、例えば、虚血骨格筋を標的にし、それによって、治療用タンパク質、例えば、ＰＰ１の阻害剤または血管新生タンパク質の発現が、例えば、組織の影響を受けた（例えば、虚血）領域への血流を増加させることによって、および／または筋肉において、影響を受けた筋肉の収縮機能を改善することによって、末梢血管疾患の症状を回復および／または治癒する。

【０２１５】

したがって、一部の態様では、本明細書に記載される技術は、心筋虚血を有する患者における心血管状態または心臓疾患を処置するための方法における本明細書に開示される投与の方法およびｒＡＡＶベクターであって、本明細書に開示される投与方法に従ってｒＡＡＶベクターを、冠動脈内注射によって、好ましくは、一方または両方の冠動脈（または移植）に直接ｒＡＡＶベクターを注射することによって患者の心筋に投与することを含み、それによって、導入遺伝子（例えば、ＰＰ１の阻害剤および／または血管形成誘導タンパク質）の発現が発現され、血流および／または収縮機能が改善される、方法に関する。

実例として、ｒＡＡＶベクターは、心臓に送達され、そこでは、タンパク質またはペプチドが、持続時間にわたり継続的に心筋において治療的に有意な度合いまで産生され、血管新生が、心筋の影響を受けた領域において促進され得る。

【０２１６】

心不全：

【０２１７】

本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターによる処置および本明細書に開示される投与の方法に適した対象としては、限定されるものではないが、うっ血性心不全（ＣＨＦ）を含む心不全を有する対象が挙げられ、対象は、心不全に加えて、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、および異常なＣａ２＋代謝、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される状態を有する。さらに別の実施形態では、対象はヒトである。そのような中でも、うっ血性心不全を患っている患者は、拡張型心筋症を示している患者、および典型的には重度のまたは閉塞性の冠動脈疾患に関連する重度の心筋梗塞を示した患者である。ある特定の実施形態では、処置される対象は、非虚血性心筋症を有する。

【０２１８】

米国心臓病学会／米国心臓協会（ＡＣＣ／ＡＨＡ）、ＨＦＡ／ＥＳＣ、およびＪＨＦＳガイドラインからの心不全の定義は、心不全を臨床症候群として分類し、それぞれの定義は以下の通りである。

（ｉ）急性心不全（ＡＨＦ）

【０２１９】

急性心不全（ＡＨＦ）は、ＨＦの症状および／または兆候の迅速な開始または悪化を指す。これは、緊急の評価および処置を必要とする生命を脅かす病状であり、典型的には、緊急入院に至る。ＡＨＦは、最初の出現（デノボ）として、またはより頻繁には、慢性ＨＦの急性代償不全の結果として存在し得、多くの場合に慢性ＨＦを有する患者において、原発性心機能不全によって引き起こされ得るか、または外部因子によって促進され得る。急性心筋機能障害（虚血性、炎症性または毒性）、急性弁閉鎖不全症または心膜タンポナーデは、ＡＨＦの最も頻繁な急性の主要な心原因である。慢性ＨＦの代償不全は、公知の増悪因子なしで起こり得るが、より多くの場合、感染症、管理不良高血圧、調律異常、または薬物／食事の非順守などの１つまたは複数の因子により起こり得る。

【０２２０】

急性心不全（ＡＨＦ）を有する人は、心不全の以前の兆候および症状を有していない。ＡＨＦは、突然の体重増加によって特徴付けられる迅速な腫脹および体液貯留を示し得る。咳、喘鳴および息切れ、ならびに不整脈は、急性心不全の症状であり得る。一部の場合では、これは、前から存在する心筋症に関連する。ＡＨＦは、多くの場合、予想外の入院を必要とする。これはまた、不十分な予後および再入院の高いリスク、ならびに退院後の死亡に関連し得る。処置の選択肢としては、薬物治療、手術および埋め込み医療デバイス、ならびに推奨される生活様式の改変が挙げられる。

【０２２１】

ほとんどの場合では、ＡＨＦを有する患者は、保たれた（９０～１４０ｍｍＨｇ）または上昇した（１４０ｍｍＨｇ；高血圧性ＡＨＦ）収縮期血圧（ＳＢＰ）のいずれかを示す。すべての患者の５～８％のみが、低いＳＢＰ（すなわち、９０ｍｍＨｇ；低血圧性ＡＨＦ）を示し、これは、特に低灌流も存在する場合に、不十分な予後に関連する。

（ｉｉ）慢性心不全（うっ血性心不全とも互換的に使用される）

【０２２２】

心不全（ＨＦ）は、心周期の拡張期の間に血液で充満するか、または心周期の収縮期の間に血液を排出する左室の損なわれた能力から生じる多くの可能性のある原因を有する複合症候群である。影響を受けた心臓は、その結果として、身体の酸素需要を満たすのに十分な血液体積を送り出すことが次第にできなくなる。

【０２２３】

心不全は、一般的な慢性状態であり、これは、高齢者に主に影響を及ぼす。有病率は、

一般的な集団では０．８～２％であるが、＞７０歳の年齢の集団の中では１０～２０％である。さらに高齢の集団では、有病率が増加する。米国では、ＨＦは、現在、５８０万人に影響を及ぼし、ある推定は、２０３０年までに８００万人超まで上昇すると予測している。

【０２２４】

慢性心不全（ＣＨＦ）は、心臓が、身体の隅々まで十分な血液を送り出し、酸素の十分な供給を提供することができないことを記載し、すなわち、ＣＨＦは、心臓が、身体の需要を満たす血液の必要量を送り出すことができない。これは、正常な心臓よりも弱いことによって引き起こされる。身体が、心臓から血液の不十分な流入を受けると、いくつかの組織および器官は、それらの潜在力を下回って機能し始め、個体が、通常の活動にふけるのに必要なエネルギーを保有することを不可能にする。心臓が、適切に充満されないか、または血液を前方に送り出すことができない場合、これは、身体の組織への体液の増加を引き起こし、うっ血または腫脹をもたらす。ＣＨＦの典型的な症状は、息切れおよび疲労であるが、しかしながら、ＣＨＦを有する一部の人は、疲労および減少した活動耐容能のみを経験する。うっ血を経験した者は、くるぶしおよび脚、腹部ならびに肺の腫脹を有し得る。息切れおよび肺水腫は、すぐに処置されなかった場合、呼吸促迫に至り得る。心不全はまた、ナトリウムおよび水を処理および排出する腎臓の能力にも影響を及ぼし得る。これは、さらに高い体液貯留、およびその後の腫脹を生じ得る。多くの場合に、不適切な心臓機能は、心臓が、酸素および血液を心臓の筋肉に受け取ることができないので、死に至る。

【０２２５】

心不全は、左側または右側に起こり得る。

【０２２６】

左側心不全：左側心不全は、不全が左室の不適切な機能に起因して起こる場合に起こる。そのような場合では、左室は、身体によって必要とされるように、心臓から血液を送り出すのに必要な力で送り出すことができない。これに起因して、左チャンバーは、血液を蓄積し、これは最終的に、肺水腫および肺高血圧症に至る。その原因としては、高血圧症、虚血性心疾患、大動脈弁疾患、および原発性心筋疾患が挙げられる。

【０２２７】

右側心不全：右側心室の不全についての主要な理由は、左側心不全のためである。しかしながら、右側の不全の出現は、肺における病理に起因する場合、これは、肺性冠動脈である。ＣＨＦは、男性において最も一般的であり、リスク因子としては、年齢、高血圧、肥り過ぎ、および代謝障害様糖尿病の存在が挙げられる。ＣＨＦは、その名称が記載する通りであり、これは、時間とともに悪化し得る長期間にわたる状態である。本発明の前には、これは、一般に治癒できないが、医学的に管理することができる。

【０２２８】

駆出率：駆出率は、心臓のポンプ能力、拍動ごとに収縮および弛緩する筋肉を記載する。ＥＦは、心臓が収縮するたびに心臓から送り出される血液のパーセンテージを測定する。拍動ごとに、心臓は、血液を身体全体に送り出す。心臓のポンプ能力が損なわれると、駆出率の測定値は減少する。ＥＦの正常範囲は、５５％～７０％である。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、ＥＦが低下した心不全（ＨＦｒＥＦ）を有する対象に対して使用される。

【０２２９】

拡張期心不全：

【０２３０】

拡張期ＨＦは、駆出率が保たれた心不全（ＨＦｐＥＦ）としても公知であり、左室が固くまたは堅くなった場合に発生し、拍動の間の時間である拡張期の間に弛緩できない。これは、心臓が、血液で適切に再充満することを防止する。すべてのＨＦ症例の約半分が示し、拡張期心不全は、高齢の人および女性において最も一般的である。これは、ＨＦの発生に寄与し得る他の基礎疾患（併存疾患）が存在する場合に、存在する場合が多い。筋肉

がすべきであるように弛緩できないが、左室が依然として正常に送り出しているので、ＨＦｐＥＦは、保たれた駆出率を示す。

【０２３１】

収縮期心不全：

【０２３２】

収縮期ＨＦは、駆出率が低下した心不全（ＨＦｒＥＦ）としても公知であり、左室が正常に収縮しない場合に発生する。これは、心臓が、もはや十分な血液を循環に押し出す十分な力で送り出すことができないことを意味する。高血圧、不整脈、冠動脈疾患、ならびにアルコールおよび薬物の乱用のような状態は、心不全の発生に寄与し得る。ＨＦｒＥＦは、心臓の左下チャンバーである左室が大きくなり、身体に燃料を送るために酸素リッチな血液の適正量をポンプで押し出すようにより過酷に働くにつれて、進行する。

【０２３３】

非代償性心不全：

【０２３４】

非代償性心不全（ＤＨＦ）は、ＨＦが知られている患者がうっ血の兆候および症状の悪化を発生する場合に起こる。これは、身体が処分し得るよりも多くの体液を有するので、体液過剰とも呼ばれる。患者は、体重増加、呼吸困難の悪化、患者の脚または腹部の腫脹または浮腫、悪心を有し得、横になっている間に息切れする。非代償性心不全はまた、疲労も引き起こし得、激しいまたは日々の活動を行うと、より疲れを感じる。これは、世帯活動、または仕事中に任意の精力的な課題を行うことを妨げ得る。これらの患者は、処置のために入院することが必要であり得る。

【０２３５】

心不全についてのある範囲の原因がある。それらには、大まかに、非虚血性心不全および虚血性心不全が含まれる。非虚血性心不全は、遺伝子学的に基づき得るか、疾病（川崎病）によって引き起こされ得るか、心筋症であり得るか、アルコール誘発性心不全などの栄養に基づき得るか、またはウイルス感染症（およびおそらくＣｏｖｉｄ－１９による）であり得る。これは、虚血によっても引き起こされ得る。

【０２３６】

例えば、高血圧症、腎機能不全、損傷を受けた心臓組織（先行心筋梗塞（ＭＩ）を含む心筋梗塞）、冠動脈疾患／虚血、異常な心臓弁またはチャンバー（先天性または後天性）、肺塞栓症（ＰＥ）および肺高血圧症、心臓不整脈、心筋症、真性糖尿病、加齢関連の悪化、薬物乱用、毒物、閉塞性睡眠時無呼吸、ならびに感染症（心筋炎、心内膜炎）を含む、心不全を対象にもたらし得るいくつかの疾患および状態がある。

【０２３７】

心臓イメージング（心エコー検査）は、左室駆出率（ＬＶＥＦ）の測定を可能にする。これは、収縮の間に駆出された左室における総血液体積の％であり、通常、大体５０～７０％である。損なわれた心室駆出に起因するＨＦは、低下した駆出率（ｒＥＦ）、すなわち、５０％未満に関連し、ＨＦｒＥＦまたは収縮期心不全と称される。損なわれた心室充満に起因するＨＦは、保たれたＥＦ（すなわち、＞５５％）に関連し、ＨＦｐＥＦまたは拡張期心不全と称される。心臓イメージングは、心不全の症状が起こる前に、左室機能障害（収縮期または拡張期のいずれか）の検出を可能にする。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶを投与された患者は、４０％のＬＶＥＦ、または３５％のＬＶＥＦ、または３０％のＬＶＥＦ、または２５％のＬＶＥＦ、または２０％のＬＶＥＦ、または１５％のＬＶＥＦ、または１０％のＬＶＥＦ、または５％のＬＶＥＦ、またはそれ未満のＬＶＥＦを有する。一部の実施形態では、ＬＶＥＦは、経胸壁心エコー検査（ＴＴＥ）によって測定される。

【０２３８】

以前の心筋梗塞（ＭＩ）および慢性高血圧症（ＣＨ）は、ＨＦの２つも最も一般的な原因である。糖尿病は、以前のＭＩまたは慢性高血圧症とは無関係に、ＨＦの増加したリスクに関連する。

【０２３９】
ＨＦの心症状としては、以下が挙げられる：軽度の労作のみの後の息切れ（呼吸困難）；運動不耐性、疲労；および最終的には、局所体液（浮腫）蓄積に起因するくるぶし腫脹／疼痛。ＨＦは、進行性の衰弱する状態である。ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）機能分類は、身体活動が制限される程度に基づいて、ＨＦの重症度の４つのクラスの１つに分類するために広く使用されている。ＮＹＨＡクラスＩは、本質的に無症候性ＨＦであり、ＮＹＨＡクラスＩＶは、「不快感なく任意の身体活動を行うことができない」最も重度のＨＦを有する患者に適用される。これらのクラスＩＶのＨＦ患者は、「安静時に症状（息切れ、疲労など）を経験する」。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶを投与される患者は、ＮＹＨＡクラスＩＩＩまたはＮＹＨＡクラスＩＶのいずれかの心不全を有する。

【０２４０】
典型的には、患者は、慢性的に安定なＨＦの期間を有し、症状および血行力学状態が有意に悪化する場合に急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）と呼ばれる急性増悪によって中断され、緊急入院を必要とする。ＨＦとまだ診断されていない者において起こり得るＡＨＦは、高い死亡率に関連する。ＡＨＦのために入院した患者の大体１２～１５％が、入院の１２週間以内に死亡し、３０％が、入院の１２か月以内に死亡する。

【０２４１】
一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法は、慢性非虚血性心筋症または虚血性心筋症を処置する方法において使用される。一部の実施形態では、対象は、慢性非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、慢性虚血性心筋症を有する対象は、処置に適さない。一部の実施形態では、対象は、本明細書に開示される方法により投与される本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターが、登録前６か月以内に経胸壁心エコー検査（ＴＴＥ）によってＬＶＥＦ（左室拡張終期容積）≦３０％を有する場合、処置に適する。一部の実施形態では、対象は、以下の通りのＬＶＥＦを有する：＞１２０心室容積／ＥＤＶＩ（ｍｌ）（重度ＬＶ拡大）、または１００～１２０の間の心室容積／ＥＤＶＩ（ｍｌ）（中等度ＬＶ拡大）、または８４～９９の間の心室容積／ＥＤＶＩ（ｍｌ）（軽度ＬＶ拡大）。一部の実施形態では、対象が、８４に等しいまたはそれ未満の心室容積／ＥＤＶＩ（ｍｌ）（正常ＬＶ）を有する場合、対象は、開示される方法により投与される本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターによる処置に適さない。

（ｉｉｉ）心筋症

【０２４２】
心筋症およびうっ血性心不全（ＣＨＦ）は、世界中で数百万人の死亡の原因である極めて一般的な状態である。心筋症は、不適切な拡張を示す機械的または電気的機能不全のいずれかを引き起こす疾患の異種群に属する。出現は、遺伝学的因子を含むいくつかの因子に起因する。それらは、多系統障害の部分であるか、または心血管系死亡に至る心臓のみに限定される。うっ血性心不全は、心臓が、身体の需要を満たす血液の必要量を送り出すことができない。心筋症および心不全またはうっ血性心不全は、互いと密接に一体化し、心筋症は、心臓の筋肉の病理であるが、心不全は、心筋症が存在する場合に起こる症候群である。

【０２４３】
３種類の心筋症が存在する：（１）肥大が付随する進行性心拡張に起因して起こる拡張型心筋症。原因としては、遺伝的突然変異、出産、鉄過負荷、心筋炎、およびアルコール乱用が挙げられる。（２）遺伝子、心筋肥大、左室心筋の不適切な機能に起因して起こる肥大型心筋症。それらは、異常な拡張期充満をもたらし、断続的な心室流出を妨害する。（３）最も一般的でなく、損なわれた心室充満をもたらす心室コンプライアンスの減少に起因して現れる拘束型心筋症。原因としては、放射線線維症、アミロイド症、転移性腫瘍およびサルコイドーシスが挙げられる。

【０２４４】
本明細書に開示されるすべての態様では、方法は、心不全を有する対象を処置すること

を包含する。一部の実施形態では、対象は、非虚血性心筋症を有する。他の実施形態では、対象は、虚血性心筋症を有する。

【０２４５】

「心筋症」という用語は、「心」（心臓）の「筋」（筋肉）の「パチー」（の疾患）を指す。拡張型心筋症は、左室チャンバー拡大、収縮機能障害、およびうっ血性心不全の臨床徴候をもたらす。

【０２４６】

一部の実施形態では、非虚血性心筋症を有する対象は、拡張型心筋症を有し、一方または両方の心室の拡張および損なわれた収縮が存在する。

【０２４７】

一部の実施形態では、対象は、毒物、例えば、アルコール、薬物（例えば、アントラサイクリン）に起因する非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、対象は、浸潤性薬剤、例えば、サルコイド、鉄過負荷（ヘモクロマトーシスまたは過剰な輸血）に起因する非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、対象は、食事の問題、例えば、脚気（チアミン欠乏症）に起因する非虚血性心筋症を有する。

【０２４８】

一部の実施形態では、対象は、現在のまたは以前の感染症、例えば、限定されるものではないが、ウイルス感染症、例えば、シャーガス病、ＨＩ、コクサッキー病またはライム病、コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ（ＭＥＲＳを引き起こす）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ（ＳＡＲＳを引き起こす）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２（ＣＯＶＩＤ－１９を引き起こす）、ならびにヒトコロナウイルス２２９Ｅ、ＮＬ６３、ＯＣ４３およびＨＫＵ１に起因する非虚血性心筋症を有する。一部の実施形態では、非虚血性心筋症を有する対象は、長期のＣｏｖｉｄ、またはｃｏｖｉｄ感染に起因する長期合併症もしくは症状を有する。

【０２４９】

一部の実施形態では、対象は、遺伝性状態、例えば、家族性ＤＣＭ、筋ジストロフィー（デュシェンヌ、ミオトニー、ミトコンドリア）に起因する非虚血性心筋症を有する。本明細書に開示される心不全の対象を処置する方法の一部の実施形態では、対象は、２２ｑ１１．２欠失症候群、腹部大動脈瘤、鎖骨下動脈起始異常、成人ポリグルコサン小体病、アルファ－マンノース症、アルストレーム症候群、アンデルセン－タウィル症候群、バルサルバ洞動脈瘤、不整脈原性右室心筋症、動脈蛇行症候群、エーラス－ダンロス症候群、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、圧反射機能障害、バース症候群、ベッカー型筋ジストロフィー、二方向性頻脈、青色ゴム乳首様母斑症候群、長母指型短指症、ブロークンハート症候群、ブルガダ症候群、ブルガダ症候群３、ブルガダ症候群４、バッド－キアリ症候群、バージャー病、腔内拡張を伴う心包虫嚢胞、心臓破裂、心臓弁型エーラス－ダンロス症候群、心脳筋症、心臓・顔・皮膚症候群、心筋症・白内障・股関節・脊椎疾患、羊毛状毛および角皮症を伴う拡張型心筋症、カーニー複合、カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ欠損症、カテコールアミン誘発性多形性心室性頻拍、無秩序型心房頻拍、チャージ症候群、染色体１ｐ３６欠失症候群、ＣＯＧ１－ＣＤＧ（ＣＤＧ－ＩＩｇ）、ＣＯＧ７－ＣＤＧ（ＣＤＧ－ＩＩｅ）、複合酸化的リン酸化欠損症１６、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、先天性修正大血管転位症、三心房心デクスター、三心房心、コステロ症候群、大動脈の嚢胞性中膜壊死、ダノン病、ＤＣＭＡ症候群、広範性皮膚全身性強皮症、拡張型心筋症、高ゴナドトロピン性性腺機能低下を伴う拡張型心筋症、ＤＯＬＫ－ＣＤＧ（ＣＤＧ－Ｉｍ）、ＤＰＭ３－ＣＤＧ（ＣＤＧ－Ｉｏ）、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、エプスタイン奇形、エリスエール冬症候群、エリス－ファンクレフェルト症候群、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維軟骨塞栓症、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、フコシドーシス、ゴーシェ病、ゴーシェ病１型、グルタル酸血症ＩＩ型、糖原病２型、糖原病３型、糖原病４型、スロベニア型心－手症候群、スペイン型心－手症候群、ＨＥＣ症候群、ヒス束頻拍、ホルト－オーラム症候群、ヒト

ＨＯＸＡ１症候群、ハーラー症候群、ハーラー－シャイエ症候群、好酸球増加症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、アイブマーク症候群、イェルベル－ランゲニールセン症候群、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、ＬＣＨＡＤ欠損症、レーベル遺伝性視神経症、左室緻密化障害、レオパード症候群、肢帯型筋ジストロフィー１Ｂ型、肢帯型筋ジストロフィー２Ｅ型、肢帯型筋ジストロフィー２Ｆ型、肢帯型筋ジストロフィー２Ｍ型－肢帯型筋ジストロフィーを参照されたい、肢帯型筋ジストロフィー２Ｃ型、肢帯型筋ジストロフィー２Ｄ型、限局型皮膚全身性強皮症、限局型全身性強皮症、ロイス－ディーツ症候群２型、ロイス－ディーツ症候群４型、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、リソソーム性マンノース症ベータＡ、マクラウド神経有棘赤血球症候群、髄芽腫、ＭＧＡＴ２－ＣＤＧ（ＣＤＧ－ＩＩａ）、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、僧帽弁閉鎖症、家族性常染色体優性僧帽弁逸脱、筋拘縮型エーラス－ダンロス症候群、赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌスてんかん、筋緊張性ジストロフィー１型、ナタリー症候群、ナクソス病、新生児脳卒中、神経線維腫症－ヌーナン症候群、ヌーナン症候群、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、ゆるい成長期毛を伴うヌーナン様症候群、心房中隔二次孔欠損症、発作性心室細動、動脈管開存症、静脈管開存症、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ　１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック１Ａ型、進行性家族性心ブロック１Ｂ型、進行性家族性心ブロック２型、偽性低アルドステロン症２型、弾性線維性仮性黄色腫、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症、形成異常を伴う色前頭部毛髪、ならびにウィリアムズ症候群を含む群から選択される心徴候を有する遺伝性障害に起因する非虚血性心筋症を有する。

（ｉｖ）一般的な心血管状態および心血管疾患：

【０２５０】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法はまた、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）などの末梢血管疾患における使用のために提供される。本明細書に記載および示されるように、したがって、これらの方法は、心血管状態、心臓疾患、末梢血管疾患、および類似の障害を処置するために有用である。

【０２５１】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法は、拡張した低収縮性左室および／または右室の所見によって典型的に診断される心不全の１種である拡張型心筋症（ＤＣＭ）を処置する方法において有用である。ＤＣＭは、冠動脈閉塞、または心筋梗塞の病歴などの心疾患の他の特徴的な形態の非存在下で起こり得る。ＤＣＭは、心不全の不十分な心室機能および症状に関連する。これらの患者では、チャンバーの拡張および壁の菲薄化は、一般に、高い左室壁張力をもたらす。多くの患者は、軽度の運動下または安静時でさえ症状を示し、したがって、重度の、すなわち、「ＩＩＩ型」または「ＩＶ型」の心不全をそれぞれ示すこととして特徴付けられる（例えば、心不全のＮＹＨＡ分類を参照されたい）。上記で述べたように、冠動脈疾患を有する多くの患者は、進行して、多くの場合１回または複数回の心臓発作（心筋梗塞）の結果として、拡張型心筋症を示し得る。

【０２５２】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法は、進行または少なくとも減少した有害な左室リモデリング（略して、ａ．ｋ．ａ．、有害なリモデリング）を防止、阻害、遅らせる方法において有用であり、これは、重度の心不全に

進行し得る心筋梗塞後のチャンバー拡張を指す。心室リモデリングが既に開始していたとしても、血流の増加が心室機能障害を相殺するのに依然として有効であり得るので、血流の増加を促進することが依然として望ましい。同様に、微小血管床の発生も心室機能障害を相殺するのに有効であり得るので、血管新生の促進は、有用であり得る。さらに、本明細書に開示されるそのようなｒＡＡＶベクターおよび投与の方法も、他の増強効果を有し得る。心筋梗塞を患った患者では、患者がチャンバー拡張を欠く場合、および心不全の症状を発生していない場合、有害な心室リモデリングは、防止される。有害な心室リモデリングは、既存の心不全の症状に任意の観察可能なまたは測定可能な低下が存在する場合に軽減される。例えば、患者は、より少ない息切れ、および運動耐容量の改善を示し得る。心臓機能の改善および症状の低下を評価する方法は、ＤＣＭについて上記に記載された方法と本質的に類似する。改善された側副血流および心室機能、ならびに／または他の機構の結果としての有害な心室リモデリングの防止または軽減は、本明細書に記載される方法を使用して、患者におけるｉｎ　ｖｉｖｏの血管由来遺伝子移入後数週間以内に達成されると予想される。

【０２５３】

本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法の別の例では、ＰＰ１の阻害剤、血管新生タンパク質、または表１８Ａ～１８Ｂから選択される治療用タンパク質をコードする導入遺伝子の移入を使用して、うっ血性心不全（ＣＨＦ）に関連する状態が処置される。

【０２５４】

一実施形態では、疾患は、心血管状態、または心臓疾患および障害であり得る。一実施形態では、疾患は、うっ血性心不全などの心不全であり得る。一実施形態では、対象は、非虚血性心筋症を有し得る。

【０２５５】

一部の実施形態では、疾患は、うっ血性心不全、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患から選択され得る。

【０２５６】

一実施形態では、疾患は、不整脈、異常な心臓収縮性、非虚血性心筋症、末梢動脈閉塞性疾患および異常なＣａ２＋代謝、ならびにそれらの組合せから選択され得る。一部の実施形態では、疾患は、うっ血性心不全、心筋症、血管疾患、後天性心臓疾患、先天性心臓疾患、アテローム性動脈硬化症、機能障害を起こした伝導系、機能障害を起こした冠動脈、肺性心高血圧症の群から選択され得る。

【０２５７】

一部の実施形態では、筋肉疾患は、血管疾患である。血管疾患は、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、腎動脈狭窄症または大動脈瘤であり得る。一部の実施形態では、筋肉疾患は、心筋症であり得る。心筋症は、高血圧性心臓疾患、心不全（うっ血性心不全など）、肺性心臓疾患、心不整脈、炎症性心臓疾患（心内膜炎、炎症性心拡大、心筋炎など）、心臓弁膜症、先天性心臓疾患およびリウマチ性心臓疾患であり得る。

【０２５８】

一部の実施形態では、心筋症は、肥大型心筋症、不整脈源性右室異形成、拡張型心筋症、拘束型心筋症、左室緻密化障害、たこつぼ型心筋症、心筋炎および好酸球性心筋炎である。好ましくは、肥大型心筋症は、ＣＭＨ１（遺伝子：ＭＹＨ７）、ＣＭＨ２（遺伝子：ＴＮＮＴ２）、ＣＭＨ３（遺伝子：ＴＰＭ１）、ＣＭＨ４（遺伝子：ＭＹＢＰＣ３）、ＣＭＨ５、ＣＭＨ６（遺伝子：ＰＲＫＡＧ２）、ＣＭＨ７（遺伝子：ＴＮＮＩ３）、ＣＭＨ８（遺伝子：ＭＹＬ３）、ＣＭＨ９（遺伝子：ＴＴＮ）、ＣＭＨ１０（遺伝子：ＭＹＬ２）、ＣＭＨ１１（遺伝子：ＡＣＴＣ１）またはＣＭＨ１２（遺伝子：ＣＳＲＰ３）である。好ましくは、不整脈源性右室異形成は、ＡＲＶＤ１（遺伝子：ＴＧＦＢ３）、ＡＲＶＤ２（遺伝子：ＲＹＲ２）、ＡＲＶＤ３、ＡＲＶＤ４、ＡＲＶＤ５（遺伝子：ＴＭＥＭ４３

）、ＡＲＶＤ６、ＡＲＶＤ７（遺伝子：ＤＥＳ）、ＡＲＶＤ８（遺伝子：ＤＳＰ）、ＡＲＶＤ９（遺伝子：ＰＫＰ２）、ＡＲＶＤ１０（遺伝子：ＤＳＧ２）、ＡＲＶＤ１１（遺伝子：ＤＳＣ２）および／またはＡＲＶＤ１２（遺伝子：ＪＵＰ）である。

【０２５９】

別の例では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法を、うっ血性心不全、非虚血性心筋症、血管疾患、後天性心臓疾患、先天性心臓疾患、アテローム性動脈硬化症、機能障害を起こした伝導系、機能障害を起こした冠動脈、肺性心高血圧症のいずれかの処置のために使用することができる。一部の実施形態では、疾患は、うっ血性心不全、冠動脈疾患、心筋梗塞、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患からなる群から選択される。

【０２６０】

うっ血性心不全（ＣＨＦ）とも呼ばれる心不全は、心臓の筋肉の収縮性が減少する障害であり、心臓は、血液を効率的に送り出すその能力を失う。これは、単独で、１０００万人の米国人に影響を及ぼすと推定される。心不全は、ほとんどの場合、慢性の長期間にわたる状態であり、法外な量の医学的介入および人材の金額を消費する。特に、残りの身体の器官への心不全の帰結は、患者の生産寿命の全体的な低下および処置の費用の両方の観点から壊滅的であり得る。この状態は、心臓の右側、左側、または両側に影響を及ぼし得る。心臓のポンプ作用が損なわれるにつれて、血液は、身体の他の領域に逆流し始める。多くの器官および器官系は、酸素および栄養素の欠如からの累積損傷に苦しみ始める。

【０２６１】

多くの根本原因が存在し得、心不全は、加齢とともにより一般的になる。問題を生じるような方法で、心不全を有する一部の患者は、明らかに注目すべき症状を有さず、重篤な器官損傷の割合を回避または減らすための早期介入の利益なしで、重篤な周辺状態が現れるのを可能にする。

（ｉｖ）虚血性心筋症

【０２６２】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法は、心筋虚血を実質的に低下させるための方法において使用される。

【０２６３】

一例では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターおよび投与の方法は、心筋虚血を実質的に低下させるための方法において使用される。

【０２６４】

一実施形態では、疾患は、虚血、心筋梗塞（ＭＩ）、虚血性心筋症、およびそれらの組合せから選択され得る。一部の実施形態では、疾患は、梗塞、組織虚血、心虚血、アテローム性動脈硬化症またはＣＡＤの群から選択され得る。

【０２６５】

心筋虚血は、心臓の筋肉（心筋）が、適切な血液供給を受けず、したがって、酸素および栄養素の必要なレベルが欠乏した場合に起こる心臓機能障害の態様である。心筋虚血は、例えば、アンギナ、心臓発作および／またはうっ血性心不全を含む各種の心臓疾患をもたらし得る。心筋虚血の最も一般的な原因は、アテローム性動脈硬化症（冠動脈疾患または「ＣＡＤ」とも称される）であり、これは、心臓の筋肉に血流を提供する血管である冠動脈の封鎖を引き起こす。心筋虚血の現在の処置としては、薬理療法、冠動脈バイパス手術、およびバルーン血管形成術などの技法を使用する経皮的血行再建術が挙げられる。標準的な薬理療法は、心臓の筋肉への血液供給を増加させること、または酸素および栄養素に対する心臓の筋肉の需要を減少させることのいずれかを含む戦略に基礎を置く。例えば、心筋への増加した血液供給は、カルシウムチャネル遮断剤またはニトログリセリンなどの薬剤によって達成することができる。これらの薬剤は、動脈壁中の平滑筋の弛緩を引き起こすことによって、病的動脈の直径を増加させると考えられる。酸素および栄養素に対

する心臓の筋肉の減少した需要は、心臓に対する血行力学的負荷を減少させる薬剤、例えば、動脈拡張薬、または所与の血行力学的負荷に対する心臓の収縮応答を減少させる薬剤、例えば、ベーターアドレナリン受容体アンタゴニストのいずれかによって成し遂げることができる。虚血性心疾患の外科的処置は、一般に、戦略的に配置されたバイパス移植（通常、伏在静脈または内胸動脈の移植）による病的動脈区域のバイパスに基づく。経皮的血行再建術は、一般に、病的冠動脈の狭窄を低下するためのカテーテルの使用に基づく。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶで処置される患者は、ニトログリセリンまたはニトロプルシドを共投与される。

【０２６６】

重度の心筋虚血が心臓発作をもたらす患者の多くを含む心臓疾患を有する多くの患者は、うっ血性心不全を有すると診断される。うっ血性心不全は、代謝要求を満たす不適切な心拍出量をもたらす異常な心臓機能として定義される（Braunwald, E. (ed), In: Heart Disease, W. B. Saunders, Philadelphia, page 426, 1988）。米国において推定で５００万人の人が、うっ血性心不全を患っている。ＣＨＦの症状が中等度になると、予後は、そのような患者の半分だけが２年より長く生存すると予測されるほとんどのがんよりも悪化する（Braunwald, E. (ed), In: Heart Disease, W. B. Saunders, Philadelphia, page 471-485, 1988）。薬物治療は、最初は、ＣＨＦの症状（例えば、浮腫、運動不耐性および息切れ）を減弱し、一部の場合では、寿命を延長する。しかしながら、この疾患の予後は、薬物処置を用いても、厳しいままであり、ＣＨＦの発生率は増加している（例えば、Baughman, K., Cardiology Clinics 13: 27-34, 1995を参照されたい）。ＣＨＦの症状としては、息切れ、疲労、衰弱、脚の腫脹および運動不耐性が挙げられる。健康診断において、心不全を有する患者は、心拍数および呼吸数、割合（肺における体液の指標）、浮腫、頸静脈膨張、および一般に拡大した心臓の上昇を有する傾向がある。ＣＨＦの最も一般的な原因は、上記で議論されるように血液を心臓の筋肉に供給する冠動脈の封鎖を引き起こすアテローム性動脈硬化症である。したがって、うっ血性心不全は、慢性または急性心不全の発生をもたらす範囲のまたは不意の、非常に重度の冠動脈疾患に最も一般的に関連する。そのような患者では、１つまたは複数の冠動脈の広範囲のおよび／または突然の閉塞が、心筋への適切な血流を妨げ、重度の虚血、一部の場合では、心筋梗塞または心臓の筋肉の死をもたらす。結果として生じる心筋壊死は、進行性慢性心不全または急性低心拍出量状態に続く傾向があり、この両方とも、高い死亡率に関連する。

【０２６７】

本明細書に開示される方法による処置に適した対象は、心筋梗塞（一般に、心臓発作と称される）を診断する任意の方法によって同定することができる。これらの状態を診断する方法は、当業者に周知である。非限定的な例として、心筋梗塞は、（ｉ）クレアチンホスホキナーゼ（ＣＰＫ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）および心筋梗塞の間に放出される他の酵素のレベルを検出する血液検査；（ｉｉ）紙上またはコンピュータモニターのいずれかの心活動のグラフ記録である心電図（ＥＣＧまたはＥＫＧ）、ＥＣＧは、疾患および／または損傷を検出するのに有益であり得る；（ｉｉｉ）先天性心臓疾患を調べ、心臓壁の機能的異常を含む心臓壁、弁および血管の異常を評価するのに使用される心エコー図（心臓超音波）；（ｉｖ）心臓弁を横断する血流を測定するために使用され得るドプラ超音波法；（ｖ）器官の解剖学的形態および機能の可視化を可能にし、冠動脈疾患、心筋梗塞、弁膜症、心臓移植拒絶反応を検出し、バイパス手術の有効性をチェックし、または血管形成術もしくは冠動脈バイパス移植のために患者を選択するために使用され得る核医学イメージング（当技術分野において核医学検査とも称される）によって診断することができる。

【０２６８】

うっ血性心不全を有する多くの患者は、「拡張型心筋症」（または、本明細書で使用される場合、ＤＣＭ）と称される状態である、拡大し、不十分に収縮する心臓に発展する傾向がある。ＤＣＭは、拡張した低収縮性の左室および／または右室の所見によって典型的

に診断される心臓の状態である。再び、ほとんどの場合で、拡張した心臓に関連するうっ血性心不全は、１回または複数回の心筋梗塞を引き起こす、多くの場合に非常に重度の冠動脈疾患の結果である。有意に少数の場合では、しかしながら、ＤＣＭは、冠動脈疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症）の特徴の非存在下で起こり得る。拡張型心筋症がＣＡＤに関連しないいくつかの場合では、ＤＣＭの原因は、公知または疑わしい。例としては、家族性心筋症（進行性筋ジストロフィー、筋強直性筋ジストロフィー、フリードライヒ運動失調症および遺伝性拡張型心筋症に関連するものなど）、心筋炎症をもたらす感染症（様々なウイルス、細菌および他の寄生生物による感染症など）、非感染性炎症（自己免疫疾患、周産期心筋症、過敏性応答または移植拒絶反応に起因するものなど）、心筋炎を引き起こす代謝障害（栄養の、内分泌学的なおよび電解質の異常を含む）、および心筋炎を引き起こす毒物（アルコール、ならびにある特定の化学療法薬およびカテコールアミンを含む）への曝露が挙げられる。非ＣＡＤ　ＤＣＭのほとんどの場合に、しかしながら、疾患の原因は未知のままであり、したがって、状態は、「特発性拡張型心筋症」（または「ＩＤＣＭ」）と称される。根本原因の潜在的な相違にもかかわらず、重度のＣＨＦを有するほとんどの患者は、拡大し、薄い壁の心臓（すなわち、ＤＣＭ）を有し、これらの患者のほとんどは、（それらの一部は明らかなアテローム性動脈硬化症を有していなくてもよいにもかかわらず）心筋虚血を示す。さらにまた、ＤＣＭを有する患者は、重度の冠動脈疾患を有していなくてもよいにもかかわらず、狭心症を経験し得る。

【０２６９】

ＣＨＦに関連する生理学的状態のさらなる合併は、機能障害を起こした心臓を有する患者において起こる傾向がある様々な自然順応である。これらの自然応答は、最初は、心臓機能を改善することができるが、それらは、多くの場合、疾患を悪化させ、処置を混乱させ、生存に対する有害効果を有し得る他の問題をもたらす。ＣＨＦ患者において一般に観察される３つのそのような適応応答がある：（ｉ）血漿量を増やし、最初は心拍出量を改善する、ナトリウム再吸収の変化によって誘導される容積の保持；（ｉｉ）比較的正常な壁張力を維持しながら１回排出量を増加させ得る心拡大（拡張および肥大から）；および（ｉｉｉ）心ベーターアドレナリン受容体と相互作用することによって、心拍数および収縮力を増加させ、それによって心拍出量を増加させる傾向がある、心臓において作用するアドレナリン作動性神経末端からの増加したノルエピネフリン放出。しかしながら、これらの３つの自然適応のそれぞれは、最終的に、様々な理由で失敗する傾向がある。特に、体液貯留は、浮腫、および呼吸を損なう肺中で保持された体液をもたらす傾向がある。心臓拡大は、その後の重度の拡張および増加した壁張力を伴う有害な左室リモデリングに至り、このようにして、ＣＨＦを悪化させ得る。最後に、ノルエピネフリンへの心臓の長期曝露は、心臓をアドレナリン刺激に対して非応答性にする傾向があり、不十分な予後に関連する。

【０２７０】

心臓疾患のような末梢血管系の疾患は、特に代謝の必要性が増加した場合に（運動によるなど）、（心疾患のように）虚血になる組織（例えば、骨格筋）への制限された血流から生じる場合が多い。したがって、末梢血管に存在するアテローム性動脈硬化症は、影響を受けた血管によって供給される組織において虚血を引き起こし得る。末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）としても公知のこの問題は、最も頻繁には、患者の下肢に影響を及ぼす。心血管疾患の他の形態として、この状態またはその症状の少なくとも一部は、薬物、例えば、アスピリンもしくは血液粘性を低下させる他の薬剤を使用することによって、または外科的介入、例えば、動脈グラフト、脂肪性プラーク沈着の外科的除去、もしくは血管内処置、例えば、血管形成術によって、処置され得る。症状は改善し得るが、そのような処置の有効性は、上記で述べた理由と類似の理由のために、典型的には不十分である。

ＩＩ．投与の方法

【０２７１】

本明細書に記載される技術の一態様は、ｒＡＡＶベクターを投与する方法であって、対象へのｒＡＡＶの総用量の単一投与であり、単一投与が、単一投与内の少なくとも２、ま

たは３、または４、または５、またはそれよりも多い分割用量に分割されるｒＡＡＶの総用量の送達を含む、方法に関する。すなわち、別の言い方をすれば、一部の実施形態では、方法は、単一投与で対象にｒＡＡＶベクターのボーラスを投与することを含み、ボーラスの単一投与が、少なくとも２、または３、または４、または５用量からのｒＡＡＶの投与を含み、一部の実施形態では、用量が、２、３、４、５、または６、またはそれよりも多くのバイアルまたは注射器からであり得、それぞれのバイアルまたは注射器からのｒＡＡＶの送達が、１～５分の間、または５分よりも長く要する。ｒＡＡＶベクターを投与する方法に関する本明細書に記載される技術の他の態様では、方法は、対象へのｒＡＡＶの少なくとも１投与、または１よりも多くの投与を含む。実施形態の一部の態様では、ｒＡＡＶベクターを投与する方法は、対象へのｒＡＡＶの２投与、３投与、４投与、または５投与を含み、それぞれの投与は、少なくとも２、または３、または４、または５、またはそれよりも多くの分割用量に分割されるｒＡＡＶの総用量の送達を含む。

【０２７２】

一部の実施形態では、ＡＡＶベクターを投与する方法は、単一注射内にＡＡＶベクターの送達の別個のパルスを含む単一注射である。すなわち、単一注射投与では、ｒＡＡＶ送達は、いくつかの時間的に離された分割投与に分けられる。例えば、単一投与は、少なくとも２、または少なくとも３、または少なくとも４、または少なくとも５、またはそれよりも多くの分割用量（「ＳＤ」）に分けられるｒＡＡＶの総量（または総用量、「ＴＤ」とも称される）であり得、それぞれの分割用量は、分割投与で投与され、それぞれの分割投与は、事前に規定された期間、例えば、それぞれの分割用量のそれぞれの分割投与の間に少なくとも１分、または少なくとも２分、または少なくとも３分、または少なくとも４分、または少なくとも５分、または少なくとも６分、または少なくとも７分、または少なくとも８分、または少なくとも９分、または少なくとも１０分、または１０分よりも長く時間的に離される。例えば、ｒＡＡＶの総用量の単一投与は、分割用量の一連のパルスを含むことができ、それぞれの分割用量は、分割投与で注射される（すなわち、単一投与のパルス）。

【０２７３】

理論に限定されないが、投与の例示的な方法は、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの間のｒＡＡＶベクターの総用量（ＴＤ）の単一投与の投与を含み、これは、少なくとも２、または少なくとも３、または少なくとも４、または少なくとも５、またはそれよりも多い分割用量（ＳＤ）に分割され得、分割用量は、少なくとも５秒、または少なくとも１０秒、または少なくとも２０秒、または少なくとも３０秒、または少なくとも４０秒、または少なくとも５０秒または少なくとも１分、または少なくとも２分、または少なくとも３分、または少なくとも４分、または少なくとも５分、または少なくとも６分、または少なくとも７分、または少なくとも８分、または少なくとも９分、または少なくとも１０分、または１０分よりも長く離して別々に対象に投与され、総ｒＡＡＶ用量についてのすべての分割用量の投与は、約１０分～約３０分の間、または約１０分～約２０分の間、または約１５分～約２５分の間、または約１５分～約３０分、または約２５分～約３０分の間、または約２０分～約４０分の間、または約４０分～約６０分の間、または６０分よりも長く要し、それぞれの分割用量は、１分、または約２分、または約３分、または約４分、または約５分、または約６分、または約７分、または約８分、または約９分、または約１０分、またはそれよりも長い期間にわたって投与される。一部の実施形態では、総ｒＡＡＶ用量の投与は、約１０分、または約１５分、または約２０分、または約２５分、または約３０分、または約３５分、または約４０分、または約４５分、または約５０分、または約６０分、またはそれよりも長い間、行われる。ある特定の実施形態では、総ｒＡＡＶ用量の投与は、約２０分～約３０分の間行われる。実施形態のある特定の態様では、ｒＡＡＶは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される。実施形態の一部の態様では、ｒＡＡＶ投与は、総５分割用量、例えば、５注射器のそれぞれで、１～５分の間行われ、それぞれの分割用量は、８ｍｌ、または９ｍｌ、または１０ｍｌ、または１２ｍｌ、または１５ｍｌ、

または２０ｍｌ、または２５ｍｌ、またはそれよりも多い体積の希釈剤を有する。実施形態のある特定の態様では、ｒＡＡＶ投与の総体積は、２０ｍｌ、または２５ｍｌ、または３０ｍｌ、または３５ｍｌ、または４０ｍｌ、または４５ｍｌ、または５０ｍｌ、または６０ｍｌ、または７０ｍｌ、または８０ｍｌ、または９０ｍｌ、または１００ｍｌ、またはそれよりも多い。任意の理論に限定されないが、希釈剤は、生理食塩水、または異なる比の生理食塩水－血液混合物であり得る。実施形態の一部の態様では、投与されるｒＡＡＶは、ホスファターゼ阻害剤タンパク質、例えば、Ｉ－１、またはそのバリアント、例えば、Ｉ－１ｃ、およびＣＭＶプロモーター、あるいは表１８Ａもしくは１８Ｂから選択される合成プロモーターまたはそのバリアントから選択されるプロモーターをコードする核酸を含む。実施形態のすべての態様では、ｒＡＡＶは、自己相補性（ｓｃ）ゲノムを含む。

【０２７４】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターの総用量（ＴＤ）の単一投与が、少なくとも２、または少なくとも３、または少なくとも４、または少なくとも５、またはそれよりも多い分割用量（ＳＤ）に分割される場合、それぞれの分割用量は、事前に規定された期間、例えば、少なくとも１分、または少なくとも２分、または少なくとも３分、または少なくとも４分、または少なくとも５分、または少なくとも６分、または少なくとも７分、または少なくとも８分、または少なくとも９分、または少なくとも１０分、または１０分よりも長くにわたって対象に投与または注射され得、それぞれの分割用量の投与の間に少なくとも１分、または少なくとも２分、または少なくとも３分、または少なくとも４分、または少なくとも５分、または少なくとも６分、または少なくとも７分、または少なくとも８分、または少なくとも９分、または少なくとも１０分、または１０分よりも長い間隔が存在する。一部の実施形態では、それぞれの分割用量は、１～５分の期間にわたって投与される。一部の実施形態では、分割用量間の時間間隔は、一定、例えば、それぞれの分割用量間が同じ時間であり得るか、または変わり得る。例えば、ｒＡＡＶベクターの総用量（ＴＤ）が、５分割用量（ｓｄ１、ｓｄ２、ｓｄ３、ｓｄ４、ｓｄ５）に分割される例示的な投与方法では、ｓｄ１およびｓｄ２の投与の間の間隔は、例えば、少なくとも２分であり得、ｓｄ２後のｓｄ３の投与の間の間隔は、例えば、５分であり得る。

【０２７５】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶの分割用量は、ボーラスによって、または別々のバイアルもしくは別々の注射器においてである。

【０２７６】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターの単一投与は、追加の薬剤または治療剤と共投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤は、本明細書に開示される免疫モジュレーターである。一部の実施形態では、追加の薬剤は、完全なｒＡＡＶ用量の単一注射の前、後、またはその両方（前および後）に投与される。一部の実施形態では、追加の薬剤（例えば、免疫モジュレーター）は、ｒＡＡＶの分割用量間の間隔で対象に投与され、すなわち、例えば、ｒＡＡＶベクターの総用量（ＴＤ）が５分割用量（ｓｄ１、ｓｄ２、ｓｄ３、ｓｄ４、ｓｄ５）に分割される例示的な投与方法では、追加の薬剤、例えば、免疫モジュレーターは、ｓｄ１およびｓｄ２の間、ｓｄ２およびｓｄ３の間、ｓｄ３およびｓｄ４の間、ｓｄ４およびｓｄ５の間のいずれか１つまたは複数の間に投与することができる。一部の実施形態では、追加の薬剤、例えば、免疫モジュレーターは、ｒＡＡＶの分割用量中に存在する。

【０２７７】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶの総用量は、約10^{11}ｖｇ、約3×10^{11}ｖｇ、約5×10^{11}ｖｇ、約10^{12}ｖｇ、約3×10^{12}ｖｇ、約5×10^{12}ｖｇ、約10^{13}ｖｇ、約3×10^{13}ｖｇ、約10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または約10^{15}ｖｇ、または約10^{15}ｖｇよりも多くのいずれかから選択される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの総用量は、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの間である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１、または少なくとも２、または少なくとも３、またはそれよりも

多い総用量が、投与される。一部の実施形態では、ｒＡＡＶのそれぞれの分割用量は、約１０^{11}ｖｇ～約１０^{15}ｖｇの間である。ある特定の実施形態では、ｒＡＡＶのそれぞれの分割用量は、約１０^{13}ｖｇ～約１０^{15}ｖｇの間である。一実施形態では、ｒＡＡＶのそれぞれの分割用量は、約１０^{11}ｖｇ、約３×１０^{11}ｖｇ、約５×１０^{11}ｖｇ、約１０^{12}ｖｇ、約３×１０^{12}ｖｇ、約５×１０^{12}ｖｇ、約１０^{13}ｖｇ、約３×１０^{13}ｖｇ、約１０^{14}ｖｇ、３×１０^{14}ｖｇ、または約１０^{15}ｖｇ、または約１０^{15}ｖｇよりも多くのいずれかから選択される。

【０２７８】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ投与は、総５分割用量のそれぞれで、例えば、総５注射器のそれぞれで、１～５分間行われ、それぞれの分割用量は、１０ｍｌの体積の、例えば、生理食塩水を有する。ある特定の実施形態では、ｒＡＡＶ投与は、総５注射器のそれぞれで、１～５分間行われ、それぞれ注射器は、８ｍｌ、または９ｍｌ、または１０ｍｌ、または１２ｍｌ、または１５ｍｌ、または２０ｍｌ、または２５ｍｌ、またはそれよりも多い体積の希釈剤を有する。希釈剤は、生理食塩水、または異なる比の生理食塩水－血液混合物である。ある特定の態様では、ｒＡＡＶ投与の総体積は、２０ｍｌ、または２５ｍｌ、または３０ｍｌ、または３５ｍｌ、または４０ｍｌ、または４５ｍｌ、または５０ｍｌ、または６０ｍｌ、または７０ｍｌ、または８０ｍｌ、または９０ｍｌ、または１００ｍｌ、またはそれよりも多い。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ投与は、１注射器、または２注射器、または３注射器、または４注射器、または５注射器、または６注射器、または７注射器、または８注射器、またはそれよりも多くの注射器で行われる。それぞれの注射器中のｒＡＡＶ分割用量は、１分、または２分、または３分、または４分、または５分、または６分、または７分、または８分、または９分、または１０分、またはそれよりも長い期間にわたって投与される。一部の実施形態では、方法は、ｒＡＡＶベクターを全身的に投与することを含む。全身投与は、経腸（例えば、経口、舌下、および直腸）または非経口（例えば、注射）であり得る。注射の好ましい経路としては、静脈内、筋肉内、皮下、動脈内、関節内、くも膜下腔内、および皮内の注射が挙げられる。一実施形態では、遺伝子治療ベクターは、心組織への注射によって送達され得る。

【０２７９】

一部の実施形態では、本発明による合成心特異的プロモーターまたは発現カセットを含むＡＡＶベクターまたはビリオンの投与は、血管内である。好適には、本発明による合成心特異的プロモーターまたは発現カセットを含むＡＡＶベクターまたはビリオンは、手の背面の静脈また前腕の前方の静脈に投与され得る。前腕の前方の好適な静脈は、橈側皮静脈、正中静脈、または尺側皮静脈である。これは、この投与経路が、患者にとって一般に安全であるためである。

【０２８０】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心臓組織に直接注射される。米国出願番号第１０／９１４，８２９号は、直接注射のためのプロトコールを記載している。心筋へのウイルスベクターの直接注射または適用は、心臓に移入される遺伝子の発現を制限し得る（Gutzman et al, 1993, Cric. Res. 73: 1202-7; French et al., 1994, Circulation. 90:2414-24）。

【０２８１】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、１つまたは複数の冠動脈の内腔に導入される。冠動脈からの血液の通過を、制限することができる。ｒＡＡＶベクターを含む調製物は、順行性で送達され得、１～５分の間、例えば、１～３分の間、動脈に存在することを可能にし得る。非ウイルス性媒体は、類似の方法によって送達され得る。

【０２８２】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、標準的な方法によって対象に投与することができる。例えば、薬剤は、静脈内（全身性）、皮内、皮下、経口（例えば、吸入または摂取）、経皮（局所）、経粘膜、またはカテーテルによって、または注射器によって、またはカテーテルおよび注射器の組合せによってを含むいくつかの異なる経路のいずれかに

よって投与することができる。一実施形態では、薬剤は、例えば、動脈内、筋肉内、または静脈内に、注射によって投与される。

【０２８３】

一部の実施形態では、対象の心臓の冠状血管を通る血流は、制限され、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、対象の冠動脈の内腔に導入される。さらに別の実施形態では、冠静脈の流出が制限されている間に、心臓は送り出している。さらに別の実施形態では、冠状血管を通る血流は、完全に制限される。制限される冠状血管としては、限定されないが、左前下行枝（ＬＡＤ）、遠位回旋動脈（ＬＣＸ）、大冠状静脈（ＧＣＶ）、中心静脈（ＭＣＶ）、または前室間静脈（ＡＩＶ）が挙げられ得る。さらに別の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの導入は、冠状血管の虚血プレコンディショニング後に起こる。また別の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、心臓からの大動脈の血流を制限しながら、対象の心臓に注入され、それによって核酸分子が心臓に流れるのを可能にする。

【０２８４】

本発明による方法の一部の実施形態では、本明細書に開示される投与またはｒＡＡＶベクターは、血流が冠動脈に向きを変えるように、心臓からの大動脈の血流を制限するステップ；核酸分子を、心臓、大動脈、または冠動脈口の内腔に注射して、核酸分子を冠動脈に提供するステップ；心臓からの大動脈の血流を制限しながら心臓が送り出すステップ；および大動脈の血流を再確立するステップを含む。さらに別の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、カテーテルにより心臓に注射される。また別の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、心臓の筋肉に直接注射される。

【０２８５】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、影響を受けた血管、例えば、動脈、または器官、例えば、心臓に注射することができる。処置の実施形態の一方法では、心臓の冠状血管を通る血流は、制限され、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、冠動脈の内腔に導入される。具体的な実施形態では、冠状静脈の流出が制限されている間に、心臓は、送り出すことが可能である。別の具体的な実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、心臓からの大動脈の血流を制限しながら、心臓に注射され、それによって、ウイルス送達系がそこに流れ、心臓に送達させるのを可能にする。他の実施形態では、冠状血管を通る血流は、完全に制限され、具体的なそのような実施形態では、制限される冠状血管は、左前下行枝（ＬＡＤ）、遠位回旋動脈（ＬＣＸ）、大冠状静脈（ＧＣＶ）、中心静脈（ＭＣＶ）、または前室間静脈（ＡＩＶ）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの導入は、冠状血管の虚血プレコンディショニング後に起こる。

【０２８６】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、血流が冠動脈に向きを変えるように、心臓からの大動脈の血流を制限するステップ；ベクターが冠動脈に流れるように、ベクターを、心臓、大動脈、または冠動脈口の内腔に注射するステップ；心臓からの大動脈の血流を制限しながら心臓が送り出すことを可能にするステップ；および大動脈の血流を再確立するステップを含む方法によって心臓に注射された。より具体的な実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、カテーテルにより心臓に注射され、さらにより具体的な実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、心臓の筋肉に直接注射される。

【０２８７】

一部の実施形態では、送達の方法は、１つまたは複数の大冠状静脈（ＧＣＶ）、中心静脈（ＭＣＶ）、または前室間静脈（ＡＩＶ）への血流を制限することを含む。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、左前下行枝（ＬＡＤ）および／または遠位回旋動脈（ＬＣＸ）の虚血プレコンディショニング後に冠動脈の内腔に導入される。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、カテーテルにより冠動脈の内腔、例えば、遠位回旋動脈（ＬＣＸ）に、または冠状血管、例えば、左前下行

枝（ＬＡＤ）に導入される。一部の実施形態では、冠動脈は、左前下行枝（ＬＡＤ）または遠位回旋動脈（ＬＣＸ）である。

【０２８８】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるＡＡＶベクターまたはビリオンは、１つもしくは複数の追加の治療剤と、または網場内皮系によってベクターのクリアランスを防止するために設計された１つもしくは複数の飽和剤と、同時にまたは連続して投与され得、例えば、本明細書に開示される１つまたは複数の免疫モジュレーターとともに投与され得る。

【０２８９】

一部の実施形態では、ベクターがＡＡＶベクターである場合、ベクターの投薬量は、１×10^{10}ｇｃ／ｋｇ～１×10^{15}ｇｃ／ｋｇまたはそれよりも多く、好適には、１×10^{12}ｇｃ／ｋｇ～１×10^{14}ｇｃ／ｋｇ、好適には５×10^{12}ｇｃ／ｋｇ～５×10^{13}ｇｃ／ｋｇであり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターの量は、１×10^{11}～１×10^{16}プラーク形成単位（ｐｆｕ）である。

【０２９０】

一般に、それを必要とする対象は、哺乳動物、好ましくは、霊長類、より好ましくは、ヒトである。典型的には、それを必要とする対象は、心血管状態、例えば、心臓疾患または心不全の症状の特徴を示す。方法は、典型的には、治療用産物の治療量を発現させることによって、それを必要とする対象によって示される症状を回復させることを含む。

【０２９１】

本発明は、それを必要とする対象、好ましくは、ヒトの遺伝子治療の方法であって、ＰＰ１の阻害剤、または血管新生タンパク質もしくはペプチド、または本明細書の表４Ａ～４Ｂに開示される任意のタンパク質をコードする遺伝子を含む、本発明の合成心特異的発現カセット、ベクター、ビリオンまたは医薬組成物を対象に投与すること（好適には、対象の心臓に導入すること）を含む、方法も提供する。

【０２９２】

方法は、好適には、前記対象の心臓組織においてＰＰ１の阻害剤の治療量を発現させることを含む。処置され得る様々な状態および疾患が、本明細書で議論される。好適な治療用産物をコードする遺伝子が、本明細書で議論され、限定されるものではないが、表４Ａ～４Ｂに開示されるものが挙げられる。

【０２９３】

ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏでの標的細胞における治療用遺伝子発現のための遺伝子治療プロトコールは、当技術分野において周知であり、本明細書で詳細に議論しない。簡潔には、それらとしては、プラスミドＤＮＡベクター（裸またはリポソーム中）またはウイルスベクターの、静脈内または動脈内投与（例えば、頸動脈内、肝動脈内、肝静脈内）、脳室内、頭蓋内投与、筋肉内注射、間質内注射、気道における滴下、内皮への適用、および肝臓実質内が挙げられる。様々なデバイスが、ＤＮＡの標的細胞に対する利用能を増強するために開発されている。単純なアプローチは、標的細胞を関連するベクターを含有するカテーテルまたは埋め込み可能な材料と物理的に接触させることであり、より複雑なアプローチは、ジェット注射デバイスなどを使用することができる。哺乳動物の心臓細胞への遺伝子移入は、ｅｘ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｖｏ手順の両方を使用して行うことができる。ｅｘ ｖｉｖｏアプローチは、典型的には、心臓細胞（例えば、心筋細胞）の採取、好適な発現ベクターによるｉｎ ｖｉｔｒｏ形質導入、それに続いて形質導入された心筋細胞の心臓への再導入を必要とする。このアプローチは、一般に、心臓における心筋細胞の採取および再導入の困難さおよび危険に起因して、あまり好ましくない。ｉｎ ｖｉｖｏ遺伝子移入は、ＤＮＡまたはウイルスベクターを心臓に直接注射することによって、例えば、頭蓋内注射によって、またはウイルスベクターの静脈内もしくは動脈内注射によって、達成されている。

【０２９４】

一実施形態では、遺伝子治療ベクターは、対象の心不全または心臓障害の症状を低下さ

せるための治療有効量で（例えば、公知の評価方法を使用して決定される）、対象に（例えば、対象の心臓に）投与され得る。

【０２９５】

反復投与

【０２９６】

本発明の一部の態様では、表２Ａ、５Ａまたは１３Ａにリストされる心細胞において活性な心特異的合成プロモーターまたは骨格筋特異的合成プロモーターの使用は、肝臓標的解除効果とともに心細胞における活性を提供する。

【０２９７】

一部の実施形態では、本発明は、２投与を含む反復投薬のための方法であって、反復投薬が、心細胞における活性を有する肝臓標的解除ＡＡＶビリオンの１投与および以前の投与において使用されていない任意の他のＡＡＶビリオンの他の投与を含み、一投与において、ＡＡＶビリオンが、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）をコードする核酸を含み、核酸が、ＣＭＶ、ＣＫ７、ミオシン、ＣＢＡ、ＣＫ８．イントロン、ＪＥＴプロモーターなどの群から選択されるプロモーターに機能的に連結されており、他の投与において、ＡＡＶビリオンが、ホスファターゼ阻害剤をコードする核酸を含み、核酸が、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な短縮型筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントに機能的に連結されており、１投与において、ＡＡＶビリオンが、以前の投与とは異なるＡＡＶカプシドを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、Ｉ－１は、配列番号１のアミノ酸１～６５またはその機能的断片を含み、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。一部の実施形態では、ホスファターゼ阻害剤をコードする核酸は、配列番号１の断片を含むＩ－１（Ｉ－１ｃ）の構成的に活性な断片をコードし、断片は、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７もしくは配列番号１のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含み、配列番号１のアミノ酸３５のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている。

【０２９８】

任意の限定に解釈されないが、反復投薬（投与）の方法の例は、第１および第２の投与を含み、第１の投与において、本明細書に記載されるホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸を含むＡＡＶ２ｉ８（またはＢＮＰ１１６）ベクターは、うっ血性心不全を有する対象に投与するために使用され、核酸が、ＣＭＶプロモーターと機能的に連結されており、第２の投与において、本明細書に記載されるホスファターゼ阻害剤ポリペプチド（Ｉ－１）をコードする核酸を含む組換えＡＡＶ２／９ベクターは、前記対象に投与するために使用され、核酸が、ＳＰ０１７３、ＳＰ０３２０、ＳＰ０２７９、ＳＰ０１３４、ＳＰ００５７、ＳＰ０２２９、ＳＰ００６７、ＳＰ０３１０、ＳＰ０３１１、ＳＰ０２６７、またはそのバリアントの群から選択される合成プロモーターと機能的に連結されている。

【０２９９】

一部の実施形態では、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な短縮型筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントを含むｒＡＡＶベクターは、ｒＡＡＶベクターの有効な反復投与が、以前の投与とは異なる任意のＡＡＶカプシドを有するｒＡＡＶビリオンを使用して心臓疾患（例えば、うっ血性心不全）を処置するのを可能にし、ｒＡＡＶは、前記プロモーターに機能的に連結されているホスファターゼ阻害

剤（Ｉ－１）をコードする核酸を含む。一部の実施形態では、表２Ａ選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアントから、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な短縮型筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントを含むｒＡＡＶは、ｒＡＡＶベクターの有効な反復投与が、以前の投与とは異なる任意のＡＡＶカプシドを有するｒＡＡＶビリオンを使用して心臓疾患（例えば、うっ血性心不全）を処置するのを可能にし、ｒＡＡＶは、前記プロモーターに機能的に連結されているホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）をコードする核酸を含み、ｒＡＡＶは、約１×１０^{11}ｖｇ／ｍｌ～約１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な短縮型筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントを含むｒＡＡＶは、ｒＡＡＶベクターの有効な反復投与が、以前の投与とは異なる任意のＡＡＶカプシドを有するｒＡＡＶビリオンを使用して心臓疾患（例えば、うっ血性心不全）を処置するのを可能にし、ｒＡＡＶは、前記プロモーターに機能的に連結されているホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）をコードする核酸を含み、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量は、約１０^{11}ｖｇ～約１０^{15}ｖｇである。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量は、約１０^{11}ｖｇ～約１０^{14}ｖｇである。一部の実施形態では、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量は、１０^{12}ｖｇ、または１０^{13}ｖｇ、または３×１０^{13}ｖｇ、または１０^{14}ｖｇ、または３×１０^{14}ｖｇである。例えば、ＳＰ０１７３、ＳＰ０３２０、ＳＰ０２７９、ＳＰ０１３４、ＳＰ００５７、ＳＰ０２２９、ＳＰ００６７、ＳＰ０３１０、ＳＰ０３１１、またはＳＰ０２６７は、ｒＡＡＶベクターの有効な反復投与が、以前の投与とは異なる任意のＡＡＶカプシド、すなわち、異なる免疫プロファイルを有するＡＡＶカプシドを有するｒＡＡＶビリオンを使用して心臓疾患（例えば、うっ血性心不全）を処置するのを可能にする。

（ｉ）免疫モジュレーター：

【０３００】

一部の実施形態では、本明細書に記載される心不全を処置するための方法および組成物は、免疫モジュレーターを投与することをさらに含む。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、ｒＡＡＶベクター投与の時に、ｒＡＡＶベクター投与の前に、またはｒＡＡＶベクター投与の後に投与することができる。

【０３０１】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、ＩｄｅＳ、ＩｄｅＺ、ＩｄｅＳ／Ｚ、Ｅｎｄｏ　Ｓ、またはそれらの機能的バリアントなどの免疫グロブリン分解酵素である。ＵＳ７，６６６，５８２号、ＵＳ８，１３３，４８３号、ＵＳ２０１８００３７９６２号、ＵＳ２０１８００２３０７０号、ＵＳ２０１７０２０９５５０号、ＵＳ８，８８９，１２８号、ＷＯ２０１００５７６２６号、ＵＳ９，７０７，２７９号、ＵＳ８，３２３，９０８号、ＵＳ２０１９０３４５５３３号、ＵＳ２０１９０２６２４３４号およびＷＯ２０２００１６３１８号に記載される、そのような免疫グロブリン分解酵素およびそれらの使用の参考文献の非限定的な例は、これらのそれぞれが、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【０３０２】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、プロテアソーム阻害剤である。ある特定の態様では、プロテアソーム阻害剤は、ボルテゾミブである。実施形態の一部の態様では、免疫モジュレーターは、ボルテゾミブ、および抗ＣＤ２０抗体であるリツキシマブを含む。実施形態の他の態様では、免疫モジュレーターは、ボルテゾミブ、リツキシマブ、メトトレキサート、および静脈内ガンマグロブリンを含む。ＵＳ１０，０２８，９９３号、ＵＳ９，５９２，２４７号およびＵＳ８，８０９，２８２号に記載される、プロテアソーム阻害剤ならびにリツキシマブ、メトトレキサートおよび静脈内ガンマグロブリンとのそれらの組合せを開示するそのような参考文献の非限定的な例は、これらのそれぞれが、参

照によりそれらの全体が組み込まれる。

【０３０３】

代替の実施形態では、免疫モジュレーターは、ＮＦ－ｋＢ経路の阻害剤である。実施形態のある特定の態様では、免疫モジュレーターは、ラパマイシンまたは機能的バリアントである。ＵＳ１０，０７１，１１４号、ＵＳ２０１６００６７２２８号、ＵＳ２０１６００７４５３１号、ＵＳ２０１６００７４５３２号、ＵＳ２０１９００７６４５８号、ＵＳ１０，０４６，０６４号に記載されるラパマイシンおよびその使用を開示する参考文献の非限定的な例は、それらの全体が組み込まれる。実施形態の他の態様では、免疫モジュレーターは、免疫抑制薬を含む合成ナノ担体である。ＵＳ２０１５０３２０７２８号、ＵＳ２０１８０１９３４８２号、ＵＳ２０１９０１４２９７４号、ＵＳ２０１５０３２８３３３号、ＵＳ２０１６０２４３２５３号、ＵＳ１０，０３９，８２２号、ＵＳ２０１９００７６５２２号、ＵＳ２０１６００２２６５０号、ＵＳ１０，４４１，６５１号、ＵＳ１０，４２０，８３５号、ＵＳ２０１５０３２０８７０号、ＵＳ２０１４０３５６３６号、ＵＳ１０，４３４，０８８号、ＵＳ１０，３３５，３９５号、ＵＳ２０２０００６９６５９号、ＵＳ１０，３５７，４８３号、ＵＳ２０１４０３３５１８６号、ＵＳ１０，６６８，０５３号、ＵＳ１０，３５７，４８２号、ＵＳ２０１６０１２８９８６号、ＵＳ２０１６０１２８９８７号、ＵＳ２０２０００３８４６２号、ＵＳ２０２０００３８４６３号に記載される、免疫抑制薬、合成ナノ担体にカップリングされた免疫抑制薬、ラパマイシンを含む合成ナノ担体、ならびに／または寛容原性合成ナノ担体、それらの用量、投与および使用の参考文献の非限定的な例は、これらのそれぞれが、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【０３０４】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、これらのそれぞれが、その全体が本明細書に組み込まれるＵＳ２０２０００３８４６３号、米国特許第９，００６，２５４号に開示される、ラパマイシンを含む合成ナノ担体（ＩｍｍＴＯＲ（商標）ナノ粒子）である（Kishimoto, et al., 2016, Nat Nanotechnol, 11(10): 890-899; Maldonado, et al., 2015, PNAS, 112(2): E156-165）。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、操作された細胞、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０１７１９２７８６号に開示されるＳＱＺ技術を使用して改変された免疫細胞である。

【０３０５】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、ポリ－ＩＣＬＣ、１０１８　ＩＳＳ、アルミニウム塩、Ａｍｐｌｉｖａｘ、ＡＳ１５、ＢＣＧ、ＣＰ－８７０，８９３、ＣｐＧ７９０９、ＣｙａＡ、ｄＳＬＩＭ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣ３０、ＩＣ３１、イミキモド、ＩｍｕＦａｃｔ　ＩＭＰ３２１、ＩＳ　Ｐａｔｃｈ、ＩＳＳ、ＩＳＣＯＭＡＴＲＩＸ、Ｊｕｖｌｍｍｕｎｅ、ＬｉｐｏＶａｃ、ＭＦ５９、モノホスホリルリピドＡ、モンタニドＩＭＳ１３１２、モンタニドＩＳＡ　２０６、モンタニドＩＳＡ　５０Ｖ、モンタニドＩＳＡ－５１、ＯＫ－４３２、ＯＭ－１７４、ＯＭ－１９７－ＭＰ－ＥＣ、ＯＮＴＡＫ、ＰＥＰＴＥＬ、ベクター系、ＰＬＧＡマイクロ粒子、レシキモド、ＳＲＬ１７２、ビロソームおよび他のウイルス様粒子、ＹＦ－１７Ｄ、ＶＥＧＦトラップ、Ｒ８４８、ベーターグルカン、Ｐａｍ３Ｃｙｓ、ならびにＡｑｕｉｌａ’ｓ　ＱＳ２１　ｓｔｉｍｕｌｏｎからなる群から選択される。別のさらなる実施形態では、免疫モジュレーターまたはアジュバントは、ポリ－ＩＣＬＣである。

【０３０６】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、細胞における自然免疫応答を阻害する小分子、例えば、クロロキン（ＴＬＲシグナル伝達阻害剤）および２－アミノプリン（ＰＫＲ阻害剤）であり、少なくとも１つの本明細書に開示されるｒＡＡＶを含む組成物と組み合わせて投与することもできる。市販のＴＬＲシグナル伝達阻害剤の一部の非限定的な例としては、ＢＸ７９５、クロロキン、ＣＬＩ－０９５、ＯｘＰＡＰＣ、ポリミキシンＢ、およびラパマイシン（ＩＮＶＩＶＯＧＥＮ（商標）からの購入品についてすべて利用可能

）が挙げられる。加えて、パターン認識受容体（ＰＲＲ）の阻害剤（自然免疫シグナル伝達に関与する）、例えば、２－アミノプリン、ＢＸ７９５、クロロキン、およびＨ－８９は、本明細書に開示されるｉｎ　ｖｉｖｏタンパク質発現のための本明細書に開示される少なくとも１つのｒＡＡＶベクターを含む組成物および方法において使用することもできる。

【０３０７】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ＮＬＲＸ１などの自然免疫の負の調節因子をコードすることもできる。したがって、一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、必要に応じて、ＮＬＲＸ１、ＮＳ１、ＮＳ３／４Ａ、またはＡ４６Ｒの１つもしくは複数、またはその任意の組合せをコードすることもできる。加えて、一部の実施形態では、本明細書に開示される少なくとも１つのｒＡＡＶベクターを含む組成物は、組織または対象により発生する自然免疫応答を回避するために、自然免疫系の阻害剤をコードする合成改変ＲＮＡを含むこともできる。

【０３０８】

一部の実施形態では、本明細書に開示される投与方法における使用のための免疫モジュレーターは、免疫抑制剤である。本明細書で使用される場合、「免疫抑制薬または免疫抑制剤」という用語は、正常な免疫機能を阻害または妨げる医薬剤を含むことが意図される。本明細書に開示される方法に好適な免疫抑制剤の例としては、米国特許公開第２００２／０１８２２１１号に開示されるような、Ｔ細胞／Ｂ細胞共刺激経路を阻害する薬剤、例えば、ＣＴＬＡ４およびＢ７経路を介してＴ細胞およびＢ細胞のカップリングを妨げる薬剤が挙げられる。一実施形態では、免疫抑制剤は、シクロスポリンＡである。他の例としては、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン（rapamicin）、および抗胸腺細胞グロブリンが挙げられる。一実施形態では、免疫抑制薬は、本明細書に開示される少なくとも１つのｒＡＡＶベクターを含む組成物において投与されるか、または別々の組成物中においてであるが、本明細書に開示される投与の方法による少なくとも１つのｒＡＡＶベクターを含む組成物の投与と同時に、もしくはその前に、もしくはその後に投与することができる。免疫抑制薬は、投与の経路に適合性の製剤において投与され、所望の治療効果を達成するのに十分な投薬量で対象に投与される。一部の実施形態では、免疫抑制薬は、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターに対する寛容性を誘導するのに十分な時間、一過性に投与される。

【０３０９】

本明細書に開示される方法および組成物の任意の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターまたはｒＡＡＶゲノムを投与される対象は、免疫抑制剤も投与される。ＡＡＶを投与される患者の免疫応答の免疫抑制をもたらす様々な方法が公知である。当技術分野において公知の方法としては、プロテアソーム阻害剤などの免疫抑制剤を患者に投与することが挙げられる。例えば、これらの両方が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，１６９，４９２号および米国特許出願第１５／７９６，１３７号に開示される、当技術分野において公知の１つのそのようなプロテアソーム阻害剤は、ボルテゾミブである。一部の実施形態では、免疫抑制剤は、抗体であり得、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ｓｃｆｖ抗体または、抗体産生細胞の排除または抑制を通して免疫応答を抑制することができる分子に由来する他の抗体を含む。さらなる実施形態では、免疫抑制エレメントは、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）であり得る。そのような実施形態では、ｓｈＲＮＡのコード領域は、ｒＡＡＶカセットに含まれ、一般に、下流のポリＡテールの３’に位置する。ｓｈＲＮＡは、サイトカイン、増殖因子（トランスフォーミング増殖因子β１およびβ２、ＴＮＦならびに公然に公知の他のものを含む）などの免疫刺激剤の発現を低下または排除するように標的化し得る。

【０３１０】

そのような免疫をモジュレートする薬剤の使用は、数か月および／または数年にわたって、一例として複数の投薬（例えば、複数回投与）を使用するための能力を促進する。これは、下記に議論される複数の薬剤、例えば、複数の遺伝子をコードするｒＡＡＶベクタ

ー、または対象への複数回投与を使用して可能である。
（ｉｉ）血管拡張薬
【０３１１】
一部の実施形態では、本明細書に記載される心不全を処置するための方法および組成物は、血管拡張薬を投与することをさらに含む。一部の実施形態では、血管拡張薬は、ｒＡＡＶベクター投与の時に（すなわち、ｒＡＡＶ投与と同時に、または実質的に同時に）、ｒＡＡＶベクター投与の前に、またはｒＡＡＶベクター投与の後に投与することができる。血管拡張薬は、血管を拡大する（拡張する）ことによってｒＡＡＶベクターの送達を支援することができる。一部の実施形態では、血管拡張薬は、ｒＡＡＶベクター投与の少なくとも約１分前、少なくとも約５分前、少なくとも約１０分前、少なくとも約１５分前、少なくとも約２０分前、少なくとも約２５分前、少なくとも約３０分前、少なくとも約３５分前、少なくとも約４０分前、または４０分よりも長く前に投与される。
【０３１２】
一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、二硝酸イソソルビド（ＩＳＯＲＤＩＬ（登録商標））、ネシリチド（ＮＡＴＲＥＣＯＲ（登録商標））、ヒドララジン（ＡＰＲＥＳＯＬＩＮＥ（登録商標））、ナイトレート薬、ミノキシジル、４ＣＡＰＴＯＰＲＩＬ（商標）、ニトロ血管拡張薬（ニトログリセリン、一硝酸イソソルビド、二硝酸イソソルビド、およびニトロプルシドナトリウム、セレラキシン）、エンドセリンアンタゴニスト（例えば、エンドセリン－１（ＥＴ－１）アンタゴニスト、例えば、テゾセンタン）；他のナトリウム利尿ペプチド（例えば、ウラリチド、ＣＤ－ＮＰ）、リラキシン、センデリチド、クレビジピン、ＴＲＶ１２００２７、シナシグアト、ＢＡＹ　１０２１１８９、ＢＡＹ２８－２６６７（Ｎ）およびヘム非依存性可溶性Ｇタンパク質活性化因子）、１０２１１８９　ＣＸＬ－１０２０、アデノシン遮断薬、吸入肺血管拡張薬（ｉＰＶＤ）（例えば、ｉＮＯまたは吸入エポプロステノール）；血管拡張性変力物質（ミルリノン、ドブタミン）、［Ｐｙｒ１］アペリン－１３（例えば、El Mathari, B et al. "Apelin improves cardiac function mainly through peripheral vasodilation in a mouse model of dilated cardiomyopathy." Peptides 142 (2021): 170568を参照されたい）のいずれかから選択される少なくとも１つの血管拡張薬とともに投与することができる。血管拡張薬は、当業者に周知であり、本明細書に開示される方法および組成物における使用について包含される。本明細書に開示される方法において有用な一部の血管拡張薬は、Holt et al., Vasodilator Therapies in the Treatment of Acute Heart Failure. Curr Heart Fail Rep. 2019 Feb;16(1):32-37、Travessa AM, Menezes Falcao L. Vasodilators in acute heart failure - evidence based on new studies. Eur J Intern Med. 2018 May; 51:1-10, et al.、Levy et al., "Vasodilators in acute heart failure: review of the latest studies." Current emergency and hospital medicine reports 2.2 (2014): 126-132；Levy, et al., 2014; Vasodilators in acute heart failure: review of the latest studies. Current emergency and hospital medicine reports, 2(2), 126-132；Kumaret al., "New drugs you are going to read about: serelaxin, ularitide, TRV027." Current emergency and hospital medicine reports 3.2 (2015): 66-73.；Ibrahim N.E., et al., (2021) Diagnosis and Management of Acute Heart Failure. In: Gaggin H.K., Januzzi Jr. J.L. (eds) MGH Cardiology Board Review. Springer, Cham.に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【０３１３】
一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、血管拡張薬と一緒に、血管作用剤または血管系透過剤とともに投与することができる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、血管作用剤または血管系透過剤のみとともに投与することができる。一部の実施形態では、血管作用剤およ

び血管拡張薬は、異なる時に共投与される。例示的な血管作用剤または血管系透過剤は、限定されないが、ヒスタミン、ヒスタミンアゴニスト、血管内皮増殖因子タンパク質（ＶＥＧＦタンパク質）、セロトニン、ブラジキニン、血小板活性化因子（ＰＡＦ）、プロスタグランジンＥ１（ＰＧＥ１）、閉鎖帯毒素（ＺＯＴ）、インターロイキン２、ブラジキニン、それらのすべてがそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ１９９９０４０９４５Ａ３号、米国特許第６，８５５，７０１号に記載されている他のプラズマキニンであり得る。

ＩＩＩ．投与のための例示的なｒＡＡＶおよびｒＡＡＶゲノムエレメント

ａ．プロテインホスファターゼ活性をモジュレートする薬剤

【０３１４】

タンパク質リン酸化の増加、および増強された心機能は、効率的で非常に調節されたプロセスにおいて、プロテインホスファターゼによって反転される。ホスファターゼ１型および２型と称されるセリン／トレオニンホスファターゼの２つの主なクラスは、心筋の収縮性能を調節する（Neumann, J. et al., 1997 J Mol Cell Cardiol; 29(1): 265-72）。プロテインホスファターゼ１（「ＰＰ１」）は、心酵素活性のかなりの量を占め、調節性ホスファターゼ酵素の重要なクラスとして関係する。ＰＰ１は、膜画分およびグリコーゲン粒子と主に会合し、グリコーゲン分解およびグリコーゲン合成において重要である。これは、基質の利用能および特異性を増強する働きをする大きな非触媒性標的化サブユニットによってこれらの場所に固定される。さらにまた、この酵素は、ホスファターゼ阻害剤－１および－２の２つの熱および酸に安定なタンパク質によって調節される。ホスファターゼ阻害剤－１（「Ｉ－１」）は、主な生理学的モジュレーターであり、ＰＫＡによってトレオニン３５上でリン酸化される場合に、有効な阻害剤である（Endo, S. et al., 1996 Biochemistry; 35(16): 5220-8）。ＰＰ１の阻害は、ＰＫＡタンパク質リン酸化の作用に対してその反対のものを除去し、心臓におけるβ－アゴニスト応答の増幅をもたらす（Ahmad, Z. J. 1989 Biol Chem; 264:3859-63；Gupta, R. C. et al., 1996 Circulation; (Suppl 1):I-361）。

【０３１５】

β－受容体の脱感作によるｃＡＭＰレベルの減少（Koch, Lefkowitz et al. 2000）が、ＰＫＡの不活性化をもたらすと予想されるが、プロテインホスファターゼ１のレベルおよび活性が増加するので、プロテインキナーゼおよびホスファターゼによる心調節タンパク質リン酸化のこの微調整する調節は、心不全においてさらにより重要になる。

【０３１６】

すなわち、ホスファターゼ活性は、心不全において増加する。心筋細胞におけるホスファターゼ活性（例えば、ホスファターゼ１活性）を低下させることで、心不全に関連する１つまたは複数の症状を和らげることができる。低下したホスファターゼ活性は、減弱したβ－アドレナリン応答に関連する。したがって、心臓細胞におけるホスファターゼ阻害剤の発現を使用して、心障害、例えば、心不全を処置することができる。ホスファターゼ活性を減少させることで、β－アドレナリン応答を改善することができる。

【０３１７】

したがって、本開示の一態様は、ＰＫＣ－αのリン酸化活性の阻害剤を発現するｒＡＡＶベクターを投与することを含む心不全を有する対象を処置する方法である。

【０３１８】

一実施形態では、ホスファターゼ活性は、１型ホスファターゼ（ＰＰ１）を阻害することによって減少させることができる。１型ホスファターゼとしては、限定されるものではないが、ＰＰ１ｃα、ＰＰ１ｃβ、ＰＰ１ｃδおよびＰＰ１ｃγが挙げられる。Sasaki et. al. (1990) Jpn J Cancer Res. 81: 1272-1280を参照されたく、この内容は、参照により本明細書に組み込まれる。ホスファターゼ阻害剤－１（または「Ｉ－１」）タンパク質は、１型ホスファターゼの内因性阻害剤である。Ｉ－１のレベルまたは活性を増加させることで、不全のヒト心筋細胞においてβ－アドレナリン応答を復元することができる。

【０３１９】
具体的な実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、構成的に活性なＩ－１タンパク質をコードする核酸を含む。１つのそのようなｒＡＡＶベクターは、Ｉ－１Ｔ３５Ｄをコードする核酸を含み、これは、最初の６５アミノ酸をコードするＩ－１　ｃＤＮＡのトランケーション、ＰＫＡリン酸化部位（ＧＧＴ：Ｔｈｒ３５）をアスパラギン酸（ＧＴＣ：Ａｓｐ３５）で置き換えるヌクレオチド変化の導入を含み、構成的に活性な阻害剤をもたらす。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、構成的に活性なＩ－１タンパク質をコードする核酸構築物を含み、ここで、トレオニン３５は、アスパラギン酸の代わりにグルタミン酸で置き換えられている。これらの置換は、全長阻害剤分子において行うこともできる。Ｉ－１Ｔ３５Ｄを発現する不全のヒト心筋細胞は、基本条件下で正常な収縮機能を示し、それらのベータアドレナリン作動機能が正常まで復元される。したがって、阻害剤－１の送達は、機能を完全に復元し、前から存在する心不全の状況でリモデリングを反転する。

【０３２０】
本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、他のホスファターゼ阻害剤およびＩ－１の他のバリアントをコードする核酸配列を含むことができる。例えば、一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、ホスファターゼ阻害剤２（ＰＰ２）；オカダ酸またはカリクリン；およびプロテインホスファターゼ１の内因性核阻害剤であるｎｉｐｐｌから選択されるいずれか１つまたは複数の阻害剤をコードする核酸を含むことができる。一実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、プロテインホスファターゼ１（ＰＰ１）に特異的なホスファターゼ阻害剤をコードする核酸を含む。心活性をモジュレートするタンパク質の例としては、限定されるものではないが、ホスファターゼ活性をモジュレートするタンパク質（例えば、ホスファターゼ１型阻害剤、例えば、Ｉ－１）、または筋小胞体Ｃａ２＋　ＡＴＰａｓｅ（ＳＥＲＣＡ）、例えば、ＳＥＲＣＡ１（例えば、１ａまたは１ｂ）、ＳＥＲＣＡ２（例えば、２ａまたは２ｂ）、もしくはＳＥＲＣＡ３が挙げられる。

【０３２１】
一部の実施形態では、本明細書に記載される技術の実施形態による処置の方法は、ホスファターゼ阻害剤－１タンパク質の突然変異形態をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの対象の心臓細胞への導入を含み、突然変異形態は、野生型のＰＫＣ－αリン酸化部位である位置に少なくとも１つのアミノ酸を含み、ここで、少なくとも１つのアミノ酸が、構成的にリン酸化されないか、または突然変異形態において非リン酸化状態を模倣する。

（ｉ）プロテインホスファターゼ１（ＰＰ１）の阻害剤としてのホスファターゼ阻害剤タンパク質－１（Ｉ－１）および構成的に活性なＩ－１（Ｉ－１ｃ）

【０３２２】
ホスファターゼ阻害剤タンパク質－１（Ｉ－１）は、心収縮性の重要な調節因子である。１型ホスファターゼとしても公知のＩ－１（ＰＰ１またはＰＰ－１）は、プロテインホスファターゼ－１（「ＰＰ－１」）の活性を阻害することによって心収縮性を調節することが公知である。ＰＰ－１を阻害するＩ－１の能力は、リン酸化によって調節されることがさらに公知である。Ｉ－１のトレオニン３５がプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）によってリン酸化される場合に、ＰＰ－１活性が阻害され、心収縮性が増強される（Pathak, A., et al. 2005 Circ Res 15:756'-66）。

【０３２３】
一実施形態では、ホスファターゼ活性は、１型ホスファターゼ（ＰＰ１）を阻害することによって減少させることができる。１型ホスファターゼとしては、限定されるものではないが、ＰＰ１ｃα、ＰＰ１ｃβ、ＰＰ１ｃδおよびＰＰ１ｃγが挙げられる。Sasaki et. al. (1990) Jpn J Cancer Res. 81: 1272-1280を参照されたく、この内容は、参照により本明細書に組み込まれる。ホスファターゼ阻害剤－１（または「Ｉ－１」）タンパク質は、１型ホスファターゼの内因性阻害剤である。Ｉ－１のレベルまたは活性を増加させることで、不全のヒト心筋細胞においてβ－アドレナリン応答を復元する

ことができる。

【０３２４】

具体的な実施形態では、構成的に活性なＩ－１タンパク質を投与することができる。本明細書に例示される１つのそのような構築物（Ｉ－１Ｔ３５Ｄ）は、最初の６５アミノ酸をコードするＩ－１　ｃＤＮＡのトランケーション、ＰＫＡリン酸化部位（ＧＧＴ：Ｔｈｒ３５）をアスパラギン酸（ＧＴＣ：Ａｓｐ３５）で置き換えるヌクレオチド変化の導入を伴い、構成的に活性な阻害剤をもたらす。構成的に活性な阻害剤を作製する別の方法は、トレオニン３５を、アスパラギン酸の代わりにグルタミン酸で置換することである。これらの置換は、全長阻害剤分子において行うこともできる。Ｉ－１Ｔ３５Ｄを発現する不全のヒト心筋細胞は、基本条件下で正常な収縮機能を示し、それらのベータアドレナリン作動機能が正常まで復元される。したがって、阻害剤－１の送達は、機能を完全に復元し、前から存在する心不全の状況でリモデリングを反転する。

【０３２５】

Ｉ－１をコードする核酸は、以下の通り示される：

【化１－１】

```
agtgtccccg gagccgcgag ctgggagcgc tgtgccggga gccgggagcc gagcgcgccg 60
ggctggggcc ggggccggag cggagcggag agggagcgcg cccgccccag ccccgagtcc 120
cgccgccttc cctcccgccg cagcgcgggc ccaccggccg ccgccccagc catggagcaa 180
gacaacagcc cccaaaagat ccagttcacg gtcccgctgc tggagccgca ccttgacccc 240
```

【化１－２】

```
gaggcggcgg agcagattcg gaggcgccgc cccacccctg ccaccctcgt gctgaccagt 300
gaccagtcat ccccagagat agatgaagac cggatcccca acccacatct caagtccact 360
ttggcaatgt ctccacggca acggaagaag atgacaagga tcacacccac aatgaaagag 420
ctccagatga tggttgaaca tcacctgggg caacagcagc aaggagagga acctgagggg 480
gccgctgaga gcacaggaac ccaggagtcc cgcccacctg ggatcccaga cacagaagtg 540
gagtcaaggc tgggcacctc tgggacagca aaaaaaactg cagaatgcat ccctaaaact 600
cacgaaagag gcagtaagga acccagcaca aaagaaccct caacccatat accaccactg 660
gattccaagg gagccaactc ggtctgagag aggaggaggt atcttgggat caagactgca 720
gtttgggaat gcatggacac cggatttgtt tcttattcct tcacttttgg ggaaaatctc 780
ttgtttttaa aaagtgataa atttggtgtt aggtccttgg cactttcctt cttttccaac 840
tgggagaatc ctttctccct gccttcttgc cctgccctct ctgtagcccc caccctcctg 900
ccaagctgcc tctgggaagg aagaaacagg agctaggcag aagccttgag cagggaagag 960
ttcttccctt agccctgact ttacttgctg tgggaagaga gatgagggtc agataggtgg 1020
gaggactaac ttccagggtg ccaagaagga agaaaagccc caggttctct tttcttattg 1080
aggaacgatc cgaccacctc acaggcctgc cctgcagctg gaagactcgg cgctctaagg 1140
cctgtgccgt gtccagctgt gactgtgcgg tgggctccat ctgctggaca aaaggggaac 1200
tgcaccatgg cacttggccc atgggaaaga gggtgtggtg gtgtgccaat acctcctcgc 1260
ctgccctcca agccccagct gccttccttt tggattccca agcttcagga tgtgttccct 1320
cttccagctg tgggaccgct gtcccttatt tcaacccgtt agcaacaatg gatagagaac 1380
acagtggcta ttaatgaaga ggcccatgct ggagactgga agggttccct tgtcctagac 1440
attgaggggc ccagataaga ccaaaaccaa gcataagaga agaaactgtc tcagatctca 1500
cggccaggcc tctctcctgc tgctgttttt gattttccca ggtagtggga gagaggaaag 1560
gagggaaggc aagattcttt ccccctccct gctgaagcat gtggtacaga ggcaagagca 1620
gagcctgaga agcgtcaggt cccacttctg ccatgcagct actatgagcc ctcggggcct 1680
cctcctgggc ctcagcttgc ccagatacat acctaaatat atatatatat atatgaggga 1740
gaacgcctca cccagatttt atcatgctgg aaagagtgta tgtatgtgaa gatgcttggt 1800
caacttgtac ccagtgaaca cacaaaaaaa aaaaaaaaa                        1839
```

（　配列番号　２）

【０３２６】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、アミノ酸の配列番号１のＩ－１もしくはＩ－１ｃタンパク質、または配列番号１の改変バリアントをコードする核酸配列を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号２またはその断片の核酸配列を含み、配列番号２の断片は、配列番号１のアミノ酸１～６５、または配列番号１のアミノ酸１からＣ末端アミノ酸７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４までの断片をコードし、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ｉｎ　ｖｉｖｏでの増強された発現のため、および／またはＣｐＧアイランドを低下させるように、および／または自然免疫応答を低下させるように、コドン最適化された核酸配列であるＩ－１またはＩ－１ｃタンパク質をコードする核酸配列を含む。本明細書に開示される方法およびｒＡＡＶ組成物における使用のために包含される例示的なコドン最適化されたＩ－１またはＩ－１ｃ核酸配列を使用することができ、あるいは当技術分野において公知の方法によりコドン最適化されている、配列番号２もしくはその部分、または配列番号３８５～４１２と少なくとも６０

％、または７０％、または８０％、８５％、または９０％、または９５％、または９８％、または９９％の配列同一性を有する核酸配列を使用することができ、あるいは配列番号２または３８５～４１２のいずれかと少なくとも８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有する核酸配列を使用することができる。

【０３２７】

加えて、一部の実施形態では、本明細書に開示される方法およびｒＡＡＶ組成物における使用のために包含されるＩ－１またはＩ－１ｃ核酸配列は、以下の改変の少なくとも１つまたは複数によりさらに改変される：（ｉ）代替リーディングフレームの少なくとも１つもしくは２つ、または一部の実施形態では、すべての除去、（ｉｉ）１つまたは複数のＣｐＧアイランドの除去、（ｉｉｉ）コザック配列の改変、（ｉｖ）翻訳終結配列の改変、ならびに（ｖ）プロモーターおよびコザック配列の間のスペーサーの除去。

【０３２８】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ＡＡＶによって発現されるヒトＩ－１タンパク質は、コドン最適化された核酸配列、例えば、配列番号３８５～４１２のいずれかから選択される配列によってコードされる。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ＡＡＶベクターによって発現されるＩ－１タンパク質は、配列番号３８５～４１２と少なくとも６０％、または７０％、または８０％、８５％、または９０％、または９５％、または９８％、または９９％の配列同一性を有する核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、配列番号３８５～４１２と少なくとも６０％、または７０％、または８０％、８５％、または９０％、または９５％、または９８％、または９９％の配列同一性を有するそのような核酸配列は、本明細書の実施例に開示されるｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイを使用して、または不全の心臓からの心筋細胞（例えば、不全の左室（ＬＶ）からの組織）を使用して、評価することができ、ここで、ＰＰ１活性は、基質として３２Ｐ標識されたウサギグリコーゲンホスホリラーゼを用いてアッセイすることができる。Ｉ－１のリン酸化状態を維持するために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるCarr, et al. "Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function." Molecular and cellular biology 22.12 (2002): 4124-4135に開示されるように、ＰＰ２Ａ（オカダ酸、４ｎＭ）およびカルシニューリンホスファターゼ（ＥＤＴＡ、０．５ｍＭ）阻害剤を、組織抽出物の調製および酵素反応に含めることができる。

【０３２９】

一部の実施形態では、配列番号３８５～４１２と少なくとも６０％、または７０％、または８０％、８５％、または９０％、または９５％、または９８％、または９９％の配列同一性を有するそのような核酸配列は、本明細書の実施例に開示され、およびPatkak et alに開示されるｉｎ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイを使用して、例えば、非侵襲性心エコー検査および心エコー評価によりｉｎ ｖｉｖｏで心機能を評価することによって評価することもでき、ｉｎ ｖｉｔｒｏ収縮性は、ランゲンドルフ灌流システムを使用して調べた。マウス心臓におけるカテーテル法（catheritization）および圧力－体積ループ測定を、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPatjak, et al. "Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1." Circulation research 96.7 (2005): 756-766に開示されているようにして、行うこともできる。

【０３３０】

Ｉ－１のアミノ酸配列は以下の通りである：

【化２】

MEQDNSPQKIQFTVPLLEPH LDPEAAEQIRRRRP**T**PATLV LTSDQSSPEIDEDRIPNPHL

KSTLAMSPRQRKKMTRITPT MKELQMMVEHHLGQQQQGEE PEGAAESTGTQESRPPGIPD

TEVESRLGTSGTAKKTAECI PKTHERGSKEPSTKEPSTHI PPLDSKGANSV* （ 配列番号 1）

【０３３１】

減少したプロテインホスファターゼ１活性の長期間のｉｎ ｖｉｖｏ効果を決定するために、我々は、心筋細胞に制限された様式で、構成的に活性なトランケートされた阻害剤－１（Ｉ１ｃ）を発現させた。阻害剤－１のこの形態は、それが、ネイティブリン酸化阻害剤よりも高い濃度であるが、プロテインホスファターゼ１を特異的に阻害するという理由で選択した。

【０３３２】

したがって、一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含み、ここで、配列番号１の３５位のトレオニンは、アスパラギン酸で置き換えられており（Ｔ３５Ｄ）、前記核酸配列は、本明細書の表２Ａ、３または４に開示される心特異的プロモーターに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、Ｉ－１タンパク質またはその機能的バリアントは、既存の心不全を有する対象において、心収縮性を増加させ、心リモデリングに関連する形態学的悪化を低下させるのに有効な量で、対象の心臓において発現される。

【０３３３】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、Ｉ－１（Ｉ－１ｃ）の構成的に活性な断片をコードする核酸配列を含み、ここで、Ｉ－１ｃは、配列番号１のアミノ酸を含むポリペプチドであり、ここで、配列番号１は、アミノ酸７０、６７、６６、６５、または６１、または５４のＣ末端でトランケートされており、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）。

【０３３４】

Ｉ－１ポリペプチドは、米国特許第９，１１４，１４８号に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、Ｉ－１ポリペプチドは、分泌シグナル（ＳＳ）を含むことができる。一部の実施形態では、当業者は、分泌シグナルペプチド（ＳＳ）であるＩ－１またはＩ－１ｃの特定の位置が融合され得ることを理解し得る。したがって、一態様では、本発明は、配列番号１のヒトＩ－１のアミノ酸１で始まり、アミノ酸７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４で終わるＩ－１タンパク質、または配列番号１の３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）配列番号１の改変Ｉ－１タンパク質に関する。

【０３３５】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ＡＡＶによって発現されるヒトＩ－１タンパク質は、配列番号１またはその断片もしくはバリアントのアミノ酸、例えば、配列番号１の残基７０、６７、６６、６５、または６１、または５４で始まるＩ－１タンパク質を含む。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターによって発現されるＩ－１タンパク質は、配列番号１の７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４のいずれか１つで始まるアミノ酸、またはアミノ酸７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４で始まる配列番号１と少なくとも６０％、もしくは７０％、もしくは８０％、８５％、もしくは９０％、もしくは９５％、もしくは９８％、もしくは９９％同一のタンパク質を含む。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、ｒＡＡＶによって発現されるＩ－１タンパク質は、配列番号１の残基７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４で始まるアミノ酸、またはそれと少なくとも６０％、もしくは７０％、もしくは８０％、８５％、もしくは９０％、もしくは９５％、もしくは９８％、もしくは９９％同一のタンパク質を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターによって発現されるＩ－１タンパク質は、配列

番号１のいずれかの残基７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４で始まるアミノ酸であって、配列番号１の３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）アミノ酸、またはそれと少なくとも６０％、もしくは７０％、もしくは８０％、８５％、もしくは９０％、もしくは９５％、もしくは９８％、もしくは９９％同一のタンパク質を含む。

（ｉｉ）異なるｒＡＡＶベクター構築物およびＩ－１ｃの評価

【０３３６】

一部の実施形態では、ホスファターゼ酵素活性に対する本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの効果は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで評価することができる。例えば、プロテインホスファターゼ１活性は、（Endo, S., et al. (1996) Biochemistry 35, 5220-5228）に記載されるように、５０ｍＭのＴｒｉｓ．ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１ｍＭのＤＴＴ、０．５ｍＭのＭｎＣｌ２、１０μＭの［３２Ｐ］ホスホリラーゼａ、および０．５μｇ／ｍｌのＰＰ１を含有する３０μｌの反応混合物中でアッセイすることができる。反応を、アッセイ構成要素の残りを含有する２０μｌのアッセイ混合物への１μｌのＰＰ１の添加によって開始する。３０℃で２０分後、反応を、アッセイ混合物に１０μｌの５０％のトリクロロ酢酸を添加することによって終了させる。次いで、アッセイ混合物を、氷上で冷却し、遠心分離する。上清からの２０μｌのアリコートを、濾紙上にスポットし、シンチレーションカウンターにセットして、放出された［３２Ｐ］Ｐｉの量を決定した。ＰＰ１アッセイのために使用した［３２Ｐ］ホスホリラーゼは、記載されるようにして、３０℃で３０分間、調製した。［３２Ｐ］ホスホリラーゼを、５０ｍＭのＴｒｉｓ．ＨＣｌ、ｐＨ ７．４、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＤＴＴ中で透析し、使用まで－８０℃で凍結保管した（Huang et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 May 23; 97(11):5824-9も参照されたい）。

【０３３７】

ＰＰ１の阻害剤、例えば、Ｉ－１、Ｉ－１ｃ、またはそのバリアントを発現する本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターの有効性は、様々な濃度の試験化合物を使用して得られるデータから用量応答曲線を作成することによって評価することができる。また、対照アッセイを行って、比較のためのベースラインを提供することもできる。対照アッセイでは、心臓細胞を、試験化合物の非存在下でインキュベートする。

【０３３８】

表１７に、任意の限定に解釈されないが、Ｉ１ｃ遺伝子をコードする例示的な核酸配列（配列番号３８５～４１２）を示し、ｒＡＡＶベクターは、配列番号４１３～４４０のいずれかから選択される核酸配列を含むことができ、これは、Ｉ－１ｃ核酸、ならびに左および右ＩＴＲ配列内で隣接する他の構成要素、または配列番号４１３～４４０と少なくとも８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の同一性を有する核酸配列を含む。本明細書で有用な例示的な閉鎖末端線状二重鎖は、配列番号３５７～３８４のいずれかから選択される核酸配列、またはそれと少なくとも８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の同一性を有する核酸を含むことができる。

【表１７－１】

ITR-ITR＋骨格	I-1c	左 ITR- 右 ITR
配列番号 357	配列番号 385	配列番号 413
配列番号 358	配列番号 386	配列番号 414
配列番号 359	配列番号 387	配列番号 415
配列番号 360	配列番号 388	配列番号 416
配列番号 361	配列番号 389	配列番号 417
配列番号 362	配列番号 390	配列番号 418
配列番号 363	配列番号 391	配列番号 419
配列番号 364	配列番号 392	配列番号 420
配列番号 365	配列番号 393	配列番号 421

【表１７－２】

配列番号 366	配列番号 394	配列番号 422
配列番号 367	配列番号 395	配列番号 423
配列番号 368	配列番号 396	配列番号 424
配列番号 369	配列番号 397	配列番号 425
配列番号 370	配列番号 398	配列番号 426
配列番号 371	配列番号 399	配列番号 427
配列番号 372	配列番号 400	配列番号 428
配列番号 373	配列番号 401	配列番号 429
配列番号 374	配列番号 402	配列番号 430
配列番号 375	配列番号 403	配列番号 431
配列番号 376	配列番号 404	配列番号 432
配列番号 377	配列番号 405	配列番号 433
配列番号 378	配列番号 406	配列番号 434
配列番号 379	配列番号 407	配列番号 435
配列番号 380	配列番号 408	配列番号 436
配列番号 381	配列番号 409	配列番号 437
配列番号 382	配列番号 410	配列番号 438
配列番号 383	配列番号 411	配列番号 439
配列番号 384	配列番号 412	配列番号 440

【０３３９】

動物モデル

【０３４０】

心血管遺伝子治療の研究の成功のための重要な要件は、（１）増加した血流および／または収縮機能についての機構に関する有用なデータを提供し得る臨床心血管疾患に適用可能な動物モデルの構成、ならびに（２）遺伝子移入の効果の正確な評価である。したがって、一部の実施形態では、ブタモデルを使用することができる。ブタは、ヒト生理学とのその関連性を理由として、ヒトの心臓疾患を含む心血管状態を研究するための特に好適なモデルである。ブタの心臓は、以下の点で、ヒトの心臓とよく似ている。ブタは、ヒトのものと非常に類似するネイティブ冠循環を有し、ネイティブ冠側副血管の相対的欠如を含む。第２に、総体重のパーセンテージとしてのブタの心臓のサイズは、ヒトの心臓のものと類似する。加えて、ブタは、大型動物モデルであり、したがって、様々なパラメーター、例えば、有効なベクター投薬量、毒性などのより正確な外挿を可能にする。対照的に、イヌおよびネズミ科のメンバーなどの動物の心臓は、多くの内因性側副血管を有する。加えて、総体重に対して、イヌの心臓のサイズは、ヒトの心臓のものの２倍である。

【０３４１】

例示的なブタモデルは、心筋虚血ブタモデルであり、これは、臨床冠動脈疾患を模倣し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国出願第２００３／０１４８９６８号に記載されている。公開された研究に基づいて、当業者は、ブタモデルにおける結果が、

ヒトの結果の予測であると予想されることを理解するであろう。
【０３４２】
米国出願第２００３／０１４８９６８号の実施例１に記載される別の動物モデルを使用することもでき、これは、臨床うっ血性心不全において観察されるものなどの拡張型心筋症を誘導する。
【０３４３】
したがって、これらのモデルを使用して、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクター、および／またはＰＰ１の阻害剤（例えば、Ｉ－１、Ｉ－１ｃまたはそのバリアント）、および／または別の治療用タンパク質（例えば、血管新生タンパク質またはペプチド）をコードするｒＡＡＶベクターの投与の方法が、これらの状態に関連する少なくとも１つの心機能不全を軽減するのに有効であるかを決定することができる。これらのモデルは、うっ血性心不全および心室リモデリングの処置のためのｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子治療の有効性を評価するためのパラメーターの一部を提供するのに特に有用である。
（ｉｉｉ）心不全の処置のためのｒＡＡＶベクターによって発現される他の薬剤
【０３４４】
一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、他のホスファターゼ阻害剤、およびＩ－１の他のバリアントを発現することができる。そのような他の阻害剤の例としては、ホスファターゼ阻害剤２；オカダ酸またはカリクリン；およびプロテインホスファターゼ１の内因性核阻害剤であるｎｉｐｐｌが挙げられる。一実施形態では、ホスファターゼ阻害剤は、プロテインホスファターゼ１に特異的である。
【０３４５】
一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、心不全を処置する他の治療剤、例えば、アデニリルシクラーゼ６（ＡＣ６、アデニリル（adnenylyl）シクラーゼＶＩとも称される）、Ｓ１００Ａ１、β－アドレナリン受容体キナーゼ－ｃｔ（βＡＲＫｃｔ）、筋小胞体／小胞体（ＳＲ）Ｃａ－ＡＴＰａｓｅ（ＳＥＲＣＡ２ａ）、ＩＬ－１８、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦ活性化因子、ウロコルチン、およびＢ細胞リンパ腫２（Ｂｃｌ２）関連アタノジーン（anthanogene）－３（ＢＡＧ３）を発現することができる。
【０３４６】

【表１８Ａ－１】

表 18A:本明細書に開示される合成心特異的プロモーターを含む rAAV ベクターによってコードされる例示的な遺伝子。

タンパク質	mRNA 配列 ID	配列番号	転写バリアントのアミノ酸
VEGF (VEGF-A)	NM_001025366	450	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 95-99 および 140-151 を参照されたい
アクチビン A	NM_001105	451	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 152 を参照されたい
アクチビン B	NM_002193.2	452	N/A
インスリン様増殖因子(IGF1)	NM_000618	453	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 153-155 を参照されたい
骨形態形成タンパク質	NM_006132	454	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 156-157 を参照されたい
線維芽細胞増殖因子	NM_000800	455	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 158-162 を参照されたい
血小板由来増殖因子	NM_002607	456	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 163 を参照されたい
インスリン、白血病抑制因子(LIF)	NM_002309	457	N/A
上皮増殖因子(EGF)	NM_001178130	458	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 164-165 を参照されたい
TGF アルファ	NM_001099691	459	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 166 を参照されたい
TDGF1	NM_003212	460	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 167 を参照されたい
vWF	NM_000552	461	N/A
GATA-4	NM_002052	462	N/A
Nkx2.5	NM_001166175	463	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 168-169 を参照されたい
Mef2-C	NM_002397	464	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 170-174 を参照されたい
LGMD-2B; 肢帯型ジストロフィー 2B (ジスフェリン)	NM_003494	465	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 175-187 を参照されたい
ジストロフィン(DMD)	NM_004006	466	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 188-204 を参照されたい
エメリン(EMD)	NM_000117	467	N/A
ラミン A/C	NM_170707	468	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 205-206 を参照されたい

【表１８Ａ－２】

アルファ-1 抗トリプシン(A1AT)	NM_001002235	469	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 207-216 を参照されたい
CFTR	NM_000492	470	N/A
ANG	NM_001097577	471	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 217 を参照されたい
プレセニリン(PSEN2)	NM_000447	472	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 218 を参照されたい
Isl1	NM_002202	473	N/A
SERCA 1a (ATP2A1)	NM_004320	474	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 219 を参照されたい
SERCA2a (ATP2A2)	NM_001681	475	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 220 を参照されたい
ホスホランバン(PLN)	NM_002667	476	N/A
βARK (ADRBK1, GRK2, BARK1)	NM_001619	477	N/A
ベータ-アドレナリン受容体 (ADRB1)	NM_000684	478	N/A
Akt (AKT1)	NM_005163	479	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 221-222 を参照されたい
アデニリルシクラーゼ VI (ADCY6)	NM_020983	480	223
FGF 1	NM_000800	481	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 241-245 を参照されたい
FGF 2 (FGFB)	NM_002006	482	N/A
FGF 4	NM_002007	483	N/A
FGF 5	NM_004464	484	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 246 を参照されたい
HGF	NM_000601	485	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 247-250 を参照されたい
Ang1 (ANGPT1; アンジオポエチン 1)	NM_001146	486	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 251, 353-354 を参照されたい
MGP1 (基質 Gla タンパク質)	NM_000900	487	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 252 を参照されたい
OMG (オリゴデンドロサイトミエリン糖タンパク質)	NM_002544	488	N/A
G-CSF (CSF3; コロニー刺激因子 3)	NM_172220	489	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 253-255 を参照されたい
PDGF (PDGFA)	NM_002607	490	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 256 を参照されたい

【表１８Ａ－３】

IGF1	NM_000618	491	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 257-259 を参照されたい
IGF2	NM_000612	492	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 260-261 を参照されたい
EGR1	NM_001964	493	N/A
Prax1 (ベンゾジアゼピン受容体関連タンパク質 1; BZRAP1; PRAX-1, KIAA0612)	NM_004758	494	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 262 を参照されたい
ニューレグリン 1 (NRG1, GGF)	NM_001159995	495	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 263-278 を参照されたい
ErbB4 (ERBB4)	NM_001042599	496	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 279 を参照されたい
ペリオスチン(POSTN)	NM_006475	497	米国特許第 10/086,043 号の 280-282
HAND1	NM_004821	498	N/A
E2F4	NM_001950	499	N/A
Skp2	NM_005983	500	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 283-284 を参照されたい
Akt1	NM_005163	501	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 285-286 を参照されたい
BAG3	NM_004281	502	
I-1 (WT)	配列番号 1	1	
I-1c	I-1c (T35D)	507	
トランケート I-1c (aa1-54;T35D)	I-1c (1-54)(T35D)	527	
トランケート I-1c (aa1-61;T35D)	I-1c (1-61)(T35D)	528	
トランケート I-1c (aa1-66;T35D)	I-1c (1-66)(T35D)	529	
トランケート I-1c (aa1-67;T35D)	I-1c (1-67)(T35D)	530	
トランケート I-1c (aa1-70;T35D)	I-1c (1-77)(T35D)	531	
トランケート I-1c (aa1-77;T35D)	I-1c (1-77)(T35D)	532	
β-アドレナリン受容体キナーゼ-- カルボキシル末端(βARKct),	NM_001619	503	βARK1 の c 末端の最後の 194aa (NM_001619)
S100A1	NM_006271	504	

【表１８Ａ－４】

IL-18 結合タンパク質(IL-18BP)	米国特許第 7,799,541 号の配列番号 1	505	WO 99/09063 号および US9,566,313 号, US20140112915 号に開示される通り
ウロコルチン(UCN)	NM_003353	506	

【０３４７】

【表１８Ｂ】

表 18B:不整脈または筋症の処置のための rAAV ベクターによって発現される例示的な治療剤

タンパク質	mRNA 配列 ID	配列番号	転写バリアント 配列番号
HERG (LQT2, 短 QT - Ikr, Kv11.1; KCNH2)	NM_000238	508	2 例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 87-289 を参照されたい
KCNQ1 (LQT - Iks; KCNA9)	NM_000218	509	N/A
SCN5A (LQT3, ブルガダ)	NM_198056	510	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 290-294 を参照されたい
ANK2 (アンキリン B; LQT4)	NM_001148	511	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 295-296 を参照されたい
KCNE1 (LQT5; MinK, ISK, JLNS2)	NM_000219	512	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 297-299 を参照されたい
KCNE2 (LQT6; MiRP1)	NM_172201	513	N/A
KCNJ2 (LQT7, 短 QT; Kir2.1, IRK1)	NM_000891	514	N/A
CACNA1c (LQT8, ブルガダ; Cav1.2, CACH2, CACN2, TS)	NM_000719	515	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 300-321 を参照されたい
SCN4B (LQT10)	NM_001142348	516	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 322-323 を参照されたい
SERCA (CPVT; APT2A1)	NM_004320	517	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 324 を参照されたい
KCNQ2 (短 QT; Kv7.2, ENB1, BFNC, KCNA11, HNSPC)	NM_172109	518	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 325-328 を参照されたい
SCN1B (ブルガダ)	NM_001037	519	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 329 を参照されたい
KCNE3 (ブルガダ; MiRP2, HOKPP)	NM_005472	520	N/A
ネブリン(NEB) (ネマリンミオパチー)	NM_004543	521	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 330-331 を参照されたい
MTM1 (ミオチューブラリン 1) (X 連鎖性筋細管ミオパチー)	NM_000252	522	N/A
ラミン A/C (LMNA; LMN1; PRO1; LMNL1)	NM_170707	523	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 332-333 を参照されたい
エメリン(EMD)	NM_000117	524	N/A
デスミン(DES; CMD1I, CSM1, CSM2)	NM_001927	525	N/A
デルタ-サルコグリカン(SGCD; DAGD, LGMD2F, CMD1L)	NM_000337	526	例えば、米国特許第 10/086,043 号の配列番号 334-335 を参照されたい

【０３４８】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、参照によりその全体が組み込まれる米国特許第１０／０８６，０４３号の表１、２、３、４、５、６または７に開示される核酸配列をコードする。

【０３４９】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物における使用のためのｒＡＡＶベクターは、表１８Ａまたはそのバリアントに開示されるタンパク質をコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列は、配列番号１、４５０～５０７、もしくは５２７～５３２、または配列番号１、４５０～５０７、もしくは５２７～５３２のいずれかと少な

くとも８０％、もしくは少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性を有するそのバリアントのいずれかから選択される。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物における使用のためのｒＡＡＶベクターは、表１８Ａのいずれかから選択されるタンパク質またはタンパク質のバリアントをコードするコドン最適化された核酸配列を含み、ここで、コドン最適化された核酸配列は、配列番号１、４５０～５０７、または５２７～５３２のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列であり、配列番号１、４５０～５０７、または５２７～５３２と少なくとも６０％、または少なくとも７０％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号１、４５０～５０７、または５２７～５３２のいずれかをコードする核酸配列を含み、配列番号１、４５０～５０７、または５２７～５３２の核酸配列のＣｐＧ部位含有量に対して、少なくとも５０％、または６０％、または７０％、または７５％、８０％、８５％、９０％、９５％低下したＣｐＧ部位含有量を有するようにコドン最適化される。

【０３５０】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物における使用のためのｒＡＡＶベクターは、表１８Ｂまたはそのバリアントに開示されるタンパク質をコードする核酸配列を含み、ここで、核酸配列は、配列番号５０８～５２６、または配列番号５０８～５２６のいずれかと少なくとも８０％、もしくは少なくとも８５％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９８％の配列同一性を有するそのバリアントのいずれかから選択される。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物における使用のためのｒＡＡＶベクターは、表１８Ｂのいずれかから選択されるタンパク質またはタンパク質のバリアントをコードするコドン最適化された核酸配列を含み、ここで、コドン最適化された核酸配列は、配列番号５０８～５２６のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列であり、配列番号５０８～５２６のいずれかと少なくとも６０％、または少なくとも７０％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、配列番号５０８～５２６のいずれかをコードする核酸配列を含み、配列番号５０８～５２６の核酸配列のＣｐＧ部位含有量に対して、少なくとも５０％、または６０％、または７０％、または７５％、８０％、８５％、９０％、９５％低下したＣｐＧ部位含有量を有するようにコドン最適化される。

【０３５１】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、本明細書に定義されるように、血管新生を増加させるための核酸、例えば、血管新生タンパク質をコードする。血管新生は、一般に、血管の発生および分化を指す。典型的に「血管新生タンパク質」と称される多くのタンパク質は、血管新生を促進することが公知である。そのような血管新生タンパク質としては、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）ファミリー、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）ファミリー、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）ファミリー、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ）ファミリーなどのメンバーが挙げられる。例えば、ＦＧＦおよびＶＥＧＦファミリーメンバーは、成長および発生の間の血管新生の調節因子として認識されている。ＦＧＦおよびＶＥＧＦファミリーの血管新生活性が調べられている。例えば、成体ラットの腹腔に置かれた場合に、コラーゲンでコーティングされたマトリックス内の酸性ＦＧＦ（「ａＦＧＦ」）タンパク質が、十分な血管形成および正常な灌流構造をもたらしたことが示されている（Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7928-7932, 1989）。冠動脈閉塞の間の塩基性ＦＧＦ（「ｂＦＧＦ」）タンパク質の成体イヌ冠動脈への注射は、報告によれば、減少した心筋機能障害、より小さい心筋梗塞、および不安定な床における増加した血管分布をもたらした（Yanagisawa-Miwa et al., Science, 257: 1401-1403, 1992）。類似の結果は、ｂＦＧＦタンパク質を使用する心筋虚

血の動物モデルにおいて報告されている（Harada et al., J. Clin. Invest., 94: 623-630, 1994；Unger et al., Am. J. Physiol., 266: H1588-H-1595, 1994）。側副血流の増加は、ＶＥＧＦタンパク質で処置されたイヌにおいて示された（Banai et al. Circulation 89: 2183-2189, 1994）。

【０３５２】

一部の実施形態では、心特異的プロモーターを含む本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、例えば、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－４、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦおよび／もしくはＶＥＧＦ、またはそれらのバリアントなどの１つまたは複数の血管新生タンパク質またはペプチドをコードする。好適な血管新生タンパク質またはペプチドは、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ）などのファミリーのメンバーによって例示される。ＦＧＦファミリーのメンバーとしては、限定されるものではないが、ａＦＧＦ（ＦＧＦ－１）、ｂＦＧＦ（ＦＧＦ－２）、ＦＧＦ－４（「ｈｓｔ／ＫＳ３」としても公知）、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－６が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるｒＡＡＶベクターは、これらのタンパク質が、機能的分泌シグナル配列を含有し、細胞から容易に分泌されるので、ＦＧＦ－４、ＦＧＦ－５またはＦＧＦ－６などの分泌される血管新生タンパク質をコードする。大部分ではないとしても多くは、ヒトＶＥＧＦタンパク質（限定されるものではないが、ＶＥＧＦ－１２１およびＶＥＧＦ－１６５を含む）も、容易に分泌され、分泌後に拡散可能である。ＶＥＧＦは、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏで虚血に応答して心筋細胞によって発現されることが示されており、これは、生理学的条件下および病理学的状態への適応応答の間の血管新生の調節因子である（Banai et al. Circulation 89:2183-2189, 1994）。ＶＥＧＦファミリーとしては、限定されるものではないが、ＶＥＧＦ－Ａサブファミリー（例えば、ＶＥＧＦ－１２１、ＶＥＧＦ－１４５、ＶＥＧＦ－１６５、ＶＥＧＦ－１８９およびＶＥＧＦ－２０６）のメンバー、ならびにＶＥＧＦ－Ｂサブファミリー（例えば、ＶＥＧＦ－１６７およびＶＥＧＦ－１８６）およびＶＥＧＦ－Ｃサブファミリーのメンバーが挙げられる。ＰＤＧＦとしては、例えば、ＰＤＧＦ ＡおよびＰＤＧＦ Ｂが挙げられ、ＩＧＦとしては、例えば、ＩＧＦ－１が挙げられる。他の血管新生タンパク質またはペプチドは、当技術分野において公知であり、新たなものは、規則通り同定される。これらのおよび他のタンパク質、ならびに対応するアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、同様に当技術分野において公知である（例えば、ＧＥＮＢＡＮＫ配列データベースを参照されたい）。

【０３５３】

血管新生タンパク質およびペプチドは、翻訳後に活性ペプチド、ならびに血管新生タンパク質またはペプチドの「誘導体」および「機能的等価体」にプロセシングされるペプチド前駆体を含む。血管新生タンパク質またはペプチドの誘導体は、類似のアミノ酸配列を有し、関連する血管新生タンパク質またはペプチドの１つまたは複数の活性をある程度まで保持するペプチドである。当業者に周知であるように、有用な誘導体は、一般に、血管新生活性に関連するタンパク質の領域またはドメインにおいてかなりの配列類似性（アミノ酸レベルで）を有する。同様に、当業者には、「機能的等価体」が、特定の血管新生タンパク質またはペプチドの１つまたは複数の活性を置換し得る活性を有するタンパク質またはペプチドを意味することが容易に理解されるであろう。好ましい機能的等価体は、特定の血管新生タンパク質またはペプチドの活性をすべて保持するが、しかしながら、機能的等価体は、定量的に測定された場合に、野生型ペプチドまたはタンパク質よりも強いまたは弱い活性を有していてもよい。

【０３５４】

ＦＧＦファミリーの詳細については、例えば、Burgess, Ann. N.Y. Acad. Sci. 638: 89-97, 1991；Burgess et al. Annu. Rev. Biochem. 58: 575-606, 1989；Muhlhauser et al., Hum. Gene Ther. 6: 1457-1465, 1995；Zhan et al., Mol. Cell. Biol., 8: 3487, 1988；Seddon et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 638: 98-108, 1991を参照されたい。ヒトｈｓｔ／Ｋ

Ｓ３（すなわち、ＦＧＦ－４）について、Taira et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2980-2984, 1987を参照されたい。ヒトＶＥＧＦ－Ａタンパク質について、例えば、Tischer et al. J. Biol. Chem. 206: 11947-11954, 1991およびその参考文献；Muhlhauser et al., Circ. Res. 77: 1077-1086, 1995；およびＮｅｕｆｅｌｄらの ＷＯ９８／１００７１号（１９９８年３月１２日）を参照されたい。公知の血管新生タンパク質の他のバリアントは、同様に記載されており、例えば、ＶＥＧＦタンパク質およびＶＥＧＦ関連タンパク質のバリアントは、例えば、ＢａｉｒｄらのＷＯ９９／４０１９７号（１９９９年８月１２日）；およびＢｏｈｌｅｎらのＷＯ９８／４９３００号（１９９８年１１月５日）を参照されたい。血管新生タンパク質の組合せ、およびそのような組合せをコードする遺伝子送達ベクターは、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる「Ｄｕａｌ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｅ」という名称の２０００年６月３０日に出願されたＧａｏらの米国番号第０９／６０７，７６６号に記載されている。当業者にも理解されるように、血管新生タンパク質は、他の血管新生タンパク質の発現、安定性または機能性を増強することによって、血管新生を促進することができる。そのような血管新生タンパク質またはペプチドの例としては、例えば、低酸素に応答して誘導される調節因子（例えば、Ｈｉｆ－１、Ｈｉｆ－２などのような低酸素誘導性因子；例えば、Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(9): 4304-8, 1993；Forsythe et al., Mol. Cell. Biol. 16(9): 4604-13, 1996；Semenza et al., Kidney Int., 51(2): 553-5, 1997；およびO'Rourke et al., Oncol. Res., 9(6-7): 327-32, 1997を参照されたい；ならびに例えば、炎症などの心血管疾患に関連する生理学的条件によって誘導されるものなどの他の調節因子（例えば、誘導性一酸化窒素シンターゼ（ｉＮＯＳ）および構成的対応物のＣＮＯＳ；例えば、Yoshizumi et al., Circ. Res., 73(1): 205-9, 1993；Chartrain et al., J. Biol. Chem., 269(9): 6765-72, 1994；Papapetropoulos et al., Am. J. Pathol., 150(5): 1835-44, 1997；およびPalmer, et al., Am. J. Physiol., 274(2 Pt 1): L212-9, 1998を参照されたい）が挙げられる。そのような血管新生タンパク質の追加の例としては、ある特定のインスリン様増殖因子（例えば、ＩＧＦ－１）およびアンジオポエチン（Ａｎｇ）が挙げられ、これは、ＶＥＧＦなどの他の血管新生タンパク質の発現および／または活性を促進および／または刺激することが報告されている（例えば、Goad, et al, Endocrinology, 137(6):2262-68 (1996)；Warren, et al., J. Bio. Chem., 271(46):29483-88 (1996)；Punglia, et al, Diabetes, 46(10):1619-26 (1997)；ならびにAsahara, et al., Circ. Res., 83(3):233-40 (1998)およびBermont et al. Int. J. Cancer 85: 117-123, 2000を参照されたい）。同様に、肝細胞増殖因子（散乱因子とも称される）は、ｉｎ ｖｉｖｏで血管形成を誘導することが報告されており（例えば、Grant et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1937-1941, 1993を参照されたい）、ＶＥＧＦの発現を増加させることも報告されている（例えば、Wojta et al., Lab Invest. 79:427-438, 1999を参照されたい）。血管新生ポリペプチドの追加の例としては、内因性血管新生遺伝子のプロモーターとして作用する天然および合成調節ペプチド（血管新生ポリペプチド調節因子）が挙げられる。ネイティブ血管新生ポリペプチド調節因子は、内因性血管新生遺伝子の誘導因子に由来し得る。上記に記載されるＨｉｆは、他の血管新生遺伝子の発現を誘導することによって血管新生を促進することが報告されているそのような血管新生遺伝子の一実例である。合成血管新生ポリペプチド調節因子は、例えば、内因性血管新生遺伝子のコード領域の上流の配列に特異的に結合し、そのような内因性遺伝子の発現を誘導するために使用することができる、マルチフィンガージンク結合タンパク質を調製することによって設計することができる。多くの遺伝子の研究は、そのようなジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパク質の設計のための「ルール」の開発をもたらした（例えば、Rhodes and Klug, Scientific American, February 1993, pp 56-65；Choo and Klug,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(23): 11163-7, 1994；Rebar and Pabo, Science, 263(5147): 671-3, 1994；Choo et al., J. Mol. Biol., 273(3): 525-32, 1997；Pomerantz et al., Science 267: 93-96, 1995；およびLiu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 5525-5530, 1997を参照されたい）。当業者に理解されるように、血管新生を直接的にまたは間接的に促進する能力を有するタンパク質またはペプチドをコードする多くの追加の遺伝子は、規則通り同定され、新たな遺伝子は、公知の血管新生タンパク質もしくはペプチドコード遺伝子、または血管新生を促進するタンパク質もしくはペプチドをコードするそのような遺伝子の発見された能力との類似性に基づいて同定される。そのような遺伝子およびコードされるポリペプチドについての配列情報は、ＧｅｎＢａｎｋまたはＥＭＢＬなどの配列データベースから容易に入手可能である。これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドも、例えば、当技術分野においてルーチンのＰＣＲまたはハイブリダイゼーション技法を使用することによって、遺伝子ライブラリーから入手することができる。

【０３５５】

一部の実施形態では、タンパク質は、ＩＬ－１８阻害剤などのサイトカインの阻害剤であり得る。例えば、ＧＳＫ抗体のＳＧＫ－１０７０８０６抗体、ＩＬ－１８に対するヌルＣａｓ９、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、またはＩＬ－１８結合タンパク質（ＩＬ－１８ＢＰ）。ＩＬ－１８ＢＰは、ＩＬ－１８に対する高い親和性を有する可溶性タンパク質である（Ｎｏｖｉｃｋら、１９９９；ＷＯ９９／０９０６３号に開示される通り）。

【０３５６】

ＩＬ－１８ＢＰは、公知のＩＬ１８受容体の１つの細胞外ドメインではないが、分泌され、天然で環状化するタンパク質である。これは、いくつかのポックスウイルスコードタンパク質をさらに含む分泌されるタンパク質の新規ファミリーに属する（Novick et al., 1999）。尿中のおよび組換えＩＬ－１８ＢＰは、高い親和性でＩＬ－１８に特異的に結合し、ＩＬ－１８の生物学的親和性をモジュレートする。ＩＬ－１８は、高い親和性で結合し、それぞれ、遺伝子ＩＬ１８Ｒ１およびＩＬ１８ＲＡＰによってコードされるアルファおよびベータ鎖の異種複合体のＩＬ－１８受容体（ＩＬ－１８Ｒ）を通してシグナルを送る（Torigoe K et al (1997) J Biol Chem; 272(41):25737-42）。ＩＬ－１８の生物活性は、天然に存在し、非常に特異的な阻害剤であるＩＬ１８ＢＰによって負に調節される。この可溶性タンパク質は、遊離ＩＬ－１８と複合体を形成して、ＩＬ－１８受容体とのその相互作用を防止し、このようにして、その生物活性を中和および阻害する（Dinarello C A (2000) Ann Rheum Dis; 59 Suppl 1:i17-20）。ＩＬ－１８ＢＰは、ＩＬ－１８への結合の高い親和性を有する構成的に分泌されるタンパク質である。ＩＬ－１８ＢＰのバリアントの選択的ｍＲＮＡスプライシングは、４つのアイソフォームをもたらす。顕著な「ａ」アイソフォームは、ＩＬ－１８と比較して、２０倍モル過剰で、健康なヒトの血清中に存在する（Dinarello and Kaplanski (2005) Expert Rev Clin Immunol, 1(4), 619-632）。

【０３５７】

ＩＬ－１８ＢＰ遺伝子は、ヒト染色体１１ｑ１３に局在化し、膜貫通ドメインをコードするエクソンは、８．３ｋｂゲノム配列中で見られなかった。選択的ｍＲＮＡスプライシングによって作成されたＩＬ－１８ＢＰの４つのスプライスバリアントまたはアイソフォームは、これまでに、ヒトにおいて見出されている。それらは、同じＮ末端をすべて共有し、Ｃ末端において異なる、ＩＬ－１８ＢＰ　ａ、ｂ、ｃおよびｄと指定された（Novick et al, 1999）。これらのアイソフォームは、ＩＬ－１８に結合するそれらの能力で異なる。４つのうち、ｈＩＬ－１８ＢＰアイソフォームａおよびｃは、ＩＬ－１８に対する中和能力を有することが公知である。ヒトＩＬ－１８ＢＰアイソフォームは、マウスＩＬ－１８に結合する。ｒＡＡＶは、ＷＯ２０１５０３２９３２号もしくはＵＳ２０１４０１１２９１５号に開示されるＩＬ－１８阻害剤、またはその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ１９９９００９０６３号に開示されるＩＬ－１８ＢＰをコードする。

【０３５８】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、これらのそれぞれが本明細書に参照により組み込まれる、１９９７年９月に出願された米国特許出願番号第０８／９２４，７５７号（１９９７年６月１６日に出願された米国第６０／０４８，９３３号および１９９６年９月に出願された米国特許第０８／７０８，６６１号に基づく）、ならびに１９９７年９月に出願されたＰＣＴ／ＵＳ９７／１５６１０号、および１９９８年１月１６日に出願された米国継続出願第０９／００８，０９７号、および１９９９年１２月２７日に出願された米国継続出願第０９／４７２，６６７号に詳細に記載および示されているように、ベータ－アドレナリン作用性シグナル伝達タンパク質（ベーター－ＡＳＰ）（ベーター－アドレナリン受容体（ベーター－ＡＲ）、Ｇタンパク質受容体キナーゼ阻害剤（ＧＲＫ阻害剤）およびアデニリルシクラーゼ（ＡＣ）を含む）をコードして、心機能を増強することができる。

【０３５９】

一部の実施形態では、本明細書に開示される心特異的プロモーターを含むｒＡＡＶベクターは、Angeli et al., Comparative Medicine, 2009, 59(3), 272-279に開示される心筋梗塞（ＭＩ）モデルを使用して評価することができる。

ｂ．心特異的プロモーター（ＣＳＰ）

【０３６０】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心特異的プロモーターに機能的に連結された、治療剤、例えば、ＰＰ１の阻害剤または他の薬剤をコードする核酸を含む。例示的な心特異的プロモーターは、本明細書の表２Ａ、２Ｂ、３および４に開示される。一部の実施形態では、心特異的プロモーターは、合成心特異的プロモーターである。

【０３６１】

一部の実施形態では、導入遺伝子、例えば、ＰＰ１の阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）の発現の適切なレベルを達成するために、ｒＡＡＶ遺伝子型は、心特異的プロモーター（ＣＳＰ）を含む。ＣＳＰは、心臓組織における機能的に連結された遺伝子の発現を可能にし、一部の実施形態では、誘導性ＣＳＰであり得る。ある実施形態では、ＣＳＰは、５’の上流に位置し、導入遺伝子、例えば、ＰＰ１の阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）をコードする異種核酸配列に機能的に連結されている。例示的な心特異的プロモーターは、本明細書に開示され、例えば、本明細書の表１から選択されるいずれか、またはその機能的バリアントである。本明細書に開示される組成物および方法の一部の実施形態では、心特異的プロモーターとしては、心特異的シス調節エレメント（ＣＲＥ）、合成心特異的シス調節モジュール（ＣＲＭ）、または表１～３に開示される合成心特異的プロモーターが挙げられる。

【０３６２】

一部の実施形態では、ＰＰ１阻害剤の発現（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ発現）の適切なレベルを達成するために、ｒＡＡＶ遺伝子型は、心特異的プロモーター（ＣＳＰ）を含む。ＣＳＰは、心臓における機能的に連結された遺伝子の発現を可能にし、一部の実施形態では、誘導性ＣＳＰであり得る。ある実施形態では、ＣＳＰは、５’の上流に位置し、ＰＰ１阻害剤タンパク質をコードする異種核酸配列に機能的に連結されている。例示的なＣＳＰは、本明細書に開示され、例えば、本明細書の表２Ａにリストされるもの、またはその機能的バリアントを含む。本明細書に開示される組成物および方法の一部の実施形態では、心特異的プロモーターとしては、心特異的シス調節エレメント（ＣＲＥ）、合成心特異的シス調節モジュール（ＣＲＭ）、または最小心特異的プロモーターもしくは心特異的近位プロモーターのエレメントを含む合成心特異的プロモーターが挙げられる。

ｉ．心特異的プロモーター

【０３６３】

表２Ａは、本明細書に開示される方法および組成物における使用のための例示的な心特異的プロモーターの核酸配列を示す。

【表２Ａ】

表 2A:

名称	長さ	名称	長さ
SP0067 (配列番号 3)	443	SP0480 (配列番号 22)	496
SP0075 (配列番号 4)	433	SP0481 (配列番号 23)	456
SP0424 (配列番号 5)	765	SP0482 (配列番号 24)	517
SP0425 (配列番号 6)	631	SP0483 (配列番号 25)	453
SP0429 (配列番号 7)	806	SP0484 (配列番号 26)	348
SP0430 (配列番号 8)	842	SP0485 (配列番号 27)	442
SP0344 (配列番号 9)	460	SP0486 (配列番号 28)	463
SP0433 (配列番号 10)	554	SP0487 (配列番号 29)	337
SP0435 (配列番号 11)	609	SP0488 (配列番号 30)	544
SP0436 (配列番号 12)	632	SP0489 (配列番号 31)	553
SP0449 (配列番号 13)	782	SP0490 (配列番号 32)	497
SP0450 (配列番号 14)	823	SP0491 (配列番号 33)	478
SP0451 (配列番号 15)	859	SP0492 (配列番号 34)	378
SP0452 (配列番号 16)	851	SP0493(配列番号 35)	359
SP0475 (配列番号 17)	647	SP0494 (配列番号 36)	545
SP0476 (配列番号 18)	501	SP0495 (配列番号 37)	567
SP0477 (配列番号 19)	484	SP0496 (配列番号 38)	548
SP0478 (配列番号 20)	465	SP0448 (配列番号 288)	763
SP0479 (配列番号 21)	456	SP0434 (配列番号 289)	420

【０３６４】

技術の態様は、表２Ａに開示される合成心特異的プロモーターを含むｒＡＡＶベクターに関する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、表２Ａに開示される合成心特異的プロモーターを含み、これは、本明細書に開示されるＰＰ１の阻害剤をコードする核酸、または本明細書に開示される表１８Ａもしくは１８Ｂに開示される遺伝子に機能的に連結されている。

【０３６５】

一部の実施形態では、本明細書に開示される合成心特異的プロモーターは、本明細書に開示される、１つまたは複数のシス調節エレメント（ＣＲＥ）、および／あるいは最小プロモーターまたは近位プロモーター、および／あるいは５’ＵＴＲもしくはイントロンなどの調節エレメント（ＲＥ）、または５’ＵＴＲおよびイントロンの両方として機能するＲＥ（例えば、ＣＭＶ－ＩＥ）を含むことができる。

【０３６６】

【表２Ｂ－１】

表2B:表2Aの心特異的プロモーターの実施形態のCREおよび最小/近位プロモーター。

プロモーター	CRE	CRE	最小または近位プロモーター	5’イントロン/UTR（存在する場合）
SP0067 (配列番号 3)		CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0075 (配列番号 ” 配列番号 4)		CRE0033 (配列番号 41)	SKM_20 (配列番号 56)	
SP0424 (配列番号 5)		CRE0004 (配列番号 39)	CRE0082 (配列番号 57)	
SP0425 (配列番号 6)		CRE0028 (配列番号 40)	CRE0082 (配列番号 57)	
SP0429 (配列番号 7)		CRE0095 (配列番号 44)	CRE0082 (配列番号 57)	
SP0430 (配列番号 8)		CRE0096 (配列番号 45)	CRE0082 (配列番号 57)	
SP0344 (配列番号 9)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0038 (配列番号 64)	
SP0433 (配列番号 10)	CRE0033 (配列番号 41)	CRE0071.3 (配列番号 43)	CRE0070 (配列番号 42)	
SP0435 (配列番号 11)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0082 (配列番号 57)	
SP0436 (配列番号 12)	CRE0033 (配列番号 41)	CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0449 (配列番号 13)	CRE0004 (配列番号 39)	CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0450 (配列番号 14)	CRE0095 (配列番号 44)	CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0451 (配列番号 15)	CRE0096 (配列番号 45)	CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0452 (配列番号 16)	CRE0082 (配列番号 57)	CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0475 (配列番号 17)		CRE0033 (配列番号 41)	SKM_18 (配列番号 55)	CMV-IE 5’UTR およびイントロン (配列番号 65)

【表２Ｂ－２】

SP0476 (配列番号 18)		CRE0105 (配列番号 46)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0477 (配列番号 19)		CRE0106 (配列番号 47)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0478 (配列番号 20)		CRE0107 ((配列番号 48)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0479 (配列番号 21)		CRE0108 (配列番号 49)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0480 (配列番号 22)		CRE0109 (配列番号 50)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0481 (配列番号 23)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0110 (配列番号 59)	
SP0482 (配列番号 24)		CRE0111 ((配列番号 51)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0483 (配列番号 25)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0112 (配列番号 60)	
SP0484 (配列番号 26)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0113 (配列番号 61)	
SP0485 (配列番号 27)		CRE0114 (AU)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0486 (配列番号 28)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0115 (配列番号 62)	
SP0487 (配列番号 29)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0116 (配列番号 63)	
SP0488 (配列番号 30)		CRE0117 (配列番号 53)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0489 (配列番号 31)		CRE0033 (配列番号 41)	CRE0104 (配列番号 58)	
SP0490 (配列番号 32)		CRE0106 (配列番号 47)	CRE0110 (配列番号 59)	
SP0491 (配列番号 33)		CRE0107 (配列番号 48)	CRE0110 (配列番号 59)	
SP0492 (配列番号 34)		CRE0106 (配列番号 47)	CRE0116 (配列番号 63)	
SP0493 (配列番号 35)		CRE0107 (配列番号 48)	CRE0116 (配列番号 63)	
SP0494 (配列番号 36)		CRE0118 (配列番号 54)	SKM_18 (配列番号 55)	
SP0495 (配列番号 37)	CRE0106 (配列番号 47)	CRE0033 (配列番号 41)	CRE0116 (配列番号 63)	
SP0496 (配列番号 38)	CRE0107 (配列番号 48)	CRE0033 (配列番号 41)	CRE0116 (配列番号 63)	

【０３６７】

ＣＲＥ、ＣＲＭ、イントロン、ＵＴＲ、最小／近位プロモーター、および本明細書に開示されるプロモーターは、様々な筋肉組織において、特に、独占的にではないが、骨格筋および／または心筋において、活性であり得る。少なくとも１つの筋肉組織型、または少なくとも１つの筋肉細胞型において活性であるＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントまたはプロモーターは、「筋肉特異的」と称され得る。容易さのために、筋肉特異的なＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントまたはプロモーターは、ＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントまたはプロモーターが、骨格筋または心筋において主に活性であるかに応じて、サブタイプにさらに細分化することができる。

【０３６８】
一部の実施形態では、本発明のシス調節エレメントおよびプロモーターは、骨格筋特異的である。一部の実施形態では、本発明のシス調節エレメント、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、骨格筋において主に活性であり、心筋においてあまり活性ではないか、または活性ではない。これらのＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、「骨格筋特異的」と呼ばれる。
【０３６９】
一部の実施形態では、本発明のシス調節エレメントおよびプロモーターは、心筋特異的である。一部の実施形態では、本発明のシス調節エレメント、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、心筋において主に活性であり、骨格筋においてあまり活性ではないか、または活性ではない。これらのＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、「心筋特異的」と呼ばれる。
【０３７０】
一部の実施形態では、筋肉特異的なＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、骨格筋および心筋の両方において活性である。これらのＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、プロモーター活性が、骨格筋および心臓（心筋において）の両方において必要である場合に好ましくあり得る。一部の実施形態では、心筋特異的なＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターが、好ましくあり得る。これらのＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、プロモーター活性が、骨格筋においてわずかな活性を有するかまたは活性なしで、心臓（心筋において）おいて必要である場合に好ましくあり得る。合成心筋特異的プロモーターの例としては、ＳＰ００６７、ＳＰ００７５、ＳＰ０４２４、ＳＰ０４２５、ＳＰ０４２９、ＳＰ０４３０、ＳＰ０４３３、ＳＰ０４３６、ＳＰ０４５２、ＳＰ０３４４、ＳＰ０４８３、ＳＰ０４９６、ＳＰ０４３５、ＳＰ０４４９、ＳＰ０４５０、ＳＰ０４５１、ＳＰ０４７５、ＳＰ０４７６、ＳＰ０４７７、ＳＰ０４７８、ＳＰ０４７９、ＳＰ０４８０、ＳＰ０４８１、ＳＰ０４８２、ＳＰ０４８４、ＳＰ０４８５、ＳＰ０４８６、ＳＰ０４８７、ＳＰ０４８８、ＳＰ０４８９、ＳＰ０４９０、ＳＰ０４９１、ＳＰ０４９２、ＳＰ０４９３、ＳＰ０４９４およびＳＰ０４９５が挙げられる。好ましい合成心筋特異的プロモーターの例は、ＳＰ００６７、ＳＰ０４３３、ＳＰ０４３６、ＳＰ０４５２、ＳＰ０３４４およびＳＰ０４８３である。
【０３７１】
本発明の心筋特異的なＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、心臓の様々な細胞において活性であり得る。心臓における優位な細胞型は、心室心筋細胞、心房心筋細胞、心線維芽細胞、または心臓における内皮細胞（ＥＣ）、ならびに血管周囲細胞およびペースメーカー細胞である。加えて、本発明の心筋特異的なＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、例えば、以下の心臓領域のいずれかまたはすべてにおける活性など、心臓の様々な領域において活性であり得る：大動脈弓動脈（ＡＡ）；大動脈；心筋細胞（ＣＭ）；内皮細胞または心内膜細胞（ＥＣ）；下大静脈（ＩＣＶ）；心室中隔（ＩＶＳ）；左房（ＬＡ）；左上大静脈（ＬＳＣＶ）；左室（ＬＶ）；流出路（ＯＴ）；肺動脈（ＰＯ）；前心外膜組織（ＰＥＯ）；肺静脈（ＰＶ）；右房（ＲＡ）；右上大静脈（ＲＳＣＶ）；右室（ＲＶ）；上大静脈（ＳＣＶ）；心平滑筋細胞（ＳＭ）。
【０３７２】
一部の実施形態では、骨格筋および心筋の両方において活性である筋肉特異的なＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターも、本明細書に開示される投与および処置の方法のためのＡＡＶにおける使用のために包含される。これらのＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントおよびプロモーターは、プロモーター活性が、骨格筋および心臓（心筋において）の両方において必要である場合に好ましくあり得る。骨格筋および心筋の両方において活性な筋肉特異的プロモーターの例としては、ＳＰ００１０、ＳＰ００２０、ＳＰ００３３、ＳＰ００３８、ＳＰ００４０、ＳＰ００４２、ＳＰ００５１、Ｓ

ＳＰ００５７、ＳＰ００５８、ＳＰ００６１、ＳＰ００６２、ＳＰ００６４、ＳＰ００６５、ＳＰ００６６、ＳＰ００６８、ＳＰ００７０、ＳＰ００７１、ＳＰ００７６、ＳＰ０１３２、ＳＰ０１３３、ＳＰ０１３４、ＳＰ０１３６、ＳＰ０１４６、ＳＰ０１４７、ＳＰ０１４８、ＳＰ０１５０、ＳＰ０１５３、ＳＰ０１５５、ＳＰ０１５６、ＳＰ０１５７、ＳＰ０１５８、ＳＰ０１５９、ＳＰ０１６０、ＳＰ０１６１、ＳＰ０１６２、ＳＰ０１６３、ＳＰ０１６４、ＳＰ０１６５、ＳＰ０１６６、ＳＰ０１６９、ＳＰ０１７０、ＳＰ０１７１、ＳＰ０１７３、ＳＰ０２２８、ＳＰ０２２９、ＳＰ０２３０、ＳＰ０２３１、ＳＰ０２３２、ＳＰ０２５７、ＳＰ０２６２、ＳＰ０２６４、ＳＰ０２６５、ＳＰ０２６６、ＳＰ０２６７、ＳＰ０２６８、ＳＰ０２７０、ＳＰ０２７１、ＳＰ０２７９、ＳＰ０２８６、ＳＰ０３０５、ＳＰ０３０６、ＳＰ０３０７、ＳＰ０３０９、ＳＰ０３１０、ＳＰ０３１１、ＳＰ０３１２、ＳＰ０３１３、ＳＰ０３１４、ＳＰ０３１５、ＳＰ０３１６、ＳＰ０３２０、ＳＰ０３２２、ＳＰ０３２３、ＳＰ０３２４、ＳＰ０３２５、ＳＰ０３２６、ＳＰ０３２７、ＳＰ０３２８、ＳＰ０３２９、ＳＰ０３３０、ＳＰ０３３１、ＳＰ０３３２、ＳＰ０３３３、ＳＰ０３３４、ＳＰ０３３５、ＳＰ０３３６、ＳＰ０３３７、ＳＰ０３３８、ＳＰ０３３９、ＳＰ０３４０、ＳＰ０３４１、ＳＰ０３４３、ＳＰ０３４５、ＳＰ０３４６、ＳＰ０３４７、ＳＰ０３４８、ＳＰ０３４９、ＳＰ０３５０、ＳＰ０３５１、ＳＰ０３５２、ＳＰ０３５３、ＳＰ０３５４、ＳＰ０３５５、ＳＰ０３５６、ＳＰ０３５８、ＳＰ０３５９、ＳＰ０３６１、ＳＰ０３６２、ＳＰ０３６３、ＳＰ０３６４、ＳＰ０３６５、ＳＰ０３６６、ＳＰ０３６７、ＳＰ０３６８、ＳＰ０３６９、ＳＰ０３７０、ＳＰ０３７１、ＳＰ０３７２、ＳＰ０３７３、ＳＰ０３７４、ＳＰ０３７５、ＳＰ０３７６、ＳＰ０３７７、ＳＰ０３７８、ＳＰ０３７９、ＳＰ０３８０、ＳＰ０３８１、ＳＰ０３８２、ＳＫＭ＿１４、ＳＫＭ＿１８、ＳＫＭ＿２０、ＳＰ０３５７、ＳＰ０４３７～ＳＰ０４４５、ＳＰ０４４７、およびＳＰ０４５３～ＳＰ０４７１、４７３～４７４が挙げられる。骨格筋および心筋の両方において活性な好ましい合成筋肉特異的プロモーターの例は、ＳＰ００５７、ＳＰ０１３４、ＳＰ０１７３、ＳＰ０２７９、ＳＰ０２８６、ＳＰ０３１０、ＳＰ０３１６、ＳＰ０３２０、およびＳＰ０３２６である。

ｉｉ．心特異的プロモーターの機能的バリアント

【０３７３】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメント（ＣＲＥ）、例えば、ＣＲＥ００５１およびＣＲＥ００４２、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、列挙された順序、例えば、ＣＲＥ００５１、ＣＲＥ００４２、次にプロモーターエレメントで含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、心特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、列挙されたものとは異なる順序、例えば、ＣＲＥ００４２、ＣＲＥ００５１、次にプロモーターエレメントで含む。

【０３７４】

一部の実施形態では、心特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、列挙された順序、例えば、ＣＲＥ００３３、次に任意の他のＣＲＥエレメントまたは本明細書に開示されるプロモーターエレメントで含む。例えば、プロモーターは、ＣＲＥ００３３、および本明細書に開示される表２Ｂ、３、５Ｂまたは６に開示される任意のＣＲＥから選択される少なくとも１つのＣＲＥ、または少なくとも２つのＣＲＥ、または少なくとも３つのＣＲＥ、または少なくとも４つのＣＲＥ、または４つよりも多くのＣＲＥを含むことができる。

【０３７５】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが心特異的であることが好ましい。

ＳＰ００６７およびそのバリアント

【０３７６】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０３７７】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０３７８】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＳＫＭ＿１８。

【０３７９】

ＣＲＥ００３３は、配列番号４１の核酸配列を有する。その配列番号４１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０３８０】

ＣＲＥ００３３の機能的バリアントは、ＣＲＥ００３３とは異なるが、筋肉特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０３８１】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００３３の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ００３３の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ００３３の代わりに置換されたＣＲＥ００３３の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ００６７を考えると、ＳＰ００６７中のＣＲＥ００３３は、ＣＲＥ００３３の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０３８２】

ＣＲＥ００３３またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４１またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４１またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０３８３】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０３３またはその機能的バリアントは、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０３８４】

ＳＫＭ＿１８は、配列番号５５の核酸配列を有する。配列番号５１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０３８５】

上記で議論されたように、ＳＫＭ＿１８の機能的バリアントは、筋肉特異的プロモーターエレメントとして作用するＳＫＭ＿１８の能力を実質的に保持する。例えば、ＳＫＭ＿１８の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ００６７に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ００６７の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＳＫＭ＿１８の機能的バリアントは、配列番号５５と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。

【０３８６】

一部の好ましい実施形態では、ＳＫＭ＿１８もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０３８７】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３による配列を有するプロモーターは、ＳＰ００６７と称される。ＳＰ００６７プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に非常に特異的であることが見出されており、また非常に短く、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ００７５およびそのバリアント

【０３８８】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０３８９】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０３９０】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿２０またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿２０は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０３９１】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＳＫＭ＿２０。

【０３９２】

ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０３９３】

ＳＫＭ＿２０は、配列番号５６の核酸配列を有する。配列番号５６の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０３９４】
上記で議論されたように、ＳＫＭ＿２０の機能的バリアントは、筋肉特異的プロモーターエレメントとして作用するＳＫＭ＿２０の能力を実質的に保持する。例えば、ＳＫＭ＿２０の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ００７５に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ００７５の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＳＫＭ＿２０の機能的バリアントは、配列番号５６と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。
【０３９５】
一部の好ましい実施形態では、ＳＫＭ＿２０もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。
【０３９６】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号４またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号４による配列を有するプロモーターは、ＳＰ００７５と称される。ＳＰ００７５プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に非常に特異的であることが見出されており、また非常に短く、これは、一部の状況では有利である。
ＳＰ０４２４およびそのバリアント
【０３９７】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０００４を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０００４を含む。
【０３９８】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。
【０３９９】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００８２またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００８２は、心筋特異的近位プロモーターである。
【０４００】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０００４、次にＣＲＥ００８２。
【０４０１】
ＣＲＥ０００４は、配列番号３９の核酸配列を有する。配列番号３９の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０４０２】
ＣＲＥ０００４の機能的バリアントは、ＣＲＥ０００４とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲ

Ｅを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０４０３】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０００４の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０００４の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０００４の代わりに置換されたＣＲＥ０００４の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４２４を考えると、ＳＰ００４２４中のＣＲＥ０００４は、ＣＲＥ０００４の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０４０４】

ＣＲＥ０００４またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号３９またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号３９またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０４０５】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００４またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０４０６】

ＣＲＥ００８２は、配列番号５７の核酸配列を有する。配列番号５７の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０４０７】

上記で議論されたように、ＣＲＥ００８２の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ００８２の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ００８２の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４２４に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４２４の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ００８２の機能的バリアントは、配列番号５７と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。

【０４０８】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ００８２もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、５００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、４００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０４０９】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号５またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号５による配列を有するプロモーターは、ＳＰ

０４２４と称される。ＳＰ０４２４プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４２５およびそのバリアント

【０４１０】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００２８を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００２８を含む。

【０４１１】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４１２】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００８２またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００８２は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０４１３】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００２８、次にＣＲＥ００８２。

【０４１４】

ＣＲＥ００２８は、配列番号４０の核酸配列を有する。配列番号４０の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０４１５】

ＣＲＥ００２８の機能的バリアントは、ＣＲＥ００２８とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０４１６】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００２８の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ００２８の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ００２８の代わりに置換されたＣＲＥ００２８の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４２５を考えると、ＳＰ００４２５中のＣＲＥ００２８は、ＣＲＥ００２８の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０４１７】

ＣＲＥ００２８またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４０またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４０またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０４１８】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００２８またはその機能的バリアントは、３００もしくは

それよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＣＲＥ００８２およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０４１９】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号６の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号６の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号６による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４２５と称される。ＳＰ０４２５プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４２９およびそのバリアント

【０４２０】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００９５を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００９５を含む。

【０４２１】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４２２】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００８２またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００８２は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０４２３】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００９５、次にＣＲＥ００８２。

【０４２４】

ＣＲＥ００９５は、配列番号４４の核酸配列を有する。配列番号４４の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０４２５】

ＣＲＥ００９５の機能的バリアントは、ＣＲＥ００９５とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０４２６】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００９５の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ００９５の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ００９５の代わりに置換されたＣＲＥ００９５の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４２９を考えると、ＳＰ０４２９中のＣＲＥ００９５は、ＣＲＥ００９５の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の

好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０４２７】

ＣＲＥ００９５またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４４またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４４またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０４２８】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００９５またはその機能的バリアントは、４００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０４２９】

ＣＲＥ００８２およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０４３０】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号７の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号７の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号７による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４２９と称される。ＳＰ０４２９プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４３０およびそのバリアント

【０４３１】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００９６を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００９６を含む。

【０４３２】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４３３】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００８２またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００８２は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０４３４】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００９６、次にＣＲＥ００８２。

【０４３５】

ＣＲＥ００９６は、配列番号４５の核酸配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０４３６】

ＣＲＥ００９６の機能的バリアントは、ＣＲＥ００９６とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および

／または挿入を含むことができる。
【０４３７】
一部の実施形態では、ＣＲＥ００９６の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ００９６の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ００９６の代わりに置換されたＣＲＥ００９６の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４３０を考えると、ＳＰ０４３０中のＣＲＥ００９６は、ＣＲＥ００９６の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。
【０４３８】
ＣＲＥ００９６またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４５またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４５またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。
【０４３９】
一部の実施形態では、ＣＲＥ００９６またはその機能的バリアントは、５００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、４００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＣＲＥ００８２およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４４０】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号８の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号８の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号８による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４３０と称される。ＳＰ０４３０プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。
ＳＰ０３４４およびそのバリアント
【０４４１】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。
【０４４２】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。
【０４４３】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００３８またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００３８は、心筋特異的近位プロモーターである。
【０４４４】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ００３８。

【０４４５】
ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４４６】
ＣＲＥ００３８は、配列番号６４の核酸配列を有する。その配列番号６４の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０４４７】
上記で議論されたように、ＣＲＥ００３８の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ００３８の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ００３８の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０３４４に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０３４４の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ００３８の機能的バリアントは、配列番号６４と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。
【０４４８】
一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ００３８もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。
【０４４９】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号９の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号９の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号９による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０３４４と称される。ＳＰ０３４４プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。
【０４５０】
ＳＰ０４３３およびそのバリアント
【０４５１】
一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ００３３およびＣＲＥ００７１．３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ００７１．３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００７１．３、ＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。
【０４５２】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが心筋特異的または心筋特異的であることが好ましい。
【０４５３】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００７０またはその

機能的バリアントである。ＣＲＥ００７０は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０４５４】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ００７１．３およびＣＲＥ００７０、またはその機能的バリアント。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ００７１．３は、配列番号４３の核酸配列を有する。配列番号４３の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０４５５】

ＣＲＥ００７１．３の機能的バリアントは、ＣＲＥ００７１．３とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０４５６】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００７１．３の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ００７１．３の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ００７１．３の代わりに置換されたＣＲＥ００７１．３の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４３３を考えると、ＳＰ００４３３中のＣＲＥ００７１．３は、ＣＲＥ００７１．３の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０４５７】

ＣＲＥ００７１．３またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４３またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４３またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０４５８】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００７１．３またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０４５９】

ＣＲＥ００７０は、配列番号４２の核酸配列を有する。配列番号４２の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０４６０】

上記で議論されたように、ＣＲＥ００７０の機能的バリアントは、筋肉特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ００７０の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ００７０の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４３３に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４３３の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ００７０の機能的バリアントは、配列番号４２と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一

性を有する配列を含む。

【０４６１】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ００７０もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、８５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、７５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０４６２】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１０の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１０の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１０による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４３３と称される。ＳＰ０４３３プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

【０４６３】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０４６４】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４６５】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００８２またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００８２は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０４６６】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ００８２。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ００８２およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

ＳＰ０４３５およびそのバリアント

【０４６７】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１１の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１１による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４３５と称される。ＳＰ０４３５プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４３６およびそのバリアント

【０４６８】

一部の実施形態では、プロモーターは、２つのシス調節エレメントＣＲＥ００３３またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施

形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、第１のＣＲＥ００３３、第２のＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。

【０４６９】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４７０】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０４７１】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：第１のＣＲＥ００３３、第２のＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８、またはその機能的バリアント。

【０４７２】

２つの同一のＣＲＥを含む合成プロモーターは、同一のＣＲＥの１つのみを含む同等のプロモーターよりも、その標的組織または細胞で、そのより高い発現を有すると予測される。例えば、第１のＣＲＥ００３３、第２のＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８を含むプロモーターＳＰ０４３６は、ＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８のみを含むプロモーターＳＰ００６７よりも心筋細胞における高い発現を有する。

【０４７３】

ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０４７４】

ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０４７５】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１２の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１２の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１２による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４３６と称される。ＳＰ０４３６プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４４９およびそのバリアント

【０４７６】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ０００４およびＣＲＥ００３３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ０００４、ＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ０００４、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。

【０４７７】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４７８】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。
【０４７９】
したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ０００４、ＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８、またはその機能的バリアント。
【０４８０】
ＣＲＥ０００４およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４８１】
ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４８２】
ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４８３】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１３の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１３の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１３による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４４９と称される。ＳＰ０４４９プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。
ＳＰ０４５０およびそのバリアント
【０４８４】
一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ００９５およびＣＲＥ００３３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００９５、ＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ００９５、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。
【０４８５】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。
【０４８６】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。
【０４８７】
したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００９５、ＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８、またはその機能的バリアント。
【０４８８】
ＣＲＥ００９５およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４８９】
ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４９０】
ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０４９１】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１４の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１４の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１４による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４５０と称される。ＳＰ０４５０プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４５１およびそのバリアント

【０４９２】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ００９６およびＣＲＥ００３３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００９６、ＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ００９６、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。

【０４９３】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０４９４】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０４９５】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００９６、ＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８、またはその機能的バリアント。

【０４９６】

ＣＲＥ００９６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０４９７】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１５の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１５の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１５による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４５１と称される。ＳＰ０４５１プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４５２およびそのバリアント

【０４９８】

一部の実施形態では、プロモーターは、心筋特異的近位プロモーターＣＲＥ００８２およびシス調節エレメントＣＲＥ００３３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、心筋特異的近位プロモーターＣＲＥ００８２およびシス調節エレメントＣＲＥ００３３は、さらなるプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記近位プロモーターおよびＣＲＥ、またはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００８２、Ｃ

ＲＥ００３３、次にさらなるプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。

【０４９９】

さらなるプロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、さらなるプロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５００】

一部の好ましい実施形態では、さらなるプロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０５０１】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００８２、ＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８、またはその機能的バリアント。このプロモーターは、使用される２つの近位プロモーターをタンデムで含む。

【０５０２】

ＣＲＥ００８２およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５０３】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１６の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１６の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１６による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４５２と称される。ＳＰ０４５２プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４７５およびそのバリアント

【０５０４】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントならびに５’ＵＴＲおよび／またはイントロンなどの調節エレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、５’ＵＴＲおよび／またはイントロンなどの調節エレメントが続くプロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０５０５】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５０６】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０５０７】

イントロンは、任意の好適のイントロンであり得る。５’ＵＴＲは、任意の好適な５’ＵＴＲであり得る。調節エレメントは、イントロンおよび５’ＵＴＲを含んでいてもよい。一部の好ましい実施形態では、調節エレメントは、ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンである。

【０５０８】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、続いてＳＫＭ＿１８、次にＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロン。

【０５０９】
ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０５１０】
ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンは、配列番号６５の核酸配列を有する。配列番号６５の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０５１１】
一部の実施形態では、ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンの機能的バリアントは、プロモーター中のＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンの代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するイントロンと見なされ得る。例えば、ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンの代わりに置換されたＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンの機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４７５を考えると、ＳＰ０４７５中のＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンは、ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンの機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたイントロンを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。
【０５１２】
ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンなどのイントロンを含む合成プロモーターは、イントロンを含まない同等のプロモーターよりも、その標的組織または細胞で、そのより高い発現を有すると予測される。例えば、ＣＲＥ００３３、ＳＫＭ＿１８、ならびにＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンを含むプロモーターＳＰ０４７５は、ＣＲＥ００３３およびＳＫＭ＿１８のみを含むプロモーターＳＰ００６７よりも、心筋組織または細胞においてより高い発現を有すると予測される。
【０５１３】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１７の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１７の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１７による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４７５と称される。ＳＰ０４７５プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。
ＳＰ０４７６およびそのバリアント
【０５１４】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０５を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０５を含む。
【０５１５】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。
【０５１６】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実

施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０５、次にＳＫＭ＿１８。

【０５１７】

ＣＲＥ０１０５は、配列番号４６の核酸配列を有する。配列番号４６の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５１８】

ＣＲＥ０１０５の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１０５とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０５１９】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０５の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１０５の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１０５の代わりに置換されたＣＲＥ０１０５の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４７６を考えると、ＳＰ０４７６中のＣＲＥ０１０５は、ＣＲＥ０１０５の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０５２０】

ＣＲＥ０１０５またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４６またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４６またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０５２１】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０５またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０５２２】

ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５２３】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１８の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１８の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１８による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４７６と称される。ＳＰ０４７６プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４７７およびそのバリアント

【０５２４】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０６を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０

６を含む。
【０５２５】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。
【０５２６】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。
【０５２７】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０６、次にＳＫＭ＿１８。
【０５２８】
ＣＲＥ０１０６は、配列番号４７の核酸配列を有する。配列番号４７の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０５２９】
ＣＲＥ０１０６の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１０６とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。
【０５３０】
一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０６の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１０６の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１０６の代わりに置換されたＣＲＥ０１０６の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４７７を考えると、ＳＰ０４７７中のＣＲＥ０１０６は、ＣＲＥ０１０６の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。
【０５３１】
ＣＲＥ０１０６またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４７またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４７またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。
【０５３２】
一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０６またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０５３３】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号１９の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号１９の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９

６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１９による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４７７と称される。ＳＰ０４７７プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４７８およびそのバリアント

【０５３４】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０７を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０７を含む。

【０５３５】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５３６】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０７、次にＳＫＭ＿１８。

【０５３７】

ＣＲＥ０１０７は、配列番号４８の核酸配列を有する。その配列番号４８の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５３８】

ＣＲＥ０１０７の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１０７とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０５３９】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０７の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１０７の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１０７の代わりに置換されたＣＲＥ０１０７の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４７８を考えると、ＳＰ０４７８中のＣＲＥ０１０７は、ＣＲＥ０１０７の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０５４０】

ＣＲＥ０１０７またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４８またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４８またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０５４１】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０７またはその機能的バリアントは、３００もしくは

それよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５４２】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２０の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２０の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２０による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４７８と称される。ＳＰ０４７８プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４７９およびそのバリアント

【０５４３】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０８を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０８を含む。

【０５４４】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５４５】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０５４６】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０８、次にＳＫＭ＿１８。

【０５４７】

ＣＲＥ０１０８は、配列番号４９の核酸配列を有する。配列番号４９の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５４８】

ＣＲＥ０１０８の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１０８とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０５４９】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０８の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１０８の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１０８の代わりに置換されたＣＲＥ０１０８の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４７９を考えると、ＳＰ０４７９中のＣＲＥ０１０８は、ＣＲＥ０１０８の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換

されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０５５０】

ＣＲＥ０１０８またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号４９またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号４９またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０５５１】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０８またはその機能的バリアントは、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５５２】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２１の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２１による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４７９と称される。ＳＰ０４７９プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８０およびそのバリアント

【０５５３】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０９を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０９を含む。

【０５５４】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５５５】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０９、次にＳＫＭ＿１８。

【０５５６】

ＣＲＥ０１０９は、配列番号５０の核酸配列を有する。配列番号５０の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５５７】

ＣＲＥ０１０９の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１０９とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０５５８】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０９の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１０９の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１０９の代わりに置換されたＣＲＥ０１０９の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４８０を考えると、ＳＰ０４８０中のＣＲＥ０１０９は、ＣＲＥ０１０９の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０５５９】

ＣＲＥ０１０９またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号５０またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号５０またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０５６０】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１０９またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５６１】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２２の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２２の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２２による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８０と称される。ＳＰ０４８０プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８１およびそのバリアント

【０５６２】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０５６３】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５６４】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１０は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０５６５】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ０１１０。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５６６】

ＣＲＥ０１１０は、配列番号５９の核酸配列を有する。配列番号５９の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５６７】

上記で議論されたように、ＣＲＥ０１１０の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ０１１０の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ０１１０の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４８１に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４８１の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ０１１０の機能的バリアントは、配列番号５９と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。

【０５６８】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ０１１０もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０５６９】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２３の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２３の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２３による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８１と称される。ＳＰ０４８１プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８２およびそのバリアント

【０５７０】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１１１を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１１１を含む。

【０５７１】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５７２】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１１１、次にＳＫＭ＿１８。

【０５７３】

ＣＲＥ０１１１は、配列番号５１の核酸配列を有する。配列番号５１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５７４】

ＣＲＥ０１１１の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１１１とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子

（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０５７５】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１１の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１１１の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１１１の代わりに置換されたＣＲＥ０１１１の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４８２を考えると、ＳＰ０４８２中のＣＲＥ０１１１は、ＣＲＥ０１１１の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０５７６】

ＣＲＥ０１１１またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号５１またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号５１またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０５７７】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１１またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５７８】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２４の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２４の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２４による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８２と称される。ＳＰ０４８２プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８３およびそのバリアント

【０５７９】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０５８０】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５８１】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１２またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１２は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０５８２】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ０１１２。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５８３】

ＣＲＥ０１１２は、配列番号６０の核酸配列を有する。配列番号６０の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５８４】

上記で議論されたように、ＣＲＥ０１１２の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ０１１２の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ０１１２の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４８３に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４８３の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ０１１２の機能的バリアントは、配列番号６０と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。

【０５８５】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ０１１２もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０５８６】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２５の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２５の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２５による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８３と称される。ＳＰ０４８３プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８４およびそのバリアント

【０５８７】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０５８８】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０５８９】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１３またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１３は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０５９０】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ０１１３。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０５９１】

ＣＲＥ０１１３は、配列番号６１の核酸配列を有する。配列番号６１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５９２】

上記で議論されたように、ＣＲＥ０１１３の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ０１１３の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ０１１３の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４８４に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４８４の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ０１１３の機能的バリアントは、配列番号６１と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。

【０５９３】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ０１１３もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０５９４】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２６の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２６の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２６による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８４と称される。ＳＰ０４８４プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８５およびそのバリアント

【０５９５】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１１４を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１１４を含む。

【０５９６】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１１４、次にＳＫＭ＿１８。

【０５９７】

ＣＲＥ０１１４は、配列番号５２の核酸配列を有する。配列番号５２の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０５９８】

ＣＲＥ０１１４の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１１４とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲ

Ｅを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０５９９】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１４の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１１４の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１１４の代わりに置換されたＣＲＥ０１１４の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４８５を考えると、ＳＰ０４８５中のＣＲＥ０１１４は、ＣＲＥ０１１４の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０６００】

ＣＲＥ０１１４またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号５２またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号５２またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０６０１】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１４またはその機能的バリアントは、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０６０２】

ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６０３】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２７の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２７の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２７による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８５と称される。ＳＰ０４８５プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８６およびそのバリアント

【０６０４】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０６０５】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６０６】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１５またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１５は、心筋特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ０１１５。

【０６０７】
ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０６０８】
ＣＲＥ０１１５は、配列番号６２の核酸配列を有する。配列番号６２の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０６０９】
上記で議論されたように、ＣＲＥ０１１５の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ０１１５の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ０１１５の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４８６に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４８６の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ０１１５の機能的バリアントは、配列番号６２と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。
【０６１０】
一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ０１１５もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。
【０６１１】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２８の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２８の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２８による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８６と称される。ＳＰ０４８６プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。
ＳＰ０４８７およびそのバリアント
【０６１２】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。
【０６１３】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１６またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１６は、心筋特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ０１１６。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０６１４】
ＣＲＥ０１１６は、配列番号６３の核酸配列を有する。配列番号６３の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０６１５】

上記で議論されたように、ＣＲＥ０１１６の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ０１１６の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ０１１６の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４８７に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４８７の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ０１１６の機能的バリアントは、配列番号６３と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。

【０６１６】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ０１１６もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０６１７】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号２９の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号２９の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号２９による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８７と称される。ＳＰ０４８７プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８８およびそのバリアント

【０６１８】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１１７を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１１７を含む。

【０６１９】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６２０】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１１７、次にＳＫＭ＿１８。

【０６２１】

ＣＲＥ０１１７は、配列番号５３の核酸配列を有する。配列番号５３の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０６２２】

ＣＲＥ０１１７の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１１７とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０６２３】
一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１７の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１１７の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１１７の代わりに置換されたＣＲＥ０１１７の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４８８を考えると、ＳＰ０４８８中のＣＲＥ０１１７は、ＣＲＥ０１１７の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０６２４】
ＣＲＥ０１１７またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号５３またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号５３またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０６２５】
一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１７またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０６２６】
ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６２７】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３０の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３０の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３０による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８８と称される。ＳＰ０４８８プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４８９およびそのバリアント

【０６２８】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３３を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ００３３を含む。

【０６２９】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６３０】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１０４またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１０４は、心筋特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３３、次にＣＲＥ０１０４。

【０６３１】
ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６３２】
ＣＲＥ０１０４は、配列番号５８の核酸配列を有する。配列番号５８の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。
【０６３３】
上記で議論されたように、ＣＲＥ０１０４の機能的バリアントは、心筋特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ０１０４の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ０１０４の機能的バリアントが、心筋特異的プロモーターＳＰ０４８９に置換される場合、改変プロモーターは、ＳＰ０４８９の活性の少なくとも８０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９０％、より好ましくは、その活性の少なくとも９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ０１０４の機能的バリアントは、配列番号５８と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を有する配列を含む。
【０６３４】
一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ０１０４もしくはその機能的バリアントを含むか、またはそれからなるプロモーターエレメントは、４００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１１０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または９５もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。
【０６３５】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３１の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３１の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３１による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４８９と称される。ＳＰ０４８９プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。
ＳＰ０４９０およびそのバリアント
【０６３６】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０６を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０６を含む。
【０６３７】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１０は、心筋特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０６、次にＣＲＥ０１１０。ＣＲＥ０１０６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ０１１０およびそのバリアントの配列は、上記に示される。
【０６３８】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３２の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３２の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３２による配列

を有するプロモーターは、ＳＰ０４９０と称される。ＳＰ０４９０プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４９１およびそのバリアント

【０６３９】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０７を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０７を含む。

【０６４０】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６４１】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１０は、心筋特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０７、次にＣＲＥ０１１０。ＣＲＥ０１０７およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ０１１０およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６４２】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３３の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３３の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３３による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４９１と称される。ＳＰ０４９１プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４９２およびそのバリアント

【０６４３】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０６を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０６を含む。

【０６４４】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６４５】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１６またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１６は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０６４６】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０６、次にＣＲＥ０１１６。ＣＲＥ０１０６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ０１１６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６４７】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３４の核酸配列またはその

機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３４の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３４による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４９２と称される。ＳＰ０４９２プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であると予測され、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４９３およびそのバリアント

【０６４８】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１０７を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１０７を含む。

【０６４９】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６５０】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１６またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１６は、心筋特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１０７、次にＣＲＥ０１１６。ＣＲＥ０１０７およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ０１１６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６５１】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３５の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３５の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３５による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４９３と称される。ＳＰ０４９３プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４９４およびそのバリアント

【０６５２】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ０１１８を含む合成心筋特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流にＣＲＥ０１１８を含む。

【０６５３】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６５４】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、以下のエレメント（またはその機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ０１１８、次にＳＫＭ＿１８。

【０６５５】

ＣＲＥ０１１８は、配列番号５４の核酸配列を有する。配列番号５４の機能的バリアン

トは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。

【０６５６】

ＣＲＥ０１１８の機能的バリアントは、ＣＲＥ０１１８とは異なるが、心筋特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する調節エレメントである。必須の転写因子（ＴＦ）に結合し、発現を増強するその能力を保持しながら、ＣＲＥの配列を変えることが可能であることは、当業者に理解されるであろう。機能的バリアントは、それらがＣＲＥを実質的に非機能的にしないという条件で、参照ＣＲＥと比較して、置換、欠失および／または挿入を含むことができる。

【０６５７】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１８の機能的バリアントは、プロモーター中のＣＲＥ０１１８の代わりに置換される場合に、その活性を実質的に保持するＣＲＥと見なされ得る。例えば、ＣＲＥ０１１８の代わりに置換されたＣＲＥ０１１８の機能的バリアントを含む心筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくは、その活性の９０％、より好ましくは、その活性の９５％、さらにより好ましくは、その活性の１００％を保持する。例えば、例としてプロモーターＳＰ０４９４を考えると、ＳＰ０４９４中のＣＲＥ０１１８は、ＣＲＥ０１１８の機能的バリアントと置き換えることができ、プロモーターは、その活性を実質的に保持する。活性の保持は、同等の条件下で、置換されたＣＲＥを含むその他の点では同一のプロモーターと、参照プロモーターの制御下の好適なレポーターの発現を比較することによって評価することができる。

【０６５８】

ＣＲＥ０１１８またはその機能的バリアントを、二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖において提供することができ、いずれかの方向で提供することができることに留意されたい。そのため、配列番号５４またはその機能的バリアントの相補配列および逆相補配列は、本発明の範囲内である。配列番号５４またはその機能的バリアントによる配列を含む一本鎖核酸も、本発明の範囲内である。

【０６５９】

一部の実施形態では、ＣＲＥ０１１８またはその機能的バリアントは、３００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、２００もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１５０もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、１２５もしくはそれよりも少ないヌクレオチド、または１００もしくはそれよりも少ないヌクレオチドの長さを有する。

【０６６０】

ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６６１】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３６の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３６の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３６による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４９４と称される。ＳＰ０４９４プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４９５およびそのバリアント

【０６６２】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ０１０６およびＣＲＥ００３３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ０１０６、ＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機

能的バリアントを、ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ０１０６、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。

【０６６３】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６６４】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１６またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１６は、心筋特異的近位プロモーターである。したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ０１０６、ＣＲＥ００３３およびＣＲＥ０１１６、またはその機能的バリアント。ＣＲＥ０１０６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ０１１６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６６５】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３７の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３７の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３７による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４９５と称される。ＳＰ０４９５プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

ＳＰ０４９６およびそのバリアント

【０６６６】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ０１０７およびＣＲＥ００３３、またはその機能的バリアントの組合せを含む合成心筋特異的プロモーターである。典型的には、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ０１０７、ＣＲＥ００３３、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、心筋特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはその機能的バリアントを、ＣＲＥ００３３、ＣＲＥ０１０７、次にプロモーターエレメントの順序で含む（順序は、当技術分野において慣習的であるように、上流から下流の方向で与えられる）。

【０６６７】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、一般に、近位プロモーターが筋肉特異的または心筋特異的であることが好ましい。

【０６６８】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ０１１６またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ０１１６は、心筋特異的近位プロモーターである。

【０６６９】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、以下の調節エレメントを含む：ＣＲＥ０１０７、ＣＲＥ００３３およびＣＲＥ０１１６、またはその機能的バリアント。ＣＲＥ０１０６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ００３３およびそのバリアントの配列は、上記に示される。ＣＲＥ０１１６およびそのバリアントの配列は、上記に示される。

【０６７０】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、配列番号３８の核酸配列またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号３８の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を有し得る。配列番号３８による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０４９６と称される。ＳＰ０４９６プロモーターは、一部の実施形態では、特に好ましい。このプロモーターは、心筋に特異的であることが見出されており、これは、一部の状況では有利である。

タンデムプロモーター

【０６７１】
一部の実施形態では、合成心筋特異的プロモーターは、２つまたはそれよりも多くのプロモーターエレメントを含む。２つまたはそれよりも多くのプロモーターエレメントを含む合成プロモーターは、本明細書で、「タンデムプロモーター」と称される。例えば、ＳＰ０４５２は、それがプロモーターエレメントＣＲＥ００８２およびＳＫＭ＿１８を含むので、タンデムプロモーターである。一部の実施形態では、タンデムプロモーターは、別のプロモーターエレメントのすぐ上流にプロモーターエレメントを含んでいてもよい。一部の実施形態では、タンデムプロモーターは、プロモーターエレメントの１つまたはそれぞれの上流に１つまたは複数のＣＲＥを含んでいてもよい。一部の実施形態では、タンデムプロモーターは、プロモーターエレメントの間に１つまたは複数のＣＲＥを含んでいてもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される合成心筋特異的プロモーターのいずれか１つは、さらなるプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよい。例えば、ＳＰ０４５２は、プロモーターエレメントＣＲＥ００８２に作動可能に連結された合成プロモーターＳＰ００６７である。合成プロモーターＳＰ００６７が、本明細書に開示される任意の他のプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよいことが理解されるであろう。同様に、本明細書に開示される任意の他の合成プロモーターは、本明細書に開示される任意のプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよい。

複合プロモーター

【０６７２】
一部の実施形態では、上記に示されているような筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターは、１つまたは複数の追加の調節配列に作動可能に連結されている。追加の調節配列は、例えば、追加の調節配列に作動可能に連結されていない筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターと比較して発現を増強することができる。一般に、追加の調節配列は、筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターの特異性を実質的に低下させない。

【０６７３】
例えば、本発明による合成筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターを、ＵＴＲ（例えば、５’および／または３’ＵＴＲ）および／またはイントロンをコードする配列などに、作動可能に連結させることができる。一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、ＵＴＲ、例えば５’ＵＴＲ、をコードする配列に作動可能に連結されている。５’ＵＴＲは、遺伝子発現を調節することができる様々なエレメントを含有することができる。天然遺伝子における５’ＵＴＲは、転写開始部位で始まり、コード領域の開始コドンの１つ前のヌクレオチドで終わる。本明細書中で言及される５’ＵＴＲが、天然に存在する５’ＵＴＲ全体であることもあり、またはそれが、天然に存在する５’ＵＴＲの一部分であることもあることに、留意されたい。５’ＵＴＲはまた、部分的にまたは完全に合成のものであり得る。真核生物では、５’ＵＴＲは、おおよそ１５０ヌクレオチドの長さ中央値を有するが、一部の場合にはそれより相当長いこともある。５’ＵＴＲ内で見出され得る調節配列としては、（ｉ）ｍＲＮＡの安定性または翻訳に影響を与え得る、タンパク質の結合部位；（ｉｉ）リボスイッチ；（ｉｉｉ）翻訳開始を促進または阻害する配列；および（ｉｖ）遺伝子発現およびｍＲＮＡ搬出の調節に関連付けられている５’ＵＴＲ内のイントロンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０６７４】
調節配列が５’ＵＴＲとイントロンの両方を含む場合、それは、５’ＵＴＲおよびイントロンと呼ばれることがある。一部の実施形態では、上記に示されているような心筋特異的プロモーターは、ＣＭＶ主要即時型遺伝子（ＣＭＶ－ＩＥ遺伝子）に由来する５’ＵＴＲおよびイントロンをコードする配列に、作動可能に連結されている。例えば、ＣＭＶ－ＩＥ遺伝子からの５’ＵＴＲおよびイントロンは、好適には、ＣＭＶ－ＩＥ遺伝子エクソン１およびＣＭＶ－ＩＥ遺伝子エクソン１、またはそれらの部分を含む。一部の場合には、プロモーターエレメントを、５’ＵＴＲへの連結を考慮して、改変することができ、例えば、プロモーターエレメント中の転写開始部位（ＴＳＳ）の下流側の配列を除去する（例えば、５’ＵＴＲで置き換える）ことができる。

【０６７５】
ＣＭＶ－ＩＥ ５’ＵＴＲおよびイントロンは、Simari, et al., Molecular Medicine 4: 700-706, 1998 "Requirements for Enhanced Transgene Expression by Untranslated Sequences from the Human Cytomegalovirus Immediate-Early Gene"に記載されており、この参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。Ｓｉｍａｒｉらにおいて論じられているＣＭＶ－ＩＥ ５’ＵＴＲおよびイントロン配列のバリアントは、参照により組み込まれるＷＯ２００２／０３１１３７にも示されており、そこで開示されている調節配列も使用することができる。

【０６７６】
プロモーターと組み合わせて使用することができる他のＵＴＲは、当技術分野において、例えば、参照により組み込まれるLeppek, K., Das, R. & Barna, M. "Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them". Nat Rev Mol Cell Biol 19, 158-174 (2018)において、公知である。

【０６７７】
一部の実施形態では、５’ＵＴＲおよびイントロンをコードする配列は、配列番号６５の核酸配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、配列番号６５の機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号６５は、ＣＭＶ－ＩＥ ５’ＵＴＲおよびイントロンをコードする。

【０６７８】
表８は、プロモーター配列におけるまたは本明細書で開示されるｒＡＡＶ構築物における使用のための他の例示的なエレメント（例えば、イントロン／ＵＴＲ、ポリＡ配列）についての配列識別番号を開示する：

【表８】

表 8:	
名称	配列番号
HBB	配列番号 283
CMV-IE 5'UTR およびイントロン	配列番号 65
最小ポリ A 配列	配列番号 284
最小ポリ A 配列	配列番号 285
SV40 初期ポリ A	配列番号 286
RBG ポリ A	配列番号 287
FULL 合成ポリ A 配列	配列番号 288
ポリ A	配列番号 445

【０６７９】

一部の実施形態では、５’ＵＴＲは、タンパク質翻訳開始部位、例えば、産生されるｍＲＮＡ中のコザック配列を定義する配列、として機能する核酸モチーフを好適に含む。例えば、一部の実施形態では、５’ＵＴＲをコードする配列は、その３’末端にまたはその３’末端付近に配列モチーフＧＣＣＡＣＣを含む。当技術分野（例えば、Marilyn Kozak, "Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon That Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes" Cell, Vol. 44, 283-292, January 31, 1986；Marilyn Kozak "At Least Six Nucleotides Preceding the AUG Initiator Codon Enhance Translation in Mammalian Cells" J. Mol. Rid. (1987) 196, 947-950；Marilyn Kozak "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs" Nucleic Acids Research. Vol. 15 (20) 1987、これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれる）において公知であるような、他のコザック配列または他のタンパク質翻訳開始部位を、使用することができる。タンパク質翻訳開始部位（例えば、コザック配列）は、好ましくは、開始コドンに直接隣接した位置にある。

【０６８０】

一部の実施形態では、上記のプロモーターまたはそのバリアントのいずれか１つは、複合プロモーターを提供するために、５’ＵＴＲおよびまたは５’ＵＴＲおよびイントロンをコードする配列に連結される。本明細書において、そのような複合プロモーターは、単に「複合プロモーター」と呼ばれることがあり、または一部の場合には、簡略して表現するために単に「プロモーター」と呼ばれることがある。

【０６８１】

一部の実施形態では、上記で論じられたようなＳＰ００６７プロモーターまたはそのバリアントは、複合プロモーターを提供するために、５’ＵＴＲおよびイントロンをコードする配列に連結される。一部の実施形態では、複合プロモーターは、配列番号１７、またはその機能的バリアントを含む。この複合プロモーター構築物は、ＣＭＶ－ＩＥ遺伝子からの５’ＵＴＲおよびイントロンに作動可能に連結されたＳＰ００６７を含む。この複合プロモーターは、本明細書において上記で説明されたようにＳＰ０４７５と呼ばれる。

ｉｉｉ．ＣＲＥおよびそれらの機能的バリアント

【０６８２】

心特異的プロモーターの構築に使用することができる様々なＣＲＥが本明細書で開示される。好適には、ＣＲＥは、心特異的である。これらのＣＲＥは、一般に、ゲノムプロモ

ーターおよびエンハンサー配列に由来するが、それらは、それらの天然ゲノム環境とは全く異なる状況で本明細書では使用される。一般に、ＣＲＥは、それらが通常会合している遺伝子の発現を制御する、はるかに大きいゲノム調節ドメインの小部分を構成する。驚くべきことに、多くが非常に小さいものであるこれらのＣＲＥをそれらの通常の環境から単離することができること、およびこれらのＣＲＥが心特異的調節活性を保持することができることを発見した。これは、驚くべきことであり、なぜなら、ゲノム内の複雑な「三次元の」天然の状況からの調節配列の除去は、多くの場合、活性の有意な喪失を生じさせる結果となり、そのため、所与のＣＲＥが、観察された活性レベルをそれらの天然の環境から除去された時点で保持すると予想するわけがないからである。ＣＲＥがＡＡＶベクター内で心特異的活性を保持する場合は、よりいっそう驚きである。ＡＡＶベクターが逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含み、ゲノムと比較して異なるＤＮＡ構造を有し、ＩＴＲとＤＮＡ構造の両方がＣＲＥの活性に影響を及ぼすことが分かっているような場合は、特にそう言える。

【０６８３】

活性の実質的な喪失を引き起こすことなく本発明のＣＲＥの配列を変更することができることに注目されたい。ＣＲＥの機能的バリアントを、ＣＲＥの配列を改変することにより調製することができるが、ＣＲＥの活性を有意に害する改変を避けることを条件とする。本開示で提供される情報を考えれば、機能的バリアントを提供するためのＣＲＥの改変は容易である。さらに、本開示は、任意の所与のＣＲＥバリアントの機能性を簡単に評価するための方法を提供する。

【０６８４】

本発明によるある特定のＣＲＥの比較的小さいサイズは有利であり、なぜなら、それによって、ＣＲＥ、より具体的にはそれを含有するプロモーターが、ベクターのペイロードの最小限の量しか占めずにベクターに備えられ得るからである。これは、ＣＲＥが、ＡＡＶに基づくベクターなどの、限られた容量を有するベクターにおいて使用される場合、特に重要である。

【０６８５】

【表３】

表3:心特異的プロモーターの例示的なCRE（シス調節エレメント）の核酸配列についての配列識別番号

表 3:

CRM 名	配列番号
CRE0004	配列番号 39
CRE0028	配列番号 40
CRE0033	配列番号 41
CRE0070	配列番号 42
CRE0071.3	配列番号 43
CRE0095	配列番号 44
CRE0096	配列番号 45
CRE0105	配列番号 46
CRE0106	配列番号 47
CRE0107	配列番号 48
CRE0108	配列番号 49
CRE0109	配列番号 50
CRE0111	配列番号 51
CRE0114	配列番号 52
CRE0117	配列番号 53
CRE0118	配列番号 54

【０６８６】

本発明のＣＲＥは、ある特定の心特異的転写因子結合部位（ＴＦＢＳ）を含む。ＣＲＥの機能的バリアントにおいてこれらの心特異的ＴＦＢＳは機能的なままであることが一般に望ましい。当業者は、ＴＦＢＳ配列は変わり得るが機能性を保持し得ることを十分承知している。このことに鑑みて、ＴＦＢＳの配列は、ある程度の変動が概して存在するコンセンサス配列によって概して説明される。ＴＦＢＳに存在する変動についてのさらなる情報は、所与のヌクレオチドが概してコンセンサス配列の所与の位置に見られる頻度を表す、位置重み行列（ＰＷＭ）を使用して説明され得る。ＴＦコンセンサス配列および関連位置重み行列の詳細は、例えば、ＪａｓｐａｒまたはＴｒａｎｓｆａｃデータベース（http://jaspar.genereg.net/およびhttp://gene-regulation.com/pub/databases.html）で見つけることができる。この情報により、当業者は、ＣＲＥ機能性を保持するように、一部の場合にはさらに増加させるように、ＣＲＥの任意の所与のＴＦＢＳにおける配列を改変することが可能になる。このことに鑑みて、当業者は、所望のＴＦに結合する能力を維持しながら任意の所与のＴＦについてのＴＦＢＳを改変することができる方法に関する十分なガイダンスを持っており、Ｊａｓｐａｒシステムは、例えば、所与のＰＷＭとのその類似性に基づいて推定ＴＦＢＳをスコアリングすることになる。さらに、ＣＲＥをＪＡＳＰＡＲデータベースからのすべてのＰＷＭに対してスキャンしてすべてのＴＦＢＳを同定／解析することができる。当業者は、もちろん、文献において追加のガイダンスを見つけることができ、さらに、日常の実験を使用して、任意のバリアントＣＲＥ中の推定ＴＦＢＳへのＴＦの結合を確認することができる。ＣＲＥ中のＴＦＢＳ内であっても、機能を維持しながらＣＲＥの有意な配列改変を行うことができることは、明らかであろう。

【０６８７】

本発明のＣＲＥを広範囲の好適な最小プロモーターまたは心特異的近位プロモーターと

組み合わせて使用することができる。

【０６８８】

ＣＲＥの機能的バリアントは、参照ＣＲＥエレメントと異なる配列だが心特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を含む。ＣＲＥの配列を、好適な心特異的転写因子（ＴＦ）を動員することによって発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。ＣＲＥの機能的バリアントは、参照ＣＲＥと比較して置換、欠失および／または挿入を含むことができるが、これらがＣＲＥを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０６８９】

一部の実施形態では、ＣＲＥの機能的バリアントを、プロモーターにおいて参照ＣＲＥの代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＥと考えることができる。例えば、所与のＣＲＥの機能的バリアントを含む心特異的プロモーターは、その活性の少なくとも８０％、より好ましくはその活性の少なくとも９０％、より好ましくはその活性の少なくとも９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％（未改変ＣＲＥを含む参照プロモーターと比較して）を保持することが好ましい。

【０６９０】

好適には、ＣＲＥの機能的バリアントは、参照ＣＲＥとの有意なレベルの配列同一性を保持する。好適には、機能的バリアントは、参照ＣＲＥと少なくとも７０％同一である配列、より好ましくは、参照ＣＲＥと少なくとも８０％、９０％、９５％または９９％同一である配列を含む。

【０６９１】

参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。心特異的プロモーター活性を評価するための好適なアッセイは、本明細書で、例えば実施例で、開示される。

【０６９２】

一部の実施形態では、ＣＲＥを１つまたは複数の追加のＣＲＥと組み合わせてシス調節モジュール（ＣＲＭ）を作出することができる。追加のＣＲＥを本発明によるＣＲＥの上流側にまたは本発明によるＣＲＥの下流側に備えさせることができる。追加のＣＲＥは、本明細書で開示されるＣＲＥであることもあり、または他のＣＲＥであることもある。好適には、追加のＣＲＥは、心特異的である。

【０６９３】

本発明によるＣＲＥ、または本発明によるＣＲＥを含むＣＲＭは、１つまたは複数の追加の調節エレメントを含み得る。例えば、それらは、誘導性または抑制性エレメント、境界制御エレメント、インシュレーター、遺伝子座制御領域、応答エレメント、結合部位、末端反復のセグメント、応答性部位、安定化エレメント、不安定化エレメント、およびスプライシングエレメントなどを含み得るが、これらがＣＲＥもＣＲＭも実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０６９４】

本発明によるＣＲＥを含むプロモーターは、ＣＲＭと最小もしくは近位プロモーターとの間に、および／またはＣＲＥ間に、スペーサーを含み得る。加えて、または代替的に、スペーサーは、ＣＲＭの５’末端に存在し得る。

【０６９５】

本発明によるＣＲＥもしくは本発明によるＣＲＥを含むＣＲＭまたはその機能的バリアントを任意の好適なプロモーターエレメントと組み合わせて本発明による合成心特異的プロモーターを得ることができることは、明らかであろう。好適には、プロモーターエレメントは、心特異的近位プロモーターである。

【０６９６】

多くの事例では、より短いプロモーター配列が、特に、ベクター（例えば、ＡＡＶなどのウイルスベクター）が限られた容量を有する状況での使用には、好ましい。したがって

、一部の実施形態では、本発明によるＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントは、６００ヌクレオチドまたはそれ未満、例えば、６００、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００、７５、６０、５０ヌクレオチドまたはそれ未満の長さを有する。好適には、配列番号１９～２４、２７、２８によるＣＲＥのうちの少なくとも１つまたはその機能的バリアントを含む合成心特異的ＣＲＭは、１０００ヌクレオチドまたはそれ未満、例えば、９５０、９００、８５０、８００、７５０、７００、６５０、６００、５５０、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００、７５、６０、５０ヌクレオチドまたはそれ未満の長さを有する。

ｉｖ．ＣＲＭおよびそれらの機能的バリアント

【０６９７】

合成心特異的プロモーターの構築に使用することができる様々な合成心特異的ＣＲＭが本明細書で開示される。本発明のＣＲＭを広範囲の好適な最小プロモーターまたは心特異的近位プロモーターと組み合わせて使用することができる。

【０６９８】

ＣＲＭの機能的バリアントは、参照ＣＲＭエレメントと異なる配列だが心特異的ＣＲＭとしての活性を実質的に保持する配列を含む。ＣＲＭの配列を、好適な心特異的転写因子（ＴＦ）を動員することによって発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。ＣＲＭの機能的バリアントは、参照ＣＲＭと比較して置換、欠失および／または挿入を含むことができるが、これらがＣＲＭを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０６９９】

一部の実施形態では、ＣＲＭの機能的バリアントを、プロモーターにおいて参照ＣＲＭの代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＭと考えることができる。例えば、所与のＣＲＭの機能的バリアントを含む心特異的プロモーターは、その活性の少なくとも８０％、より好ましくはその活性の少なくとも９０％、より好ましくはその活性の少なくとも９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％（未改変ＣＲＭを含む参照プロモーターと比較して）を保持することが好ましい。

【０７００】

好適には、ＣＲＭの機能的バリアントは、参照ＣＲＭとの有意なレベルの配列同一性を保持する。好適には、機能的バリアントは、参照ＣＲＭと少なくとも７０％同一である配列、より好ましくは、参照ＣＲＭと少なくとも８０％、９０％、９５％または９９％同一である配列を含む。

【０７０１】

参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＭを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。心特異的プロモーター活性を評価するための好適なアッセイは、本明細書で、例えば実施例で、開示される。

【０７０２】

所与のＣＲＭの機能的バリアントは、一部の実施形態では、参照ＣＲＭ中に存在するＣＲＥのうちの１つまたは複数についての機能的バリアントを含み得る。例えば、所与のＣＲＭの機能的バリアントは、参照ＣＲＭ中に存在するＣＲＥのうちの１つまたは２つについての機能的バリアントを含み得る。

【０７０３】

所与のＣＲＭの機能的バリアントは、一部の実施形態では、参照ＣＲＭと同じ組合せＣＲＥを含み得るが、これらのＣＲＥは、参照ＣＲＭとは異なる順序で存在し得る。ＣＲＥは、参照ＣＲＭと同じ順序で存在する（したがって、ＣＲＭの機能的バリアントは、好適には、参照ＣＲＭにおいて示されるのと同じＣＲＥ順列を含む）ことが、通常は好ましい。

【０７０４】

所与のＣＲＭの機能的バリアントは、一部の実施形態では、参照ＣＲＭ中に存在するも

のに対して１つまたは複数の追加のＣＲＥを含み得る。追加のＣＲＥを、参照ＣＲＭ中に存在するＣＲＥの上流側に、参照ＣＲＭ中に存在するＣＲＥの下流側に、および／または参照ＣＲＭ中に存在するＣＲＥ間に備えさせることができる。追加のＣＲＥは、本明細書で開示されるＣＲＥであることもあり、または他のＣＲＥであることもある。一般に、所与のＣＲＭの機能的バリアントは、同じＣＲＥ（またはその機能的バリアント）を含むことおよび追加のＣＲＥを含まないことが好ましい。

【０７０５】

所与のＣＲＭの機能的バリアントは、参照ＣＲＭと比較して１つまたは複数の追加の調節エレメントを含み得る。例えば、それらは、誘導性または抑制性エレメント、境界制御エレメント、インシュレーター、遺伝子座制御領域、応答エレメント、結合部位、末端反復のセグメント、応答性部位、安定化エレメント、不安定化エレメント、およびスプライシングエレメントなどを含み得るが、これらがＣＲＭを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０７０６】

所与のＣＲＭの機能的バリアントは、隣接したＣＲＥ間に追加のスペーサーを含むことがあり、または１つもしくは複数のスペーサーが参照ＣＲＭ中に存在する場合、前記１つもしくは複数のスペーサーは、参照ＣＲＭ中のものより長いこともあり、もしくは短いこともある。参照ＣＲＭ中に存在するスペーサーが、機能的バリアントでは除去されていることがある。

【０７０７】

本明細書で開示されるＣＲＭまたはその機能的バリアントを任意の好適なプロモーターエレメントと組み合わせて本発明による合成心特異的プロモーターを得ることができることは、明らかであろう。好適には、プロモーターエレメントは、心特異的近位プロモーターである。

【０７０８】

多くの事例では、より短いプロモーター配列が、特に、ベクター（例えば、ＡＡＶなどのウイルスベクター）が限られた容量を有する状況での使用には、好ましい。したがって、一部の実施形態では、合成心特異的ＣＲＭは、５００ヌクレオチドまたはそれ未満、例えば、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００、７５、６０、５０ヌクレオチドまたはそれ未満の長さを有する。

ｖ．合成心特異的プロモーターおよびそれらの機能的バリアント

【０７０９】

様々な合成心特異的プロモーターが本明細書で開示される。参照合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、参照合成心特異的プロモーターとは異なる配列だが心筋特異的プロモーター活性を実質的に保持する配列を含むプロモーターである。合成心特異的プロモーターの配列を、好適な心特異的転写因子（ＴＦ）を動員するおよびＲＮＡポリメラーゼＩＩを動員するその能力を保持しつつ、作動可能に連結された配列（例えば、オープンリーディングフレーム）の心特異的発現をもたらすように変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、参照プロモーターと比較して置換、欠失および／または挿入を含み得るが、そのような置換、欠失および／または挿入が、合成心特異的プロモーターを参照プロモーターと比較して実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０７１０】

【表４】

表4:表2Aの合成心特異的プロモーターの一部の実施形態で使用される例示的な最小または近位プロモーター。

表 4	
プロモーター名	配列番号
SKM_18	配列番号 55
SKM_20	配列番号 56
CRE0082	配列番号 57
CRE0104	配列番号 58
CRE0110	配列番号 59
CRE0112	配列番号 60
CRE0113	配列番号 61
CRE0115	配列番号 62
CRE0116	配列番号 63
CRE0038	配列番号 64

【０７１１】

したがって、一部の実施形態では、合成心特異的プロモーターの機能的バリアントを、参照プロモーターの心特異的プロモーター活性を実質的に保持するバリアントと考えることができる。例えば、合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、好ましくは、参照プロモーターの活性の少なくとも７０％、より好ましくはその活性の少なくとも８０％、より好ましくはその活性の少なくとも９０％、より好ましくはその活性の少なくとも９５％、よりいっそう好ましくはその活性の１００％を保持する。

【０７１２】

合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、多くの場合、参照合成心特異的プロモーターとの有意なレベルの配列類似性を保持する。一部の実施形態では、機能的バリアントは、参照合成心特異的プロモーターと少なくとも７０％同一である配列、より好ましくは、参照合成心特異的プロモーターと少なくとも８０％、９０％、９５％または９９％同一である配列を含む。

【０７１３】

機能的バリアントは、本明細書において下記で定義される。好適には、合成心特異的プロモーターは、配列番号３～６４のいずれか１つと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列を含み得る。

【０７１４】

参照合成心特異的プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、推定機能的バリアントの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、機能的バリアントの活性を評価することができる。心特異的プロモーター活性を評価するための好適なアッセイは、本明細書で、例えば実施例で、開示される。

【０７１５】

所与の合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、参照合成心特異的プロモーター中に存在するＣＲＥの機能的バリアントを含み得る。所与の合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、参照合成心特異的プロモーター中に存在するＣＲＭの機能的バリアントを含み得る。所与の合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、参照合成心特異的プロモーターと比較したとき、プロモーターエレメントの機能的バリアントを含む

こともあり、または異なるプロモーターエレメントを含むこともある。

【０７１６】

所与の合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、参照合成心特異的プロモーター中に存在するものに対して１つまたは複数の追加のＣＲＥを含み得る。追加のＣＲＥを、例えば、参照合成心特異的プロモーター中に存在するＣＲＥの上流側に、または参照合成心特異的プロモーター中に存在するＣＲＥの下流側に備えさせることができる。追加のＣＲＥは、本明細書で開示されるＣＲＥであることもあり、または他のＣＲＥであることもある。

【０７１７】

所与の合成心特異的プロモーターの機能的バリアントは、隣接したエレメント（ＣＲＥ、ＣＲＭもしくはプロモーターエレメント）間に追加のスペーサーを含むことがあり、または１つもしくは複数のスペーサーが参照合成心特異的プロモーター中に存在する場合、前記１つもしくは複数のスペーサーは、参照合成心特異的プロモーター中のものより長いこともあり、もしくは短いこともある。あるいは、１つまたは複数のスペーサーが参照合成心特異的プロモーター中に存在する場合、これらのスペーサーは、機能的バリアントでは除去されていることがある。

【０７１８】

本発明の合成心特異的プロモーターが、本発明のＣＲＥ、または本発明のＣＲＥを含むＣＲＭ、および追加の調節配列を含み得ることは、明らかであろう。例えば、それらは、１つまたは複数の追加のＣＲＥ、誘導性または抑制性エレメント、境界制御エレメント、インシュレーター、遺伝子座制御領域、応答エレメント、結合部位、末端反復のセグメント、応答性部位、安定化エレメント、不安定化エレメント、およびスプライシングエレメントなどを含み得るが、これらがプロモーターを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０７１９】

本発明の好ましい合成心特異的プロモーターは、心細胞においてＣＭＶまたはミオシンプロモーターにより示される活性の少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、３５０％または４００％である心特異的プロモーター活性を示す。一部の実施形態では、合成心特異的プロモーターにより駆動されるホスファターゼ阻害剤遺伝子または他の例示的遺伝子の発現レベルは、心細胞においてＣＭＶプロモーターにより駆動される遺伝子の発現レベルと同等である。多くの場合、より高いプロモーター活性レベルが好ましいが、これがいつも当てはまるとは限らず、したがって、一部の場合には、より穏やかな発現レベルが好ましいことがある。一部の場合には、発現レベルを必要条件に合わせることを可能にするために異なる活性レベルの様々なプロモーターを利用できることが望ましく、本開示は、そのような様々な活性を有するプロモーターを提供する。公知のプロモーターと比較される本発明の所与の合成心特異的プロモーターの活性は、合成心特異的プロモーターの制御下でのレポーター遺伝子の心特異的発現と、公知のプロモーターの制御下での同レポーターの発現とを、これら２つのプロモーターが他の点では同等の発現構築物に備えられているときに同等の条件下で比較することにより評価され得る。

【０７２０】

異なる活性レベルに加えて、一部の場合には、異なる領域において、例えば、心臓の異なる領域、例えば心房に対して心室において、または異なる心臓細胞において、例えば、心房心筋細胞もしくは心線維芽細胞に対して心室心筋細胞において、または心臓の内皮細胞（ＥＣ）において、ならびに血管周囲細胞およびペースメーカー細胞において活性を有する、様々なプロモーターを利用できることが望ましい。加えて、発現レベルを必要条件に合わせることを可能にするために異なる領域にわたって異なる活性レベルを有する様々なプロモーターを有することが望ましいことがある。一部の場合には、特定の領域における発現が望ましい。一部の実施形態では、心臓の他の部分における発現も、身体の他の部

分における発現も、ほとんどまたは全くない、心筋細胞における発現が望ましい。好適には、発現は、心臓内の複数の領域において必要とされ得る。一部の好ましい実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、次の心臓領域のいずれかまたはすべてにおいて活性を示す：大動脈弓動脈（ＡＡ）；大動脈；心筋細胞（ＣＭ）；内皮細胞または心内膜細胞（ＥＣ）；下大静脈（ＩＣＶ）；心室中隔（ＩＶＳ）；左房（ＬＡ）；左上大静脈（ＬＳＣＶ）；左室（ＬＶ）；流出路（ＯＴ）；肺動脈（ＰＯ）；前心外膜組織（ＰＥＯ）；肺静脈（ＰＶ）；右房（ＲＡ）；右上大静脈（ＲＳＣＶ）；右室（ＲＶ）；上大静脈（ＳＣＶ）；心平滑筋細胞（ＳＭ）。一部の実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、上述の心臓エリアでは活性を示すが、心臓の他のエリア、身体の他のエリアでは、ほとんどまたは全く活性を示さない。

【０７２１】

異なる活性レベル、および異なる活性エリアに加えて、一部の場合には、異なる細胞または細胞の組合せ、例えば、異なる心筋細胞集団において活性を有する様々なプロモーターを利用できることが望ましい。一部の好ましい実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心筋細胞において活性を示す。一部の好ましい実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心室の心筋細胞においてまたは伝導心筋細胞において活性を示す。一部の好ましい実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心筋細胞および平滑筋細胞において活性を示す。一部の好ましい実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心室の心筋細胞において、伝導心筋細胞および心臓の平滑筋細胞において活性を示す。一部の実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心筋細胞において活性を示し、他の心臓細胞型においてほとんどまたは全く発現しない。一部の実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心筋細胞および心臓の平滑筋細胞において活性を示し、他の心臓細胞型においてほとんどまたは全く発現しない。一部の実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、心筋細胞においておよびペースメーカー細胞において活性を示し、他の心臓細胞型においてほとんどまたは全く発現を示さない。

【０７２２】

あるいは、心臓のすべてのまたはほぼすべての領域、好適には全収縮エリアにおいて、例えば、心室および心房を構成する細胞において広く発現されることが好ましいこともある。

【０７２３】

本発明の好ましい合成心特異的プロモーターは、ＭＬＣ－２ｖ心特異的プロモーターにより示される活性の少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、３５０％または４００％である心特異的プロモーター活性を示す。ＭＬＣ－２ｖプロモーターと比較される本発明の所与の合成心特異的プロモーターの活性は、心臓組織または心臓細胞、例えば、心筋細胞における、合成心特異的プロモーターの制御下でのレポーター遺伝子の心特異的発現と、ＭＬＣ－２ｖプロモーターの制御下での同レポーターの発現とを、これら２つのプロモーターが他の点では同等の発現構築物に備えられているときに同等の条件下で比較することにより評価され得る。一部の実施形態では、本発明の合成心特異的プロモーターは、対象のニューロンにおける遺伝子（例えば、治療用遺伝子または目的の遺伝子）の発現を、公知の心特異的プロモーター、好適にはＭＬＣ－２ｖプロモーターと比べて、少なくとも２０％、少なくとも４０％、少なくとも６０％、少なくとも８０％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、少なくとも３００％、少なくとも５００％、少なくとも１０００％またはそれより大きく増加させることができる。本明細書で開示される合成心特異的プロモーターの心特異的発現は、他の公知の心特異的プロモーター、例えば、これらに限定されるものではないが、以下の遺伝子：αミオシン重鎖遺伝子、例えば心室αミオシン重鎖遺伝子、βミオシン重鎖遺伝子、例えば心室βミオシン重鎖遺伝子、心室ミオシンＭｙｏｓｉｎ軽鎖２ｖ遺伝子、例えば軽鎖２遺伝子、ミオシン軽鎖２ａ遺伝子、例えば心室ミオシン軽鎖２遺伝子、心臓筋細胞限定心アン

キリン反復タンパク質（ＣＡＲＰ）遺伝子、心αアクチン遺伝子、心ｍ２ムスカリン／アセチルコリン遺伝子からのプロモーター、と比較され得る。ＡＮＰ遺伝子、ＢＮＰ遺伝子、心トロポニンＣ遺伝子、心トロポニンＩ遺伝子、心トロポニンＴ遺伝子、心臓筋小体Ｃａ－ＡＴａｓｅ遺伝子、骨格αアクチン遺伝子、および人工心臓細胞特異的プロモーターがある。

【０７２４】

加えて、本明細書で開示される合成心特異的プロモーターは、使用され得る他の腔特異的プロモーターまたはエンハンサーと、例えば、心房特異的発現についてウズラ遅筋型ミオシン鎖３型（ＭｙＨＣ３）もしくはＡＮＰプロモーター、またはｃＧＡＴＡ－６エンハンサーと、比較され得る。Ｉｒｏｑｕｏｉｓホメオボックス遺伝子を心室特異的発現に使用することができる。心室筋細胞特異的プロモーターの例としては、心室ミオシン軽鎖２プロモーターおよび心室ミオシン重鎖プロモーターが挙げられる。一部の実施形態では、他のプロモーターおよび／またはエンハンサーと比較され得る本明細書で開示される合成心特異的プロモーターとしては、Ｃｓｘ／ＮＫＸ２．５遺伝子、タイチン遺伝子、αアクチニン遺伝子、ミオメシン遺伝子、Ｍタンパク質遺伝子、心トロポニンＴ遺伝子、ＲｙＲ２遺伝子、Ｃｘ４０遺伝子、Ｃｘ４３遺伝子、さらにはＭｅｆ２が挙げられる。ｄＨＡＮＤ、ＧＡＴＡ、ＣａｒＧ、Ｅボックス、Ｃｓｘ／ＮＫＸ２．５、もしくはＴＧＦ－ベータ、またはこれらの組合せに結合する遺伝子がある。

【０７２５】

多くの事例では、より短いプロモーター配列が、特に、ベクター（例えば、ＡＡＶなどのウイルスベクター）が限られた容量を有する状況での使用には、好ましい。したがって、一部の実施形態では、合成心特異的プロモーターは、１０００ヌクレオチドまたはそれ未満、例えば、９００、８００、７００、６００、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００ヌクレオチドまたはそれ未満の長さを有する。特に好ましい合成心特異的プロモーターは、短くもあり高い活性レベルも示すものである。

【０７２６】

心特異的プロモーターがＡＡＶベクター内で心特異的活性を保持する場合は、驚きであり、ＡＡＶベクターのＩＴＲ、およびゲノムと比較して異なるＤＮＡ構造が、プロモーターの活性に影響を及ぼすことは公知であり、多くの場合、ＩＴＲおよび異なるＤＮＡ構造は、プロモーターの活性に悪影響を与えるからである。

【０７２７】

表２Ａ、５Ａまたは表３もしくは６のいずれか１つのバリアントＣＲＥを含む、本発明による心特異的プロモーターは、参照ＣＲＥの活性の少なくとも２５％、５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または１００％を保持することが、一般に好ましい。参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。好適には、前記活性は、本明細書に記載の実施例を使用して評価されるが、他の方法を使用してもよい。好適には、そのまたは各ＣＲＥは、心特異的シス調節エレメントである。

【０７２８】

好適には、プロモーターエレメントは、最小または近位プロモーターである。好ましくは、存在する場合、近位プロモーターは、心特異的近位プロモーターである。

【０７２９】

一部の実施形態では、合成心特異的プロモーターは、配列番号３～６４のいずれか１つによる配列もしくはこの配列の機能的バリアントを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態では、合成心特異的プロモーターは、配列番号３～６４のいずれか１つと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％同一である配列を含むか、またはそれからなる。

【０７３０】

したがって、本発明は、様々な合成心特異的プロモーターおよびそれらの機能的バリア

ントを提供する。配列番号３～３８または５５、５６、８０～２００、２９０～３２９のいずれか１つのバリアントである、本発明によるプロモーターは、参照プロモーターの活性の少なくとも２５％、５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または１００％を保持することが、一般に好ましい。好適には、前記活性は、本明細書に記載の実施例を使用して評価されるが、他の方法を使用してもよい。好適には、最小または近位プロモーターは、ＣＲＥまたはＣＲＭと作動可能に連結され得る。ＣＲＥは、本発明によるＣＲＥまたは任意の他のＣＲＥであり得る。ＣＲＭは、本発明によるＣＲＭであり得、または本発明によるＣＲＥを含み得る。好適には、ＣＲＥまたはＣＲＭは、心特異的である。

【０７３１】

好適には、本発明による近位プロモーターは、１つまたは複数の近位プロモーターと作動可能に連結され得る。本発明による合成心特異的プロモーターは、２つの近位プロモーターを含み得るか、またはそれらからなり得る。好適には、本発明による合成心特異的プロモーターは、２つもしくはそれより多くの近位プロモーターを含み得るか、またはそれらからなり得る。好適には、近位プロモーターは、心特異的近位プロモーターである。好適には、少なくとも２つの近位プロモーターは、本発明によるＣＲＥまたはＣＲＭに作動可能に連結され得る。

【０７３２】

本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓の特定の領域において、好ましくは心筋細胞において、または特定の心臓細胞型において、または心臓細胞型の組合せにおいて、または両方の組合せにおいて、活性であり得る。したがって、好適には、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心特異的である。

【０７３３】

本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓の様々な部分のうちの１つまたは複数において活性であり得る。好適には、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓において活性であり得る。好適には、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心筋細胞において活性であり得るが、心臓のいずれの他の部分においても活性であり得ない。好適には、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓内の様々なエリアのうちの１つまたは複数において活性であり得る。

【０７３４】

一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、ＣＲＭ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓において広範な活性を示すことが望ましいこともある。一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、ＣＲＭ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓のすべての部分（全心臓）において活性である。一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、ＣＲＭ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、上述の心臓のエリアのうちの１、２、３、４、５、６、７、８または９カ所において活性である。

【０７３５】

一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓の１エリアにおいて顕著な活性を示すことが望ましいこともある。好適には、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓の１エリアでは活性を示すが心臓の他の部分では活性を示さないかまたは最小限の活性しか示さないことが望ましいこともある。一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、上述の心臓のエリアのうちの１エリアのみにおいて活性である。

【０７３６】

本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、心臓の様々な細胞において活性であり得る。心臓における主な細胞型は、心室心筋細胞、心房心筋細胞、心線維芽細胞、または心臓の内皮細胞（ＥＣ）、ならびに血管周囲細胞およびペースメーカー細胞である。さらに、本発明の、ＣＲＥ、最小／近位プロモーター、またはプロモー

ターは、例えば、以下の心臓領域のいずれかまたはすべてにおける活性など、心臓の様々な領域において活性であり得る：大動脈弓動脈（ＡＡ）；大動脈；心筋細胞（ＣＭ）；内皮細胞または心内膜細胞（ＥＣ）；下大静脈（ＩＣＶ）；心室中隔（ＩＶＳ）；左房（ＬＡ）；左上大静脈（ＬＳＣＶ）；左室（ＬＶ）；流出路（ＯＴ）；肺動脈（ＰＯ）；前心外膜組織（ＰＥＯ）；肺静脈（ＰＶ）；右房（ＲＡ）；右上大静脈（ＲＳＣＶ）；右室（ＲＶ）；上大静脈（ＳＣＶ）；心平滑筋細胞（ＳＭ）。一部の実施形態では、本発明による心特異的プロモーターは、上述の心臓エリアでは活性を示すが、心臓の他のエリア、身体の他のエリアでは、ほとんどまたは全く活性を示さない。他の細胞型が、特に炎症状態では、存在することもある。一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、ＣＲＭ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、少なくとも４つ、または少なくとも３つ、または少なくとも２つ、または少なくとも１つの上述の心臓細胞型、例えば、心室心筋細胞、心房心筋細胞、心線維芽細胞、または心臓の内皮細胞（ＥＣ）、ならびに血管周囲細胞およびペースメーカー細胞において、活性である。

【０７３７】

一部の実施形態では、プロモーターは、限られた数の心臓細胞型においてまたは１つ以下の心臓細胞型において活性であることが望ましいことがある。

【０７３８】

一部の実施形態では、本発明の、ＣＲＥ、ＣＲＭ、最小／近位プロモーター、またはプロモーターは、例えば、心室心筋細胞、心房心筋細胞、心線維芽細胞、または心臓の内皮細胞（ＥＣ）、ならびに血管周囲細胞およびペースメーカー細胞などの、心臓細胞の特定のサブタイプにおいて、活性である。

【０７３９】

所望の心臓組織または心臓細胞において本発明の心特異的プロモーターにより駆動される発現は、少なくとも１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２３時間、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、１週間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、２週間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、３週間、２２日間、２３日間、２４日間、２５日間、２６日間、２７日間、２８日間、２９日間、３０日間、３１日間、１か月間、２か月間、３か月間、４か月間、５か月間、６か月間、７か月間、８か月間、９か月間、１０か月間、１１か月間、１年間、１３か月間、１４か月間、１５か月間、１６か月間、１７か月間、１８か月間、１９か月間、２０か月間、２１か月間、２２か月間、２３か月間、２年間、３年間、４年間、５年間、６年間、７年間、８年間、９年間、１０年間、１５年間、２０年間、３０年間、４０年間、５０年間、６０年間、７０年間、８０年間、９０年間、１００年間の期間の発現であり得る。所望の組織または細胞において本発明のプロモーターにより駆動される発現は、１か月間、２か月間、３か月間、４か月間、５か月間、６か月間、７か月間、８か月間、９か月間、１０か月間、１１か月間、１年間、１３か月間、１４か月間、１５か月間、１６か月間、１７か月間、１８か月間、１９か月間、２０か月間、２１か月間、２２か月間、２３か月間、２年間、３年間、４年間、５年間、６年間、７年間、８年間、９年間、１０年間、２０年間、３０年間、４０年間、５０年間、６０年間、７０年間、８０年間、９０年間、１００年間の発現であり得る。発現は、１～５時間、１～１２時間、１～２日間、１～５日間、１～２週間、１～３週間、１～４週間、１～２か月間、１～４か月間、１～６か月間、２～６か月間、３～６か月間、３～９か月間、４～８か月間、６～１２か月間、１～２年間、１～５年間、２～５年間、３～６年間、３～８年間、４～８年間、５～１０年間、１０～１５年間、１５～２０年間、２０～３０年間、３０～４０年間、４０～５０年間、５０～６０年間、６０～７０年間、８０～９０年間または９０～１００年間より長い期間の発現であり得る。

【０７４０】

さらなる態様では、本発明による心臓疾患の処置のための導入遺伝子（例えば、これら

に限定されるものではないが、ＰＰ１および／または血管新生タンパク質またはペプチドの阻害剤）に機能的に連結された、合成心特異的プロモーターを含むｒＡＡＶベクターを含む、医薬組成物が提供される。例えば、ｒＡＡＶベクター粒子は、本明細書における投与方法での使用のための医薬組成物として調製され得る。そのような組成物が、１つまたは複数の活性成分を必然的に含み、ほとんどの場合、薬学的に許容される賦形剤を含むことは、理解されるであろう。

ｖｉ．心臓および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター

【０７４１】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、筋肉特異的プロモーターに機能的に連結された治療剤、例えばＰＰ１の阻害剤または他の薬剤、をコードする核酸を含み、筋肉特異的プロモーターは、骨格筋と心筋の両方において活性である。例示的な筋肉特異的プロモーターは、本明細書における表５Ａ、５Ｂ、６および７で開示される。一部の実施形態では、心特異的プロモーターは、合成心特異的プロモーターである。

【０７４２】

心臓および骨格筋において活性である筋肉特異的プロモーター。

【０７４３】

一部の実施形態では、プロモーターは、骨格筋と心筋の両方において活性の合成筋肉特異的プロモーターである。骨格筋と心筋の両方において活性の筋肉特異的プロモーターの例としては、ＳＰ００１０、ＳＰ００２０、ＳＰ００３３、ＳＰ００３８、ＳＰ００４０、ＳＰ００４２、ＳＰ００５１、ＳＰ００５７、ＳＰ００５８、ＳＰ００６１、ＳＰ００６２、ＳＰ００６４、ＳＰ００６５、ＳＰ００６６、ＳＰ００６８、ＳＰ００７０、ＳＰ００７１、ＳＰ００７６、ＳＰ０１３２、ＳＰ０１３３、ＳＰ０１３４、ＳＰ０１３６、ＳＰ０１４６、ＳＰ０１４７、ＳＰ０１４８、ＳＰ０１５０、ＳＰ０１５３、ＳＰ０１５５、ＳＰ０１５６、ＳＰ０１５７、ＳＰ０１５８、ＳＰ０１５９、ＳＰ０１６０、ＳＰ０１６１、ＳＰ０１６２、ＳＰ０１６３、ＳＰ０１６４、ＳＰ０１６５、ＳＰ０１６６、ＳＰ０１６９、ＳＰ０１７０、ＳＰ０１７１、ＳＰ０１７３、ＳＰ０２２８、ＳＰ０２２９、ＳＰ０２３０、ＳＰ０２３１、ＳＰ０２３２、ＳＰ０２５７、ＳＰ０２６２、ＳＰ０２６４、ＳＰ０２６５、ＳＰ０２６６、ＳＰ０２６７、ＳＰ０２６８、ＳＰ０２７０、ＳＰ０２７１、ＳＰ０２７９、ＳＰ０２８６、ＳＰ０３０５、ＳＰ０３０６、ＳＰ０３０７、ＳＰ０３０９、ＳＰ０３１０、ＳＰ０３１１、ＳＰ０３１２、ＳＰ０３１３、ＳＰ０３１４、ＳＰ０３１５、ＳＰ０３１６、ＳＰ０３２０、ＳＰ０３２２、ＳＰ０３２３、ＳＰ０３２４、ＳＰ０３２５、ＳＰ０３２６、ＳＰ０３２７、ＳＰ０３２８、ＳＰ０３２９、ＳＰ０３３０、ＳＰ０３３１、ＳＰ０３３２、ＳＰ０３３３、ＳＰ０３３４、ＳＰ０３３５、ＳＰ０３３６、ＳＰ０３３７、ＳＰ０３３８、ＳＰ０３３９、ＳＰ０３４０、ＳＰ０３４１、ＳＰ０３４３、ＳＰ０３４５、ＳＰ０３４６、ＳＰ０３４７、ＳＰ０３４８、ＳＰ０３４９、ＳＰ０３５０、ＳＰ０３５１、ＳＰ０３５２、ＳＰ０３５３、ＳＰ０３５４、ＳＰ０３５５、ＳＰ０３５６、ＳＰ０３５８、ＳＰ０３５９、ＳＰ０３６１、ＳＰ０３６２、ＳＰ０３６３、ＳＰ０３６４、ＳＰ０３６５、ＳＰ０３６６、ＳＰ０３６７、ＳＰ０３６８、ＳＰ０３６９、ＳＰ０３７０、ＳＰ０３７１、ＳＰ０３７２、ＳＰ０３７３、ＳＰ０３７４、ＳＰ０３７５、ＳＰ０３７６、ＳＰ０３７７、ＳＰ０３７８、ＳＰ０３７９、ＳＰ０３８０、ＳＰ０３８１、ＳＰ０３８２、ＳＫＭ＿１４、ＳＫＭ＿１８、ＳＫＭ＿２０、ＳＰ０３５７、ＳＰ０４３７～ＳＰ０４４５、ＳＰ０４４７およびＳＰ０４５３～ＳＰ０４７１、ＳＰ０４７３～ＳＰ０４７４が挙げられる。骨格筋と心筋の両方において活性である、好ましい合成筋肉特異的プロモーターの例は、ＳＰ００５７、ＳＰ０１３４、ＳＰ０１７３、ＳＰ０２７９、ＳＰ０２８６、ＳＰ０３１０、ＳＰ０３１６、ＳＰ０３２０およびＳＰ０３２６である。

【０７４４】

一部の実施形態では、骨格筋および心筋において活性である、合成筋肉特異的プロモーターは、配列番号５５、５６、８０～２００、２９０～３２９のいずれか１つによる配列もしくはこの配列の機能的バリアントを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態で

は、骨格筋および心筋において活性である、合成筋肉特異的プロモーターは、配列番号５５、５６、８０～２００、２９０～３２９のいずれか１つと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％同一である配列を含むか、またはそれからなる。

【０７４５】

表５Ａは、本明細書で開示される方法および組成物における使用のための、心筋および骨格筋において活性の例示的な筋肉特異的プロモーターの核酸配列についての配列識別番号を示す。

【表５Ａ－１】

表 5A:

名称	配列番号	長さ	名称	配列番号	長さ
SP0010	配列番号 80	298	SP0333	配列番号 162	543
SP0020	配列番号 81	354	SP0334	配列番号 163	362
SP0033	配列番号 82	270	SP0335	配列番号 164	715
SP0038	配列番号 83	286	SP0336	配列番号 165	521
SP0040	配列番号 84	315	SP0337	配列番号 166	618
SP0042	配列番号 85	421	SP0338	配列番号 167	729
SP0051	配列番号 86	524	SP0339	配列番号 168	610
SP0057	配列番号 87	601	SP0340	配列番号 169	654
SP0058	配列番号 88	531	SP0341	配列番号 170	924
SP0061	配列番号 89	528	SP0343	配列番号 171	652
SP0062	配列番号 90	454	SP0345	配列番号 172	693

【表５Ａ－２】

表 5A:

名称	配列番号	長さ	名称	配列番号	長さ
SP0064	配列番号 91	484	SP0346	配列番号 173	576
SP0065	配列番号 92	465	SP0347	配列番号 174	606
SP0066	配列番号 93	484	SP0348	配列番号 175	575
SP0068	配列番号 94	448	SP0349	配列番号 176	907
SP0070	配列番号 95	444	SP0350	配列番号 177	727
SP0071	配列番号 96	404	SP0351	配列番号 178	365
SP0076	配列番号 97	438	SP0352	配列番号 179	365
SP0132	配列番号 98	538	SP0353	配列番号 180	568
SP0133	配列番号 99	528	SP0354	配列番号 181	376
SP0134	配列番号 100	655	SP0355	配列番号 182	296
SP0136	配列番号 101	588	SP0356	配列番号 183	654
SP0146	配列番号 102	660	SP0358	配列番号 184	659
SP0147	配列番号 103	806	SP0359	配列番号 185	332
SP0148	配列番号 104	938	SP0361	配列番号 186	483
SP0150	配列番号 105	814	SP0362	配列番号 187	535
SP0153	配列番号 106	418	SP0363	配列番号 188	598
SP0155	配列番号 107	508	SP0364	配列番号 189	683
SP0156	配列番号 108	718	SP0365	配列番号 190	453
SP0157	配列番号 109	202	SP0366	配列番号 191	591
SP0158	配列番号 110	705	SP0367	配列番号 192	429
SP0159	配列番号 111	615	SP0368	配列番号 193	550
SP0160	配列番号 112	586	SP0369	配列番号 194	388
SP0161	配列番号 113	740	SP0370	配列番号 195	514
SP0162	配列番号 114	650	SP0371	配列番号 196	354
SP0163	配列番号 115	621	SP0372	配列番号 197	354
SP0164	配列番号 116	764	SP0373	配列番号 198	362
SP0165	配列番号 117	480	SP0374	配列番号 199	362
SP0166	配列番号 118	894	SP0375	配列番号 200	376
SP0169	配列番号 119	248	SP0376	配列番号 290	434
SP0170	配列番号 120	482	SP0377	配列番号 291	436
SP0171	配列番号 121	534	SP0378	配列番号 292	522
SP0173	配列番号 122	728	SP0379	配列番号 293	524
SP0228	配列番号 123	885	SP0380	配列番号 294	522
SP0229	配列番号 124	1003	SP0381	配列番号 295	524
SP0230	配列番号 125	953	SP0382	配列番号 296	524
SP0231	配列番号 126	773	SKM_14	配列番号 297	240

【表５Ａ－３】

表 5A:

名称	配列番号	長さ	名称	配列番号	長さ
SP0232	配列番号 127	683	SKM_18	配列番号 55	242
SP0257	配列番号 128	710	SKM_20	配列番号 56	232
SP0262	配列番号 129	943	SP0357	配列番号 298	335
SP0264	配列番号 130	724	SP0437	配列番号 299	340
SP0265	配列番号 131	822	SP0438	配列番号 300	365
SP0266	配列番号 132	1016	SP0439	配列番号 301	365
SP0267	配列番号 133	560	SP0440	配列番号 302	585
SP0268	配列番号 134	728	SP0441	配列番号 303	546
SP0270	配列番号 135	562	SP0442	配列番号 304	585
SP0271	配列番号 136	451	SP0443	配列番号 305	328
SP0279	配列番号 137	883	SP0444	配列番号 306	328
SP0286	配列番号 138	616	SP0445	配列番号 307	436
SP0305	配列番号 139	562	SP0447	配列番号 308	291
SP0306	配列番号 140	500	SP0453	配列番号 309	761
SP0307	配列番号 141	554	SP0454	配列番号 310	720
SP0309	配列番号 142	636	SP0455	配列番号 311	551
SP0310	配列番号 143	441	SP0456	配列番号 312	688
SP0311	配列番号 144	318	SP0457	配列番号 313	621
SP0312	配列番号 145	501	SP0458	配列番号 314	759
SP0313	配列番号 146	395	SP0459	配列番号 315	837
SP0314	配列番号 147	334	SP0460	配列番号 316	298
SP0315	配列番号 148	204	SP0461	配列番号 317	365
SP0316	配列番号 149	376	SP0462	配列番号 318	356
SP0320	配列番号 150	944	SP0463	配列番号 319	772
SP0322	配列番号 151	661	SP0464	配列番号 320	837
SP0323	配列番号 152	613	SP0465	配列番号 321	772
SP0324	配列番号 153	407	SP0466	配列番号 322	764
SP0325	配列番号 154	409	SP0467	配列番号 323	671
SP0326	配列番号 155	483	SP0468	配列番号 324	671
SP0327	配列番号 156	538	SP0469	配列番号 325	506
SP0328	配列番号 157	822	SP0470	配列番号 326	365
SP0329	配列番号 158	324	SP0471	配列番号 327	624
SP0330	配列番号 159	365	SP0473	配列番号 328	718
SP0331	配列番号 160	365	SP0474	配列番号 329	465
SP0332	配列番号 161	565			

【０７４６】

【表５Ｂ－１】

表5B:表1Cに示されている心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターの実施形態の
CREおよび最小/近位プロモーター

プロモーター（配列番号）	CRE（配列番号）	CRE（配列番号）	CRE（配列番号）	CRE（配列番号）	プロモーターエレメント（配列番号）	5'UTR および/またはイントロン（配列番号）
SP0010 (80)					CRE0010 (264)	
SP0020 (81)				CRE0020 (203)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0033 (82)				CRE0035 (208)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0038 (83)				CRE0031 (207)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0040 (84)				CRE0036 (209)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0042 (85)				CRE0036 (209)	CRE0037 (267)	
SP0051 (86)				CRE0020 (203)	SKM_14 (277)	
SP0057 (87)			CRE0029 (206)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0058 (88)				CRE0016 (201)	CRE0005 (262)	
SP0061 (89)				CRE0016 (201)	SKM_18 (55)	
SP0062 (90)				CRE0018 (202)	SKM_18 (55)	
SP0064 (91)				CRE0027 (205)	SKM_18 (55)	
SP0065 (92)				CRE0028 (40)	SKM_18 (55)	
SP0066 (93)				CRE0029 (206)	SKM_18 (55)	
SP0068 (94)				CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	
SP0070 (95)				CRE0018 (202)	SKM_20 (56)	
SP0071 (96)				CRE0025 (204)	SKM_20 (56)	
SP0076 (97)				CRE0035 (208)	SKM_20 (56)	
SP0132 (98)				CRE0020 (203)	SKM_18 (55)	
SP0133 (99)				CRE0020 (203)	SKM_20 (56)	
SP0134 (100)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0136 (101)				CRE0020 (203)	CRE0010 (264)	
SP0146 (102)				CRE0050 (211)	CRE0049 (270)	HBB イントロン (283)
SP0147 (103)				CRE0020 (203)	CRE0049 (270)	HBB イントロン (283)
SP0148 (104)				CRE0020 (203)	RSV (279)	
SP0150 (105)				CRE0025 (204)	RSV (279)	
SP0153 (106)				CRE0035 (208)	CRE0046 (268)	
SP0155 (107)		CRE0035 (208)	48 bp (224)	48 bp (224)	CRE0046 (268)	
SP0156 (108)			CRE0035 (208)	CRE0020 (203)	SKM_14 (277)	
SP0157 (109)				CRE0050 (211)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	

【表５Ｂ－２】

SP0158 (110)			CRE0020 (203)	CRE0036 (209)	CRE0037 (267)	
SP0159 (111)			CRE0035 (208)	CRE0036 (209)	CRE0037 (267)	
SP0160 (112)			CRE0035 (208)	CRE0031 (207)	CRE0037 (267)	
SP0161 (113)			CRE0020 (203)	CRE0036 (209)	CRE0009 (263)	
SP0162 (114)			CRE0035 (208)	CRE0036 (209)	CRE0009 (263)	
SP0163 (115)			CRE0035 (208)	CRE0031 (207)	CRE0009 (263)	
SP0164 (116)			CRE0047 (210)	CRE0020 (203)	CRE0048 (269)	
SP0165 (117)				CRE0047 (210)	CRE0048 (269)	
SP0166 (118)				CRE0051 (212)	RSV (279)	
SP0169 (119)					SKM_18 (55)	
SP0170 (120)				CRE0051 (212)	SKM_18 (55)	
SP0171 (121)				CRE0010 (264)	SKM_18 (55)	
SP0173 (122)			CRE0010 (264)	CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	
SP0228 (123)		CRE0020 (203)	CRE0029 (206)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0229 (124)		CRE0020 (203)	CRE0029 (206)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0230 (125)		CRE0020 (203)	CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0231 (126)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0232 (127)			CRE0035 (208)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0257 (128)			CRE0010 (264)	CRE0035 (208)	CRE0046 (268)	
SP0262 (129)			CRE0010 (264)	CRE0035 (208)	CRE0054 (272)	
SP0264 (130)				CRE0035 (208)	CRE0010 (264)	
SP0265 (131)				CRE0010 (264)	CRE0010_ALDOA (265)	
SP0266 (132)			CRE0010 (264)	CRE0035 (208)	CRE0010_ALDOA (265)	
SP0267 (133)			CRE0033 (41)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0268 (134)			CRE0035 (208)	CRE0010 (264)	SKM_18 (55)	
SP0270 (135)			CRE0035 (208)	CRE0055 (273)	DES_mp_v1 (280)	
SP0271 (136)				CRE0035 (208)	CRE0056 (274)	
SP0279 (137)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	CRE0070.2 (275)	CMV-IE (65)
SP0286 (138)				CRE0071 (216)	CRE0070.2 (275)	CMV-IE (65)
SP0305 (139)			CRE0010 (264)	CRE0035 (208)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0306 (140)			CRE0029 (206)	CRE0035 (208)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0307 (141)			CRE0020 (203)	CRE0035 (208)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0309 (142)			CRE0035 (208)	CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	
SP0310 (143)				CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	
SP0311 (144)			CRE0035 (208)	48 bp (224)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	

【表５Ｂ－３】

SP0312 (145)			CRE0047 (210)	CRE0035 (208)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0313 (146)			CRE0035 (208)	CRE0059 (213)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0314 (147)		CRE0035 (208)	CRE0060 (214)	CRE0060 (214)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0315 (148)				CRE0050 (211)	CRE0053.2 SRL_mp (271)	
SP0316 (149)				CRE0050 (211)	SKM_18 (55)	
SP0320 (150)			CRE0010 (264)	CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	CMV-IE (65)
SP0322 (151)			CRE0069 (215)	CRE0051 (212)	SKM_18 (55)	
SP0323 (152)			CRE0069.2 (242)	CRE0051 (212)	SKM_18 (55)	
SP0324 (153)				CRE0069 (215)	SKM_14 (277)	
SP0325 (154)				CRE0069 (215)	SKM_18 (55)	
SP0326 (155)				CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0327 (156)			CRE0069 (215)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0328 (157)		CRE0020 (203)	CRE0069 (215)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0329 (158)				CRE0071.13 (243)	CRE0070 (42)	
SP0330 (159)				CRE0071.3 (43)	CRE0070 (42)	
SP0331 (160)				CRE0071.4 (236)	CRE0070 (42)	
SP0332 (161)			CRE0035 (208)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0333 (162)				CRE0035 (208)	CRE0072 (276)	
SP0334 (163)				CRE0035 (208)	DES_mp_v1 (280)	
SP0335 (164)			CRE0035 (208)	CRE0055 (273)	CRE0034 (266)	
SP0336 (165)				CRE0055 (273)	CRE0034 (266)	
SP0337 (166)			CRE0035 (208)	CRE0055 (273)	CRE0046 (268)	
SP0338 (167)		CRE0069 (215)	CRE0035 (208)	CRE0055 (273)	DES_mp_v1 (280)	
SP0339 (168)		CRE0035 (208)	48 bp (224)	CRE0055 (273)	DES_mp_v1 (280)	
SP0340 (169)			CRE0035 (208)	CRE0046 (268)	SKM_18 (55)	
SP0341 (170)			CRE0035 (208)	CRE0055 (273)	CRE0010_ALDOA (265)	
SP0343 (171)				CRE0035 (208)	SKM_18.2 (278)	CMV-IE (65)
SP0345 (172)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	DES_mp_v1 (280)	
SP0346 (173)			CRE0069 (215)	CRE0071 (216)	DES_mp_v1 (280)	
SP0347 (174)			CRE0029 (206)	CRE0050 (211)	SKM_18 (55)	

【表５Ｂ－４】

SP0348 (175)			CRE0029.2 (241)	CRE0050 (211)	SKM_18 (55)	
SP0349 (176)		CRE0029 (206)	CRE0035 (208)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0350 (177)		CRE0020 (203)	72 bp (246)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0351 (178)				CRE0071.14 (244)	CRE0070 (42)	
SP0352 (179)				CRE0071.15 (245)	CRE0070 (42)	
SP0353 (180)				CRE0073 (218)	CRE0046 (268)	
SP0354 (181)				CRE0074 (219)	CRE0046 (268)	
SP0355 (182)				CRE0075 (220)	CRE0046 (268)	
SP0356 (183)				CRE0076 (221)	CRE0046 (268)	
SP0358 (184)				CRE0078 (222)	CRE0046 (268)	
SP0359 (185)				CRE0079 (223)	CRE0046 (268)	
SP0361 (186)				CRE0071.14 (244)	SKM_18 (55)	
SP0362(187)			CRE0069 (215)	CRE0071.5 (217)	DES_mp_v1 (280)	
SP0363 (188)			CRE0029 (206)	CRE0071.5 (217)	DES_mp_v1 (280)	
SP0364 (189)			CRE0029 (206)	CRE0071 (216)	CRE0046 (268)	
SP0365 (190)				CRE0071 (216)	CRE0046 (268)	
SP0366 (191)			CRE0079 (223)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0367 (192)				CRE0079 (223)	CRE0034 (266)	
SP0368 (193)			CRE0079 (223)	CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	
SP0369 (194)				CRE0071.6 (237)	CRE0070 (42)	
SP0370 (195)				CRE0071.7 (225)	CRE0070 (42)	
SP0371 (196)				CRE0071.8 (238)	CRE0070 (42)	
SP0372 (197)				CRE0071.9 (239)	CRE0070 (42)	
SP0373 (198)				CRE0071.10 (226)	CRE0070 (42)	
SP0374 (199)				CRE0071.11 (227)	CRE0070 (42)	
SP0375 (200)				CRE0071.12 (228)	CRE0070 (42)	
SP0376 (290)		CRE0035 (208)	HTMB ev_4 (282)	DES_MT_エンハンサー_48bp_v2 (229)	DES_mp_v1 (280)	

【表５Ｂ－５】

SP0377 (291)		CRE0035 (208)	HTMB ev_4 (282)	DES_MT_エンハンサー_48bp_v3 (230)	DES_mp_v1 (280)	
SP0378 (292)			CRE0020 (203)	DES_MT_エンハンサー_72bp_v2 (231)	DES_mp_v1 (280)	
SP0379 (293)			CRE0020 (203)	DES_MT_エンハンサー_72bp_v3 (232)	DES_mp_v1 (280)	
SP0380 (294)			CRE0020 (203)	DES_MT_エンハンサー_72bp_v4 (233)	DES_mp_v1 (280)	
SP0381 (295)			CRE0020 (203)	DES_MT_エンハンサー_72bp_v5 (234)	DES_mp_v1 (280)	
SP0382 (296)			CRE0020 (203)	DES_MT_エンハンサー_72bp_v6 (235)	DES_mp_v1 (280)	
SKM_14 (297)					SKM_14 (277)	
SKM_18 (55)					SKM_18 (55)	
SKM_20 (56)					SKM_20 (56)	
SP0357 (298)				CRE0077 (240)	CRE0046 (268)	
SP0437 (299)				CRE0071.16 (249)	CRE0070 (42)	
SP0438 (300)				CRE0071.17 (250)	CRE0070 (42)	
SP0439 (301)				CRE0071.18 (251)	CRE0070 (42)	
SP0440 (302)			CRE0020 (203)	CRE0071.13 (243)	CRE0070 (42)	
SP0441 (303)			CRE0020 (203)	CRE0071.19 (252)	CRE0070 (42)	
SP0442 (304)			CRE0020 (203)	CRE0071.5 (217)	CRE0070 (42)	
SP0443 (305)				CRE0071.20 (253)	CRE0070 (42)	
SP0444 (306)				CRE0071.21 (254)	CRE0070 (42)	
SP0445 (307)				CRE0071.5 (217)	SKM_18 (55)	
SP0447 (308)				CRE0071.22 (255)	CRE0070 (42)	

【表５Ｂ－６】

SP0453 (309)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0454 (310)			CRE0020 (203)	CRE0071.5 (217)	SKM_18 (55)	
SP0455 (311)		CRE0093 (247)	CRE0094 (248)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0456 (312)		CRE0093 (247)	CRE0094 (248)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0457 (313)	CRE0093 (247)	CNTRL_001 (259)	CRE0094 (248)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0458 (314)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	SKM_14 (277)	
SP0459 (315)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	CRE0049 (270)	
SP0460 (316)				CRE0071.23 (256)	CRE0070 (42)	
SP0461 (317)			CRE0071.23 (256)	CNTRL_001 (67 bp) (257)	CRE0070 (42)	
SP0462 (318)			CRE0060 (214)	CRE0071.13 (243)	CRE0070 (42)	
SP0463 (319)			CRE0020 (203)	CRE0071 (216)	CRE0099 (281)	
SP0464 (320)			CRE0071 (216)	CRE0020 (203)	CRE0049 (270)	
SP0465 (321)			CRE0071 (216)	CRE0020 (203)	CRE0099 (281)	
SP0466 (322)		CRE0071 (216)	CRE0093 (247)	CRE0094 (248)	CRE0049 (270)	
SP0467 (323)			CRE0035 (208)	CRE0071 (216)	SKM_18 (55)	
SP0468 (324)			CRE0071 (216)	CRE0035 (208)	SKM_18 (55)	
SP0469 (325)		CRE0093.2 (260)	CRE0094.2 (261)	CRE0071 (216)	CRE0070 (42)	
SP0470 (326)				CRE0071.24 (258)	CRE0070 (42)	
SP0471 (327)			CRE0071 (216)	CRE0020 (203)	CRE0070 (42)	
SP0473 (328)			CRE0020 (203)	CRE0071.5 (217)	SKM_14 (277)	
SP0474 (329)		CRE0093.2 (260)	CRE0094.2 (261)	CRE0071.5 (217)	CRE0070 (42)	

【０７４７】

表１３Ａは、本明細書で開示される方法および組成物における使用のための、心筋および骨格筋において活性の例示的な筋肉特異的プロモーターの短縮された核酸配列についての配列識別番号を示す。

【表１３Ａ－１】

名称および配列番号	長さ
SP0502 (配列番号 336)	251
SP0515 (配列番号 337)	235
SP0521 (配列番号 338)	263
SP4169 (配列番号 339)	287

【表１３Ａ－２】

SP0522 (配列番号 340)	237
SP0523 (配列番号 341)	221
SP0524 (配列番号 342)	249

【０７４８】

【表１３Ｂ】

表13B:表13Aに示されている心筋および骨格筋において活性な短縮された筋肉特異的プロモーターの実施形態のCREおよび最小/近位プロモーター。

プロモーター (配列番号)	CRE (配列番号)	CRE (配列番号)	CRE (配列番号)	CRE (配列番号)	プロモーターエレメント (配列番号)	5'UTR および/またはイントロン (配列番号)
SP0502 (配列番号336)				CRE0050 (配列番号211)	CRE0053 (配列番号344)	
SP0515 (配列番号337)				CRE0050 (配列番号211)	BG mp (配列番号345)	
SP0521 (配列番号338)				CRE0050 (配列番号211)	SCP1 (配列番号346)	
SP4169 (配列番号339)				CRE0050 (配列番号211)	CRE0070 (配列番号42)	
SP0522 (配列番号340)				CRE0145 (配列番号343)	CRE0053 (配列番号344)	
SP0523 (配列番号341)				CRE0145 (配列番号343)	BG mp (配列番号345)	
SP0524 (配列番号342)				CRE0145 (配列番号343)	SCP1 (配列番号346)	

ｖｉｉ．心筋および骨格筋において活性である筋肉特異的プロモーターの機能的バリアント：

ＳＰ００５７およびそのバリアント

【０７４９】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ００２９およびＣＲＥ００７１、またはそれらの機能的バリアント、の組合せを含む、合成筋肉特異的プロモーターである。概して、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００２９、ＣＲＥ００７１、そしてその後、プロモーターエレメントという順序で含む（順序は、当技術分野では一般的であるように、上流から下流への方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００７１、ＣＲＥ００２９、そしてその後、プロモーターエレメントという順序で含む。

【０７５０】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。

【０７５１】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００７０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００７０は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０７５２】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、次の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００２９、ＣＲＥ００７１およびＣＲＥ００７０、またはこれらの機能的バリアント。

【０７５３】

ＣＲＥ００２９は、配列番号２０６による配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。

【０７５４】

ＣＲＥ００２９の機能的バリアントは、ＣＲＥ００２９とは異なる配列だが筋肉特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する、調節エレメントである。ＣＲＥの配列を、必要な転写因子（ＴＦ）に結合して発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。機能的バリアントは、参照ＣＲＥと比較して置換、欠失および／または挿入を含み得るが、これらがＣＲＥを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０７５５】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００２９の機能的バリアントを、プロモーターにおいてＣＲＥ００２９の代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＥと考えることができる。例えば、ＣＲＥ００２９の代わりに代用されたＣＲＥ００２９の機能的バリアントを含む筋肉特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくはその活性の９０％、より好ましくはその活性の９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％を保持する。例えば、一例としてプロモーターＳＰ００５７を考えると、ＳＰ００５７中のＣＲＥ００２９を、ＣＲＥ００２９の機能的バリアントで置き換えることができ、このプロモーターは、その活性を実質的に保持する。参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。

【０７５６】

ＣＲＥ００２９またはその機能的バリアントを二本鎖ポリヌクレオチドのどちらの鎖にも備えさせることができ、どちらの方向性でも備えさせることができることに留意されたい。しかるが故に、配列番号２０６の相補および逆相補配列またはその機能的バリアントは、本発明の範囲に含まれる。配列番号２０６による配列またはその機能的バリアントを含む一本鎖核酸もまた、本発明の範囲に含まれる。

【０７５７】

ＣＲＥ００７１は、配列番号２１６による配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。

【０７５８】

ＣＲＥ００７１の機能的バリアントは、ＣＲＥ００７１とは異なる配列だが筋肉特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する、調節エレメントである。ＣＲＥの配列を、必要な転写因子（ＴＦ）に結合して発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。機能的バリアントは、参照ＣＲＥと比較して置換、欠失および／または挿入を含み得るが、これらがＣＲＥを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０７５９】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００７１の機能的バリアントを、プロモーターにおいてＣＲＥ００７１の代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＥと考えることができる。例えば、ＣＲＥ００７１の代わりに代用されたＣＲＥ００２９の機能的バリアントを含む筋肉特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましく

はその活性の９０％、より好ましくはその活性の９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％を保持する。例えば、一例としてプロモーターＳＰ００５７を考えると、ＳＰ００５７中のＣＲＥ００７１を、ＣＲＥ００７１の機能的バリアントで置き換えることができ、このプロモーターは、その活性を実質的に保持する。参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。

【０７６０】

ＣＲＥ００７１またはその機能的バリアントを二本鎖ポリヌクレオチドのどちらの鎖にも備えさせることができ、どちらの方向性でも備えさせることができることに留意されたい。しかるが故に、配列番号２１６の相補および逆相補配列またはその機能的バリアントは、本発明の範囲に含まれる。配列番号２１６による配列またはその機能的バリアントを含む一本鎖核酸もまた、本発明の範囲に含まれる。

【０７６１】

ＣＲＥ００７０およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。

【０７６２】

一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号Ｘによる配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号Ｘによる配列を有するプロモーターは、ＳＰ００５７と呼ばれる。ＳＰ００５７プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。

ＳＰ０１３４およびそのバリアント

【０７６３】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ００２０およびＣＲＥ００７１、またはそれらの機能的バリアント、の組合せを含む、合成筋肉特異的プロモーターである。概して、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００２０、ＣＲＥ００７１、そしてその後、プロモーターエレメントという順序で含む（順序は、当技術分野では一般的であるように、上流から下流への方向で与えられる）。一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００７１、ＣＲＥ００２０、そしてその後、プロモーターエレメントという順序で含む。

【０７６４】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。

【０７６５】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００７０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００７０は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０７６６】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、次の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００２０、ＣＲＥ００７１およびＣＲＥ００７０、またはこれらの機能的バリアント。

【０７６７】

ＣＲＥ００２０は、配列番号２０３による配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。

【０７６８】
ＣＲＥ００２０の機能的バリアントは、ＣＲＥ００２０とは異なる配列だが筋肉特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する、調節エレメントである。ＣＲＥの配列を、必要な転写因子（ＴＦ）に結合して発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。機能的バリアントは、参照ＣＲＥと比較して置換、欠失および／または挿入を含み得るが、それらがＣＲＥを実質的に非機能性にしないことを条件とする。
【０７６９】
一部の実施形態では、ＣＲＥ００２０の機能的バリアントを、プロモーターにおいてＣＲＥ００２０の代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＥと考えることができる。例えば、ＣＲＥ００２０の代わりに代用されたＣＲＥ００２０の機能的バリアントを含む骨格筋特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくはその活性の９０％、より好ましくはその活性の９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％を保持する。例えば、一例としてプロモーターＳＰ０２２７を考えると、ＳＰ０２２７中のＣＲＥ００２０を、ＣＲＥ００２０の機能的バリアントで置き換えることができ、このプロモーターは、その活性を実質的に保持する。参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。
【０７７０】
ＣＲＥ００２０またはその機能的バリアントを二本鎖ポリヌクレオチドのどちらの鎖にも備えさせることができ、どちらの方向性でも備えさせることができることに留意されたい。しかるが故に、配列番号２０３の相補および逆相補配列またはその機能的バリアントは、本発明の範囲に含まれる。配列番号２０３による配列またはその機能的バリアントを含む一本鎖核酸もまた、本発明の範囲に含まれる。
【０７７１】
一部の実施形態では、ＣＲＥ００２０またはその機能的バリアントは、３００ヌクレオチドもしくはそれ未満、２５０ヌクレオチドもしくはそれ未満、２００ヌクレオチドもしくはそれ未満、１５０ヌクレオチドもしくはそれ未満、１２５ヌクレオチドもしくはそれ未満、または１００ヌクレオチドもしくはそれ未満の長さを有する。
【０７７２】
ＣＲＥ００７１およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。
【０７７３】
ＣＲＥ００７０およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。
【０７７４】
一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１００による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１００による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０１３４と呼ばれる。ＳＰ０１３４プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。
ＳＰ０１７３およびそのバリアント
【０７７５】
一部の実施形態では、プロモーターは、筋肉特異的近位プロモーターＣＲＥ００１０とシス調節エレメントＣＲＥ００３５、またはそれらの機能的バリアント、の組合せを含む、合成筋肉特異的プロモーターである。概して、筋肉特異的近位プロモーターＣＲＥ００１０およびシス調節エレメントＣＲＥ００３５は、さらなるプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは

、前記近位プロモーターおよびＣＲＥ、またはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００１０、ＣＲＥ００３５、そしてその後、さらなるプロモーターエレメントという順序で含む（順序は、当技術分野では一般的であるように、上流から下流への方向で与えられる）。一部の実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、前記近位プロモーターおよびＣＲＥ、またはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００３５、ＣＲＥ００１０、そしてその後、さらなるプロモーターエレメントという順序で含む。

【０７７６】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。

【０７７７】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０７７８】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、次の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００１０、ＣＲＥ００３５およびＳＫＭ＿１８、またはこれらの機能的バリアント。

【０７７９】

ＣＲＥ００１０は、配列番号２６４による配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。

【０７８０】

上記で論じられたように、ＣＲＥ００１０の機能的バリアントは、筋肉特異的プロモーターエレメントとして作用するＣＲＥ００１０の能力を実質的に保持する。例えば、ＣＲＥ００１０の機能的バリアントが、筋肉特異的プロモーターＳＰ０３２０に置換により組み込まれた場合、改変されたプロモーターは、その活性の少なくとも８０％、より好ましくはその活性の少なくとも９０％、より好ましくはその活性の少なくとも９５％、よりいっそう好ましくはＳＰ０３２０の活性の１００％を保持する。好適には、ＣＲＥ００１０の機能的バリアントは、配列番号２６４と少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性である配列を含む。

【０７８１】

一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥ００１０もしくはその機能的バリアントを含むまたはそれからなるプロモーターエレメントは、４００ヌクレオチドもしくはそれ未満、３００ヌクレオチドもしくはそれ未満、２５０ヌクレオチドもしくはそれ未満、２００ヌクレオチドもしくはそれ未満、１５０ヌクレオチドもしくはそれ未満、１２５ヌクレオチドもしくはそれ未満、１１０ヌクレオチドもしくはそれ未満、またはド９５ヌクレオチドもしくはそれ未満の長さを有する。

【０７８２】

ＣＲＥ００３５は、配列番号２０８による配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。

【０７８３】

ＣＲＥ００３５の機能的バリアントは、ＣＲＥ００３５とは異なる配列だが筋肉特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する、調節エレメントである。ＣＲＥの配列を、必要な転写因子（ＴＦ）に結合して発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。機能的バリアントは、参照ＣＲＥと比較して置換、欠失および／または挿入を含み得るが、それらがＣＲＥを実質的に非機能性にしないことを条件とする。

【０７８４】

一部の実施形態では、ＣＲＥ００３５の機能的バリアントを、プロモーターにおいてＣ

ＲＥ００３５の代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＥと考えることができる。例えば、ＣＲＥ００３５の代わりに代用されたＣＲＥ００３５の機能的バリアントを含む筋肉特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくはその活性の９０％、より好ましくはその活性の９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％を保持する。例えば、一例としてプロモーターＳＰ０１７３を考えると、ＳＰ０１７３中のＣＲＥ００３５を、ＣＲＥ００３５の機能的バリアントで置き換えることができ、このプロモーターは、その活性を実質的に保持する。参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。

【０７８５】

ＣＲＥ００３５またはその機能的バリアントを二本鎖ポリヌクレオチドのどちらの鎖にも備えさせることができ、どちらの方向性でも備えさせることができることに留意されたい。しかるが故に、配列番号２０８の相補および逆相補配列またはその機能的バリアントは、本発明の範囲に含まれる。配列番号２０８による配列またはその機能的バリアントを含む一本鎖核酸もまた、本発明の範囲に含まれる。

【０７８６】

ＳＫＭ＿１８（配列番号５５）の配列およびそのバリアントは、本明細書中の他の箇所に示されている。

【０７８７】

一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１２２による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１２２による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０１７３と呼ばれる。ＳＰ０１７３プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。

ＳＰ０２７９およびそのバリアント

【０７８８】

一部の実施形態では、プロモーターは、シス調節エレメントＣＲＥ００２０およびＣＲＥ００７１、またはそれらの機能的バリアント、の組合せを含む、合成筋肉特異的プロモーターである。概して、ＣＲＥは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００２０、ＣＲＥ００７１、そしてその後、プロモーターエレメントという順序で含む（順序は、当技術分野では一般的であるように、上流から下流への方向で与えられる）。一部の好ましい実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００７１、ＣＲＥ００２０、そしてその後、プロモーターエレメントという順序で含む。一部の好ましい実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、前記ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００２０、ＣＲＥ００７１、プロモーターエレメント、そしてＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンという順序で含む（順序は、当技術分野では一般的であるように、上流から下流への方向で与えられる）。

【０７８９】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。

【０７９０】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００７０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００７０は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０７９１】
したがって、一実施形態では、プロモーターは、次の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００２０、ＣＲＥ００７１、ＣＲＥ００７０ならびにＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロン、またはこれらの機能的バリアント。
【０７９２】
ＣＲＥ００２０およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。
【０７９３】
ＣＲＥ００７１およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。
【０７９４】
ＣＲＥ００７０およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。
【０７９５】
ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンならびにこれらのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。
【０７９６】
一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１３７による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１３７による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０２７９と呼ばれる。ＳＰ０２７９プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。
ＳＰ０２８６およびそのバリアント
【０７９７】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００７１を含む合成筋肉特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流側にＣＲＥ００７１を含む。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、プロモーターエレメントならびにＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンのすぐ上流側に、ＣＲＥ００７１を含む。
【０７９８】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。
【０７９９】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＣＲＥ００７０またはその機能的バリアントである。ＣＲＥ００７０は、筋肉特異的近位プロモーターである。
【０８００】
一部の実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、次のエレメント（またはそれらの機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００７１、ＣＲＥ００７０、そしてその後、ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロン。
【０８０１】
ＣＲＥ００７１およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。
【０８０２】
ＣＲＥ００７０およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。
【０８０３】
ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンならびにこれらのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。

【０８０４】
一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１３８による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１３８による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０２８６と呼ばれる。ＳＰ０２８６プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。
ＳＰ０３１０およびそのバリアント
【０８０５】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００３５を含む合成筋肉特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流側にＣＲＥ００３５を含む。
【０８０６】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。
【０８０７】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。
【０８０８】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、次のエレメント（またはそれらの機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００３５、そしてその後、ＳＫＭ＿１８。
【０８０９】
ＣＲＥ００３５およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。
【０８１０】
ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。
【０８１１】
一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１４３による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１４３による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０３１０と呼ばれる。ＳＰ０３１０プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。
ＳＰ０３１６およびそのバリアント
【０８１２】
一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００５０を含む合成筋肉特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流側にＣＲＥ００５０を含む。
【０８１３】
プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。
【０８１４】
一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機

能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。
【０８１５】
一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、次のエレメント（またはそれらの機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００５０、そしてその後、ＳＫＭ＿１８。
【０８１６】
ＣＲＥ００５０は、配列番号２１１による配列を有する。その機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。
【０８１７】
ＣＲＥ００５０の機能的バリアントは、ＣＲＥ００５０とは異なる配列だが筋肉特異的ＣＲＥとしての活性を実質的に保持する配列を有する、調節エレメントである。ＣＲＥの配列を、必要な転写因子（ＴＦ）に結合して発現を増強するその能力を保持しつつ変化させることが可能であることは、当業者には理解されるであろう。機能的バリアントは、参照ＣＲＥと比較して置換、欠失および／または挿入を含み得るが、それらがＣＲＥを実質的に非機能性にしないことを条件とする。
【０８１８】
一部の実施形態では、ＣＲＥ００５０の機能的バリアントを、プロモーターにおいてＣＲＥ００５０の代わりに代用されたときにその活性を実質的に保持するＣＲＥと考えることができる。例えば、ＣＲＥ００５０の代わりに代用されたＣＲＥ００３５の機能的バリアントを含む筋肉特異的プロモーターは、好ましくは、その活性の８０％、より好ましくはその活性の９０％、より好ましくはその活性の９５％、さらにいっそう好ましくはその活性の１００％を保持する。例えば、一例としてプロモーターＳＰ０３１６を考えると、ＳＰ０３１６中のＣＲＥ００５０を、ＣＲＥ００５０の機能的バリアントで置き換えることができ、このプロモーターは、その活性を実質的に保持する。参照プロモーターの制御下での好適なレポーターの発現と、置換ＣＲＥを含む他の点では同一のプロモーターの制御下での好適なレポーターの発現とを、同等の条件下で比較することにより、活性の保持を評価することができる。
【０８１９】
ＣＲＥ００５０またはその機能的バリアントを二本鎖ポリヌクレオチドのどちらの鎖にも備えさせることができ、どちらの方向性でも備えさせることができることに留意されたい。しかるが故に、配列番号２１１の相補および逆相補配列またはその機能的バリアントは、本発明の範囲に含まれる。配列番号２１１による配列またはその機能的バリアントを含む一本鎖核酸もまた、本発明の範囲に含まれる。
【０８２０】
ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。
【０８２１】
一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１４９による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１４９による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０３１６と呼ばれる。ＳＰ０３１６プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。
ＳＰ０３２０およびそのバリアント
【０８２２】
一部の実施形態では、プロモーターは、筋肉特異的近位プロモーターＣＲＥ００１０とシス調節エレメントＣＲＥ００３５、またはそれらの機能的バリアント、の組合せを含む、合成筋肉特異的プロモーターである。概して、筋肉特異的近位プロモーターＣＲＥ００１０およびシス調節エレメントＣＲＥ００３５は、さらなるプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは

、前記近位プロモーターおよびＣＲＥ、またはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００１０、ＣＲＥ００３５、そしてその後、さらなるプロモーターエレメントという順序で含む（順序は、当技術分野では一般的であるように、上流から下流への方向で与えられる）。一部の実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、前記近位プロモーターおよびＣＲＥ、またはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００３５、ＣＲＥ００１０、そしてその後、さらなるプロモーターエレメントという順序で含む。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、前記近位プロモーターおよびＣＲＥ、またはそれらの機能的バリアントを、ＣＲＥ００１０、ＣＲＥ００３５、さらなるプロモーターエレメント、続いてＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンという順序で含む。

【０８２３】

さらなるプロモーターエレメントは、任意の好適な近位プロモーターまたは最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。

【０８２４】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０８２５】

したがって、一実施形態では、プロモーターは、次の調節エレメントを含む：ＣＲＥ００１０、ＣＲＥ００３５、ＳＫＭ＿１８ならびにＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロン、またはこれらの機能的バリアント。

【０８２６】

ＣＲＥ００１０およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。

【０８２７】

ＣＲＥ００３５およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。

【０８２８】

ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。

【０８２９】

ＣＭＶ－ＩＥ　５’ＵＴＲおよびイントロンならびにこれらのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。

【０８３０】

一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１５０による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１５０による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０３２０と呼ばれる。ＳＰ０３２０プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。

ＳＰ０３２６およびそのバリアント

【０８３１】

一部の実施形態では、プロモーターは、プロモーターエレメントに作動可能に連結されたＣＲＥ００７１を含む合成筋肉特異的プロモーターである。一部の好ましい実施形態では、合成筋肉特異的プロモーターは、プロモーターエレメントのすぐ上流側にＣＲＥ００７１を含む。

【０８３２】

プロモーターエレメントは、任意の好適な近位または最小プロモーターであり得る。一部の実施形態では、プロモーターエレメントは、最小プロモーターである。プロモーターが近位プロモーターである場合、近位プロモーターは筋肉特異的であることが一般に好ましい。

【０８３３】

一部の好ましい実施形態では、プロモーターエレメントは、ＳＫＭ＿１８またはその機能的バリアントである。ＳＫＭ＿１８は、筋肉特異的近位プロモーターである。

【０８３４】

一部の実施形態では、心筋特異的プロモーターは、次のエレメント（またはそれらの機能的バリアント）を含む：ＣＲＥ００７１、そしてその後、ＳＫＭ＿１８。

【０８３５】

ＣＲＥ００７１およびそのバリアントの配列は、上記に示されている。

【０８３６】

ＳＫＭ＿１８およびそのバリアントの配列は、本明細書中の他の箇所に示されている。

【０８３７】

一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、配列番号１５５による配列、またはその機能的バリアントを含む。一部の実施形態では、機能的バリアントは、それと少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一である配列を有し得る。配列番号１５５による配列を有するプロモーターは、ＳＰ０３２６と呼ばれる。ＳＰ０３２６プロモーターは、一部の実施形態では特に好ましい。このプロモーターは、筋肉に非常に特異的であることが分かっており、このことが一部の状況では有利である。

【０８３８】

【表６】

表6:表5Aで開示される、心筋および骨格筋の両方において活性である筋肉特異的プロモーターの例示的なCRE(シス調節エレメント)の核酸配列についての配列識別番号。

表 6:

名称 (配列番号)	名称 (配列番号)
CRE0016 (配列番号 201)	DES_MT_ エンハンサー _72 BP_V2 (配列番号 231)
CRE0018 (配列番号 202)	DES_MT_ エンハンサー _72 BP_V3 (配列番号 232)
CRE0020 (配列番号 203)	DES_MT_ エンハンサー _72 BP_V4 (配列番号 233)
CRE0025 (配列番号 204)	DES_MT_ エンハンサー _72 BP_V5 (配列番号 234)
CRE0027 (配列番号 205)	DES_MT_ エンハンサー _72 BP_V6 (配列番号 235)
CRE0028 (配列番号 40)	CRE0071.3 (配列番号 43)
CRE0029 (配列番号 206)	CRE0071.4 (配列番号 236)
CRE0031 (配列番号 207)	CRE0071.6 (配列番号 237)
CRE0033 (配列番号 41)	CRE0071.8 (配列番号 238)
CRE0035 (配列番号 208)	CRE0071.9 (配列番号 239)
CRE0036 (配列番号 209)	CRE0077 (配列番号 240)
CRE0047 (配列番号 210)	CRE0029.2 (配列番号 241)
CRE0050 (配列番号 211)	CRE0069.2 (配列番号 242)
CRE0051 (配列番号 212)	CRE0071.13 (配列番号 243)
CRE0059 (配列番号 213)	CRE0071.14 (配列番号 244)
CRE0060 (配列番号 214)	CRE0071.15 (配列番号 245)
CRE0069 (配列番号 215)	72 BP (配列番号 246)
CRE0071 (配列番号 216)	CRE0093 (配列番号 247)
CRE0071.5 (配列番号 217)	CRE0094 (配列番号 248)
CRE0073 (配列番号 218)	CRE0071.16 (配列番号 249)
CRE0074 (配列番号 219)	CRE0071.17 (配列番号 250)
CRE0075 (配列番号 220)	CRE0071.18 (配列番号 251)
CRE0076 (配列番号 221)	CRE0071.19 (配列番号 252)
CRE0078 (配列番号 222)	CRE0071.20 (配列番号 253)
CRE0079 (配列番号 223)	CRE0071.21 (配列番号 254)
48 BP (配列番号 224)	CRE0071.22 (配列番号 255)
CRE0071.7 (配列番号 225)	CRE0071.23 (配列番号 256)
CRE0071.10 (配列番号 226)	対照 _001 (67 BP) (配列番号 257)
CRE0071.11 (配列番号 227)	CRE0071.24 (配列番号 258)
CRE0071.12 (配列番号 228)	対照 _001 (配列番号 259)
DES_MT_ エンハンサー _48BP_V2 (配列番号 229)	CRE0093.2 (配列番号 260)
DES_MT_ エンハンサー _48BP_V3 (配列番号 230)	CRE0094.2 (配列番号 261)

【０８３９】

【表７】

表7:表5Aの心筋および骨格筋において活性である合成筋肉特異的プロモーターの一部の実施形態で使用される例示的な最小または近位プロモーター。

表 7:	
名称	名称
CRE0005 (配列番号 262)	CRE0056 (配列番号 274)
CRE0009 (配列番号 263)	CRE0070 (配列番号 42)
CRE0010_ITGB1BP2 (配列番号 264)	CRE0070.2 (配列番号 275)
CRE0010_ALDOA (配列番号 265)	CRE0072 (配列番号 276)
CRE0034 (配列番号 266)	SKM_14 (配列番号 277)
CRE0037 (配列番号 267)	SKM_18.2 (配列番号 278)
CRE0046 (配列番号 268)	SKM_18 (配列番号 55)
CRE0048 (配列番号 269)	SKM_20 (配列番号 56)
CRE0049 (配列番号 270)	RSV プロモーター (配列番号 279)
CRE0053.2 SRL_mp (配列番号 271)	DES_mp_v1 (配列番号 280)
CRE0054 (配列番号 272)	CRE0099 (配列番号 281)
CRE0055 (配列番号 273)	HTMB ev_4 (配列番号 282)

【０８４０】

【表１４】

表 14:表 13A で開示される、心筋および骨格筋の両方において活性である短縮された筋肉特異的プロモーターの例示的なシス調節モジュール(CRM)の核酸配列についての配列識別番号。

表 14:		
CRM	**配列番号**	**長さ**
CRM_SP0502、SP0515、SP0521、および SP4169	配列番号 347	176
CRM_SP0522、SP0523、および SP0524	配列番号 351	162

【０８４１】

【表１５】

表 15:表 13A で開示される、心筋および骨格筋の両方において活性である短縮された筋肉特異的プロモーターの例示的な CRE (シス調節エレメント)の核酸配列についての配列識別番号。

表 15:		
CRM	**配列番号**	**長さ**
CRE0145	配列番号 343	114

【０８４２】

【表１６】

表 16:表 13A で開示される、心筋および骨格筋の両方において活性である短縮された筋肉特異的

プロモーターの合成プロモーターからの例示的なプロモーターエレメントの核酸配列についての

配列識別番号。

表 16:		
CRM	**配列番号**	**長さ**
BG_mp	**配列番号** 345	53
SCP1	**配列番号** 346	81
CRE0053	**配列番号** 344	69

ｖｉｉｉ．合成心特異的発現カセット

【０８４３】

本発明は、発現産物、好適には遺伝子（例えば、導入遺伝子）、例えば本明細書で開示されるＰＰ１の阻害剤、および／または本明細書で開示される血管新生タンパク質もしくはペプチド、をコードする配列に作動可能に連結された本発明の合成心特異的プロモーターを含む、合成心特異的発現カセットも提供する。

【０８４４】

本発明の一部の好ましい実施形態では、遺伝子は、治療用発現産物、好ましくは、必要に応じて心臓組織における、異所的遺伝子発現に関連する疾患または状態を処置する際の使用に好適な治療用ポリペプチド、をコードする。

【０８４５】

一部の実施形態では、治療用発現産物は、本明細書で開示される、心血管状態または心臓疾患および障害の処置に有用なものを含む。一部の実施形態では、心臓障害は、心不全またはＣＨＦである。

ｃ．分泌シグナルペプチドおよびイントロン配列

【０８４６】

一部の実施形態では、ＰＰ１の阻害剤をコードする核酸は、ＰＰ１の阻害剤（例えば、Ｉ－１、Ｉ－１ｃまたはそのバリアント）をコードする核酸の５’側に分泌ペプチドを含み得る。好適なシグナルペプチドは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている。例えば、好適な分泌配列を含有するポリヌクレオチドを、ＰＰ１の選択された阻害剤、または血管新生タンパク質遺伝子、の第１コドンの５’側に融合させることができる。一部の実施形態では、好適な分泌シグナル配列は、ＦＧＦ－４、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－６遺伝子のシグナル配列、またはＩＬ－１－ベータなどの、異なる分泌されるタンパク質のシグナル配列を含む。一部の実施形態では、好適な分泌配列は、心臓筋細胞から通常は分泌されるタンパク質に由来する分泌シグナル配列である。一部の実施形態では、ＰＰ１の阻害剤をコードするまたは血管新生タンパク質もしくはペプチドをコードする核酸は、標的化ペプチドを含み、例えば、好適な心臓標的化ペプチドは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１８／１７０３１０または米国特許出願公開第２０１７０１６６９２６Ａ１号において開示されている。他の好適な標的化ペプチドとしては、Muller et al., Nature Biotechnology 21:1040-1046 (2003)により同定され、ＷＯ２０１９／２１６９３２Ａ１号において開示されているように配列番号２～１２６として開示されている、冠動脈内皮細胞を標的とするペプチドが挙げられ、前記参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０８４７】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ遺伝子型は、プロモーター配列の３’側かつ、分泌シグナルペプチドの、存在する場合には、５’側、またはＰＰ１阻害剤をコードする核酸配列

の５’側に位置する、イントロン配列を含む。イントロン配列は、ｍＲＮＡ安定性、核外へのｍＲＮＡ輸送、および／または発現、および／または発現されたポリペプチドの調節のうちの１つまたは複数を増加させるのに役立つ。

【０８４８】

一部の実施形態では、イントロン配列は、ＭＶＭイントロン配列、例えば、これに限定されるものではないが、ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号１３のイントロン配列、またはそれと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列である。

【０８４９】

一部の実施形態では、イントロン配列は、ＨＢＢ２イントロン配列、例えば、これに限定されるものではないが、ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号１４のイントロン配列、またはそれと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列である。

【０８５０】

本明細書で開示される方法および組成物の一部の実施形態では、組換えＡＡＶベクターは、分泌シグナルペプチドをコードする配列の５’側かつプロモーターの３’側に位置するイントロン配列をさらに含む異種核酸配列を含む。一部の実施形態では、イントロン配列は、ＭＶＭ配列またはＨＢＢ２配列を含み、ＭＶＮ配列は、ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号１３の核酸配列、または核酸配列（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号１３と少なくとも約７５％、もしくは８０％、もしくは８５％、もしくは９０％、もしくは９５％、もしくは９８％、もしくは９９％の配列同一性）を含み、ＨＢＢ２配列は、ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号１４の核酸配列、または核酸配列（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号１４と少なくとも約７５％、もしくは８０％、もしくは８５％、もしくは９０％、もしくは９５％、もしくは９８％、もしくは９９％の配列同一性）を含む。

【０８５１】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ遺伝子型は、ヒトベータグロビンｂ２（またはＨＢＢ２）イントロン、ＦＩＸイントロン、ニワトリベーターグロビンイントロン、およびＳＶ４０イントロンからなる群から選択されるイントロン配列を含む。一部の実施形態では、イントロンは、必要に応じて、改変イントロン、例えば、改変ＨＢＢ２イントロン（例えば、ＷＯ２０１８０４６７７４Ａ１における配列番号１７を参照されたい）、改変ＦＩＸイントロン（例えば、ＷＯ２０１８０４６７７４Ａ１における配列番号１９を参照されたい）、または改変ニワトリベーターグロビンイントロン（例えば、ＷＯ２０１８０４６７７４Ａ１における配列番号２１を参照されたい）、またはＷＯ２０１５／１６２３０２において開示されている改変ＨＢＢ２もしくはＦＩＸイントロンであり、これらはそれら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

ｄ．ポリＡ

【０８５２】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターゲノムは、ＰＰ１阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）をコードする異種核酸遺伝子から３’側および下流側に位置する、少なくとも１つのポリＡテールを含む。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、本明細書で定義される通りの安定性配列またはＣＳ配列の３’側にある。ｈＧＨポリＡ、ｓｙｎｐＡポリＡなどを含むがこれらに限定されない、任意のポリＡ配列を使用することができる。一部の実施形態では、ポリＡは、合成ポリＡ配列である。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターゲノムは、２つのポリＡテール、例えば、ｈＧＨポリＡ配列および別のポリＡ配列を含み、スペーサー核酸配列がこれら２つのポリＡ配列間に位置する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶゲノムは、ＰＰ１阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）をコードする核酸の３’側に、以下のエレメントを含む：第１のポリＡ配列、スペーサー核酸配列（１００～４００ｂｐの間、または約２５０ｂｐのもの）、第２のポリＡ配列、スペーサー核酸配

列、および３’ＩＴＲ。一部の実施形態では、第１および第２のポリＡ配列は、ｈＧＨポリＡ配列であり、一部の実施形態では、第１および第２のポリＡ配列は、合成ポリＡ配列である。一部の実施形態では、第１のポリＡ配列は、ｈＧＨポリＡ配列であり、第２のポリＡ配列は、合成配列であるか、またはその逆であり、すなわち、代替実施形態では、第１のポリＡ配列は、合成ポリＡ配列であり、第２のポリＡ配列は、ｈＧＨポリＡ配列である。例示的なポリＡ配列は、例えば、ｈＧＨポリＡ配列（配列番号６６）であるか、または配列番号６６と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％のヌクレオチド配列同一性を有するポリＡ核酸配列である。一部の実施形態では、使用のために包含されるｈＧＨポリ配列は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるAnderson et al. J. Biol. Chem 264(14); 8222-8229, 1989に記載されている（例えば、ｐ．８２２３、第２列、第１段落を参照されたい）。

【０８５３】

一部の実施形態では、ポリＡテールを、異種遺伝子の転写物をはじめとするｒＡＡＶベクターゲノムから転写されるＲＮＡ転写物を安定化するように操作することができ、一実施形態ではＰＰ１阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）、および代替実施形態ではポリＡテールを、安定化していないエレメントを含むように操作することができる。

【０８５４】

本明細書で開示される方法および組成物の一部の実施形態では、組換えＡＡＶベクターは、ＰＰ１阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）ペプチドをコードする核酸の３’側かつ３’ＩＴＲ配列の５’側に位置する、少なくとも１つのポリＡ配列を含む。

【０８５５】

ある実施形態では、ポリＡテールを、ポリＡテールの長さを変更することにより不安定化エレメントになるように操作することができる。ある実施形態では、ポリＡテールを延長または短縮することができる。一部の実施形態では、３’非翻訳領域は、３’ＵＴＲを含む。

【０８５６】

一部の実施形態では、不安定化エレメントは、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）であり、このｍｉＲＮＡには、このｍｉＲＮＡが結合するＲＮＡ転写物であって、異種遺伝子をコードするＲＮＡ転写物をサイレンシングする（翻訳を抑制する、および分解を促進する）能力がある。ある実施形態では、ポリＡテール内のシード領域の付加または欠失は、本明細書で開示されるＰＰ１阻害剤（例えば、Ｉ－１またはＩ－１ｃ）などのタンパク質の発現を増加または減少させることができる。

【０８５７】

一部の実施形態では、シード領域を操作して、異種遺伝子とポリＡテールの間に位置する３’非翻訳領域にすることもできる。さらなる実施形態では、不安定化剤は、ｓｉＲＮＡであり得る。ｓｉＲＮＡのコード領域をｒＡＡＶベクターゲノムに含めることができ、このコード領域は、一般に、ポリＡテールの下流側、３’側に位置する。

【０８５８】

本明細書で開示される方法および組成物のすべての態様では、ｒＡＡＶゲノムは、スタッファーＤＮＡ核配列も含み得る。例示的なスタッファーＤＮＡ配列は、任意の非コードＤＮＡ配列である。例示的なスタッファーＤＮＡ配列は、表９に示されており、または表９に示されている配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列である。一部の実施形態では、スタッファー配列は、例えば、ポリＡテールの３側に位置し、‘３　ＩＴＲ配列の５’側に位置する。一部の実施形態では、スタッファーＤＮＡ配列は、合成ポリアデニル化シグナルを逆の方向性で含む。

【０８５９】

一部の実施形態では、スタッファー核酸配列は、ポリＡ配列と３’ＩＴＲの間に位置し得る（すなわち、スタッファー核酸配列は、ポリＡ配列の３’側かつ３’ＩＴＲの５’側に位置する）。そのようなスタッファー核酸配列は、約３０ｂｐ、５０ｐｂ、７５ｂｐ、１

００ｂｐ、１５０ｂｐ、２００ｂｐ、２５０ｂｐ、３００ｂｐであることもあり、または３００ｂｐより長いこともある。本明細書で開示される方法および組成物の一部の実施形態では、スタッファー核酸断片は、２０～５０ｂｐの間、５０～１００ｂｐの間、１００～２００ｂｐの間、２００～３００ｂｐの間、３００～５００ｂｐの間であるか、または２０～５００ｂｐの間の任意の整数である。例示的なスタッファー（またはスペーサー）核酸配列は、次のものを含む：例示的なスタッファー（またはスペーサー）核酸配列は、表９に示されている配列、または表９に示されている配列と少なくとも約７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９％同一の核酸配列を含む。

【０８６０】

【表９】

表９.例示的なスペーサーまたはスタッファー配列:

例示的なスタッファー配列	配列番号
スタッファー配列 1	配列番号 67
スタッファー配列 2	配列番号 68
スタッファー配列 3	配列番号 69

【０８６１】

好適には、合成心特異的プロモーターを含む本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、リボソーム結合部位、開始コドン、停止コドンおよび転写終結配列のうちの１つまたは複数、好ましくはすべて、を備えているまたはコードする配列をさらに含み得る。好適には、ｒＡＡＶベクターは、転写後調節エレメントをコードする核酸を含む発現カセットを含む。好適には、発現カセットは、ポリＡエレメントをコードする核酸を含む。

【０８６２】

ポリＡ、二本鎖ＲＮＡ終結エレメントおよびリバースポリＡ

【０８６３】

本明細書に記載される、ホスファターゼ阻害剤遺伝子、例えば本明細書で開示されるＩ１ｃ遺伝子、をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶの場合、核酸配列は、Ｉ１ｃ遺伝子または本明細書で開示されるコドン最適化Ｉ１ｃ遺伝子のコード配列の後に、ポリアデニル化シグナルまたはポリＡシグナルをさらに含む。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、同種である。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、異種である。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、二本鎖ＲＮＡ終結エレメント、および／またはリバースポリＡを含み得る。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、二本鎖ＲＮＡ終結エレメント、および／またはリバースポリＡである。一部の実施形態では、リバースポリＡ、または二本鎖ＲＮＡターミネーターは、同種または異種ポリＡシグナル配列の後に位置する。

【０８６４】

「二本鎖ＲＮＡ終結エレメント」は、二本鎖ＲＮＡの、例えば３’ＩＴＲからの、転写を阻害するエレメントである。一部の実施形態では、二本鎖ＲＮＡ終結エレメントは、３’から５’への方向性で、Ｉ１ｃ遺伝子の下流側かつ３’ＩＴＲの上流側に位置する。３’から５’への方向性で、終結エレメントは、３’ＩＴＲからの転写を可能にせず、したがって、二本鎖ＲＮＡは、３’ＩＴＲから転写されない。例えば、任意の種からの逆方向天然ポリＡ配列、もしくは合成ポリＡシグナル、またはそれらの断片、あるいは当技術分野において公知の他の核酸構造ターミネーターを含む、任意の終結エレメントを使用することができる。例示的なポリＡシグナルおよび／または転写ターミネーターとしては、ＢＧＨ、ＳＶ４０、ＨＧＨ、ベータグロビン、アルファ２グロビン遺伝子からのＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写休止シグナル、ｐｏｌ　ＩＩＩの転写終結シグナル、これらの断片およびこれ

らの任意の組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

【０８６５】

「リバースポリＡ」は、３’→５’の方向性でＩ１ｃ導入遺伝子の下流側かつ３’ＩＴＲの上流側の位置にあるポリＡシグナル配列である。３’→５’の方向性の任意の天然または合成ポリＡをリバースポリＡとして使用することができる。一部の実施形態では、リバースポリＡは、全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開番号ＷＯ２０１９１４３９５０および米国特許出願公開第２０２００３４００１３号に記載されているようなポリＡ（ｐＡ）である。いくつかの実施形態では、「リバースポリＡ」および「二本鎖ＲＮＡ終結エレメント」は、同義で使用される。３’から５’への方向性で、リバースポリＡ、または終結エレメントは、３’ＩＴＲからの転写を可能にせず、したがって、二本鎖ＲＮＡは、３’ＩＴＲから転写されない。リバースポリＡ、または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントは、異種である、例えば、目的の遺伝子とは異なる遺伝子からのものであることもあり、または同種である、例えば、目的の遺伝子と同じ遺伝子であることもある。本願では、目的の遺伝子は、Ｉ１ｃである。

【０８６６】

様々な実施形態では、ポリＡシグナルは、二本鎖ＲＮＡ転写エレメントまたはリバースポリＡを含む。一部の実施形態では、二本鎖ＲＮＡ終結エレメントまたはリバースポリＡ配列の５’末端、およびポリＡシグナルの３’末端は、互いにすぐ隣にあるか、または１ヌクレオチド離れているか、または２ヌクレオチド離れているか、または３ヌクレオチド離れているか、または４ヌクレオチド離れているか、または５ヌクレオチド離れているか、または６ヌクレオチド離れているか、または７ヌクレオチド離れているか、または８ヌクレオチド離れているか、または９ヌクレオチド離れているか、または１０ヌクレオチド離れているか、または１０ヌクレオチドより大きく離れている。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、二本鎖ＲＮＡ転写レレメントもリバースポリＡも含まない。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、ＡＡＴＡＡＡまたはＡＡＵＡＡＡを含む。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、ＡＡＴＡＡＡまたはＡＡＵＡＡＡの１反復、または２反復、または３反復、または４反復、または５反復、または６反復、または７反復、または８反復、または９反復、または１０反復、またはそれより多くの反復を含む。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる「Delineation of the Exact Transcription Termination Signal for Type 3 Polymerase III. Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Mar 2;10:36-44」に記載されているようなＰｏｌ　ＩＩＩの転写終結シグナルを含む。一部の実施形態では、ＰｏｌＩＩＩの転写終結シグナルの１つまたは複数は、３’から５’への方向性である。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、ＴＴＴＴを含む。一部の実施形態では、ポリＡシグナルは、ＡＡＡＡＡＡＡを含む。

【０８６７】

例示的な二本鎖ＲＮＡ終結エレメント配列（ＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写休止シグナルである）は、配列番号３３２であるか、または配列番号３３２と少なくとも８０％の配列同一性を有する配列である。

【０８６８】

本明細書で開示されるｒＡＡＶおよび線状ＤＮＡにおける使用のための例示的なポリＡ配列としては、（ｉ）配列番号３３１の核酸配列を有する、または配列番号３３１と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を有する、ｈＧＨポリ（Ａ）シグナルおよび終結配列；（ｉｉ）配列番号３３４を含む核酸を有する、または配列番号３３１と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を有する、ＳＶ４０ポリＡ配列；（ｉｉｉ）配列番号３３５の核酸を含む、または配列番号３３５と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、完全合成ポリＡ配列；（ｉｖ）配列番号２８４の核酸を含む、または配列番号２８４と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、最小合成ポリＡ配列；（ｖ）配列番号２８５の核酸を含む、または配列番号２８５と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、最小合成ポリＡ配列；（ｖｉ）配列番号２８６

の核酸を含む、または配列番号２８６と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、最短の天然に存在するＳＶ４０初期ポリＡシグナル（ＳＶ４０初期ポリＡ）；（ｖｉｉ）配列番号２８７の核酸を含む、または配列番号２８７と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、ＲＢＧポリＡが挙げられるが、これらに限定されない。その全体が参照により組み込まれる、"Definition of an efficient synthetic poly(A) site" Genes Dev. 1989 Jul;3(7):1019-25. doi: 10.1101/gad.3.7.1019.に記載されているようなポリＡ配列。すべての上記ポリＡ配列およびまたはターミネーター配列を、逆方向配列として、例えば３’から５’への方向性で、使用することができる。

ｅ．ＡＡＶ　ＩＴＲ

【０８６９】

ここで開示されるｒＡＡＶゲノムは、望ましい特性を有するＡＡＶ　ＩＴＲであって、これらのＩＴＲを組み込んでいるベクターの活性およびベクターに対する細胞応答をモジュレートするように設計され得る、ＡＡＶ　ＩＴＲを含む。一部の実施形態では、ＡＡＶ　ＩＴＲは、望ましい特性を有する合成ＡＡＶ　ＩＴＲであって、１つまたは２つの合成ＩＴＲを含むベクターの活性およびベクターに対する細胞応答を操作するように設計され得る、合成ＡＡＶ　ＩＴＲであり、これらには、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，４４７，４３３号に示されているようなものが含まれる。

【０８７０】

一部の実施形態では、ＩＴＲは、天然に存在するＩＴＲ、例えば、ＡＡＶ２からのＩＴＲ２と比べて、改変された転写活性を示す。ＩＴＲ２配列がもともとプロモーター活性を有することは公知である。それは、ポリ（Ａ）配列と同様の終結活性も、もともと有する。本発明の最小の機能的ＩＴＲは、ＩＴＲ２と比べて低下したレベルでだが、実施例で示されるように転写活性を示す。したがって、一部の実施形態では、ＩＴＲは、転写のために機能する。他の実施形態では、ＩＴＲは、転写に関して正常に機能しない。ある特定の実施形態では、ＩＴＲは、例えば、ベクターが宿主染色体に組み込まれたとき、ベクター内に存在する導入遺伝子カセットの転写を防止する、転写インシュレーターとして作用することができる。

【０８７１】

本発明の一態様は、少なくとも１つの合成ＡＡＶ　ＩＴＲを含むｒＡＡＶベクターゲノムであって、ＩＴＲ中の１つまたは複数の転写因子結合部位のヌクレオチド配列が、ＩＴＲ２などの天然に存在するＡＡＶ　ＩＴＲの配列と比べて欠失および／または置換されている、ｒＡＡＶベクターゲノムに関する。一部の実施形態では、それは、１つまたは複数の転写因子結合部位が欠失および／または置換されている最小の機能的ＩＴＲである。一部の実施形態では、少なくとも１つの転写因子結合部位、例えば、少なくとも５つもしくはそれより多くの、または１０もしくはそれより多くの、転写因子結合部位、例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０または２１の転写因子結合部位が、欠失および／または置換されている。

【０８７２】

別の実施形態である、本明細書に記載のｒＡＡＶベクターゲノムを含むｒＡＡＶベクターは、ＩＴＲ中の転写開始部位にまたはその付近に概して存在する１つまたは複数のＣｐＧアイランド（すぐ後にグアニン塩基が続くシトシン塩基（ＣｐＧ）、このような配置でのシトシンはメチル化される傾向がある）が欠失および／または置換されている少なくとも１つの合成ＡＡＶ　ＩＴＲを含む、ポリヌクレオチドを含む。ある実施形態では、ＣｐＧアイランド数の欠失または低減は、ｒＡＡＶベクターの免疫原性を低下させ得る。これは、ＣｐＧアイランドで起こる、ｒＡＡＶベクターＤＮＡ配列へのＴＬＲ－９結合の低減または完全な阻害に起因する。ＣｐＧモチーフのメチル化が転写のサイレンシングを生じさせる結果となることも周知である。ＩＴＲ中のＣｐＧモチーフの除去は、ＴＬＲ－９認識の減少および／またはメチル化の減少、したがって、導入遺伝子サイレンシングの減少

を生じさせる結果となると予想される。一部の実施形態では、それは、１つまたは複数のＣｐＧアイランドが欠失および／または置換されている最小の機能的ＩＴＲである。ある実施形態では、ＡＡＶ　ＩＴＲ２は、１６のＣｐＧアイランドを含有することが公知であり、これらのアイランドの１つもしくは複数または１６すべてを欠失させることができる。

【０８７３】

一部の実施形態では、少なくとも１つのＣｐＧモチーフ、例えば、少なくとも４つもしくはそれより多くの、または８つもしくはそれより多くの、ＣｐＧモチーフ、例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５または１６のＣｐＧモチーフが、欠失および／または置換されている。

【０８７４】

一部の実施形態では、合成ＩＴＲは、下記に列挙されるヌクレオチド配列のうちの１つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。他の実施形態では、合成ＩＴＲは、表１０に収載されるヌクレオチド配列のうちの１つと少なくとも８０％同一ある、例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である、ヌクレオチド配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【０８７５】

【表１０】

表 10:例示的な合成 ITR 配列:

表 10:	
ITR 名	**配列番号**
MH-257	配列番号 70
MH-258	配列番号 71
MH デルタ 258	配列番号 72
MH テロメア-1 ITR	配列番号 73
MH テロメア-2 ITR	配列番号 74
MH PolII 258 ITR	配列番号 75
MH 258 デルタ D 保存的	配列番号 76
5' AAV2-ITR	配列番号 77
3' AAV2 ITR	配列番号 78

ＩＶ．ベクターおよびビリオン

【０８７６】

本発明は、本発明による合成心特異的プロモーターまたは発現カセットを含むベクターをさらに提供する。

【０８７７】

一部の実施形態では、ベクターは、遺伝子治療ベクターである。様々な遺伝子治療ベクターが当技術分野において公知であり、ＡＡＶベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを挙げることができる。ベクターが遺伝子治療ベクターである場合、ベクターは、本明細書で開示されるような、治療用産物、好適には治療用タンパク質、例えば、ＰＰ１の阻害剤、をコードする、本発明の合成心特異的プロモーターに作動可能に連結された核酸配列を好ましくは含む。一部の実施形態では、ＰＰ１の阻害剤、例えばＩ－１もしくはＩ－１ｃ、またはそのバリアントは、分泌可能なタンパク質であるか、または分泌のためのシグナルペプチドに融合されている。

【０８７８】

一部の実施形態では、ベクターは、ＡＡＶベクターである。一部の実施形態では、ＡＡＶは、心臓への形質導入のために好適なまたは特異的に最適化された血清型を有する。一部の実施形態では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ２ｉ８、ＡＡＶＤＪ８およびＡＡＶ２ｇ９、またはこれ

らの誘導体からなる群から選択される。

【０８７９】

ＡＡＶベクターは、好ましくは、ＡＡＶ形質導入（すなわち、一本鎖ＡＡＶから二本鎖ＡＡＶへの変換）における制限ステップの１つを克服するために自己相補的な二本鎖ＡＡＶベクター（ｓｃＡＡＶ）として使用されるが、一本鎖ＡＡＶベクター（ｓｓＡＡＶ）の使用も本明細書では包含される。本発明の一部の実施形態では、ＡＡＶベクターはキメラであり、これは、ＡＡＶベクターが、少なくとも２つのＡＡＶ血清型からの成分、例えば、ＡＡＶ２のＩＴＲ、およびＡＡＶ５のカプシドタンパク質を含むことを意味する。ＡＡＶ９は、有効に心細胞、例えば心筋細胞、および特に有効に心組織に形質導入することが公知であり、したがって、ＡＡＶ９およびその誘導体は、心細胞および組織への標的化のために特に興味深い。ＡＡＶ２ｇ９は、有効に心細胞および特に有効に心組織に形質導入することが公知であり、したがって、ＡＡＶ２ｇ９およびその誘導体は、心細胞および心組織への標的化のために特に興味深い。ＡＡＶｒｈ１０は、有効に心細胞および特に有効に心組織に形質導入することが公知であり、したがって、ＡＡＶｒｈ１０およびその誘導体は、細胞および心組織への標的化のために特に興味深い。

【０８８０】

一実施形態では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクター（ｒＡＡＶビリオンとも呼ばれる）は、カプシドタンパク質、およびカプシドタンパク質中のｒＡＡＶゲノムを含む。

【０８８１】

一実施形態では、本明細書で開示されるＡＡＶベクターは、その全体が参照により本明細書に特に組み込まれるＷＯ２０１９／２４１３２４において開示されているもののいずれかからのカプシドタンパク質を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、心特異的カプシド、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９／２４１３２４において開示されているＸＬ３２およびＸＬ３２．１から選択される心特異的カプシドを含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９／２４１３２４において開示されているＡＡＶＸＬ３２またはＡＡＶＸＬ３２．１である。

【０８８２】

本明細書に記載のｒＡＡＶベクターにおいてＡＡＶカプシドとして使用され得る例示的なキメラまたはバリアントカプシドタンパク質を、参照により本明細書に特に組み込まれる２０１９年１１月１９日に出願された米国特許仮出願第６２，９３７，５５６号からの表２から選択することができ、あるいは現在公知であるもしくは後に同定される野生型カプシドタンパク質および／または他のキメラもしくはバリアントカプシドタンパク質との任意の組合せとともに使用することができ、各々が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、使用のために包含されるｒＡＡＶベクターは、キメラベクター、例えば、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる９，０１２，２２４および米国特許第７，８９２，８０９号において開示されているようなキメラベクターである。

【０８８３】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、半数体ｒＡＡＶベクター、例えば、ＷＯ２０１８／１７０３１０Ａ１において開示されているような半数体ｒＡＡＶベクター、または倍数体ｒＡＡＶベクター、例えば、ＷＯ２０１９／２１６９３２Ａ１においておよび米国出願第１６／１５１，１１０号において開示されているような倍数体ｒＡＡＶベクターであり、これらの参考特許文献の各々は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、ｒＡＡＶ３ベクター、例えば、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる９，０１２，２２４およびＷＯ２０１７／１０６２３６において開示されているようなｒＡＡＶ３ベクターである。

【０８８４】

特定の実施形態では、ｒＡＡＶは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９／２４１３２４において開示されているようなＡＡＶＸＬ３２またはＡＡＶＸＬ３２．１　ＡＡＶベクターである。

【０８８５】

一実施形態では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、現在公知のまたは後に同定される野生型カプシドタンパク質および／または他のキメラもしくはバリアントカプシドタンパク質との任意の組合せで本発明のＡＡＶカプシドに組み込むことができるキメラまたはバリアントカプシドタンパク質を記載しているＵＳＰＴＯ発行特許および公開出願の包袋に記載されている以下の生物学的配列ファイルのいずれかと関連付けられるカプシドタンパク質を含む（実証を目的として、１１４８６２５４は、米国特許出願第１１／４８６，２５４号に対応し、他の生物学的配列ファイルも同様に解釈されたい）：１１４８６２５４、１１９３２０１７、１２１７２１２１、１２３０２２０６、１２３０８９５９、１２６７９１４４、１３０３６３４３、１３１２１５３２、１３１７２９１５、１３５８３９２０、１３６６８１２０、１３６７３３５１、１３６７９６８４、１４００６９５４、１４１４９９５３、１４１９２１０１、１４１９４５３８、１４２２５８２１、１４４６８１０８、１４５１６５４４、１４６０３４６９、１４６８０８３６、１４６９５６４４、１４８７８７０３、１４９５６９３４、１５１９１３５７、１５２８４１６４、１５３６８５７０、１５３７１１８８、１５４９３７４４、１５５０３１２０、１５６６０９０６、および１５６７５６７７。

【０８８６】

一実施形態では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクター（ｒＡＡＶビリオンとも呼ばれる）は、カプシドタンパク質、およびカプシドタンパク質中のｒＡＡＶゲノムを含む。心血管疾患または心臓疾患または心不全を処置するために使用されるｒＡＡＶビリオンのｒＡＡＶカプシドは、表１１に収載されているもののいずれか、またはそれらの任意の組合せである。

【表１１－１】

表 11: AAV 血清型および例示的な公開されている対応するカプシド配列。

表 11	
血清型、およびカプシド配列が公開されている場所	**血清型、およびカプシド配列が公開されている場所**
AAV3.3b (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 72)	AAV3-3 (参照: 配列番号 200 米国特許出願公開第 20150315612 号)
AAV3-3 (参照: 配列番号 217 米国特許出願公開第 20150315612 号)	AAV3a ((参照: 米国特許第 6156303 号における配列番号 5)
AAV3a (参照: 米国特許第 6156303 号における配列番号 9)	AAV3b (参照: 米国特許第 6156303 号における配列番号 6)
AAV3b (参照: 米国特許第 6156303 号における配列番号 10)	AAV3b (参照: 米国特許第 6156303 号における配列番号 1)
AAV4 (参照: 配列番号 17 米国特許出願公開第 20140348794 号)	AAV4 ((参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 5)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 3)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 14)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 15)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 19)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 12)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 13)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 7)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 8)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 9)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 2)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 10)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 11)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 18)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 63) および米国特許出願公開第 20160017295 号 SEQ
ID 番号: (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 4)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 16)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 20)	AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 6)
AAV4 (参照: 米国特許出願公開第 20140348794 号における配列番号 1)	AAV42.2 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 9)
AAV42.2 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 102)	AAV42.3b (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 36)
AAV42.3B (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 107)	AAV42.4 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 33)
AAV42.4 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 88)	AAV42.8 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 27)
AAV42.8 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 85)	AAV43.1 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 39)

【表１１－２】

AAV43.1 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 92)	AAV43.12 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 41)
AAV43.12 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 93)	AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 15)
AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20150376240 号における配列番号 7)	AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 4; 米国特許出願公開第 20150315612 号 SEQ
ID 番号: 182	AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 95)、米国特許出願公開第 20140359799 号 SEQ
AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 31)	AAV8 (参照: 例えば、米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 8、または米国特許第 7198951 号における配列番号 7、または米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 223)
AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20150376240 号における配列番号 8)	AAV8 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 214)
AAV-8b (参照: 米国特許出願公開第 20150376240 号における配列番号 5)	AAV-8b (参照: 米国特許出願公開第 20150376240 号における配列番号 3)
AAV-8h (参照: 米国特許出願公開第 20150376240 号における配列番号 6)	AAV-8h (参照: 米国特許出願公開第 20150376240 号における配列番号 4)
AAV9 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 5)	AAV9 (参照: 米国特許第 7198951 号における配列番号 1)
AAV9 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 9)	AAV9 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 100)、米国特許第 7198951 号 配列番号 2
	AAV9 (参照: 米国特許第 7198951 号における配列番号 3)
AAV9 (AAVhu.14) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 3)	AAV9 (AAVhu.14) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 123)
AAVA3.1 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 120)	AAVA3.3 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 57)
AAVA3.3 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 66)	AAVA3.4 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 54)
AAVA3.4 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 68)	AAVA3.5 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 55)
AAVA3.5 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 69)	AAVA3.7 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 56)
AAVA3.7 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 67)	AAV29. (参照: (AAVbb. l) 161 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 11)
AAVC2 (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 61)	AAVCh.5 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 46); 米国特許出願公開第 20150315612 号 SEQ
ID 番号: 234	AAVcy.2 (AAV13.3) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 15)

【表１１－３】

AAV24.1 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 101)	AAVcy.3 (AAV24.1) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 16)
AAV27.3 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 104)	AAVcy.4 (AAV27.3) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 17)
AAVcy.5 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 227)	AAV7.2 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 103)
AAVcy.5 (AAV7.2) (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 18)	AAV16.3 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 105)
AAVcy.6 (AAV16.3) (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 10)	AAVcy.5 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 8)
AAVcy.5 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 24)	AAVCy.5R1 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号
AAVCy.5R2 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号)	AAVCy.5R3 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号
AAVCy.5R4 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号)	AAVDJ (参照: 米国特許出願公開第20140359799 号における配列番号 3) および米国特許第 7588772 号における配列番号 2)
	AAVDJ (参照: 米国特許出願公開第20140359799 号における配列番号 2;および米国特許第 7588772 号における配列番号 1)
	AAVDJ-8 (参照: 米国特許第 7588772 号における配列番号: ; Grimm et al 2008
AAVDJ-8 (参照: 米国特許第 7588772 号における配列番号: ; Grimm et al 2008	AAVF5 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 110)
AAVH2 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 26)	AAVH6 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 25)
AAVhEl.1 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 44)	AAVhErl.14 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 46)
AAVhErl.16 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 48)	AAVhErl.18 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 49)
AAVhErl.23 (AAVhEr2.29) (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 53)	AAVhErl.35 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 50)
AAVhErl.36 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 52)	AAVhErl.5 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 45)
AAVhErl.7 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 51)	AAVhErl.8 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 47)
AAVhEr2.16 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 55)	AAVhEr2.30 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 56)
AAVhEr2.31 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 58)	AAVhEr2.36 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 57)
AAVhEr2.4 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 54)	AAVhEr3.1 (参照: 米国特許第 9233131 号における配列番号 59)
AAVhu.1 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 46)	AAVhu.1 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 144)

【表１１－４】

AAVhu.lO (AAV16.8) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 56)	AAVhu.lO (AAV16.8) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 156)
AAVhu.l1 (AAV16.12) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 57)	AAVhu.l1 (AAV16.12) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 153)
AAVhu.12 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 59)	AAVhu.12 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 154)
AAVhu.13 (参照: 米国特許出願公開第 2015015917 号における配列番号 16 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 71)	
AAVhu.13 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 32 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 129)	
AAVhu.136.1 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 165)	AAVhu.140.1 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 166)
AAVhu.140.2 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 167)	AAVhu.145.6 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 178)
AAVhu.15 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 147)	AAVhu.15 (AAV33.4) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 50)
AAVhu.156.1 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 179)	AAVhu.16 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 148)
AAVhu.l6 (AAV33.8) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 51)	AAVhu.17 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 83)
AAVhu.l7 (AAV33.12) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 4)	AAVhu.172.1 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 171)
AAVhu.172.2 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 172)	AAVhu.173.4 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 173)
AAVhu.173.8 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 175)	AAVhu.18 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 52)
AAVhu.18 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 149)	AAVhu.19 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 62)
AAVhu.19 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 133)	AAVhu.2 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 48)
AAVhu.2 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 143)	AAVhu.20 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 63)
AAVhu.20 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 134)	AAVhu.21 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 65)
AAVhu.21 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 135)	AAVhu.22 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 67)
AAVhu.22 239((参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 138)	AAVhu.23 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 60)
AAVhu.23.2 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 137)	AAVhu.24 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 66)

【表１１－５】

AAVhu.24 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 136)	AAVhu.25 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 49)
AAVhu.25 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 146)	AAVhu.26 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 17 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 61)
	AAVhu.26 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 33)、米国特許出願公開第 20150315612 号 SEQ
	AAVhu.27 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 64)
AAVhu.27 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 140)	AAVhu.28 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 68)
AAVhu.28 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 130)	AAVhu.29 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 69)
AAVhu.29 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 42 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 132)	
AAVhu.29 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 225)	AAVhu.29R (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号:
AAVhu.3 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 44)	AAVhu.3 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 145)
AAVhu.30 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 70)	AAVhu.30 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 131)
AAVhu.31 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 1)	AAVhu.31 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 121)
AAVhu.32 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 2)	AAVhu.32 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 122)
AAVhu.33 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 75)	AAVhu.33 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 124)
AAVhu.34 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 72)	AAVhu.34 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 125)
AAVhu.35 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 73)	AAVhu.35 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 164)
AAVhu.36 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 74)	AAVhu.36 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 126)
AAVhu.37 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 34 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 88)	
AAVhu.37 (AAV106.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 10 および米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 18)	

【表１１－６】

AAVhu.38 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 161)	AAVhu.39 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 102)
AAVhu.39 (AAVLG-9) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 24)	AAVhu.4 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における　配列番号 47)
AAVhu.4 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 141)	AAVhu.40 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 87)
AAVhu.40 (AAV114.3) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 11)	AAVhu.41 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 91)
AAVhu.41 (AAV127.2) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 6)	AAVhu.42 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 85)
AAVhu.42(AAV127.5) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 8)	AAVhu.43 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 160)
AAVhu.43 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 236)	AAVhu.43 (AAV128.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 80)
AAVhu.44 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 45 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 158)	
AAVhu.44 (AAV128.3) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 81)	AAVhu.44R1 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号
AAVhu.44R2 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号	AAVhu.44R3 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号
AAVhu.45 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 76)	AAVhu.45 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 127)
AAVhu.46 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 82)	AAVhu.46 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 159)
AAVhu.46 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 224)	AAVhu.47 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 77)
AAVhu.47 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 128)	AAVhu.48 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 38)
AAVhu.48 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 157)	AAVhu.48 (AAV130.4) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 78)
AAVhu.48R1 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号	AAVhu.48R2 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号
AAVhu.48R3 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号	AAVhu.49 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 209)
AAVhu.49 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 189)	AAVhu.5 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 45)
AAVhu.5 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 142)	AAVhu.51 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 208)
AAVhu.51 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 190)	AAVhu.52 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 210)
AAVhu.52 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 191)	AAVhu.53 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 19)

【表１１－７】

AAVhu.53 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 35)	AAVhu.53 (AAV145.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 176)
AAVhu.54 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 188)	AAVhu.54 (AAV145.5) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 177)
AAVhu.55 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 187)	AAVhu.56 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 205)
AAVhu.56 (AAV145.6) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 168)	AAVhu.56 (AAV145.6) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 192)
AAVhu.57 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 206)	AAVhu.57 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 169)
AAVhu.57 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 193)	AAVhu.58 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 207)
AAVhu.58 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 194)	AAVhu.6 (AAV3.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 5)
AAVhu.6 (AAV3.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 84)	AAVhu.60 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 184)
AAVhu.60 (AAV161.10) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 170)	AAVhu.61 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 185)
AAVhu.61 (AAV161.6) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 174)	AAVhu.63 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 204)
AAVhu.63 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 195)	AAVhu.64 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 212)
AAVhu.64 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 196)	AAVhu.66 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 197)
AAVhu.67 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 215)	AAVhu.67 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 198)
AAVhu.7 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 226)	AAVhu.7 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 150)
AAVhu.7 (AAV7.3) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 55)	AAVhu.71 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 79)
AAVhu.8 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 53)	AAVhu.8 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 12)
AAVhu.8 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 151)	AAVhu.9 (AAV3.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 58)
AAVhu.9 (AAV3.1) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 155)	AAV-LK01 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 2)
AAV-LK01 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 29)	AAV-LK02 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 3)
AAV-LK02 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 30)	AAV-LK03 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 4)
AAV-LK03 (参照: WO2015121501 における配列番号 12 および米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 31)	
AAV-LK04 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 5)	AAV-LK04 (参照: 米国特許出願公開第 20150376607 号における配列番号 32)

【表１１－８】

AAV-LK05 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 6)	AAV-LK05 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 33)
AAV-LK06 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 7)	AAV-LK06 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 34)
AAV-LK07 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 8)	AAV-LK07 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 35)
AAV-LK08 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 9)	AAV-LK08 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 36)
AAV-LK09 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 10)	AAV-LK09 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 37)
AAV-LK10 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 11)	AAV-LK10 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における　配列番号 38)
AAV-LK11 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 12)	AAV-LK11 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 39)
AAV-LK12 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 13)	AAV-LK12 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 40)
AAV-LK13 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 14)	AAV-LK13 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 41)
AAV-LK14 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 15)	AAV-LK14 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 42)
AAV-LK15 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 16)	AAV-LK15 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 43)
AAV-LK16 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 17)	AAV-LK16 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 44)
AAV-LK17 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 18)	AAV-LK17 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 45)
AAV-LK18 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 19)	AAV-LK18 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 46)
AAV-LK19 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 20)	AAV-LK19 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 47)
AAV-PAEC (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 1)	AAV-PAEC (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 48)
AAV-PAEC11 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 26)	AAV-PAEC11 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 54)
AAV-PAEC 12 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 27)	AAV-PAEC 12 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 51)
AAV-PAEC 13 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 28)	AAV-PAEC 13 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 49)
AAV-PAEC2 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 21)	AAV-PAEC2 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 56)
AAV-PAEC4 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 22)	AAV-PAEC4 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 55)
AAV-PAEC6 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 23)	AAV-PAEC6 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 52)

【表１１－９】

AAV-PAEC7 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 24)	AAV-PAEC7 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 53)
AAV-PAEC8 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 25)	AAV-PAEC8 (参照: 米国特許出願公開第20150376607 号における配列番号 50)
AAVpi.1 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 28)	AAVpi.1 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 93; AAVpi.2 408、参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 30)
AAVpi.2 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 95)	AAVpi.3 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 29)
AAVpi.3 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 94)	AAVrh.10 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 9)
AAVrh.10 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 25)	AAV44.2 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 59)
AAVrh.10 (AAV44.2) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 81)	AAV42.1B (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 90)
AAVrh.l2 (AAV42.1b) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 30)	AAVrh.13 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 10)
AAVrh.13 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 26)	AAVrh.13 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 228)
AAVrh.l3R (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号	AAV42.3A (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 87)
AAVrh.l4 (AAV42.3a) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 32)	AAV42.5A (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 89)
AAVrh.l7 (AAV42.5a) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 34)	AAV42.5B (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 91)
AAVrh.l8 (AAV42.5b) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 29)	AAV42.6B (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 112)
AAVrh.l9 (AAV42.6b) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 38)	AAVrh.2 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 39)
AAVrh.2 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 231)	AAVrh.20 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 1)
AAV42.10 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 106)	AAVrh.21 (AAV42.10) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 35)
AAV42.11 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 108)	AAVrh.22 (AAV42.11) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 37)
AAV42.12 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 113)	AAVrh.23 (AAV42.12) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 58)
AAV42.13 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 86)	AAVrh.24 (AAV42.13) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 31)
AAV42.15 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 84)	AAVrh.25 (AAV42.15) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 28)
AAVrh.2R (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号	AAVrh.31 (AAV223.1) (参照: 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 48)

【表１１－１０】

AAVC1 (参照: 米国特許出願公開第20030138772 号における配列番号 60)	AAVrh.32 (AAVC1) (参照: 446 米国特許出願公開第 20030138772 号における配列番号 19)
AAVrh.32 /33 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 2)	AAVrh.51 (AAV2-5) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 104)
AAVrh.52 (AAV3-9) (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 18)	AAVrh.52 (AAV3-9) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 96)
AAVrh.53 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号)	AAVrh.53 (AAV3-11) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 17)
AAVrh.53 (AAV3-11) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 186)	AAVrh.54 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 40)
AAVrh.54 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 49 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 116)	
AAVrh.55 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 37)	AAVrh.55 (AAV4-19) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 117)
AAVrh.56 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 54)	AAVrh.56 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 152)
AAVrh.57 (参照: 497 における配列番号 米国特許出願公開第 20150315612 号 配列番号 26	AAVrh.57 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 105)
AAVrh.58 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 27)	AAVrh.58 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 48 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 106)
	AAVrh.58 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 232)
AAVrh.59 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 42)	AAVrh.59 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 110)
AAVrh.60 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 31)	AAVrh.60 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 120)
AAVrh.61 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 107)	AAVrh.61 (AAV2-3) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 21)
AAVrh.62 (AAV2-15) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 33)	AAVrh.62 (AAV2-15) (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 114)
AAVrh.64 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 15)	AAVrh.64 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号 43 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 99)
	AAVrh.64 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 233)
AAVRh.64RI (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号	AAVRh.64R2 (参照: 米国特許出願公開第20150159173 号における配列番号
AAVrh.65 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 35)	AAVrh.65 (参照: 米国特許出願公開第20150315612 号における配列番号 112)

【表１１－１１】

AAVrh.67 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 36)	AAVrh.67 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 230)
AAVrh.67 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 47 および米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 47)	
AAVrh.68 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 16)	AAVrh.68 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 100)
AAVrh.69 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 39)	AAVrh.69 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 119)
AAVrh.70 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 20)	AAVrh.70 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 98)
AAVrh.71 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 162)	AAVrh.72 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 9)
AAVrh.73 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 5)	AAVrh.74 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 6)
AAVrh.8 (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号における配列番号 41)	AAVrh.8 (参照: 米国特許出願公開第 20150315612 号における配列番号 235)
AAVrh.8R (参照: 米国特許出願公開第 20150159173 号、WO2015168666 における、配列番号 9)	AAVrh.8R A586R 突然変異体 (参照: WO2015168666 における配列番号 10)
AAVrh.8R R533A 突然変異体 (参照: WO2015168666 における配列番号 11)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 8)
BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 10)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 4)
BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 2)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 6)
BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 1)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 5)
BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 3)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 11)
BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 7427396 号における配列番号 5)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 7427396 号における配列番号 6)
BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 9193769 号における配列番号 7)	BAAV (ウシ AAV) (参照: 米国特許第 91937699 号における配列番号 9)
BNP61 AAV (参照: 米国特許出願公開第 20150238550 号における配列番号 1)	BNP61 AAV (参照: 米国特許出願公開第 20150238550 号における配列番号 2)
BNP62 AAV (参照: 米国特許出願公開第 20150238550 号における配列番号 3)	BNP63 AAV (参照: 米国特許出願公開第 20150238550 号における配列番号 4)
ヤギ AAV (参照: 米国特許第 7427396 号における配列番号 3)	ヤギ AAV (参照: 米国特許第 7427396 号における配列番号 4)
真型 AAV (ttAAV) (参照: WO2015121501 における配列番号 2)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における　配列番号 12)
AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 2)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 6)

【表１１－１２】

AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 4)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 8)
AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 14)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 10)
AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 15)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 5)
AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 9)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 3)
AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 7)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 11)
AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号)	AAAV (トリ AAV) (参照: 米国特許第 9238800 号における配列番号 1)
AAV シャッフル 100-1 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 23)	AAV シャッフル 100-1 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 11)
AAV シャッフル 100-2 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 37)	AAV シャッフル 100-2 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 29)
AAV シャッフル 100-3 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 24)	AAV シャッフル 100-3 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 12)
AAV シャッフル 100-7 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 25)	AAV シャッフル 100-7 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 13)
AAV シャッフル 10-2 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 34)	AAV シャッフル 10-2 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 26)
AAV シャッフル 10-6 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 35)	AAV シャッフル 10-6 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 27)
AAV シャッフル 10-8 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における　配列番号 36)	AAV シャッフル 10-8 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 28)
AAV SM 100-10 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 41)	AAV SM 100-10 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 33)
AAV SM 100-3 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 40)	AAV SM 100-3 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 32)
AAV SM 10-1 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 38)	AAV SM 10-1 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 30)
AAV SM 10-2 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 10)	AAV SM 10-2 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 22)
AAV SM 10-8 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 39)	AAV SM 10-8 (参照: 米国特許出願公開第 20160017295 号における配列番号 31)
AAV CBr-7.1 (参照: WO2016065001 における配列番号 4)	AAV CBr-7.1 (参照: WO2016065001 における配列番号 54)
AAV CBr-7.10 (参照: WO2016065001 における配列番号 11)	AAV CBr-7.10 (参照: WO2016065001 における配列番号 61)
AAV CBr-7.2 (参照: WO2016065001 における配列番号 5)	AAV CBr-7.2 (参照: WO2016065001 における配列番号 55)
AAV CBr-7.3 (参照: WO2016065001 における配列番号 6)	AAV CBr-7.3 (参照: WO2016065001 における配列番号 56)

【表１１－１３】

AAV CBr-7.4 (参照: WO2016065001 における配列番号 7)	AAV CBr-7.4 (参照: WO2016065001 における配列番号 57)
AAV CBr-7.5 (参照: WO2016065001 における配列番号 8)	AAV CHt-6.6 (参照: WO2016065001 における配列番号 35)
AAV CHt-6.6 (参照: WO2016065001 における配列番号 85)	AAV CHt-6.7 (参照: WO2016065001 における配列番号 36)
AAV CHt-6.7 (参照: WO2016065001 における配列番号 86)	AAV CHt-6.8 (参照: WO2016065001 における配列番号 37)
AAV CHt-6.8 (参照: WO2016065001 における配列番号 87)	AAV CHt-Pl (参照: WO2016065001 における配列番号 29)
AAV CHt-Pl (参照: WO2016065001 における配列番号 79)	AAV CHt-P2 (参照: WO2016065001 における配列番号 1)
AAV CHt-P2 (参照: WO2016065001 における配列番号 51)	AAV CHt-P5 (参照: WO2016065001 における配列番号 2)
AAV CHt-P5 (参照: WO2016065001 における配列番号 52)	AAV CHt-P6 (参照: WO2016065001 における配列番号 30)
AAV CHt-P6 (参照: WO2016065001 における配列番号 80)	AAV CHt-P8 (参照: WO2016065001 における配列番号 31)
AAV CHt-P8 (参照: WO2016065001 における配列番号 81)	AAV CHt-P9 (参照: WO2016065001 における配列番号 3)
AAV CHt-P9 (参照: WO2016065001 における配列番号 53)	AAV CKd-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 57)
AAV CKd-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 131)	AAV CKd-10 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 58)
AAV CKd-10 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 132)	AAV CKd-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 59)
AAV CKd-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 133)	AAV CKd-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 60)
AAV CKd-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 134)	AAV CKd-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 61)
AAV CKd-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 135)	AAV CKd-6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 62)
AAV CKd-6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 136)	AAV CKd-7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 63)
AAV CKd-7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 137)	AAV CKd-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 64)
AAV CKd-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 138)	AAV CKd-B 1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 73)
AAV CKd-B 1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 147)	AAV CKd-B2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 74)
AAV CKd-B2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 148)	AAV CKd-B3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 75)
AAV CKd-B3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号	AAV CKd-B3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 149)

【表１１－１４】

AAV CLv-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 65)	AAV CLv-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 139)
AAV CLvl-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 171)	AAV Civ 1-10 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 178)
AAV CLvl-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 172)	AAV CLv-12 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 66)
AAV CLv-12 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 140)	AAV CLvl-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 173)
AAV CLv-13 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 67)	AAV CLv-13 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 141)
AAV CLvl-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 174)	AAV Civ 1-7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 175)
AAV Civ 1-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 176)	AAV Civ 1-9 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 177)
AAV CLv-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 68)	AAV CLv-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 142)
AAV CLv-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 69)	AAV CLv-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 143)
AAV CLv-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 70)	AAV CLv-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 144)
AAV CLv-6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 71)	AAV CLv-6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 145)
AAV CLv-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 72)	AAV CLv-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 146)
AAV CLv-Dl (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 22)	AAV CLv-Dl (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 96)
AAV CLv-D2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 23)	AAV CLv-D2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 97)
AAV CLv-D3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 24)	AAV CLv-D3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 98)
AAV CLv-D4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 25)	AAV CLv-D4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 99)
AAV CLv-D5 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 26)	AAV CLv-D5 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 100)
AAV CLv-D6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 27)	AAV CLv-D6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 101)
AAV CLv-D7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 28)	AAV CLv-D7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 102)
AAV CLv-D8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 29)	AAV CLv-D8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 103); AAV CLv-Kl 762、参照: WO2016065001 における配列番号 18)
AAV CLv-Kl (参照: WO2016065001 における配列番号 68)	AAV CLv-K3 (参照: WO2016065001 における配列番号 19)
AAV CLv-K3 (参照: WO2016065001 における配列番号 69)	AAV CLv-K6 (参照: WO2016065001 における配列番号 20)

【表１１－１５】

AAV CLv-K6 (参照: WO2016065001 における配列番号 70)	AAV CLv-L4 (参照: WO2016065001 における配列番号 15)
AAV CLv-L4 (参照: WO2016065001 における配列番号 65)	AAV CLv-L5 (参照: WO2016065001 における配列番号 16)
AAV CLv-L5 (参照: WO2016065001 における配列番号 66)	AAV CLv-L6 (参照: WO2016065001 における配列番号 17)
AAV CLv-L6 (参照: WO2016065001 における配列番号 67)	AAV CLv-M1 (参照: WO2016065001 における配列番号 21)
AAV CLv-M1 (参照: WO2016065001 における配列番号 71)	AAV CLv-M11 (参照: WO2016065001 における配列番号 22)
AAV CLv-M1 1 (参照: WO2016065001 における配列番号 72)	AAV CLv-M2 (参照: WO2016065001 における配列番号 23)
AAV CLv-M2 (参照: WO2016065001 における配列番号 73)	AAV CLv-M5 (参照: WO2016065001 における配列番号 24)
AAV CLv-M5 (参照: WO2016065001 における配列番号 74)	AAV CLv-M6 (参照: WO2016065001 における配列番号 25)
AAV CLv-M6 (参照: WO2016065001 における配列番号 75)	AAV CLv-M7 (参照: WO2016065001 における配列番号 26)
AAV CLv-M7 (参照: WO2016065001 における配列番号 76)	AAV CLv-M8 (参照: WO2016065001 における配列番号 27)
AAV CLv-M8 (参照: WO2016065001 における配列番号 77)	AAV CLv-M9 (参照: WO2016065001 における配列番号 28)
AAV CLv-M9 (参照: WO2016065001 における配列番号 78)	AAV CLv-R1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 30)
AAV CLv-R1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 104)	AAV CLv-R2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 31)
AAV CLv-R2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 105)	AAV CLv-R3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 32)
AAV CLv-R3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 106)	AAV CLv-R4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 33)
AAV CLv-R4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 107)	AAV CLv-R5 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 34)
AAV CLv-R5 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 108)	AAV CLv-R6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 35)
AAV CLv-R6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 109); AAV CLv-R7 802 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 36)	AAV CLv-R7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 110)
AAV CLv-R8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 37)	AAV CLv-R8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 111)
AAV CLv-R9 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 38)	AAV CLv-R9 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 112)
AAV CSp-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 45)	AAV CSp-1 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 119)
AAV CSp-10 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 46)	AAV CSp-10 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 120)

【表１１－１６】

AAV CSp-11 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 47)	AAV CSp-11 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 121)
AAV CSp-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 48)	AAV CSp-2 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 122)
AAV CSp-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 49)	AAV CSp-3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 123)
AAV CSp-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 50)	AAV CSp-4 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 124)
AAV CSp-6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 51)	AAV CSp-6 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 125)
AAV CSp-7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 52)	AAV CSp-7 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 126)
AAV CSp-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 53)	AAV CSp-8 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 127)
AAV CSp-8.10 (参照: WO2016065001 における配列番号 38)	AAV CSp-8.10 (参照: WO2016065001 における配列番号 88)
AAV CSp-8.2 (参照: WO2016065001 における配列番号 39)	AAV CSp-8.2 (参照: WO2016065001 における配列番号 89)
AAV CSp-8.4 (参照: WO2016065001 における配列番号 40)	AAV CSp-8.4 (参照: WO2016065001 における配列番号 90)
AAV CSp-8.5 (参照: WO2016065001 における配列番号 41)	AAV CSp-8.5 (参照: WO2016065001 における配列番号 91)
AAV CSp-8.6 (参照: WO2016065001 における配列番号 42)	AAV CSp-8.6 (参照: WO2016065001 における配列番号 92)
AAV CSp-8.7 (参照: WO2016065001 における配列番号 43)	AAV CSp-8.7 (参照: WO2016065001 における配列番号 93)
AAV CSp-8.8 (参照: WO2016065001 における配列番号 44)	AAV CSp-8.8 (参照: WO2016065001 における配列番号 94)
AAV CSp-8.9 (参照: WO2016065001 における配列番号 45)	AAV CSp-8.9 (参照: WO2016065001 における配列番号 95)
AAV CSp-9 842 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 54)	AAV CSp-9 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 128)
AAV.hu.48R3 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 183)	AAV.VR-355 (参照: 米国特許第 8734809 号における配列番号 181)
AAV3B (参照: WO2016065001 における配列番号 48)	AAV3B (参照: WO2016065001 における配列番号 98)
AAV4 (参照: WO2016065001 における配列番号 49)	AAV4 (参照: WO2016065001 における配列番号 99)
AAV5 (参照: WO2016065001 における配列番号 50)	AAV5 (参照: WO2016065001 における配列番号 100)
AAVF1/HSC1 (参照: WO2016049230 における配列番号 20)	AAVF1/HSC1 (参照: WO2016049230 における配列番号 2)
AAVF11/HSC11 (参照: WO2016049230 における配列番号 26)	AAVF11/HSC11 (参照: WO2016049230 における配列番号 4)

【表１１－１７】

AAVF12/HSC12 (参照: WO2016049230 における配列番号 30)	AAVF12/HSC12 (参照: WO2016049230 における配列番号 12)
AAVF13/HSC13 (参照: WO2016049230 における配列番号 31)	AAVF13/HSC13 (参照: WO2016049230 における配列番号 14)
AAVF14/HSC14 (参照: WO2016049230 における配列番号 32)	AAVF14/HSC14 (参照: WO2016049230 における配列番号 15)
AAVF15/HSC15 (参照: WO2016049230 における配列番号 33)	AAVF15/HSC15 (参照: WO2016049230 における配列番号 16)
AAVF16/HSC16 (参照: WO2016049230 における配列番号 34)	AAVF16/HSC16 (参照: WO2016049230 における配列番号 17)
AAVF17/HSC17 (参照: WO2016049230 における配列番号 35)	AAVF17/HSC17 (参照: WO2016049230 における配列番号 13)
AAVF2/HSC2 (参照: WO2016049230 における配列番号 21)	AAVF2/HSC2 (参照: WO2016049230 における配列番号 3)
AAVF3/HSC3 (参照: WO2016049230 における配列番号 22)	AAVF3/HSC3 (参照: WO2016049230 における配列番号 5)
AAVF4/HSC4 (参照: WO2016049230 における配列番号 23)	AAVF4/HSC4 (参照: WO2016049230 における配列番号 6)
AAVF5/HSC5 (参照: WO2016049230 における配列番号 25)	AAVF5/HSC5 (参照: WO2016049230 における配列番号 11)
AAVF6/HSC6 (参照: WO2016049230 における配列番号 24)	AAVF6/HSC6 (参照: WO2016049230 における配列番号 7)
AAVF7/HSC7 (参照: WO2016049230 における配列番号 27)	AAVF7/HSC7 (参照: WO2016049230 における配列番号 8)
AAVF8/HSC8 (参照: WO2016049230 における配列番号 28)	AAVF8/HSC8 (参照: WO2016049230 における配列番号 9)
AAVF9/HSC9 (参照: WO2016049230 における配列番号 10)	AAVF9/HSC9 882 (参照: WO2016049230 における配列番号 29)
28m - 2vp3(参照: 米国特許第 10,550,405 号における配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)	AAV83 (参照: 米国特許第 10,550,405 号における 配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)
AAV82 (参照: 米国特許第 10,550,405 号における配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)	AAV93(参照: 米国特許第 10,550,405 号における配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)
AAV92 (参照: 米国特許第 10,550,405 号における配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)	AAVrh10-3 (参照: 米国特許第 10,550,405 号における 配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)
AAV82G9 (参照: 米国特許第 10,550,405 号における配列番号 139～142、および WO2018/170310 または WO2019/216932 における配列番号)	

【０８８７】

一実施形態では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、現在公知のまたは後に同定される野生型カプシドタンパク質および／または他のキメラもしくはバリアントカプシドタンパク質との任意の組合せで本発明のＡＡＶカプシドに組み込むことができるキメラまたはバリアントカプシドタンパク質を記載しているＵＳＰＴＯ発行特許および公開出願の包袋に記載されている以下の生物学的配列ファイルのいずれかと関連付けられるカプシドタンパク質を含む（実証を目的として、１１４８６２５４は、米国特許出願第１１／４８６，２５４号に対応し、他の生物学的配列ファイルも同様に解釈されたい）：１１４８６２５４．ｒａｗ、１１９３２０１７．ｒａｗ、１２１７２１２１．ｒａｗ、１２３０２

２０６．ｒａｗ、１２３０８９５９．ｒａｗ、１２６７９１４４．ｒａｗ、１３０３６３４３．ｒａｗ、１３１２１５３２．ｒａｗ、１３１７２９１５．ｒａｗ、１３５８３９２０．ｒａｗ、１３６８１２０．ｒａｗ、１３６７３３５１．ｒａｗ、１３６７９６８４．ｒａｗ、１４００６９５４．ｒａｗ、１４１４９９５３．ｒａｗ、１４１９２１０１．ｒａｗ、１４１９４５３８．ｒａｗ、１４２２５８２１．ｒａｗ、１４４６８１０８．ｒａｗ、１４５１６５４４．ｒａｗ、１４６０３４６９．ｒａｗ、１４６８０８３６．ｒａｗ、１４６９５６４４．ｒａｗ、１４８７８７０３．ｒａｗ、１４９５６９３４．ｒａｗ、１５１９１３５７．ｒａｗ、１５２８４１６４．ｒａｗ、１５３６８５７０．ｒａｗ、１５３７１１８８．ｒａｗ、１５４９３７４４．ｒａｗ、１５５０３１２０．ｒａｗ、１５６６０９０６．ｒａｗ、および１５６７５６７７．ｒａｗ。

【０８８８】

ある実施形態では、本発明のＡＡＶカプシドタンパク質およびウイルスカプシドは、それらが、例えば、参照により組み込まれる国際特許公報ＷＯ００／２８００４に記載されているような、別のウイルス、必要に応じて別のパルボウイルスまたはＡＡＶ、からのカプシドサブユニットのすべてまたは一部分を含み得ることから、キメラであり得る。

【０８８９】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターゲノムは、本明細書に組み込まれる米国特許第８，７８４，７９９号に記載されているような一本鎖または単量体二重鎖のものである。

【０８９０】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、細菌配列がない、および／または代替のオープンリーディングフレームを欠いている、および／またはコード配列からのＣｐＧを欠いている、および／または二本鎖ＲＮＡブロッカーもしくは二本鎖ＲＮＡ終結エレメントを有する、核酸を含む。一部の実施形態では、本発明の組換えＡＡＶは、末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡ鋳型から生成される。一部の実施形態では、本発明の組換えＡＡＶは、プラスミドＤＮＡ鋳型から生成される。

【０８９１】

一部の実施形態では、組換えＡＡＶは、プラスミドＤＮＡから産生される。一部の実施形態では、組換えＡＡＶは、末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡから産生される。閉鎖線状ＤＮＡ分子は、ヘアピンループとも記述される共有結合で閉鎖された末端を概して含み、相補ＤＮＡ鎖間に塩基対合が存在しない。ヘアピンループは、相補ＤＮＡ鎖の末端を結合する。このタイプの構造が概して染色体のテロメア末端に形成して、閉鎖構造で末端ヌクレオチドを封鎖することにより染色体ＤＮＡの損失または損傷を防止する。本明細書に記載の閉鎖線状ＤＮＡ分子の例では、ヘアピンループは、相補的な塩基対合しているＤＮＡ鎖に隣接しており、それによって閉鎖線状（ｃｌ）ＤＮＡ型構造が形成される。閉鎖線状ＤＮＡ分子は、バーベル型ＤＮＡを含む。

【０８９２】

末端閉鎖線状二重鎖核酸を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ無細胞合成およびｉｎ　ｖｉｖｏ法をはじめとする、様々な公知の方法により生成することができる。共有結合で末端が閉鎖された線状二重鎖核酸を生成する１つの方法は、プロテロメラーゼ結合部位が目的の核酸に隣接するようにプロテロメラーゼ結合部位を前駆体分子内に組み込むことによる方法である。プロテロメラーゼへの目的の核酸分子の曝露によって、核酸がその部位で切断され、ライゲーションされる。末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡの作製の例は、例えば、Nucleic Acids Res. 2015 Oct 15; 43(18): e120; Antisense & nucleic acid drug development 11:149-153 (2001)；米国特許第９１０９２５０号、同第９４９９８４７号、同第１０５０１７８２号、同第１０２８６３９９号、および／または米国特許出願公開第２０１９０１８５９２４号、同第２０１９０２０３２８２号に記載されているように、当技術分野において周知であり、これらの参考文献のすべてについての内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０８９３】

原核生物の配列も細菌の配列も欠いている、共有結合で末端が閉鎖された線状ＤＮＡを

生成する代替方法は、当技術分野において公知であり、例えば、プラスミドからのミニサークルＤＮＡの形成による（例えば、それらそれぞれの内容がそれら全体が参照により組み込まれる、米国特許第８，８２８，７２６号および米国特許第７，８９７，３８０号に記載されているような）方法である。例えば、１つの無細胞合成方法は、２つの酵素－Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼおよびプロテロメラーゼ－を併用し、高忠実度、共有結合閉鎖線状ＤＮＡ構築物を生成する。構築物は、抗生物質耐性マーカーを含有せず、それ故、これらの配列のパッケージングを排除する。このプロセスは、２週間プロセスで、商業規模でＡＡＶゲノムＤＮＡを増幅することができ、ウイルス産生に必要なＩＴＲ配列を維持することができる。

【０８９４】

ある特定の実施形態では、ｉｎ　ｖｉｖｏ細胞株が、持続発現のための標的細胞への所定の核酸配列の送達用の非ウイルスＤＮＡベクター構築物を産生するために使用される。非ウイルスＤＮＡベクターは、Ａ、Ａ’、Ｂ、Ｂ’、Ｃ、Ｃ’およびＤ領域；Ｄ’領域を有し、ＤおよびＤ’領域が長さ約５～２０ｎｔの相補的なパリンドローム配列であり、ＡおよびＡ’領域に隣接した位置にある、逆方向末端反復を各々が含む、２つのＤＤ－ＩＴＲ；所定の核酸配列（例えば、発現のための異種遺伝子）を含み；２つのＤＤ－ＩＴＲは、共有結合閉鎖非ウイルスＤＮＡに関連して核酸に隣接しており、この閉鎖線状ベクターは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開番号ＷＯ２０１９２４６５４４に記載されているように、各末端上に１／２のプロテロメラーゼ結合部位を含む。

【０８９５】

代替実施形態では、例えば、本明細書で開示される通りの開示される方法および組成物のための、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターの生成は、米国特許出願公開第２０１８／００３７９４３号およびKarbowniczek et al., Bioinsights, 2017において開示されているような、Ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ技術（ｄｂＤＮＡ（商標））を含むがこれに限定されない、末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡを使用して行うことができ、前記参考文献の両方は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。手短に言えば、末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡ技術を使用するＡＡＶ産生のためのプラスミドは、ＩＴＲを含み得、プロモーターおよび目的の遺伝子が、５６ｂｐパリンドロームプロテロメラーゼ認識配列と隣接している。実施形態の一部の態様では、ＩＴＲは、１４５ｂｐまたはそれ未満である。実施形態のある特定の態様では、ＩＴＲは、１３０ｂｐである。プラスミドが変性され、Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、および適切なプライマーの存在下で、Ｐｈｉ２９は、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）を開始し、その結果、元の構築物の二本鎖コンカテマー反復（cancatameric repeats）が作出される。プロテロメラーゼが添加されると、パリンドロームプロテロメラーゼ認識配列の結合が起こり、切断－結合反応が起こって、単量体二本鎖（ｄｓ）線状共有結合閉鎖ＤＮＡ構築物が生じる結果となる。一般的な制限酵素の添加により、エキソヌクレアーゼ活性によって望ましくないＤＮＡプラスミド骨格配列が除去され、消化され、その結果、バーベル型ＤＮＡが得られ、これをサイズ分画して、ＩＴＲとプロモーターと目的の遺伝子とをコードするバーベル型ＤＮＡ配列を単離することができる。バーベル型ＤＮＡをはじめとする末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡを使用するｒＡＡＶベクターの生成のための例示的なプラスミドは、以下の５’から３’への方向で、５’－プロテロメラーゼＲＳ、５’ＩＴＲ、ＬＳＰプロモーター、ｈＧＡＡ、３’ＵＴＲ、ｈＧＨポリ（Ａ）、３’ＩＴＲ、３’－プロテロメラーゼＲＳ（センス鎖）を含み、このセンス鎖は、鎖状（ｄｓ）線状共有結合閉鎖ＤＮＡ構築物の場合は相補アンチセンス鎖に連結されている。本明細書で開示される方法および組成物における使用のためのＡＡＶベクターを製造するための出発材料としての、末端閉鎖線状二重鎖ＤＮＡ、例えばバーベル型ＤＮＡ、の使用により、ＡＡＶベクターを含有するプラスミドを増殖させるために使用される細菌骨格が排除され、その産物は、Ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）応答を誘発することができない。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを作製する方法は、米国特許第９１０９２５０号、同第９４９９８４７号、同第１０５０１７８２号、同第１０２８６３９９号、および／または米国特許出願公開第２０１９／０１８５９２

４号、同第２０１９／０２０３２８２号において開示されており、これらの参考特許文献の各々は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０８９６】

ある実施形態では、本明細書で開示される心血管疾患または心臓疾患または心不全の処置に有用なｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ３ｂカプシドである。使用のために包含されるＡＡＶ３ｂカプシドは、２０１７／１０６２３６、および９，０１２，２２４、および７，８９２，８０９に記載されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０８９７】

ある実施形態では、本発明のＡＡＶカプシドタンパク質およびウイルスカプシドは、それらが、例えば、参照により組み込まれる国際特許公報ＷＯ００／２８００４に記載されているような、別のウイルス、必要に応じて別のパルボウイルスまたはＡＡＶ、からのカプシドサブユニットのすべてまたは一部分を含み得ることから、キメラであり得る。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターゲノムは、本明細書に組み込まれる米国特許第８，７８４，７９９号に記載されているような一本鎖または単量体二重鎖のものである。

【０８９８】

さらなる実施形態として、本発明のＡＡＶカプシドタンパク質およびウイルスカプシドは、参照により組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ１８／２２７２５、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０４４６３２、または米国特許第１０，５５０，４０５号に記載されているように単一のＡＡＶカプシドにＶＰ１　ＡＡＶ血清型と、ＶＰ２　ＡＡＶ血清型と、ＶＰ３　ＡＡＶ血清型との異なる組合せを含み得ることから、倍数体（半数体とも呼ばれる）であり得る。

【０８９９】

ある実施形態では、本明細書で開示される心臓疾患または障害、例えば心不全またはＣＨＦ、の処置に有用なｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ３ｂカプシドである。使用のために包含されるＡＡＶ３ｂカプシドは、２０１７／１０６２３６、および９，０１２，２２４、および７，８９２，８０９、および国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６１６５３（ＷＯ２０２０／１０２６４５）に記載されており、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ＡＡＶ３ｂカプシドは、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄカプシド、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄ５４９Ａカプシド、ＡＡＶ３ｂＳＡＳＴＧカプシド、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄ５４９Ａカプシド、ＡＡＶ３ｂ５４９Ａカプシド、ＡＡＶ３ｂＱ２６３Ｙカプシド、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されているようなＡＡＶ３ｂ　Ｑ２６３Ａ／Ｔ２６５カプシドを含むＡＡＶ３ｂＳＡＳＴＧカプシドのいずれかから選択される。一部の実施形態では、ＡＡＶ３ｂカプシドは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号４４、４６、５０、５２または５４のいずれかから選択される。

【０９００】

細胞へのそれらの導入を助長するために、本発明において有用なｒＡＡＶベクターゲノムは、（１）発現されることになる異種配列（一実施形態では、本明細書で開示されるＰＰ１の阻害剤、例えばＩ－１もしくはＩ－１ｃ、またはそのバリアントをコードする、ポリヌクレオチド）と、（２）異種遺伝子の組込みおよび発現を助長するウイルス配列エレメントとを含む、組換え核酸構築物である。ウイルス配列エレメントは、ｉｎ　ｃｉｓでのＤＮＡの複製およびＡＡＶカプシドへのパッケージングに必要とされるＡＡＶベクターゲノムの配列（例えば、機能的ＩＴＲ）を含み得る。ある実施形態では、異種遺伝子は、本明細書で開示される心臓疾患または障害、例えば心不全またはＣＨＦ、に罹患している患者においてＰＰ１の阻害剤を発現するために、本明細書で開示されるＰＰ１の阻害剤、例えばＩ－１もしくはＩ－１ｃ、またはそのバリアントをコードする。ある実施形態では、そのようなｒＡＡＶベクターゲノムは、マーカーまたはレポーター遺伝子も含有し得る。ある実施形態では、ｒＡＡＶベクターゲノムは、全部または一部が置き換えられているまたは欠失しているが機能的な隣接ＩＴＲ配列を保持する、ＡＡＶ３ｂ野生型（ＷＴ）シス遺伝子の１つまたは複数を有し得る。

【０９０１】
一実施形態では、本明細書で開示される心臓疾患または障害、例えば心不全またはＣＨＦ、の処置に有用な本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ３ｂカプシドまたはＡＡＶ２ｉ８カプシドによりカプセル化された、本明細書で開示されるｒＡＡＶゲノムを含む。一部の実施形態では、本明細書で開示される心臓疾患または障害、例えば心不全またはＣＨＦ、の処置に有用な本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、ＡＡＶ３ｂカプシド（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号４４）、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄカプシド（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号４６）、ＡＡＶ３ｂ　ＳＴ（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されているＳ６６３Ｖ＋Ｔ４９２Ｖ）カプシド（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号４８）、ＡＡＶ３ｂ２６５Ｄ５４９Ａカプシド（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号５０）、ＡＡＶ３ｂ５４９Ａカプシド（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号５２）、ＡＡＶ３ｂＱ２６３Ｙカプシド（ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されている配列番号５４）、またはＡＡＶ３ｂＳＡＳＴＧ（すなわち、ＷＯ２０２０／１０２６４５において開示されているＱ２６３Ａ／Ｔ２６５）カプシドから選択される任意のＡＡＶ３ｂカプシドによりカプセル化された、本明細書で開示されるｒＡＡＶゲノムを含む。

【０９０２】
ＡＡＶベクターは、当技術分野において広範に論じられている。ＡＡＶベクターは、通常はゲノムに組み込まれず、免疫応答を惹起しないので、ＡＡＶベクターは、特に興味深い。ＡＡＶ血清型１、２、４、５、８、９、ｒｈ１０、ＤＪ８および２ｇ９（ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＤＪ８およびＡＡＶ２ｇ９）は、心臓内への効率的形質導入を果たすことが認められている。したがって、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＶＤＪ８、ＡＡＶ２ｇ９、ＡＡＶ２ｉ８およびこれらの誘導体は、特に好ましいＡＡＶ血清型である。一部の実施形態では、ＡＡＶ９は、好ましいＡＡＶベクターである。他の実施形態では、ＡＡＶ２ｇ９は、特に好ましいＡＡＶベクターである（ＷＯ２０１４／１４４２２９）。さらに他の実施形態では、特に好ましいＡＡＶベクターは、ＡＡＶＤＪ８である。一部の実施形態では、ＡＡＶｒｈ１０は、特に好ましいＡＡＶベクターである。さらに別の実施形態では、ＡＡＶ２ｉ８は、特に好ましいベクターである。ＡＡＶ２ｉ８は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる特許８，８８９，６４１において開示されている。一部の実施形態では、ＡＡＶは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，１７２，８９３号において開示されているような、ハイブリッド－ＡＡＶ２ＩＴＲ／ＡＡＶである。好適には、ＡＡＶベクターは、２つの逆方向末端反復（ＩＴＲ）間に位置する本発明の核酸配列を含むウイルスゲノムを含む。例えば、ＷＯ２０１９／０２８３０６には、心臓において使用することができる様々な野生型および改変ＡＡＶベクターが開示されている。一実施形態では、本発明のＡＡＶベクターは、それらのウイルスゲノム内に機能的ＲｅｐおよびＣａｐタンパク質をコードする配列を欠いている、複製欠損型である組換えＡＡＶウイルスベクターである。これらの欠損型ＡＡＶベクターは、大部分のまたはすべての親コード配列を欠いていることがあり、基本的に、１つだけまたは２つのＡＡＶ　ＩＴＲ配列と、細胞、組織、臓器または生物への送達のための目的の核酸とを担持し得る。好適には、本明細書における使用のためのＡＡＶベクターは、核酸ペイロードまたは目的のカーゴの形質導入に必要な最小限の成分に縮小されたウイルスを含む。このように、ＡＡＶベクターは、特異的送達のためのビヒクルであって、その上、野生型ウイルスに見られる有害な複製および／または組込み特徴を欠いているビヒクルとして、操作される。一実施形態では、本発明のＡＡＶ粒子は、ｓｃＡＡＶである。一部の実施形態では、本発明のＡＡＶ粒子は、ｓｓＡＡＶである。ＡＡＶ粒子を産生および／または改変するための方法は、当技術分野において広範に開示されている（例えば、参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０００／２８００４、ＷＯ２００１／２３００１、ＷＯ２００４／１１２７２７、ＷＯ２００５／００５６１０およびＷＯ２００５

／０７２３６４を参照されたい）。一実施形態では、ＡＡＶベクターは、血管内（例えば、静脈内または動脈内）投与後の血液脳関門透過を可能にするカプシドを含む（例えば、例えば、血液脳関門の効率的横断のために操作されたカプシド、例えば、ＶＯＹ１０１、ＶＯＹ２０１、ＡＡＶＰＨＰ．Ｎ、ＡＡＶＰＨＰ．Ａ、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ、ＰＨＰ．Ｂ２、ＰＨＰ．Ｂ３、Ｇ２Ａ３、Ｇ２Ｂ４、Ｇ２Ｂ５、ＰＨＰ．Ｓ、およびこれらのバリアントを含む、カプシドまたはペプチド挿入物を論じている、ＷＯ２０１４／１４４２２９を参照されたい）。

【０９０３】

ＡＡＶベクターを作製する方法は、当技術分野において周知であり、例えば、米国特許第６２０４０５９号、同第５７５６２８３号、同第６２５８５９５号、同第６２６１５５１号、同第６２７０９９６号、同第６２８１０１０号、同第６３６５３９４号、同第６４７５７６９号、同第６４８２６３４号、同第６４８５９６６号、同第６９４３０１９号、同第６９５３６９０号、同第７０２２５１９号、同第７２３８５２６号、同第７２９１４９８号および同第７４９１５０８号、同第５０６４７６４号、同第６１９４１９１号、同第６５６６１１８号、同第８１３７９４８号；または国際公開番号ＷＯ１９９６０３９５３０、ＷＯ１９９８０１００８８、ＷＯ１９９９０１４３５４、ＷＯ１９９９／０１５６８５、ＷＯ１９９９／０４７６９１、ＷＯ２０００／０５５３４２、ＷＯ２０００／０７５３５３およびＷＯ２００１／０２３５９７；Methods In Molecular Biology, ed. Richard, Humana Press, NJ (1995)；O'Reilly et al, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, Oxford Univ. Press (1994)；Samulski et al.,J Fir.63:3822-8 (1989)；Kajigaya et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88: 4646-50 (1991)；Ruffing et al., J. Vir. 66:6922-30 (1992)；Kimbauer et al, Vir., 219:37-44 (1996)；Zhao et al, Vir.272: 382-93 (2000)に記載されており、これらの参考文献の各々の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。組換えＡＡＶウイルス粒子の産生に一般的に使用されるウイルス複製細胞としては、ＨＥＫ２９３細胞、ＣＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＫＢ細胞、および他の哺乳動物細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

【０９０４】

ウイルス発現系が、本明細書に記載の方法を使用するその産生中に所与のウイルスベクターを補完するために必要とされる任意の必要エレメントを含むようにさらに改変されることになることを理解されたい。例えば、ある特定の実施形態では、核酸カセットは、末端反復配列と隣接している。一実施形態では、ｒＡＡＶベクターの産生のために、ＡＡＶ発現系は、組換えＡＡＶプラスミド、Ｒｅｐを発現するプラスミド、Ｃａｐを発現するプラスミド、およびアデノウイルスヘルパープラスミドのうちの少なくとも１つをさらに含むことになる。所与のウイルスベクターの相補エレメントは、当技術分野において周知であり、したがって、当業者は、本明細書に記載のウイルス発現系を改変することができるだろう。

【０９０５】

ＡＡＶベクターを製造するためのウイルス発現系（例えば、ＡＡＶ発現系）は、例えば誘導性プロモーターの制御下にある、複製（Ｒｅｐ）遺伝子および／またはカプシド（Ｃａｐ）遺伝子をｉｎ　ｔｒａｎｓでさらに含み得る。ＲｅｐおよびＣａｐの発現は、これらの遺伝子の発現が一緒に「オン」にされるように１つの誘導性プロモーターの制御下にあることもあり、または明確に異なる誘導因子により「オン」にされる２つの別々の誘導性プロモーターの制御下にあることもある。ＡＡＶゲノムの左側には、異なる長さの２つのオーバーラップしているメッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）を産生することができる、ｐ５およびｐ１９と呼ばれる２つのプロモーターがある。これらの各々は、イントロンを含有し、このイントロンは、切り出されることもあり、または切り出されないこともあり、したがって、得られる可能性があるＲｅｐ遺伝子は次の４つとなる：Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅｐ５２およびＲｅｐ４０。Ｒｅｐ遺伝子（特に、Ｒｅｐ　７８およびＲｅｐ　６８）は、自己プライミング作用でＩＴＲにより形成されるヘアピンに結合し、その

ヘアピン内の指定された末端分離部位で切断する。それらは、ＡＡＶゲノムのＡＡＶＳ１特異的組込みに必要である。４つのＲｅｐタンパク質すべてが、ＡＴＰに結合することおよびヘリカーゼ活性を有することが示されている。ポジティブセンスＡＡＶゲノムの右側は、ｐ４０と名付けられた１つのプロモーターから始まる、ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３という３つのカプシドタンパク質のオーバーラップ配列をコードする。ｃａｐ遺伝子は、集合活性化タンパク質（ＡＡＰ）と呼ばれる、さらなる非構造タンパク質を産生する。このタンパク質は、ＯＲＦ２から産生され、カプシド集合プロセスに不可欠である。ＡＡＶベクターを製造するための必要エレメントは、当技術分野において公知であり、それらを、例えば、米国特許第５４７８７４５Ａ号、同第５６２２８５６Ａ号、同第５６５８７７６Ａ号、同第６４４０７４２Ｂ１号、同第６６３２６７０Ｂ１号、同第６１５６３０３Ａ号、同第８００７７８０Ｂ２号、同第６５２１２２５Ｂ１号、同第７６２９３２２Ｂ２号、同第６９４３０１９Ｂ２号、同第５８７２００５Ａ号、および米国特許出願公開第２０１７／０１３０２４５号、同第２００５０２６６５６７Ａ１号、同第２００５０２８７１２２Ａ１号においてさらに再調査することができ、各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０９０６】

一実施形態では、ＡＡＶベクターを産生するための細胞は、浮遊状態で培養される。一部の実施形態では、細胞は、動物由来成分不含条件下で培養される。動物由来成分不含培地は、所与の細胞株、例えば、ＨＥＫ２９３細胞に適合する、いずれの動物由来成分不含培地（例えば、血清不含培地）であってもよい。ＡＡＶベクターを増殖できることが当技術分野において公知の任意の細胞株を、本明細書に記載の方法を使用するＡＡＶの産生に使用することができる。ＡＡＶベクターを生成するために使用することができる例示的な細胞株としては、ＨＥＫ２９３、ＣＨＯ、Ｃｏｓ－７およびＮＳＯが挙げられるが、これらに限定されない。

【０９０７】

一実施形態では、ＡＡＶベクターを産生するための細胞株は、ＡＡＶベクター産生に必要な成分のいずれか、例えば、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、ＶＰ１などを安定的に発現する。一実施形態では、ＡＡＶベクターを産生するための細胞株は、ＡＡＶベクター産生に必要な成分のいずれか、例えば、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、ＶＰ１などを一過性に発現する。

【０９０８】

ＡＡＶベクターを産生するための細胞株がｒｅｐまたはｃａｐを安定的にも一過性にも発現しない場合には、これらの配列をＡＡＶ発現系に備えさせなければならない。ＡＡＶｒｅｐおよびｃａｐ配列を、当技術分野において公知の任意の方法により備えさせることができる。現行のプロトコールは、概して、単一のプラスミド上にＡＡＶ　ｒｅｐ／ｃａｐ遺伝子を発現する。ＡＡＶ複製およびパッケージング配列を一緒に備えさせる必要はないが、そうするのが適便であり得る。ＡＡＶ　ｒｅｐおよび／またはｃａｐ配列を、任意のウイルスまたは非ウイルスベクターにより備えさせることができる。例えば、ｒｅｐ／ｃａｐ配列を、ハイブリッドアデノウイルスまたはヘルペスウイルスベクター（例えば、欠失アデノウイルスベクターのＥ１ａまたはＥ３領域に挿入された）により、備えさせることができる。ＥＢＶベクターも、ＡＡＶ　ｃａｐおよびｒｅｐ遺伝子を発現するために利用することができる。この方法の１つの利点は、ＥＢＶベクターがエピソーム性であるが、連続的な細胞分裂を通して高コピー数を維持する（すなわち、「ＥＢＶに基づく核エピソーム」と名付けられた染色体外エレメントとして細胞に安定的に組み込まれる；Ｍａｒｇｏｌｓｋｉ，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ．Ｉｍｍｕｎ．１５８:６７（１９９２)を参照されたい）ことである。

【０９０９】

概して、ＡＡＶ　ｒｅｐ／ｃａｐ配列は、これらの配列のレスキューの防止および／またはパッケージング維持のために、ＴＲと隣接しないことになる。

【０９１０】

本明細書に記載の方法を使用してレンチウイルスを製造するためのウイルス発現系は、

核酸カセットに隣接する長い末端反復（ＬＴＲ）をさらに含むことになる。ＬＴＲは、レトロウイルスＲＮＡの逆転写により形成されるレトロトランスポゾンまたはプロウイルスＤＮＡのどちらかの末端において何百回または何千回も反復する同一のＤＮＡ配列である。ＬＴＲは、ＬＴＲ特異的インテグラーゼ、宿主染色体によるレトロウイルスＤＮＡの組込みを媒介する。レンチウイルスベクターを製造するためのＬＴＲおよび方法は、例えば、米国特許第７０８３９８１Ｂ２号、同第６２０７４５５Ｂ１号、同第６５５５１０７Ｂ２号、同第８３４９６０６Ｂ２号、同第７２６２０４９Ｂ２号、および米国特許出願公開第２００７００２５９７０Ａ１号、同第２０１７００６７０７９Ａ１号、同第２０１１００２８６９４Ａ１号にさらに記載されており、各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０９１１】

本明細書に記載の方法を使用してアデノウイルスを製造するためのウイルス発現系は、核酸カセットに隣接する、おおよそ９０～１４０塩基対（正確な長さは血清型に依存する）の同一の逆方向末端反復（ＩＴＲ）をさらに含む。ウイルス複製起点は、まさにゲノム末端のＩＴＲ内にある。アデノウイルスゲノムは、おおよそ３６０００塩基対の線状二本鎖ＤＮＡ分子である。多くの場合、遺伝子治療に使用されるアデノウイルスベクターは、新規遺伝情報が導入され得るＥ１領域が欠失しており、Ｅ１欠失によって組換えウイルスは複製欠損になる。アデノウイルススベクターを製造するためのＩＴＲおよび方法は、例えば、米国特許第７５１０８７５Ｂ２号、同第７８２０４４０Ｂ２号、同第７７４９４９３Ｂ２号、同第７８２０４４０Ｂ２号、同第１００４１０４９Ｂ２号；国際特許出願番号ＷＯ２０００００７００７１Ａ１；および米国特許出願番号ＷＯ２０００００７００７１Ａ１；米国特許出願公開第２００３００２２３５６Ａ１号；米国特許出願公開第２００８００５０７７０Ａ１号にさらに記載されており、各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０９１２】

一実施形態では、ウイルス発現系は、宿主細胞、例えば、ウイルス、哺乳動物細胞または昆虫細胞であり得る。例示的な昆虫細胞としては、Ｓｆ９、ｓｆ２１、Ｈｉ－５、およびＳ２昆虫細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ＡＡＶベクターを製造するためのウイルス発現系は、例えばウイルス発現系が昆虫細胞である場合、バキュロウイルス発現系をさらに含み得る。バキュロウイルス発現系は、バキュロウイルス感染昆虫細胞からの組換えタンパク質の効率的な大規模ウイルス産生および発現用に設計されている。バキュロウイルス発現系は、例えば、米国特許第６９１９０８５Ｂ２号、同第６２２５０６０Ｂ１号、同第５１９４３７６Ａ号にさらに記載されており、各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０９１３】

一部の実施形態では、ウイルス発現系は、無細胞株である。ウイルスベクター産生のための無細胞株は、例えば、Cerqueira A., et al. Journal of Virology, 2016；Sheng J., et al. The Royal Society of Chemistry, 2017；およびSvitkin Y.V., and Sonenberg N. Journal of Virology, 2003に、さらに記載されており、これらの内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０９１４】

細胞において産生されたウイルスベクターを、任意の標準的な技法を使用して放出させる（すなわち、ベクターを産生した細胞から解放する）ことができる。例えば、ウイルスベクターを、機械的方法、例えば、微少溶液操作、遠心分離、もしくは超音波処理、または化学的方法、例えば、溶解緩衝液および界面活性物質によって、放出させることができる。次いで、当技術分野における標準的な方法を使用して、放出されたウイルスベクターを回収（すなわち、収集）し、精製して純粋な集団を得る。例えば、ウイルスベクターを、それらが放出された緩衝液から、深層濾過または接線流濾過（ＴＦＦ）を使用する清澄化ステップを含む精製方法によって、回収することができる。本明細書において実施例で説明されるように、ウイルスベクターを、超音波処理によって細胞から放出させ、カラム

クロマトグラフィーを使用する清澄化溶解物の精製によって回収することができる。

【０９１５】

配列番号３８５～４１２から選択される配列を有する核酸を発現するウイルスベクターが、本明細書で提供される。一実施形態では、核酸配列は、配列番号３８５～４１２の配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一である配列を有する。一実施形態では、ウイルスベクターは、ＡＡＶである。

【０９１６】

本明細書における一態様は、配列番号３８５～４１２から選択される配列を有する核酸を発現するｒＡＡＶである。本明細書における一態様は、配列番号４１３～４４０から選択される配列を有する核酸を含むｒＡＡＶである。

【０９１７】

配列番号３８５～４１２から選択される配列を有する核酸を発現するウイルスベクター、例えばｒＡＡＶ、を含む組成物が、本明細書でさらに提供される。Ｉ１ｃ導入遺伝子をコードする核酸配列であって、配列番号３８５～４１２から選択される核酸配列が、本明細書でさらに提供される。一実施形態では、核酸配列は、配列番号３８５～４１２から選択される配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれより高度に同一である配列を有する。

【０９１８】

一実施形態では、核酸配列は、コドン最適化配列である。一実施形態では、配列番号３８５～４１２で示されるような、または他の最適化Ｉ－１ｃ導入遺伝子をコードする、核酸配列は、ＣＭＶプロモーター、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な短縮された筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントから選択されるプロモーターと、機能的に連結されている。

【０９１９】

３５７～３８４のいずれかの核酸配列を含む閉鎖線状ＤＮＡ構築物も提供される。閉鎖線状ＤＮＡは、細菌ＤＮＡ配列を欠いているｒＡＡＶを作製するための方法において使用され得る。したがって、構成的に活性なＩ－１ｃをコードするｒＡＡＶを含む、心不全の処置のための医薬組成物であって、ｒＡＡＶ組成物が細菌核酸配列を欠いている、医薬組成物も、本明細書で提供される。

Ｖ．心細胞および筋肉細胞

【０９２０】

非限定的な例として、好適な心細胞としては、胚性幹細胞；心線維芽細胞；骨格筋芽細胞；心室心筋細胞をはじめとする心筋細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、心細胞は、非心筋細胞体細胞である。一部の実施形態では、心細胞は、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを用いてｅｘ　ｖｉｖｏでトランスフェクトされ、対象に移植される、ｉＰＳ細胞由来または他の幹細胞由来の心細胞である。一部の実施形態では、ｉＰＳＣまたは他の幹細胞由来の心細胞は、ヒト細胞である。一部の実施形態では、心細胞は、成体幹細胞に由来する。心筋細胞をはじめとする成熟心細胞にｉＰＳＣを分化させる方法は、当技術分野において公知であり、心筋細胞へのヒトｉＰＳ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化のための方法を記載しているUosaki et al. (PLOS One, 2011, 6(8): e23657) を含むが、これに限定されない。

【０９２１】

一部の実施形態では、本明細書で開示される心筋細胞は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許仮出願第６０／８５６，４９０号および同第６０／８６０，３５４号ならびに国際出願ＰＣＴ／ＵＳ０７／２３１５５において開示されているものなどの、Ｉｓｌ１$^{+}$多能性前駆細胞に由来し得る。

【０９２２】
本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターでのトランスフェクションのための心筋細胞は、Ｍｅｆ２ｃ、Ｎｘｋ２．５、Ｔｂｘ２０、Ｉｓｌ１、ＧＡＴＡ４、ＧＡＴＡ６；トロポニン（Tropinin）Ｔ（ＴｎＴ）、トロポニンＣ（ＴｎＩ）、ＢＭＰ７、ＢＭＰ４、ＢＭＰ２、ｍｉＲ－２０８、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－６８９および平滑筋アクチン（ｓｍアクチン）、またはこれらのホモログもしくはバリアントの陽性発現を含むがそれらに限定されない、心筋細胞株統に特有のマーカーに反応する薬剤を使用することにより、同定および単離することができる。あるいは、心筋細胞は、Ｍｅｆ２ｃおよびＮｘｋ２．５の発現について陽性である。より正確に言えば、心筋細胞を、Ｍｅｆ２ｃおよびＮｘｋ２．５の陽性発現、および以下のマーカーのうちの少なくとも１つについての発現の欠如または低レベルの発現に基づいて、選択または同定することができる：Ｔｂｘ５、Ｓｎａｉ２、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１９９ｂ、ｍｉＲ－１２６－３ｐ、ｍｉＲ－３２２およびＣＤ３１、またはこれらのホモログもしくはバリアント。

【０９２３】
一部の実施形態では、細胞マーカーであるＳＩＲＰＡ（シグナル調節タンパク質アルファ）は、幹細胞から分化した心筋細胞の集団を同定するために使用され得、例えば、９８％心トロポニンＴ陽性である集団の単離を可能にする（Dubois et al., Nat. Biotech, (2011) 29;1011-1018）。Ｄｕｂｏｉｓらにより記載された方法では、ＰＥＣＡＭ、ＴＨＹ１、ＰＤＧＦＲＢおよびＩＴＧＡ１についての幹細胞の陰性選択を使用して非筋細胞集団を除去することができる。

【０９２４】
本発明の一部の実施形態では、細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏのものであり、例えば細胞培養下にある。本発明の他の実施形態では、細胞は、組織または多細胞生物の一部であり得る。

【０９２５】
好ましい実施形態では、細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｖｏのものであり得る、筋肉細胞（筋細胞）である。好ましい実施形態では、細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｖｏのものであり得る、心筋細胞である。代替の好ましい実施形態では、細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｖｏのものであり得る、骨格筋細胞である。筋肉細胞は、初代筋肉細胞、または筋肉由来の細胞株、例えば不死化細胞株、の細胞であり得る。細胞は、筋肉組織環境内に（例えば、動物の筋肉内に）存在することがあり、または筋肉組織から単離されていることがあり、例えば、それは細胞培養下にあることがある。好適には、細胞は、ヒト細胞である。

【０９２６】
骨格筋細胞は、速筋または遅筋からのものであり得る。

【０９２７】
心筋細胞は、心室心筋細胞、心房心筋細胞、心線維芽細胞、または心臓の内皮細胞（ＥＣ）、ならびに血管周囲細胞およびペースメーカー細胞から選択され得る。一実施形態では、筋肉細胞（単数／複数）は、心筋細胞（単数／複数）である。一実施形態では、筋肉細胞（単数／複数）は、骨格筋細胞（単数／複数）である。

ＶＩ．医薬組成物

【０９２８】
本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、薬学的に許容される賦形剤、すなわち、１つまたは複数の薬学的に許容される担体物質および／または添加剤、例えば、緩衝剤、担体、賦形剤、安定剤などを用いて、医薬組成物に製剤化することができる。医薬組成物は、キットの形態で提供されることもある。本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを含む医薬組成物、およびその使用は、当技術分野において公知である。

【０９２９】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを含む医薬組成物を提供する。本開示による医薬組成物中の活性成分（例えば、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターａａ）、薬学的に許容される賦形剤および／または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の正体、サイズおよび／または状態に依存して、さらに、組成物が投与され得る経路に依存して、変わり得る。例えば、組成物は、０．１パーセント～９９パーセント（ｗ／ｗ）の間の活性成分を含み得る。例として、組成物は、０．１パーセント～１００パーセントの間、例えば、５～５０パーセントの間、１～３０パーセントの間、５～８０パーセントの間、少なくとも８０パーセント（ｗ／ｗ）活性成分を含み得る。

【０９３０】

医薬組成物を、１つまたは複数の賦形剤または希釈剤を使用して（１）安定性を増大させるように、（２）細胞トランスフェクションもしくは形質導入を増加させるように、（３）ペイロードの持続放出もしくは遅延放出を可能にするように、（４）生体内分布を変更する（例えば、ウイルス粒子を特定の組織もしくは細胞型に標的化する）ように、（５）コードされたタンパク質の翻訳を増加させるように、（６）コードされたタンパク質の放出プロファイルを変更するように、および／または（７）本発明のペイロードの調節可能な発現を可能にするように、製剤化することができる。一部の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、純度少なくとも９５パーセント、少なくとも９６パーセント、少なくとも９７パーセント、少なくとも９８パーセント、少なくとも９９パーセントまたは１００パーセントであり得る。一部の実施形態では、賦形剤は、ヒトへの使用および獣医学的使用が認可されている。一部の実施形態では、賦形剤は、米国食品医薬品局により認可されたものであり得る。一部の実施形態では、賦形剤は、医薬品グレードであり得る。一部の実施形態では、賦形剤は、米国薬局方（ＵＳＰ）、欧州薬局方（ＥＰ）、英国薬局方、および／または国際薬局方の基準を満たし得る。賦形剤は、本明細書で使用される場合、所望される特定の剤形に好適であるような任意のおよびすべての溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、保存薬などを含むが、これらに限定されない。医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤、および組成物を調製するための技法は、当技術分野において公知である（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 2006を参照されたい）。従来の賦形剤媒体の使用は、本開示の範囲内であると考えられ得るが、ただし、任意の従来の賦形剤媒体が、物質またはその誘導体と不適合であり得る場合、例えば、何らかの望ましくない生物学的効果を生じさせることまたは別様に医薬組成物の他のいずれかの成分と有害な形で相互作用することにより不適合であり得る場合を除く。

【０９３１】

本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、１つまたは複数の他の治療剤、予防剤、研究用薬剤または診断剤と組み合わせて使用することができる。「と組み合わせて」には、薬剤を同じ時に投与しなければならない、および／または送達のために一緒に製剤化しなければならないことを含意する意図はないが、これらの送達方法は本発明の範囲内である。組成物は、１つもしくは複数の他の所望の治療薬もしくは医療手順と同時に、その前に、またはその後に、投与することができる。一部の実施形態では、１つの処置（例えば、遺伝子治療ベクター）の送達は、第２の処置（例えば、１つまたは複数の治療薬）の送達を開始するときにまだ行われていることがあり、したがって、投与期間にオーバーラップがある。これは、本明細書では「同時」または「並行送達」と呼ばれることもある。他の実施形態では、１つの処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。どちらの場合の一部の実施形態でも、併用投与のため、処置は、より有効である。例えば、第２の処置がより有効であり、例えば、同等の効果が、より少ない第２の処置で見られるか、または第２の処置によって、症状が、第２の処置が第１の処置の非存在下で投与された場合に見られる症状より大幅に軽減されるか

、または類似の状況が、第１の処置に伴って見られる。一部の実施形態では、送達は、症状の軽減、または障害に関連する他のパラメーターの低減が、他の処置の非存在下で送達される１つの処置に伴って観察されるものより大きくなるような送達である。２つの処置の効果は、部分的な相加効果であることもあり、完全な相加効果であることもあり、または相加効果より大きいこともある。送達は、送達される第１の処置の効果が、第２の処置が送達されたときにまだ検出可能であるような送達であり得る。本明細書に記載の組成物と少なくとも１つの追加の治療とを、同じ組成物または別々の組成物で同時にまたは連続的に投与することができる。連続投与の場合、本明細書に記載の遺伝子治療ベクターを最初に投与することができ、１つもしくは複数の治療薬を２番目に投与することができ、または投与の順序を逆にすることができる。遺伝子治療ベクターおよび１つまたは複数の治療薬を、活動性障害の期間中に、または寛解期もしくは疾患の活動性がより低い期間中に投与することができる。遺伝子治療ベクターを、別の処置の前に、その処置と並行して、処置後に、または障害の寛解中に投与することができる。

【０９３２】

組み合わせて投与される場合、本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクター、および１つもしくは複数の治療薬（例えば、第２もしくは第３の治療薬）、またはすべてを、個々に使用される、例えば単剤療法として使用される各々についての量もしくは投薬量より多い、それより少ない、またはそれと同じである量または用量で、投与することができる。ある特定の実施形態では、本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクター、および１つもしくは複数の治療薬（例えば、第２もしくは第３の薬剤）、またはすべてについての投与される量または投薬量は、個々に使用される各々についての量または投薬量より（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％）少ない。他の実施形態では、所望の効果（例えば、心血管疾患または心臓疾患の処置）を生じさせる結果となる、本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクター、および１つもしくは複数の治療薬（例えば、第２もしくは第３の薬剤）、またはすべてについての量または投薬量は、同じ治療効果を達成するために個々に必要とされる各々についての量または投薬量より（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、または少なくとも５０％）少ない。

【０９３３】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターの投与方法は、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを単独で、または追加の薬剤、例えば本明細書で開示される免疫モジュレーター、と組み合わせて、送達することができる。一部の実施形態では、追加の薬剤は、例えば、処置される筋肉における血流を改善し、筋肉機能を増強するための、筋肉増強タンパク質またはペプチドである。さらに、所望される場合には、一部の実施形態では、追加の薬剤：標的部位での遺伝子送達をさらに増進するために、本明細書に記載のこれらの方法および組成物と併用することができる血管作用剤。例示的な血管作用剤は、ヒスタミン、ヒスタミンアゴニスト、一酸化窒素供与体、ＶＥＧＦタンパク質を含むがこれらに限定されず、遺伝子ベクター用量での遺伝子移入の効率を高めるために使用され得る。一部の実施形態では、血管作用剤は、所与の治療効果を達成するために投与する必要があるベクターの量を制限するのに有用である。

【０９３４】

本明細書に記載のＡＡＶ粒子と組み合わせて使用することができる化合物としては、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤、ベータ遮断薬、変力効果（例えば、心臓の収縮力の増加）を誘導する化合物、および尿流量を増加させる化合物、すなわち利尿薬、をはじめとする、うっ血性心不全の処置に現在使用されている薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ｒＡＡＶベクターは、別の活性薬剤、例えば、食物摂取量低減剤、血漿グルコース低下剤もしくは血漿中脂質低下剤、例えば、アミリン、アミリンアゴニスト、ＣＣＫもしくはレプチン、または心臓処置剤、例えば、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤と組み合わせて、本明細書で開示される方法に従って投

与される。一実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、カプトプリル（ＣＡＰＯＴＥＮ（登録商標））と組み合わせて投与される。他の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、１つまたは複数の追加のＡＣＥ阻害剤、例えば、ベナゼプリル（ＬＯＴＥＮＳＩＮ（登録商標））、エナラプリル（ＶＡＳＯＴＥＣ（登録商標））、リシノプリル（ＰＲＭＩＶＩＬ（登録商標）ＺＥＳＴＲＩＬ（登録商標））、ホシノプリル（ＭＯＮＯＰＲＩＬ（登録商標））、ラミプリル（ＡＬＴＡＣＥ（登録商標））、ペリンドプリル（ＡＣＥＯＮ（登録商標））、キナプリル（ＡＣＣＵＰＲＩＬ（登録商標））、モエキシプリル（ＵＮＩＶＡＳＣ（登録商標））、およびトランドラプリル（ＭＡＶＩＫ（登録商標））と組み合わせて投与される。

【０９３５】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、１つまたは複数のベータ遮断薬、例えば、ソタロール（ＢＥＴＡＰＡＣＥ（登録商標））、チモロール（ＢＬＯＣＡＤＲＥＮ（登録商標））、エスモロール（ＢＲＥＶＩＢＬＯＣ（登録商標））、カルテオロール（ＣＡＲＴＲＯＬ（登録商標））、カルベジロール（ＣＯＲＥＧ（登録商標））、ナドロール（ＣＯＲＧＡＲＤ（登録商標））、プロプラノロール（ＩＮＤＥＲＡＬ（登録商標））、プロプラノロール（ＭＤＥＲＡＬ－ＬＡ（登録商標））、ベタキソロール（ＫＥＲＬＯＮＥ（登録商標））、ペンブトロール（ＬＥＶＡＴＯＬ（登録商標））、メトプロロール（ＬＯＰＲＥＳＳＯＲ（登録商標））、ラベタロール（ＮＯＲＭＯＤＹＮＥ（登録商標））、アセブトロール（ＳＥＣＴＲＡＬ（登録商標））、アテノロール（ＴＥＮＯＲＭＩＮ（登録商標））、メトプロロール（ＴＯＰＲＯＬ－ＸＬ（登録商標））、ラベタロール（ＴＲＡＮＤ　ＡＴＥ（登録商標））、ピンドロール（ＶＩＳＫＥＮ（登録商標））、およびビソプロロール（ＺＥＢＥＴ　Ａ（登録商標））と組み合わせて、うっ血性心不全の処置に使用することができる。

【０９３６】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、１つまたは複数のアンジオテンシンπ受容体遮断薬（ＡＲＢ）、例えば、カンデサルタンシレキセチル（ＡＴＡＣＡＮＤ（登録商標））、イルベサルタン（ＡＶＡＰＲＯ（登録商標））、ロサルタン（ＣＯＺＡＡＲ（登録商標））、バルサルタン（ＤＩＯ　Ｖ　ＡＮ（登録商標））、テルミサルタン（ＭＩＣＡＲＤＩＳ（登録商標））、およびメシル酸エプロサルタン（ＴＥＶＥＴＥＮ（登録商標））と組み合わせて、うっ血性心不全の処置に使用することができる。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、１つまたは複数のアルドステロン拮抗薬、例えば、スピロノラクトン（ＡＬＤＡＣＴＡＺＩＤＥ（登録商標））およびエプレレノン（ＩＮＳＰＲＡ（登録商標））と組み合わせて、うっ血性心不全の処置に使用することができる。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、ＩＬ－１８阻害剤、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，７９９，５４１号において開示されているような＿＿またはＩＬ－１８ＢＰもしくはそのバリアントと組み合わせて、使用することができる。

【０９３７】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、１つまたは複数のバソペプチダーゼ阻害剤と組み合わせて、うっ血性心不全の処置に使用することができる。バソペプチダーゼ阻害剤は、天然エンドペプチダーゼ（ＮＥＰ）およびＡＣＥ阻害活性を有するＮＥＰ／ＡＣＥ阻害剤を含む。ＮＥＰ／ＡＣＥ阻害剤の例としては、三環系ベンザゼピノンチオール、オマパトリラト、ゲモパトリラト、ミキサンプリル、ラセカドトリル、ファシドトリル、サムパトリラト、ＭＤＬ　１００．２４０　Ｚ１３７５２Ａ、ＢＭＳｌ　８９９２１、ＢＭＳｌ　８２６５７、およびＣＧＳ　３０００８が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における

使用に好適なＮＥＰ／ＡＣＥ阻害剤の例としては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，３６２，７２７号、同第５，３６６，９７３号、同第５，２２５，４０１号、同第４，７２２，８１０号、同第５，２２３，５１６号、同第４，７４９，６８８号、および同第５，５５２，３９７号において開示されているものが挙げられる。そのような追加の薬剤もしくは化合物の投与は、本明細書で開示される方法に従って投与されるｒＡＡＶベクターと同時（すなわち、投与中）であり得、または対象は、ｒＡＡＶベクターの投与前、もしくは投与中、もしくは投与後に追加の薬剤での処置を受けることになり得る。

【０９３８】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法に従って投与される、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、当技術分野において公知であるうっ血性心不全のための任意の治療と組み合わせて、うっ血性心不全の処置に使用することができる。例えば、一実施形態では、本明細書で開示される方法によるｒＡＡＶベクターの投与を、心臓再同期＿＿などの治療用デバイスと組み合わせて、うっ血性心不全の処置に使用することができる。

【０９３９】

本開示による医薬組成物を、単一単位用量として、および／または複数の単一単位用量として、調製すること、包装すること、および／または大量に販売することができる。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個別量を指す。活性成分の量は、一般に、対象に投与されることになる活性成分の投薬量、および／またはそのような投薬量の適便な数分の一、例えば、そのような投薬量の２分の１もしくは３分の１などに等しい。

【０９４０】

さらなる態様では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、本明細書で開示される投与方法における使用のための医薬としての使用のために調製される。

【０９４１】

さらなる態様では、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターは、治療、すなわち、医学的状態または疾患、例えば、本明細書で開示される心血管疾患または心臓疾患もしくは障害、の予防または処置における使用のための、本明細書で開示される投与方法における使用のための医薬としての使用のために調製される。本態様に関する例示的な医学的状態または疾患は、下記で論じられる。

【０９４２】

さらなる態様では、表１～３から選択される合成心特異的プロモーターまたはそのバリアントを含む本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを含む細胞が提供される。一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞、必要に応じてヒト細胞である。好適には、細胞は、心細胞である。好適には、細胞は、心筋細胞、例えば、心室心筋細胞であり得る。好適には、細胞は、ヒト心筋細胞、例えば、ヒト心室心筋細胞であり得る。

【０９４３】

一部の実施形態では、医薬組成物は、約ｐＨ７．０～約ｐＨ８．０の緩衝液（例えば、賦形剤）中の組換えＡＡＶベクターを含む。一部の実施形態では、緩衝液のｐＨは、約７．０～約７．５である。好ましい実施形態では、緩衝液のｐＨは、７．５未満である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）またはリン酸緩衝液（例えば、１０ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、３５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、５％ソルビトール、０．００１％（ｗ／ｖ）ポロキサマー１８８）である。ある特定の実施形態では、緩衝液または賦形剤は、ナトリウム、カリウム、リン酸、塩化物、カルシウム、マグネシウム、硫酸、クエン酸およびこれらの任意の組合せからなる群から選択されるイオンを含む。医薬組成物は、ポリオール、糖、または同様のものをさらに含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、グリセロール、またはプロピレングリコール、またはポリエチレングリコール、またはソルビトール、またはマンニトールを含む。いくつかの実施形態では、ソルビトール濃度は、約１％（ｗ／ｖ）～約１０％（ｗ／ｖ）の範囲である。一部の実施形態では、ソルビトール濃度は、約２％（ｗ／ｖ）～約８％（ｗ／ｖ）の範囲で

ある。好ましい実施形態では、ソルビトール濃度は、約３％（ｗ／ｖ）～約６％（ｗ／ｖ）の範囲である。ある特定の実施形態では、ソルビトール濃度は、１％（ｗ／ｖ）、２％（ｗ／ｖ）、３％（ｗ／ｖ）、４％（ｗ／ｖ）、５％（ｗ／ｖ）、６％（ｗ／ｖ）、７％（ｗ／ｖ）、８％（ｗ／ｖ）、９％（ｗ／ｖ）、または１０％（ｗ／ｖ）である。医薬組成物は、非イオン性界面活性剤をさらに含む。一部の実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレングロックコポリマー、アルキルグルコシド、アルキルフェノ－ルエトキシレート、ポリソルベート、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポロキサマー１８８、またはＥｃｏｓｕｒｆ　ＳＡ－１５である。ある特定の実施形態では、ポロキサマー１８８またはＥｃｏｓｕｒｆ　ＳＡ－１５濃度は、０．０００５％（ｗ／ｖ）、０．０００８％（ｗ／ｖ）、０．０００９％（ｗ／ｖ）、０．００１％（ｗ／ｖ）、０．００２％（ｗ／ｖ）、０．００２５％（ｗ／ｖ）、０．００３％（ｗ／ｖ）、０．００３５％（ｗ／ｖ）、０．００４％（ｗ／ｖ）、０．００４５％（ｗ／ｖ）、０．００５％（ｗ／ｖ）、０．００６％（ｗ／ｖ）、０．００７％（ｗ／ｖ）、０．００８％（ｗ／ｖ）、０．００９％（ｗ／ｖ）、または０．０１％（ｗ／ｖ）である。

【０９４４】

医薬組成物は、少なくとも１×１０^{9}ｖｇ／ｍｌの本発明で開示される組換えＡＡＶベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、約１×１０^{9}ｖｇ／ｍｌ～約１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌの組換えＡＡＶベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、約１×１０^{11}ｖｇ／ｍｌ～約１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌの組換えＡＡＶベクターを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、ホスファターゼ阻害剤ポリペプチドをコードする核酸を含む、約１×１０^{11}ｖｇ／ｍｌ～約１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌの組換えＡＡＶ２ｉ８ベクターであって、核酸が、ＣＭＶプロモーター、表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表５Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な短縮された筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアントから選択されるプロモーターと、機能的に連結されている、組換えＡＡＶ２ｉ８ベクターを含む。

ＶＩＩ．他の方法および使用

【０９４５】

一実施形態では、本技術は、心血管疾患または心臓疾患または心不全、好ましくはＣＨＦ、の処置における使用のための本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターも提供する。関連のある状態、疾患および治療用発現産物は、上記で論じられている。一実施形態では、本技術は、心血管疾患または心臓疾患または心不全、好ましくはＣＨＦ、の処置における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターも提供する。

【０９４６】

一実施形態では、本技術は、医薬としての使用のための本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターも提供する。一実施形態では、本技術は、医薬としての使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターも提供する。

【０９４７】

一実施形態では、本技術は、本明細書で言及される任意の状態または疾患の処置のための医薬組成物の使用、製造のための、本明細書で開示される投与方法における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターも提供する。一実施形態では、本技術は、本明細書で言及される任意の状態または疾患の処置における使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターも提供する。

【０９４８】

一実施形態では、本技術は、本明細書で開示される投与方法における使用のための本明

細書で開示されるｒＡＡＶベクターを含む細胞も提供する。好適には、細胞は、真核細胞である。真核細胞は、好適には、動物（後生動物）細胞（例えば、哺乳動物細胞）であり得る。好適には、細胞は、ヒト細胞である。本発明の一部の実施形態では、細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏのものであり、例えば細胞培養下にある。本発明の他の実施形態では、細胞は、心臓組織の一部、または心臓組織であり得る。一実施形態では、本技術は、医薬としての使用のための本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを含む細胞も提供する。

【０９４９】

好ましい実施形態では、細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｖｏのものであり得る、心臓細胞である。心臓細胞は、心筋細胞、例えば、心室心筋細胞、心房心筋細胞、平滑筋細胞、ペースメーカー細胞、または他の心臓細胞であり得る。あるいは、心臓細胞は、心臓由来の細胞株、例えば、不死化細胞株であり得る。一実施形態では、細胞は、筋肉細胞、例えば、心筋細胞、または心臓の平滑筋細胞である。細胞は、心臓組織環境内に（例えば、動物の心臓内に）存在することがあり、または心臓組織から単離されていることがあり、例えば、それは細胞培養下にあることがある。好適には、初代細胞または細胞株は、ヒト細胞である。

【０９５０】

さらなる態様では、本発明は、細胞、好ましくは、心細胞において本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを産生するための方法を提供する。方法は、好適には、遺伝子の発現に好適な条件下で前記心細胞を維持するステップを含む。培養下でのこのステップは、心細胞、または心細胞を含む組織を、好適な培養条件下でインキュベートすることを含み得る。発現は、もちろん、ｉｎ ｖｉｖｏでの発現であり、例えば、対象の心臓内の１つまたは複数の細胞における発現であり得る。

【０９５１】

好適には、方法は、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを心細胞に導入するステップを含む。心細胞への広範なトランスフェクション方法が、当技術分野において周知である。心細胞への好ましいトランスフェクション方法は、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを用いる細胞への形質導入である。

【０９５２】

本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを、遺伝子治療のための本明細書で開示される投与方法で使用することができることは、当業者には明らかであろう。

【０９５３】

本発明は、心細胞において治療用導入遺伝子を発現させるために本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを投与する方法であって、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを本明細書で開示される投与方法に従って心細胞に導入するステップを含む方法も提供する。心細胞は、ｉｎ ｖｉｖｏまたはｅｘ ｖｉｖｏのものであり得る。

【０９５４】

本明細書に開示される技術の組成物および方法のすべての態様を、以下の番号付け項のいずれか１つまたは複数に定義することができる。

Ａ．心不全を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後６か月、患者の血清におけるＮＴ－プロＢＮＰレベルが、９００ｐｇ／ｍｌを下回る、方法。

Ｂ．ｒＡＡＶベクターが、ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結されたＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む、項Ａに記載の方法。

Ｃ．総用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される、項Ａ～Ｂのいずれかに記載の方法。

Ｄ．総用量の投与が、分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、項Ａ～Ｃのいずれかに記載の方法。

Ｅ．総用量の投与が、５分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間に

わたって投与される、項Ａ～Ｄのいずれかに記載の方法。
Ｆ．５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される、項５に記載の方法。
Ｇ．ｒＡＡＶが、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される、項Ａ～Ｅのいずれかに記載の方法。
Ｈ．ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである、項１～７のいずれかに記載の方法。
Ｉ．心不全を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、（ｉ）ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤タンパク質をコードする核酸配列、（ｉｉ）ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質に機能的に連結された合成プロモーターを含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含む、方法。
Ｊ．総用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される、項Ｉに記載の方法。
Ｋ．総用量の投与が、分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、項Ｉ～Ｊに記載の方法。
Ｌ．総用量の投与が、５分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、項Ｉ～Ｋに記載の方法。
Ｍ．５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される、項Ｉ～Ｌに記載の方法。
Ｎ．ｒＡＡＶが、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される、項Ａ～Ｍのいずれかに記載の方法。
Ｏ．ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの用量範囲から選択される、項Ａ～Ｎのいずれかに記載の方法。
Ｐ．ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである、項Ａ～Ｏのいずれかに記載の方法。
Ｑ．ｒＡＡＶ用量の投与後６か月、患者の血清におけるＮＴ－プロＢＮＰレベルが、９００ｐｇ／ｍｌを下回る、項Ａ～Ｐのいずれかに記載の方法。
Ｒ．免疫モジュレーターを投与することをさらに含む、項Ａ～Ｑのいずれかに記載の方法。
Ｓ．ｒＡＡＶベクターが、配列番号２のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含み、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）、先行する項Ａ～Ｒのいずれかに記載の方法。
Ｔ．ｒＡＡＶが、表１１から選択される、先行する項Ａ～Ｓのいずれかに記載の方法。
Ｕ．投与が、ニトロプルシドまたはニトログリセリンをさらに含む、先行する項Ａ～Ｔのいずれかに記載の方法。
Ｖ．合成プロモーターが、平滑筋細胞において優先的にホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現を引き起こす、項Ａ～Ｕのいずれかに記載の方法。
Ｗ．合成プロモーターが、心細胞において優先的にホスファターゼ阻害剤タンパク質の発現を引き起こす、項Ａ～Ｖのいずれかに記載の方法。
Ｘ．発現が、ＣＭＶプロモーターによって引き起こされる発現と同等である、項Ａ～Ｗのいずれかに記載の方法。
Ｙ．投与が、患者の心臓の冠動脈の内腔の中に、または全身投与である、項Ａ～Ｘのいずれかに記載の方法。
Ｚ．合成プロモーターが、表２Ａから選択される心特異的プロモーターまたはそのバリアント、あるいは表５Ａもしくは表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターまたはそのバリアントである、項Ａ～Ｙのいずれかに記載の方法。
ＡＡ．心血管状態または心臓疾患を有する患者を処置する方法であって、患者の心臓細胞に、表２Ａから選択される心特異的プロモーターまたはそのバリアント、あるいは表５

Ａもしくは表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターまたはそのバリアントに機能的に連結された治療用核酸を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、治療用核酸が、ＲＮＡまたはＤＮＡであり、治療用核酸が、表１８Ａまたは１８Ｂから選択される治療用タンパク質を発現する、方法。

ＢＢ．心血管疾患または心臓疾患が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される、項ＡＡに記載の方法。

ＣＣ．総用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される、項ＡＡ～ＢＢのいずれかに記載の方法。

ＤＤ．総用量の投与が、分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、項ＡＡ～ＣＣのいずれかに記載の方法。

ＥＥ．心不全を有する患者を処置する方法であって、
患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの用量範囲から選択され、総用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与され、総用量の投与が、分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、方法。

ＦＦ．ｒＡＡＶベクターが、ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結されたＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む、項ＡＡ～ＥＥのいずれかに記載の方法。

ＧＧ．ｒＡＡＶが、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される、項ＡＡ～ＦＦのいずれかに記載の方法。

ＨＨ．総用量の投与が、５分割用量で行われ、それぞれの分割用量が、１～５分の期間にわたって投与される、項ＡＡ～ＧＧのいずれかに記載の方法。

ＩＩ．５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される、項ＡＡ～ＨＨのいずれかに記載の方法。

ＪＪ．ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである、項ＡＡ～ＩＩのいずれかに記載の方法。

ＫＫ．ｒＡＡＶの少なくとも１分割用量が、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである、先行する項のいずれかに記載の方法。

ＬＬ．うっ血性心不全を有する患者を処置する方法であって、患者にｒＡＡＶベクターの少なくとも１用量を投与することを含み、ｒＡＡＶベクターが、ＡＡＶ２ｉ８であり、ＣＭＶプロモーター、表２Ａから選択される心特異的プロモーターまたはそのバリアント、あるいは表５Ａもしくは表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターまたはそのバリアントから選択されるプロモーターに機能的に連結されたホスファターゼ阻害剤１（Ｉ－１）をコードする核酸を含む、方法。

ＭＭ．Ｉ－１が、配列番号１のアミノ酸１～６５またはその機能的断片を含み、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）、項ＬＬに記載の方法。

ＮＮ．ホスファターゼ阻害剤をコードする核酸が、配列番号１の断片を含むＩ－１（Ｉ－１ｃ）の構成的に活性な断片をコードし、断片が、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１

～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７もしくは配列番号１のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）、項ＬＬ～ＭＭに記載の方法。

ＯＯ．心不全が、虚血、不整脈、心筋梗塞、異常な心臓収縮性、または異常なＣａ２＋代謝を含む、項ＬＬ～ＮＮのいずれかに記載の方法。

ＰＰ．投与が、患者の心臓の冠動脈の内腔の中にである、項ＬＬ～ＯＯのいずれかに記載の方法。

ＱＱ．少なくとも１用量が、２～５分割用量で投与される、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲である、項ＬＬ～ＰＰのいずれかに記載の方法。

ＲＲ．配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、配列番号１のアミノ酸３５のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられており、前記核酸配列が、ＣＭＶプロモーター、表２Ａから選択される心特異的プロモーターまたはそのバリアント、あるいは表５Ａもしくは表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターまたはそのバリアントのいずれかから選択されるプロモーターに作動可能に連結されている、ＡＡＶベクター。

ＳＳ．ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）、項ＲＲに記載のＡＡＶベクター。

ＴＴ．ＡＡＶが、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される、項ＲＲに記載のＡＡＶベクター。

ＵＵ．（ｉ）配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであって、配列番号１のアミノ酸３５のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられており（Ｔ３５Ｄ）、前記核酸配列が、表２Ａから選択される心特異的プロモーターまたはそのバリアント、あるいは表５Ａもしくは表１３Ａから選択される心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターまたはそのバリアントに作動可能に連結されている、ＡＡＶベクター、ならびに（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

ＶＶ．ＡＡＶベクターが、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択されるポリペプチドをコードする核酸配列を含み、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸で置き換えられている（Ｔ３５Ｄ）、項ＵＵに記載の医薬組成物。

ＷＷ．ＡＡＶが、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される、項ＵＵまたはＶＶに記載のＡＡＶベクター。

ＸＸ．ＡＡＶが、ＡＡＶ９またはＡＡＶ２ｉ８である、項４９に記載のＡＡＶベクター。

【０９５５】

本明細書に開示される技術の組成物および方法のすべての態様を、以下の番号付け項のいずれか１つまたは複数に定義することができる。

１．心不全を有する患者を処置する方法であって、

うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後少なくとも１２か月、

うっ血性心不全の分類の改善が存在する、方法。
２．分類が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、ミネソタＬＩＶＩＮＧ ＷＩＴＨ ＨＥＡＲＴ ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、カンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、または２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、項１に記載の方法。
３．ｒＡＡＶの投与後１２か月、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、項１または２に記載の方法。
４．ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、項１または２に記載の方法。
５．投与後１２か月、分類の少なくとも２レベルの改善が存在する、項１に記載の方法。
６．分類システムが、ＮＹＨＡであり、分類のレベルが、クラスＩ、クラスＩＩ、クラスＩＩＩ、およびクラスＩＶからなる群から選択される、項１～５のいずれかに記載の方法。
７．分類システムが、米国心臓病学会／米国心臓協会（ＡＣＣ／ＡＨＡ）補完病期分類システムであり、分類のレベルが、ステージＡ、ステージＢ、ステージＣ、ステージＤからなる群から選択される、項１～５のいずれかに記載の方法。
８．分類システムが、ＫＣＣＱであり、分類のレベルが、ＫＣＣＱの５０～１００のまずまず～極めて良好なスコア、０～４９の非常に不良～まずまずのスコア、７５～１００の良好～極めて良好なスコア、および０～７４の非常に不良～良好なスコアからなる群から選択されるＫＱＱＣ全体サマリースコア範囲である、項１～５のいずれかに記載の方法。
９．心筋症を有する患者を処置する方法であって、
患者の心臓細胞に、ホスファターゼ活性を阻害するホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質をコードする核酸配列を含むｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量を投与することを含み、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後少なくとも１２か月、患者におけるベースラインレベルからの少なくとも１つのパラメーターの改善が存在し、少なくとも１つのパラメーターが、駆出率（ＥＦ）、収縮終期容積（ＥＳＶ）、駆出率（ＥＦ）および内径短縮率（ＦＳ）から選択される心収縮性、拡張終期容積（ＤＶ）および収縮終期容積（ＥＳＶ）のいずれかから選択される心容積、６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、運動および最大ＶＯ２のいずれかから選択される機能基準、ＢＮＰレベル、プロ－ＢＮＰレベル、バイオマーカーレベルであって、トロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、または肝臓トランスアミナーゼの群から選択される、バイオマーカーレベル、患者報告結果（ＰＲＯ）、例えば、症状の低減、健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＯＬ）、または患者が知覚する健康状態、ならびに心不全に起因する死亡リスク、心不全症状に起因する入院の減少、または心不全に対する処置の治療的介入のいずれかの減少から本質的になる群から選択される、方法。
１０．投与後少なくとも１２か月、少なくとも２つのパラメーターの改善が存在する、項９に記載の方法。
１１．投与後少なくとも１２か月、少なくとも３つのパラメーターの改善が存在する、項１０に記載の方法。
１２．投与後少なくとも１２か月、少なくとも４つのパラメーターの改善が存在する、項１１に記載の方法。
１３．投与後少なくとも１２か月、少なくとも５つのパラメーターの改善が存在する、項１２に記載の方法。
１４．改善が、ベースラインからの駆出率の少なくとも５％もしくはそれよりも高い増加、ベースラインからの収縮終期容積の少なくとも１０％の減少もしくは少なくとも２０

ｍｌの減少、ベースラインからの６分間歩行試験の少なくとも５０メートルの増加、ベースラインからの血液におけるＢＮＰレベル（ｐｇ／ｍｌ）の少なくとも４０％の減少、ベースラインからの血液におけるプロ－ＢＮＰレベル（ｐｇ／ｍｌ）の少なくとも３５％の減少、同じバイオマーカーのベースラインレベルからのトロポニン、血清クレアチニン、シスタチン－Ｃ、もしくは肝臓トランスアミナーゼから選択されるバイオマーカーの少なくとも１０％の低下、ベースラインからの心筋酸素消費量（ＭＶＯ２）の少なくとも１．５ｍｌ／ｋｇ／分の増加、または改善されたＨＦ症状に起因する退院、もしくは対象における改善されたＨＦ症状に起因する変力物質、血管拡張薬、利尿薬のいずれかの使用の減少から選択される低下した介入のいずれかから選択される、項９に記載の方法。

１５．前記ｒＡＡＶベクター（the rAAV vector）が、ホスファターゼ阻害剤タンパク質に機能的に連結されたＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターをさらに含む、項１～１４に記載の方法。

１６．総用量が、以下：約２０分～約３０分の期間にわたる投与方法、一連の分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与される投与方法、一連の５分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与され、５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される投与方法のいずれかとして投与される、項１～１５のいずれかに記載の方法。

１７．前記ｒＡＡＶベクター（there rAAV vector）が、肝臓を標的解除するカプシドを含む、項１～１６のいずれかに記載の方法。

１８．ｒＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ２ｉ８、ｒｈ１０、ＡＡＶ２．５およびＡＡＶ２Ｇ９からなる群から選択される、項１～１７のいずれかに記載の方法。

１９．前記ｒＡＡＶベクターが、ＡＡＶ２ｉ８である、項１～１８のいずれかに記載の方法。

２０．ｒＡＡＶの少なくとも１総用量が、10^{13}ｖｇ、3×10^{13}ｖｇ、10^{14}ｖｇ、3×10^{14}ｖｇ、または10^{15}ｖｇである、項１～１９のいずれかに記載の方法。

２１．ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）タンパク質が、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）である、項１～２０のいずれかに記載の方法。

２２．ｓＩ－１ｃが、（ａ）配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～５４を含むポリペプチドであって、配列番号１が、アミノ酸７０、６７、６６、６５、または６１、または５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～５４またはその機能的断片を含むポリペプチドであって、機能的断片が、配列番号１のアミノ酸残基１～５４と少なくとも８５％の配列同一性を有するか、またはアミノ酸７０、６７、６６、６５、もしくは６１、もしくは５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチドのいずれかから選択される、項２１に記載の方法。

２３．ｒＡＡＶゲノムが、配列番号４１３～４４１からなる群から選択される核酸配列を含む、項１～２１のいずれかに記載の方法。

２４．Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列が、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列から選択される、項２１に記載の方法。

２５．Ｉ－１タンパク質をコードする核酸配列が、コドン最適化された核酸配列である

、項１～２４のいずれかに記載の方法。
２６．Ｉ－１タンパク質をコードする核酸配列が、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、項１～２５のいずれかに記載の方法。
２７．心筋症を有する対象が、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する、項１～２６のいずれかに記載の方法。
２８．心筋症を有する対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、項１～２７のいずれかに記載の方法。
２９．先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、項２９に記載の方法。
３０．心筋症を有する対象が、虚血性心筋症を有する、項１～２９のいずれかに記載の方法。
３１．心筋症を有する対象が、心不全を有する、項１～３０のいずれかに記載の方法。
３２．心不全を有する対象が、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩに等しいか、またはそれよりも上の分類を有する、項３１に記載の方法。
３３．心不全を有する対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する、項３０～３２のいずれかに記載の方法。
３４．心筋症を有する対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）、または保たれた駆出率（ＨＦｐＥＦ）を有する、項１～３３のいずれかに記載の方法。
３５．ｒＡＡＶの投与後少なくとも１２か月、ベースラインレベルからの心不全の分類の少なくとも１クラスの改善が存在し、心不全の分類が、以下：（ａ）米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、２０１６年欧州心臓病学会ガイドライン（ＥＳＣＧ

）、日本心不全学会（ＪＨＦＳ）ガイドライン、日本循環器学会（ＪＣＳ）ガイドライン、もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システム、またはその同等物、あるいは（ｂ）ミネソタＬＩＶＩＮＧ　ＷＩＴＨ　ＨＥＡＲＴ　ＦＡＩＬＵＲＥ（登録商標）質問票（ＭＬＨＦＱ）、またはカンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）、慢性心不全質問票（ＣＨＦＱ）、重度心不全のためのクオリティオブライフ質問票（ＱＬＱ－ＳＨＦ）、左室機能障害（ＬＶＤ－３６）質問票、および左室疾患質問票（ＬＶＤＱ）のいずれかからなる群から選択される健康に関連するクオリティオブライフ（ＨＲＱＬ）質問票の少なくとも１つによって評価される、項１～３４のいずれかに記載の方法。

３６．ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、項３５に記載の方法。

３７．ｒＡＡＶの投与後１２か月以内に、少なくとも２レベルの分類の改善が存在する、項３５に記載の方法。

３８．ベースラインレベルからのクオリティオブライフＭＬＷＨＦＱまたはＫＣＣＱの少なくとも１０ポイントの減少の改善が存在する、項３５に記載の方法。

３９．対象が、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の投与と同時に、および／またはその前に、および／またはその後に血管拡張薬を投与される、項１～３８のいずれかに記載の方法。

４０．対象が、ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の投与と同時に、またはその前に、またはその後に免疫モジュレーターを投与される、項１～３９のいずれかに記載の方法。

４１．配列番号３８５～４１２のいずれかから選択されるコドン最適化されたＩ－１ｃ核酸配列、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含むＡＡＶベクターを含む医薬組成物。

４２．コドン最適化された核酸配列が、ＣＭＶプロモーターまたは合成プロモーターに作動可能に連結されている、項４１に記載の医薬組成物。

４３．配列番号４１～４２からなる群から選択される核酸配列、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列を含む、項４１に記載の医薬組成物。

４４．項１～４０のいずれかに記載の方法における使用のための、項４１～４３のいずれかに記載の医薬組成物。

４５．表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターもしくはそのバリアント、または心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターのいずれかから選択されるプロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター。

４６．心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターが、表５Ａもしくは表１３Ａ、またはそのバリアントから選択される、項４５に記載のＡＡＶベクター。

４７．ＡＡＶが、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される、項４５～４６のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

４８．ＡＡＶが、肝臓を標的解除するカプシドを含む、項４５～４７のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

４９．ＡＡＶが、ＡＡＶ２ｉ８である、項４５～４８のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５０．ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドが、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）である、項４５～４９のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５１．Ｉ－１ｃが、（ａ）配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～６５を含むポリペプチドまたはその機能的等価体、（ｂ）配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドであって、ポリペプチドが、残基７０、６７、６６、６５、または６１、ま

たは５４から選択されるアミノ酸のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチド、または配列番号１のアミノ酸残基１～６５と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体、あるいは（ｄ）配列番号５０７もしくは５２７～５３２、または配列番号５０７もしくは５２７～５３２のいずれかのアミノ酸残基と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体のいずれかから選択されるポリペプチドのいずれかから選択される、項４５～５０のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５２．Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列が、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列から選択される、項４５～５１のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５３．ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸１～５４、配列番号１のアミノ酸１～６１、配列番号１のアミノ酸１～６５、配列番号１のアミノ酸１～６６、配列番号１のアミノ酸１～６７、もしくは配列番号２のアミノ酸１～７７、またはその機能的バリアントから選択され、配列番号１の３５位のトレオニンが、アスパラギン酸（Ｔ３５Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、項４５～５２のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５４．Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列が、コドン最適化された核酸配列である、項４５～５０のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５５．コドン最適化された核酸配列が、配列番号１の野生型参照配列またはその断片と比較して、低下したＣｐＧ含有量または低下したＣｐＧアイランドを有する、項４５～５４のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５６．Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２と少なくとも８０％の配列同一性の核酸配列のいずれかから選択されるコドン最適化された核酸配列である、項４５～５４のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５７．心特異的プロモーターまたは筋肉特異的プロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の５’に位置する少なくとも１つのＩＴＲをさらに含む、項４５～５６のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５８．心特異的プロモーターまたは筋肉特異的プロモーターに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列に隣接する少なくとも２つのＩＴＲをさらに含む、項４５～５７のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

５９．ＩＴＲ配列が、配列番号７０～７８、または配列番号７０～７８と少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸のいずれか１つまたは複数から選択される、項４５～５８のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

６０．リバースポリＡ配列または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントをさらに含み、リバースポリＡ配列または二本鎖終結エレメントが、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の３’に位置する、項４５～５９のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

６１．リバースポリＡ配列または二本鎖ＲＮＡ終結エレメントが、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の３’および右側ＩＴＲの５’の間に位置する、項６０に記載のＡＡＶベクター。

６２．核酸配列が、少なくとも１つの免疫モジュレーターをコードする核酸配列をさらに含むことができる、項４５～６１のいずれかに記載のＡＡＶベクター。

６３．組成物または溶液中に存在し、免疫モジュレーターをさらに含む、項４５～６１のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
６４．ＳＶ４０ポリＡ（配列番号３３４）、ＨＧＨポリＡ（配列番号６６）、配列番号２８４～２８７、配列番号３３１～３３５のいずれかから選択されるポリＡ配列をさらに含み、ポリＡ配列が、ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列の３’に位置する、項４５～６３のいずれかに記載のＡＡＶベクター。
６５．（ｉ）（ａ）表２Ａから選択される心特異的プロモーターもしくはそのバリアント、（ｂ）心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター、または（ｃ）心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターもしくはそのバリアントのいずれか１つに作動可能に連結されたホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、ならびに（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。
６６．心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターが、表５Ａもしくは表１３Ａ、またはその少なくとも８５％の配列同一性を有するバリアントから選択される、項６５に記載の医薬組成物。
６７．ＡＡＶが、アデノ随伴ウイルス－１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ２ｉ８からなる群から選択される、項６５～６６に記載の医薬組成物。
６８．ＡＡＶが、肝臓を標的解除するカプシドを含む、項６５～６７に記載の医薬組成物。
６９．ＡＡＶが、ＡＡＶ２ｉ８である、項６５～６８のいずれかに記載の医薬組成物。
７０．ＡＡＶが、配列番号４１３～４４０、または配列番号４１３～４４０から選択される配列と少なくとも８０％の配列同一性の核酸配列からなる群から選択される核酸を含み、配列番号４１３～４４０に示される（seet forth）核酸が、配列番号３３０のＣＭＶプロモーターを含み、配列番号３３０のＣＭＶプロモーターが、（ａ）表２Ａもしくはその少なくとも８５％の配列同一性を有するバリアントから選択される心特異的プロモーター、（ｂ）心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーター（例えば、心筋および骨格筋において活性な筋肉特異的プロモーターは、表５Ａもしくは表１３Ａ、またはその少なくとも８５％の配列同一性を有するバリアントから選択される）、または（ｃ）心組織特異的エンハンサーが存在する場合に任意のプロモーターもしくはそのバリアントのいずれかによって置き換えられている、項６５～６９のいずれかに記載の医薬組成物。
７１．血管拡張薬をさらに含む、項６４～６９のいずれかに記載の医薬組成物。
７２．免疫モジュレーターをさらに含む、項６４～６９のいずれかに記載の医薬組成物。
７３．ホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドが、構成的に活性なタンパク質（Ｉ－１ｃ）である、項６５に記載の医薬組成物。
７４．Ｉ－１ｃが、（ａ）配列番号１の少なくともアミノ酸残基１～６５を含むポリペプチドまたはその機能的等価体、（ｂ）配列番号１の少なくともアミノ酸１～５４を含むポリペプチドであって、ポリペプチドが、アミノ酸７０、６７、６６、６５、または６１、または５４のＣ末端でトランケートされ、３５位にアスパラギン酸が存在する（Ｔ３５Ｄ）、ポリペプチド、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチド、または配列番号１のアミノ酸残基１～６５と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体、あるいは（ｄ）配列番号５０７もしくは５２７～５３２、または配列番号５０７もしくは５２７～５３２のいずれかのアミノ酸残基と少なくとも８５％の配列同一性を有するその機能的等価体のいずれかから選択されるポリペプチドのいずれかから選択される、項７３に記載の医薬組成物。
７５．Ｉ－１ポリペプチドをコードする核酸配列が、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、Ｔではないアミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５

位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）のいずれかから選択される酸性アミノ酸で置き換えられている、核酸配列、（ｃ）配列番号１のアミノ酸１～６５を含むポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号１の３５位のトレオニン（Ｔ）が、アスパラギン酸（Ｄ）、またはアスパラギン酸の保存的アミノ酸で置き換えられている、核酸配列から選択される、項６５～７４のいずれかに記載の医薬組成物。

７６．Ｉ－１タンパク質をコードする核酸配列が、コドン最適化された核酸配列である、項６５～７４５のいずれかに記載の医薬組成物。

７７．コドン最適化された核酸配列が、参照野生型配列と比較して、低下したＣｐＧ含有量を有する、項７６に記載の医薬組成物。

７８．Ｉ－１ポリペプチドをコードするコドン最適化された核酸配列が、配列番号３８５～４１２、または配列番号３８５～４１２のいずれかから選択される配列と少なくとも８０％の配列同一性を有する核酸配列のいずれかから選択される、項６５～７７のいずれかに記載の医薬組成物。

７９．心筋症を有する対象の処置のための医薬組成物の製造のための、項４５～６４のいずれかに記載のＡＡＶベクターの使用。

８０．心筋症を有する対象が、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する、項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。

８１．心筋症を有する対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、項７９～８０のいずれかに記載のＡＡＶベクターの使用。

８２．先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、項８１に記載のＡＡＶベクターの使用。

８３．心筋症を有する対象が、虚血性心筋症を有する、項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。

８４．心筋症を有する対象が、心不全を有する、項７９に記載のＡＡＶベクターの使用。

８５．心不全を有する対象が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく心不全

の分類を有する、項８４に記載のＡＡＶベクターの使用。
８６．心不全を有する対象が、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩ、またはクラスＩＩＩよりも上の分類を有する、項８５に記載のＡＡＶベクターの使用。
８７．心不全に関連する状態または疾患を有する対象の処置のための医薬組成物の製造のための、項４５～６４のいずれか一項に記載のＡＡＶベクターの使用。
８８．対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する、項８７に記載の使用。
８９．分類が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、項８７に記載の使用。
９０．対象が、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する、項８７に記載の使用。
９１．対象が、虚血性心不全または虚血性心筋症を有する、項８７に記載の使用。
９２．対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する、項７９または８７のいずれかに記載の使用。
９３．項４５～６４のいずれかに記載のＡＡＶベクターを含む細胞。
９４．細胞が、心細胞または筋細胞である、項９３に記載の細胞。
９５．細胞が、細胞培養物中にあるか、または対象中に存在する細胞である、項９３～９４のいずれかに記載の細胞。
９６．心筋症を有する対象の処置における使用のための、項４５～６４に記載のＡＡＶベクター、項６５～７８のいずれかに記載の医薬製剤、または項９３～９５のいずれかに記載の細胞。
９７．心筋症を有する対象が、非虚血性心不全および／または非虚血性心筋症を有する、項９６に記載のＡＡＶベクター。
９８．心筋症を有する対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、項９６に記載のＡＡＶベクター。
９９．先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、項９８に記載のＡＡＶベクター。
１００．心筋症を有する対象が、虚血性心筋症を有する、項９６に記載のＡＡＶベクタ

ー。
１０１．心筋症を有する対象が、心不全を有する、項９６に記載のＡＡＶベクター。
１０２．心不全を有する対象が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく心不全の分類を有する、項１０１に記載のＡＡＶベクター。
１０３．心不全を有する対象が、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類システムのクラスＩＩＩ、またはクラスＩＩＩよりも上の分類を有する、項１０２に記載のＡＡＶベクター。
１０４．心不全を有する患者の処置における使用のための、項４５～６４に記載のＡＡＶベクター、項６５～７８のいずれかに記載の医薬製剤、または項９３～９５のいずれかに記載の細胞。
１０５．対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類を有する、項１０４に記載のＡＡＶベクター。
１０６．分類が、米国心臓協会（ＡＨＡ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）またはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）によって使用される分類システムに基づく、項１０５に記載のＡＡＶベクター。
１０７．対象が、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する、項１０４に記載のＡＡＶベクター。
１０８．対象が、虚血性心不全または虚血性心筋症を有する、項１０４に記載のＡＡＶベクター。
１０９．対象が、低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する、項９６または１０４に記載のＡＡＶベクター。
１１０．心不全を有する対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する、項１０４に記載のＡＡＶベクター。
１１１．対象が、（ａ）非虚血性心不全、（ｂ）非虚血性心筋症、（ｃ）米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、またはその同等の分類システムによって使用される分類システムに基づくうっ血性心不全（ＣＨＦ）の分類、あるいは（ｄ）低下した駆出率（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）の１つまたは複数を有する、項１０４に記載のＡＡＶベクター。
１１２．心筋症を有する対象においてホスファターゼ阻害剤（Ｉ－１）ポリペプチドを発現させる方法であって、心筋症を有する対象に、項４５～６３のいずれか一項に記載のＡＡＶベクターの少なくとも１用量を導入することを含み、心筋症を有する対象が、心不全の分類を有し、ｒＡＡＶの少なくとも１用量が、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲から選択され、投与後少なくとも１２か月、心不全の分類の改善が存在する、方法。
１１３．心不全の分類が、米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、またはその同等の分類システムによって使用される分類システムに基づく、項１１２に記載の方法。
１１４．ｒＡＡＶの投与後１２か月、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、項１１２に記載の方法。
１１５．ｒＡＡＶの投与後６か月以内に、少なくとも１レベルの分類の改善が存在する、項１１２に記載の方法。
１１６．投与後１２か月、米国心臓協会（ＡＨ）、米国心臓病学会（ＡＣＣ）、もしくはニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）、またはその同等の分類システムのいずれか１つま

たは複数における分類の少なくとも２レベルの改善が存在する、項１１２に記載の方法。
１１７．ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の投与と同時に、またはその前に、またはその後に免疫モジュレーターを投与することをさらに含む、項１１２～１１６のいずれかに記載の方法。
１１８．ｒＡＡＶベクターの少なくとも１総用量の投与と同時に、および／またはその前に、および／またはその後に血管拡張薬を投与することをさらに含む、項１１２～１１６のいずれかに記載の方法。
１１９．対象が、非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する、項１１２～１１８のいずれかに記載の方法。
１２０．非虚血性心不全または非虚血性心筋症を有する対象が、先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する、項１１２～１１９のいずれかに記載の方法。
１２１．先天性心筋症、または心徴候を有する遺伝性障害を有する対象が、不整脈原性右室心筋症、家族性心房粘液腫、一次孔心房中隔欠損、静脈洞型心房中隔欠損症、バース症候群、筋ジストロフィー、バージャー病、心脳筋症、染色体１ｐ３６欠失症候群、先天性全身性リポジストロフィー４型、先天性心ブロック、拡張型心筋症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）、ファブリー病、家族性心房細動、家族性拡張型心筋症、家族性肥大型心筋症、家族性進行性心伝導障害、家族性胸部大動脈瘤および大動脈解離、線維筋性異形成、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、糖原病（２、３または４型）、ヒス束頻拍、ハーラー症候群、左心低形成症候群、乳児組織球様心筋症、頭蓋内動静脈奇形、イソブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ欠損症、カリクレイン高血圧症、川崎病、カーンズ－セイヤー症候群、左室緻密化障害、肢帯型筋ジストロフィー（１Ｂ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｍ、２Ｃ、２Ｄ型）、限局型全身性強皮症、ＱＴ延長症候群１、リンパ浮腫および大脳動静脈異常、リンパ球性血管炎、小頭症－心筋症；ミトコンドリア脳筋症乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作、ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症、筋緊張性ジストロフィー１型、新生児脳卒中、ヌーナン症候群１、２、３、４、５および６、周産期心筋症、ピータースプラス症候群、ＰＧＭ１－ＣＤＧ、ＰＨＡＣＥ症候群、ホスホランバンＡｒｇ１４欠失、体位性起立性頻拍症候群、原発性カルニチン欠損症、進行性家族性心ブロック（１Ａ、１Ｂおよび２型）、偽性低アルドステロン症２型、肺動脈性肺高血圧症、無傷の心室中隔を伴う肺動脈閉鎖症、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖症、肺動脈弁狭窄症、肺静脈狭窄症、肺動脈狭窄症、腎欠如性高血圧症、弁上肺動脈狭窄を伴う網膜細動脈瘤、右心室形成不全、サルコイドーシス、センガー症候群、内臓逆位、不整脈性突然死症候群、大動脈弁上狭窄症、スワイヤー症候群、ＴＡＮＧＯ２関連代謝性脳症および不整脈、ＴＡＲＰ症候群、ファロー四徴症、チモシー症候群、三尖弁閉鎖症、ビシ症候群、ＶＬＣＡＤ欠損症ならびにウィリアムズ症候群からなる群から選択される疾患または障害を有する、項１２０に記載の方法。
１２２．心不全を有する対象が、虚血性心筋症である、項１１１～１１７のいずれかに記載の方法。
１２３．心不全を有する対象が、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、左室リモデリング、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）、特発性拡張型心筋症（ＩＤＣＭ）を含む拡張型心筋症（ＤＣＭ）、冠動脈疾患、虚血、不整脈、心筋梗塞（ＭＩ）、異常な心臓収縮性、急性（非代償性）心不全（ＡＨＦ）、異常なＣａ２＋代謝、心筋虚血、アテローム性動脈硬化症、心筋症、特発性心筋症、遺伝性障害誘発性心筋症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、感染性心筋炎、薬物または毒物誘発性の筋肉異常、過敏性心筋炎、自己免疫性心内膜炎および先天性心臓疾患、ならびに肺性心高血圧症のいずれかから選択される心血管疾患または心臓疾患を有する、項１１１～１２０のいずれかに記載の方法。
１２４．対象が、低下した駆出率（ejaculation fraction）（ｒＥＦまたはＨＦｒＥＦ）を有する、項１１１～１２２のいずれかに記載の方法。
１２５．心不全が、虚血、不整脈、心筋梗塞、異常な心臓収縮性、または異常なＣａ２＋代謝を含む、項１１１～１２３のいずれかに記載の方法。
１２６．投与が、患者の心臓の冠動脈の内腔の中にである、項１１１～１２４のいずれ

かに記載の方法。
１２７．少なくとも１用量が、１用量または２～５分割用量で投与される、約10^{13}ｖｇ～約10^{15}ｖｇの総用量範囲である、項１１１～１２５のいずれかに記載の方法。
１２８．総用量が、以下：（ａ）約２０分～約３０分の期間にわたる投与方法、（ｂ）一連の分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与される投与方法、（ｃ）一連の５分割用量で投与され、それぞれの分割用量が、約１分～約５分の期間にわたって投与され、５分割用量が、約２０分～約３０分の期間にわたって投与される投与方法のいずれかとして投与される、項１１１～１２６のいずれかに記載の方法。
定義および全般的論点
【０９５６】
本発明の様々な実施形態の実行および使用が下記で詳細に論じられるが、本発明が、多種多様な特異的な状況で具現化され得る多くの適用可能な発明概念を提供することを理解されたい。本明細書で論じられる特定の実施形態は、本発明を行うためのおよび使用するための特定の方法の説明に役立つものに過ぎず、本発明の範囲を定めるものではない。
【０９５７】
本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語が下記で定義される。本明細書で定義される用語は、本発明に関連する分野の当業者によって一般に理解されている通りの意味を有する。「ａ（１つの）」、「ａｎ（１つの）」および「ｔｈｅ（その）」などの用語は、単数の実体のみを指すように意図されたものではなく、具体例が説明に使用され得る一般的なクラスを含む。本明細書における用語法は、本発明の特定の実施形態を説明するために使用されるが、それらの利用は、特許請求の範囲で概要が述べられている場合を除き、本発明の範囲を定めない。
【０９５８】
本明細書における本発明の背景についての論述は、本発明の状況を説明するために含まれる。これを、言及される物質のいずれかが、請求項のいずれかについての優先日の時点でいずれかの国において公開されていた、公知であった、または共通の一般知識の一部であったことを認めることと解釈すべきでない。
【０９５９】
本開示を通して、様々な公表文献、特許および公開特許明細書が、識別引用により参照される。本明細書に引用されるすべての文献は、これによりそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、本明細書で具体的に言及されるそのような文献の教示またはセクションは、参照により本明細書に組み込まれる。
【０９６０】
本発明の実施は、別段の指示がない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えＤＮＡ、および免疫学の従来の技法を利用することになり、これらの技法は、当技術分野の技能の範囲内である。そのような技法は、文献で十分に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)；Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984)；米国特許第４，６８３，１９５号；Nucleic Acid Hybridization (Harries and Higgins eds. 1984)；Transcription and Translation (Hames and Higgins eds. 1984)；Culture of Animal Cells (Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)；Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986)；Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)；the series, Methods in Enzymology (Abelson and Simon, eds. -in-chief, Academic Press, Inc., New York)、特に、Vols.154および155 (Wu et al. eds.) ならびにVol. 185, "Gene Expression Technology" (Goeddel,

ed.)；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)；Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)；Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986)；およびManipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照されたい。

【０９６１】

用語「筋肉」は、当業者に十分理解されている。好ましくは、筋肉は、骨格筋（横隔膜を含む）または心筋である。本発明のプロモーターは、骨格筋および／または心筋において活性であり得る。好ましくは、筋肉は、脊椎動物の、より好ましくは哺乳動物の、さらにいっそう好ましくはヒト対象の筋肉である。好ましくは、筋肉は、横紋筋である。

【０９６２】

一部の場合には、プロモーターは、心臓特異的である。本明細書で使用される場合、心臓特異的は、プロモーターに心組織への選好性があることを意味する。そのようなプロモーターは、心臓細胞または心筋細胞への全般的な選好性があるのであれば、他の筋肉を含む、他の組織においても発現され得る。

【０９６３】

用語「筋肉細胞」または「筋細胞」は、本＿＿では、筋肉（筋肉組織）に見られる細胞、または筋肉組織に由来する細胞に関する。筋肉細胞は、初代細胞または細胞株（例えば、Ｃ２Ｃ１２もしくはＨ２Ｋ細胞（骨格筋細胞株）またはＨ９Ｃ２細胞（心細胞株））であり得る。筋肉細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば、筋肉組織内）のものであることもあり、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ（例えば、細胞培養下）のものであることもある。筋肉組織に見られるような筋細胞は、筋形成として公知のプロセスで筋芽細胞から成長して筋肉を形成する、概して長い管状の細胞である。本明細書で使用される場合の筋肉細胞または筋細胞という用語は、骨格筋からの筋細胞、および心筋からの筋細胞（心筋細胞）を含む。本明細書で開示されるプロモーターは、骨格筋細胞および／または心筋細胞において活性であり得る。

【０９６４】

用語「シス調節エレメント」または「ＣＲＥ」は、当業者に周知の用語であり、隣接遺伝子（すなわち、ｉｎ　ｃｉｓ）の転写を調節またはモジュレートすることができる核酸配列、例えば、エンハンサー、プロモーター、インシュレーターまたはサイレンサーを意味する。ＣＲＥは、それらが調節する遺伝子の近傍に見られる。ＣＲＥは、概して、ＴＦに結合することにより遺伝子転写を調節する、すなわち、それらはＴＦＢＳを含む。単一のＴＦが多くのＣＲＥに結合することができ、それ故、多くの遺伝子の発現（多面発現）を制御することができる。ＣＲＥは、常にではないが通常は、それらが調節する遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の上流側に位置する。これに関連して「エンハンサー」は、それらが作動可能に会合している遺伝子の転写を増強（すなわち、上方調節）するＣＲＥであり、それらが調節する遺伝子のイントロンの上流側、イントロンの下流側、およびさらにはイントロン内に見られ得る。複数のエンハンサーが、１つの遺伝子の転写を調節するために協調的に作用し得る。これに関連して「サイレンサー」は、遺伝子の転写を防止または下方調節するように作用する、リプレッサーと呼ばれるＴＦに結合するＣＲＥに関する。用語「サイレンサー」は、メッセンジャーＲＮＡの３’非翻訳領域内の、そのｍＲＮＡ分子の翻訳を抑制するタンパク質に結合する領域を指すこともあるが、この用法は、ＣＲＥを説明する上でのその使用とは明確に異なる。一般に、本発明のＣＲＥは、筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的エンハンサーエレメント（多くの場合、筋肉特異的、心筋特異的もしくは骨格筋特異的ＣＲＥ、または筋肉特異的、心筋特異的もしくは骨格筋特異的ＣＲＥエンハンサーなどと呼ばれる）である。これに関連して、ＣＲＥは、転写開始部位（ＴＳＳ）から２５００ヌクレオチドまたはそれ未満、より好ましくはＴＳＳから２０００ヌクレオチドまたはそれ未満、より好ましくはＴＳＳから１５００ヌクレオチドま

たはそれ未満、好適にはＴＳＳから１０００、７５０、５００、２５０、２００、１５０もしくは１００ヌクレオチドまたはそれ未満に位置することが好ましい。本発明のＣＲＥは、好ましくは、長さが比較的短く、好ましくは、長さ５００ヌクレオチドまたはそれ未満であり、例えば、それらは、長さ４００、３００、２００、１７５、１５０、９０、８０、７０、６０もしくは５０ヌクレオチドまたはそれ未満であり得る。本発明のＣＲＥは、概して、最小プロモーターまたは近位プロモーターであり得る作動可能に連結されたプロモーターエレメントと組み合わせて備えられており、本発明のＣＲＥは、プロモーターエレメントの筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的活性を増強する。本明細書で開示されるＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントの組合せのいずれにおいても、述べられるＣＲＥおよびプロモーターエレメントの一部またはすべては、好適には、プロモーター内で互いに隣接した（すなわち、いずれの介在するＣＲＥも、他の調節エレメントもない）位置にあり得る。ＣＲＥは、隣接していることもあり、または隣接していないこともある（すなわち、それらは、互いに直接隣接した位置にあることもあり、またはそれらは、スペーサーもしくは他の配列によって隔てられていることもある）。ＣＲＥは、いずれの順序であってもよい。一部の好ましい実施形態では、ＣＲＥまたはそれらの機能的バリアントは、述べられる順序で備えられており、互いに隣接している。例えば、合成筋肉特異的調節核酸は、ＣＲＥ００３３のすぐ上流側にＣＲＥ０１０７を含むことなどがある。一部の実施形態では、ＣＲＥの一部またはすべてが隣接していることが好ましい。

【０９６５】

用語「シス調節モジュール」または「ＣＲＭ」は、通常は２つまたはそれより多くのＣＲＥを含む機能的調節核酸モジュールを意味し、本発明では、ＣＲＥは、概して、心特異的エンハンサー、例えば、心筋特異的または骨格筋特異的エンハンサーであり、それ故、ＣＲＭは、合成心特異的調節核酸である。ＣＲＭは、複数の心特異的ＣＲＥを含み得る。好適には、ＣＲＭに含まれるＣＲＥのうちの少なくとも１つは、配列番号１９～２４、２７、２８によるＣＲＥ、またはその機能的バリアントである。概して、ＣＲＭ内の複数のＣＲＥは、一緒に（例えば、相加的にまたは相乗的に）作用して、ＣＲＭを含むプロモーターが作動可能に会合している遺伝子の転写を増強する。ＣＲＭ内のＣＲＥをシャフリングする（すなわち、順序を変更する）、それらを逆にする（すなわち、方向性を逆転する）、およびそれらの間隔を変更する、相当な余地がある。したがって、本発明のＣＲＭの機能的バリアントは、参照されるＣＲＭの、それらの中のＣＲＥがシャフリングされた、および／もしくは逆にされた、ならびに／またはＣＲＥ間の間隔が変更されたバリアントを、とりわけ含む。タンデムプロモーターの場合、ＣＲＭは、プロモーターエレメントと、さらなるプロモーターエレメントに作動可能に連結されている１つまたは複数のＣＲＥとの組合せを記述するために使用され得る。

【０９６６】

例えば、タンデムプロモーターＳＰ０２６８では、ＣＲＥ　ＣＲＥ００３５とプロモーターエレメントＣＲＥ００１０の組合せをＣＲＭと考えることができる。

【０９６７】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という表現は、転写が起こるために必要とされる、すなわち転写を開始する、転写される核酸配列の上流側に一般に位置するＤＮＡの領域を指す。プロモーターは、それらの制御下にあるコード配列の転写の適切な活性化または抑制を可能にする。プロモーターは、複数のＴＦにより認識され結合される、特異的な配列を概して含有する。ＴＦは、プロモーター配列に結合し、その結果、遺伝子のコード領域からＲＮＡを合成する酵素であるＲＮＡポリメラーゼが動員されることになる。多くの多様なプロモーターが当技術分野において公知である。一部の場合には、用語「プロモーター」または「複合プロモーター」は、本明細書では、プロモーターと、追加の調節エレメント、例えば、転写開始部位（ＴＳＳ）、例えば５’ＵＴＲならびにまたは５’ＵＴＲおよびイントロン、のすぐ下流側に位置する調節配列との組合せを指すために使用される。ＴＳＳの下流側のそのような配列は、転写および／または翻訳段階での発現の調節に寄与し得る。一部の場合には、用語「プロモーター」または「複合プロモーター」は

、本明細書では、本明細書中の他の箇所で定義される通りの「タンデムプロモーター」を指すために使用される。

【０９６８】

用語「合成プロモーター」は、本明細書で使用される場合、自然界に存在しないプロモーターに関する。これに関連して、それは、最小（またはコア）プロモーターまたは心特異的近位プロモーター（プロモーターエレメント）に作動可能に連結された本発明のＣＲＥおよび／またはＣＲＭを概して含む。本発明のＣＲＥおよび／またはＣＲＭは、合成プロモーターに作動可能に連結された遺伝子の心特異的転写を増強するように機能する。合成プロモーターの部分は、天然に存在する（例えば、最小プロモーター、またはプロモーター内の１つもしくは複数のＣＲＥである）ことがあるが、実体としての合成プロモーターは、天然に存在しない。あるいは、合成プロモーターは、自然界に存在するプロモーターの、より短いトランケートされたバージョンであり得る。

【０９６９】

本明細書で使用される場合、「最小プロモーター」（「コアプロモーター」としても公知）は、単独では不活性または主として不活性であるが他の転写調節エレメントと組み合わせられると転写を媒介することができる、概して短いＤＮＡセグメントを指す。最小プロモーター配列は、原核生物遺伝子および真核生物遺伝子を含む、様々な異なる供給源から得ることができる。最小プロモーターの例としては、ドーパミンベータ－ヒドロキシラーゼ遺伝子ミニマムプロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期遺伝子ミニマムプロモーター（ＣＭＶ－ＭＰ）、およびヘルペスチミジンキナーゼ最小プロモーター（ＭｉｎＴＫ）が挙げられる。最小プロモーターは、概して、転写開始部位（ＴＳＳ）および直上流側のエレメント、ＲＮＡポリメラーゼＩＩの結合部位、ならびに一般的な転写因子結合部位（多くの場合、ＴＡＴＡボックス）を含む。最小プロモーターは、ＴＳＳの下流側のいくつかのエレメントも含み得るが、これらには、追加の調節エレメントがないときにはほとんど機能性がない。

【０９７０】

本明細書で使用される場合、「近位プロモーター」は、少なくともいくつかの追加の調節配列、典型的には、主要な調節エレメントを含有する傾向がある遺伝子の上流側の近位配列を加えた最小プロモーターに関する。それは、多くの場合、ＴＳＳの上流側おおよそ２５０塩基対にわたるものであり、特定のＴＦＢＳを含む。近位プロモーターはまた、ＴＳＳの下流側に１つまたは複数の調節エレメント、例えば、ＵＴＲまたはイントロンを含み得る。この場合、近位プロモーターは、好適には、天然に存在する心特異的近位プロモーターの、より短いトランケートされたバージョンであり得る。本発明の近位プロモーターを、本発明の１つまたは複数のＣＲＥまたはＣＲＭと組み合わせることができる。しかし、近位プロモーターは、合成のものであることもある。

【０９７１】

本明細書で使用される場合、「プロモーターエレメント」は、上記で定義された通りの最小プロモーターまたは近位プロモーターのどちらかを指す。本発明に関して、プロモーターエレメントは、本発明の合成心特異的プロモーターを提供するために１つまたは複数のＣＲＥと組み合わせられ得る。

【０９７２】

本発明に関して、ＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメント、プロモーターまたは他の調節核酸の「機能的バリアント」は、参照配列と、例えば、心特異的ＣＲＥ、心特異的ＣＲＭまたは心特異的プロモーターと、同様に機能する能力を保持する、参照配列のバリアントである。そのような機能的バリアントの代替用語としては、「生物学的等価体」または「等価体」が挙げられる。

【０９７３】

所与のＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターまたは他の調節配列の、心特異的エンハンサーとして機能する能力が、その配列の、参照配列に結合する同じ心特異的ＴＦに結合する能力によって大きく左右されることは、理解されるであろう。したがって、ほとんどの場合、

ＣＲＥまたはＣＲＭの機能的バリアントは、参照ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターと同じＴＦの大部分またはすべてについてのＴＦＢＳを含有することになる。機能的バリアントのＴＦＢＳが、参照ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターと同じ相対位置（すなわち、順序および一般位置）にあることは、必須ではないが、好ましい。機能的バリアントのＴＦＢＳが、参照配列と同じ方向性であることも、必須ではないが、好ましい（ＴＦＢＳは、一部の場合には逆の方向性で、例えば、参照配列中の配列に対して逆相補体として存在し得ることに、留意されたい）。機能的バリアントのＴＦＢＳが、参照配列と同じ鎖上にあることも、必須ではないが、好ましい。したがって、好ましい実施形態では、機能的バリアントは、同じＴＦのＴＦＢＳを、参照配列と同じ順序で、同じ位置に、同じ方向性で、同じ鎖上に含む。ＴＦＢＳ間にある配列（一部の場合にはスペーサー配列などと呼ばれる）がＣＲＥまたはＣＲＭの機能にとってあまり重要でないことも理解されるであろう。そのような配列を通常は大幅に変えることができ、それらの長さを変更することができる。しかし、好ましい実施形態では、間隔（すなわち、隣接したＴＦＢＳ間の距離）は、機能的バリアントでは、それが参照配列内にある場合と実質的に同じである（例えば、それは、２０％より大きく異ならず、好ましくは１０％より大きく異ならず、より好ましくは、それは、ほぼ同じである）。一部の場合には、ＣＲＥの機能的バリアントが逆の方向性で存在し得ること、例えば、それが上記のＣＲＥまたはそのバリアントの逆相補体であり得ることは、明らかであろう。

【０９７４】

機能的バリアントと参照配列との配列同一性レベルも、指標または保持される機能性であり得る。ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターのＴＦＢＳにおける高い配列同一性レベルは、スペーサー配列（配列のいかなる保存要件も、ほとんどまたは全くない）における配列同一性よりも重要度が一般に高い。しかし、機能的ＴＦＢＳの配列がコンセンサス配列と正確にマッチする必要がないことを考えると、ＴＦＢＳ内であってもかなりの配列変異度に対応することができることは、理解されるであろう。

【０９７５】

所与の機能的バリアントにおけるＴＦＢＳに結合する１つまたは複数のＴＦの能力を、電気泳動移動度シフトアッセイ（ＥＭＳＡ）、結合アッセイ、クロマチン免疫沈降（ＣｈＩＰ）、およびＣｈＩＰ－シークエンシング（ＣｈＩＰ－ｓｅｑ）を含むがこれらに限定されない、当技術分野において公知の任意の適切な手段により決定することができる。好ましい実施形態では、所与の機能的バリアントに結合する１つまたは複数のＴＦの能力は、ＥＭＳＡにより決定される。ＥＭＳＡを行う方法は、当技術分野において周知である。好適なアプローチは、上記のSambrook et al.に記載されている。この手順を記載している多くの関連論文、例えば、Hellman and Fried, Nat Protoc. 2007; 2(8): 1849-1861を利用できる。

【０９７６】

「筋肉特異的」または「筋肉特異的発現」は、他の組織（例えば、脾臓、肝臓、肺および脳）と比較して優先的にまたは優勢に筋肉における（または筋肉由来の細胞における）遺伝子の発現を増強または駆動する、シス調節性エレメント、シス調節性モジュールまたはプロモーターの能力を指す。遺伝子の発現は、ｍＲＮＡまたはタンパク質の形態での発現であり得る。好ましい実施形態では、筋肉特異的発現は、他の（すなわち、非筋肉）組織または細胞では発現がほとんどないような発現であり、すなわち、発現が高度に筋肉特異的である。

【０９７７】

「心筋特異的」または「心筋特異的発現」は、他の組織（例えば、脾臓、肝臓、肺および脳）と比較しておよび骨格筋組織と比較して優先的にまたは優勢に心筋における遺伝子の発現を増強または駆動する、シス調節性エレメント、シス調節性モジュールまたはプロモーターの能力を指す。遺伝子（例えば、治療用遺伝子またはレポーター遺伝子）の発現が、心筋細胞はもちろん心臓の平滑筋細胞も含む筋肉細胞において優先的にまたは優勢に起こる、心特異性を、同定することができる。優先的または優勢発現は、例えば、発現レ

ベルが他の細胞型（すなわち、非心臓由来の細胞）におけるより心臓由来の細胞において有意に高い場合に、定義され得る。例えば、心臓由来の細胞における発現は、好適には、非心細胞におけるより少なくとも５倍多く、好ましくは、非心細胞におけるより少なくとも１０倍多く、一部の場合には、５０倍またはそれより多いこともある。便宜上、筋肉特異的発現は、肝臓由来の細胞株（例えば、Ｈｕｈ７もしくはＨｅｐＧ２）、腎臓由来の細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３）、子宮頸組織由来の細胞株（例えば、ＨｅＬａ）および／または肺由来の細胞株（例えば、Ａ５４９）における発現レベルと比較される、肝臓の筋肉細胞株（例えば、筋肉由来の細胞株、例えばＣ２Ｃ１２）またはＨ２Ｋ細胞（骨格筋）またはＨ９Ｃ２細胞（心臓の）における発現レベルの比較によって、好適に実証され得る。心筋特異的発現は、肝臓由来の細胞株（例えば、Ｈｕｈ７もしくはＨｅｐＧ２）、腎臓由来の細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３）、子宮頸組織由来の細胞株（例えば、ＨｅＬａ）、肺由来の細胞株（例えば、Ａ５４９）および／または骨格筋由来の細胞（例えば、Ｃ２Ｃ１２またはＨ２Ｋ）における発現レベルと比較される、心筋細胞株（例えば、心筋由来の細胞株、例えば、Ｈ９Ｃ２）または初代心筋細胞における発現レベルの比較によって、好適に実証され得る。骨格筋特異的発現は、肝臓由来の細胞株（例えば、Ｈｕｈ７もしくはＨｅｐＧ２）、腎臓由来の細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３）、子宮頸組織由来の細胞株（例えば、ＨｅＬａ）、肺由来の細胞株（例えば、Ａ５４９）および／または心筋細胞株（例えば、Ｈ９Ｃ２）における発現レベルと比較される、骨格筋由来の細胞（例えば、Ｃ２Ｃ１２もしくはＨ２Ｋ）または初代骨格筋細胞における発現レベルの比較によって、好適に実証され得る。

【０９７８】

本発明の合成筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターは、ＣＭＶ－ＩＥなどの非組織特異的プロモーターと比較されたとき、非筋肉由来の細胞において、好適にはＨｕｈ７、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａおよび／またはＡ５４９細胞において低減された発現を好ましくは示す。本発明の合成筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターは、好ましくは、非筋肉由来の細胞において（好適には、Ｈｕｈ７、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、および／またはＡ５４９細胞において）ＣＭＶ－ＩＥプロモーターの５０％もしくはそれ未満、好適には、２５％もしくはそれ未満、２０％もしくはそれ未満、１５％もしくはそれ未満、１０％もしくはそれ未満、５％もしくはそれ未満、または１％もしくはそれ未満の活性を有する。一般に、非筋肉由来の細胞における発現は最小限に抑えられることが好ましいが、一部の場合には、これは必要でないことがある。本発明の合成プロモーターが、例えば１つまたは２つの非筋肉細胞において、より高度な発現をたとえ有したとしても、それが、一般に、様々な筋肉細胞において非筋肉細胞に対して全体としてより高度な発現を有するのであれば、それは、やはり筋肉特異的プロモーターであり得る。一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、筋肉細胞において非筋肉細胞と比較して少なくとも２５％、または少なくとも３５％、または少なくとも４５％、または少なくとも５５％、または少なくとも６５％、または少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または２５％～９５％の間の任意の整数値、多く遺伝子を発現する。

【０９７９】

本発明の合成筋肉特異的プロモーターは、好ましくは、対象の筋肉における発現の促進に、例えば、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子、の筋肉特異的発現の駆動に、好適である。本発明の合成心筋特異的プロモーターは、好ましくは、対象の心臓における発現の促進に、例えば、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子、の心筋特異的発現の駆動に、好適である。本発明の合成骨格筋特異的プロモーターは、好ましくは、対象の骨格筋における発現の促進に、例えば、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子、の骨格筋特異的発現の駆動に、好適である。本発明の好ましい合成筋肉特異的プロモーターは、筋肉特異的導入遺伝子発現の促進に好適であり、筋肉細胞においてＣＢＡプロモーターの活性の少なくとも１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、３５

０％または４００％である活性を有する。一部の実施形態では、本発明の合成筋肉特異的プロモーターは、ＣＢＡプロモーターの活性の少なくとも１００％、好ましくはＣＢＡまたはｓｐｃ５－１２プロモーターの活性の１５０％、２００％、３００％または５００％レベルでの筋肉特異的導入遺伝子発現の促進に好適である。一部の実施形態では、本発明の合成心筋特異的プロモーターは、Ｔｎｎｔ２またはＭｙｌ２プロモーターの活性の少なくとも１００％、好ましくはＴｎｎｔ２またはＭｙｌ２プロモーターの活性の１５０％、２００％、３００％または５００％レベルでの心筋特異的導入遺伝子発現の促進に好適である。一部の実施形態では、本発明の合成骨格筋特異的プロモーターは、Ｔｎｎｔ２またはＭｙｌ２プロモーターの活性の少なくとも１００％、好ましくはｓｐｃ５－１２プロモーターの活性の１５０％、２００％、３００％または５００％レベルでの骨格筋特異的導入遺伝子発現の促進に好適である。そのような筋肉特異的発現は、例えば、Ｃ２Ｃ１２もしくはＨ２Ｋ細胞（骨格筋）またはＨ９Ｃ２細胞（心臓の）または初代筋肉細胞（好適には初代ヒト筋細胞）のような、筋肉由来の細胞において、好適に決定される。

【０９８０】

本発明の合成筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的プロモーターはまた、筋肉由来の細胞（例えば、ｃ２ｃ１２もしくはＨ２Ｋ細胞（骨格筋）またはｈ９Ｃ２細胞（心臓の））においてＣＭＶ－ＩＥと比較して少なくとも５０％、１００％、１５０％または２００％レベルで遺伝子の筋肉特異的、心筋特異的または骨格筋特異的発現を促進することが可能であり得る。

【０９８１】

「エンハンサーエレメント」とは、プロモーターにごく接近して配置されたとき、エンハンサードメインの非存在下でプロモーターから得られる転写活性と比べて転写活性の増加をもたらす、核酸配列を意味する。したがって、「エンハンサー」は、作動可能に連結された遺伝子またはコード配列の転写を助長するポリヌクレオチド配列を含む。様々な異なる供給源からのいくつかのエンハンサーが当技術分野において周知である。プロモーター配列（例えば、一般に使用されるＣＭＶプロモーター）を有する一部のポリヌクレオチドは、エンハンサー配列も有する。

【０９８２】

心特異的ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターとして機能するＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターの能力を、当業者は容易に評価することができる。したがって、当業者は、上述の特異的ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターについての任意のバリアントが機能的なままである（すなわち、それが、上記で定義された通りの機能的バリアントである）かどうかを容易に判定することができる。例えば、評価されることになる任意の所与のＣＲＭを最小プロモーター（例えば、ＣＭＶ－ＭＰの上流側に位置する）に作動可能に連結させることができ、遺伝子（概してレポーター遺伝子）の心特異的発現を駆動するシス調節エレメントの能力が測定される。あるいは、ＣＲＥまたはＣＲＭのバリアントを、参照ＣＲＥまたはＣＲＭの代わりに置換により合成心特異的プロモーターに組み込むことができ、前記改変プロモーターにより駆動される心特異的発現に対する効果を判定し、非改変形と比較することができる。同様に、心特異的発現を駆動するプロモーターの能力を、当業者は（下記の実施例で説明されるように）容易に評価することができる。参照プロモーターのバリアントにより駆動される遺伝子の発現レベルを、参照プロモーターにより駆動される発現レベルと比較することができる。一部の実施形態では、バリアントプロモーターにより駆動される心特異的発現レベルが、参照プロモーターにより駆動される発現レベルの少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも１００％である場合、バリアントが機能的なままであると言うことができる。心特異的発現増強を評価するために好適な核酸構築物およびレポーターアッセイを容易に構築することができ、下記に示される実施例によって好適な方法論が得られる。

【０９８３】

筋肉特異的または心筋特異的ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターとして機能するＣＲＥ

、ＣＲＭまたはプロモーターの能力を、当業者は容易に評価することができる。したがって、当業者は、上述の特異的ＣＲＥ、ＣＲＭまたはプロモーターについての任意のバリアントが機能的なままである（すなわち、それが、上記で定義された通りの機能的バリアントである）かどうかを容易に判定することができる。例えば、評価されることになる任意の所与のＣＲＭを最小プロモーター（例えば、ＣＭＶ－ＭＰの上流側に位置する）に作動可能に連結させることができ、遺伝子（概してレポーター遺伝子）の筋肉特異的または心筋特異的発現を駆動するシス調節エレメントの能力が測定される。あるいは、ＣＲＥのバリアントを、参照ＣＲＥの代わりに置換により合成心筋特異的プロモーターに組み込むことができ、前記改変プロモーターにより駆動される心筋特異的発現に対する効果を判定し、非改変形と比較することができる。同様に、筋肉特異的または心筋特異的発現を駆動するＣＲＭまたはプロモーターの能力を、当業者は（下記の実施例で説明されるように）容易に評価することができる。参照プロモーターのバリアントにより駆動される遺伝子の発現レベルを、参照配列により駆動される発現レベルと比較することができる。一部の実施形態では、バリアントプロモーターにより駆動される心筋特異的発現レベルが、参照プロモーターにより駆動される発現レベルの少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも１００％である場合、バリアントが機能的なままであると言うことができる。筋肉または心筋特異的発現増強を評価するために好適な核酸構築物およびレポーターアッセイを容易に構築することができる。

【０９８４】

遺伝子（例えば、治療用遺伝子またはレポーター遺伝子）の発現が、筋肉由来の細胞または心筋由来の細胞において優先的にまたは優勢に起こる、筋肉特異性または心筋特異性を、同定することができる。優先的または優勢発現は、例えば、発現レベルが他の細胞型（すなわち、非筋肉由来または非心筋由来の細胞）におけるより筋肉由来または心筋由来の細胞において有意に高い場合に、定義され得る。例えば、筋肉由来または心筋由来の細胞における発現は、好適には、非筋肉細胞におけるより少なくとも５倍多く、好ましくは、非筋肉細胞におけるより少なくとも１０倍多く、一部の場合には５０倍またはそれより多いこともある。便宜上、心筋特異的発現は、肝臓由来の細胞株（例えば、Ｈｕｈ７もしくはＨｅｐＧ２）、腎臓由来の細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３）、子宮頸組織由来の細胞株（例えば、ＨｅＬａ）および／または肺由来の細胞株（例えば、Ａ５４９）における発現レベルと比較される、心筋細胞株（例えば、心筋由来の細胞株、例えば、Ｈ９Ｃ２）または初代心筋細胞における発現レベルの比較によって、好適に実証され得る。心筋特異的発現は、肝臓由来の細胞株（例えば、Ｈｕｈ７もしくはＨｅｐＧ２）、腎臓由来の細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３）、子宮頸組織由来の細胞株（例えば、ＨｅＬａ）、肺由来の細胞株（例えば、Ａ５４９）および／または骨格筋由来の細胞（例えば、Ｃ２Ｃ１２またはＨ２Ｋ）における発現レベルと比較される、心筋細胞株（例えば、心筋由来の細胞株、例えば、Ｈ９Ｃ２）または初代心筋細胞における発現レベルの比較によって、好適に実証され得る。骨格筋特異的発現は、肝臓由来の細胞株（例えば、Ｈｕｈ７もしくはＨｅｐＧ２）、腎臓由来の細胞株（例えば、ＨＥＫ－２９３）、子宮頸組織由来の細胞株（例えば、ＨｅＬａ）、肺由来の細胞株（例えば、Ａ５４９）および／または心筋細胞株（例えば、Ｈ９Ｃ２）における発現レベルと比較される、骨格筋由来の細胞（例えば、Ｃ２Ｃ１２もしくはＨ２Ｋ）または初代骨格筋細胞における発現レベルの比較によって、好適に実証され得る。

【０９８５】

本発明の合成心筋特異的プロモーターは、ＣＭＶ－ＩＥなどの非組織特異的プロモーターと比較されたとき、非筋肉由来の細胞において、好適にはＨｕｈ７、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａおよび／またはＡ５４９細胞において低減された発現を好ましくは示す。本発明の合成心筋特異的プロモーターは、好ましくは、非筋肉由来の細胞において（好適には、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、および／またはＡ５４９細胞において）ＣＭＶ－ＩＥプロモーターの５０％もしくはそれ未満、好適には、２５％もしくはそれ未満、２０％もしくは

それ未満、１５％もしくはそれ未満、１０％もしくはそれ未満、５％もしくはそれ未満、または１％もしくはそれ未満の活性を有する。一般に、非筋肉由来の細胞における発現は最小限に抑えられることが好ましいが、一部の場合には、これは必要でないことがある。一部の実施形態では、本発明の合成心筋特異的プロモーターは、非肝臓由来の細胞（例えば、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、および／またはＡ５４９細胞）におけるＬＰ１またはＣＭＶ－ＩＥプロモーターの５０％またはそれ未満のレベルでの／５０％またはそれ未満での遺伝子発現の促進に好適である。本発明の合成プロモーターが、例えば１つまたは２つの非心筋細胞において、より高度な発現をたとえ有したとしても、それが、一般に、様々な心筋細胞において非心筋細胞に対して全体としてより高度な発現を有するのであれば、それは、やはり心筋特異的プロモーターであり得る。

【０９８６】

本発明の合成心筋特異的プロモーターは、好ましくは、対象の心臓における発現の促進に、例えば、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子、の心筋特異的発現の駆動に、好適である。本発明の合成心筋特異的プロモーターは、好ましくは、対象の心臓における発現の促進に、例えば、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子、の心筋特異的発現の駆動に、好適である。本発明の合成骨格筋特異的プロモーターは、好ましくは、対象の骨格筋における発現の促進に、例えば、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子、の骨格筋特異的発現の駆動に、好適である。本発明の好ましい合成心筋特異的プロモーターは、心筋特異的導入遺伝子発現の促進に好適であり、心筋細胞においてＣＢＡプロモーターまたはｓｐｃ５－１２プロモーターの活性の少なくとも１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、３５０％または４００％である活性を有する。一部の実施形態では、本発明の合成心筋特異的プロモーターは、ＣＢＡ　Ｔｎｎｔ２、Ｍｙｌ２、またはｓｐｃ５－１２プロモーターの活性の少なくとも５０％、好ましくはＣＢＡ、Ｔｎｎｔ２、Ｍｙｌ２、またはｓｐｃ５－１２プロモーターの活性の１００％、１５０％、２００％、３００％または５００％レベルでの心筋特異的導入遺伝子発現の促進に好適である。そのような心筋特異的発現は、心筋由来の細胞において、例えば、Ｈ９Ｃ２細胞または初代心筋細胞（好適には初代ヒト心筋細胞）において、好適に決定される。

【０９８７】

本発明の合成心筋特異的プロモーターはまた、心筋由来の細胞（例えば、Ｈ９Ｃ２心細胞）、またはＣ１２Ｃ１２もしくはＨ２Ｋ細胞（骨格筋細胞）においてＣＭＶ－ＩＥと比較して少なくとも５０％、１００％、１５０％または２００％レベルで遺伝子の心筋特異的発現を促進することが可能であり得る。

【０９８８】

用語「核酸」は、本明細書で使用される場合、概して、ヌクレオチドで本質的に構成されている任意の長さのオリゴマーまたはポリマー（好ましくは線状ポリマー）を指す。ヌクレオチド単位は、一般的に、複素環塩基と、糖基と、改変または置換リン酸基を含む少なくとも１つ、例えば、１つ、２つまたは３つ、のリン酸基とを含む。複素環塩基は、とりわけ、天然に存在する核酸に広く分布しているプリンおよびピリミジン塩基、例えば、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、チミン（Ｔ）およびウラシル（Ｕ）、他の天然に存在する塩基（例えば、キサンチン、イノシン、ヒポキサンチン）、ならびに化学的にまたは生化学的に改変された（例えば、メチル化された）、非天然または誘導体化塩基を含み得る。糖基は、とりわけ、天然に存在する核酸に多く見られるペントース（ペントフラノース）基、例えば、好ましくは、リボースおよび／もしくは２－デオキシリボース、またはアラビノース、２－デオキシアラビノース、トレオースもしくはヘキソース糖基、ならびに改変または置換糖基を含み得る。本明細書で意図されるような核酸は、天然に存在するヌクレオチド、改変ヌクレオチド、またはこれらの混合物を含み得る。改変ヌクレオチドは、改変複素環塩基、改変糖部分、改変リン酸基、またはこれらの組合せを含み得る。リン酸基または糖の改変を導入して、安定性、酵素分解に対する耐性、または一部の他の有用な特性を改善することができる。用語「核酸」は、さらに好ましくは

、ＤＮＡ、ＲＮＡおよびＤＮＡ　ＲＮＡハイブリッド分子を包含し、これらには、具体的には、ｈｎＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、増幅産物、オリゴヌクレオチド、および合成（例えば、化学的に合成された）ＤＮＡ、ＲＮＡまたはＤＮＡ　ＲＮＡハイブリッドが含まれる。核酸は、天然に存在する、例えば、自然界に存在する、もしくは自然界から単離されている核酸であることもあり、あるいは天然に存在しない、例えば、組換えの、すなわち、組換えＤＮＡ技術により産生された、および／または部分的にもしくは完全に、化学的にもしくは生化学的に合成された核酸であることもある。「核酸」は、二本鎖状、部分的に二本鎖状、または一本鎖状であり得る。一本鎖状の場合、核酸は、センス鎖またはアンチセンス鎖であり得る。加えて、核酸は、環状または線状であり得る。

【０９８９】

「単離された」とは、核酸への言及である場合、自然界でそれと通常は会合している配列の全部もしくは一部がない、核酸分子もしくは核酸配列；または自然界に存在するような配列だが、それと会合している異種配列を有する配列；または染色体から解離した分子を意味する。

【０９９０】

用語「同一性」および「同一の」などは、２つの高分子間の、例えば、２つの核酸分子間の、例えば２つのＤＮＡ分子間の、配列類似性を指す。配列アラインメント、および配列同一性の決定は、例えば、Altschul et al. 1990 (J Mol Biol 215: 403-10)によって最初に記載された基本ローカルアラインメント検索ツール（ＢＬＡＳＴ）、例えば、Tatusova and Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250)によって記載された「Ｂｌａｓｔ　２配列」アルゴリズムを使用して、行うことができる。

【０９９１】

比較のために配列をアラインメントする方法は、当技術分野において周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482；Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443；Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444；Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44；Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3；Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90；Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65；Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31；Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50に記載されている。配列アラインメント方法および相同性計算の詳細にわたる検討は、例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10において見つけることができる。

【０９９２】

米国国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）基本ローカルアラインメント検索ツール（ＢＬＡＳＴ（商標）；Altschul et al. (1990)）は、米国国立生物工学情報センター（Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）をはじめとするいくつかの供給源から入手可能であり、いくつかの配列解析プログラムと接続して使用するために、インターネット上で利用可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法の説明は、インターネット上で、ＢＬＡＳＴ（商標）の「ヘルプ」セクションで入手可能である。核酸配列の比較のために、デフォルトパラメーターを使用してＢＬＡＳＴ（商標）（Ｂｌａｓｔｎ）プログラムの「Ｂｌａｓｔ　２　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」関数を用いることができる。参照配列とのさらに大きい類似性を有する核酸配列は、この方法により評価すると同一性パーセンテージの上昇を示すことになる。概して、配列同一性パーセンテージは、配列の全長にわたって計算される。

【０９９３】

例えば、大域的最適アラインメントは、次のスコアリングパラメーターを用いてニード

ルマン－ウンシュアルゴリズムによって好適に求められる：マッチスコア：＋２、ミスマッチスコア：－３、ギャップペナルティー：ギャップ開始５、ギャップ伸長２。得られる最適な大域的アラインメントの同一性パーセンテージは、アラインメント長がマッチとミスマッチの両方を含むアラインメントの全長に対するアラインメントされた塩基の数の比に１００を掛けることによって好適に計算される。

【０９９４】

用語「転写因子結合部位」（ＴＦＢＳ）は、当技術分野において周知である。ＴＦＢＳ配列を、意図した転写因子（ＴＦ）がそれらに結合していることを条件に、改変することができることは、当業者には明らかであろう。本明細書で開示される様々なＴＦＢＳについてのコンセンサス配列は、当技術分野において公知であり、当業者は、この情報を容易に使用して代替ＴＦＢＳを決定することができる。さらに、所与の推定配列に結合するＴＦの能力を、当業者は実験に基づいて（例えば、当技術分野において周知の、および本明細書で論じられる、ＥＭＳＡおよび他のアプローチによって）容易に決定することができる。

【０９９５】

「コンセンサス配列」の意味は、当技術分野において周知である。本願では、文脈による別段の指示がない限り、コンセンサス配列について以下の表記法が使用される。以下の例示的ＤＮＡ配列を考える：

Ａ［ＣＴ］Ｎ｛Ａ｝ＹＲ

【０９９６】

Ａは、Ａがその位置に常に見られることを意味し、［ＣＴ］は、その位置におけるＣまたはＴのどちらかを表し、Ｎは、その位置における任意の塩基を表し、｛Ａ｝は、Ａ以外の任意の塩基がその位置に見られることを意味する。Ｙは、任意のピリミジンを表し、Ｒは、任意のプリンを示す。

【０９９７】

本願において用語「合成（の）」は、自然界に存在しない核酸分子を意味する。本発明の合成核酸は、人工的に、概して組換え技術またはデノボ合成により、産生される。そのような合成核酸は、天然に存在する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、および他のそのような調節配列）を含有し得るが、これらは、天然に存在しない状況で存在する。例えば、合成遺伝子（または遺伝子の一部分）は、自然界では連続していない１つもしくは複数の核酸配列（キメラ配列）を概して含有し、および／または置換、挿入および欠失、ならびにこれらの組合せを包含し得る。

【０９９８】

「相補（的な）」または「相補性」は、本明細書で使用される場合、２つの核酸配列のワトソン－クリック塩基対合を指す。例えば、配列について、５’－ＡＧＴ－３’は、相補配列３’－ＴＣＡ－５’に結合する。２つの核酸配列間の相補性は、塩基の一部のみがそれらの相補体に結合する場合、「部分的」であることもあり、または配列中のあらゆる塩基がその相補的塩基に結合するときのように完全であることもある。

【０９９９】

用語「投与」は、本明細書で使用される場合、人体または動物体への外来物質の導入を指す。投与は、例えば、静脈内、動脈内、または頭蓋内であり得る。

【１０００】

本願における「トランスフェクション」は、核酸を細胞に意図的に導入する任意のプロセスを幅広く指し、ウイルスおよび非ウイルスベクターの導入を包含し、形質転換、形質導入ならびに同様の用語およびプロセスを含むかまたはそれらに相当する。例としては、ウイルスベクターでのトランスフェクション；プラスミドベクターでの形質転換；電気穿孔（Fromm et al. (1986) Nature 319:791-3）；リポフェクション（Feigner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7）；マイクロインジェクション（Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85）；Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ媒介移入（Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

80:4803-7）；直接ＤＮＡ取り込み；ウィスカー媒介形質転換；およびマイクロプロジェクタイルボンバードメント（Klein et al. (1987) Nature 327:70）が挙げられるが、これらに限定されない。

【１００１】

本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」という表現は、外来性核酸酸配列を指す。一例では、導入遺伝子は、工業的にもしくは薬学的に有用な化合物をコードする遺伝子、または望ましい形質をコードする遺伝子である。さらに別の例では、導入遺伝子は、有用な核酸、例えば、アンチセンス核酸配列をコードし、アンチセンス核酸配列の発現は、標的核酸配列の発現を阻害する。導入遺伝子は、好ましくは、治療用産物、例えばタンパク質、をコードする。

【１００２】

用語「ベクター」は、当技術分野において周知であり、本明細書で使用される場合、本発明による核酸配列が挿入されていることもある、核酸分子、例えば二本鎖ＤＮＡを指す。ベクターは、挿入された核酸分子を好適な宿主細胞に輸送するために好適に使用される。ベクターは、概して、挿入核酸分子の転写および好ましくはその転写物のポリペプチドへの翻訳を可能にする必要エレメントのすべてを含有する。ベクターは、概して、必要エレメントのすべてを含有し、したがって、ベクターが宿主細胞内に存在すると、ベクターは、宿主染色体ＤＮＡとは無関係にまたはそれと同時に複製することができ、ベクターおよびその挿入された核酸分子のいくつかのコピーを生成することができる。

【１００３】

本明細書で使用される場合、用語「ウイルスベクター」、「ベクター」、または「遺伝子送達ベクター」は、核酸送達ビヒクルとして機能し、ビリオン内にパッケージングされたベクターゲノム（例えば、ウイルスＤＮＡ［ｖＤＮＡ］）を含む、ウイルス（例えば、ＡＡＶ）粒子を指す。あるいは、一部の文脈では、用語「ベクター」は、単独でのベクターゲノム／ｖＤＮＡを指すために使用され得る。

【１００４】

「ｒＡＡＶベクターゲノム」または「ｒＡＡＶゲノム」は、１つまたは複数の異種核酸配列を含むＡＡＶゲノム（すなわち、ｖＤＮＡ）である。ｒＡＡＶベクターは、一般に、ウイルスを生成するためにｉｎ　ｃｉｓでの逆方向末端反復（ＴＲ）のみを必要とする。すべての他のウイルス配列は、重要でなく、ｉｎ　ｔｒａｎｓで供給され得る（Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbial. Immunol. 158:97）。概して、ｒＡＡＶベクターゲノムは、ベクターによって効率的にパッケージングされ得る導入遺伝子のサイズを最大にするために１つまたは複数のＴＲ配列のみを保持することになる。構造および非構造タンパク質コード配列は、ｉｎ　ｔｒａｎｓで（例えば、プラスミドなどのベクターから、または配列をパッケージング細胞に安定に組み込むことにより）提供され得る。本発明の実施形態では、ｒＡＡＶベクターゲノムは、少なくとも１つのＩＴＲ配列（例えば、ＡＡＶ　ＴＲ配列）を含み、必要に応じて、２つのＩＴＲ（例えば、２つのＡＡＶ　ＴＲ）を含み、これら２つのＩＴＲは、概して、ベクターゲノムの５’および３’末端にあり、異種核酸に隣接することになるが、異種核酸と連続している必要はない。ＴＲは、互いに同じであることもあり、または異なることもある。

【１００５】

用語「末端反復」または「ＴＲ」は、ヘアピン構造を形成し、逆方向末端反復（すなわち、所望の機能、例えば、複製、ウイルスパッケージング、組込み、および／またはプロウイルスレスキューなど、を媒介するＩＴＲ）として機能する、任意のウイルス末端反復または合成配列を含む。ＴＲは、ＡＡＶ　ＴＲであることもあり、または非ＡＡＶ　ＴＲであることもある。例えば、非ＡＡＶ　ＴＲ配列、例えば、他のパルボウイルス（例えば、イヌパルボウイルス（ＣＰＶ）、マウスパルボウイルス（ＭＶＭ）、ヒトパルボウイルスＢ－１９）のもの、または任意の他の好適なウイルス配列（例えば、ＳＶ４０複製起点としての機能を果たすＳＶ４０ヘアピン）を、ＴＲとして使用することができ、それを、トランケーション、置換、欠失、挿入および／または付加によってさらに改変することが

できる。さらに、ＴＲは、部分的にまたは完全に合成のもの、例えば、Ｓａｍｕｌｓｋｉらの米国特許第５，４７８，７４５号に記載されているような「二重Ｄ配列」であることもある。

【１００６】

「ＡＡＶ逆方向末端反復」または「ＡＡＶ　ＩＴＲ」を含む、「ＡＡＶ末端反復」または「ＡＡＶ　ＴＲ」は、血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２、または現在公知のもしくは後に発見される任意の他のＡＡＶを含むがこれらに限定されない、任意のＡＡＶからのものであり得る。ＡＡＶ末端反復は、その末端反復が、所望の機能、例えば、複製、ウイルスパッケージング、組込み、および／またはプロウイルスレスキューなどを媒介するのであれば、天然末端反復配列を有する必要はない（例えば、天然ＡＡＶ　ＴＲまたはＡＡＶ　ＩＴＲ配列が、挿入、欠失、トランケーションおよび／またはミスセンス突然変異により変更されていてもよい）。

【１００７】

ＡＡＶタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３は、互いに相互作用して正十二面体対称のＡＡＶカプシドを形成する、カプシドタンパク質である。ＶＰ１．５は、米国特許出願公開第２０１４／００３７５８５号に記載されているＡＡＶカプシドタンパク質である。

【１００８】

本発明のウイルスベクターは、さらに、国際特許公開ＷＯ００／２８００４およびChao et al., (2000) Molecular Therapy 2:619に記載されているような、「標的化」ウイルスベクター（例えば、方向付けられた親和性を有する）および／または「ハイブリッド」パルボウイルス（すなわち、ウイルスＴＲとウイルスカプシドが、異なるパルボウイルスからのものである）であり得る。

【１００９】

本発明のウイルスベクターは、さらに、国際特許公開ＷＯ０１／９２５５１（この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているような二重パルボウイルス粒子であり得る。したがって、一部の実施形態では、二本鎖（二重鎖）ゲノムを本発明のウイルスカプシドにパッケージングすることができる。

【１０１０】

さらに、ウイルスカプシドまたはゲノムエレメントは、挿入、欠失および／または置換をはじめとする他の改変を含有し得る。

【１０１１】

「キメラ」カプシドタンパク質は、本明細書で使用される場合、野生型と比べてカプシドタンパク質のアミノ酸配列内の１つまたは複数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０など）のアミノ酸残基の置換、ならびに野生型と比べてアミノ酸配列内の１つまたは複数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０など）のアミノ酸残基の挿入および／または欠失によって改変されている、ＡＡＶカプシドタンパク質を意味する。一部の実施形態では、１つのＡＡＶ血清型からの完全なまたは部分的なドメイン、機能的領域、エピトープなどが、任意の組合せで、異なるＡＡＶ血清型の対応する野生型ドメイン、機能的領域、エピトープなどに置き換わって、本発明のキメラカプシドタンパク質を産生し得る。当技術分野において周知のプロトコールに従ってキメラカプシドタンパク質の産生を行うことができ、有意な数のキメラカプシドタンパク質が文献および本明細書に記載されており、それらを本発明のカプシドに含めることができる。

【１０１２】

本明細書で使用される場合、用語「半数体ＡＡＶ」は、本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ１８／２２７２５に記載されているようなＡＡＶを意味するものとする。

【１０１３】

用語「ハイブリッド」ＡＡＶベクターまたはパルボウイルスは、ウイルスＴＲまたはＩＴＲおよびウイルスカプシドが異なるパルボウイルスからのものである、ｒＡＡＶベクターを指す。ハイブリッドベクターは、国際特許公開ＷＯ００／２８００４およびChao et al., (2000) Molecular Therapy 2:619に記載されている。例えば、ハイブ

リッドＡＡＶベクターは、概して、アデノウイルス複製およびパッケージングに十分なアデノウイルス５’および３’シスＩＴＲ配列（すなわち、アデノウイルス末端反復およびＰＡＣ配列）を含む。一部の実施形態では、ＡＡＶは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，１７２，８９３号において開示されているような、ハイブリッド－ＡＡＶ２ＩＴＲ／ＡＡＶである。

【１０１４】

用語「倍数体ＡＡＶ」は、２つまたはそれより多くのＡＡＶ血清型からのカプシド、例えば＿＿、で構成されているＡＡＶベクターであって、より高度な形質導入に個々の血清型を利用することができるが、ある特定の実施形態では親からの親和性を消失させることができない、ＡＡＶベクターを指す。

【１０１５】

本明細書で使用される場合、「ホスファターゼ阻害剤－１タンパク質」または「Ｉ－１タンパク質」は、タンパク質ホスファターゼ－１の活性を阻害することにより心収縮性を調節する、例えばＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００６７４１により記載されている、タンパク質である。ホスファターゼ阻害剤－１タンパク質またはＩ－１タンパク質に関して、用語「野生型」は、ホスファターゼ阻害剤タンパク質－１（Ｉ－１）、サブユニット１Ａをコードする配列番号２のヌクレオチド配列、および配列番号１のポリペプチド配列、およびＩ－１タンパク質をコードする任意の他のヌクレオチド配列（前述のポリペプチド配列と同じ機能特性および結合親和性を有する）、例えば対立遺伝子バリアント、を指す。

【１０１６】

野生型Ｉ－１は、タンパク質のいわゆる「機能的誘導体」を含む。「機能的誘導体」とは、本発明のポリペプチドまたは核酸の「化学的誘導体」、「断片」、「多形体」または「バリアント」を意味する。機能的誘導体は、本発明によるその有用性を可能にする、タンパク質の機能の少なくとも一部分を保持する。遺伝子コードの縮重に起因して非常に多くの異なる核酸配列が同じアミノ酸配列をコードし得ることは周知である。元々の機能性を保持するタンパク質またはポリペプチドに達するように、アミノ酸の保存的変化を起こすことができることも、当技術分野で周知である。両方の場合、すべての順列が本開示により包含されるように意図されている。

【１０１７】

本明細書に記載の単離された核酸分子の機能的等価体は、本発明の範囲に含まれる。遺伝子コードの縮重は、ある特定のコドンの置換であって、同じアミノ酸を指定する、したがって、同じタンパク質を生じさせることになる、他のコドンによる置換を可能にする。メチオニンおよびトリプトファンを除いて、公知のアミノ酸は１つより多くのコドンによりコードされ得るので、核酸配列は、大幅に変わり得る。しかし、そのコードされたアミノ酸配列は、保存されることになる。

【１０１８】

加えて、核酸配列は、５’末端および／または３’末端に対する少なくとも１つのヌクレオチドの付加、欠失または置換の結果として生じるヌクレオチド配列を含み得るが、その付加、欠失または置換が、ヌクレオチド配列によりコードされている本明細書に記載のアミノ酸配列を変更しないことを条件とする。例えば、本発明の核酸分子は、その５’末端および／または３’末端に付加された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有し得る。

【１０１９】

さらに、コドンを欠失させて、または１つまたは複数のコドンを縮重コドン以外のコドンで置換して、構造的に改変されたポリペプチドだが、未改変の核酸分子により産生されるポリペプチドと実質的に同じ有用性または活性を有するものを産生することが可能である。当技術分野で認知されているように、これら２つのポリペプチドは、機能的に等価であり、それらの産生を生じさせる２つの核酸分子も、たとえ、これらの核酸分子間の差が遺伝子コードの縮重と関係がなかったとしても、機能的に等価である。

【１０２０】

Ｉ－１の「キメラ誘導体」は、通常はタンパク質の一部でない追加の化学的部分を含有する。ペプチドの標的アミノ酸残基と、選択された側鎖または末端残基と反応することができる有機誘導体化剤とを反応させることにより、タンパク質またはペプチドの共有結合の改変を分子に導入することができる。

【１０２１】

「血管新生タンパク質またはペプチド」は、本明細書で使用される場合、血管新生または血管新生活性、すなわち血管発生、を促進することができる任意のタンパク質またはペプチドを指す。

【１０２２】

用語「血管新生」は、単独で、または線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、肝細胞増殖因子、アンジオゲニン、トランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ）、組織壊死因子（ＴＮＦ、例えばＴＮＦ－α）、血小板誘導増殖因子（ＰＤＧＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＣＳＦ）、胎盤ＧＦ、ＩＬ－８を含むがこれらに限定されない、他の薬剤と組み合わせて、血管新生を誘導し、アンジオポエチン、例えば、プロリフェリン、アンジオポエチン－１およびアンジオポエチン－２、トロンボスポンジン、エフリン－Ａ１、Ｅ－セレクチン、レプチン、ヘパリン親和性調節ペプチドを含む、薬剤を意味する。

【１０２３】

「増殖因子」とは、細胞成長を少なくとも促進する、または発現変化を誘導する、薬剤を意味する。

【１０２４】

「脈管構造」または「脈管の／血管の（ｖａｓｃｕｌａｒ）」は、哺乳動物の全身に血液（ならびにリンパ液）を運ぶ血管系を指す用語である。

【１０２５】

「血管（ｂｌｏｏｄ　ｖｅｓｓｅｌ）」は、動脈、細動脈、毛細血管、細静脈、静脈、洞、および栄養血管を含む、哺乳動物の脈管系の血管（ｖｅｓｓｅｌ）のいずれかを指す。心血管状態、心疾患を処置するための本発明の好ましい態様では、血管新生導入遺伝子を含むベクターは、血液を心筋に供給する血管導管に直接導入される。そのような血管導管は、冠動脈はもちろん、伏在静脈または内胸動脈グラフトなどの血管も含む。

【１０２６】

「動脈」は、心臓から離れた血液が通る血管を指す。冠動脈は、心臓自体の組織を供給し、その一方で他の動脈は、身体の残りの臓器を供給する。動脈の一般的な構造は、多層動脈壁によって取り囲まれた管腔からなる。

【１０２７】

用語「断片」は、それが由来する全長ポリペプチド未満の長さを有する、Ｉ－１のアミノ酸配列に由来するポリペプチドを示すために使用される。例えば、全長タンパク質のタンパク質分解的切断により、そのような断片を産生することができる。タンパク質をコードするＤＮＡ配列を、天然配列のＣ末端、天然配列のＮ末端および／または天然配列内の１つまたは複数の部位における１つまたは複数のアミノ酸を欠失させるように適切に改変することにより、そのような断片を組換えによって得ることもできる。そのような断片は、天然Ｉ－１の機能的部分を保持する。

【１０２８】

本発明の範囲内であるように意図されている別の機能的誘導体は、天然ポリペプチドと比べて１つもしくは複数のアミノ酸を欠いているかまたは追加のもしくは置換されたアミノ酸を含有するかどちらかである、「バリアント」ポリペプチドである。付加された、置換されたおよび／または追加のアミノ酸を有する、そのようなバリアントは、天然Ｉ－１の機能的部分を保持する。アミノ酸残基が欠失、挿入および／または置換されているタンパク質の機能的誘導体を、当業者に周知の標準的な技法を使用して（例えば、部位特異的変異誘発（Adelman et al., 1983, DNA 2:183）を使用して）調製することができる。あるいは、アミノ酸欠失、挿入および／または置換を有するタンパク質を、当技

術分野において周知の方法を使用して、直接化学合成により適便に調製することができる。

【１０２９】

本明細書で使用される場合、用語「突然変異体」は、野生型配列と比較して変更されているアミノ酸配列を生じさせる結果となるおよびＩ－１ポリペプチドの機能の変更を生じさせる結果となる遺伝的突然変異を含有する遺伝子から翻訳された、Ｉ－１ポリペプチドを指す。

【１０３０】

本明細書で使用される場合、用語「ホスファターゼ活性」は、一般的に使用されるモデルタンパク質基質であるＭｙＢＰに対するホスファターゼの活性を指す。本明細書では、ミエリン塩基性タンパク質（ＭｙＢＰ）は、タンパク質ホスファターゼ活性の変化を測定する際に基質（結合パートナー）として（３２Ｐで標識して）用いられる。

【１０３１】

用語「作動可能に連結された」、「作動可能に接続された」または同等の表現は、本明細書で使用される場合、様々な核酸エレメントの互いに対する配置であって、エレメントが、機能的に接続され、意図された様式で互いと相互作用できるような配置を指す。そのようなエレメントとしては、プロモーター、ＣＲＥ（例えば、エンハンサーまたは他の調節エレメント）、プロモーターエレメント、ポリアデニル化配列、１つまたは複数のイントロンおよび／またはエクソン、ならびに発現させるべき目的の遺伝子のコード配列を挙げることができるが、これらに限定されない。核酸配列エレメントは、正しい方向に置かれているまたは作動可能に連結されている場合、共に作用して互いの活性をモジュレートし、最終的に、発現産物の発現レベルに影響を与え得る。モジュレートするとは、特定のエレメントの活性のレベルを上昇させること、低下させること、または維持することを意味する。他のエレメントに対する各エレメントの位置は、各エレメントの５’末端および３’末端によって、または別のエレメントもしくは位置（例えば、ＴＳＳもしくはプロモーターエレメント）の上流側もしくは下流側のそれらの位置によって表され得、任意の特定のエレメント間の距離は、エレメント間の介在ヌクレオチドまたは塩基対の数により言及され得る。当業者により理解されているように、作動可能に連結されたは、機能活性を含意し、必ずしも天然の位置の連結に関するとは限らない。実際、核酸発現カセットにおいて使用される場合、ＣＲＥは、概して、プロモーターエレメントのすぐ上流側に位置することになる（一般的にはそうであるが、それを、決して核酸発現カセット内の位置の限定とも、除外とも解釈すべきでない）が、ｉｎ ｖｉｖｏではそうである必要がなく、例えば、遺伝子の下流側に天然に存在する調節エレメント配列であって、その遺伝子の転写に影響を与える調節エレメント配列は、プロモーターの上流側に位置するときと同様に機能することができる。したがって、特異的な実施形態によれば、調節エレメントの調節または増強効果は、位置非依存性であり得る。

【１０３２】

「スペーサー配列」または「スペーサー」は、本明細書で使用される場合、２つの機能的核酸配列（例えば、ＴＦＢＳ、ＣＲＥ、ＣＲＭ、プロモーターエレメントなど）を隔てる核酸配列である。それは、本質的にいずれの配列を有してもよいが、それが、機能的核酸配列（例えば、シス調節エレメント）が所望通りに機能することを妨げないことを条件とする（例えば、これは、それがサイレンサー配列を含む場合に起こることがあり得、所望の転写因子の結合などを妨げる）。概して、それは、非機能的であり、つまり、それは、隣接した機能的核酸配列の互いからの間隔を空けるためにのみ存在する。一部の実施形態では、スペーサーは、７５、５０、４０、３０、３０または１０ヌクレオチドまたはそれ未満の長さを有し得る。一部の実施形態では、スペーサーは、７５ヌクレオチドを超える、例えば、７５～１００、１００～２００、２００～２５０、２５０～３００ヌクレオチドの、または３００ヌクレオチドを超える長さを有し得る。

【１０３３】

用語「薬学的に許容される」は、本明細書で使用される場合、当技術に沿ったものであ

り、この用語には、医薬組成物の他の成分と適合しかつそのレシピエントに対して有害でないという意味がある。

【１０３４】

「治療有効量」という表現および同様の表現は、所望の特異的薬理効果、例えば、心組織もしくは心臓における治療用遺伝子の発現および／または血漿への分泌、をもたらす用量または対象における血漿濃度を意味する。治療有効量は、たとえ当業者がそのような投薬量を治療有効量であると思ったとしても、本明細書に記載の状態の処置に必ずしも有効であるとは限らない可能性があることが、強調される。治療有効量は、投与経路および剤形、対象の年齢および体重、ならびに／または処置される疾患もしくは状態に基づいて変わり得る。治療有効量は、たとえ当業者がそのような投薬量を治療有効量であると思ったとしても、本明細書に記載の状態の処置に必ずしも有効であるとは限らない可能性がある。

【１０３５】

用語「処置する」、「処置すること」、または「の処置」（およびこれらの文法的変化形）とは、対象の状態の重症度を低下させる、少なくとも部分的に改善するもしくは安定化すること、および／または少なくとも１つの臨床症状の何らかの緩和、軽減、減少もしくは安定化を達成すること、および／または疾患もしくは障害の進行の遅延があることを意味する。

【１０３６】

用語「予防する」、「予防すること」、および「予防」（およびこれらの文法的変化形）は、本発明の方法の非存在下で起こるものと比べて、対象における疾患、障害および／もしくは臨床症状の開始の予防および／もしくは遅延、ならびに／または疾患、障害および／もしくは臨床症状の開始の重症度の低下を指す。予防は、完全な予防、例えば、疾患、障害および／または臨床症状の全くの非存在、であることがある。予防は、対象における疾患、障害、および／もしくは臨床症状の出現、ならびに／または開始の重症度が、本発明の非存在下で起こるものに実質的に満たないような、部分的な予防であることもある。

【１０３７】

「処置有効」量は、本明細書で使用される場合、対象に何らかの改善または恩恵をもたらすのに十分である量である。別の言い方をすれば、「処置有効」量は、対象における少なくとも１つの臨床症状の何らかの緩和、軽減、減少または安定化をもたらすことになる量である。何らかの恩恵が対象に提供されるのであれば、治療効果が完全である必要も、治癒的である必要もないことは、当業者には理解されるであろう。

【１０３８】

「予防有効」量は、本明細書で使用される場合、本発明の方法の非存在下で起こるものと比べて、対象における疾患、障害、および／もしくは臨床症状の開始を予防するおよび／もしくは遅延させるのに、ならびに／または対象における疾患、障害、および／もしくは臨床症状の開始の重症度を低下および／もしくは遅延させるのに、十分である量である。何らかの予防的恩恵が対象に提供されるのであれば、予防レベルが完全である必要がないことは、当業者には理解されるであろう。

【１０３９】

本明細書で使用される場合、用語「心臓障害」は、その正常な機能を損なわせる、心臓の構造的または機能的異常を指す。例えば、心臓障害は、心不全、虚血、心筋梗塞、うっ血性心不全（ＣＨＦ）、不整脈、心筋症、心収縮性の障害、移植拒絶反応などであり得る。この用語は、収縮異常を特徴とする障害、Ｃａ２＋代謝異常、および不整脈を特徴とする障害を含む。

【１０４０】

用語「心臓疾患」は、急性および／または慢性心機能障害を指す。心臓疾患は、多くの場合、心収縮機能の低下を伴い、心筋への血流の観測可能な減少（例えば、冠動脈疾患の結果としての）を伴うこともある。心臓疾患の徴候としては、心筋虚血が挙げられ、これ

は、狭心症、心臓発作および／またはうっ血性心不全につながり得る。この用語は、心臓への、特に心細胞または心筋細胞への、活性化合物の投与により処置可能および／または予防可能な疾患に関する。一部の実施形態では、心臓障害は、心不全、またはうっ血性心不全（ＣＨＦ）である。

【１０４１】

用語「心筋症（複数形）」は、うっ血性心不全を生じさせる疾患群を指す。心筋症は、機械的および／または電気的機能障害に関連する心筋の不均一な疾患群であり、これらの疾患は、通常、不適切な心室肥大または拡張を示し、遺伝的原因を含む様々な原因に起因する。

【１０４２】

本明細書で使用される場合、用語「心筋症（単数形）」は、心筋（ｍｙｏｃａｒｄｉｕｍ）（すなわち、心筋（ｈｅａｒｔ　ｍｕｓｃｌｅ））の機能の低下を指す。心筋症は、外因性である（例えば、原発病変が、例えば虚血に起因して、心筋自体の外側に存する）こともあり、内因性である（例えば、心筋力低下が、特定可能な外因に起因しない）こともある。

【１０４３】

用語「うっ血性心不全」または「ＣＨＦ」は、「心不全」または「慢性心不全」と同義でもあり、心臓に生じる病的状態の徴候であり、心臓が、身体の代謝要求を満たすのに十分な速度で血液を送り出すことができないことを指す。

【１０４４】

用語「心不全」は、臨床的には、心臓が代謝要求を満たすのに十分な血流を身体に提供しない状態と定義される。症状としては、息切れ、疲労、脱力感、下肢の腫脹、および運動耐容量低下が挙げられる。身体検査で、心不全を有する患者は、心拍数および呼吸数の上昇、ラ音（肺内部の液体貯留の指標）、浮腫、頸静脈怒張、および多くの場合、心臓肥大を有する傾向がある。重度心不全を有する患者は、高い死亡率を被り、概して、患者の５０％は、この状態の発症から２年以内に死亡する。一部の場合では、心不全は、重度冠動脈疾患（「ＣＡＤ」）に関連しており、概して、ＣＡＤは、本明細書においておよび当技術分野において説明されているように、心筋梗塞、および進行性慢性心不全または急性低心拍出量状態のどちらかに至る。他の場合には、心不全は、拡張型心筋症に関連しており、重度冠動脈疾患に関連していない。別の言い方をすれば、用語「心不全」は、心臓に、身体の要求を満たすために十分に送り出すその能力の欠陥がある、いくつかの障害のうちのいずれかを指す。多くの場合、心不全は、心細胞の興奮・収縮連関の様々なステップにおける細胞レベルでの１つまたは複数の異常の結果である。１つのそのような異常は、ＳＲ機能不全である。心不全は、多くの理由で起こり得る心筋収縮の障害に最も高頻度に起因し、その最も一般的な理由としては、心筋の虚血性損傷、心臓からの血液の流出に対する過剰な機械的抵抗、弁機能不全に起因する心室の過負荷、心筋の感染もしくは炎症、または先天的に低下している心筋収縮機能が挙げられる。（Ｂｒａｕｎｗａｌｄ，Ｅ．２００１　Ｈａｒｒｉｓｏｎ'ｓ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　Ｉｎｔｅｒｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１５ｔｈ　ｅｄ．，ｐｐ１３１８-２９）。

【１０４５】

用語「末梢血管疾患」は、末梢（すなわち、非心）脈管構造および／またはそれによって供給される組織の急性または慢性機能障害を指す。心臓疾患と同様に、末梢血管疾患は、概して、脈管構造により供給される組織への不十分な血流の結果として生じ、この血液不足は、例えば、虚血に、または重症例では組織細胞死につながり得る。末梢血管疾患の態様は、末梢動脈閉塞性疾患（ＰＡＯＤ）および末梢筋肉虚血を含むが、これらに限定されない。高い頻度で、末梢血管疾患の症状は、患者の体肢、特に下肢に現れる。

【１０４６】

用語「心血管状態」は、冠動脈疾患／虚血、冠動脈疾患（ＣＡＤ）、虚血、狭心症（胸痛）、血栓症、冠動脈血栓症、心筋梗塞（ＭＩ）、無症状虚血、狭窄／再狭窄、一過性脳虚血発作（ＴＩＡ）、アテローム性動脈硬化症、末梢血管疾患、例えば、徐脈性不整脈、徐脈、病的な洞調律（洞機能不全症候群）、洞性徐脈、洞房ブロック、心拍停止、洞停止

、失神、第１度房室（ＡＶ）ブロック、第２度房室（ＡＶ）ブロック、第３度房室（ＡＶ）ブロック、機能不全である異常な徐脈性不整脈、例えば、頻脈性不整脈、頻脈、細動、粗動、心房細動、心房粗動、家族性心房細動、発作性心房細動、永続性心房細動、持続性心房細動、上室性頻脈性不整脈、洞頻脈、リエントリー（リエントリー性不整脈）、ＡＶ結合リエントリー、限局性不整脈、トランスロケーション、心室細動（ＶＦ）、心室頻拍（ＶＴ）、ウォルフ・パーキンソン・ホワイト症候群（ＷＰＷ）、心突然死、頻脈性不整脈、例えば、心不全、心筋症、うっ血性心不全、肥大型心筋症、リモデリング、非虚血性心筋症、拡張期心筋症、拘束型心筋症、拡張期心不全、収縮期心不全、慢性心不全である心不全、例えば、房室（ＡＶ）遮断、脚ブロック（ＢＢＢ）、左脚ブロック（ＬＢＢＢ）、右脚ブロック（ＲＢＢＢ）、長期ＱＴ症候群（ＬＱＴＳ）、心室性期外収縮（ＰＶＣ）、電気的リモデリング、心室内伝導障害、ヘミブロック・ある特定の心ブロック／電気的障害、例えば、高血圧、低血圧、左室機能障害、低駆出率、低心拍出量、低心拍出量血行動態不全、心突然死、心停止突然に心臓（ＳＣＤ）、心室細動、心力不全、細菌性心内膜炎、ウイルス性心筋炎、心膜炎、リウマチ性心臓疾患を含むが、これらに限定されず、心膜炎はない。特に、心血管状態は、例えば心房細動も心室細動も徐脈も伴わない肥厚である不整脈、虚血、心不全、腫瘍性疾患、心室リモデリング、拡張機能障害、異常な体温、例えば、変更された静脈、左室もしくは左房圧、異常なもしくは変化する圧力、異常なもしくは変化する心拍もしくは心音、異常なもしくは変化する電位図、例えば、変化する血液ｐＨ、グルコースpO_2、pCO_2、分時換気量、クレアチン、ＣＲＰ、ＭＥＦ２Ａ、クレアチンキナーゼもしくはクレアチンキナーゼＭＢレベル、異常なもしくは変更された心代謝、異常なもしくは変更された肺インピーダンスもしくは胸部インピーダンス、異常なもしくは変更された一回拍出量、異常なもしくは変更された神経ホルモンレベル、異常なもしくは変更された電気活動、異常なもしくは変更された感受性の神経活動、異常なもしくは変更された腎排泄量、上記の異常なもしくは変更されたアンジオテンシンＩＩレベルに関連し得る異常なもしくは変更された濾過率、または異常なもしくは変更された呼吸音を含むがこれに限定されない。

【１０４７】

用語「心筋虚血」または「ＭＩ」は、心筋が、十分なレベルの酸素および栄養を受け取らない状態であり、この状態は、概して、心筋への不十分な血液供給（例えば、冠動脈疾患の結果としての）に起因する。

【１０４８】

用語「冠動脈疾患」および「急性冠症候群」は、本明細書では同義で使用され、不十分な、望ましくないまたは異常な心機能を特徴とするあらゆる障害、例えば、虚血性心疾患、高血圧性心臓疾患および肺性高血圧性心臓疾患、弁膜疾患、うっ血性心疾患、ならびに対象、特に、ヒト対象においてうっ血性心不全を引き起こす任意の状態を含む、心血管状態、疾患または障害を指す、心筋梗塞を指す。不十分なまたは異常な心機能は、疾患、傷害および／または加齢の結果であり得る。背景として、心筋傷害に対する応答は、明確に定義された経路をたどり、この経路において、一部の細胞は死滅し、その一方で他の細胞は、まだ死滅していないが機能していない冬眠状態に入る。これに続いて、炎症細胞の浸潤、瘢痕の一部としてのコラーゲンの沈着が起こり、これらのすべてが、新たな血管の内方成長およびある程度の連続細胞死と並行して起こる。

【１０４９】

本明細書で使用される場合、用語「虚血」は、血液の流入の低減に起因する任意の局所組織虚血を指す。用語「心筋虚血」は、アテローム性冠動脈硬化症、および／または心筋への不十分な酸素供給により引き起こされる循環障害を指す。例えば、急性心筋梗塞は、心筋組織への不可逆的な虚血侵襲を表す。この損傷は、冠循環において閉塞（例えば、血栓性または塞栓性）事象を生じさせる結果となり、心筋代謝要求が心筋組織への酸素供給を上回る環境を生じさせる。

【１０５０】

本明細書で使用される場合、用語「心臓細胞」は、（ａ）対象体内に存在する心臓の一

部、（ｂ）ｉｎ　ｖｉｔｒｏで維持されている心臓の一部、（ｃ）心臓組織の一部、または（ｄ）対象の心臓から単離されている細胞であり得る、細胞を指す。例えば、細胞は、筋肉細胞、例えば、心臓筋細胞（心筋細胞）または平滑筋細胞であり得る。本発明の心臓細胞は、心臓内の内皮細胞、例えば、毛細血管、動脈または他の血管の細胞も含み得る。心臓細胞は、ペースメーカー細胞などを含む。

【１０５１】

本明細書で使用される場合、用語「心臓」は、対象体内に存在する心臓、または対象体外にｅｘ　ｖｉｖｏで維持されている心臓を指す。

【１０５２】

本明細書で使用される場合、用語「心臓組織」は、対象の心臓に由来する組織を指す。

【１０５３】

本明細書で使用される場合、用語「収縮性」（心筋収縮性の場合のような）は、心筋の動作を指す。それは、多くの場合、所与の線維長で収縮する心筋線維の内因性の能力と定義される。

【１０５４】

本明細書で使用される場合、用語「血流を制限すること」は、血管を通る血流、例えば、遠位大動脈およびその枝への血流を、実質的に遮断することを指す。例えば、心臓から流出する血液の少なくとも５０％が制限され、好ましくは、血液の７５％、より好ましくは８０、９０または１００％が、心臓からの流出を制限される。大動脈および肺動脈を、例えばクランプで、塞ぐことにより、血流を制限することができる。

【１０５５】

本明細書で使用される場合の用語「ＡＡＶベクター」は、当技術分野において周知であり、一般に、様々な核酸配列を含むＡＡＶベクター核酸配列を指す。本明細書で使用される場合のＡＡＶベクターは、概して、ＡＡＶに由来しない異種核酸配列をベクターの一部として含む。この異種核酸は、本明細書で開示されるプロモーターはもちろん、細胞の遺伝子形質転換のための目的の他の配列も、概して含む。一般に、異種核酸配列は、少なくとも１つの、一般には２つのＡＡＶ逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）と隣接している。「ＡＡＶビリオン」または「ＡＡＶウイルス」または「ＡＡＶウイルス粒子」または「ＡＡＶベクター粒子」は、少なくとも１つのＡＡＶカプシドポリペプチド（バリアントＡＡＶカプシドポリペプチドと非バリアント親カプシドポリペプチドの両方を含む）とカプシド化されたポリヌクレオチドＡＡＶベクターとで構成されているウイルス粒子を指す。粒子が異種核酸（すなわち、野生型ＡＡＶゲノム以外のポリヌクレオチド、例えば、哺乳動物細胞に送達されることになる導入遺伝子）を含む場合、それは、「ＡＡＶベクター粒子」、または単に「ＡＡＶベクター」と呼ばれ得る。したがって、ＡＡＶビリオンまたはＡＡＶ粒子の産生は、ＡＡＶベクターの産生を必然的に含む。そのようなベクターは、ＡＡＶビリオンまたはＡＡＶ粒子内に含有されるからである。ＩＴＲは、表１１に収載されている血清型のいずれかから選択されるカプシドと同じ血清型に由来することもあり、またはそのカプシドとは異なる血清型に由来することもある。２つのＩＴＲが同じである必要はない。加えて、合成ＩＴＲを使用することができる。ＡＡＶベクターは、概して、１つより多くのＩＴＲを有する。非限定的な例では、ＡＡＶベクターは、２つのＩＴＲを含むウイルスゲノムを有する。一実施形態では、ＩＴＲは、互いに同じ血清型のものである。一部の実施形態では、ＩＴＲは、異なる血清型のものである。非限定的な例は、カプシドと同じ血清型を有する、ＩＴＲを全く含まないか、一方のＩＴＲを含むか、または両方のＩＴＲを含む。独立して、各ＩＴＲは、長さ約１００ヌクレオチド～約１５０ヌクレオチドであり得る。ＩＴＲは、長さ約１００～１０５ヌクレオチド、長さ１０６～１１０ヌクレオチド、長さ１１１～１１５ヌクレオチド、長さ１１６～１２０ヌクレオチド、長さ１２１～１２５ヌクレオチド、長さ１２６～１３０ヌクレオチド、長さ１３１～１３５ヌクレオチド、長さ１３６～１４０ヌクレオチド、長さ１４１～１４５ヌクレオチドまたは長さ１４６～１５０ヌクレオチドであり得る。一実施形態では、ＩＴＲは、長さ１４０～１４２ヌクレオチドである。ＩＴＲ長の非限定的な例は、長さ１０２、１０５、１３０、１４０

、１４１、１４２、１４５ヌクレオチドである。

【１０５６】

本明細書で使用される場合、用語「マイクロＲＮＡ」は、内因性マイクロＲＮＡおよび人工マイクロＲＮＡ（例えば、合成ｍｉＲＮＡ）を含むがこれらに限定されない、任意のタイプの干渉ＲＮＡを指す。内因性マイクロＲＮＡは、ｍＲＮＡの生産利用をモジュレートすることができる、ゲノム内に天然にコードされている低分子ＲＮＡである。人工マイクロＲＮＡは、ｍＲＮＡの活性をモジュレートすることができる、内因性マイクロＲＮＡ以外の、任意のタイプのＲＮＡ配列であり得る。マイクロＲＮＡ配列は、これらの配列のいずれか１つまたは複数で構成されているＲＮＡ分子であり得る。マイクロＲＮＡ（または「ｍｉＲＮＡ」）配列は、Lim, et al, 2003, Genes & Development, 17, 991-1008、Lim et al, 2003, Science, 299, 1540、Lee and Ambrose, 2001, Science, 294, 862、Lau et al, 2001, Science 294, 858-861、Lagos -Quintana et al, 2002, Current Biology, 12, 735-739、Lagos- Quintana et al., 2001, Science, 294, 853-857、およびLagos-Quintana et al., 2003, RNA, 9, 175- 179などの、公表文献に記載されている。マイクロＲＮＡの例としては、より大きいＲＮＡの任意のＲＮＡ断片が挙げられ、またはｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｔＲＮＡ、ｓｎｃＲＮＡ、ｔｎｃＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｍＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、もしくは他の低分子ノンコーディングＲＮＡである。例えば、米国特許出願公開第２００５０２７２９２３号、同第２００５０２６６５５２号、同第２００５０１４２５８１号、および同第２００５００７５４９２号を参照されたい。「マイクロＲＮＡ前駆体」（またはプレｍｉＲＮＡ」）は、内部にマイクロＲＮＡ配列が組み込まれているステム－ループ構造を有する核酸を指す。「成熟マイクロＲＮＡ」（または「成熟ｍｉＲＮＡ」）は、マイクロＲＮＡ前駆体（「プレｍｉＲＮＡ」）から切断されたマイクロＲＮＡ、または合成された（例えば、無細胞合成により研究所で合成された）マイクロＲＮＡを含み、約１９ヌクレオチド～約２７ヌクレオチドの長さを有し、例えば、成熟マイクロＲＮＡは、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ、２６ｎｔ、または２７ｎｔの長さを有し得る。成熟マイクロＲＮＡは、標的ｍＲＮＡに結合し、標的ｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる。

【１０５７】

用語「処置」または「処置すること」は、疾患または状態の１つまたは複数の兆候、症状または疾患もしくは状態の効果を軽減すること、改善することまたは消失させることを指す。したがって、「処置」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物における、特にヒトにおける、疾患の任意の処置を含み、（ａ）疾患の素因を有するまたは疾患を獲得するリスクがあるがまだ疾患を有すると診断されていない対象において疾患が起こるのを予防すること；（ｂ）疾患を抑えること、すなわち、その発症を抑止すること；および（ｃ）疾患を和らげること、すなわち、疾患の退行を生じさせることを含む。

【１０５８】

一部の実施形態では、用語「処置する」または「処置」または「処置すること」は、その目的が疾患の発症を予防または緩徐化すること、例えば、心障害の発症を遅らせること、または心血管状態、疾患もしくは障害、すなわち、不十分なもしくは望ましくない心機能を特徴とする任意の障害、の少なくとも１つの有害効果もしくは症状を軽減することである、治療的処置を指す。心障害の有害効果または症状は、当技術分野において周知であり、呼吸困難、胸痛、動悸、めまい、失神、浮腫、チアノーゼ、蒼白、疲労および死亡を含むが、これらに限定されない。処置は、１つまたは複数の症状または臨床マーカーが、その用語が本明細書で定義されるように軽減／低減される場合、一般に、「有効」である。あるいは、処置は、疾患の進行が軽減されるまたは食い止められる場合、「有効」である。すなわち、「処置」は、症状の改善または疾患のマーカーの減少ばかりでなく、処置の非存在下で予想される症状の進行または悪化の停止または緩徐化も含む。有益なまたは所望の臨床結果は、検出可能であるか、検出不能であるかにかかわらず、１つまたは複数の症状の緩和、疾患の程度の低下、病状の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患進

行の遅延または緩徐化、病状の改善または軽減、および寛解（部分寛解であるか完全寛解あるかにかかわらず）を含むが、これらに限定されない。「処置」は、処置を受けなかった場合の予想生存期間と比較して生存期間を延長することも意味し得る。処置を必要とする者は、心臓の状態があると既に診断されている者はもちろん、遺伝的感受性または他の因子、例えば、体重、食事および健康に起因して心臓の状態を発症する可能性が高い者も含む。一部の実施形態では、処置することという用語は、疾患または障害の開始を予防するための本明細書で開示される医薬組成物の投与を含む、予防対策および／または予防的処置も包含する。

【１０５９】

用語「有効量」は、本明細書で使用される場合、医薬組成物の治療剤の量、例えば、疾患または障害の少なくとも１つまたは複数の症状を軽減させるのに十分な量のタンパク質を発現させるための合成改変ＲＮＡの量を指し、所望の効果をもたらすのに十分な医薬組成物の量に関する。例えば、本明細書で開示される合成改変ＲＮＡの、「治療有効量」という表現は、本明細書で使用される場合、任意の医療処置に適用できる妥当なリスク／ベネフィット比で、障害を処置するのに十分な組成物の量を意味する。したがって、用語「治療有効量」は、例えば、心血管状態、疾患または障害を有する典型的な対象に投与されたときに心機能障害または心障害に関連する症状または臨床マーカーの治療的にまたは予防的に有意な軽減／低減を生じさせるのに十分である、本明細書で開示される組成物の量を指す。

【１０６０】

症状の治療的に有意な軽減は、例えば、対照または無処置対象と比較して測定されるパラメーターの少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約１００％、少なくとも約１２５％、少なくとも約１５０％、またはそれより高度である。測定されるまたは測定可能なパラメーターとしては、疾患の臨床的に検出可能なマーカー、例えば、生物学的マーカーのレベル上昇もしくは低下、ならびに疾患または障害の症状またはマーカーの臨床的に許容される尺度に関するパラメーターが挙げられる。本明細書で開示される組成物および製剤の全１日使用量が担当医により正当な医学的判断の範囲内で決定されることは、理解されるであろう。必要とされる正確な量は、処置される疾患のタイプなどの因子によって変わることになる。

【１０６１】

例えば対象における心血管状態または疾患の、処置に関して、用語「治療有効量」は、心血管疾患または障害の発症を予防または遅延させるのに安全かつ十分である量を指す。したがって、この量は、心血管疾患もしくは障害を治癒するもしくは寛解させることができ、心血管疾患進行の経過を緩徐化することができ、心血管疾患もしくは障害の症状を緩徐化するもしくは抑えることができ、心血管疾患もしくは障害の二次症状の定着を緩徐化するもしくは抑えることができ、または心血管疾患もしくは障害の二次症状の発症を抑えることができる。心血管疾患または障害の処置のための有効量は、処置されることになる心血管疾患のタイプ、症状の重症度、処置される対象、対象の年齢および全身状態、投与方法などに依存する。したがって、正確な「有効量」を明記するのは難しい。しかし、任意の所与の症例について、適切な「有効量」を、当業者は日常の実験をもっぱら使用して決定することができる。処置の有効性を、当業者は判断することができ、例えば、有効性を、本明細書で論じられるような心血管疾患または障害の動物モデル、例えば、急性心筋梗塞または虚血再灌流傷害を有する齧歯動物の処置、および本明細書で開示されるような心血管疾患または障害の少なくとも１つの症状の減少につながる任意の処置または組成物もしくは製剤の投与、で評定することができ、例えば、心臓駆出率の上昇、心不全率の低下、梗塞サイズの減少、関連する病的状態（肺水腫、腎不全、不整脈）の減少　運動耐容量または他のクオリティオブライフ尺度の改善、ならびに死亡率の低下は、有効な処置を示す。組成物が心血管疾患または障害の処置に使用される実施形態では、組成物の有効性

を、心血管疾患の実験動物モデル、例えば、虚血再灌流傷害の動物モデル（Headrick JP, Am J Physiol Heart circ Physiol 285;H1797;2003）および急性心筋梗塞の動物モデル（Yang Z, Am J Physiol Heart Circ. Physiol 282:H949:2002; Guo Y, J Mol Cell Cardiol 33;825-830, 2001）、または心不全のモデル（Mann, Douglas L., and G. Michael Felker. "Mechanisms and models in heart failure: a translational approach." Circulation research 128.10 (2021): 1435-1450に開示される）、例えば、心筋症のモデルであるα－アクチントランスジェニックマウス（mアクチン－Tgマウス）を使用して、判断することができる。

【１０６２】

実験動物モデルを使用する場合、処置の有効性は、心血管疾患または障害の症状の軽減、例えば、呼吸困難、胸痛、動悸、めまい、失神、浮腫、チアノーゼ、蒼白、疲労および高血圧のうちの１つまたは複数の症状の軽減、これが、未処置動物に対して処置動物においてより早く生じた場合に証明される。「より早く」とは、例えば腫瘍のサイズの、減少が、少なくとも５％早く、しかし好ましくはそれよりもっと早く、例えば、１日早く、２日早く、３日早く、またはそれよりもっと早く起こることを意味する。

【１０６３】

本明細書で使用される場合、心血管疾患または障害の処置に関して使用されるときの用語「処置すること」は、心血管疾患または障害の、症状の軽減および／または生化学的マーカーの低減を指すために使用され、例えば、心血管疾患の少なくとも１つの生化学的マーカーの少なくとも約１０％の低減は、有効な処置と考えられることになる。心血管疾患のそのような生化学的マーカーの例としては、例えば、血液中のクレアチンホスホキナーゼ（ＣＰＫ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）、の低減、ならびに／または心電図（ＥＣＧもしくはＥＫＧ）、もしくは心エコー図（心臓超音波検査）、ドプラ超音波検査および核医学イメージングにより測定して当業者により決定されるような、心血管疾患の症状の軽減ならびに／もしくは血流および心機能の改善が挙げられる。心血管疾患の症状の少なくとも約１０％の軽減もまた、本明細書で開示される方法による有効な処置と考えられることになる。代替例として、心血管疾患の症状の軽減、例えば、呼吸困難、胸痛、動悸、めまい、失神、浮腫、チアノーゼなどのうちの少なくとも１つの少なくとも約１０％の軽減もしくはそのようなシステムの停止、または心血管疾患の１つのそのような症状のサイズの少なくとも約１０％の縮小もまた、本明細書で開示される方法による有効な処置と考えられることになる。一部の実施形態では、治療剤は、心血管疾患または障害を実際に消失させる必要がなく、むしろ症状を管理可能な程度に単に軽減することが好ましい。

【１０６４】

本明細書で使用される場合、用語「治療効果がある」および「処置の成功」は、本質的に同じ意味を有する。具体的に言うと、心血管疾患または心臓疾患に罹患している患者は、患者が、本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターを本発明の方法に従って受けた後に心臓疾患の症状のうちの１つまたは複数の観測可能なおよび／もしくは測定可能な軽減または非存在を示した場合、その状態の「処置」に成功した患者である。これらの兆候または症状の軽減を患者も感じることができる。したがって、心臓疾患状態の処置の成功の指標は、狭心症、疲労、脱力感、息切れ、下肢の腫脹、ラ音、心拍数もしくは呼吸数、浮腫、または頸静脈怒張の症状のいずれか１つの軽減を示すまたは感じる患者を含む。患者はまた、より大きい運動耐容量を示し、心室および心機能が改善されたより小さい心臓を有し、一般に、心臓の状態に関して必要とする通院の回数がより少ない。心血管機能の改善は、患者の代謝要求を満たすのに十分なものであり得、患者は、軽度の労作下または安静時には症状を示さないことがある。これらの兆候および症状の多くは、容易に目視で観測可能であり、および／または医師によく知られている日常の手順により測定可能である。心血管機能の改善の指標は、処置された組織の血流増加および／または収縮機能増大を含む。下記で説明されるように、患者の血流は、タリウムイメージング（Braunwald in

Heart Disease, 4th ed., pp. 276-311 (Saunders, Philadelphia, 1992)により記載されているような）により、または心エコー（実施例１および５で説明される、ならびにSahn, D J., et al., Circulation. 58:1072-1083, 1978に記載されている）により、測定することができる。本明細書で開示される投与方法による本明細書で開示されるｒＡＡＶベクターでの処置前および処置後の血流を、これらの方法を使用して比較することができる。心臓機能の改善は、上述のような兆候および症状の軽減と関連付けられる。心エコーに加えて、当技術分野において公知であるような核（非侵襲的）技法により駆出率（ＬＶ）を測定することができる。本発明に従って処置した末梢組織において血流および収縮機能を同様に測定することができる。

【１０６５】

対象への薬剤の「投与」は、対象への薬剤のその所期の機能を果たすための任意の導入または送達経路を含む。投与は、経口で、鼻腔内に、眼内に、眼科的に、非経口で（血管内に、筋肉内に、腹腔内に、もしくは皮下に）、または局所的に行うことを含む、任意の好適な経路により行うことができる。投与は、自己投与および他者による投与を含む。静脈内または動脈内投与は、本発明において特に興味深い。

【１０６６】

用語「個体」、「対象」、および「患者」は、同義で使用され、処置を必要とする疾患または状態を有する任意の個々の対象を指す。本開示の目的では、対象は、霊長類、好ましくはヒト、または別の哺乳類、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ヤギもしくはウシ亜科動物などであり得る。

【１０６７】

用語「エリアにおいてまたは組織において特異的に活性な」は、主にそのエリアまたは組織において活性である、すなわち、そのエリアまたは組織において他のエリアまたは組織より活性である、プロモーターを指す。

【１０６８】

別段の指示がない限り、「効率的形質導入」または「効率的親和性」または同様の用語は、好適な対照を参照することにより決定され得る（例えば、対照の形質導入または親和性の、それぞれ、少なくとも約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、３５０％、４００％、５００％、またはそれより高い％）。特定の実施形態では、ウイルスベクターは、神経細胞および心筋細胞に効率的に形質導入するか、またはそれに対する効率的親和性を有する。好適な対照は、所望の親和性および／または形質導入プロファイルをはじめとする様々な因子に依存することになる。

【１０６９】

「治療用ポリペプチド」は、細胞もしくは対象におけるタンパク質の非存在もしくは欠損の結果として生じる症状を緩和、軽減、予防、遅延および／もしくは安定化することができるポリペプチドであり、ならびに／あるいは別様に対象に恩恵、例えば、疾患の症状を軽減もしくは消失させるための酵素補充、または移植片の生存性の向上、または免疫応答の誘導をもたらす、ポリペプチドである。

【１０７０】

用語「異種ヌクレオチド配列」および「異種核酸分子」は、本明細書では同義で使用され、ウイルスに天然に存在しない核酸配列を指す。一般に、異種核酸分子または異種ヌクレオチド配列は、目的の（例えば、細胞および／または対象への送達のための）ポリペプチドおよび／または非翻訳ＲＮＡ、例えばＰＰ１の阻害剤、をコードするオープンリーディングフレームを含む。

【１０７１】

さらに、用語「約」は、測定可能な値、例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の長さの量、用量、時間、温度などへの言及の際に本明細書で使用される場合、まさにその指定量、および指定量の±２０％、±１０％、±５％、±１％、±０．５％、また

はさらには±０．１％の変量を包含するように意図されている。

【１０７２】

また、本明細書で使用される場合、「および／または」は、付随する列挙されている事柄の１つまたは複数についての任意のおよびすべての可能な組合せはもちろん、選択的に（「または」と）解釈されるときには組合せの欠如も指し、それらを包含する。

【１０７３】

本明細書で使用される場合、移行句「から本質的なる」は、請求項の範囲を、その請求項で述べられている指定物質またはステップと、請求項記載の発明の「基本および新規特徴に実質的に影響を与えないもの」とを包含するように解釈すべきであることを意味する。In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461,463 (CCPA 1976)（強調は原文通り）を参照されたい：MPEP § 2111.03も参照されたい。したがって、用語「から本質的になる」は、本発明の請求項で使用される場合、「含む」と同等であると解釈されるように意図されていない。文脈による別段の指示がない限り、本明細書に記載の本発明の様々な特徴を任意の組合せで使用することができることが、特に意図されている。

【１０７４】

さらに、本発明は、本発明の一部の実施形態では、本明細書で示される任意の特徴または特徴の組合せが除外または削除され得ることも企図している。

【実施例】

【１０７５】

材料および方法

【１０７６】

ＤＮＡ調製物をＨ９Ｃ２（ラットＢＤＩＸ心臓筋芽細胞細胞株、ＡＴＣＣから入手可能）、Ｃ２Ｃ１２（不死化マウス筋芽細胞細胞株、ＡＴＣＣから入手可能）、またはＨ２Ｋ２Ｂ４（不死化サテライト細胞由来の細胞株、PLoS One. 2011; 6(9): e24826を参照されたい）にトランスフェクトして、転写活性を評価した。

【１０７７】

Ｈ９Ｃ２細胞培養およびトランスフェクション

【１０７８】

Ｈ９Ｃ２は、ラットＢＤＩＸ心臓筋芽細胞細胞株（ラット心筋細胞）である。それらは、骨格筋特性を有し、例えば、集密状態（confluency）で形成される筋管がアセチルコリンに応答する。

【１０７９】

Ｈ９Ｃ２細胞維持：Ｈ９Ｃ２細胞を、Ｔ－７５フラスコ内で、１％ＦＢＳ（熱不活性化型－Ｇｉｂｃｏ １０２７０－１０６、ロット番号４２Ｇ２０７６Ｋ）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン溶液（１５１４０－１２２、Ｇｉｂｃｏ）を伴う、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ）で培養した。細胞が集密になり、融合して筋管を形成するリスクを回避するために、細胞を亜集密段階（７０～８０％）で継代させた。

【１０８０】

細胞維持しながら継代するために、培養培地を除去し、$CaCl_2$不含、$MgCl_2$不含のＤＰＢＳ（１４１９０－０９４、Ｇｉｂｃｏ）５ｍｌで細胞を２回洗浄した。１ｍｌのトリプシンＥＤＴＡ（２５２００－０５６、Ｇｉｂｃｏ）とともにおよそ５分間インキュベートすることにより、細胞をフラスコから剥離させた。次いで、４ｍｌの培養培地をフラスコに添加し、混合物を穏やかにピペットで吸い上げ、吐き出して、フラスコ表面からの細胞の剥離を助けた。１００ｇで３分間、細胞をペレット化した。上清を廃棄し、細胞を３ｍｌの培養培地に再浮遊させた。細胞をＣｏｕｎｔｅｓｓ自動細胞計数器で計数し、１：３～１：１０で播種し（すなわち、１～３×１０，０００細胞／cm^2を播種すること）、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

【１０８１】

Ｈ９Ｃ２細胞トランスフェクションおよび分化：Ｈ９Ｃ２細胞を、集密度おおよそ７０～８０％の２本のＴ－７５フラスコから、上記で説明したような、ＤＰＢＳでの洗浄、１ｍｌのトリプシンＥＤＴＡを使用するフラスコからの剥離、４ｍｌの培養培地でのフラスコの表面から洗浄除去、および１００ｇで３分間のペレット化によって、収集した。細胞を４５ｍｌの培養培地に再浮遊させ、４８ウェル平底プレート（３００μｌ／ウェル）（３５３２３０、Ｃｏｒｎｉｎｇ）に４０，０００細胞／ウェルの密度で播種した。４８ウェルプレート内の細胞を、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

【１０８２】

２４時間後、細胞上の培養培地を、３００μｌの抗生物質不含培養培地（すなわち、１％ＦＢＳ（熱不活性化型－Ｇｉｂｃｏ　１０２７０－１０６、ロット番号４２Ｇ２０７６Ｋ）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）を伴う、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ））と交換した。１ウェルあたり３００ｎｇのＤＮＡに、ｖｉａｆｅｃｔ（Ｅ４９８１、Ｐｒｏｍｅｇａ）を、１ウェルあたり３０μｌの総複合体体積でトランスフェクトした。プレートをトランスフェクション後に穏やかに混合し、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

【１０８３】

２４時間後、培養培地をトランスフェクト細胞から除去し、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）、１％ＦＢＳ（熱不活性化型－Ｇｉｂｃｏ　１０２７０－１０６、ロット番号４２Ｇ２０７６Ｋ）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン溶液（１５１４０－１２２、Ｇｉｂｃｏ）および０．１％レチノイン酸（Ｓｉｇｍａ－Ｒ２６２５）からなる、３００μｌの分化培地と交換した。プレートを３７℃、５％CO_2で７日間インキュベートして分化を誘導した。分化後、細胞形態を観察して、筋管への分化を確認した。

【１０８４】

次いで、細胞を５００μｌのＤＰＢＳで洗浄し、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水を使用して１Ｘに希釈した１００μｌのＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｌｙｓｉｓ　５Ｘ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｅ１５３１、Ｐｒｏｍｅｇａ）で溶解した。細胞溶解試薬を、１０回、ピペットで吸い上げ、吐き出し、次いで、プレートを中出力で３０分間ボルテックスして細胞溶解を促進した。ルシフェラーゼアッセイを完了する前に、プレートを密封し、－８０℃で保管した。Ｈ９Ｃ２細胞におけるトランスフェクション後のルシフェラーゼアッセイから収集したすべてのデータは、３回の技術的反復実験および３回の生物学的反復実験に基づく。

【１０８５】

Ｈ２Ｋ　２Ｂ４（Ｈ２Ｋ）細胞培養およびトランスフェクション

【１０８６】

Ｈ２Ｋ細胞維持：Ｈ２Ｋ細胞は、マウス骨格筋細胞であり、それらを、Ｔ－７５フラスコ内で、２０％ＦＢＳ（熱不活性化型－Ｇｉｂｃｏ　１０５００－０６４、ロット番号０８Ｑ２７７１Ｋ）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン溶液（１５１４０－１２２、Ｇｉｂｃｏ）、０．５％ニワトリ胚抽出物（ＭＤ－ＯＯ４Ｅ－ＵＫ、ＬＳＰ、ロット番号Ａ２０４１８）、０．２％マウスＩＦＮ－γ（３１５－０５、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、ロット番号０６１７９８Ｃ２９１８）を伴う、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ）で培養した。細胞を、３～４日ごとに、細胞が４の集密度－６．７×10^4細胞／cm^2に達したとき、継代した。継代するために、培養培地を除去し、$CaCl_2$不含、$MgCl_2$不含のＤＰＢＳ（１４１９０－０９４、Ｇｉｂｃｏ）５ｍｌで細胞を２回洗浄し、１ｍｌのトリプシンＥＤＴＡ（２５２００－０５６、Ｇｉｂｃｏ）を使用してフラスコから細胞を剥離させた。細胞をトリプシンＥＤＴＡとともにおおよそ２分間インキュベートした後、４ｍｌの培養培地をフラスコに添加し、穏やかにピペットで吸い上げ、吐き出して、フラスコ表面から細胞を洗い落とした。１００ｇで３分間、細胞をペレット化した。上清を廃棄し、細胞を６ｍｌの培養培地に再浮遊させた。細胞をＣｏｕｎｔｅｓｓ自動細胞計数器で計数し、４０

００、２７００、２０００または１３００細胞／ｃｍ^{2}という４つの密度で播種し、３３℃、１０％CO_2でインキュベートした。

【１０８７】

Ｈ２Ｋ細胞トランスフェクションおよび分化：Ｈ２Ｋ細胞を、集密度おおよそ２０～４０％の３本のＴ－７５フラスコから、ＤＰＢＳでの洗浄、１ｍｌのトリプシンＥＤＴＡを使用するおおよそ２分間のフラスコからの剥離、４ｍｌの培養培地でのフラスコの表面から洗浄除去、および１００ｇで３分間のペレット化によって収集した。細胞を、４５ｍｌの培養培地に８０００細胞／１００μｌ培養培地の密度で再浮遊させた。次いで、ＢｉｏＦｉｌｌ Ｓｏｌｏ試薬ディスペンサー（Ｂｒｏｏｋｓ Ａｕｔｏｍａｔｉｏｎ Ｌｔｄ、カタログ番号３４－１０００）を使用して、１００μｌの細胞浮遊液を、９６ウェルＭａｔｒｉｇｅｌ被覆（Ｃｏｒｎｉｎｇ、参照番号３５４２３４、ロット８０８５００９）プレートの各ウェルに分注した。９６ウェルプレート内の細胞を、３３℃、１０％CO_2でインキュベートした。

【１０８８】

２４時間後、細胞上の培養培地を、１００μｌの抗生物質不含培養培地（すなわち、２０％ＦＢＳ（熱不活性化型－Ｇｉｂｃｏ １０５００－０６４、ロット番号０８Ｑ２７７１Ｋ）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）、０．５％ニワトリ胚抽出物（ＭＤ－ＯＯ４Ｅ－ＵＫ、ＬＳＰ、ロット番号Ａ２０４１８）、０．２％マウスＩＦＮ－γ（３１５－０５、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、ロット番号０６１７９８Ｃ２９１８）を伴う、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ））と交換した。１ウェルあたり１５０ｎｇのＤＮＡに、０．３μＬのリポフェクタミン３０００を１ウェルあたり１０μｌの総複合体体積でトランスフェクトした。プレートをトランスフェクション後に穏やかに混合し、３３℃、１０％CO_2でインキュベートした。２４時間後、培養培地をトランスフェクト細胞から除去し、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ）、０．１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）、０．２％ウマ血清（ＧＩＢＣＯ、参照番号１６０５０－１２２、ロット１６７１３１７）、０．０２％ニワトリ胚抽出物（ＭＤ－ＯＯ４Ｅ－ＵＫ、ＬＳＰ、ロット番号Ａ２０４１８）、０．１％ペニシリン／ストレプトマイシン溶液（１５１４０－１２２、Ｇｉｂｃｏ）からなる、２００μｌの分化培地と交換した。プレートを３７℃、５％CO_2で７２時間インキュベートして分化を誘導した。分化後、細胞形態を観察して、筋管への分化を確認した。次いで、細胞を２５０μｌのＤＰＢＳで洗浄し、続いて、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水を使用して１Ｘに希釈した５０μｌのＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｌｙｓｉｓ ５Ｘ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｅ１５３１、Ｐｒｏｍｅｇａ）で溶解した。細胞溶解試薬を、１０回、ピペットで吸い上げ、吐き出し、次いで、プレートを中出力で１０分間ボルテックスして細胞溶解を促進した。ルシフェラーゼアッセイを完了する前に、プレートを密封し、－８０℃で保管した。

【１０８９】

ルシフェラーゼアッセイの準備

【１０９０】

溶解細胞が入っている９６ウェルプレートを室温で解凍し、中出力で１０分間ボルテックスし、１分間、２２５０ｇで遠心分離した。１０μｌの溶解物を、各ウェルから、白色マイクロプレートＦｌｕｏｒｏＮｕｎｃ ９６ウェル平底（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、１０３４６３３１）に移した。下記で説明するように、ＢＭＧ Ｌａｂｔｅｃｈ ＦＬＵＯｓｔａｒ Ｏｍｅｇａプレートリーダーで ＬＡＲ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ４５５０）注入を使用してルシフェラーゼ読み出しを生成した。Ｈ２Ｋ細胞におけるトランスフェクション後のルシフェラーゼアッセイから収集したすべてのデータは、４回の技術的反復実験および３回の生物学的反復実験に基づく。

【１０９１】

Ｃ２Ｃ１２細胞培養およびトランスフェクション

【１０９２】

Ｃ２Ｃ１２細胞維持：Ｃ２Ｃ１２細胞を、Ｔ－７５フラスコ内で、１０％ＦＢＳ（熱不活性化型－Ｇｉｂｃｏ　１０５００－０６４）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（３５０５０－０３８、Ｇｉｂｃｏ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン溶液（１５１４０－１２２、Ｇｉｂｃｏ）を伴う、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ）で培養した。細胞に２～３日ごとに新鮮培地を供給し、それらが集密度７０％に達したら継代させた。継代するために、培養培地を除去し、$CaCl_2$不含、$MgCl_2$不含のＤＰＢＳ（１４１９０－０９４、Ｇｉｂｃｏ）５ｍｌで細胞を２回洗浄し、１ｍｌのトリプシンＥＤＴＡ（２５２００－０５６、Ｇｉｂｃｏ）を使用してフラスコ（Ｔ－７５）から細胞を剥離させた。細胞を、３７℃で（CO_2インキュベーターにおいて）、３～５分間、顕微鏡下で判定して細胞が剥離するまでインキュベートした。４ｍｌの完全培養培地をフラスコに添加してトリプシンを不活性化し、細胞浮遊液を１５ｍｌ管に移した。２５０ｇで３分間、細胞をペレット化した。上清を廃棄し、細胞を６ｍｌの培養培地に再浮遊させた。細胞をＣｏｕｎｔｅｓｓ自動細胞計数器で計数し、１：１０希釈で播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

【１０９３】

Ｃ２Ｃ１２細胞トランスフェクションおよび分化：Ｃ２Ｃ１２細胞を、それらが集密度８０％に達したら、ＤＰＢＳでの洗浄、１ｍｌのトリプシンＥＤＴＡを使用するおおよそ３～５分間のフラスコからの剥離、４ｍｌの培養培地でのフラスコの表面から洗浄除去、および２５０ｇで３分間のペレット化によって、Ｔ－７５フラスコから収集した。細胞を、継代数に依存して特定の密度で再浮遊させた（詳細については表１２を参照されたい）。

【１０９４】

【表１２】

表 12.

C2C12 の継代	トランスフェクション前の播種細胞密度 (48 ウェルプレート)
p.4、p.5、p.6	45,000 細胞/300µl 培地
p.7、p.8、p.9	40,000 細胞/300µl 培地
p.10、p.11、p.12	38,000 細胞/300µl 培地

【１０９５】

次いで、３００μｌの適切な細胞浮遊液（継代数に基づいて）を４８ウェルプレートの各ウェルに分注した。４８ウェルプレート内の細胞を、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

【１０９６】

２４時間後、細胞上の培養培地を、ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｄ６５４６、Ｓｉｇｍａ）と１％Ｇｌｕｔａｍａｘとを含有する３００μｌの予温したトランスフェクション培地と交換した。３００ｎｇのＤＮＡに、０．９μｌのＶｉａｆｅｃｔ（Ｅ４９８１、Ｐｒｏｍｅｇａ）を、１ウェルあたり３０μｌの総複合体体積でトランスフェクトした。プレートをトランスフェクション後に穏やかに混合し、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

【１０９７】

２４時間後、培養培地をトランスフェクト細胞から除去し、ＤＭＥＭ（高グルコース、ピルビン酸ナトリウムなし、１１９６０－０４４、Ｇｉｂｃｏ）、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ、２％ウマ血清（熱不活性化型、１６０５０－１２２、Ｇｉｂｃｏ）からなる、分化培地と交換した。プレートを３７℃、５％CO_2でさらに５．５日間インキュベートして分化を誘導した。分化後、細胞形態を観察して、筋管への分化を確認した。次いで、細胞を３００μｌのＤＰＢＳで洗浄し、続いて、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水を使用して１Ｘに希釈した１００μｌのＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｌｙｓｉｓ　５Ｘ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｅ１５３１、Ｐｒｏｍｅｇａ）で溶解した。ルシフェラーゼアッセイを完了す

る前に、プレートを密封し、－８０℃で保管した。
【１０９８】
Ｃ２Ｃ１２ルシフェラーゼアッセイの準備：溶解細胞が入っている４８ウェルプレートを室温で解凍し、中出力で１０分間ボルテックスし、１分間、２２５０×ｇで遠心分離した。１０μｌの溶解物を、各ウェルから、白色マイクロプレートＦｌｕｏｒｏＮｕｎｃ９６ウェル平底（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、１０３４６３３１）に移した。下記で説明するように、ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ　ＦＬＵＯｓｔａｒ　Ｏｍｅｇａプレートリーダーで ＬＡＲ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ４５５０）注入を使用してルシフェラーゼ読み出しを生成した。Ｃ２Ｃ１２細胞におけるトランスフェクション後のルシフェラーゼアッセイから収集したすべてのデータは、３回の技術的反復実験および３回の生物学的反復実験に基づく。
【１０９９】
ルシフェラーゼ活性の測定
【１１００】
ルシフェラーゼ活性を、ＬＡＲＩＩ（Ｄｕａｌ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｒｅｐｏｒｔｅｒ　１０００アッセイシステム、Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｅ１９８０）を使用して測定した。トランスフェクションの２４時間後、培地を細胞から除去した。細胞を３００μｌのＤＰＢＳ中で１回洗浄した。１００μｌの受動溶解緩衝液を使用して細胞を溶解し、揺動しながら１５分間インキュベートした。卓上遠心分離機において１分間の最大速度でのプレートの遠心分離により細胞デブリをペレット化した。１０μｌの試料を白色９６ウェルプレートに移し、ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ　ＦＬＵＯｓｔａｒ　Ｏｍｅｇａプレートリーダーを製造業者の使用説明書に従って用いて５０μｌのＬＡＲＩＩ基質の注入により発光を測定した。
【１１０１】
例示的な製剤医薬組成物：
【１１０２】
本発明の様々な態様では、医薬組成物は、１０ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、２００ｍＭ ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、１％（ｗ／ｖ）マンニトール、５ｍｌの充填体積にするための０．０００５％（ｗ／ｖ）ＩＧＥＰＡＬ（登録商標）ＣＡ　７２０（ポリオキシエチレン（１２）イソオクチルフェニルエーテル）中の、ｒＡＡＶ－Ｉ１ｃを含む組換えＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ２ｉ８ｓｃ．ＣＭＶ．Ｉ１ｃ）を含む。一部の実施形態では、充填体積は、１ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、または１０ｍｌである。
【１１０３】
本発明の一態様では、医薬組成物は、２０ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＫＣｌ、３％（ｗ／ｖ）マンニトール、５ｍｌの充填体積にするための０．００１％（ｗ／ｖ）Ｂｒｉｊ（登録商標）　Ｓ２０中の、ｒＡＡＶ－Ｉ１ｃを含む組換えＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ２ｉ８ｓｃ．ＣＭＶ．Ｉ１ｃ）を含む。一部の実施形態では、充填体積は、１ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、または１０ｍｌである。
【１１０４】
本発明のいくつかの態様では、医薬組成物は、２０ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、３００ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＫＣｌ、３％（ｗ／ｖ）ソルビトール、５ｍｌの充填体積にするための０．００１％（ｗ／ｖ）Ｅｃｏｓｕｒｆ　ＳＡ－１５中の、ｒＡＡＶ－Ｉ１ｃを含む組換えＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ２ｉ８ｓｃ．ＣＭＶ．Ｉ１ｃ）を含む。一部の実施形態では、充填体積は、１ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、または１０ｍｌである。
【１１０５】
本発明の様々な態様では、医薬組成物は、１０ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、３５０ｍＭ ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、５％（ｗ／ｖ）ソルビトール、５ｍｌの充填体積にする

ための０．００１％（ｗ／ｖ）ポロキサマー１８８中の、ｒＡＡＶ－Ｉ１ｃを含む組換えＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ２ｉ８ｓｃ．ＣＭＶ．Ｉ１ｃ）を含む。一部の実施形態では、充填体積は、１ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、または１０ｍｌである。

【１１０６】

本明細書で提供される本発明のいくつかの態様では、医薬組成物は、１５ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、３７５ｍＭ　ＮａＣｌ、３．５ｍＭ　ＫＣｌ、５％（ｗ／ｖ）ソルビトール、５ｍｌの充填体積にするための０．０００５％（ｗ／ｖ）Ｔｅｒｇｉｔｏｌ　ＮＰ－１０中の、ｒＡＡＶ－Ｉ１ｃを含む組換えＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ２ｉ８ｓｃ．ＣＭＶ．Ｉ１ｃ）を含む。一部の実施形態では、充填体積は、１ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、または１０ｍｌである。

【１１０７】

本発明の一態様では、医薬組成物は、１５ｍＭリン酸塩ｐＨ７．４、３７５ｍＭ　ＮａＣｌ、３．５ｍＭ　ＫＣｌ、３％（ｗ／ｖ）グリセロール、５ｍｌの充填体積にするための０．０００５％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ（登録商標）　８０中の、ｒＡＡＶ－Ｉ１ｃを含む組換えＡＡＶベクター（例えば、ＡＡＶ２ｉ８ｓｃ．ＣＭＶ．Ｉ１ｃ）を含む。一部の実施形態では、充填体積は、１ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、または１０ｍｌである。

（実施例１）

【１１０８】

筋肉特異的プロモーターのｉｎ　ｖｉｖｏ評価：ルシフェラーゼ遺伝子を駆動する、ＳＰ００６７または対照プロモーターＣＢＡ、ＣＫ８を含む、発現カセットを作出し、これらの発現カセットを含むｒＡＡＶ２／９ベクターを高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって精製した。ｒＡＡＶを０．９％生理食塩水で希釈し、８匹の８週齢雄Ｂａｌｂ／ｃ（野生型）マウスに、２００μｌ／マウスで、１ｅ＋１２ｖｇ／マウスの用量で、尾静脈経由で送達した。６週間後にマウスを　　殺し、横隔膜（骨格筋）、心臓（心筋）、腸（骨格筋）、腎臓（特異性対照組織）、肝臓（特異性対照組織）、肺（特異性対照組織）、四頭筋（骨格筋）、脾臓（特異性対照組織）、および前脛骨筋（骨格筋）を収集し、３つの部分に分けた。切開後直ちに試料を液体窒素で瞬間凍結し、－８０℃で保管した。横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋および前脛骨筋（ＴＡ）についての読み出しを、タンパク質定量化（ＢＣＡ　Ｐｉｅｒｃｅタンパク質アッセイキット；Ｐｒｏｍｅｇａ　２３２２５を使用する）およびルシフェラーゼ定量化（ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム；Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｅ６１２０を使用する）により作成した。ＲＬＵ値を、ｐｇ／ｍｇ抽出タンパク質として計算した。

【１１０９】

図１～３は、心特異的プロモーターＳＰ００６７が、ｉｎ　ｖｉｖｏで心臓において活性であるが、ｉｎ　ｖｉｖｏで骨格筋（横隔膜、四頭筋、前脛骨筋、腸）においてあまり活性でないことを示す。この実施形態では、ＳＰ００６７は、心筋においてＣＢＡおよびＣＫ８．イントロン対照プロモーターより活性が低いが、これらの一般的な対照プロモーターとは異なり、ＳＰ００６７は、ｉｎ　ｖｉｖｏで骨格筋と比較して心筋に対して非常に特異的である。ＳＰ００６７は、ｉｎ　ｖｉｖｏで肝臓においても、ある程度の活性を有する。図４Ａ～４Ｂは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの心筋管および骨格筋の筋管における、ＳＰ００６７および他の合成心特異的プロモーターに機能的に連結されたｒＡＡＶ２／９からのルシフェラーゼのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現を示す。

【１１１０】

Ｈ９Ｃ２細胞を使用して、心筋および骨格筋において活性な例示的筋肉特異的プロモーターの短縮された核酸配列のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性を評価した。図８は、心臓の筋管に分化される筋肉細胞株Ｈ９Ｃ２における合成の短い筋肉特異的プロモーターＳＰ０５２１およびＳＰ４１６９のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性を、ＣＢＡおよびＣＫ８対照プロモーターと比較して示す。図８は、合成プロモーターＳＰ０５２１およびＳＰ４１６９が筋肉細胞株Ｈ

９Ｃ２において良好な活性を示すことを示す。心筋および骨格筋において活性な追加の筋肉特異的プロモーターＳＰ０５０２、ＳＰ０５１５、ＳＰ０５２２、ＳＰ０５２３およびＳＰ５２４もＨ９Ｃ２細胞株において実験的に試験したが、これらのプロモーターは、低い活性を示した（データを示さない）。

（実施例２）

【１１１１】

ｉｎ　ｖｉｖｏ試験

【１１１２】

ルシフェラーゼ遺伝子を駆動する、ＳＰ０１７３、ＳＰ０２７０、ＳＰ０２６８、ＳＰ０３２０、ＳＰ０１３４、ＳＰ０２７９、ＳＰ００５７、ＳＰ０２２９、ＳＰ０３１０、ＳＰ００６７およびＳＰ０２６７の、または対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８の、各々を含む発現カセットを作出し、これらの発現カセットを含むＡＡＶ２／９を高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって精製した。ＡＡＶを０．９％生理食塩水で希釈し、８匹の８週齢雄Ｂａｌｂ／ｃ（野生型）マウスに、２００μｌ／マウスで、１ｅ＋１２ｖｇ／マウスの用量で、尾静脈経由で送達した。６週間後にマウスを　　殺し、横隔膜（骨格筋）、心臓（心筋）、腸（骨格筋）、腎臓（特異性対照組織）、肝臓（特異性対照組織）、肺（特異性対照組織）、四頭筋（骨格筋）、脾臓（特異性対照組織）、および前脛骨筋（骨格筋）を収集し、３つの部分に分けた。切開後直ちに試料を液体窒素で瞬間凍結し、－８０℃で保管した。横隔膜、心臓、腸、肝臓、四頭筋および前脛骨筋についての読み出しを、タンパク質定量化（ＢＣＡ　Ｐｉｅｒｃｅタンパク質アッセイキット；Ｐｒｏｍｅｇａ　２３２２５を使用する）およびルシフェラーゼ定量化（ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム；Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｅ６１２０を使用する）により作成した。ＲＬＵ値を、ｐｇ／ｍｌとして計算した。

【１１１３】

図５Ａ～５Ｆにおけるｘ軸は、対数尺度でのものである。対数尺度（$\log_{10}$）でデータをプロットするために、対数尺度への変換の前に正規化ＲＬＵ値に10^9を掛けた。ｘ軸は、正規化ＲＬＵ値の10^9倍の$\log_{10}$を表す。図１、図２、および図６Ａ～６Ｆにおけるｘ軸は、ＲＬＵ値（ｐｇ／ｍｌ）を表す。

【１１１４】

ｉｎ　ｖｉｖｏで試験した合成プロモーターは、図６Ａ～６Ｆに示されているように、肝臓および腸におけるより心臓、横隔膜、四頭筋および前脛骨筋におけるほうがはるかに活性が高かった。

【１１１５】

一部のプロモーター、例えば、ＳＰ０２７０およびＳＰ０２６８（図６Ｂおよび６Ｃ）は、心筋（心臓）より骨格筋（横隔膜および前脛骨筋）におけるほうが活性が高かった。他のプロモーター、例えば、ＳＰ００５７、ＳＰ０２２９およびＳＰ００６７（図６Ｇ、６Ｈおよび図６Ｉ）は、骨格筋（横隔膜および前脛骨筋）より心筋（心臓）におけるほうが活性が高かった。

【１１１６】

図１および図６Ｉは、心筋特異的プロモーターＳＰ００６７が、骨格筋（横隔膜、四頭筋、前脛骨筋、腸）において活性でないが、心臓において活性であることを示す。ＳＰ００６７は、心筋において対照プロモーターＣＢＡおよびＣＫ８より活性が低いが、これらの一般的な対照プロモーターとは異なり、ＳＰ００６７は、骨格筋と比較して心筋に非常に特異的である。ＳＰ００６７は、肝臓においても、ある程度の活性を有する。

（実施例３）

【１１１７】

ｉｎ　ｖｉｖｏでの心特異的プロモーターの評価：

【１１１８】

ルシフェラーゼ遺伝子を駆動する上で心特異的プロモーターＳＰ００６７、ＳＰ０４５１、ＳＰ０４５２、ＳＰ０４３０、ＳＰ０４５０、ＳＰ０４２９、ＳＰ０４２４、ＳＰ０

４３５、ＳＰ０４３６、ＳＰ０４３３、ＳＰ０４４９、ＳＰ０３４４、ＳＰ０４７５、または対照プロモーター（ＣＫ８－筋肉プロモーター対照としてのもの、もしくは心特異的陽性対照としてのプロモーターである心特異的プロモーター対照１（配列番号２８８）および対照２（配列番号２８９））の各々を含む発現カセットを作出し、これらの発現カセットを含むＡＡＶ２／９を実施例２で開示したように産生した。心特異的対照プロモーター１および２は、以前に、Bezzerides, et al. "Gene therapy for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia by inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II." Circulation 140.5 (2019): 405-419に記載されている。ｒＡＡＶをイオジキサノール勾配によって精製した。マウスにｒＡＡＶを実施例２で開示したように投与し、６週間後にそれらのマウスを　殺し、横隔膜（骨格筋）、心臓（心筋）、肝臓（特異性対照組織）、四頭筋（骨格筋）、ヒラメ筋（solus）（遅筋）、および前脛骨筋（骨格筋）を収集し、３つの部分に分けた。切開後直ちに試料を液体窒素で瞬間凍結し、－８０℃で保管した。横隔膜、心臓、肝臓、四頭筋および前脛骨筋についての読み出しを、タンパク質定量化（ＢＣＡ　Ｐｉｅｒｃｅタンパク質アッセイキット；Ｐｒｏｍｅｇａ　２３２２５を使用する）およびルシフェラーゼ定量化（ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム；Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｅ６１２０を使用する）により作成した。ＲＬＵ値を、抽出タンパク質のｍｇあたりのＲＬＵとして計算した（図７Ａ～７Ｍ）。

【１１１９】

ｉｎ　ｖｉｖｏで試験した合成プロモーターは、図７Ａ～７Ｍに示されているように、肝臓におけるより心臓、横隔膜、四頭筋および前脛骨筋におけるほうがはるかに活性が高かった。

【１１２０】

一部の心特異的プロモーター、例えば、ＳＰ０４２４（図７Ｃ）、ＳＰ０４２９（図７Ｅ）、ＳＰ０４３０（図７Ｆ）、ＳＰ０４３５（図７Ｉ）、ＳＰ０４５０（図７Ｍ）、ＳＰ０４５１（図７Ｎ）およびＳＰ０４５２（図７Ｏ）すべては、心臓における特異的発現を示し、他の筋肉組織ではより低い発現レベルを示した。これらのプロモーターは、肝臓標的解除効果があるのでこれらのプロモーターを含むこれらのｒＡＡＶを使用する肝臓において有意に低い発現を示す。さらに、肝臓標的解除効果があるこれらの心特異的プロモーターを含む、ＡＡＶ２ｉ８を除くいずれかのＡＡＶ血清型またはＢＮＰ１１６を有するこれらのｒＡＡＶを、反復投与に使用することができ、この反復投与では、ＡＡＶ２ｉ８を一方の投与に使用し、これらの心特異的プロモーターを含む、ＡＡＶ２ｉ８を除くいずれかのＡＡＶ血清型またはＢＮＰ１１６を有するｒＡＡＶを、他方の投与に使用することができる。

【１１２１】

対照１（図７Ｈ）および対照２（図７Ｋ）心特異的プロモーターは、以前に、Bezzerides, et al. "Gene therapy for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia by inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II." Circulation 140.5 (2019): 405-419 において開示されており、この研究では対照として、ＣＫ８対照とともに使用されている。

（実施例４）

【１１２２】

ｒＡＡＶベクター製造：Ｉ－１遺伝子を安定的に発現するように操作されたＰｒｏ１０／ＨＥＫ２９３細胞からｒＡＡＶウイルスベクターを製造する方法を、本明細書で説明する。

【１１２３】

米国特許第９，４４１，２０６号に記載の安定した細胞株であるＰｒｏ１０／ＨＥＫ２９３は、ＡＡＶベクターのスケーラブルな産生にとって理想的である。この細胞株を、心特異的プロモーターＳＰ００６７（配列番号３）に機能的に連結されたＩ－１遺伝子を発現するために使用される発現ベクターと接触させることができる。それらのゲノムに組み

込まれたＩ－１発現を有するクローン集団を、当技術分野において周知の方法を使用して選択する。Ｉ－１遺伝子の発現を、ウェスタンブロット法によって確認する。

【１１２４】

Ｉ－１を安定的に発現するＰｒｏ１０／ＨＥＫ２９３細胞に、Ｒｅｐ２および血清型特異的Ｃａｐ２をコードするパッケージングプラスミド：ＡＡＶ－Ｒｅｐ／Ｃａｐと、Ａｄ－ヘルパープラスミド（ＸＸ６８０：アデノウイルスヘルパー配列をコードする）とをトランスフェクトする。

【１１２５】

トランスフェクション。トランスフェクション当日に、細胞を、ＶｉＣｅｌｌ　ＸＲ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して計数し、トランスフェクションのために希釈する。トランスフェクションカクテルを混合するために、以下の試薬をコニカルチューブにこの順序で添加する：プラスミドＤＮＡ、ＯＰＴＩＭＥＭ（登録商標）Ｉ（Ｇｉｂｃｏ）もしくはＯｐｔｉＰｒｏ　ＳＦＭ（Ｇｉｂｃｏ）または他の無血清の適合するトランスフェクション培地、そしてその後、プラスミドＤＮＡに対して特定の比率でのトランスフェクション試薬。カクテルを反転させて混合し、その後、室温でインキュベートする。トランスフェクションカクテルをフラスコにピペットで分注し、シェーカー／インキュベーターに戻す。すべての最適化研究を３０ｍＬ培養体積で行い、続いて、より大きい培養体積で検証を行う。トランスフェクションの４８時間後に細胞を回収する。

【１１２６】

ウェーブバイオリアクターシステムを使用するｒＡＡＶの産生。トランスフェクションの２日前にウェーブバッグに播種する。ウェーブバックの播種の２日後、そのようなトランスフェクションの前に、細胞培養物を計数し、次いで、細胞培養物を拡大／希釈する。その後、ウェーブバイオリアクター細胞培養物にトランスフェクトする。細胞培養物を、トランスフェクションの少なくとも４８時間後にウェーブバイオリアクターバッグから回収する。

【１１２７】

力価：ＤＮａｓｅ消化後、ｑＰＣＲを使用して標準曲線（ＡＡＶ　ＩＴＲ特異的）およびＩ－１遺伝子に特異的なプライマーに対してＡＡＶ力価を計算する。

【１１２８】

振盪フラスコおよび６０個のウェーブバイオリアクターバッグからの浮遊細胞の回収。トランスフェクションの４８時間後、振盪フラスコからの注入またはウェーブバイオリアクターバッグからのポンピングのどちらかにより、細胞培養物を５００ｍＬポリプロピレン製コニカルチューブ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に収集する。次いで、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＲＣ３Ｃ　ｐｌｕｓ遠心機およびＨ６０００Ａローターを使用して６５５×ｇで１０分間、細胞培養物を遠心分離する。上清を廃棄し、細胞を１×ＰＢＳに再浮遊させ、５０ｍＬコニカルチューブに移し、１０ｍＭについて６５５×ｇで遠心分離する。この時点で、ペレットをＮＬＴ－６０℃で保管することができ、あるいは精製によって存続させることができる。

【１１２９】

ｑＰＣＲを使用する細胞溶解物からのｒＡＡＶの力価決定。１０ｍＬの細胞培養物を除去し、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＲＣ３Ｃ　ｐｌｕｓ遠心機およびＨ６０００Ａローターを使用して６５５×ｇで１０分間、遠心分離する。上清を細胞ペレットからデカントする。次いで、細胞ペレットを５ｍＬのＤＮａｓｅ緩衝液（５ｍＭ　$CaCl_2$、５ｍＭ　$MgCl_2$、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０）に再浮遊させ、続いて超音波処理を行って細胞を効率的に溶解する。次いで、３００ｕＬを除去し、１．５ｍＬ微量遠心管に入れる。次いで、１４０ユニットのＤＮａｓｅ　Ｉを各試料に添加し、３７℃で１時間インキュベートする。ＤＮａｓｅ消化の有効性を決定するために、４～５ｍｇのＩ－１プラスミドを、ＤＮａｓｅを添加したおよびしていない非トランスフェクト細胞溶解物にスパイクする。５０μＬのＥＤＴＡ／サルコシル溶液（６．３％サルコシル、６２．５ｍＭ　ＥＤＴ

Ａ　ｐＨ８．０）を各管に添加し、７０℃で２０分間インキュベートする。次いで、５０μＬのプロテイナーゼＫ（１０ｍｇ／ｍＬ）を添加し、５５℃で少なくとも２時間インキュベートする。試料を１５分間沸騰させてプロテイナーゼＫを不活性化する。ｑＰＣＲによる解析のために各試料から一定分量を除去する。ｒＡＡＶベクターが生成される細胞あたりの量を有効に決定するために、２つのｑＰＣＲ反応を行う。１つのｑＰＣＲ反応は、プラスミドＸＸ６８０、ｐＸＲ２およびＩ－１の骨格上の相同配列に結合するように設計された１セットのプライマー２を使用して設定する。第２のｑＰＣＲ反応は、Ｉ－１遺伝子内の領域に結合して増幅する１セットのプライマーを使用して設定する。サイバーグリーン試薬と３０　ＲｏｃｈｅからのＬｉｇｈｔ　ｃｙｃｌｅｒ４８０とを使用して、ｑＰＣＲを行う。１０分間９５℃で試料を変性させ、これに、４５サイクル（１０秒間９０℃、１０秒間６２℃、および１０秒間７２℃）および融解曲線（１サイクル：３０秒間９９℃、連続する１分間６５℃）が続く。

【１１３０】

粗溶解物からのｒＡＡＶの精製。各細胞ペレットを１０ｍＬの最終体積に調整する。ペレットを短時間ボルテックスし、収率３０％で、１秒間オン、１秒間オフのバーストで４分間、超音波処理する。超音波処理後、５５０ＵのＤＮａｓｅを添加し、３７℃で４５分間インキュベートする。次いで、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＲＣＳＢ遠心機およびＨＳ－４ローターを使用して９４００×ｇでペレットを遠心分離して細胞デブリをペレット化し、清澄化された溶解物をＴｙｐｅ７０Ｔｉ遠心管（Ｂｅｃｋｍａｎ　３６１６２５）に移す。ｒＡＡＶの単離のための浮遊ＨＥＫ２９３細胞の回収および溶解に関して、当業者は、微少溶液操作などの機械的方法または界面活性物質などの化学的方法などを使用することができ、続いて、深層濾過または接線流濾過（ＴＦＦ）を使用する清澄化ステップを行うことができる。

【１１３１】

ＡＡＶベクター精製。清澄化されたＡＡＶ溶解物を、当業者が知っているような、および全体が参照により本明細書に組み込まれている以下の原稿（Allay et al.、Davidoff et al.、Kaludov et al.、Zolotukhin et al.、Zolotukin et al、など）に記載されているような、カラムクロマトグラフィー方法によって精製する。

（実施例５）

【１１３２】

ヒトにおける心不全を処置するためのＩ－１ｃを発現するｒＡＡＶの有効性：

【１１３３】

本明細書における実施例５は、本明細書で開示する方法に従って心不全を処置するためにＩ－１ｃ遺伝子を発現するｒＡＡＶウイルスベクターをヒト患者に投与する方法を説明する。実施例５は、配列番号４４１のプラスミドから産生されるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを投与した、心不全（非虚血性心筋症）を有するヒト患者の結果を示す（本実施例および他の実施例におけるＡＡｖ２ｉ８　ｓｃは、自己相補的ゲノムを有するＡＡｖ２ｉ８を指す）。実施例５で使用するＡＡＶベクターＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃは、例示的なｒＡＡＶを単独で使用したものであり、本明細書で開示する任意のｒＡＡＶを、本明細書で開示される心不全を処置する方法に使用することができる。例えば、当業者は、実施例５で使用するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃにおけるプロモーターを、心特異的プロモーター、例えば、表２Ａもしくは５Ａで開示する、または図７Ｂ～７Ｏに示す、任意の心特異的プロモーター、または心筋において活性な筋肉特異的プロモーターの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例５で使用するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、Ｉ－１ｃをコードするコドン最適化核酸配列、例えば、これらに限定されるものではないが、配列番号３８５～４１２の核酸配列、を含むｒＡＡＶの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例５で使用するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、Ｉ－１ｃをコードするコドン最適化核酸配列、例えば、これらに限定されるものではないが、配列番号３８５～４１２の核酸配列、を含む核酸；およびポリＡ、例えばＨＧＨポリＡまたはＳＶ４０ポリＡと、アルファ２グロビン遺伝子か

らのＲＮＡポリメラーゼＩＩ転写休止シグナルとをさらに含む核酸を含む、ｒＡＡＶの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例５で使用するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、配列番号４１３～４４０の核酸配列またはその改変バージョンを含むｒＡＡＶの代わりに、容易に使用することができる。細菌配列を欠いており、実施例５で使用するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを含む、ｒＡＡＶを、配列番号３５７～３８４の線状二重鎖ＤＮＡのいずれかから製造することができる。

【１１３４】

症候性うっ血性心不全を有する患者７名に、ｒＡＡＶベクターがＡＡＶ２ｉ８であるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃであって、ＣＭＶプロモーターのもとでＩ－１ｃタンパク質（Ｔ３５Ｄ改変を有するアミノ酸１～６５）を発現するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの注入を施した。ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの単回冠動脈内注入を、ＮＹＨＡクラスＩＩＩ心不全を有する患者７名に投与し、投与は、（ｉ）３×10^{13}ｖｇ（ｎ＝３）（ｉｉ）１×10^{14}ｖｇ（ｎ＝４）から選択される総用量の単回投与として行った。本研究におけるすべての患者は、非虚血性心筋症を有した。各分割用量が別々の注射器から投与される一連の５分割用量で総用量を患者に投与し、これらの５分割用量を約２５～３０分の期間にわたって対象に投与した。このような事例では、総ｒＡＡＶ用量を５０ｍｌの生理食塩水で希釈し、５分割用量として５本の注射器で、各注射器に１０ｍｌの体積で投与する。たびたび停止し、造影剤注射を使用して各冠動脈におけるカテーテルの位置をチェックしながら、５本の注射器の各々について約５分かけて、次々に注射器を用いて投与を行う。すべての患者を処置介入の１２か月後まで追跡し、その後、さらに２４か月（＋／－３０日）間、６か月ごとに半構造化電話質問票による長期追跡調査を行った。患者に、ｒＡＡＶ投与の約２５分前に血管拡張薬、例えば、ニトログリセリンを併用投与した。

【１１３５】

投与前（すなわち、スクリーニング時）、ならびに投与の４週間（＋／－３日）、６か月および１２か月後に、様々な生理学的評価および臨床パラメーターを使用して患者を評価した。例えば、ＬＶＥＦ、ＬＶＥＶＤ、ＬＶＥＤＶＩ、ＶＬＥＳＶ、ＬＶＥＶＩ、ＳｐＩおよびＧＬＳの心エコー評価、そして僧帽弁逆流度を評価し、血清ＮＴ－プロＢＮＰレベルも評価し、ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃ　ｒＡＡＶベクターの投与の有効性を決定するために二次効果も評価した。二次効果としては、例えば、（ｉ）心肺運動負荷試験により評価されるピークVO_2、（ｉｉ）６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、（ｉｉｉ）ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類、（ｉｖ）院外生存日数の総数（および研究介入後の総生存日数の％としての院外総日数）、（ｖ）ベースラインと比較される６および１２か月の時点でのクオリティオブライフ、（ｖｉ）ミネソタＬｉｖｉｎｇ　ｗｉｔｈ　Ｈｅａｒｔ　Ｆａｉｌｕｒｅ質問票（ＭＬＷＨＦＱ）により評価される健康に関連するクオリティオブライフが挙げられるが、これらに限定されない。また、１２か月および長期追跡調査期間（介入後３６か月目まで）において、患者を、心臓移植または左室補助人工心臓（ＬＶＡＤ）移植の必要性を、評価した。これらの臨床パラメーターの各々を下記で論じる：

【１１３６】

ＮＹＨＡ：ＮＹＨＡクラスは、患者の機能の状態の臨床医評価尺度であり、

【１１３７】

その単純さおよび予後値のため臨床試験で広く使用されている。

【１１３８】

ＬＶＥＦ：ＬＶＥＦは、心収縮機能を示し、収縮ごとに左室から拍出される血液の量のパーセンテージとして測定する。ＥＦの低下は、心臓リモデリングに関連する。ＬＶＥＦの処置により誘導される変化は、死亡率に対する効果を予示することもある。各患者には１２か月目までベースラインからのＬＶＥＦの改善があった。絶対的パーセント上昇は、患者１では＋１０．５％であり、患者２では＋２２％であり、患者３では＋６％であった。一部の患者において、ＬＶＥＦの改善は、左室収縮終期容積および左室拡張末期容積の

両方の低下に関連していた。加えて、スクリーニング時から１２か月目まで、すべての患者に左室壁運動異常の改善があったことが注目された。

【１１３９】

６ＭＷテスト：６ＭＷＴは、準最大運動能力を評価するための標準的な手段であり、６分で歩行したメートルでの距離と定義される。６ＭＷＴは、クオリティオブライフのサロゲートと考えられ、成績は、後の臨床転帰と強く相関する。

【１１４０】

最大VO_2：最大運動中の心肺テストおよびピークVO_2測定量の測定値は、有酸素容量の評価、心不全患者における予後の確立、および様々な形態の介入の恩恵の評価に使用されている。ごく最近、ＥＸＰＬＯＲＥＲ－ＨＣＭ試験によって、閉塞性心筋症を有する患者において、（１）ピーク酸素消費量の増加≧１．５ｍＬ／ｋｇ／分、および少なくとも１つのニューヨーク心臓協会クラスの低下；または（２）ニューヨーク心臓協会クラスの悪化を伴わないピーク酸素消費量の≧３．０ｍＬ／ｋｇ／分の改善のどちらかとして定義される主要複合機能エンドポイントを３０週目にベースラインと比較して使用して、マバカムテンの有効性が評価された。

【１１４１】

ＭＬＷＨＦＱ：クオリティオブライフは、臨床医によって評価される症状より再現性があることが示されている、ミネソタＬｉｖｉｎｇ ｗｉｔｈ Ｈｅａｒｔ Ｆａｉｌｕｒｅ質問票（ＭＬＷＨＦＱ）などの十分に有効性が認められている質問票で、ほとんどの場合、評価される。

【１１４２】

ＢＮＰ：脳性ナトリウム利尿ペプチド（ＢＮＰ）およびＮＴプロ－ＢＮＰなどのバイオマーカーは、心不全を有する患者の組み入れ基準として、およびＨＦ患者における処置の効果を追跡するために、使用されている。一部の患者には、改善を示す、ベースラインからのＢＮＰレベルの低下（－３８および－６０）が、１２か月目までにあった。

【１１４３】

ピークVO_2およびＬＶＥＦレベルの変化を含む、主要評価項目を評価した。ピークVO_2変化を判定するために、修正ブルースプロトコールを使用して心肺運動負荷試験により決定されるような、投与前または投与時のピークVO_2と比較して（すなわち、ベースラインと比較して）投与後６および１２か月の時点で測定されるピークVO_2。評価した他の主要評価項目は、投与またはスクリーニングの時点、投与の１８～２４時間後、投与の４週間、６か月および１２か月後に測定された左室駆出率（ＬＶＥＦ）の、投与の前または投与の時点で測定されたＬＶＥＦ（例えば、ベースラインＬＶＥＦレベル）と比較したときの、心エコー評価の変化であった。

【１１４４】

投与後６および１２か月の時点で測定された６ＭＷＴ（６分間歩行試験）からの結果の、投与時または投与前に測定された６ＭＷＴからの結果と比較したときの（すなわち、ベースラインと比較したときの）変化を含む、副次的評価項目も評価した。正常な対象と比較して心不全の対象において予想される％の解析の副次的評価項目も判定した。

【１１４５】

表１９Ａは、投与後１か月、２か月、３か月、６か月、９か月および１２か月の時点でＮＹＨＡ分類システムを評価した、Ｉ－１ｃを発現する、3×10^{13}ｖｇ ｒＡＡＶを受けた患者（ｎ＝３）の臨床的改善の結果を、ＮＹＨＡ分類を使用して示すものである。

【表１９Ａ】

	用量: 3×10^{13} vg/患者					
患者番号:	2		3		5	
	NYHA	EF (%)	NYHA	EF (%)	NYHA	EF (%)
スクリーニング	III	35*	III	27	III	29
1か月			II	40		25
3か月		39			II	
6か月	II	41	I	41	II	41
9か月						
12か月	II	39	I	35		

【１１４６】

表１９Ｂは、投与後１か月、２か月、３か月および６か月の時点でＮＹＨＡ分類システムを評価した、Ｉ－１ｃを発現する、１×１０^{14}ｖｇ　ｒＡＡＶを受けた患者（ｎ＝３）の臨床的改善の結果を、ＮＹＨＡ分類を使用して示すものである。

【表１９Ｂ】

	用量: 1×10^{14} vg/患者							
患者番号:	11		9		13		12	
	NYHA	EF (%)	NYHA	EF (%)	NYHA	EF (%)	NYHA	EF (%)
スクリーニング	III	14	III	18	III	28	III	22.5
1か月		23		19		31		
3か月	II	26						
6か月	II	15						
12か月								

【１１４７】

結果（表１９Ａ参照）は、患者（３×１０^{13}ｖｇ　ｒＡＡＶを受けた）の分類の、ＮＹＨＡ分類システムの少なくとも１クラスの改善を示し、一部の事例では、対象は、６か月以内にＮＹＨＡ分類を２クラス改善した。例えば、患者番号２は、６か月以内にクラスＩＩＩからクラスＩＩに改善し、患者番号３は、６か月以内にクラスＩＩＩからクラスＩに改善し、したがって、投与６か月以内のＮＹＨＡ分類システムの２レベルの驚くべき有意な改善を実証した。言い換えれば、患者番号３には、Ｉ－１ｃをコードするｒＡＡＶの投与後１３か月でＮＹＨＡ分類システムの２クラス低下があった。３×１０^{13}用量と同様に、１×１０^{14}ｖｇ　ｒＡＡＶを受ける患者（表１９Ｂ）も、ＮＹＨＡ分類の改善を示し、例えば、患者１１は、３か月および６か月の時点でＮＹＨＡ分類値により示される通り１クラス改善した。

【１１４８】

駆出率（％ＥＦ）も、スクリーニングの時点および投与後複数の時点で（例えば、投与の１か月、２か月、３か月、６か月、９か月および１２か月後に）評価し、結果を表１９Ａ～１９Ｂに示した。大部分の処置した患者においてＥＦの５％の増加、または５％より大きい増加があり、例えば、患者番号３および５には、Ｉ－１ｃを発現する３×１０^{13}ｖｇ　ｒＡＡＶの投与後、それぞれ、６か月でベースラインでの２７％から４１％までのおよびベースラインでの２９％から４１％までのＥＦ％の増加があった。

【１１４９】

他のパラメーターの概要結果：

【１１５０】

６分間歩行試験（６ＭＷＴ）では、すべての患者は、１２か月以内に６分間歩行距離（

６ＭＷＤ）を少なくとも５０メートル延ばし、一部の患者は、６か月以内に５０メートル延ばした。ＭＷＨＦ質問票に関して、すべての患者は、１２か月で１０を超えるスコアの減少を示した。すべての患者は、１２か月で最大ｐＶＯ$_2$またはＭＶＯ$_2$を１．５ｍｌ／ｋｇ／分、またはそれより大きく増加させた。

【１１５１】

各機能試験についての臨床的に意義のある変化を表１９Ｃに示す。患者へのＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃ　ｒＡＡＶの投与は、表１９Ｃ中の１つまたは複数のエンドポイントを達成することが示された。

【表１９Ｃ】

パラメーター	ベースラインからの変化
左室駆出率	≧5%増加
左室収縮終期容積	>20mL または 10%減少
ニューヨーク心臓協会クラス	1 クラス低下
クオリティオブライフ (ミネソタ Living With Heart Failure 質問票)	10 ポイント減少
6 分間歩行試験	50 メートル延長
BNP (pg/mL)	40%減少
NT-プロ-BNP (pg/mL)	35%減少
MVO_2	1.5 mL/kg/分 増加

【１１５２】

したがって、結果は、（ｉ）３×１０^{13}ｖｇ（ｎ＝３）（ｉｉ）１×１０^{14}ｖｇ（ｎ＝４）から選択される総用量の単回投与でＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを投与した患者において、投与前に患者において測定された臨床パラメーターと比較して（例えば、血清ＮＴ－プロＢＮＰの変化、ピークＶＯ$_2$の変化、ＬＶＥＦの変化）、改善された臨床パラメーター（例えば、血清ＮＴ－プロＢＮＰの減少、ピークＶＯ$_2$の増加（データを示さない）、ＬＶＥＦの増加など）を示す。

【１１５３】

ブタ研究（データを示さない）では、各注射器が１０ｍｌの生理食塩水を有する５本の注射器を用いて約２５分の期間にわたってＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃ　ｒＡＡＶベクターの総用量を投与したとき、各注射器が１０ｍｌの生理食塩水を有する２本の注射器を用いて１０分の期間にわたってＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃ　ｒＡＡＶベクターの同じ総用量を投与したときと比べて、ブタの心臓内へのｒＡＡＶの形質導入の増進が観察される。

【１１５４】

患者が、臨床パラメーターの大幅な改善、例えば、ＮＹＨＡクラスの改善、％ＥＦの増加、６ＭＷＴでの歩行距離の延長、ピークＶＯ$_2$（ｐＶＯ$_2$またはＭＶＯ$_2$）の増加、ＬＶＥＦ（またはＥＦ）の増加、ＭＷＨＦＱ（またはＫＣＣＱ）スコアの改善などを示した、ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの投与後６または１２か月の時点で検出されるような、本実施例における非虚血性心筋症患者のＨＦ臨床パラメーターの大幅な改善に基づいて、様々な原因または疾患による非虚血性心筋症を有する患者も、投与の少なくとも１２か月後にＨＲ臨床パラメーターの同様の改善を有すると予想され、これらの患者には、以下のことに起因する非虚血性心筋症を有する患者が含まれる：心筋炎症を生じさせる結果となる感染（例えば、様々なウイルスによる感染（おそらく、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ２に過去に感染した患者、またはＣＯＶＩＤ－１９感染症、細菌感染症および他の寄生虫に罹患したことがある対象を含む））、非感染性炎症（例えば、自己免疫疾患、周産期心筋症、過敏性反応または移植拒絶反応に起因するもの）、心筋炎を引き起こす代謝障害（栄養、内分泌学的および電解質異常を含む）、および心筋炎を引き起こす毒物（アルコール、な

らびにある特定の化学療法薬およびカテコールアミンを含む）への曝露。それ故、実施例５は、本明細書で開示する方法が、疾患の原因がまだ分かっていないＨＦを有する対象の処置に有用であり、それ故、「特発性拡張型心筋症」（または「ＩＤＣＭ」）を有する患者を処置するのに有用であることを明示した。

（実施例６）

【１１５５】

非虚血性遺伝性心筋症を有するヒト対象のｉｎ　ｖｉｖｏ処置。

【１１５６】

非虚血性心筋症に起因する心不全を有する対象の処置を実施例５で説明した。本明細書における実施例６は、本明細書で開示される方法に従って、遺伝的突然変異に伴って生じる遺伝性心筋症および／または遺伝的突然変異に関連する心筋症の処置のために、Ｉ－１ｃ遺伝子を発現するｒＡＡＶウイルスベクターをヒト患者に投与する方法を説明する。実施例６は、配列番号４４１のプラスミドから産生される、例示的なｒＡＡＶとしてのＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの投与を論じる。実施例６で論じるｒＡＡＶベクターＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃは、例示的なｒＡＡＶであり、本明細書で開示する任意のｒＡＡＶを、本明細書で開示するような異なる原因に起因する様々な非虚血性心筋症からの心不全を処置するための方法で使用することができる。例えば、当業者は、実施例６で論じるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃにおけるＣＭＶプロモーターを、心特異的プロモーター、例えば、表２Ａもしくは５Ａで開示する、または図７Ｂ～７Ｏに示す、任意の心特異的プロモーターの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例で論じるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、Ｉ－１ｃをコードするコドン最適化核酸配列、例えば、これらに限定されるものではないが、配列番号３８５～４１２の核酸配列、を含むｒＡＡＶの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例６で論じるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、配列番号４１３～４４０の核酸配列またはその改変バージョンを含むｒＡＡＶの代わりに、容易に使用することができる。実施例６で使用する、細菌配列を欠いておりＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを含むｒＡＡＶを、配列番号３５７～３８４の線状二重鎖ＤＮＡのいずれからも製造することができ、本実施例で論じるようなホスホランバン突然変異を有する患者に関する心筋症の処置を含む、様々な異なる原因に起因する様々な非虚血性心筋症の処置に使用することができる。

【１１５７】

ホスホランバン（ＰＬＮ）の病原性突然変異は、カルシウム恒常性におけるその役割に起因して遺伝性心筋症を生じさせる。いくつかのＰＬＮ突然変異が同定されており、Ｒ１４ｄｅｌ突然変異は、オランダにおいて最も多く見られる心筋症関連突然変異である。ＰＬＮ遺伝子のＲ１４ｄｅｌ突然変異は、不整脈原性心筋症と診断された患者はもちろん、拡張型心筋症と診断された患者にも存在する。Ｒ１４ｄｅｌ突然変異を有する患者は、高齢の発症年齢、低電位差心電図および高頻度の不整脈を特徴とする。加えて、これらの患者は、予後が不良であり、多くの場合、左室機能障害および若年性心不全を有する（Hof et al., Prevalence and cardiac phenotype of patients with a phospholamban mutation. Neth Heart J. 2019 Feb;27(2):64-69；Hof IE et al., Prevalence and cardiac phenotype of patients with a phospholamban mutation. Neth Heart J. 2019 Feb;27(2):64-69）。

【１１５８】

ＰＬＮ遺伝子のＲ１４ｄｅｌ突然変異があると同定されたヒト患者に、本明細書で開示するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを投与することができる。例えば、不整脈原性心筋症および／または拡張型心筋症を有するオランダからの患者、ならびに／またはＰＬＮ遺伝子のＲ１４ｄｅｌ突然変異を有する患者に、ｒＡＡＶベクターがＡＡＶ２ｉ８であり、Ｉ－１ｃタンパク質（Ｔ３５Ｄ改変を有するアミノ酸１～６５）をＣＭＶプロモーターのもとで発現する、ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの注入を施すことができる。ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの単回冠動脈内注入を、少なくともＮＹＨＡクラスＩＩＩの心不全を有するヒト患者に投与することになり、投与を、3×10^{13}ｖｇ、１

×１０^{14}ｖｇ、３×１０^{14}ｖｇ、１×１０^{15}ｖｇ、または１×１０^{15}ｖｇのいずれかから選択される総用量の単回投与として行うことができる。本研究におけるすべての患者は、ＰＬＮ遺伝子のＲ１４ｄｅｌ突然変異を有し、かつ非虚血性心筋症を有すると同定された者となる。一部の患者の場合、総用量を、各分割用量が別々の注射器から投与される一連の５分割用量で投与することになり、これらの５分割用量を約２５～３０分の期間にわたって対象に投与する。このような事例では、総ｒＡＡＶ用量を５０ｍｌの生理食塩水で希釈し、５分割用量として５本の注射器で、各注射器に１０ｍｌの体積で投与する。たびたび停止し、造影剤注射を使用して各冠動脈におけるカテーテルの位置をチェックしながら、５本の注射器の各々について約５分かけて、次々に注射器を用いて投与を行うことになる。すべての患者を処置介入の１２か月後まで追跡し、その後、さらに２４か月（＋／－３０日）間、６か月ごとに半構造化電話質問票による長期追跡調査を行うことになる。

【１１５９】

投与前、ならびに投与の４週間（＋／－３日）、６か月および１２か月後に、様々な生理学的評価を使用して患者を評価することになる。例えば、ＬＶＥＦ、ＬＶＥＶＤ、ＬＶＥＤＶＩ、ＶＬＥＳＶ、ＬＶＥＶＩ、ＳｐＩおよびＧＬＳの心エコー評価、そして僧帽弁逆流度を評価することができ、血清ＮＴ－プロＢＮＰレベルも評価することができ、ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃ　ｒＡＡＶベクターの投与の有効性を決定するために二次効果も評価することができる。二次効果としては、例えば、（ｉ）心肺運動負荷試験により評価されるピークＶＯ$_2$、（ｉｉ）６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、（ｉｉｉ）ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類、（ｉｖ）院外生存日数の総数（および研究介入後の総生存日数の％としての院外総日数）、（ｖ）ベースラインと比較される６および１２か月の時点でのクオリティオブライフ、（ｖｉ）ミネソタＬｉｖｉｎｇ　ｗｉｔｈ　Ｈｅａｒｔ　Ｆａｉｌｕｒｅ質問票（ＭＬＷＨＦＱ）により評価される健康に関連するクオリティオブライフが挙げられるが、これらに限定されない。患者を、１２か月および長期追跡調査期間（介入後３６か月目まで）で評価することもでき、または心臓移植もしくは左室補助人工心臓（ＬＶＡＤ）移植の必要性について評価することもできる。

【１１６０】

ピークＶＯ$_2$およびＬＶＥＦレベルの変化を含む、主要評価項目を評価することになる。ピークＶＯ$_2$変化を判定するために、修正ブルースプロトコールを使用して心肺運動負荷試験により決定されるようなピークＶＯ$_2$を、投与後６および１２か月の時点で、投与前または投与時のピークＶＯ$_2$と比較して（すなわち、ベースラインと比較して）測定することになる。評価することになる他の主要評価項目は、左室駆出率（ＬＶＥＦ）の、投与もしくはスクリーニングの時点で測定されるＬＶＥＦと比較したときの心エコー評価の変化、または投与の１８～２４時間後、もしくは投与の４週間、６か月および１２か月後の左室駆出率（ＬＶＥＦ）の、投与の前または投与の時点で測定されるＬＶＥＦ（例えば、ベースラインＬＶＥＦレベル）と比較したときの心エコー評価の変化である。

【１１６１】

投与後６および１２か月の時点で測定される６ＭＷＴ（６分間歩行試験）からの結果の、投与時または投与前に測定される６ＭＷＴからの結果と比較したときの（すなわち、ベースラインと比較したときの）変化を含む、副次的評価項目も、評価することができる。正常な対象と比較して心不全の対象において予想される％の解析の副次的評価項目も判定した。

【１１６２】

ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの投与後６または１２か月の時点で検出される、実施例５における非虚血性心筋症患者のＨＦ臨床パラメーターの有意な改善（例えば、臨床パラメーターの改善、例えば、ＮＹＨＡクラスの改善、％ＥＦの増加、６ＭＷＴでの歩行距離の延長、血清ＮＴ－プロＢＮＰの減少、ピークＶＯ$_2$の増加、ＬＶＥＦの増加、ＭＷＨＦスコアの改善など）に基づいて、ＰＬＮ遺伝子のＲ１４ｄｅｌ突然変異に起因する非虚血性心筋症をはじめとする、非虚血性遺伝性心筋症を有する患者にも、投与の少なく

とも１２か月後にＨＲ臨床パラメーターの同様の改善があると予想される。したがって、実施例５および６は、本明細書で開示する方法が、疾患の原因がまだ分かっていないＨＦを有する対象の処置に有用であり、それ故、心臓の症状を伴う遺伝障害に起因する非虚血性心筋症、または家族性心筋症（例えば、進行性筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、フリードライヒ運動失調症および遺伝性拡張型心筋症に関連するもの、ならびに本明細書で開示される他のもの）を有する患者を処置するのに有用であることを示唆する。

（実施例７）

【１１６３】

虚血性心筋症を有するヒト対象のｉｎ　ｖｉｖｏ処置。

【１１６４】

実施例７では虚血性心筋症に起因する心不全を有する対象の処置を説明する。ここでの実施例７は、本明細書で開示する方法に従って虚血性心筋症からの心不全を処置するためにＩ－１ｃ遺伝子を発現するｒＡＡＶウイルスベクターをヒト患者に投与する方法を説明する。実施例７は、配列番号４４１のプラスミドから産生される、例示的なｒＡＡＶとしてのＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの投与を論じる。実施例７で論じるｒＡＡＶベクターＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃは、例示的なｒＡＡＶであり、本明細書で開示する任意のｒＡＡＶを、本明細書で開示するような様々な異なる原因に起因する様々な非虚血性心筋症からの心不全を処置するための方法で使用することができる。例えば、当業者は、実施例７で論じるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃにおけるプロモーターを、心特異的プロモーター、例えば、表２Ａもしくは５Ａで開示する、または図７Ｂ～７Ｏに示す、任意の心特異的プロモーターの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例で論じるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、Ｉ－１ｃをコードするコドン最適化核酸配列、例えば、これらに限定されるものではないが、配列番号３８５～４１２の核酸配列、を含むｒＡＡＶの代わりに、容易に用いることができる。同様に、実施例７で論じるＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを、配列番号４１３～４４０の核酸配列またはその改変バージョンを含むｒＡＡＶの代わりに、容易に使用することができる。細菌配列を欠いており、実施例５で使用したＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを含む、ｒＡＡＶを、配列番号３５７～３８４の線状二重鎖ＤＮＡのいずれかから製造し、本実施例で論じるように虚血性心筋症を処置するために使用することができる。

【１１６５】

本明細書で開示するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを投与したすべての患者は、左室壁運動異常の改善（ＬＶＥＦの改善により検出されるような）を有した。特に、本明細書で開示するＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃを投与した１名のヒト患者は、心臓の左室壁運動異常に起因する心不全を有した。ＬＶＥＦ、ＬＶＥＶＤ、ＬＶＥＤＶＩ、ＶＬＥＳＶ、ＬＶＥＶＩ、ＳｐＩおよびＧＬＳの心エコー評価、および僧帽弁逆流度の評価を含む、重要な心エコー図の読み出しを、投与前、ならびに投与後１か月、２か月、３か月、６か月、９か月および１２か月の時点で行った。心エコー図読み出しの有意な改善、特に、ＬＶＥＦの有意な改善があった。

【１１６６】

ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの投与後６～１２か月の時点で検出される、実施例５でのすべての患者におけるＬＶＥＦの有意な改善、および左室壁運動異常を有する患者１名のＬＶＥＦの有意な改善に基づいて、虚血性心筋症を有する患者にも、投与の少なくとも１２か月後にＬＶＥＦおよび他のＨＲ臨床パラメーターの同様の改善があると予想される。それ故、実施例７は、本明細書で開示する方法が、虚血性心筋症を有する対象の処置に有用であり、それ故、心不全症状またはＣＨＦ症状が現れる前の虚血性心筋症を有する患者をはじめとする虚血性心筋症を有する患者を処置するのに有用であることを示唆する。したがって、心筋梗塞（ＭＩ）、梗塞、組織虚血、心虚血、アテローム性動脈硬化症または冠動脈疾患（ＣＡＤ）に起因する虚血性心筋症を有する患者をはじめとする、虚血性心筋症を有する患者にも、投与の少なくとも１２か月後にＨＲ臨床パラメーターの同

様の改善があると予想される。

【１１６７】

しかるが故に、虚血性心筋症を有する患者に、ｒＡＡＶベクターがＡＡＶ２ｉ８であり、ＣＭＶプロモーターのもとでＩ－１ｃタンパク質（Ｔ３５Ｄ改変を有するアミノ酸１～６５）を発現する、ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの注入を施すことができる。ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの単回冠動脈内注入を、少なくともＮＹＨＡクラスＩＩＩの心不全を有するヒト患者に投与することになり、投与を、３×１０^{13}ｖｇ、１×１０^{14}ｖｇ、３×１０^{14}ｖｇ、１×１０^{15}ｖｇ、または１×１０^{15}ｖｇのいずれかから選択される総用量の単回投与として行うことができる。本研究における患者すべてが、虚血性心筋症を有すると同定されていることになる。一部の患者の場合、総用量を、各分割用量が別々の注射器から投与される一連の５分割用量で投与することになり、これらの５分割用量を約２５～３０分の期間にわたって対象に投与する。このような事例では、総ｒＡＡＶ用量を５０ｍｌの生理食塩水で希釈し、５分割用量として５本の注射器で、各注射器に１０ｍｌの体積で投与する。たびたび停止し、造影剤注射を使用して各冠動脈におけるカテーテルの位置をチェックしながら、５本の注射器の各々について約５分かけて、次々に注射器を用いて投与を行うことになる。すべての患者を処置介入の１２か月後まで追跡し、その後、さらに２４か月（＋／－３０日）間、６か月ごとに半構造化電話質問票による長期追跡調査を行うことになる。一部の事例では、対象に、非虚血性心筋症を有すると同定された対象に投与するｒＡＡＶの用量と比較して多いｒＡＡＶ用量を投与することができる。一部の事例では、虚血性心筋症を有する対象へのｒＡＡＶの投与を、冠動脈内注入により行うことになるか、または左室の筋肉および／もしくは心筋梗塞（ＭＩ）の位置を含むがこれらに限定されない、心筋組織への直接注射により行うことになる。一部の事例では、梗塞領域への血流を増加させるための追加の治療剤を対象に投与することもできる。

【１１６８】

投与前、ならびに投与の４週間（＋／－３日）、６か月および１２か月後に、様々な生理学的評価を使用して患者を評価することになる。例えば、ＬＶＥＦ、ＬＶＥＶＤ、ＬＶＥＤＶＩ、ＶＬＥＳＶ、ＬＶＥＶＩ、ＳｐＩおよびＧＬＳの心エコー評価、そして僧帽弁逆流度を評価することができ、血清ＮＴ－プロＢＮＰレベルも評価することができ、ＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃ　ｒＡＡＶベクターの投与の有効性を決定するために二次効果も評価することができる。二次効果としては、例えば、（ｉ）心肺運動負荷試験により評価されるピークVO_2、（ｉｉ）６分間歩行試験（６ＭＷＴ）、（ｉｉｉ）ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）分類、（ｉｖ）院外生存日数の総数（および研究介入後の総生存日数の％としての院外総日数）、（ｖ）ベースラインと比較される６および１２か月の時点でのクオリティオブライフ、（ｖｉ）ミネソタＬｉｖｉｎｇ　ｗｉｔｈ　Ｈｅａｒｔ　Ｆａｉｌｕｒｅ質問票（ＭＬＷＨＦＱ）により評価される健康に関連するクオリティオブライフが挙げられるが、これらに限定されない。患者を、１２か月および長期追跡調査期間（介入後３６か月目まで）で評価することもでき、または心臓移植もしくは左室補助人工心臓（ＬＶＡＤ）移植の必要性について評価することもできる。

【１１６９】

ピークVO_2およびＬＶＥＦレベルの変化を含む、主要評価項目を評価することになる。ピークVO_2変化を判定するために、修正ブルースプロトコールを使用して心肺運動負荷試験により決定されるようなピークVO_2を、投与後６および１２か月の時点で、投与前または投与時のピークVO_2と比較して（すなわち、ベースラインと比較して）測定することになる。評価することになる他の主要評価項目は、左室駆出率（ＬＶＥＦ）の、投与もしくはスクリーニングの時点で測定されるＬＶＥＦと比較したときの心エコー評価の変化、または投与の１８～２４時間後、もしくは投与の４週間、６か月および１２か月後の左室駆出率（ＬＶＥＦ）の、投与の前または投与の時点で測定されるＬＶＥＦ（例えば、ベースラインＬＶＥＦレベル）と比較したときの心エコー評価の変化である。

【１１７０】

投与後６および１２か月の時点で測定される６ＭＷＴ（６分間歩行試験）からの結果の、投与時または投与前に測定される６ＭＷＴからの結果と比較したときの（すなわち、ベースラインと比較したときの）変化を含む、副次的評価項目も、評価することができる。正常な対象と比較して心不全の対象において予想される％の解析の副次的評価項目も判定した。

【１１７１】

左室の動きが悪い心臓の異常に起因する心不全を有する患者においてＡＡＶ２ｉ８．ｓｃ－ＣＭＶ．Ｉ１ｃの投与後に心エコー評価により判定したときの左室駆出率（ＬＶＥＦ）の改善に基づいて、虚血性心筋症を有する患者にも、投与の少なくとも１２か月後に左室駆出率（ＬＶＥＦ）の改善があると予想される。

参考文献

【１１７２】

本明細書および実施例に引用したすべての参考文献は、それら全体が参照により組み込まれる。

【化３－１】

CARR, et al. "Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function." Molecular and cellular biology 22.12 (2002): 4124-4135

【化３－２】

DOKAINISH "Left ventricular diastolic function and dysfunction: Central role of echocardiography." Global Cardiology Science & Practice, 3: 1-12 (2015)

GYÖNGYÖSI et al. "Porcine model of progressive cardiac hypertrophy and fibrosis with secondary postcapillary pulmonary hypertension." Journal of Translation Medicine, 15(202): 1-15 (2017)

HIGGINS "Natriuretic peptide measurement in heart failure." acutecaretesting.org: 1-7 (2017)

HOF et al., Prevalence and cardiac phenotype of patients with a phospholamban mutation. Neth Heart J. 2019 Feb;27(2):64-69.

HOF et al., Prevalence and cardiac phenotype of patients with a phospholamban mutation. Neth Heart J. 2019 Feb;27(2):64-69; Hof IE et al., Prevalence and cardiac phenotype of patients with a phospholamban mutation. Neth Heart J. 2019 Feb;27(2):64-69.

ISHIKAWA et al. "Cardiac I-1c Overexpression With Reengineered AAV Improves Cardiac Function in Swine Ischemic Heart Failure." The American Society of Gene & Cell Therapy, 22(12): 2038-2045, (2014).

ISHIKAWA et al. "Gene Transfer for Ischemic Heart Failure in a Preclinical Model." Journal of Visualized Experiments, 51: 1-3 (2011).

KONERMANN et al. "Changes of the Left Ventricle after Myocardial Infarction-Estimation with Cine Magnetic Resonance Imagine during the First Six Months." Clinical Cardiology, 20: 201-212 (1997).

PATHAK, et al. "Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1." Circulation research 96.7 (2005): 756-766.

SWANK et al. "Modest Increase in Peak VO_2 Is Related to Better Clinical Outcomes in Chronic Heart Failure Patients: Results from Heart Failure and a Controlled Trial to Investigate Outcomes of Exercise Training." American Heart Association, 579-585 (2012).

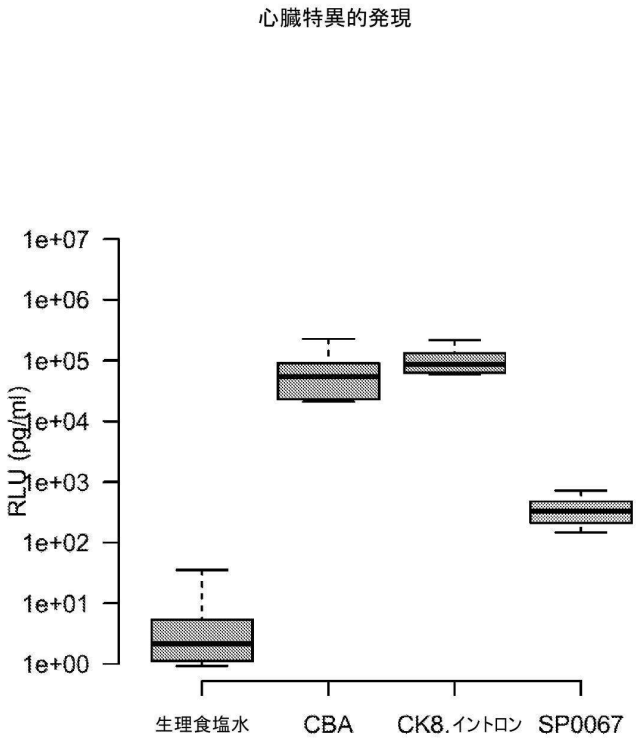
TAYLOR et al. "Diagnostic accuracy of point-of-care natriuretic peptide testing for chronic heart failure in ambulatory care: systematic review and meta-analysis." Nuffield Department of Primary Care Health Sciences at University of Oxford: 1-14 (2018)

WATANABE et al. "Protein Phosphatase Inhibitor-1 Gene Therapy in a Swine Model of Nonischemic Heart Failure." Journal of the American College of Cardiology, 70(14): 1744-1756 (2017).

【図面】

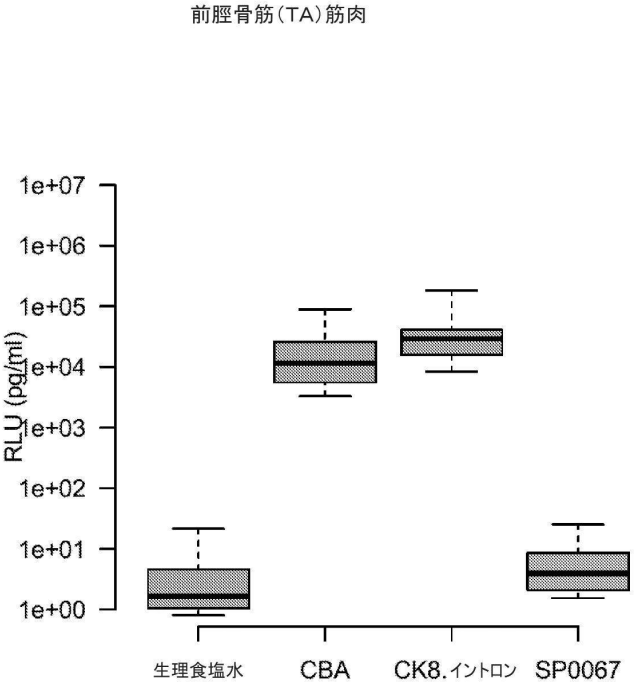
【図１】

FIG. 1



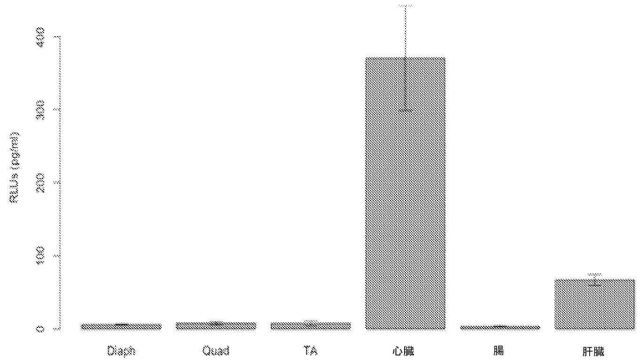
【図２】

FIG. 2



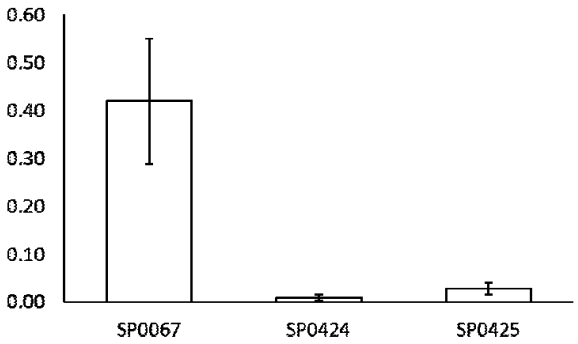
【図３】

FIG. 3



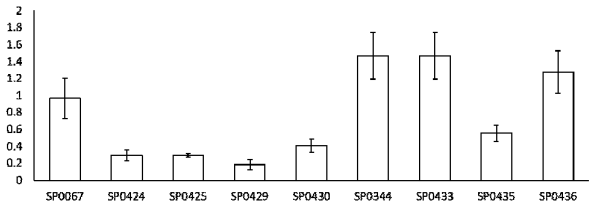
【図４Ａ】

FIG. 4A



【図４Ｂ】

FIG. 4B



【図５－１】

FIG. 5A

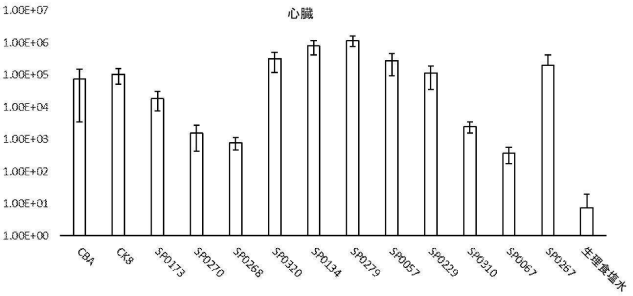
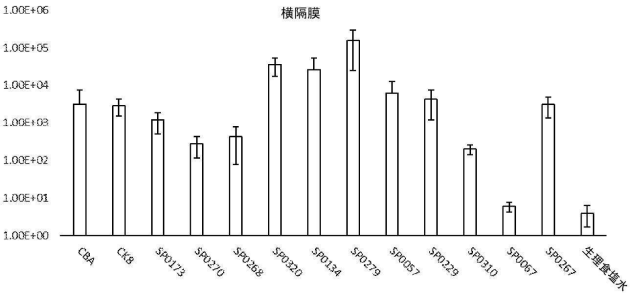


FIG. 5B



【図５－２】

FIG. 5C

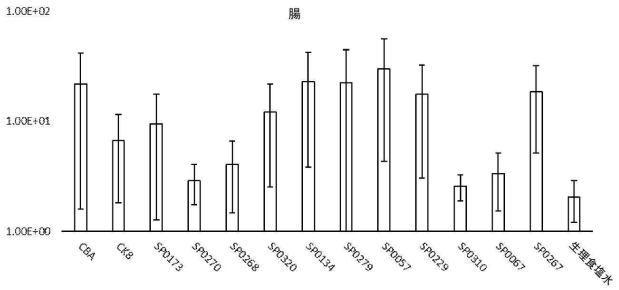
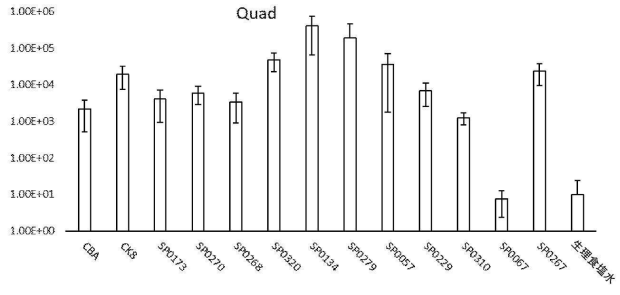


FIG. 5D



【図５－３】

FIG. 5E

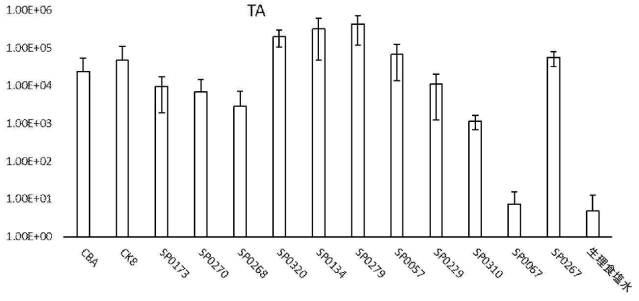
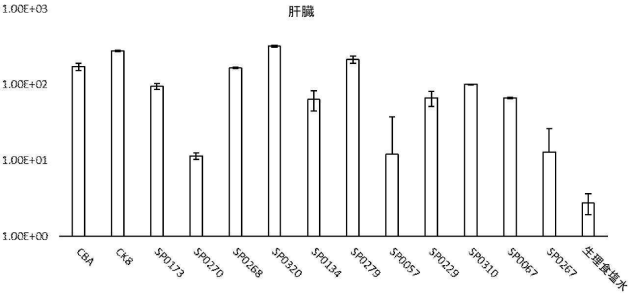


FIG. 5F



【図６－１】

FIG. 6A

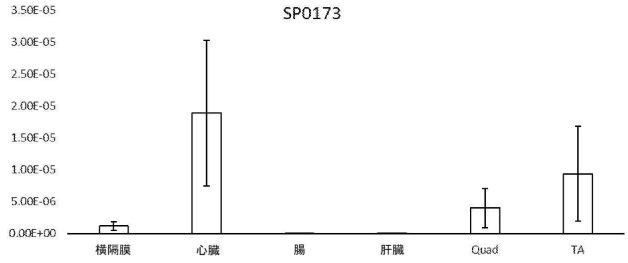
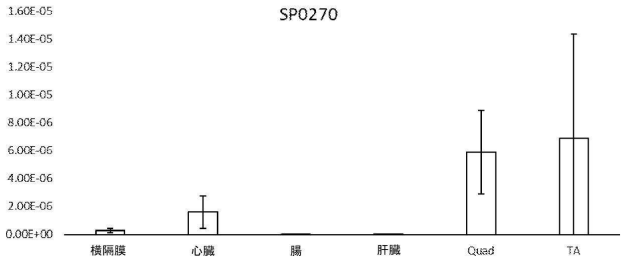


FIG. 6B



【図６－２】

FIG. 6C

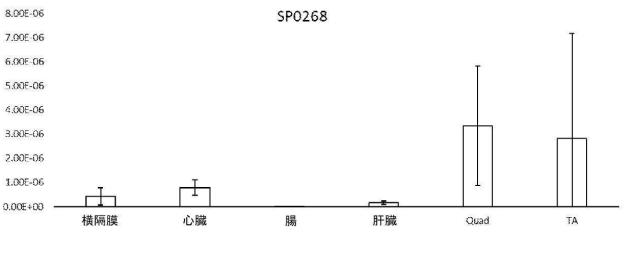
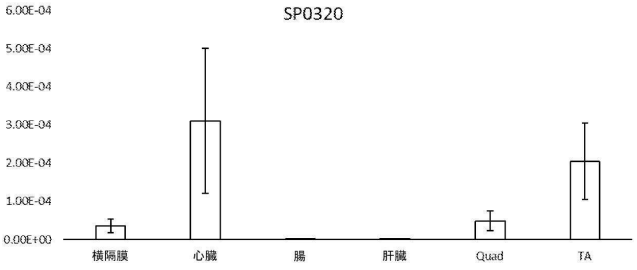


FIG. 6D



【図６－３】

FIG. 6E

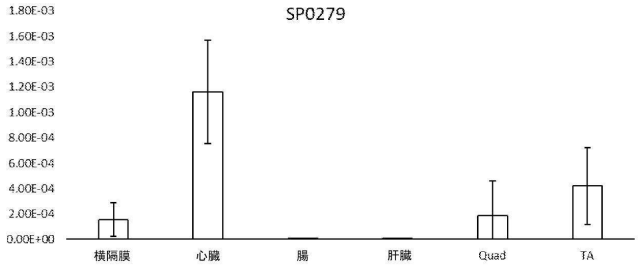
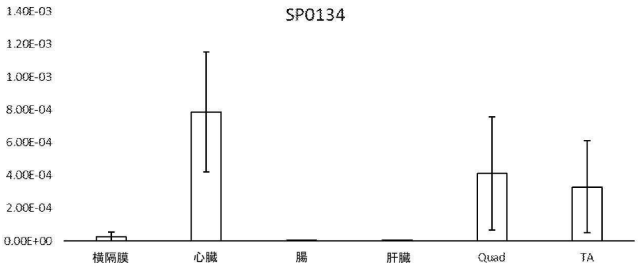


FIG. 6F



【図６－４】

FIG. 6G

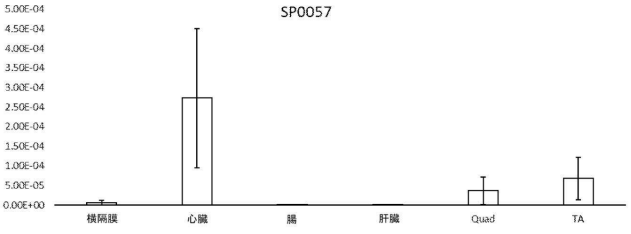
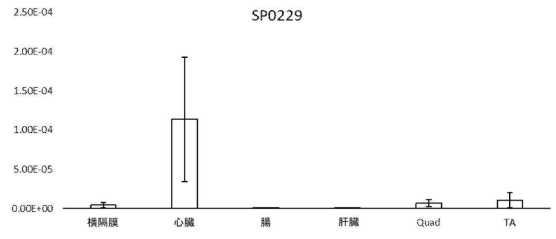


FIG. 6H



【図６－５】

FIG. 6I

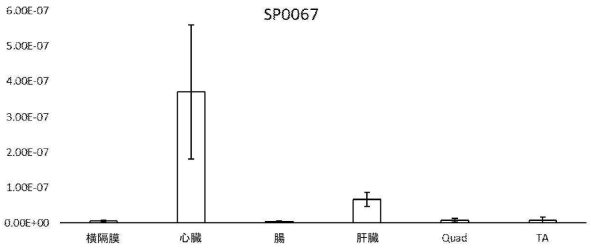


FIG. 6J

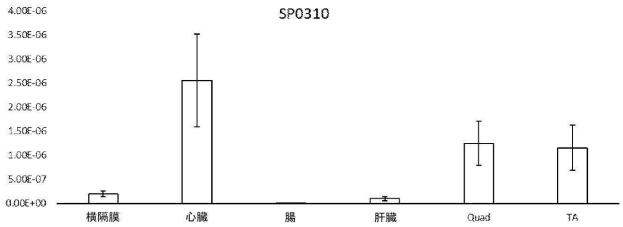
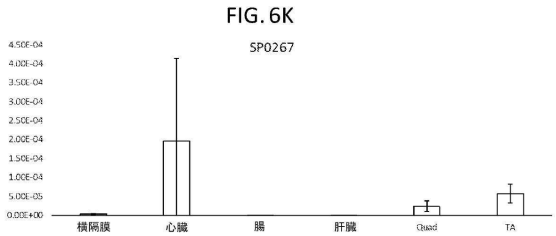


FIG. 6K



【図７－１】

FIG. 7A

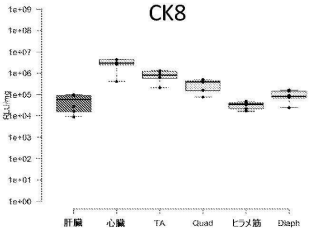


FIG. 7B

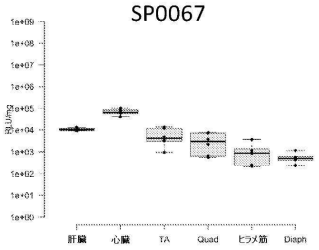
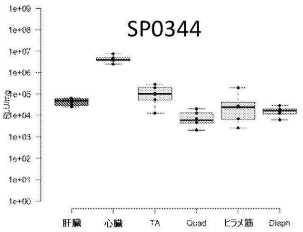


FIG. 7C



【図７－２】

FIG. 7D

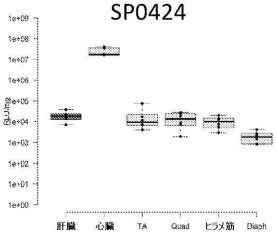


FIG. 7E

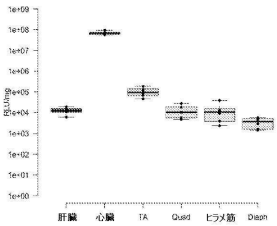
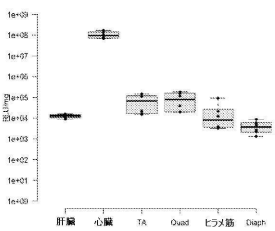


FIG. 7F



【図７－３】

FIG. 7G

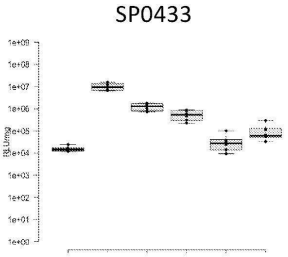


FIG. 7H

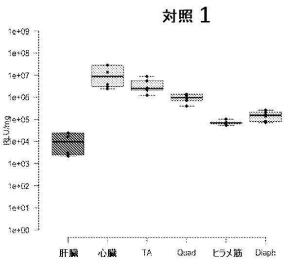
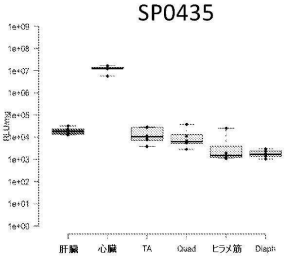


FIG. 7I



【図７－４】

FIG. 7J

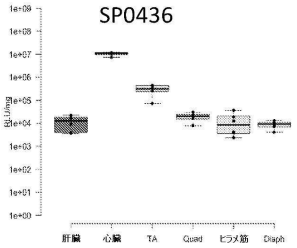


FIG. 7K

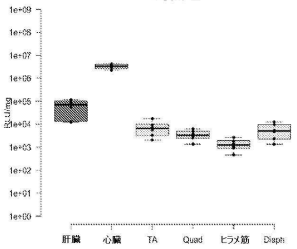
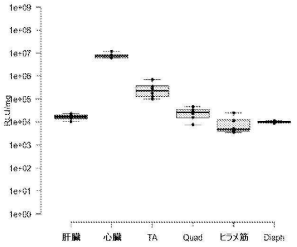


FIG. 7L



【図７－５】

FIG. 7M

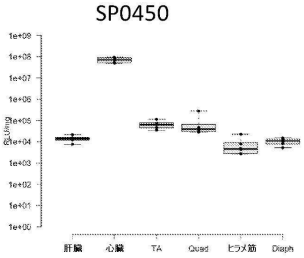


FIG. 7N

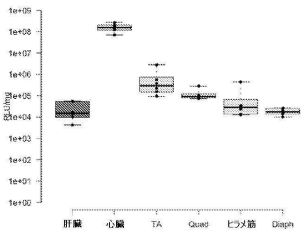
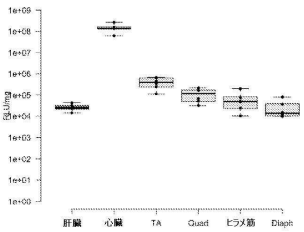
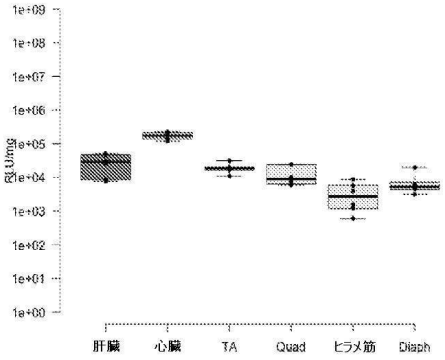


FIG. 7O



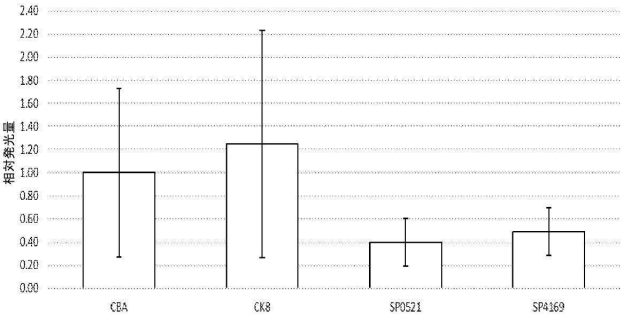
【図７－６】

FIG. 7P



【図８】

FIG. 8



【配列表】

2023536921000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/44650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61P 9/04, A61P 9/00, A61K 38/16, C12N 15/861, A61K 48/00 (2021.01)
CPC - A61P 9/04, A61P 9/00, A61K 38/16, C12N 15/861, C12N 2800/22, C12N 2750/14143

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/0296578 A1 (THE UNIVERSITY OF CINCINNATI) 18 October 2018 (18.10.2018) para [0025]; para [0029]; para [0061]; para [0124]; para [0132]; para [0150]; claim 1; claim 13; claim 16	1-5, 9, 14-15
Y	US 2011/0144019 A1 (UNEMORI et al.) 16 June 2011 (16.06.2011) para [0005]; para [0027]; claim 41; claim 51	1-5, 15/1
Y	WATANABE et al. "Protein Phosphatase Inhibitor-1 Gene Therapy in a Swine Model of Nonischemic Heart Failure" J Am Coll Cardiol. 3 October 2017, Vol. 70, No. 14, pp 1744-1756, especially, Abstract; Table 1	9, 14, 15/14

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 November 2021	FEB 17 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/44650

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/44650

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

3. ☒ Claims Nos.: 6-8, 16-40, 44, 48-64, 67-72, 75-128
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

----------continued on supplemental sheet----------

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 9, 14-15 wherein the twelve months post administration improvement in the parameter from a baseline level is ejection fraction (EF).

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/44650

Continuation of Box III: Observations hwere unity of invention is lacking:

Group I+: Claims 1-5, 9-15, directed to a method of treating a patient having a heart failure or cardiomyopathy, comprising administering into heart cells of the patient a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity. The method of treatment will be searched to the extent that the twelve months post-administration improvement in the parameter from a baseline level in the patient is ejection fraction (EF). It is believed that claims 1-5, 9 and 14-15 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the method of treating a patient having a heart failure or cardiomyopathy, comprising administering into heart cells of the patient a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity, wherein the twelve months post-administration improvement in the parameter from a baseline level in the patient is ejection fraction (EF). Additional parameters will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected parameters. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a method of treating a patient having a heart failure or cardiomyopathy, comprising administering into heart cells of the patient a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity, wherein the twelve months post-administration improvement in the parameter from a baseline level in the patient is end systolic volume (ESV)(claims 1-5, 9 and 14-15). A further exemplary election would be a method of treating a patient having a heart failure or cardiomyopathy, comprising administering into heart cells of the patient a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity, wherein the twelve months post-administration improvement in the parameter from a baseline level in the patient is ejection fraction (EF) and end systolic volume (ESV)(claims 1-5, 9-10 and 14-15)

Group II+: Claims 41-43, 46-47, 65-66, 73-74 directed an adeno-associated virus (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence encoding a Phosphatase inhibitor (I-1). Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The AAV vector may be searched for an additional fee and election as such, for example, to the extent that the AAV vector comprises a codon optimized I-Ic nucleic sequence of SEQ ID NO: 385, a cardiac-specific promoter of SEQ ID NO: 3 and a polypeptide comprising at least amino acid residues 1 -65 of SEQ ID NO: 1 (claims 41-45, 47, 65, 57, 73-74). Additional I-Ic, promoters and polypeptide sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected DNA molecule. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a AAV vector may be searched for an additional fee and election as such, for example, to the extent that AAV vector may be searched for an additional fee and election as such, for example, to the extent that the AAV vector comprises a codon optimized I-Ic nucleic sequence of SEQ ID NO: 41, a muscle-specific promoter active in cardiac and skeletal muscle of SEQ ID NO: 336 and a polypeptide comprising at least amino acids 1-54 of SEQ ID NO: 1, wherein the polypeptide is truncated at the C-terminus at amino acid 70, 67, 66, 65, or 61, or 54, and where the there is an aspartic acid at position 35 (T35D) (claims 41-46, 47, 65-66, 73-74).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I+ requires a method of treating a patient having a heart failure or cardiomyopathy, not required by Group II+.

Group II+ requires an adeno-associated virus (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence encoding a Phosphatase inhibitor (I-1), not required by Group I+.

Common Technical Features

The feature shared by Group I+, and II+ is an adeno-associated virus (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence encoding a Phosphatase inhibitor (I-1) polypeptide.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2018/0296578 A1 to the University of Cincinnati (hereinafter 'UC').

UC discloses a adeno-associated virus (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence encoding a Phosphatase inhibitor (I-1) polypeptide (claim 1- "method of treating a subject having heart failure, comprising: introducing, into heart cells of the subject, a nucleic acid that comprises a sequence encoding a phosphatase inhibitor protein that inhibits phosphatase activity"; claim 16- "wherein the nucleic acid is introduced using an adeno-associated viral particle"; para [0061]- "Exemplary adenoviral vectors include...").

----------continued on next sheet----------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/44650

Continuation of previous sheet:

The features shared by the inventions listed as Group I+ are a method of treating a patient having a heart failure or cardiomyopathy, comprising administering into heart cells of the patient a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by UC in view of US 2011/0144019 A1 to Unemori et al. (hereinafter 'Unemori').

UC discloses (instant claim 1) a method of treating a patient having a heart failure (claim 1- "method of treating a subject having heart failure"), comprising:
administering into heart cells of the patient having a congestive heart failure (CHF) (claim 1; para [0029]- " "heart disorder" refers to a structural or functional abnormality of the heart that impairs its normal functioning. For example, the heart disorder can be heart failure, ischemia, myocardial infarction, congestive heart failure"), at least one total dose of a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity (claim 1- "method of treating a subject having heart failure, comprising: introducing, into heart cells of the subject, a nucleic acid that comprises a sequence encoding a phosphatase inhibitor protein that inhibits phosphatase activity"; claim 16- "wherein the nucleic acid is introduced using an adeno-associated viral particle"; para [0061]- "Exemplary adenoviral vectors include (Ad.RSV.lacZ)"; para [0025]- "that includes one or more doses of a viral delivery system described herein. A dose can include"),
wherein, at least one dose of the rAAV is selected from a total dose-range of about 1013vg to about 1015vg (para [0024]- "dose can include, e.g., at least 1X109, 1X1010, 1X10 11, 1X1012, 1X1013, 1X1014, 1X1015, or 1X1016 units (e.g., genomes or plaque forming units) of the viral delivery system"), and
wherein, at least twelve months post-administration there is an improvement in the congestive heart failure (para [0124]- "expression of a protein that inhibits phosphatase is effective for decreasing PP1 activity, an activity which is reported to be elevated in human heart failure. In addition, these results indicate that inhibition of PP1 activity by I-1T35SD significantly improves the beta-adrenergic responsiveness in the failing human heart"; para [0150]; para [0132]- "Moreover, cardiac function was similarly increased at 6 months of age and longevity studies (19 WTs and 19 TGs) indicated no evidence of sudden death, while Kaplan-Meier survival analysis (upto 2 years of age)"), but does not teach the patient having a classification of congestive heart failure (CHF), and wherein, at least twelve months post-administration there is an improvement in the classification of congestive heart failure.
However, Unemori teaches treating patients with congestive heart failure as classified by New York Heart association (para [0005]- "The present disclosure provides methods for treating patients with congestive heart failure (CHF) by administering relaxin"; claim 1- "pharmaceutically active relaxin to a human subject with New York Heart Association Class II or Class III heart failure) wherein the treatment results in improvement in the classification of the heart condition (claim 51- "wherein the improved functional capacity corresponds to a change to a milder class of heart failure, according to the NYHA classification"). Since, Unemori teaches that the disclosed method can prevent the condition from developing into acute conditions (para [0005]- "in a balanced vasodilation that prevents compensated heart failure from developing into acute decompensated heart failure"), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of UC with Unemori and optimized the method and used the classification to assess the condition before and after treatment, to achieve a desired treatment, using routine experimentation.

UC discloses (instant claim 9), a method of treating a patient having cardiomyopathy (para [0120]- "fl-1 in failing human hearts, the levels of I-1 were compared in biopsies from nine non-failing and ten failing human hearts, in which the primary diagnosis was dilated cardiomyopathy (IDC)"; claim 1- "method of treating a subject having heart failure"), comprising:
administering into heart cells of the patient at least one total dose of a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity (claim 1- "method of treating a subject having heart failure, comprising: introducing, into heart cells of the subject, a nucleic acid that comprises a sequence encoding a phosphatase inhibitor protein that inhibits phosphatase activity"; claim 16- "wherein the nucleic acid is introduced using an adeno-associated viral particle"; para [0061]- "Exemplary adenoviral vectors include (Ad.RSV.lacZ)"),
wherein, at least one dose of the rAAV is selected from a total dose-range of about 1013vg to about 1015vg (para [0024]- " dose can include, e.g., at least 1X109, 1X1010, 1X10 11, 1X1012, 1X1013, 1X1014, 1X1015, or 1X1016 units (e.g., genomes or plaque forming units) of the viral delivery system"), and
wherein, at least twelve months post-administration (para [0124]- "expression of a protein that inhibits phosphatase is effective for decreasing PP1 activity, an activity which is reported to be elevated in human heart failure. In addition, these results indicate that inhibition of PP1 activity by I-1T35SD significantly improves the Beta-adrenergic responsiveness in the failing human heart"; para [0150]; para [0132]- "Moreover, cardiac function was similarly increased at 6 months of age and longevity studies (19 WTs and 19 TGs) indicated no evidence of sudden death, while Kaplan-Meier survival analysis (upto 2 years of age)") there is an improvement in the at least one parameter from a baseline level in the patient, where the at least one parameter is end systolic volume (ESV) (para [0145]- "suggesting maintained function and reduced wall-tension or stress, as determined by La Place's law. In contrast, WTs experienced a .30% decline in Vcfc and significant increases in left-ventricular end-diastolic and end-systolic dimensions (P<0.05), indicating their progression to cardiac dilatation (FIG. 5A)").

The features shared by the inventions listed as Group II+ is a rAAV vector comprising a nucleic acid sequence encoding a phosphatase inhibitor (I-1) protein that inhibits phosphatase activity.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by UC.

----------continued on next sheet----------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/44650

continuation of previous sheet:

UC discloses (instant claim 41) a pharmaceutical composition comprising an AAV vector that comprises a codon optimized I-1c nucleic sequence (claim 1- "method of treating a subject having heart failure, comprising: introducing, into heart cells of the subject, a nucleic acid that comprises a sequence encoding a phosphatase inhibitor protein that inhibits phosphatase activity, in an amount effective to decrease phosphatase activity"; claim 6- "wherein the phosphatase inhibitor protein is a constitutively active fragment of phosphatase inhibitor-1"; para [0075]).

UC discloses (instant claim 45) an adeno-associated virus (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence encoding a Phosphatase Inhibitor (I-1) polypeptide (claim 1- "method of treating a subject having heart failure, comprising: introducing, into heart cells of the subject, a nucleic acid that comprises a sequence encoding a phosphatase inhibitor protein that inhibits phosphatase activity, in an amount effective to decrease phosphatase activity"; claim 6- "wherein the phosphatase inhibitor protein is a constitutively active fragment of phosphatase inhibitor-1") operably linked to a promoter (claim 10- "nucleic acid further comprises a promoter operably linked to the coding sequence") selected from a cardiac-specific promoter (claim 13- "the promoter comprises regulatory sequences from the Cytomegalovirus (CMV) or the cardiac specific cardiac troponin T").

UC discloses (instant claim 65), a pharmaceutical composition comprising (para [0075]):
(i) adeno-associated virus (AAV) vector comprising a nucleic acid sequence encoding a Phosphatase inhibitor (I-1) polypeptide operably linked to a cardiac-specific promoter (claim 1- "method of treating a subject having heart failure, comprising: introducing, into heart cells of the subject, a nucleic acid that comprises a sequence encoding a phosphatase inhibitor protein that inhibits phosphatase activity, in an amount effective to decrease phosphatase activity"; claim 6- "wherein the phosphatase inhibitor protein is a constitutively active fragment of phosphatase inhibitor-1"; claim 10- "nucleic acid further comprises a promoter operably linked to the coding sequence"; claim 13- "the promoter comprises regulatory sequences from the Cytomegalovirus (CMV) or the cardiac specific cardiac troponin T"); and
(ii) a pharmaceutically acceptable carrier (para [0075]).

UC discloses (instant claim 73) the pharmaceutical composition, wherein the phosphatase inhibitor (I-1) polypeptide is a constitutively active protein (I-1c) (para [0075]; claim 6- "wherein the phosphatase inhibitor protein is a constitutively active fragment of phosphatase inhibitor-1").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+, and II+ therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)
Claims 6-8, 16-40, 44, 48-64, 67-72 and 75-128 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Notes:
- Claim 29 is objected to for being self-dependent. For the purposes of this application, claim 29 is construed as though depending from claim 28.
- Claim 79 is objected to for being dependent on of any of claims 65-745. For the purposes of this application, claim 79 is construed as though depending from any of claims 65-74.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/864(2006.01)*	C12N	15/864	100Z	
C12N	*5/077(2010.01)*	C12N	5/077		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*15/12 (2006.01)*	C12N	15/12	ZNA	
C12N	*15/35 (2006.01)*	C12N	15/35		

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

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 オカラガン， マイケル ダブリュー．
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０９， リサーチ トライアングル パーク， ティー．ダブリュー． アレクサンダー ドライブ ２０， スイート １１０， アスクレピオス バイオファーマシューティカル， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ロバーツ， マイケル エル．
イギリス国 イーエイチ２５ ９アールジー ミッドロージアン， イースター ブッシュ キャンパス， ロスリン イノベーション センター， シンプロミクス リミテッド 気付
(72)発明者 ヤネス－クーナ， ジョージ オマル
イギリス国 イーエイチ２５ ９アールジー ミッドロージアン， イースター ブッシュ キャンパス， ロスリン イノベーション センター， シンプロミクス リミテッド 気付
(72)発明者 イグレシアス ゴンザレス， フアン マヌエル
イギリス国 イーエイチ２５ ９アールジー ミッドロージアン， イースター ブッシュ キャンパス， ロスリン イノベーション センター， シンプロミクス リミテッド 気付
(72)発明者 エブリピオティ， アントニア
イギリス国 イーエイチ２５ ９アールジー ミッドロージアン， イースター ブッシュ キャンパス， ロスリン イノベーション センター， シンプロミクス リミテッド 気付
(72)発明者 クーパー， シンクレア
イギリス国 イーエイチ２５ ９アールジー ミッドロージアン， イースター ブッシュ キャンパス， ロスリン イノベーション センター， シンプロミクス リミテッド 気付
(72)発明者 セスナ， フェルジン
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０９， リサーチ トライアングル パーク， ティー．ダブリュー． アレクサンダー ドライブ ２０， スイート １１０， アスクレピオス バイオファーマシューティカル， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ハジャル， ロジャー
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０９， リサーチ トライアングル パーク， ティー．ダブリュー． アレクサンダー ドライブ ２０， スイート １１０， アスクレピオス バイオファーマシューティカル， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 トレチャコヴァ， アンナ
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７０９， リサーチ トライアングル パーク， ティー．ダブリュー． アレクサンダー ドライブ ２０， スイート １１０， アスクレピオス バイオファーマシューティカル， インコーポレイテッド 気付

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA08 BA20 BA23 CA53 DC32 MA65 NA05 NA14 ZA37

Fターム（参考）　4C087　AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA12 MA65 NA14 ZA37