(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0032438
(43) 공개일자 2021년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/69* (2017.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7004180
(22) 출원일자(국제) 2019년07월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년02월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/042069
(87) 국제공개번호 WO 2020/018583
국제공개일자 2020년01월23일
(30) 우선권주장
62/698,503 2018년07월16일 미국(US)
62/839,766 2019년04월28일 미국(US)

(71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그로브 스트리트 65
(72) 발명자
켈러, 피터
미국 01915 매사추세츠주 비벌리 베리우드 레인 3
키시모토, 타카시, 케이
미국 02420 매사추세츠주 렉싱턴 쿨리지 애비뉴 46
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 **OTC 구축물 및 벡터의 방법 및 조성물**

(57) 요 약

오르니틴 트랜스카르브아밀라제 (OTC)를 코딩하는 핵산, 예컨대 OTC 코돈-최적화된 서열을 포함하는 핵산, 뿐만 아니라 관련 벡터, 예컨대 AAV 벡터와 관련된 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 또한, 요소 회로 장애와 연관된 효소를 코딩하는 서열 및 발현 제어 서열을 포함하는 AAV 벡터를 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체와 조합하여 투여하는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/6937 (2017.08)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/1018 (2013.01)
C12Y 201/03003 (2013.01)
C12N 2750/14132 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
(72) 발명자
무로, 안드레스
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 빌딩 원 아스날 스트리트 480
드 사바타, 줄리아
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 빌딩 원 아스날 스트리트 480

명 세 서

청구범위

청구항 1

요소 회로 장애를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체에게 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 및 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체를 병용으로 투여하는 것을 포함하며, 여기서 AAV 벡터는 요소 회로 장애와 연관된 효소를 코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 요소 회로 장애가 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 신테타제 (OTC) 결핍인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, AAV 벡터 및 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체가 AAV 벡터에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응을 감소시키는데 효과적인 양으로 존재하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 벡터 및 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체가 초기 질환 발병 동안 병용으로 투여되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 추가의 치료제로서 스테로이드가 투여되지 않는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 치료제로서 스테로이드를 감소된 양으로 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 이전에 AAV 벡터 및 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체를 병용으로 투여받았던 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 후속 시점에 대상체에게 AAV 벡터를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 벡터 및 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체의 병용 투여가 반복되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 요소 회로 장애와 연관된 효소를 코딩하는 서열이 코돈 최적화된 서열인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 요소 회로 장애와 연관된 효소가 OTC인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, OTC를 코딩하는 서열이 OTC-CO3 또는 OTC-CO21의 OTC를 코딩하는 서열인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, OTC를 코딩하는 서열이 서열식별번호: 1-11 또는 13에 제시된 바와 같은 서열 또는 그의 부분인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, OTC를 코딩하는 서열이 서열식별번호: 13의 OTC를 코딩하는 서열인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 제어 서열이 간-특이적 프로모터인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 라파마이신인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 벡터가 AAV8 벡터인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 합성 나노담체 내에 캡슐화된 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 중합체 나노입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르 또는 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 폴리에스테르가 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에테르가 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체 집단의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균이 110nm 초과의 직경인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 직경이 150nm 초과인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 직경이 200nm 초과인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 직경이 250nm 초과인 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 직경이 5㎛ 미만인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 직경이 4㎛ 미만인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 직경이 3㎛ 미만인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 직경이 2㎛ 미만인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 직경이 1㎛ 미만인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 직경이 500nm 미만인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 직경이 450nm 미만인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 직경이 400nm 미만인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 직경이 350nm 미만인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 직경이 300nm 미만인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 로드가 합성 나노담체 전반에 걸쳐 평균 0.1% 내지 50% (중량/중량)인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 로드가 0.1% 내지 25%인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 로드가 1% 내지 25%인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 로드가 2% 내지 25%인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체 집단의 종횡비가 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3,

1:5, 1:7 또는 1:10 초과인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 AAV 벡터의 용량을 포함하는 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 합성 나노담체의 용량을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 키트인 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 키트가 사용에 대한 지침서를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

제45항에 있어서, 키트가 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 방법을 수행하는 것에 대한 지침서를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 48

본원에 제공된 OTC 중 어느 하나를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 서열이 OTC-CO3 또는 OTC-CO21의 OTC를 코딩하는 것인 조성물.

청구항 50

제48항에 있어서, OTC를 코딩하는 서열이 서열식별번호: 1-11 또는 13에 제시된 바와 같은 서열 또는 그의 부분인 조성물.

청구항 51

제48항에 있어서, OTC를 코딩하는 서열이 서열식별번호: 13의 OTC를 코딩하는 서열인 조성물.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산의 서열이 발현 제어 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 발현 제어 서열이 프로모터인 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 프로모터가 간-특이적 프로모터인 조성물.

청구항 55

OTC를 코딩하는 본원에 제공된 서열 중 어느 하나, 예컨대 서열식별번호: 4, 8 또는 9에 제시된 바와 같은 서열 또는 그의 부분을 포함하는 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 핵산이 발현 제어 서열을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 발현 제어 서열이 프로모터인 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 프로모터가 간-특이적 프로모터인 조성물.

청구항 59

제48항 내지 제58항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 바이러스 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 바이러스 벡터가 AAV 벡터인 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, AAV 벡터가 AAV8 벡터인 조성물.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 바이러스 벡터를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2018년 7월 16일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/698,503 및 2019년 4월 28일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/839,766의 이익을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 (OTC)를 코딩하는 핵산, 예컨대 OTC 코돈-최적화된 서열을 포함하는 핵산, 뿐만 아니라 관련 벡터, 예컨대 AAV 벡터와 관련된 방법 및 조성물에 관한 것이다. 또한, 요소 회로 장애와 연관된 효소를 코딩하는 서열 및 발현 제어 서열을 포함하는 AAV 벡터를 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체와 조합하여 투여하는 방법이 제공된다.

발명의 내용

[0005] OTC를 코딩하는 핵산, 예컨대 OTC 코돈-최적화된 서열을 포함하는 핵산, 뿐만 아니라 관련 벡터, 예컨대 AAV 벡터와 관련된 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 또한, 요소 회로 장애와 연관된 효소를 코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열을 포함하는 AAV 벡터를, 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체와 조합하여 투여하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 투여는 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나에서 본원에 제공된 목적 중 어느 하나에 대한 치료 이익을 가질 수 있다.

[0006] 또 다른 측면에서, 실시예 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 방법 또는 조성물이 제공된다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 벡터 또는 핵산 서열 중 어느 하나를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0007] 또 다른 측면에서, 조성물 중 어느 하나는 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 것이다.

[0008] 또 다른 측면에서, 방법 또는 조성물 중 어느 하나는 본원에 기재된 질환 또는 장애 중 어느 하나를 치료하는데 사용하기 위한 것이다. 또 다른 측면에서, 방법 또는 조성물 중 어느 하나는 AAV 항원 및/또는 AAV 벡터의 발현된 생성물에 대한 면역 반응 (즉, 체액성 및/또는 세포성)을 감소시키거나, 효소를 코딩하는 서열의 발현을 증가시키거나, 또는 AAV 벡터의 반복 투여를 위해 사용하기 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 3종의 상이한 구축물의 형질감염 효율을 보여준다. GFP 플라스미드를 사용하여 형질감염 효율 (wt)을 정규화하였다.

도 2는 각각의 구축물을 이중으로 형질감염시킨 경우의 결과를 보여준다. 웨스턴 블롯 (상부)은 WB 정량화 그래프 (하부)에 밴드 강도에 의해 정량화된다.

도 3은 모든 실험 (n=4)으로부터의 각각의 구축물의 밴드 강도를 보여준다.

도 4는 CO3 서열의 특색을 보여준다.

도 5는 CO21 서열의 특색을 보여준다.

도 6은 코돈 용법, 잠재 스플라이싱 부위, 안티센스 가닥 내의 ORF (ARF >50 bp), 2차 구조, GC-함량, 및 CpG 섬을 포함한, 코돈 최적화 분석에 사용된 다양한 상이한 알고리즘을 보여준다.

도 7은 실시간 PCR을 사용하여 pSMD2_hOTC 구축물로 형질감염된 Huh7 세포에서의 OTC mRNA 발현 수준을 보여준다 (n=2).

도 8a-8b는 pSMD2_hOTC 구축물로 형질감염된 HUH7에서의 OTC 발현을 보여주며; 웨스턴 블롯 분석 (도 8a) 및 밴드 정량화 (도 8b)가 제시된다.

도 9는 염색에 의한 hOTC 세포내 국재화를 보여준다.

도 10은 C57Bl/6N에서의 AAV 배치 5.0E12개 vgp/kg으로부터의 결과를 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-CO1, AAV8-CO3, 및 AAV8-CO6. AAV8-OTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다.

도 11은 $OTC^{spf-ash}$ 마우스 ($5x10^{11}$개 Vg/Kg) 실험의 결과를 보여준다.

도 12는 웨스턴 블롯에 의한 인간 및 마우스 OTC의 비교를 보여준다.

도 13은 간에서 동일한 ($5x10^{11}$개 Vg/Kg) 농도의 바이러스를 갖는 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 소변 오로트산을 보여준다 (n=2).

도 14는 HUH7 간세포성 암종 세포주에서의 제1 군의 AAV8-hOTC-CO 변이체의 발현 수준을 보여준다. 6개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7, AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC 야생형 및 공 AAV8 벡터를 대조군으로서 사용하였다 (n=2, * = P<0.05).

도 15는 HUH7 간세포성 암종 세포주에서의 제2 군의 AAV8-hOTC-CO 변이체의 발현 수준을 보여준다. 5개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6-1, AAV8-hOTC-CO9-1, AAV8-hOTC-CO9-2. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=2, * = P<0.05).

도 16은 인간의 566개의 OTC 서열의 정렬의 로고 표현을 보여준다. 넘버링은 인간 서열 대비 삽입을 제거하기 위한 인간 서열에 상응한다. 문자의 크기는 서열 보존의 정도를 나타낸다.

도 17은 제3 군의 hOTC-CO 변이체를 생성하기 위한 셔플링된 hOTC cDNA 구축물의 개략도를 보여준다. hOTC-CO1, hOTC-CO3, 및 hOTC-CO6 구축물의 보존된 영역을 셔플링하여 hOTC-CO21 및 hOTC-CO18 구축물을 설계하였다. 넘버링은 야생형 인간 OTC 단백질의 아미노산 서열에 상응한다.

도 18은 HUH7 간세포성 암종 세포주에서의 AAV8-hOTC-CO 구축물의 발현 수준을 보여준다. 5개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO18, 및 AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=4, * = P<0.05).

도 19는 고용량의 AAV (5.0E12개 바이러스 게놈/킬로그램 (vg/kg))로 형질도입된 수컷 C57Bl/6N 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 6개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7, 및 AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=3, * = P<0.05).

도 20은 AAV (5.0E12개 vg/kg)로 형질도입된 수컷 C57Bl/6N 마우스로부터의 결과를 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, 및 AAV8-hOTC-CO6. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=3, * = P<0.05).

도 21은 AAV (1.25E12개 vg/kg)로 형질도입된 수컷 C57Bl/6N 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 6개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7, 및 AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하

였다 (n=3, * = P<0.05, **=P<0.01, ***=P<0.001). 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포가 제시된다.

도 22는 AAV (5.0E12개 vg/kg)로 형질도입된 암컷 C57Bl/6N 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 6개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7, 및 AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다.

도 23은 1.25E12개 vg/kg 또는 5.0E12개 vg/kg 구축물로 처리된 수컷 및 암컷 C57Bl/6N 마우스에서의 AAV8-hOTC-CO 구축물의 mRNA 수준을 보여준다. 6개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7, 및 AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다.

도 24는 AAV (1.25E12개 vg/kg)로 형질도입된 수컷 C57Bl/6N 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, 및 AAV8-hOTC-CO6. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=2, * = P<0.05).

도 25는 AAV (1.25E12개 vgp/kg)로 형질도입된 C57Bl/6N 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, 및 AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=4, * = P<0.05).

도 26은 5.0E11개 vg/kg으로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 소변 오로트산을 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, 및 AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=4).

도 27은 5.0E11개 vg/kg으로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 혈장 암모니아 (NH_4) 수준을 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, 및 AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC 야생형 및 C57Bl/6N 야생형 마우스를 대조군으로서 사용하였다 (n=4).

도 28은 AAV (5.0E11개 vgp/kg)로 형질도입된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 3개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, 및 AAV8-hOTC-CO06. AAV8-hOTC 야생형 및 C57Bl/6N 야생형 마우스를 대조군으로서 사용하였다 (n=4, * = P<0.05, **=P<0.01, ***=P<0.001).

도 29는 AAV (5.0E11개 vgp/kg)로 형질도입된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 2개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1 및 AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=4).

도 30은 5.0E11개 vg/kg으로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 소변 오로트산 및 촉매 활성을 보여준다. 2개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1 및 AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC 야생형 및 C57Bl/6N 야생형 마우스를 대조군으로서 사용하였다 (n=5).

도 31은 AAV (1.0E12개 vgp/kg)로 형질도입된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 2개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1 및 AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=5).

도 32는 AAV (5.0E11개 vgp/kg)로 형질도입된 암컷 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 2개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1 및 AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=5).

도 33은 AAV (1.0E12개 vgp/kg)로 형질도입된 암컷 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 2개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO1 및 AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=5).

도 34는 AAV (1.0E12개 vgp/kg)로 형질도입된 수컷 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 OTC의 발현 수준, OTC의 촉매 활성,

및 바이러스 게놈 카피/세포를 보여준다. 2개의 상이한 구축물을 시험하였다: AAV8-hOTC-CO3 및 AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC 야생형을 대조군으로서 사용하였다 (n=5, * =P<0.05, ** =P<0.01).

도 35는 간에서 동일한 (1.0E12개 vgp/kg) 농도의 바이러스를 갖는 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스의 소변 오로트산을 보여준다 (n=5).

도 36은 AAV8-hOTC 야생형 또는 AAV8-hOTC-CO21의 3가지 용량 중 1가지 (2.5E11개 vgp/kg, 5.0E11개 vgp/kg, 1.0E12개 vgp/kg)로 주사된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 소변 오로트산, OTC 효소적 활성, 및 OTC 단백질 수준을 보여준다.

도 37은 5.0E11개 vg/kg AAV8-hOTC-wt 또는 AAV8-hOTC-CO21로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스에서의 소변 오로트산 수준을 보여준다 (n=5).

도 38은 2.5E11개 vg/kg AAV8-hOTC-wt 또는 AAV8-hOTC-CO21로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스의 단백질 발현, 및 촉매 활성을 보여준다 (n=5, *=P<0.05).

도 39는 2.5E11개 vg/kg AAV8-hOTC-wt 또는 AAV8-hOTC-CO21로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스의 단백질 발현, 및 촉매 활성을 보여준다 (n=5, *=P<0.05).

도 40은 2.5E11개 vg/kg AAV8-OTC-wt 또는 AAV8-hOTC-CO21로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스에서의 소변 오로트산을 보여준다.

도 41은 AAV8-hOTC-wt 또는 AAV8-hOTC-CO21의 3가지 용량 중 1가지 (2.5E11개, 5.0E11개, 또는 1.0E12개 vg/kg)로 처리된 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스에서의 소변 오로트산 및 OTC 효소적 활성을 보여준다.

도 42는 5E11개 vgp/kg AAV8-hOTC 야생형 또는 AAV8-hOTC-CO21 바이러스가 주사된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 행동 시험 결과, 혈장 암모니아 (NH4) 수준, 및 소변 오로트산 수준을 보여준다. B6EiC3Sn-WT (WT-CH3) 마우스를 대조군으로서 사용하였다 (n=4, * =P<0.05, ** =P<0.01, *** =P<0.001).

도 43은 5E11개 vgp/kg 또는 1E12개 vgp/kg AAV8-hOTC-CO21이 주사된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 소변 오로트산을 보여준다.

도 44는 5E11개 vpg/kg AAV8-hOTC 야생형 또는 AAV8-hOTC-CO21 바이러스가 주사된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 행동 시험 결과, 혈장 암모니아 (NH4) 수준, 소변 오로트산 수준, 단백질 발현 수준, 및 OTC 효소적 활성을 보여준다. Bi6EiC3Sn-WT (WT-CH3) 또는 C57Bl/6N 야생형 (C57-WT) 마우스를 대조군으로서 사용하였다 (n=4, * =P<0.05, ** =P<0.01, *** =P<0.001).

도 45는 AAV8-hOTC-CO21 및 AAV8-hOTC-Δ인핸서-CO21 (AAV8-hOTC-Δ-CO21)을 발현하는 인간 간세포에서의 OTC 발현 및 효소적 활성을 보여준다. 비처리 $OTC^{spf-ash}$ 마우스를 대조군으로서 사용하였다.

도 46은 AAV8-hOTC-CO21 및 AAV8-hOTC-Δ-CO21이 주사된 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 소변 오로트산 및 OTC 발현을 보여준다. 비처리 $OTC^{spf-ash}$ 마우스를 대조군으로서 사용하였다.

도 47은 5.0E11개 vgp/kg AAV8-hOTC-CO21 바이러스가 주사된 어린 (P30) $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 소변 오로트산 및 항-AAV8 항체 (Nab)를 보여준다. 비처리 $OTC^{spf-ash}$ 마우스를 대조군으로서 사용하였다.

도 48은 4.0E12개 vg/kg AAV8-루시페라제 (AAV8-luc) 및 8 mg/kg SVP [Rapa] 또는 SVP [공]에 이어서, 4.0E12개 vg/kg AAV8-hFIX 및 8 vg/kg SVP [Rapa] 또는 SVP [공]가 주사된 C57BL/6 마우스에서의 항-AAV8 IgG 항체의 수준 및 hFIX의 발현을 보여준다 (n=5/군).

도 49는 2.0E12개 vg/kg AAV8-Gaa 및 3 mg/kg SVP [Rapa] 또는 SVP [공]에 이어서, 2.0E12개 vg/kg AAV8-hFIX 및 3 mg/kg SVP [Rapa] 또는 SVP [공]가 주사된 마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis) 비-인간 영장류에서의 항-AAV8 IgG 항체의 수준 및 hFIX의 발현을 보여준다 (n=2 SVP[Rapa] + AAV, n=1 SVP[공] + AAV).

도 50은 AAV8-OTC CO21 단독 ("AAV", 흑색 원형), AAV8-OTC CO21 + 공 나노입자 대조군 ("AAV + NPc", 흑색 사

각형), AAV8-OTC CO21 + 4 mg/kg SVP-라파마이신 ("AAV + SVP4", 흑색 정삼각형), AAV8-OTC CO21 + 8 mg/kg SVP-라파마이신 ("AAV + SVP8", 흑색 역삼각형), 또는 AAV8-OTC CO21 + 12 mg/kg SVP-라파마이신 ("AAV + SVP12", 흑색 다이아몬드형)의 주사 2주 후 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 항-AAV8 IgG 항체의 수준을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 특정하게 예시된 물질 또는 공정 파라미터로 제한되지 않으며, 물론 변경될 수 있는 것으로 이해해야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정한 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 설명하기 위한 대체 용어의 사용을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0011] 상기 또는 하기에서 본원에 인용된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이와 같이 참조로 포함되는 것은, 본원에 인용된 포함되는 공개, 특허 및 특허 출원 중 임의의 것이 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0012] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 내용이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일 중합체 종의 혼합물을 포함하고, "합성 나노담체"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 합성 나노담체의 혼합물 또는 복수의 이러한 합성 나노담체를 포함하며, "DNA 분자"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 DNA 분자의 혼합물 또는 복수의 이러한 DNA 분자를 포함하고, "면역억제제"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 면역억제제 분자의 혼합물 또는 복수의 이러한 면역억제제 분자를 포함하는 등이다.

[0013] 본원에 사용된 용어 "포함하다" 또는 그의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 임의의 나열된 정수 (예를 들어, 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들)을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수들 군을 배제하지 않는다는 것을 표시하는 것으로 판독되어야 한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "포함하는"은 포괄적이며 추가의 나열되지 않은 정수 또는 방법/공정 단계를 배제하지 않는다.

[0014] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시양태에서, "포함하는"은 "로 본질적으로 이루어진" 또는 "로 이루어진"으로 대체될 수 있다. 어구 "로 본질적으로 이루어진"은 명시된 정수(들) 또는 단계뿐만 아니라 청구된 본 발명의 특징 또는 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 요구하기 위해 본원에 사용된다. 본원에 사용된 용어 "로 이루어진"은 나열된 정수 (예를 들어, 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들) 단독의 존재를 표시하기 위해 사용된다.

[0015] A. 서론

[0016] 요소 회로 결함 (UCD)은 일반적으로 요소 회로에서의 6종의 효소 중 1종의 결핍을 발생시키는 유전 장애에 의해 유발되며, 이는 혈액 중 암모니아의 축적으로 이어진다. 식이 단백질 제한 및 암모니아 스캐빈징 약물에도 불구하고, UCD를 갖는 소아는 고암모니아혈증과 관련된 장애가 발생하고, 많은 소아가 생후 첫 20년 안에 사망한다. 기관 이용가능성 및 평생의 면역억제 치료에 의해 제한적인 침습적 절차인 간 이식 이외에, 가장 통상적인 UCD인 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 결핍 (OTCd)에 대한 결정적 치료는 존재하지 않는다. 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 결핍 (OTCd)은 15,000-60,000명의 정상 출산의 추정 유병률을 갖는 단일유전자, X-연관 요소 회로 질환이다. 가장 중증인 OTC 결핍 환자는 출생 직후에 중증 암모니아 위기를 동반한 증상이 나타나며, 혼수 및 조기 사망으로 이어질 수 있다. 제2 환자 군은 효소의 부분적 잔류 활성으로 인한 지연된 발달 및 지적 장애를 포함한 후기 발병 징후를 특징으로 한다 (Campbell et al., 1973; Wraith, 2001; Gordon, 2003).

[0017] 예로서, 간-특이적 프로모터의 전사 제어 하에 인간 OTC 트랜스진을 발현하는 일련의 ssAAV 벡터 구축물이 개발되었다. wt-hOTC는 상이한 알고리즘에 의해 코돈-최적화 (CO)되었다. 이들 후보 벡터를 AAV8 내에 패키징하고, OTCspf-ash ($5x10^{11}$개 및 $1x10^{12}$개 vgp/kg) 마우스에 형질도입하는데 사용하였다. 세포당 바이러스 게놈 카피의 수, 단백질 수준, 촉매 활성, 소변 오로트산 수준, 및 혈장 암모니아 수준을 측정함으로써, OTCspf-ash 마우스의 표현형을 교정하는데 특히 효율적인 CO-hOTC 구축물을 확인하였다. 이러한 구축물을 포함하는 조성물이 본원에 일부 측면에서 제공된다. 이러한 구축물은 본원에 제공된 방법 및 조성물 중 어느 하나에 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 바이러스 벡터는 트랜스진 발현과 같은 다양한 적용을 위한 유망한 치료제이지만, 바이러스 벡터에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응은 효능을 저하시킬 수 있고/거나 반복 투여 상황에서 이러한 치료제의 사용 능력을

감소시킬 수 있다는 것에 주목한다. 이들 면역 반응은 항체, B 세포 및 T 세포 반응을 포함하고, 바이러스 벡터의 바이러스 항원, 예컨대 바이러스 캡시드 또는 코트 단백질 또는 그의 펩티드에 특이적일 수 있다.

[0019] 예를 들어 면역원성 치료 효소에 대한 면역 반응, 예컨대 항체 반응을 방지하기 위해 면역억제제, 예컨대 라파마이신을 함유하는 생분해성 합성 나노담체와 조합하여 투여하기 위한 OTC 유전자를 코딩하는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터가 제조 및 사용될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 연구에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 AAV에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응을 차단하였으며, 이는 OTCd의 경우 2가지 이익을 가질 수 있었다: 1) 치료 발현 수준을 유지하기 위한 이후의 재투여 가능성을 유지하면서 초기 연령의 환자를 치료하는 능력, 및 2) 대사 위기를 촉발할 수 있는 스테로이드의 사용의 최소화. 따라서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 조합하여 본원에 제공된 구축물 중 어느 하나를 포함하는 재조합 AAV 벡터로 대상체를 치료하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 제공된다.

[0020] 이에 따라, 본 발명자들은 놀랍게도 예상외로 상기 언급된 문제점 및 제한이 본원에 개시된 본 발명을 실시함으로써 극복될 수 있다는 것을 발견하였다. 치료용 바이러스 벡터의 효과적인 사용을 위한 상기 언급된 장애물에 대한 해결책을 제공하는 방법 및 조성물이 제공된다.

[0021] 본 발명은 지금부터 하기에서 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0022] B. 정의

[0023] "추가의 치료제"는 바이러스 벡터 및/또는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 이외의 임의의 치료제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 스테로이드, 예컨대 코르티코스테로이드이다.

[0024] "투여하는" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학상 유용한 방식으로 물질을 대상체에게 제공하거나 또는 투약하는 것을 의미한다. 용어는 "투여되도록 하는 것"을 포함하는 것으로 의도된다. "투여되도록 하는 것"은 또 다른 당사자가 물질을 투여하도록 직접적으로 또는 간접적으로 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 AAV 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 병용 투여하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 병용 투여는 반복해서 수행된다. 추가 실시양태에서, 병용 투여는 동시 투여이다. "동시"는 동일한 시간에, 또는 임상의가 목적하는 치료 성과에 미치는 영향에 대해 사실상 무의미하거나 무시할 수 있는 투여 사이의 임의의 시간인 것으로 간주할 실질적으로 동일한 시간에 투여하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 동시는 투여가 5, 4, 3, 2, 1분 또는 그 미만으로 이루어지는 것을 의미한다.

[0025] 본원에 제공된 바와 같이 대상체에게 투여하기 위한 조성물 또는 투여 형태의 맥락에서 "유효한 양"은 대상체에서 한 가지 이상의 목적하는 결과, 예를 들어 바이러스 벡터 또는 그의 발현 생성물에 대한 면역 반응의 감소 또는 제거 및/또는 효과적인 트랜스진 발현을 발생시키는 조성물 또는 투여 형태의 양을 지칭한다. 유효한 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적을 위한 양은 대상체에 대해 임상 이익을 가질 수 있을 것으로 임상의가 믿는 양일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서, 투여되는 조성물(들)은 본원에 제공된 바와 같은 유효한 양 중 어느 하나일 수 있다.

[0026] 유효한 양은 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이는 바람직하지 않은 면역 반응을 완전히 방지하는 것을 수반한다. 유효한 양은 또한, 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한, 목적하는 치료 종점 또는 목적하는 치료 결과를 발생시키는 양일 수 있다. 유효한 양은, 일부 실시양태에서, 대상체에서 항원, 예컨대 바이러스 벡터의 바이러스 항원 및/또는 발현된 생성물에 대한 면역관용성 면역 반응을 발생시킨다. 유효한 양은 또한, 증가된 트랜스진 발현을 발생시킬 수 있다 (트랜스진은 바이러스 벡터에 의해 전달됨). 이는 대상체 내의 다양한 관심 조직 또는 시스템에서 트랜스진 단백질 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 이러한 증가된 발현은 국부로 또는 전신으로 측정될 수 있다. 상기 중 임의의 것의 달성은 상용 방법에 의해 모니터링될 수 있다.

[0027] 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효한 양은 목적하는 면역 반응, 예컨대 면역 반응의 감소 또는 제거를 대상체에서 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 지속시키는 양이다. 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 유효한 양은 측정가능한 목적하는 면역 반응, 예컨대 면역 반응의 감소 또는 제거를 발생시키는 양이다. 일부 실시양태에서, 유효한 양은 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 측정가능한 목적하는 면역 반응을 발생시키는 양이다.

[0028] 유효한 양은 물론, 치료될 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 포함한 개별 환자 파라미터; 치료 지속기간; (존재하는 경우) 공동 요법의 성질; 구체적 투여 경로; 및 건강 진

료의의 지식 및 전문성 내의 기타 인자에 좌우될 것이다. 이들 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용 실험만으로 해결될 수 있다.

[0029] "부착하다" 또는 "부착된" 또는 "커플링되다" 또는 "커플링된" (등)은 하나의 실체 (예를 들어, 모이어티)가 또 다른 실체와 화학적으로 회합된 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 부착은 공유 부착이며, 이는 부착이 2개의 실체 간의 공유 결합의 존재의 맥락에서 일어난다는 것을 의미한다. 비-공유 실시양태에서, 비-공유 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스택킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스(van der Waals) 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 실시양태에서, 캡슐화는 부착의 한 형태이다.

[0030] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.

[0031] "코돈-최적화"는 일반적으로 아미노산 서열의 변화는 발생시키지 않지만 증가된 또는 보다 효율적인 발현을 발생시키는 코돈을 변화시킴으로써 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 최적화하는 것을 지칭한다. 코돈-최적화는 유전자의 전사 및 번역 효율을 증가시킴으로써 유기체에서 단백질 코딩 유전자, 예를 들어 OTC의 단백질 발현을 개선시키는데 사용되는 기술이다. 살아있는 유기체에서 표적 유전자의 감소된 단백질 발현은 희귀 코돈의 존재, GC 함량, mRNA 구조, 반복 서열, 및 제한 효소 절단 부위의 존재를 포함하나 이에 제한되지는 않는 수많은 인자에 기인할 수 있다. 상이한 코돈-최적화 알고리즘은 이들 인자를 다양한 수준으로 고려하고 가중치를 둔다. 전형적으로, 다수의 상이한 코돈-최적화 알고리즘이 특정한 서열에 대해 사용되고 나란히 비교될 것이다.

[0032] 일부 실시양태에서, 코돈-최적화는 핵산 서열, 예를 들어 mRNA 서열 내의 코돈의 서열을 변경시키기 위해 수행된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 코딩된 아미노산 서열은 변경시키지 않으면서 변경된다. 코돈은 단백질로의 RNA 번역 동안 상보적 전달 RNA (tRNA)에 의해 결합되는 mRNA 내의 뉴클레오티드 서열의 3개의 염기 쌍 블록이다. 일부 경우에, mRNA 서열은 희귀 코돈을 제거하도록 변경된다. 희귀 코돈 코돈은 표적 유전자가 발현되는 유기체에 존재하지 않거나 또는 낮은 수준으로 존재하는 tRNA에 상보적이다. 표적 유전자에서의 희귀 코돈의 존재는 단백질 번역을 감소시키거나 심지어 차단할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 주어진 유기체에 대한 희귀 코돈을 제거하기 위해 핵산 서열을 변화시키는 것은 단백질 발현을 개선시킬 수 있다.

[0033] 일부 경우에, 핵산 서열, 예를 들어 mRNA 서열은 핵산 서열의 GC 함량을 증가 또는 감소시키도록 변경된다. 핵산 서열의 구아노신/시토신 (GC) 함량은 핵산 서열에서의 G 또는 C인 뉴클레오티드의 백분율이다. 구아노신 및 시토신은 상보적이며, 이중-가닥 뉴클레오티드에서 3개의 수소 결합을 형성하는 한편, 아데닌 및 티민 또는 아데닌 및 우라실은 오직 2개의 수소 결합만을 형성한다. 이러한 수소 결합의 수의 증가는 핵산 분자의 안정성을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 GC 함량을 증가시키기 위해 핵산 서열을 변화시키는 것은 단백질 발현을 개선시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 GC 함량을 감소시키기 위해 핵산 서열을 변화시키는 것은 단백질 발현을 개선시킬 수 있다.

[0034] mRNA의 구조는 유기체에서 mRNA의 단백질로의 번역을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다. mRNA가 2차, 3차, 또는 4차 구조를 형성하는 경우, 이들 구조는 코돈을 tRNA 또는 리보솜에 의한 결합에 접근불가능하게 하여, 번역을 억제할 수 있다. mRNA의 2차 및 3차 구조는 줄기 루프 및 유사매듭을 포함하며, 3차 구조는 2차 구조보다 더 복잡한, 3차원 mRNA 형태이다. mRNA의 4차 구조는 mRNA-mRNA 동종이량체 및 mRNA-mRNA 이종이량체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 mRNA 2차, 3차, 또는 4차 구조의 형성을 감소시키거나 피하기 위해 핵산 서열, 예를 들어, mRNA 서열을 변화시키는 것은 단백질 발현을 개선시킬 수 있다.

[0035] 일부 실시양태에서, 핵산 서열, 예를 들어 mRNA 서열에서 반복 서열의 존재는 표적 유전자의 전사 및 번역을 억제함으로써 단백질 발현을 감소시킨다. 반복 서열은 이용가능한 뉴클레오티드 및 tRNA 풀을 고갈시킴으로써 전사 및 번역을 감소시킨다. 추가적으로, 반복 서열은 또한 mRNA 2차 및 3차 구조의 형성을 허용함으로써 번역을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 반복 서열을 제거하거나 감소시키기 위해 핵산 서열을 변화시키는 것은 단백질 발현을 개선시킬 수 있다.

[0036] 일부 실시양태에서, 핵산 서열, 예를 들어 mRNA 서열에서 제한 효소 절단 부위의 존재는 핵산, 예를 들어 mRNA의 전사 및 번역을 억제함으로써 단백질 발현을 감소시킨다. 제한 효소는 특정 서열에의 결합 후 핵산을 절단

하는 단백질이다. 이들 절단된 핵산은 전사 또는 번역에 적합한 기질이 아닐 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 제한 효소 절단 부위를 제거하기 위해 핵산 서열을 변화시키는 것은 단백질 발현을 개선시킨다.

[0037] "병용으로"는 시간상 상관된 방식으로, 바람직하게는 시간상 충분히 상관된 방식으로 2개 이상의 물질/작용제를 대상체에게 투여하여 면역 반응에 조정을 제공하는 것을 의미하고, 보다 더 바람직하게는 2개 이상의 물질/작용제는 조합되어 투여된다. 실시양태에서, 병용 투여는 2개 이상의 물질/작용제를 명시된 기간 내에, 바람직하게 1개월 내에, 보다 바람직하게 1주 내에, 보다 더 바람직하게 1일 내에, 및 보다 더 바람직하게 1시간 내에 투여하는 것을 포괄할 수 있다. 실시양태에서, 물질/작용제는 반복해서 병용 투여될 수 있고; 이는 1회 초과의 병용 투여이다.

[0038] "용량"은 주어진 시간 동안 대상체에게 투여하기 위한 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질의 구체적 양을 지칭한다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 조성물에서 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 바이러스 벡터의 용량은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 바이러스 벡터의 양을 지칭한다. 대안적으로, 용량은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 용량을 지칭하는 경우에, 목적하는 양의 면역억제제를 제공하는 합성 나노담체의 수에 기초하여 투여될 수 있다. 용량이 반복 투여의 상황에서 사용되는 경우에, 용량은 동일하거나 상이할 수 있는 반복 용량 각각의 양을 지칭한다.

[0039] "조기 질환 발병"은 질환 발병의 평균 연령보다 더 이른 연령 또는 질환 발병의 예상 연령보다 더 이른 연령의 대상체에서의 질환의 발병을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조기 질환 발병은 소아기에 발생한다. 조기 질환 발병은 임상의에 의해 결정될 수 있다.

[0040] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 일부를 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 다른 실시양태에서, 캡슐화된 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는 물질의 대부분 또는 모두를 합성 나노담체의 표면 상에 위치시키고, 물질을 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 두는 흡수와 구별된다.

[0041] "발현 제어 서열"은 발현에 영향을 미칠 수 있는 임의의 서열이고, 프로모터, 인핸서, 및 오퍼레이터를 포함할 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 발현 제어 서열은 프로모터이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 발현 제어 서열은 간-특이적 프로모터이다. "간-특이적 프로모터"는 간의 세포에서 독점적으로 또는 우선적으로 발현을 발생시키는 것이다.

[0042] "동일성"은 1차원 서열 정렬에서 동일하게 위치하는 아미노산 또는 잔기 또는 핵산 염기의 백분율을 의미한다. 동일성은 비교되는 서열이 얼마나 밀접하게 관련되는지에 대한 척도이다. 한 실시양태에서, 2개의 서열 사이의 동일성은 베스트핏(BESTFIT) 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 추가적으로, 퍼센트 동일성은 또한 인터넷(ftp:/ncbi.nlm.nih.gov/pub/)을 통해 수득할 수 있는 NCBI (메릴랜드주 베데스다)에 의해 개발된 다양한 공중 이용가능한 소프트웨어 툴을 사용하여 계산될 수 있다. 예시적인 툴은 http://wwww.ncbi.nlm.nih.gov에서 이용가능한 BLAST 시스템을 포함한다. 쌍별 및 클러스탈W 정렬 (BLOSUM30 매트릭스 셋팅) 뿐만 아니라 카이트-두리틀(Kyte-Doolittle) 소수친수성 분석은 맥벡터(MacVector) 서열 분석 소프트웨어 (옥스포드 몰레큘라 그룹(Oxford Molecular Group))를 사용하여 수득할 수 있다. 상기 핵산의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 상보체 (전장 상보체 포함)가 또한 본 발명에 포괄된다. "면역억제제"는 바람직하게는 APC에 대한 그의 효과를 통해 면역관용성 효과를 유발할 수 있는 화합물을 의미한다. 면역관용성 효과는 일반적으로, 항원에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 지속적인 방식으로 감소, 억제 또는 방지하는, APC 또는 다른 면역 세포에 의한 전신 및/또는 국부 조정을 지칭한다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 APC가 하나 이상의 면역 이펙터 세포에서 조절 표현형의 촉진을 유발하는 것이다. 예를 들어, 조절 표현형은 항원-특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생산, 유도, 자극 또는 동원의 억제; 항원-특이적 항체의 생산의 억제, Treg 세포 (예를 들어, CD4+CD25고FoxP3+ Treg 세포)의 생산, 유도, 자극 또는 동원 등으로 특징화될 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포가 조절 표현형으로 전환된 것의 결과일 수 있다. 이는 또한, FoxP3이 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서 유도된 것의 결과일 수 있다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 항원을 프로세싱한 후 APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 항원의 프로세싱을 방해하는 것이 아니다. 추가 실시양태에서, 면역억제제는 아폽토시스-신호전달 분자가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.

[0043] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (즉, 라파로그); TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴 A; 코르티코스테로이드;

미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제, 예컨대 6Bio, 덱사메타손, TCPA-1, IKK VII; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제 (PGE2), 예컨대 미소프로스톨; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제 (PDE4), 예컨대 롤리프람; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제; PI3KB 억제제, 예컨대 TGX-221; 자가포식 억제제, 예컨대 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아솜 억제제 I (PSI); 및 산화 ATP, 예컨대 P2X 수용체 차단제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 레티노산, 시클로스포린, 예컨대 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오퓨린 (Aza), 6-메르캅토퓨린 (6-MP), 6-티오구아닌 (6-TG), FK506, 상글리페린 A, 살메테롤, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 아스피린 및 다른 COX 억제제, 니플룸산, 에스트리올 및 트리프톨리드를 포함한다. 다른 예시적인 면역억제제는 소분자 약물, 천연 생성물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물제제-기반 약물, 탄수화물-기반 약물, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토트렉세이트, NSAID; 핑골리모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506), 아바타셉트, 벨라타셉트 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 "라파로그"는 라파마이신과 구조상 관련된 (유사체) 분자 (시롤리무스)를 지칭한다. 라파로그의 예는, 비제한적으로, 템시롤리무스 (CCI-779), 에베롤리무스 (RAD001), 리다포롤리무스 (AP-23573), 및 조타롤리무스 (ABT-578)를 포함한다. 라파로그의 추가의 예는, 예를 들어 WO 공개 WO 1998/002441 및 미국 특허 번호 8,455,510에서 확인할 수 있고, 그의 라파로그는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0044] 면역억제제는 APC에 대한 면역관용성 효과를 직접적으로 제공하는 화합물일 수 있거나, 또는 면역관용성 효과를 간접적으로 (즉, 투여 후 일부 방식으로 프로세싱된 후) 제공하는 화합물일 수 있다. 추가의 면역억제제가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다. 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 작용제 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0045] "로드"는, 합성 나노담체와 커플링된 경우, 전체 합성 나노담체 중의 물질의 총 건조 레시피 중량에 기초한, 합성 나노담체와 커플링된 면역억제제의 양이다 (중량/중량). 일반적으로, 이러한 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로서 계산된다. 한 실시양태에서, 합성 나노담체에 걸친 평균 로드는 0.1% 내지 99%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 50%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 20%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 10%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 1% 내지 10%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 7% 내지 20%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 적어도 0.1%, 적어도 0.2%, 적어도 0.3%, 적어도 0.4%, 적어도 0.5%, 적어도 0.6%, 적어도 0.7%, 적어도 0.8%, 적어도 0.9%, 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%이다. 상기 실시양태 중 일부 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 25% 이하이다. 실시양태에서, 로드는 실시예에 기재될 수 있는 바와 같이 또는 관련 기술분야에 달리 공지되어 있는 바와 같이 계산된다.

[0046] "합성 나노담체의 최대 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최소 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 작은 것일 것인 한편, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μm 이하이다. 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게는 120 nm 초과, 보다 바람직하게는 130 nm 초과, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수의 종횡비는 실시양태에 따라

달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 대 최소 치수의 종횡비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 및 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다.

[0047] 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μm 이하, 보다 바람직하게는 2 μm 이하, 보다 바람직하게는 1 μm 이하, 보다 바람직하게는 800 nm 이하, 보다 바람직하게는 600 nm 이하, 및 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게는 120 nm 이상, 보다 바람직하게는 130 nm 이상, 보다 바람직하게는 140 nm 이상, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정은 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질에 현탁시키고 동적 광 산란 (DLS) (예를 들어, 브룩헤븐 제타팔스 (Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용함)을 사용함으로써 수득할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액을 수성 완충제로부터 정제수 내로 희석시켜 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도를 달성할 수 있다. 희석된 현탁액은 내부에서 직접 제조되거나, 또는 DLS 분석에 적합한 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서, 큐벳을 DLS에 두고, 제어 온도로 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력에 기초하여 안정하고 재현가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서, 유효 직경, 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 종횡비, 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것은 보다 정확한 측정치를 수득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또는 "직경"은, 예를 들어, 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0048] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 약리학적 활성 물질과 함께 조성물을 제제화하는 데 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 사카라이드 (예컨대 글루코스, 락토스 등), 보존제 예컨대 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수 (예컨대 포스페이트 완충 염수), 및 완충제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 다양한 물질을 포함한다.

[0049] "폴리뉴클레오티드(들)" 또는 "핵산 서열(들)" 또는 "핵산(들)"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 예를 들어, DNA, RNA (예컨대, 예를 들어, mRNA) 또는 cDNA일 수 있다. 본원에 기재된 AAV 벡터 및 트랜스진은 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 트랜스진, 예를 들어 OTC를 코딩한다.

[0050] 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 상보체, 예컨대 전장 상보체, 또는 축중물 (유전자 코드의 축중성으로 인함)을 포함한다.

[0051] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 선택된 퍼센트 동일성의 관련 핵산 서열을 확인하기 위해 표준 핵산 혼성화 절차가 사용될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "엄격한 조건"은 관련 기술분야에 익숙한 파라미터를 지칭한다. 이러한 파라미터는 염, 온도, 프로브의 길이 등을 포함한다. 혼성화 시 발생하는 염기 미스매치의 양은 거의 0% ("높은 엄격도")에서 약 30% ("낮은 엄격도")의 범위일 수 있다. 높은-엄격도 조건의 한 예는 혼성화 완충제 (3.5X SSC, 0.02% 피콜, 0.02% 폴리비닐피롤리돈, 0.02% 소 혈청 알부민, 2.5mM NaH2PO4(pH7), 0.5% SDS, 2mM EDTA) 중 65℃에서의 혼성화이다. SSC는 0.15M 염화나트륨/0.015M 시트르산나트륨, pH7이고; SDS는 소듐 도데실 술페이트이고; EDTA는 에틸렌디아민테트라아세트산이다. 혼성화 후에, 핵산이 전달된 막을, 예를 들어, 실온에서 2X SSC로 세척하고, 이어서 최대 68℃의 온도에서 0.1 - 0.5X SSC/0.1X SDS로 세척한다.

[0052] "반복 용량" 또는 "반복 투여" 등은 동일한 물질의 이전 용량 또는 투여에 후속하여 대상체에게 투여되는 적어도 1회의 추가의 용량 또는 투여를 의미한다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 반복 용량은 동일한 물질의 이전 용량 후 바이러스 벡터의 적어도 1회의 추가의 용량이다. 물질은 동일할 수 있지만, 반복 용량에서 물질의 양은 이전 용량과 상이할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 실시양태에서, 반복 용량에서 바이러스 벡터의 양은 보다 초기의 용량의 바이러스 벡터의 양보다 적을 수 있다. 대안적으로, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 실시양태에서, 반복 용량은 보다 초기의 용량 내 바이러스 벡터의 양과 적어도 동등한 양일 수 있다. 반복 용량은 이전 용량의 수주, 수개월 또는 수년 후에 투여될 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 반복 용량 또는 투여는 반복 용량 또는 투여 직전에 이루어진 용량 또는 투여의 적어도 1주 후에 투여된다. 반복 투여는 그것이 대상체에게 유익한 효과를 발생시키는 경우에 효과적인 것으로 간주된다. 바람직하게는, 효과적인 반복 투여는 예컨대 바이러스 벡터에 대한 감소

된 면역 반응과 함께 유익한 효과를 발생시킨다.

[0053] "감소된 양"은 예컨대 선행 투여에서 대상체에게 투여된 치료제의 양보다 적거나, 또는 본원에 제공된 바와 같은 AAV 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 병용 투여 없이 대상체에게 투여하기 위해 선택될 치료제의 용량을 지칭한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 치료제의 감소된 양을 선택하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. "선택하는 것"은 "선택하도록 유발하는 것"을 포함하는 것으로 의도된다. "선택하도록 유발하는 것"은 엔티티가 상기 언급된 감소된 양을 선택하도록 엔티티와 협조하여 유발, 촉구, 격려, 조장, 유도 또는 지시 또는 작용하는 것을 의미한다.

[0054] "대상체"는 온혈 포유동물 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장용 가축 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물 등을 포함한 동물을 의미한다. 본원에 사용된 대상체는 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나를 필요로 하는 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 UCD, 예를 들어 OTCd를 갖거나 또는 갖는 것으로 의심된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 UCD, 예를 들어 OTCd가 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 소아 또는 어린 대상체이고, 예를 들어, 18세 미만, 16세 미만, 15세 미만, 14세 미만, 13세 미만, 12세 미만, 11세 미만, 10세 미만, 9세 미만, 8세 미만, 7세 미만, 6세 미만, 5세 미만, 4세 미만, 3세 미만, 또는 2세 미만이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 1-10세이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 성인 대상체이다.

[0055] "합성 나노담체(들)"는 자연에서 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 보유하는 개별 대상을 의미한다. 알부민 나노입자가 일반적으로 합성 나노담체로서 포함되지만, 특정 실시양태에서 합성 나노담체는 알부민 나노입자를 포함하지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자가 아니다. 추가 실시양태에서, 합성 나노담체는 인지질을 포함하지 않는다.

[0056] 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 지질인 나노입자로서 지칭되기도 함), 중합체 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조 단백질로 구성되지만, 감염성이 아니거나 또는 낮은 감염성을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로서 지칭되기도 함) (예컨대, 알부민 나노입자) 및/또는 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자, 예컨대 지질-중합체 나노입자 중 1개 또는 복수개일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 피라미드형, 직사각형, 원통형, 토로이드형 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시에 사용하기 위해 적합화될 수 있는 예시적인 합성 나노담체는 (1) 미국 특허 5,543,158 (Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 공개된 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체 나노입자, (3) 공개된 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 리소그래픽적으로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 공개된 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개된 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개된 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개된 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 핵산 부착된 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1 또는 WO2009106999A2에 개시된 바이러스-유사 입자, (10) 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]에 개시된 나노침전된 나노입자, (11) 미국 공개 번호 2002/0086049에 개시된 아폽토시스 세포, 아폽토시스체 또는 합성 또는 반합성 모방체, 또는 (12) 문헌 [Look et al., "Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)]의 것을 포함한다.

[0057] 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 히드록실 기를 갖는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화하지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하지 않는 모이어티로 본질

적으로 이루어진 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 바이러스-유사 입자를 배제한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 또는 1:10 초과의 종횡비를 보유할 수 있다.

[0058] "요소 회로 장애"는 요소 회로 효소의 결핍이 존재하는 임의의 장애 또는 결함을 지칭한다. 일반적으로, 이는 대상체에서 이러한 결핍을 발생시키는 돌연변이에 의해 유발된다. 따라서, "요소 회로 장애와 연관된 효소"는 대상체에서 장애를 발생시키는 결핍이 존재하는 효소이다.

[0059] "바이러스 벡터"는 치료제, 예컨대 치료 단백질을 코딩하는 트랜스진 또는 핵산 물질을 포함하고 전달하도록 적합화된, 바이러스 성분, 예컨대 캡시드 및/또는 코트 단백질을 갖는 벡터 구축물을 의미하며, 트랜스진 또는 핵산 물질은 본원에 제공된 바와 같이 발현될 수 있다. "발현된" 또는 "발현" 등은 트랜스진 또는 핵산 물질이 세포 내로 형질도입되고 형질도입된 세포에 의해 프로세싱된 후의 기능적인 (즉, 원하는 목적을 위해 생리학상 활성인) 생성물의 합성을 지칭한다. 이러한 생성물은 또한 본원에서 "발현 생성물"로 지칭된다. 바이러스 벡터는, 비제한적으로, 아데노-연관 바이러스, 예컨대 AAV8에 기초할 수 있다. 따라서 본원에 제공된 AAV 벡터는 AAV, 예컨대 AAV8에 기초한 바이러스 벡터이고, 트랜스진 또는 핵산 물질을 전달하기 위해 이를 패키징할 수 있는 바이러스 성분, 예컨대 캡시드 및/또는 코트 단백질을 갖는다.

[0060] C. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물

[0061] 상기 언급된 바와 같이, 기관 이용가능성 및 평생의 면역억제 치료에 의해 제한적인 침습적 절차인 간 이식 이외에, 가장 통상적인 UCD인 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 결핍 (OTCd)에 대한 결정적 치료는 존재하지 않는다. 이에 더하여, 또한 상기 언급된 바와 같이, 바이러스 벡터에 대한 면역 반응, 예컨대 체액성 및 세포성 면역 반응은 그의 효능에 불리한 영향을 미칠 수 있고, 또한 그의 재투여를 방해할 수 있다. 중요한 것으로, 본원에 제공된 방법 및 조성물은, 예컨대 코돈-최적화된 서열에 의해 코딩된 OTC의 강한 발현을 달성하고/거나 OTC를 코딩하는 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시킴으로써 상기 언급된 장애를 극복하는 것으로 확인되었다.

[0062] 트랜스진

[0063] 본원에 제공된, 예컨대 바이러스 벡터의 트랜스진 또는 핵산 물질은 대상체, 예컨대 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 유익한 임의의 단백질 또는 그의 부분을 코딩할 수 있다. 일반적으로, 대상체는 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이를 제한된 양으로 생산하거나 전혀 생산하지 않는 질환 또는 장애를 갖거나 갖는 것으로 의심된다. 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 갖는 것일 수 있고, 트랜스진 또는 핵산 물질은 본원에 제공된 바와 같은 치료 단백질 또는 그의 부분 중 어느 하나를 코딩하는 것이다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 코돈-최적화될 수 있다. 본원에 제공된 트랜스진 또는 핵산 물질은 대상체에서 그의 내인성 버전의 일부 결함 (내인성 버전의 발현의 결함 포함)을 통해 대상체에서 질환 또는 장애를 발생시키는 임의의 단백질의 기능적 버전을 코딩할 수 있다. 이러한 질환 또는 장애의 예는 요소 회로 효소 결함, 예컨대 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 신테타제 결핍 (OTCd)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이에 따라 트랜스진 또는 핵산 물질에 의해 코딩되는 치료 단백질은 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 신테타제 (OTC)를 포함한다.

[0064] 트랜스진 또는 핵산 물질의 서열은 또한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 서열은 프로모터, 인핸서, 및 오퍼레이터를 포함하고, 이는 일반적으로, 발현 구축물이 활용될 발현 시스템에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 프로모터 및 인핸서 서열은 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 능력에 대해 선택되는 반면, 오퍼레이터 서열은 유전자 발현을 조절할 수 있는 능력에 대해 선택될 수 있다. 트랜스진은 또한 숙주 세포 내에서의 상동 재조합 및/또는 포장을 용이하게 하고, 바람직하게는 촉진하는 서열을 포함할 수 있다. 트랜스진은 또한 숙주 세포에서의 복제에 필요한 서열을 포함할 수 있다.

[0065] 예시적인 발현 제어 서열은 간-특이적 프로모터 서열, 예컨대 본원에 제공될 수 있는 어느 하나를 포함한다. 일반적으로, 프로모터는 목적하는 발현 생성물을 코딩하는 서열의 상류 (즉, 5')에 작동가능하게 연결된다. 트랜스진은 또한, 코딩 서열의 하류 (즉, 3')에 작동가능하게 연결된 적합한 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.

[0066] 본 개시내용에서 고려되는 예시적인 트랜스진 서열은 실시예 섹션에 이어지는 표 1에 제시된다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 표 1의 핵산 서열 중 1개 이상과 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서 트랜스진 서열은 본원에 제공된 바와 같은 CO3 또는 CO21의 트랜스진 서열이다.

[0067] 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-13 (표 1)의 핵산 서열 중 어느 하나와 적어

도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일한 핵산 서열이다. 이들 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명의 부분적 실시양태로서 고려된다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 본원에 제공된 트랜스진 서열 중 1개 이상, 예컨대 CO3 또는 CO21의 트랜스진 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다.

[0068] 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 표 1의 아미노산 서열, 예를 들어 서열식별번호: 14-25 중 1개 이상과 동일한 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 서열식별번호: 14-25 (표 1)의 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 코딩한다.

[0069] 한 측면에서, OTC를 코딩하는 본원에 제공된 서열 중 어느 하나 또는 그의 부분을 포함하는 핵산이 제공된다. 이러한 핵산의 조성물이 또한 제공된다.

[0070] 바이러스 벡터

[0071] 바이러스는 이들이 감염시킨 세포 내부에서 자신의 게놈을 수송하기 위한 전문화된 메카니즘을 진화시켜 왔고; 이러한 바이러스에 기초한 바이러스 벡터는 세포를 형질도입하기 위해 특정한 적용에 맞출 수 있다. 본원에 제공된 바와 같이 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 본원에 기재되어 있다. 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어 아데노-연관 바이러스 (AAV)-기반 벡터를 포함한다.

[0072] 본원에 제공된 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV)에 기초할 수 있다. AAV 벡터는 본원에 기재된 것과 같은 치료 용도에서 사용하기 위한 것으로 특히 관심 대상이다. AAV는 인간 질환을 유발하는 것으로 공지되어 있지 않은 DNA 바이러스이다. 일반적으로, AAV는 효율적인 복제를 위해, 헬퍼 바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 또는 포진 바이러스)와의 공동-감염, 또는 헬퍼 유전자의 발현을 필요로 한다. AAV-기반 벡터의 설명에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 8,679,837, 8,637,255, 8,409,842, 7,803,622, 및 7,790,449, 및 미국 공개 번호 20150065562, 20140155469, 20140037585, 20130096182, 20120100606, 및 20070036757을 참조한다. AAV 벡터는 재조합 AAV 벡터일 수 있다. AAV 벡터는 또한 자기-상보적 (sc) AAV 벡터일 수 있고, 이는 예를 들어, 미국 특허 공개 2007/01110724 및 2004/0029106, 및 미국 특허 번호 7,465,583 및 7,186,699에 기재되어 있다.

[0073] 바이러스 벡터의 기초가 되는 아데노-연관 바이러스는 특정 혈청형, 예컨대 AAV8일 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV8 벡터이다.

[0074] 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체

[0075] 본원에 제공된 바이러스 벡터는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 조합되어 투여될 수 있다. 일반적으로, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가적인 요소이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성되는 경우, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가된, 일부 실시양태에서는 그에 부착된, 화합물이다. 합성 나노담체의 물질이 또한 면역관용성 효과를 발생시키는 경우의 실시양태에서, 면역억제제는 면역관용성 효과를 발생시키는 합성 나노담체의 물질에 추가적으로 존재하는 요소이다.

[0076] 매우 다양한 다른 합성 나노담체가 본 발명에 따라, 일부 실시양태에서는 면역억제제에 커플링되어 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 구형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 편평하거나 또는 플레이트 모양이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 정육면체 또는 입방체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 계란형 또는 타원이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 원통형, 원뿔형 또는 피라미드형이다.

[0077] 일부 실시양태에서, 각각의 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록 크기 또는 형상 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체의 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총수에 기초하여, 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는, 이러한 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10%, 또는 20% 이내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0078] 합성 나노담체는 고체 또는 중공일 수 있고, 1개 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교해서 고유한 조성 및 고유한 특성을 갖는다. 하나의 예로, 합성 나노담체는 코어/쉘 구조를 가질 수 있고, 여기서 코어는 1개의 층이고 (예를 들어, 중합체 코어), 쉘은 제2의 층 (예를 들어, 지질 이중층

또는 단층)이다. 합성 나노담체는 복수의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 지질을 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 골 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0080] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 합성 나노담체는 비-중합체 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0081] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 친양쪽성 실체를 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 실체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노담체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 실체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과 회합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 많은 친양쪽성 실체가 본 발명에 따라 합성 나노담체를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 친양쪽성 실체는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민 (DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄 (DOTMA); 디올레오일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤 (DPPG); 헥산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올레에이트 (스판(Span)®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스판®20); 폴리소르베이트 20 (트윈(Tween)®20); 폴리소르베이트 60 (트윈®60); 폴리소르베이트 65 (트윈®65); 폴리소르베이트 80 (트윈®80); 폴리소르베이트 85 (트윈®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴; 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스핑고미엘린; 포스파티딜에탄올아민 (세팔린); 카르디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 틸록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 시클로덱스트린; 카오트로픽 염; 이온 쌍형성 작용제; 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 친양쪽성 실체 성분은 상이한 친양쪽성 실체의 혼합물일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 친양쪽성 실체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노담체의 생성에 사용될 수 있다.

[0082] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 탄수화물을 임의로 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도된 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 모노사카라이드 또는 디사카라이드를 포함하며, 이는 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀로비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루쿠론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 폴리사카라이드이며, 이는 풀루란, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 히드록시셀룰로스 (HC), 메틸셀룰로스 (MC), 덱스트란, 시클로덱스트란, 글리코겐, 히드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복실메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 곤약, 글루코만난, 푸스툴란, 헤파린, 히알루론산, 커들란 및 크산탄을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 탄수화물, 예컨대 폴리사카라이드를 포함하지 않는다 (또는 구체적으로 배제한다). 특정 실시양태에서, 탄수화물은 탄수화물 유도체, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 알콜을 포함할 수 있다.

[0083] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체이다. 일

부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 비-메톡시-종결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 비-메톡시-종결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 중합체는 코팅 층 (예를 들어, 리포솜, 지질 단층, 미셀 등)에 의해 둘러싸일 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 요소가 상기 중합체에 부착될 수 있다.

[0084] 면역억제제는 수많은 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체와 커플링될 수 있다. 일반적으로, 부착은 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합에 따른 결과일 수 있다. 이러한 결합으로 인해, 면역억제제가 합성 나노담체의 표면에 부착되게 하고/거나 합성 나노담체 내에 함유 (캡슐화)될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 대한 결합보다는 오히려 합성 나노담체의 구조에 따른 결과로서 합성 나노담체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제는 중합체에 부착된다.

[0085] 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합에 따른 결과로서 부착이 일어나는 경우, 이러한 부착은 커플링 모이어티를 통해 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는, 이를 통해 면역억제제가 합성 나노담체와 결합되는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합을 포함할 뿐만 아니라 면역억제제를 합성 나노담체와 (공유 또는 비공유) 결합시켜 주는 별개의 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 그의 유닛을 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제와 정전기적으로 결합하는, 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 그와 공유 결합되는 중합체 또는 그의 유닛을 포함할 수 있다.

[0086] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전하게 중합체성일 수 있거나 또는 중합체와 다른 물질의 혼합물일 수 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체들이 회합하여 중합체 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 성분, 예컨대 면역억제제는 이러한 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유 회합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 성분은 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 성분은 중합체 매트릭스 내에 캡슐화될 수 있고/거나, 이러한 매트릭스에 의해 둘러싸일 수 있고/거나 상기 매트릭스 전반에 걸쳐 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 광범위한 중합체 및 그로부터 중합체 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 공지되어 있다.

[0088] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체이거나 또는 2개 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 순서의 면에서, 공중합체는 무작위 또는 블록일 수 있거나 또는 무작위 및 블록 순서의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0089] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드, 또는 폴리에테르, 또는 그의 유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 또는 폴리카프로락톤, 또는 그의 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체가 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 포함하는 경우, 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록 공중합체를 포함하여, 중합체가 생분해성이 되도록 하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 유닛, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 단독으로 포함하지 않는다.

[0090] 본 발명에 사용하기 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-

글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β-히드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 21 C.F.R. § 177.2600 하에 미국 식품 의약품국 (FDA)에 의해 인간에게 사용하도록 승인된 중합체를 포함하며, 이는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레롤락톤, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0092] 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기 (예를 들어, 포스페이트 기, 술페이트 기, 카르복실레이트 기); 양이온성 기 (예를 들어, 4급 아민 기); 또는 극성 기 (예를 들어, 히드록실 기, 티올 기, 아민 기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 혼입되는 물질의 성질에 강력한 영향을 미칠 수 있다.

[0093] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 모이어티 및/또는 관능기에 의해 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 탄수화물; 및/또는 폴리사카라이드로부터 유래된 비-시클릭 폴리아세탈에 의해 변형될 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 미국 특허 번호 5543158 (Gref et al.), 또는 WO 공개 번호 WO2009/051837 (von Andrian et al.)의 일반적 교시를 이용하여 이루어질 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 중합체는 지질 또는 지방산 기에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 팔미톨레산, 올레산, 바센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산, 또는 에루스산 중 하나 이상일 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르일 수 있고, 이는 락트산과 글리콜산 유닛을 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드) (본원에서 집합적으로 "PLGA"로서 지칭됨); 및 글리콜산 유닛을 포함하는 단독중합체 (본원에서 "PGA"로서 지칭됨); 및 락트산 유닛을 포함하는 단독중합체, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 및 폴리-D,L-락티드 (본원에서 집합적으로 "PLA"로서 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; 락티드와 글리콜리드의 공중합체 및 PEG 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체), 및 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함한다.

[0096] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, 다양한 형태의 PLGA는 락트산:글리콜산의 비를 특징으로 한다. 락트산은 L-락트산, D-락트산, 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어 아크릴산과 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 상기 중합체 중 하나 이상을 포함하는 조합물을 포함한다. 아크릴 중합체는 4급 암모늄 기의 함량이 낮은 아크릴산과 메타크릴산 에스테르의 완전 중합된 공중합체를 포함할 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음으로 하전된 가닥을 응축 및/또는 보호할 수 있다. 아민-함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (문헌 [Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 및 Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7]), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; 문헌 [Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297]), 및 폴리(아미도아민) 덴드리머 (문헌 [Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; 및 Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372])가 생리학상 pH에서 양으로-하전되어, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 이를 배제할 수 있다).

[0099] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 보유하는 분해성 폴리에스테르일 수 있다 (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; 및 Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). 이들 폴리에스테르의 예는 폴리(L-락티드-코-L-리신) (문헌 [Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010]), 폴리(세린 에스테르) (문헌 [Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399]), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633]), 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633])를 포함한다.

[0100] 이들 및 다른 중합체의 특성, 및 이들의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; 및 4,946,929; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; 및 Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 보다 일반적으로, 특정의 적합한 중합체를 합성하는 다양한 방법이 문헌 ([Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 번호 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732)에 기재되어 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 서로 실질적으로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않으면서 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 합성 나노담체는 상기 및 다른 중합체 중 임의의 것의 블록 공중합체, 그라프트 공중합체, 블렌드, 혼합물 및/또는 부가물을 포함할 수 있는 것으로 추가로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 합성 나노담체는 비-중합체 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0103] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제는, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 커플링될 수 있다. 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (라파로그); TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능의 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제 및 산화된 ATP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한, IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오프린, 6-메르캅토퓨린, 아스피린, 니플룸산, 에스트리올, 트리폴리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토카인 또는 시토카인 수용체 등을 포함한다.

[0104] mTOR 억제제의 예는 라파마이신 및 그의 유사체 (예를 들어, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-메트알릴라파마이

신 (C20-Marap), C16-(S)-부틸술폰아미도라파마이신 (C16-BSrap), C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신 (C16-iRap) (Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107)), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), 크리소판산 (크리소판올), 데포롤리무스 (MK-8669), 에베롤리무스 (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, 템시롤리무스, 및 WYE-354 (미국 텍사스주 휴스톤 소재의 셀렉(Selleck)으로부터 입수 가능함)를 포함한다.

[0105] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수, 또는 포스페이트 완충 염수를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위해 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0106] D. 조성물의 사용 및 제조 방법 및 관련 방법

[0107] 바이러스 벡터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되거나 또는 본원에 달리 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,797,368 및 문헌 [Laughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983)]에 제시된 방법을 이용하여 구축 및/또는 정제할 수 있다.

[0108] AAV 벡터는 재조합 방법을 이용하여 생성할 수 있다. 전형적으로, 방법은 AAV 캡시드 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; AAV 역전된 말단 반복부 (ITR) 및 트랜스진으로 구성된 재조합 AAV 벡터; 및 재조합 AAV 벡터를 AAV 캡시드 단백질 내로 패키징하는 것을 가능하게 하는데 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 AAV 혈청형, 예컨대 AAV8의 역전된 말단 반복부 (ITR)를 포함할 수 있다.

[0109] rAAV 벡터를 AAV 캡시드 내에 패키지하기 위해 숙주 세포에서 배양하고자 하는 성분은 이러한 숙주 세포에 트랜스로 제공될 수 있다. 대안적으로, 필요한 성분들 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 기능) 중 임의의 하나 이상은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 상기 필요한 성분들 중 하나 이상을 함유하도록 조작한 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게, 상기 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에 상기 필요한 성분(들)을 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 필요한 성분(들)은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 본 발명의 rAAV를 생산하는데 필요한 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및 헬퍼 기능은 임의의 적절한 유전 요소를 이용하여 패키징 숙주 세포에 전달할 수 있다. 선택된 유전 요소는 본원에 기재된 방법을 포함한, 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 임의의 실시양태를 구축하는데 사용되는 방법은 핵산 조작에 있어서의 기술자에게 공지되어 있고, 이는 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 널리 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에 대해 제한적이지 않다. 예를 들어, 문헌 [K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 번호 5,478,745를 참조한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 벡터는 삼중 형질감염 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,001,650에 상세히 기재된 바와 같고, 삼중 형질감염 방법에 관한 그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)을 이용하여 생성할 수 있다. 전형적으로, 재조합 AAV는 숙주 세포를 AAV 입자 내로 패키지될 재조합 AAV 벡터 (트랜스진을 포함함), AAV 헬퍼 기능 벡터, 및 보조 기능 벡터로 형질감염시킴으로써 생성된다. 일반적으로, AAV 헬퍼 기능 벡터는 생산적 AAV 복제 및 캡시드화를 위해 트랜스로 기능하는 AAV 헬퍼 기능 서열 (rep 및 cap)을 코딩한다. 바람직하게, AAV 헬퍼 기능 벡터는 임의의 검출 가능한 야생형 AAV 비리온 (즉, 기능적 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않으면서도 효율적인 AAV 벡터 생성을 뒷받침한다. 보조 기능 벡터는 AAV가 복제에 대해 의존적인 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포성 기능에 대한 뉴클레오티드 서열을 코딩할 수 있다. 보조 기능은 AAV 복제에 필요한 기능을 포함하며, 이는 AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, cap 발현 생성물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여한 모이어티를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바이러스-기반 보조 기능은 공지된 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 (단순 포진 바이러스 유형-1 이외의 바이러스), 및 백시니아 바이러스 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0111] 바이러스 벡터를 생산하는 다른 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 또한, 바이러스 벡터는 상업적으로 입수가능하다.

[0112] 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체와 관련하여, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다.

[0113] 특정 실시양태에서, 부착시키는 것은 공유 링커를 통할 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따른 면역억제제는 알킨 기를 함유하는 면역억제제와 아지도 기와의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 형성되거나 또는 아지도 기를 함유하는 면역억제제와 알킨과의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해

외부 표면에 공유 부착될 수 있다. 이러한 고리화첨가 반응은 바람직하게, Cu(II) 화합물을 촉매적 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키는 환원제 및 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매의 존재 하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC)는 클릭 반응으로서 지칭될 수도 있다.

[0114] 추가적으로, 공유 커플링은 아미드 링커, 디술피드 링커, 티오에테르 링커, 히드라존 링커, 히드라지드 링커, 이민 또는 옥심 링커, 우레아 또는 티오우레아 링커, 아미딘 링커, 아민 링커, 또는 술폰아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0115] 아미드 링커는 하나의 성분, 예컨대 면역억제제 상의 아민과 제2 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 사이의 아미드 결합을 통해 형성된다. 이러한 링커 내의 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산과 활성화 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신이미드-활성화된 에스테르의 통상적인 아미드 결합 형성 반응 중 임의의 것을 이용하여 제조될 수 있다.

[0116] 디술피드 링커는, 예를 들어 R1-S-S-R2의 형태의 2개의 황 원자 사이의 디술피드 (S-S) 결합의 형성을 통해 제조된다. 디술피드 결합은 티올/메르캅탄 기 (-SH)를 함유하는 성분을 또 다른 활성화 티올 기로 티올 교환하거나, 또는 티올/메르캅탄 기를 함유하는 특정 성분을 활성화 티올 기를 함유하는 특정 성분으로 티올 교환함으로써 형성될 수 있다.

[0117] 트리아졸 링커, 구체적으로 형태  의 1,2,3-트리아졸 (여기서, R1 및 R2는 임의의 화학적 실체일 수 있음)은 제1 성분에 부착된 아지드와 제2 성분, 예컨대 면역억제제에 부착된 말단 알킨의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 제조된다. 이러한 1,3-양극성 고리화첨가 반응은 1,2,3-트리아졸 관능기를 통해 상기 2개의 성분을 연결하는 촉매의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 Cu(I)-촉매의 존재 하에 수행된다. 이러한 화학은 문헌 [Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) 및 Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015]에 상세히 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로서 지칭된다.

[0118] 티오에테르 링커는, 예를 들어 R1-S-R2의 형태의 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 제조된다. 티오에테르는 하나의 성분 상의 티올/메르캅탄 (-SH) 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드로 알킬화시킴으로써 제조될 수 있다. 티오에테르 링커는 또한, 하나의 성분 상의 티올/메르캅탄 기를, 마이클 수용체로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자-결핍 알켄 기에 마이클 첨가함으로써 형성될 수 있다. 또 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 하나의 성분 상의 티올/메르캅탄 기를 제2 성분 상의 알켄 기와 라디칼 티올-엔 반응시킴으로써 제조할 수 있다.

[0119] 히드라존 링커는 하나의 성분 상의 히드라지드 기를 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0120] 히드라지드 링커는 하나의 성분 상의 히드라진 기를 제2 성분 상의 카르복실산 기와 반응시킴으로써 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로, 카르복실산을 활성화 시약으로 활성화시키는 아미드 결합의 형성과 유사한 화학을 이용하여 수행된다.

[0121] 이민 또는 옥심 링커는 하나의 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기를 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기와 반응시킴으로써 형성된다.

[0122] 우레아 또는 티오우레아 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0123] 아미딘 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0124] 아민 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드, 또는 술포네이트 에스테르 기와 알킬화 반응시킴으로써 제조된다. 대안적으로, 아민 링커는 또한, 하나의 성분 상의 아민 기를, 적합한 환원 시약, 예컨대 소듐 시아노보로히드라이드 또는 소듐 트리아세톡시보로히드라이드를 이용하여 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기로 환원성 아미노화함으로써 제조될 수 있다.

[0125] 술폰아미드 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0126] 술폰 링커는 친핵체를 비닐 술폰에 마이클 첨가함으로써 제조된다. 비닐 술폰 또는 친핵체 중 하나는 나노담체의 표면 상에 있거나 또는 특정 성분에 부착될 수 있다.

[0127] 이러한 성분은 또한, 비-공유 접합 방법을 통해 접합될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 면역억제제는 정전기 흡착을 통해 양으로 하전된 성분과 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분이 또한, 금속-리간드 착물을 통해 금속 착물과 접합될 수 있다.

[0128] 실시양태에서, 성분은 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상의 반응성 또는 활성화될 수 있는 기와 함께 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제시되는 부착 화학과 적합성인 기를 이용하여 제조할 수 있다. 다른 실시양태에서, 펩티드 성분은 적합한 링커를 이용하여 VLP 또는 리포솜에 부착시킬 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 커플링할 수 있는 화합물 또는 시약이다. 특정 실시양태에서, 링커는 문헌 [Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이관능성 또는 이종이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재 하에 동종이관능성 링커인 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 처리하여, 이러한 ADH 링커를 갖는 상응하는 합성 나노담체를 형성할 수 있다. 이어서, 이로써 생성되는 ADH 연결된 합성 나노담체를, 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통해 산 기를 함유하는 펩티드 성분과 접합시켜 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 접합체를 생성한다.

[0129] 실시양태에서, 중합체 쇄에 대해 말단인 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체가 제조된다. 이어서, 이러한 중합체를 사용하여, 복수 개의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 위에 위치하는 방식으로 합성 나노담체를 제조한다. 대안적으로, 이러한 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조한 다음, 연속해서 알킨 또는 아지드 기로 관능화할 수 있다. 성분은 알킨 기의 존재 하에 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 기의 존재 하에 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 제조된다. 이어서, 상기 성분은, 이러한 성분을 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 입자에 공유 부착시켜 주는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-양극성 고리화첨가 반응을 통해 상기 나노담체와 반응될 수 있다.

[0130] 성분이 소분자인 경우, 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 상기 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유리할 수 있다. 실시양태에서, 성분을 중합체에 부착시킨 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하기보다는 오히려 이들 표면 기의 사용을 통해 상기 성분을 합성 나노담체에 부착시키기 위해 사용되는 표면 기를 갖는 합성 나노담체를 제조하는 것이 또한 유리할 수 있다.

[0131] 이용가능한 접합 방법에 관한 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조할 수 있다. 공유 부착 외에도, 상기 성분은 미리 형성된 합성 나노담체에 흡착시킴으로써 부착시킬 수 있거나 또는 합성 나노담체의 형성 동안 캡슐화함으로써 부착시킬 수 있다.

[0132] 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 매우 다양한 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 나노침전, 유체 채널을 이용한 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 에멀젼 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링, 마이크로에멀젼 절차, 마이크로제작, 나노제작, 희생 층, 단순 및 복잡 코아세르베이션과 같은 방법, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 단분산 반도체, 전도성, 자기성, 유기 및 다른 나노물질에 대한 수성 및 유기 용매 합성이 기재되어 있다 (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; 및 Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). 추가의 방법이 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; 및 Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755]; 미국 특허 번호 5578325 및 6007845; 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)] 참조).

[0133] 물질은 문헌 [C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like

Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 방법을 이용하여 바람직한 바와 같이 합성 나노담체 내로 캡슐화할 수 있다. 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있고, 이는 2003년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 번호 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0134] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는데 사용된 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 생성하기 위해 변경시킬 수 있다. 합성 나노담체의 제조 방법 및 사용된 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노담체에 부착될 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 조성에 좌우될 수 있다.

[0135] 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 합성 나노담체가 목적하는 범위를 벗어난 크기 범위를 갖는 경우, 합성 나노담체는, 예를 들어 체를 이용하여 사이징될 수 있다.

[0136] 합성 나노담체의 요소들은, 예를 들어 하나 이상의 공유 결합에 의해 전체 합성 나노담체에 부착될 수 있거나, 또는 하나 이상의 링커를 통해 부착될 수 있다. 합성 나노담체를 관능화하는 추가의 방법은 공개된 미국 특허 출원 2006/0002852 (Saltzman et al.), 공개된 미국 특허 출원 2009/0028910 (DeSimone et al.), 또는 공개된 국제 특허 출원 WO/2008/127532 A1 (Murthy et al.)로부터 적합화될 수 있다.

[0137] 대안적으로 또는 추가적으로, 합성 나노담체는 비-공유 상호작용을 통해 성분들에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유 실시양태에서, 비-공유 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스태킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 부착은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 있도록 배열될 수 있다. 실시양태에서, 캡슐화 및/또는 흡수가 부착의 한 형태이다.

[0138] 본원에 제공된 조성물은 무기 또는 유기 완충제 (예를 들어, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트 또는 시트레이트의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조정제 (예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트레이트 또는 아세테이트의 염, 아미노산 및 그의 염), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌9-10 노닐 페놀, 소듐 데스옥시콜레이트), 용액 및/또는 냉동/동결 안정화제 (예를 들어, 수크로스, 락토스, 만니톨, 트레할로스), 삼투 조정제 (예를 들어, 염 또는 당), 항박테리아제 (예를 들어, 벤조산, 페놀, 겐타미신), 소포제 (예를 들어, 폴리디메틸실로존), 보존제 (예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, EDTA), 중합체 안정화제 및 점도-조정제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.

[0139] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용하기 적합한 기술은 문헌 [Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; 및 Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone]에서 확인할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위해 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0140] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있고, 본 발명은 본원에 기재된 방법을 이용하여 생성될 수 있는 조성물로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 적절한 제작 방법을 선택하기 위해 연관된 특정한 모이어티의 특성에 주의를 기울여야 할 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 조건 하에 제작되거나 또는 최종적으로 멸균된다. 이는 이로써 생성되는 조성물이 멸균이면서 비-감염성이라는 것을 보장하므로, 비-멸균 조성물과 비교해서 안전성을 개선시킬 수 있다. 이것은, 특히 조성물을 투여받는 대상체가 면역 결함이 있고/거나, 감염으로 인해 고통받고 있고/거나 감염되기 쉬운 경우에, 중요한 안전 조치를 제공한다.

[0142] 본 발명에 따른 투여는 피하, 정맥내 및 복강내 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의할 수 있다. 본원에 언급된 조성물은 통상적인 방법을 이용하여 투여하기 위해, 일부 실시양태에서 병용 투여하기 위해 제작 및 제조될 수 있다.

[0143] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 유효량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 바이러스 벡터는 면역 반응을 감소시키고/거나 바이러스

벡터를 대상체에 재투여하는 것을 허용하는데 유효한 양의 투여 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 바이러스 벡터는 대상체에서 효과적인 트랜스진 발현을 증가시키거나 달성하는데 유효한 양의 투여 형태로 존재한다. 투여 형태는 다양한 빈도로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터와 함께 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 반복 투여하는 것이 수행된다.

[0144] 본 발명의 측면은 본원에 제공된 바와 같은 투여 방법을 위한 프로토콜을 결정하는 것에 관한 것이다. 프로토콜은 적어도, 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 빈도, 투여량을 달리하고, 후속적으로 목적하는 또는 바람직하지 않은 면역 반응을 평가함으로써 결정될 수 있다. 본 발명의 실시를 위해 바람직한 프로토콜은 바이러스 벡터 및/또는 발현된 생성물에 대한 면역 반응을 감소시키고/거나 트랜스진 발현을 촉진시킨다. 프로토콜은 적어도 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 투여 빈도 및 용량을 포함한다.

[0145] 개시내용의 또 다른 측면은 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나 이상을 포함한다. 바람직하게는, 조성물(들)은 본원에 제공된 바와 같은 어느 하나 이상의 용량을 제공하는 양으로 존재한다. 조성물(들)은 키트에서 1개의 용기 또는 1개 초과의 용기 내에 존재할 수 있다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 용기는 바이알 또는 앰플이다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 조성물(들)은 각각 별개의 용기 또는 동일한 용기 내의 동결건조 형태이고, 이에 따라 이들은 후속 시점에 재구성될 수 있다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 재구성, 혼합, 투여 등에 대한 지침서를 추가로 포함한다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 지침서는 본원에 기재된 방법 중 어느 하나에 대한 설명을 포함한다. 지침서는 임의의 적합한 형태로, 예를 들어, 인쇄 삽입물 또는 라벨로서 존재할 수 있다. 본원에 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에게 생체내로 조성물(들)을 전달할 수 있는 1개 이상의 시린지 또는 다른 장치(들)를 추가로 포함한다.

[0146] 실시예

[0147] 실시예 1: 시험관내 ssAAV 벡터 구축물 실험

[0148] 간-특이적 프로모터의 전사 제어 하에 인간 OTC 트랜스진을 발현하는 일련의 ssAAV 벡터 구축물을 개발하였다. rAAV-hOTC 벡터 (AAV2/8, 즉 AAV8 캡시드 단백질을 갖도록 조작된 AAV2 바이러스)는 야생형 AAV2 역전된 말단 반복부 (ITR)에 플랭킹된 인간 OTC (hOTC) 발현 카세트를 함유한다. 백본, 프로모터, 및 조절 요소는 벡터 pSMD2에 기초한다 (Ronzitti, et al., 2016). hOTC 트랜스진의 전사는 아포지단백질 E (ApoE) 인핸서 및 인간 알파-1-항트립신 (hAAT) 프로모터를 함유하는 하이브리드 프로모터에 의해 구동되고, 헤모글로빈 베타 (HBB) 폴리아데닐화 신호에 의해 종결된다. 코딩 영역 및 프로모터는 50개 염기 쌍 초과의 대안적 오픈 리딩 프레임 및 잠재 스플라이싱 부위의 제거에 의해 변형된 인간 헤모글로빈 베타-유래 합성 인트론 (HBB2)에 의해 분리된다 (Ronzitti, et al., 2016).

[0149] wt-hOTC는 상이한 알고리즘에 의해 코돈-최적화 (CO)되었다. 최적화 과정은 아미노산 1차 서열을 비변경된 상태로 유지시키면서 뉴클레오티드 서열을 변화시킴으로써 OTC mRNA의 번역 및 안정성을 개선시키는 것을 목표로 한다. 야생형 OTC cDNA 서열 및 WO 2015/138357 특허 A2 (Wang L., Wilson J.M.)로부터의 코돈-최적화된 (CO) LW4 서열을 또한 합성하여, 비교 대조군 (CO1)으로서 사용하였다. 상이한 CO cDNA의 뉴클레오티드 서열은 WT cDNA 서열과 30-20% 범위로 상이하다. 이어서, 벡터를 AAV8 혈청형 내로 패키징하고, Huh7 세포를 형질도입하는데 사용하였다. OTC 구축물 및 pGG2-eGFP 플라스미드 (형질감염 효율에 대해 정규화하기 위함)로 공동-형질감염된 Huh7 세포를 사용하여 총 RNA 및 단백질을 생성하였다. mRNA, 단백질, 및 활성 수준을 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯팅을 사용하여 분석하였다.

[0150] 효율에 대해 정규화하기 위해 GFP 플라스미드를 사용하여 형질감염을 입증하였다. 생성된 DNA를 증폭시켰고 (상부, 도 1), CO3 및 CO21 구축물이 가장 큰 형질감염 효율을 나타내었다 (하부, 도 1). CO3 및 CO21 구축물의 특색을 각각 도 4 및 5에 나타낸다. 구축물을 이중으로 실행한 다음 정량화했을 때, 야생형 (GFP 플라스미드)과 CO18 및 CO21 벡터 사이에 유의한 차이가 관찰되었다 (도 2). 모든 실험 (n=4)으로부터의 결과를 평균하여 도 3에 나타내었다. CO3을 동일한 방식으로 검사하였고; 결과를 도 7-8b에 나타내었다.

[0151] 처리된 세포를 또한 염색하여 OTC의 세포하 국재화를 검사하였다 (도 9).

[0152] 모든 DNA 제조는 동일한 DNA 제조 키트를 사용하여 동일한 날에 나란히 수행하여 DNA 품질 및 정량화에서의 주요 차이를 피하였다.

[0153] 실시예 2: 마우스에서의 ssAAV 벡터 구축물 실험

[0154] 간-특이적 프로모터의 전사 제어 하에 인간 OTC 트랜스진을 발현하는 일련의 ssAAV 벡터 구축물을 개발하였다. wt-hOTC를 상이한 알고리즘에 의해 코돈-최적화 (CO)하였다 (도 6, 표 1). 코돈 용법, 잠재 스플라이싱 부위, 안티센스 가닥 내의 ORF (ARF > 50bp), 2차 구조, GC-함량, 및 CpG 섬을 포함한 상이한 알고리즘을 검사한 다음, 수동 분석을 수행하여 후보 구축물을 결정하였다. 이어서, 벡터를 AAV8 혈청형 내로 패키징하고, 수컷 및 암컷 WT C57Bl/6 및 $OTC^{spf-ash}$ 마우스를 형질도입하는데 사용하였다.

[0155] 추가적으로, 단백질 수준, 촉매 활성 (도 10-11), 및 소변 오로트산 수준 (도 13)을 측정하여, $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 표현형을 교정하는데 특히 효율적인 CO-hOTC 구축물을 확인하였다 (CO3). 단백질, 활성 및 mRNA 정량화를 바이러스 게놈에 의해 정규화하였다.

[0156] 표 1. 예시적인 트랜스진 서열

[0157] 볼드체 대문자는 개시 및 정지 코돈을 나타내고, 작은 대문자는 코작 서열을 나타낸다.

명칭	서열	SEQ ID NO:
hOCT-001_cds_(WT)	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTTAATCTGAGGATCCTGTTAAACAATGCAGCTTTTAG AAATGGTCACAACTTCATGGTTCGAAATTTTCGGTGTGGACAACCACTACAAAATAA AGTGCAGCTGAAGGGCCGTGACCTTCTCACTCTAAAAAACTTTACCGGAGAAGAAA TTAAATATATGCTATGGCTATCAGCAGATCTGAAATTTAGGATAAAACAGAAAGGAG AGTATTTGCCTTTATTGCAAGGGAAGTCCTTAGGCATGATTTTTGAGAAAAGAAGTA CTCGAACAAGATTGTCTACAGAAACAGGCTTTGCACTTCTGGGAGGACATCCTTGTT TTCTTACCACACAAGATATTCATTTGGGTGTGAATGAAAGTCTCACGGACACGGCCC GTGTATTGTCTAGCATGGCAGATGCAGTATTGGCTCGAGTGTATAAACAATCAGATT TGGACACCCTGGCTAAAGAAGCATCCATCCCAATTATCAATGGGCTGTCAGATTTGT ACCATCCTATCCAGATCCTGGCTGATTACCTCACGCTCCAGGAACACTATAGCTCTC TGAAAGGTCTTACCCTCAGCTGGATCGGGGATGGGAACAATATCCTGCACTCCATC ATGATGAGCGCAGCGAAATTCGGAATGCACCTTCAGGCAGCTACTCCAAAGGGTTA TGAGCCGGATGCTAGTGTAACCAAGTTGGCAGAGCAGTATGCCAAAGAGAATGGTA CCAAGCTGTTGCTGACAAATGATCCATTGGAAGCAGCGCATGGAGGCAATGTATTA ATTACAGACACTTGGATAAGCATGGGACAAGAAGAGGAGAAGAAAAAGCGGCTCCA GGCTTTCCAAGGTTACCAGGTTACAATGAAGACTGCTAAAGTTGCTGCCTCTGACT GGACATTTTTACACTGCTTGCCCAGAAAGCCAGAAGAAGTGGATGATGAAGTCTTTT ATTCTCCTCGATCACTAGTGTTCCCAGAGGCAGAAAACAGAAAGTGGACAATCATG GCTGTCATGGTGTCCCTGCTGACAGATTACTCACCTCAGCTCCAGAAGCCTAAATTT TGA**TAA**gaattc	1
hOCT-CO1	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTC GGAACGGGCACAACTTTATGGTGAGGAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAA TAAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACAGGGGAG GAAATCAAGTATATGCTGTGGCTGTCAGCTGATCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAA GGGCGAATATCTGCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAG CGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTGGATTCGCTCTGCTGGGAGGAC ACCCTTGTTTTCTGACCACTCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACC GACACTGCTCGCGTCCTGAGCTCTATGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACA AACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGC CTGTCAGACCTGTATCACCCCATCCAGATTCTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGA GCACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACTGAGTTGGATTGGGGACGGAAACAATA TCCTGCACTCTATTATGATGTCAGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTCCAGGCTGCA ACCCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTACG CCAAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCTCA CGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGAAGAG AAGAAGAAGCGGCTCCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTGACAATGAAAACCGCTA AGGTCGCAGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAGA GGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCAGAAGCCTGGTGTTTCCCGAAGCTGAG AATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTCAGCCTGCTGACTGATTATTCACC TCAGCTCCAGAAACCAAAGTTCTGAT**AA**gaattc	2

[0158]

hOCT-CO2	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTC GGAACGGGCACAACTTTATGGTCCGCAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAAT AAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACAGGGGAGG AAATCAAGTATATGCTGTGGCTGTCAGCTGATCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAAG GGCGAATATCTGCCACTGCTGCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAGC GCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTGGATTCGCTCTGCTGGGAGGACA CCCTTGTTTTCTGACAACTCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCG ACACTGCTCGCGTCCTGAGCTCTATGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACAAA CAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGCCT GTCAGACCTGTATCACCCCATCCAGATTCTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGAGC ACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACTGAGTTGGATTGGGGACGGAAACAATATC CTGCACTCTATTATGATGTCAGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTCCAGGCTGCAAC CCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTACGCC AAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCTCACG GAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGAAGAGAA GAAGAAGCGGCTCCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACCGCTAAG GTCGCAGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAGAGG TGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCACGCTCCCTGGTGTTTCCCGAAGCTGAGAAT AGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTCAGCCTGCTGACTGATTATTCACCTCA GCTCCAGAAACCAAAGTTCTGAT**AA**gaattc	3
hOCT-CO3	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGAGAATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTTC GGAACGGCCACAACTTCATGGTCCGCAACTTCCGCTGCGGCCAGCCACTGCAGAA CAAGGTGCAGCTGAAGGGCAGAGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAG GAGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAGAATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAGGGCAAAAGCCTGGGCATGATCTTCGAAAAG CGCTCCACCCGGACCAGACTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGC CACCCTTGCTTCCTGACAACCCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGTCCCTGA CCGACACCGCCAGAGTGCTGAGCTCTATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGTA CAAACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCAATTATTAAcG GCCTGTCCGACCTGTATCACCCCATCCAGATTCTGGCCGATTACCTGACCCTGCAG GAGCACTATAGCAGCCTGAAGGGCCTGACACTGTCTTGGATCGGCGACGGAAATA ATATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGGCT GCTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTA CGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCT CACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTTCTATGGGACAGGAGGAAG AGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACCGC TAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAA GAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGGAGCCTGGTGTTTCCCGAAGCTG AGAATCGGAAATGGACAATtATGGCTGTGATGGTGTCCCTGCTGACTGATTATTCTC CTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGAT**AA**gaattc	4
hOCT-CO6	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGCATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCC GCAACGGCCACAACTTCATGGTcagaAACTTCCGCTGCGGCCAGCCCCTGCAaAACA AaGTGCAGCTGAAGGGCCGCGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAGGA GATCAAaTACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGCATCAAGCAGAAGG GCGAGTACCTGCCaCTGCTGCAaGGCAAGAGCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCG CAGCACCCGCACCCGCCTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCCCTGCTGGGCGGCCA CCCCTGCTTCCTGACaACaCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACC GACACCGCCCGCGTGCTGAGCAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCCCGCGTGTAC AAGCAGAGCGACCTGGACACCCTGGCCAAGGAGGCCAGCATCCCCATCATCAACG GCCTGAGCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCA GGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAA CAAtATCCTGCACAGtATTtATGATGAGCGCCGCCAAGTTCGGaATGCACCTGCAGGC	5

[0159]

	CGCCACCCCCAAGGGCTACGAGCCCGACGCCAGCGTGACCAAGCTGGCCGAGCA GTACGCCAAGGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCCCTGGAGGCC GCCCACGGCGGCAACGTGCTGATCACCGACACCTGGATCtctATGGGCCAGGAGGA GGAGAAGAAGAAGCGCCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTcACtATGAAGACCG CCAAGGTGGCCGCCAGCGACTGGACCTTCCTGCACTGCCTGCCCCGCAAGCCCGA GGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGCAGCCTGGTGTTCCCCGAGGC CGAGAACCGCAAGTGGACtATtATGGCCGTGATGGTctccCTGCTGACCGACTACAGC CCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGAT**AA**gaattc	
hOTC-CO6-1	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGGATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCA GAAACGGCCACAACTTCATGGTCCGAAACTTCAGATGCGGCCAGCCTCTGCAGAAC AAGGTGCAGCTGAAGGGCAGAGATCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAAG AGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGGATTAAGCAGAAG GGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAGGGAAAGTCTCTGGGCATGATCTTCGAGAAGC GGAGCACCAGAACCAGACTGAGCACCGAGACAGGCTTTGCCCTGCTCGGAGGACA CCCCTGCTTTCTGACAACACAGGATATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACC GATACAGCCAGAGTGCTGAGCAGCATGGCTGATGCCGTGCTGGCCAGAGTGTACA AGCAGAGCGATCTGGACACCCTGGCCAAAGAGGCCAGCATTCCCATCATCAACGG CCTGAGCGACCTGTATCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACACTGCAAG AGCACTACAGCAGCCTGAAGGGACTGACCCTGTCTTGGATCGGCGACGGCAACAA CATCCTGCACTCTATTATGATGAGCGCCGCCAAGTTCGGAATGCACCTGCAGGCCG CTACACCCAAGGGCTATGAGCCTGATGCCAGCGTGACAAAGCTGGCCGAGCAGTA CGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGATCCCCTGGAAGCTGCC CACGGCGGCAATGTGCTGATCACCGATACCTGGATCTCTATGGGCCAAGAGGAAG AGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAAGTGACAATGAAGACCGC CAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCTCGGAAGCCTGAA GAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCTAGAAGCCTGGTGTTCCCCGAGGCCG AGAACAGAAAGTGGACCATCATGGCTGTGATGGTGTCCCTGCTGACCGACTACTCT CCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGAT**AA**gaattc	6
hOCT-CO7	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGGATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCC GGAACGGCCACAACTTCATGGTCCGGAACTTCCGCTGTGGCCAGCCCCTGCAGAA CAAGGTGCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAA GAGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAGGGCAAGTCTCTGGGCATGATCTTCGAGAAG CGGAGCACCCGGACCCGGCTGTCTACCGAGACAGGATTTGCCCTGCTGGGCGGC CACCCTTGCTTTCTGACAACACAGGATATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGAC CGACACAGCCAGAGTGCTGAGCAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCCAGAGTGTA CAAGCAGAGCGACCTGGACACCCTGGCCAAAGAGGCCAGCATCCCCATCATCAAC GGCCTGTCCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCAGACTACCTCACACTGCA GGAACACTACAGCTCCCTGAAGGGCCTGACACTGAGCTGGATCGGCGACGGCAAC AATATCCTGCACTCTATTATGATGAGCGCCGCCAAGTTCGGAATGCACCTGCAGGC CGCCACCCCCAAGGGCTACGAGCCTGACGCCAGCGTGACCAAGCTGGCCGAGCA GTACGCCAAAGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAAGCC GCCCACGGCGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATCTCTATGGGCCAGGAAG AGGAAAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAAGTGACAATGAAGAC CGCCAAAGTGGCCGCCAGCGACTGGACCTTCCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCC GAAGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGGTCCCTGGTGTTTCCCGAGG CCGAGAACCGGAAGTGGACAATTATGGCTGTGATGGTGTCTCTGCTGACCGACTAC TCCCCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGAT**AA**gaattc	7
hOTC-CO9	GTCGACgccgccacc**ATG**CTCTTTAATCTGAGAATCCTGCTTAACAACGCCGCCTTCCG CAACGGACACAACTTCATGGTCCGGAACTTCAGATGCGGCCAGCCTCTCCAAAACA AGGTCCAGCTTAAGGGCAGAGATCTGCTCACCCTCAAAAACTTCACCGGAGAGGAA ATCAAGTATATGCTGTGGCTGTCTGCCGATCTTAAGTTCCGGATCAAACAGAAGGG	8

[0160]

	GGAGTACCTTCCGCTGCTGCAAGGGAAGTCACTCGGAATGATCTTCGAGAAGCGC TCCACTCGGACCAGGCTCAGCACCGAAACTGGATTTGCACTCCTGGGTGGTCATCC CTGTTTCCTGACCACCCAAGATATCCACCTGGGCGTGAACGAATCCCTGACCGACA CAGCTCGCGTGCTGTCCTCCATGGCCGACGCTGTGTTGGCCCGGGTCTACAAGCA GAGCGACCTGGACACTCTGGCCAAGGAAGCCTCCATTCCGATCATCAATGGGCTG TCCGACCTGTACCACCCAATTCAGATCCTGGCGGATTACTTGACCCTGCAAGAGCA CTACAGCTCCCTGAAGGGACTGACCCTCTCCTGGATTGGCGACGGGAACAACATC CTCCACTCGATTATGATGTCGGCGGCGAAGTTCGGCATGCATCTGCAAGCCGCCA CTCCTAAGGGTTACGAACCGGACGCAAGCGTGACCAAGCTCGCCGAACAGTACGC GAAGGAAAACGGCACTAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCCCTGGAAGCCGCTCAC GGCGGAAACGTGCTGATTACGGACACCTGGATCAGCATGGGACAGGAGGAGGAGA AGAAGAAGCGGCTGCAGGCGTTCCAGGGATACCAGGTCACCATGAAAACTGCCAA AGTGGCAGCCTCAGACTGGACTTTCCTGCACTGCCTGCCTCGGAAGCCAGAGGAG GTGGACGATGAAGTGTTCTACTCCCCTCGCTCCCTGGTGTTCCCGGAGGCGGAAA ACAGGAAGTGGACCATCATGGCCGTGATGGTGTCATTGTTGACCGATTACTCGCCG CAACTGCAGAAGCCCAAGTTTTG**A**gaattc	
hOTC-CO9-1	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTTAATCTGAGAATCCTGCTGAACAATGCTGCTTTCCG CAATGGGCACAACTTTATGGTCCGAAACTTCCGATGTGGACAGCCTCTGCAGAACA AGGTGCAGCTGAAGGGCCGGGACCTGCTGACCCTGAAGAATTTCACAGGCGAGGA GATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTTAGGATCAAGCAGAAGG GCGAGTATCTGCCACTGCTGCAGGGCAAGTCCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCG GAGCACCCGGACAAGACTGAGCACCGAGACAGGATTCGCACTGCTGGGAGGACAC CCATGCTTTCTGACAACACAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGTCTCTGACCGA CACAGCACGGGTGCTGAGCTCCATGGCAGATGCCGTGCTGGCCAGAGTGTACAAG CAGAGCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAGGCCTCCATCCCCATCATCAATGGCC TGTCTGACCTGTATCACCCAATCCAGATCCTGGCCGATTACCTGACCCTGCAGGAG CACTATTCTAGCCTGAAGGGCCTGACACTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATAT CCTGCACAGCATCATGATGTCCGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGGCAGCA ACCCCAAAGGGATACGAGCCCGATGCCTCCGTGACAAAGCTGGCCGAGCAGTATG CCAAGGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGACAAATGACCCACTGGAGGCAGCACA CGGAGGAAACGTGCTGATCACCGATACATGGATCTCTATGGGCCAGGAGGAGGAG AAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTGACCATGAAGACAGCCA AGGTGGCCGCCTCTGATTGGACCTTTCTGCACTGTCTGCCCCGGAAGCCTGAGGA GGTGGACGATGAGGTGTTCTATTCCCCTCGGAGCCTGGTGTTCCCAGAGGCAGAG AATCGCAAGTGGACAATCATGGCCGTGATGGTCTCCCTGCTGACTGACTACTCCCC ACAGCTGCAGAAGCCCAAGTTTTGAT**AA**gaattc	9
hOTC-CO9-2	GTCGACgccgccacc**ATG**CTCTTCAATCTCCGAATACTCCTGAATAATGCGGCATTCAG AAATGGGCACAATTTTATGGTGCGAAATTTTCGATGTGGGCAGCCCTTGCAAAATAA AGTACAACTTAAAGGCAGAGATCTTCTTACGCTCAAAAACTTTACCGGCGAAGAGAT TAAGTATATGTTGTGGCTGTCTGCTGACCTTAAATTCCGAATAAAACAGAAAGGCGA ATACCTTCCGCTCCTCCAAGGGAAATCTCTTGGGATGATTTTCGAGAAGAGATCTAC GCGCACGCGGCTTTCAACGGAAACTGGATTCGCACTCTTGGGCGGCCACCCATGT TTTCTGACTACTCAAGATATTCACTTGGGAGTAAATGAGTCACTTACTGACACGGCA AGAGTGCTCTCTAGCATGGCTGATGCAGTGCTGGCTAGAGTCTATAAACAATCCGA CCTGGATACACTCGCCAAGGAAGCTTCAATACCAATAATCAACGGGTTGTCTGACTT GTACCACCCTATCCAAATCTTGGCCGATTATTTGACACTCCAGGAACACTACTCAAG TCTGAAGGGACTTACGCTTAGCTGGATAGGTGATGGTAACAACATCCTTCATAGCAT TATGATGTCAGCCGCCAAATTCGGCATGCATCTGCAAGCAGCGACTCCCAAGGGCT ATGAGCCTGATGCCTCAGTCACCAAACTGGCGGAGCAGTACGCTAAAGAGAATGG GACGAAGCTTTTGCTGACGAACGATCCCCTGGAGGCGGCTCACGGGGGAAATGTG CTTATCACGGATACCTGGATAAGTATGGGGCAGGAGGAAGAAAAAAAAAAAGCGATT	10

[0161]

	GCAAGCCTTTCAAGGTTACCAGGTTACAATGAAAACTGCGAAAGTCGCCGCATCTG ACTGGACTTTTCTGCACTGTCTTCCGAGAAAGCCGGAAGAGGTGGACGACGAAGT GTTCTACTCTCCGCGCTCTCTCGTGTTTCCTGAAGCAGAGAACCGAAAGTGGACCA TAATGGCGGTAATGGTCAGCCTCTTGACTGATTATTCCCCTCAGCTGCAGAAGCCA AAGTTTTGAT**AA**gaattc	
hOTC-CO18	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGCATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCC GCAACGGCCACAACTTCATGGTCAGAAACTTCCGCTGCGGCCAGCCCCTGCAAAA CAAAGTGCAGCTGAAGGGCCGCGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAG GAGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAGAATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAAGGCAAGAGCCTGGGCATGATCTTCGAGAAG CGCAGCACCCGCACCCGCCTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGC CACCCTTGCTTCCTGACAACCCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGA CCGACACCGCCCGCGTGCTGAGCAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGT ACAAACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCCATCATCAAC GGCCTGAGCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGC AGGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCA ACAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGG CTGCTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAG TACGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCG CTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGACACCTGGATCTCTATGGGCCAGGAGGA AGAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACC GCTAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTCCTGCACTGCCTGCCCCGCAAGCCCG AGGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGCAGCCTGGTGTTCCCCGAGG CCGAGAACCGCAAGTGGACTATTATGGCCGTGATGGTGTCCCTGCTGACTGATTAT TCTCCTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGAT**AA**gaattc	11
hOTC CO21 (전체 서열)	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTC GGAACGGGCACAACTTTATGGTGAGGAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAA TAAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACAGGGGAG GAAATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAGAATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAG CGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGCC ACCCTTGCTTCCTGACAACCCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACC GACACTGCTCGCGTCCTGAGCTCTATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGTACA AACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCCATCATCAACGGC CTGAGCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCAGG AGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAA TATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGGCTG CTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTAC GCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCTC ACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGAAGA GAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACCGCT AAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAG AGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCAGAAGCCTGGTGTTTCCCGAAGCTGA GAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTGTCCCTGCTGACTGATTATTCTC CTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGAT**AA**gaattc	12
hOTC CO21 (ORF)	ATGCTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTCGGAACG GGCACAACTTTATGGTGAGGAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAA TAAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACA GGGGAGGAAATCaaatacatgctgtggctgagcgccgatctgaagttca	13

[0162]

[0163]

	gaatcaagcagaagggcgagtacCTGCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCT GGGGATGATCTTCGAAAAGCGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAG ACTggcttcgctctgctgggaggccacccttgcttcctgacaacccagG ACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCGACACTGCTCGCGTCCT GAGCTCTatggccgacgccgtgctggctcgggtgtacaaacagtccgac ctggataccctggccaaggaagcttccATCCCCATCATCAACGGCCTGA GCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCA GGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGAC GGCAACAATATCCTGcactctattatgatgtctgccgccaagtttggaa tgcacctgcaggctgctacccctaaaggctacgaacccgatgcctctgt gacaaagctggctgaacagtacgccaaagagaacggcacaaagctgctg ctgaccaacgaccctctggaggccgctcacggaggcaacGTGCTGATCA CCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGgaagagaagaagaagcggct gcaggccttccagggctaccaggtcaccatgaaaaccgctaaggtggcc gccagcgatTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAGAGG TGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCAGAAGCCTGGTGTTTCCCGAAGC TGAGAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGatggtgtccctgctgact gattattctcctcaactgcagaaacctaaatttga	
hOTC-001_cds_(WT)	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	14
hOTC-CO1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	15
hOTC-CO2	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	16
hOTC-CO3	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA	17

[0164]

	ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	
hOTC-CO6	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	18
hOTC-CO6-1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	19
hOTC-CO7	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	20
hOTC-CO9	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	21
hOTC-CO9-1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	22
hOTC-CO9-2	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD	23

	GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	
hOTC- CO18	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	24
hOTC- CO21	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	25

[0165]

[0166] 실시예 3: 생체내 간-표적화 연구

[0167] 간을 높은 효율로 표적화하는 능력에 대해 여러 AAV 캡시드 변이체를 스크리닝하기 위해, 마우스 및 비-인간 영장류에서 시험관내 및 생체내 연구를 수행하였다. 추가의 전임상 연구를 수행하여 AAV 벡터 및 라파마이신을 캡슐화한 합성 나노담체의 조합물의 안전성 및 효율을 평가하였고, 초기 치사성을 갖는 질환에서 반복 투여를 가능하게 하는 치료 접근법을 개발할 수 있는 실행가능성을 입증하였다.

[0168] 실시예 4: AAV8-hOTC-CO 구축물의 시험관내 시험

[0169] 인간 간세포성 암종 세포주 HUH7을 사용하여 AAV8-hOTC-CO 구축물의 발현 수준을 평가하였다. AAV8-hOTC-CO1 (CO1), AAV8-hOTC-CO2 (CO2), AAV8-hOTC-CO3 (CO3), AAV8-hOTC-CO6 (CO6), AAV8-hOTC-CO7 (CO7), AAV8-hOTC-CO9 (CO9) 구축물 플라스미드를, 내부 대조군으로서 pGFP 플라스미드와 함께, 리포펙타민 (리포펙타민 2000, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))을 사용하여 HUH7 세포를 일시적으로 공동-형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 총 단백질 용해물을 제조하고, 웨스턴 블롯 분석에 의해 OTC 발현에 대해 분석하였다.

[0170] 결과는 hOTC-wt (WT) 구축물에 비해 모든 조작된 서열의 경우 OTC 단백질 발현의 전체적인 증가를 보여주었다 (도 14). WT 구축물보다 약 5-배 더 높은 발현 효율의 증가를 갖는 CO6이 가장 효율적인 구축물이었고, WT 및 CO1 구축물과 비교하여 대략 2.5-배 더 높은 발현을 갖는 CO3 및 CO7이 그 다음이었다.

[0171] 개선된 번역가능성을 갖는 추가의 AAV8-hOTC-CO 구축물을 생성하기 위해 2가지 전략을 채용하였다: 1) 생물정보학 알고리즘을 사용하여 OTC CO6 및 CO9 구축물을 "재-최적화"하는 것 (표 2); 및 2) 종 사이에서 OTC 단백질의 가장 보존된 영역을 분석하는 것에 기초하여 (도 16), 이들 영역을 선택하고 가장 효율적인 AAV8-hOTC-CO 구축물 사이에서 셔플링하는 것.

[0172] 표 2. hOTC-CO 서열 설명

명칭	설명
hOTC-wt	유전자 은행으로부터의 WT 인간 OTC 코딩 서열
hOTC-CO1	CO LW4 서열 (Wang, L, 2012, Molecular Genetics and Metabolism)
hOTC-CO2	예측 잠재 스플라이스 부위를 제거하여 최적화된 CO1
hOTC-CO3	추가의 부위를 제거하여 최적화된 CO1
hOTC-CO6	JCat 알고리즘에 의해 이루어진 최적화
hOTC-CO7	GeneArt에 의해 이루어진 최적화
hOTC-CO9	DNA 2.0에 의해 이루어진 최적화
hOTC-CO6-1	GeneArt에 의해 재-최적화된 CO6
hOTC-CO9-1	GeneArt에 의해 재-최적화된 CO9
hOTC-CO9-2	IDT에 의해 재-최적화된 CO9
hOTC-CO18	CO1, CO3, 및 CO6 사이에서의 보존된 영역 셔플링에 기초한 키메라 서열
hOTC-CO21	CO1, CO3, 및 CO6 사이에서의 보존된 영역 셔플링에 기초한 키메라 서열

[0173]

[0174] 3개의 새로운 코돈-"재"-최적화된 구축물의 군을 시험하였다 (CO6-1, CO9-1, 및 CO9-2). HUH7 세포를 WT, CO1, CO3, CO6-1, CO9-1, CO9-2 구축물로 형질감염시켰다. CO6-1, CO9-1, 및 CO9-2 단백질의 OTC 단백질 발현 수준은 WT, CO1, 및 다른 이전에 시험된 구축물과 비교하여 유의하게 감소되었다 (도 15).

[0175] 보다 효율적인 생성물을 유지하기 위해 코돈-최적화된 OTC 서열의 제3 군을 생성하였다. 단백질 도메인 및 종 사이의 보존된 영역을 확인하기 위해 OTC ORF 서열의 기능적 분석을 분석하였다. 이들 영역을 CO1, CO3, 및 CO6 서열 사이에서 셔플링하여 CO18 및 CO21 서열을 수득하였다 (도 17). CO18 및 CO21 구축물은 OTC 단백질 수준을 WT보다 최대 5-6배 더 높게 증가시키는데 가장 효율적이었다 (도 18). CO21을 OTC 결핍 유전자 요법에 대한 후보로서 선택하였다.

[0176] WT, CO1, 및 CO3 구축물의 미토콘드리아로의 세포내 국재화를 HUH7 세포에서 시험하였다. HUH7 세포를 WT, CO1, 및 CO3 구축물로 형질감염시키고, 24시간 후, 세포를 미토콘드리아 마커 (미토트래커(MitoTracker)® 레드 CMXRos, 인비트로젠(Invitrogen)) 및 항-OTC 항체 (압캠(Abcam) ab203859)로 염색하였다. 생성된 제조물을 공초점 현미경에 의해 분석하였다. 모든 hOTC 구축물의 국재화는, 미토콘드리아 마커와의 강한 공동-국재화에 의해 입증된 바와 같이, 미토콘드리아 내부였다 (도 9).

[0177] 실시예 5: AAV8-hOTC-CO 구축물의 생체내 시험

[0178] 2마리의 마우스 동물 모델을 본원에 기재된 연구에 사용하였다: 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratory)로부터의 야생형 (WT) C57Bl/6 마우스 및 $OTC^{spf-ash}$ 마우스 (B6EiC3Sn a/A-Otc$^{spf-ash}$, 스톡 번호 001811). 시험관내 평가 후, AAV8-hOTC-CO 구축물을 WT C57Bl/6 마우스에서 생체내 시험하였고, 가장 효율적인 구축물을 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 시험하였다. 이들 실험은 코돈-최적화된 구축물과 야생형 hOTC의 비교를 포함하였다.

[0179] AAV8-hOTC-CO 구축물을 처리군으로 무작위 배정한 성체 8-주령 수컷 및 암컷 마우스에서 시험하였다. 마우스를 단일 꼬리 정맥 주사로 처리하였다. 5개의 상이한 용량 (5.0E12개 vg/kg, 1.25E12개 vg/kg, 1.0E12개 vg/kg, 5.0E11개 vg/kg, 및 2.5E11개 vg/kg)을 시험하여 실질적인 OTC 단백질 발현을 생성하였다. 실제로, 외인성 hOTC 발현의 수준은 분석에서 내인성 OTC의 간섭을 제한할 만큼 충분히 높은 것으로 시험되었다.

[0180] 처리 후, 마우스를 특정 시간에 희생시키고, 간을 수집하고, OTC 단백질 수준, OTC 촉매 활성, 및 세포당 바이러스 게놈의 정량화에 대해 분석하였다. 상업용 키트 (프로메가 위자드(Promega Wizard)™ 게놈 DNA 정제 키트)를 사용하여 간 분말로부터 추출된 게놈 DNA의 qPCR에 의해 게놈 바이러스 카피를 결정하였다. 동일한

DNA 제조물로부터 바이러스 게놈의 측정을 3회 반복하고, 평균값을 보고하였다.

[0181] 10 밀리그램의 간 분말을 자동 균질화기를 사용하여 200 μl의 미토콘드리아 완충제 (0.5% 트리톤, 10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM 디티오트레이톨)로 용해시켰다. 세포 파편을 최대 속도에서 10분 동안 원심분리하여 제거하고, 총 단백질 농도를 브래드포드 검정에 의해 결정하였다. 동등량의 단백질 (10 μg)을 10% SDS-PAGE 겔에 로딩한 후, 이를 니트로셀룰로스로 옮기고, α-OTC 항체 (압캠 ab203859, 희석: 5% 밀크-PBST 중 1:3,000)와 함께 인큐베이션함으로써 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 항-튜불린 또는 GAPDH를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0182] OTC 효소 활성을 3회 측정하였다. 1 마이크로그램 (1 μg)의 총 간 단백질을 175 μl의 새로이 제조된 반응 완충제 (5 mM 오르니틴, 15 mM 카르바밀 포스페이트, 270 mM 트리에탄올아민, pH 7.7)와 함께 30분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 반응을 62.5 μL의 3:1 인산:황산 용액으로 정지시켰다. 이어서, 12.5 μL의 3% 2,3-부탄디온 모녹심을 즉시 반응물에 첨가하고, 반응물을 95℃에서 15분 동안 인큐베이션하고, 빛으로부터 보호하였다. 샘플을 96-웰 플레이트로 옮기고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응을 이중으로 수행하고, 평균값을 보고하였다. 단백질 수준 및 효소 활성을 바이러스 게놈 값에 의해 정규화하였다.

[0183] WT C57Bl/6 마우스에서의 시험

[0184] CO1, CO2, CO3, CO6, CO7, CO9, 및 WT 구축물을 처리군으로 무작위 배정한 WT C57Bl/6 마우스에서 시험하였다. 마우스를 단일 꼬리 정맥 주사로 처리하였다. 실험군 및 용량은 표 13-15에서와 같다.

[0185] 수컷 WT C57Bl/6 마우스를 고용량 (5.0E12개 vg/kg)으로 형질도입한 결과, CO3 및 CO6이 CO1 및 WT 구축물과 비교하여 단백질 발현 및 활성 둘 다의 면에서 가장 효율적인 구축물이었다 (도 19-20, 표 3-6). 특히, CO3 구축물을 주사한 마우스는 동등한 바이러스 게놈 카피 농도에서 WT를 주사한 마우스보다 3-4배 더 높은 간 OTC 수준 및 활성을 가졌다 (도 19-20, 표 3-6). 또한, CO6을 주사한 마우스는 WT를 주사한 마우스보다 4-6배 더 높은 간 OTC 수준 및 활성을 가졌다 (도 19-20). 바이러스 게놈 카피는 단백질 수준 및 활성과 일치하였다 (도 19).

[0186] 보다 낮은 용량 (1.25E12개 vg/kg)으로의 수컷 마우스의 형질도입은 CO6 구축물이 가장 효율적이라는 것을 확인시켜 주었으며, 이는 WT 버전보다 3-4배 더 높은 OTC 활성을 나타내었다 (도 21, 표 7-9). CO3 구축물은 동등한 바이러스 게놈 카피에서 WT를 주사한 마우스보다 1.5-배 더 높은 간 OTC 활성을 발생시켰다 (도 21, 표 7-9).

[0187] 반대로, 암컷 C57Bl/6 마우스의 형질도입은 수컷과 비교하여 일부 동물에서 보다 높은 가변성 및 보다 낮은 바이러스 게놈 로드를 나타내었다 (도 22, 표 10-12). 사실, 암컷 마우스에서의 감소된 AAV 형질도입은 이미 보고되어 있다 (Davidoff et al., 2003). 5.0E12개 vg/kg의 CO3을 주사한 암컷 C57Bl/6 마우스는 WT보다 3-4배 더 높은 OTC 발현 및 활성을 가졌다 (도 22, 표 10-12). 형질도입된 마우스의 간에서 hOTC mRNA 수준을 측정한 경우, 상이한 구축물 사이에 통계적 차이는 존재하지 않았고, 이는 코돈-최적화가 유전자 전사 효율에 영향을 미치지 않았음을 시사한다 (도 23).

[0188] 종합하면, 이들 데이터는 HUH7 형질감염이 코돈-최적화된 구축물을 스크리닝하기 위한 신뢰할 수 있는 시험 방법이고, 코돈-최적화 전략은 야생형 트랜스진보다 생체내 트랜스진 발현에 보다 효율적일 수 있는 조작된 hOTC 카세트를 생산하는데 효과적이라는 것을 시사한다. 특히, CO3 및 CO6은 상승된 수준의 촉매 활성 OTC 단백질을 생산하는데 고도로 효율적인 것으로 확인되었다.

[0189] $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 시험

[0190] AAV-hOTC-CO 구축물의 제2 배치를 제조하여 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 실험을 수행하였다. 형질도입 효율을 제1 배치의 것과 비교하기 위해 이 제2 배치를 먼저 수컷 WT C57BL/6 마우스에서 시험하였다 (도 24, 표 16-19). 이전 실험에서와 같이 단백질 발현, OTC 촉매 활성, 및 세포당 바이러스 게놈 카피에 대해 유사한 결과가 수득되었다.

[0191] 시험관내 결과에 기초하여, CO21, CO1, 및 CO3 구축물을 WT C57BL/6 마우스에서 시험하였다. AAV8-OTC-CO21은 단백질 발현을 증가시키는데 가장 효율적이었고, WT 구축물과 비교하여 6-8배 더 높은 OTC 발현 및 촉매 활성, 및 CO3 구축물보다 2-배 더 높은 촉매 활성을 가졌다 (도 25, 표 20-23).

[0192] WT, CO1, CO3, 및 CO6 구축물을 성체 8-주령 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 시험하였다 (표 24). $OTC^{spf-ash}$ 마우스는

OTCd의 확립된 모델이고, 임상 연구에서 널리 사용된다 (Moscioni, et al., 2006; Cunningham, et al., 2011; Wang, et al., 2012). $OTC^{spf-ash}$ 마우스는 X-염색체 상에 위치한 OTC 유전자의 엑손 4의 마지막 뉴클레오티드에 저차형 구아닌에서 아데노신으로의 돌연변이를 보유한다. 이는 이상 침묵 및 단지 5%의 정확하게 스플라이싱된 mRNA의 생산 및 5-10%의 잔류 OTC 효소적 활성으로 이어진다. 반접합 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스는 생존가능하지만, 정상 식이를 유지할 때 감소된 수명을 나타낸다. 임상적으로, $OTC^{spf-ash}$ 마우스는 성장 지연, 희박한 털, 고암모니아혈증, 및 증가된 소변 오로트산을 나타낸다. 질소-로드 성장 챌린지 시, 이들 마우스에서 암모니아-유발 뇌병증이 발생한다. 정상 식이 중인 마우스에서의 중증 신경계 손상의 부재는 이들 마우스가 보다 경도의 질환 형태인 지연 발병 OTC 결핍에 대한 모델로서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0193] $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서, 통계적으로 유의한 실험에 도달하는데 필요한 최소 군 크기는 G*파워 소프트웨어 (버전 3.1.9.3)를 사용하여, $\alpha=0.05$, $1-\beta=0.8$, 양측, 유사한 군 크기, 효과 크기 높음으로 고려하고, 비처리 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 소변 오로트산 값 600 μmol/mmol 크레아티닌, 및 처리 마우스에서의 소변 오로트산 값 200 μmol/mmol 크레아티닌 ± 100 μmol 오로트산/mmol 크레아티닌 SD (결함의 교정에서의 경미한 영향에 상응함) (야생형 마우스의 수준은 약 60-100 μmol 오로트산/mmol 크레아티닌임)를 고려하여 계산하였다. 계산된 최소 크기 군은 3마리의 마우스였고, 4마리를 본원에 기재된 실험에 사용하였다.

[0194] 소변 오로트산을 사용하여 AAV8-hOTC 구축물 형질도입 후 표현형 교정을 평가하였다. 소변 오로트산은 본원에 기재된 바와 같이 안정한-동위원소-희석 액체 크로마토그래피-질량 분광측정법에 의해 정량화하였다. 소변을 1.5 mL 튜브에 수집하고, 최대 속도로 1분 동안 원심분리하여 정화하였다. 10 μL의 소변을 90 μL의 안정한 동위원소 완충제 (1.25 mM NH_4OAc 중 0.2 mM 1,3-($^{15}N_2$) 오로트산)에 희석하였다. 샘플을 액체 크로마토그래피/탠덤 질량 분광측정법을 사용하여 천연 및 안정성 동위원소 오로트산에 대해 각각 전이 111.1>155.1 및 157>113을 사용하여 오로트산에 대해 분석하였다. 이동상은 아세토니트릴-0.1% 포름산으로 이루어졌다. 결과를 효소 상업용 키트 (마우스 크레아티닌 검정 키트, 80350, 크리스탈 켐(Crystal Chem))를 사용하여 측정된 크레아티닌 수준에 대해 표준화하였다. 문헌 [Cunningham, et al., 2009]으로부터 적합화하였다.

[0195] 소변 중 소변 오로트산을 주사 1일 전 및 주사 후 2주마다 측정하였다. $OTC^{spf-ash}$ 마우스에 주사한 모든 rAAV8-hOTC 구축물은 오로트산 수준을 감소시킬 수 있었고, 주사 8주 후에 생리학적 수준으로 회복시켰다. 모든 rAAV 벡터는 벡터 전달 8주 후에 소변 오로트산을 정상화시켰고, CO1 및 CO3은 치료 2주 후에 보다 높은 오로트산 복귀 동역학을 가졌다 (도 26, 표 25).

[0196] 혈장 암모니아 수준을 또한 측정하였지만; $OTC^{spf-ash}$ 마우스 혈액에서의 그의 변동으로 인해, 그 자체는 고도로 신뢰할 수 있는 시험 파라미터인 것으로 간주될 수 없다. 하악하 천공에 의해 50 μL의 혈액을 EDTA-함유 튜브에 수집하고, 즉시 얼음 상에 두었다. 3,000 rcf에서 15분 동안 원심분리하여 혈장을 추출하고, 상업용 키트 (암모니아 검정 키트, MAK310, 시그마(Sigma))를 사용하여 암모니아를 즉시 측정하였다.

[0197] WT, CO1, CO3, 및 CO6의 주사 4주 후에, 암모니아 수준은 생리학적 수준 미만으로 유의하게 감소되었다 (도 27, 표 26). 수컷 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 간을 단백질 발현, OTC 촉매 활성, 및 바이러스 게놈 카피수에 대해 분석하였다. WT C57Bl/6 마우스와 일치하게, CO3 및 CO6은, 바이러스 게놈 카피에 대해 정규화한 경우, 각각 트랜스진 발현의 4-배 및 6-배 증가를 매개하여, 형질도입 효율을 유의하게 개선시켰다 (도 28, 표 27-29). OTC 촉매 활성은 단백질 수준과 강한 상관관계를 나타내었다 (도 28).

[0198] 5.0E11개 vg/kg 용량을 주사한 반접합 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스를 상기 기재된 실험과 동일한 실험 근거에 따라 분석하였다. 주사 1일 전 및 바이러스 투여 후 2주마다 주기적으로 오로트산을 측정하였다. 마우스를 바이러스 투여 8주 후에 희생시키고, 간을 수집하여 OTC 단백질 발현, 촉매 활성 및 바이러스 게놈 카피수를 평가하였다. CO3을 주사한 마우스는 WT 처리한 동물과 비교하여 간 OTC 발현 및 촉매 활성에서 유의한 3-4배 증가를 가졌지만, 전체적인 바이러스 게놈 카피, 및 결과적으로, hOTC 발현 및 활성은 이전에 기재된 실험과 비교하여 중요하게 감소되었다 (도 29-30, 표 34-36). 오로트산 수준은 감소되었지만, 생리학적 정상 값에 도달하지 못했다 (도 30, 표 37-38).

[0199] 1.0E12개 vg/kg의 AAV8 용량을 주사한 반접합 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스를 8주 후에 희생시키고, 간을 수집하여 OTC

단백질 발현, OTC 촉매 활성 및 바이러스 게놈 카피수를 평가하였다. 이 실험은 WT 및 CO1 구축물과 비교할 때 단백질 발현 및 촉매 활성의 면에서 CO3의 개선된 효능을 확인시켜 주었다 (도 31, 표 39-41).

[0200] 2가지 용량 (5.0E11개 vg/kg 및 1.0E12개 vg/kg)으로 WT, CO1, 및 CO3 구축물을 주사한 이형접합 암컷 $OTC^{spf-ash}$ 마우스는 WT C57Bl/6 마우스 실험에서 이미 관찰된 바와 같이, 감소된 효율 및 증가된 가변성을 가졌다 (도 32, 표 42-43). 그러나, 1.0E12개 vg/kg 처리된 마우스의 간에서의 hOTC 단백질 정량화 및 활성 분석은 CO3 구축물을 가장 효율적인 구축물로서 확인시켜주었고, 이는 WT와 비교하여 최대 4-5배 증가된 효율 및 CO1에 비해 1.5-2-배 증가를 가졌다 (도 33, 표 44-46).

[0201] 이어서, CO21 구축물을 WT 및 CO3 구축물과 함께 병렬 비교 실험에서 1.0E12개 vg/kg의 초기 용량으로 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 평가하였다. 또한, 잠재적 임상 후보로서 CO21 구축물을 추가로 특징화하기 위해, 3가지 상이한 용량: 1.0E12개 vg/kg, 5.0E11개 vg/kg, 및 2.5E11개 vg/kg을 사용하여 CO21에 대한 용량 설정 연구를 수행하였다 (표 47-49). 용량 설정 실험을 WT 구축물과의 병렬 비교로 수행하였다.

[0202] 1.0E12개 vg/kg 용량을 주사한 $OTC^{spf-ash}$ 마우스의 분석은 모든 3종의 구축물이 OTC 표현형을 교정하여, 주사 2주 후에 소변 오로트산 농도를 생리학적 수준으로 감소시킬 수 있음을 나타내었다 (도 35, 표 53). 그러나, CO21이 최상의 동역학 및 효율을 입증하였고, 시간 경과에 따라 보다 안정한 감소를 나타내었다 (도 35). CO3 또는 CO21을 주사한 마우스의 간에서의 OTC 단백질 수준 및 촉매 활성 분석은 WT와 비교하여 대등한 개선을 나타내었다 (도 34, 표 50-52).

[0203] 중간 용량 (5.0E11개 vg/kg)을 주사한 $OTC^{spf-ash}$ 마우스로부터의 소변 오로트산의 분석은 오로트산 수준을 생리학적 범위로 감소시킴으로써 표현형을 교정하는데 있어서 CO21의 보다 강한 효능을 입증하였다. 반대로, 동일한 용량의 WT를 주사한 $OTC^{spf-ash}$ 마우스는, 오로트산이 생리학적 수준을 초과하여, 치료 효과 미만을 발생시킨다 (도 36, 37, 표 54-57). OTC 단백질 수준 및 촉매 활성 분석은 오로트산 측정치를 확인시켜 주었다. 실제로, CO21을 처리한 마우스는 OTC 표현형을 교정하는 것으로 보이는 4-배 더 높은 간 hOTC 발현을 가졌다 (도 36, 38, 표 55-57).

[0204] 마지막으로, 보다 낮은 용량 (2.5E11개 vg/kg)의 WT 및 CO21 (2.5E11개)을 주사한 $OTC^{spf-ash}$ 마우스는 부분적으로 교정되는 것으로 확인되었다. 소변 오로트산 그래프에 제시된 바와 같이, 비록 수준이 병리학적 역치 근처에서 변동하고 불안정하기는 하지만, 주사 2주 후에 오로트산의 유의한 감소가 관찰되었다 (도 40, 표 61). CO21은 WT보다 약 3-배 더 높은 hOTC 발현 효율을 유지하였다 (도 39, 표 58-60).

[0205] 종합하면, 이들 데이터는 CO21이 간에서 촉매 활성 hOTC를 발현하는데 있어서 WT보다 약 5-배 더 효율적이라는 것을 시사한다. 증가된 발현 효율로 인해, CO21은 5.0E11개 vg/kg의 용량에서 $OTC^{spf-ash}$ 표현형을 교정하기에 충분한 단백질을 제공하여 치료 효과를 제공한다 (도 41, 표 62). 5.0E11개 vg/kg은 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 OTC 단백질의 생리학적 수준을 회복시키고 소변 오로트산을 정상치로 감소시키기에 충분한 용량이다. 따라서, AAV8-hOTC-CO21 구축물은 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 OTC 결핍의 효율적이고 안전한 교정을 매개한다.

[0206] 실시예 6: 생체내 암모니아 챌린지

[0207] $OTC^{spf-ash}$ 마우스는 야생형 마우스와 비교하여 증가된 혈액 암모니아 수준을 갖는다. 혈액으로부터의 암모니아 (NH_4) 클리어런스의 효율을 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 암모니아 챌린지 실험으로 검사하였다. $OTC^{spf-ash}$ 마우스에게 단일 용량의 5.0E11개 vg/kg AAV8-hOTC-WT (WT) 또는 AAV8-hOTC-CO21 (CO21)을 주사하였다 (표 63). 주사 4 및 8주 후에, 마우스를 7.5 mmol/kg의 0.64M NH_4Cl 용액을 복강내로 주사하는 암모니아 챌린지 실험에 적용하였다. B6EiC3Sn-WT (WT-CH3) 마우스를 대조군으로서 사용하였다.

[0208] NH_4Cl 주사 20분 후에, 마우스를 행동 시험에 적용하여 암모니아 (NH_4) 위기를 평가하였다. 행동 스코어를 표 64의 스킴에 따라 각각의 마우스에게 할당하였다 (도 42, 44). 동물을 블라인드 터널 시험에 적용하여 운동실조를 측정하였다. 마우스 발을 비-독성 페인트에 담그고 (앞발에 대해 1개의 색상 및 뒷발에 대해 제2 색상), 마우스를 블라인드 터널 (10 cm 폭 x 50 cm 길이 x 10 cm 높이)의 한쪽 끝에 위치시켰다. 터널의 바닥을 백지로 라이닝하여 보행을 분석하였다. 소리에 대한 반응은 마우스를 100 db 벨로부터 1.5 미터 거리에 두고, 각각

5초 동안 벨을 3회 울린 후 행동을 관찰함으로써 결정하였다.

[0209] 행동 시험 후, 마우스로부터 혈액 50 μl를 수집하고, 상업용 키트 (암모니아 검정 키트, MAK310, 시그마)를 사용하여 암모니아를 측정하였다. 소변 오로트산을 또한 측정하였다.

[0210] 표 64: 행동 스코어링 척도.

카테고리	행동 설명	스코어
발작의 강도	발작 없음	2
	근간대성경련: 자발적 떨림	1
	긴장성-간대성 발작: 사지의 경직 신전	0
운동실조	정상 보행	2
	비정상 보행	1
	스스로 지지할 수 없음: 한쪽으로 누움	0
소리에 대한 반응	정상, 소리에 대해 반응 없음	3
	사지의 움찔수축	2
	점핑	1
	빈사 또는 한쪽으로 누움	0

[0211]

[0212] 주사 4주 후 암모니아 챌린지 실험은, wt 동물과 대등한 행동 시험 스코어 및 NH_4 수준 측정치에 의해 제시된 바와 같이, CO21이 $OTC^{spf-ash}$ 마우스를 암모니아 챌린지로부터 보호하는데 고도로 효율적임을 입증하였다 (도 42, 44, 표 65-69). 또한, 교정은, CO21 처리된 마우스가 여전히 NH_4로부터 보호되고 WT 동물과 대등할 때인 주사로부터 8주까지 유지되었다 (안정하였다) (도 42, 44). WT 구축물은 암모니아 클리어런스에서, 특히 제2 암모니아 챌린지 실험 동안 CO21보다 덜 효율적이었고 (도 44), 여기서 할당된 총 행동 스코어는 WT 동물에 할당된 스코어링된 것보다 약간 높았다. 모든 측정된 데이터는 OTC 단백질 발현 및 활성의 분자 분석과 일치한다 (도 42-44).

[0213] 실시예 7: 인핸서 서열의 결실은 생체내 AAV8-hOTC-CO21 안전성을 개선시킨다

[0214] AAV8-hOTC-CO21 구축물은 5' 및 3' 역전된 말단 반복부 (ITR)에 인접한 105개의 뉴클레오티드 (nt) 인핸서 서열을 함유한다. 인핸서 서열을 결실시켜 (AAV8-hOTC-Δ-CO21, 또한 AAV8-hOTC-Δenh-CO21로도 지칭됨) AAV8-hOTC-CO21 구축물의 생체내 안전성을 증가시켰다. 인간 간세포를 AAV8-hOTC-CO21 또는 AAV8-hOTC-Δ-CO21로 형질도입하였다. AAV8-hOTC-Δ-CO21은 AAV8-hOTC-CO21과 비교하여 증가된 단백질 수준 및 유사한 촉매 활성 수준을 나타내었다 (도 45).

[0215] $OTC^{spf-ash}$ 마우스에게 AAV8-hOTC-CO21 또는 AAV8-hOTC-Δ-CO21을 주사하였다. AAV8-hOTC-Δ-CO21 구축물은 소변 오로트산을 감소시켰고, AAV8-hOTC-CO21 구축물과 유사한 단백질 수준을 생산하였다 (도 46).

[0216] 실시예 8: 마우스에서의 면역원성의 감소

[0217] 소아과 환자는 유전자 요법에 대해 3가지 주요 도전과제를 제시한다: 환자가 성장함에 따른 시간 경과에 따른 벡터 손실, AAV의 투여는 환자를 재치료할 가능성을 제한하는 중화 항체의 생산을 유발함, 및 간 염증 및 트랜스진 발현의 손실로 이어지는 AAV에 대한 세포성 면역 반응.

[0218] 트랜스진 (예를 들어, 루시페라제, 알파-산 글루코시다제, 인자 IX 응고 인자)을 코딩하는 AAV8 구축물을 합성 나노입자의 존재 하에 WT C57BL/6 마우스 또는 비-인간 영장류 (마카카 파시쿨라리스) 내로 주사하여 AAV8-트랜스진 단백질에 대한 항체의 생성을 검사하였다.

[0219] 비-인간 영장류 실험을 위해, 중화 AAV8 항체의 결여에 기초하여 3마리의 수컷 시노몰구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스)를 선택하였다. 제0일에, 동물을 처리군으로 무작위화하고, 정맥내 주입 (30 ml/h의 SVP[Rapa] (3 mg/kg의 라파마이신, n=2 SVP[Rapa]#1 및 SVP[Rapa]#2 또는 SVP[공] (n=1)한 후, 즉시 AAV8-알파-산 글루코시다제 (AAV8-Gaa) 벡터 (2.0E12개 vg/kg)를 정맥내 주입하였다. 1개월 후, 각각의 동물에게 SVP[Rapa] (3

mg/kg의 라파마이신, n=2 SVP[Rapa]#1 및 SVP[Rapa]#2 또는 SVP[공] (n=1)을 두번째 주입한 후, 즉시 AAV8-인간 인자 IX 응고 인자 벡터 (AAV8-hFI.X) (2.0E12개 vg/kg)를 주입하였다.

[0220] 마우스 및 비-인간 영장류 실험에서, 말초 혈액을 수집하고, 기준선 및 지시된 시점에 혈청을 단리하거나 또는 시트레이트 또는 EDTA를 함유하는 튜브로 즉시 옮겨 혈장을 단리하였다. 부검 시 비장 및 서혜 림프절을 신선한 RPMI 배지에 수집하고, 다양한 기관을 수집하여 추가의 분석을 위해 -80℃에서 저장하였다.

[0221] 중합체 폴리락트산 (PLA) 및 폴리락트산-폴리에틸렌 글리콜 (PLA-PEG)로 구성된 합성 나노입자 (SVP)를 문헌 [Kishimoto, et al., 2016, Nat. Nanotechnology 및 Maldonado, et al., 2015, PNAS]에서와 같이 수중유 단일 에멀젼 증발 방법을 사용하여 합성하였다. 간략하게, 라파마이신, PLA, 및 PLA-PEG 블록 공중합체를 디클로로메탄 용액 중에 용해시켜 오일-상을 형성하였다. 오일-상을 포스페이트 완충제 중 폴리비닐알콜의 수용액에 첨가한 후, 초음파처리하였다. 이와 같이 형성된 에멀젼을 포스페이트 완충제 용액이 담긴 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여 디클로로메탄이 증발되도록 하였다. 라파마이신을 함유하는 생성된 나노입자를 76,6000xg + 4℃에서 원심분리에 의해 2회 세척하고, 펠릿을 포스페이트 완충제 용액 중에 재현탁시켰다. 라파마이신이 없는 무함유 나노입자를 라파마이신이 없는 동일한 조건에서 제조하였다.

[0222] 문헌 [Meliani, et al., 2018, Nature Communications, Mingozzi, et al., 2013, Sci. Transl. Med and Meliani, et al., 2017, Blood Adv.]에서와 같이 ELISA 및 시험관내 중화 검정을 사용하여 항체 측정 검정을 수행하였다. 간략하게, ELISA 검정의 경우, 눈크(Nunc)™ 맥시소르프(MaxiSorp)™ 플레이트 (써모 피셔 사이언티픽)를 AAV 입자 (2.0E12개 입자/mL) 및 정제된 이뮤노글로불린 (뮤린 샘플의 경우 IgG1, IgG2a, IgG2b, 및 IgG3; 비-인간 영장류 샘플의 경우 IgG 및 IgM)의 연속 희석물로 코팅하여 표준 곡선을 생성하였다. 4℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 플레이트를 2% 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS-0.05% 트윈-20으로 차단하고, 적절하게 희석된 샘플을 이중으로 플레이팅하였다. 샘플을 실온에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 플레이트를 세척하고, HRP에 접합된 2차 항체를 웰에 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 플레이트를 세척하고, 시그마패스트(SIGMAFAST)™ OPD 기질을 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 결합된 항체의 존재를 검출하였다.

[0223] 인간 F.IX 트랜스진의 혈장 수준을 본원에 기재된 ELISA 검정에서와 같이 측정하였다. 마우스 혈장에서의 hFI.X 항원 수준의 검출은 hF.IX에 대한 모노클로날 항체 (GAFIX-AP, 아피니티 바이올로지칼스(Affinity Biologicals))를 사용하여 수행하였다. 비-인간 영장류 샘플에서는, 항-hFIX 항체 (MA1-43012, 써모 피셔 사이언티픽) 및 항-hFiIX-HRP 항체 (CL20040APHP, 테부-바이오(Tebu-bio))를 각각 코팅 및 검출에 사용하였다.

[0224] 선택된 혈청 샘플을 또한 문헌 [Meliani, et al., 2015, Hum. Gene. Ther. Methods]에서와 같이 시험관내 세포-기반 시험을 사용하여 항-AAV 중화 항체 역가에 대해 분석하였다. 간략하게, 열-불활성화된 샘플의 연속 희석물을 루시페라제를 발현하는 벡터와 혼합하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 세포에 첨가하고, 잔류 루시페라제 발현을 24시간 후에 측정하였다. 중화 역가는 비-억제 대조군과 비교하여 루시페라제 발현의 적어도 50% 억제가 측정되는 최고 샘플 희석으로서 결정하였다. 본 검정에서, 1:10의 중화 항체 (Nab) 역가는, 10-배 희석 후 비-억제 대조군의 50% 미만의 잔류 루시페라제 신호가 관찰된 샘플의 역가를 나타낸다.

[0225] P30 어린 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에게 5.0E11개 vg/kg AAV8-hOTC-CO21 (CO21)을 주사하여 면역원성을 평가하였다. 소변 오로트산 및 중화 항체 (NAb)를 측정하였다 (도 47). AAV8-hOTC-CO21을 주사한 마우스에서의 소변 오로트산 농도는 주사 후 2주까지 감소하였지만, 후속적으로 증가하였다. 중화 항체는 또한 AAV8-hOTC-CO21을 주사한 $OTC^{spf-ash}$ 어린 마우스에서도 생성되었다. 본원에 제시된 결과는 시간 경과에 따라 벡터 손실이 발생하고, AAV의 투여가 중화 항체의 생산을 유발한다는 것을 입증한다. 이는 잠재적으로 환자를 재치료할 가능성을 제한하고, AAV에 대한 세포성 면역 반응으로 이어지며, 이는 간 염증 및 트랜스진 발현의 손실로 이어진다.

[0226] 면역억제제 라파마이신을 함유하는 합성 바이러스 입자 (SVP) 내에 AAV8 구축물을 패키징하여, 라파마이신 (rapa)이 면역원성을 생체내 억제하는 능력을 검사하였다. C57BL/6 마우스에게 4.0E12개 vg/kg AAV8-루시페라제 및 SVP[rapa] (8mg/kg) 또는 SVP[공]를 주사하였다. 21일 후, 마우스에게 4.0E12개 vg/kg AAV8-hFIX 및 SVP[rapa] (8mg/kg) 또는 SVP[공]를 주사하였다. 항-AAV8 IgG 및 hFIX의 수준을 마우스에서 측정하였다 (도 48). SVP[rapa]의 투여는 SVP[공] 또는 AAV8-hFIX 만을 투여한 마우스와 비교하여 항-AAV8 IgG 수준을 감소시켰다. SVP[rapa]를 투여한 마우스에서의 hFIX의 수준은 AAV8-hFIX 만을 투여한 마우스와 유사하였고, SVP[공]를 투여한 마우스에 비해 유의하게 증가되었다 (도 48).

[0227] 추가로 SVP[rapa] 또는 SVP[공] 내에 패키징된 AAV8 구축물의 면역원성을 비-인간 영장류 (마카카 파시쿨라리스)에서 검사하였다. 비-인간 영장류에게 2.0E12개 vg/kg AAV8-Gaa 및 3 mg/kg SVP[rapa] 또는 SVP[공]를 주사하였다. 30일 후에, 비-인간 영장류에게 2.0E12개 vg/kg AAV8-hFIX 및 3 mg/kg SVP[rapa] 또는 SVP[공]를 주사하였다. 항-AAV8 IgG 및 hFIX의 수준을 비-인간 영장류에서 측정하였다 (도 49). SVP[rapa]의 투여는 SVP[공]을 투여한 비-인간 영장류와 비교하여 항-AAV8 IgG 수준을 감소시켰다. SVP[rapa]를 투여한 비-인간 영장류에서의 hFIX의 수준은 SVP[공]를 투여한 비-인간 영장류에 비해 증가되었다. 본원에 제시된 결과는 AAV 벡터 및 합성 나노담체의 병용 투여가 트랜스진 발현을 증가시키고 AAV 벡터에 대한 면역 반응을 감소시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0228] 실시예 9. SVP-라파마이신은 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 AAV8-OTC CO21에 대한 항-AAV8 IgG 반응을 억제한다

[0229] 상이한 용량의 라파마이신에 커플링된 합성 나노담체 (SVP-라파마이신) 및 AAV8-OTC CO21 구축물이 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서 AAV8 IgG 반응에 미치는 효과를 검사하였다. $OTC^{spf-ash}$ 마우스에게 제0일에 하기와 같이 투여하였다: (1) AAV8-OTC CO21 단독 ("AAV"), (2) AAV8-OTC CO21 + 공 나노입자 대조군 ("AAV + NPc"), (3) AAV8-OTC CO21 + 4 mg/kg SVP-라파마이신 ("AAV + SVP4"), (4) AAV8-OTC CO21 + 8 mg/kg SVP-라파마이신 ("AAV + SVP8"), 또는 (5) AAV8-OTC CO21 + 12 mg/kg SVP-라파마이신 ("AAV + SVP12"). 항-AAV8 IgG 항체 반응을 투여 2주 후에 평가하였고, 결과를 도 50에 제시한다. 도면에 제시된 바와 같이, AAV9-OTC CO21 벡터 및 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 투여는 투여된 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 용량과 관계 없이 항-AAV8 IgG 반응을 억제하였다.

[0230] 실시예 10

[0231] 본 실시예에는 실시예 1-9에 기재된 표 3-69을 제시한다.

[0232] 표 3: 도 19의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
1	OTC-wt (1668)	A2901	0.03	0.74	100	41
		A2902	0.03	0.79		
		A2903	0.06	1.47		
2	OT-C01 (1669)	A2904	0.07	1.79	162	15
		A2905	0.06	1.60		
		A2906	0.06	1.48		
3	OTC-C02 (1692)	A2907	0.07	1.81	286	174
		A2908	0.19	4.87		
		A2909	0.07	1.91		
4	OTC-C03 (1678)	A2910	0.10	2.62	329	73
		A2911	0.15	4.06		
		A2912	0.12	3.18		
1	OTC-wt (1668)	A2901	0.05	0.67	100	38
		A2902	0.06	0.91		
		A2903	0.10	1.41		
5	OTC-C06 (1679)	A2913	0.04	0.61	269	186
		A2914	0.22	3.27		
		A2915	0.29	4.19		
6	OTC-C07 (1680)	A2916	0.06	0.83	43	35
		A2917	0.01	0.16		
		A2918	0.02	0.29		
7	OTC-C09 (1681)	A2919	0.04	0.61	36	27
		A2920	0.01	0.08		
		A2921	0.03	0.41		

[0233]

[0234] 표 4: 도 19의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	OTC 활성 (μmol 시트룰린/μg 용해물/30분)			개별 평균 ± SD	군 평균 ± SD
			Exp 1	Exp 2	Exp 3		
1	OTC-wt (1668)	A2901	45.36	112.6	88.6	82.2 ± 34.1	105.7±81.1
		A2902	29.32	69.0	18.5	38.9 ± 26.6	
		A2903	35.14	274.6	278.2	196.0 ± 139.3	
2	OT-C01 (1669)	A2904	77.44	116.9	218.2	137.5 ± 72.6	160.8±25.8
		A2905	135.76	139.1	290.7	188.5 ± 88.5	
		A2906	119.72	135.4	214.0	156.4± 50.5	
3	OTC-C02 (1692)	A2907	59.94	154.6	211.6	142.0 ± 76.6	165.5±36.0
		A2908	70.14	197.1	353.7	207.0 ± 142.0	
		A2909	81.8	117.4	243.4	147.5 ±84.9	
4	OTC-C03 (1678)	A2910	74.52	161.9	110.8	115.7 ± 43.9	250.5±119.2
		A2911	77.44	267.0	537.1	293.8 ± 231.0	
		A2912	164.92	306.1	554.9	342.0 ± 197.4	
5	OTC-C06 (1679)	A2913	182.42	161.2	311.7	218.4 ± 81.5	417.1±194.9
		A2914	115.34	386.1	773.5	425.0 ± 330.8	
		A2915	138.68	610.0	1075.3	608.0 ± 468.3	
6	OTC-C07 (1680)	A2916	204.3	156.0	235.2	198.5 ± 39.9	176.7±49.9
		A2917	147.42	200.2	288.5	212.0 ± 71.3	
		A2918	135.76	99.4	124.0	119.7 ± 18.6	
7	OTC-C09 (1681)	A2919	112.42	138.1	208.3	152.9 ± 49.6	136.4±19.9
		A2920	145.96	94.7	185.5	142.1 ± 45.5	
		A2921	131.38	85.9	125.7	114.3 ±24.8	
8	비처리	A2922	7.88	55.36	55.4	39.5 ± 27.4	41.2±2.4
		A2923	10.11	62.43	56.1	42.9 ± 28.6	

[0235]

[0236] 표 5: 도 19의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
			Exp 1	Exp 2		
1	OTC-wt (1668)	A2901	20.7	18.6	19.6	16.9±3.3
		A2902	24.5	11.4	17.9	
		A2903	9.7	16.9	13.3	
2	OT-C01 (1669)	A2904	39.6	16.9	28.2	28.7±1.6
		A2905	25.1	29.6	27.4	
		A2906	40.9	20.1	30.5	
3	OTC-C02 (1692)	A2907	16.7	13.8	15.2	17.0±10.5
		A2908	8.8	6.2	7.5	
		A2909	29.4	27.1	28.2	
4	OTC-C03 (1678)	A2910	16.6	18.5	17.5	14.8±3.2
		A2911	13.4	9.0	11.2	
		A2912	20.0	11.3	15.6	
5	OTC-C06 (1679)	A2913	56.7	30.9	43.8	20.2±20.5
		A2914	11.0	9.0	10.0	
		A2915	7.6	6.1	6.8	
6	OTC-C07 (1680)	A2916	39.5	43.0	41.3	53.3±31.6
		A2917	28.6	30.3	29.5	
		A2918	88.6	89.7	89.1	
7	OTC-C09 (1681)	A2919	52.4	45.3	48.8	56.4±8.3
		A2920	64.3	46.0	55.1	
		A2921	75.4	55.0	65.2	

[0237]

[0238] 표 6: 도 20의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
1	OTC-wt (1668)	A2901	0.48	0.67	100	43
		A2902	0.61	0.85		
		A2903	1.07	1.48		
2	OT-C01 (1669)	A2904	0.99	1.37	125	12
		A2905	0.90	1.24		
		A2906	0.82	1.13		
4	OTC-C03 (1678)	A2910	1.34	1.85	254	61
		A2911	2.04	2.81		
		A2912	2.15	2.97		
5	OTC-C06 (1679)	A2913	0.71	0.97	365	243
		A2914	3.09	4.27		
		A2915	4.13	5.71		

[0239]

[0240] 표 7: 도 21의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
9	OTC-wt (1668)	A3215	0.30	96%	100%	39
		A3216	0.19	63%		
		A3217	0.43	141%		
10	OT-C01 (1669)	A3218	0.29	96%	131%	31
		A3219	0.45	148%		
		A3220	0.46	150%		
11	OTC-C02 (1692)	A3221	0.41	133%	94%	35
		A3222	0.20	66%		
		A3223	0.25	81%		
12	OTC-C03 (1678)	A3224	0.26	86%	105%	41
		A3225	0.46	151%		
		A3226	0.23	76%		
9	OTC-wt (1668)	A3215	0.36	100%	100%	18
		A3216	0.30	82%		
		A3217	0.43	118%		
13	OTC-C06 (1679)	A3227	0.64	175%	222%	63
		A3228	0.72	196%		
		A3229	1.07	293%		
14	OTC-C07 (1680)	A3230	0.15	42%	58%	17
		A3231	0.28	76%		
		A3232	0.20	55%		
15	OTC-C09 (1681)	A3233	0.25	69%	146%	108
		A3234	0.81	223%		
		A3235				

[0241]

[0242] 표 8: 도 21의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	OTC 활성 (μmol 시트룰린/μg 용해물/30분)			평균	평균 ± SD
			Exp. 1	Exp. 1	Exp. 3		
9	OTC-wt (1668)	A3215	128.7	143.0	92.9	121.6	94.1± 27.4
		A3216	113.4	101.1	67.3	93.9	
		A3217	85.9	21.0	93.7	66.9	
10	OT-C01 (1669)	A3218	67.7	311.0	114.8	164.5	138.8±29
		A3219	94.6	95.1	133.2	107.6	
		A3220	113.9	157.5	161.9	144.4	
11	OTC-C02 (1692)	A3221	69.0	53.0	70.8	64.3	74.2±30
		A3222	49.2	52.9	49.2	50.4	
		A3223	93.5	130.0	100.2	107.9	
12	OTC-C03 (1678)	A3224	122.5	84.3	150.4	119.1	123.1± 15.2
		A3225	105.5	92.4	133.0	110.3	
		A3226	85.7	181.3	152.7	139.9	
13	OTC-C06 (1679)	A3227	164.0	93.2	197.6	151.6	305.5±19 8.6
		A3228	232.3	226.9	246.7	235.3	
		A3229	491.3	596.9	500.8	529.7	
14	OTC-C07 (1680)	A3230	54.7	41.4	95.8	64.0	93.9± 30.2
		A3231	116.1	62.4	101.7	93.4	
		A3232	85.5	162.4	125.1	124.4	
15	OTC-C09 (1681)	A3233	129.1	143.1	104.2	125.5	108±24.9
		A3234	153.1	31.4	86.5	90.3	
		A3235					
16	비처리	A3236	55.1	88.4	57.5	67.0	62.9±6.8
		A3237	55.8	62.3	46.9	55.0	
		A3238	55.6	91.2	53.4	66.7	

[0243]

[0244] 표 9: 도 21의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
9	OTC-wt (1668)	A3215	1.61	1.85	1.73	2.7±1.1
		A3216	1.98	2.94	2.46	
		A3217	3.15	4.68	3.92	
10	OT-C01 (1669)	A3218	3.58	3.60	3.59	2.3±1.4
		A3219	0.73	0.94	0.84	
		A3220	2.21	2.84	2.52	
11	OTC-C02 (1692)	A3221	2.16	2.86	2.51	5.4±2.5
		A3222	6.34	7.78	7.06	
		A3223	5.23	8.13	6.68	
12	OTC-C03 (1678)	A3224	6.92	12.57	9.74	7.6±3.4
		A3225	3.21	4.14	3.67	
		A3226	9.13	9.75	9.44	
13	OTC-C06 (1679)	A3227	1.91	2.03	1.97	1.7±1.2
		A3228	2.02	3.45	2.73	
		A3229	0.24	0.41	0.32	
14	OTC-C07 (1680)	A3230	14.28	20.16	17.22	11.8±5.4
		A3231	5.16	7.56	6.36	
		A3232	9.27	14.12	11.69	
15	OTC-C09 (1681)	A3233	5.97	6.40	6.18	2.9±3.1
		A3234	1.81	2.86	2.34	
		A3235	0.09	0.21	0.15	

[0245]

[0246] 표 10: 도 22의 웨스턴 블롯 정량화.

군 암컷	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
1	OTC-wt (1668)	A2929	0.11	195%	100%	86
		A2930	0.01	27%		
		A2931	0.04	78%		
2	OT-C01 (1669)	A2932	0.10	193%	191%	112
		A2933	0.04	77%		
		A2934	0.16	302%		
3	OTC-C02 (1692)	A2935	0.08	142%	122%	51
		A2936	0.03	64%		
		A2937	0.09	160%		
4	OTC-C03 (1678)	A2938	0.13	242%	190%	75
		A2939	0.07	137%		
		A2940				
1	OTC-wt (1668)	A2929	0.11	159%	100%	59
		A2930	0.03	41%		
		A2931	0.07	100%		
5	OTC-C06 (1679)	A2941	0.10	145%	103%	37
		A2942	0.06	90%		
		A2943	0.05	75%		
6	OTC-C07 (1680)	A2944	0.26	375%	261%	100
		A2945	0.15	213%		
		A2946	0.13	193%		
7	OTC-C09 (1681)	A2947	0.05	71%	107%	54
		A2948	0.12	169%		
		A2949	0.06	81%		

[0247]

[0248] 표 11: 도 22의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 암컷	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	OTC 활성 (μmol 시트룰린/μg 용해물/30분)			개별 평균 ± SD	군 평균 ± SD
			Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
1	OTC-wt (1668)	A2929	29.39	28.1	17.2	24.9 ± 6.7	16.3±8.2
		A2930	8.41	3.4	13.7	8.5 ± 5.2	
		A2931	14.29	9.9	22.2	15.5 ± 6.2	
2	OT-C01 (1669)	A2932	49.04	29.2	48.2	42.1 ± 11.2	33.6±21
		A2933	11.20	11.3	6.8	9.8 ± 2.6	
		A2934	60.23	56.1	30.7	49.0 ± 16.0	
3	OTC-C02 (1692)	A2935	38.60	20.6	32.7	30.6 ± 9.2	26.4±10.5
		A2936	14.27	9.2	20.0	14.5 ± 5.4	
		A2937	36.94	26.4	39.0	34.1 ± 6.8	
4	OTC-C03 (1678)	A2938	59.79	24.4	43.4	42.5 ± 17.7	35.3±10.2
		A2939	41.05	19.7	23.7	28.2 ± 11.3	
		A2940					
5	OTC-C06 (1679)	A2941	24.92	19.9	20.7	21.8 ± 2.7	16.3±4.8
		A2942	14.18	11.9	14.8	13.6 ± 1.5	
		A2943	12.54	12.1	15.9	13.5 ± 2.1	
6	OTC-C07 (1680)	A2944	76.87	32.5	93.2	67.5 ± 31.4	41.8±23.3
		A2945	40.60	30.1	36.7	35.8 ± 5.3	
		A2946	23.97	21.8	20.2	22.0 ± 1.9	
7	OTC-C09 (1681)	A2947	16.72	8.4	8.6	11.2 ± 4.7	28.1±30.7
		A2948	79.82	38.3	72.3	63.5 ± 22.1	
		A2949	23.23	4.8	0.5	9.5 ± 12.1	
8	비처리	A2950	29.39	7.8	13.3	16.8 ± 11.2	10.8±3.7
		A2951	8.41	13.7	4.2	8.8 ± 4.8	

[0249]

[0250] 표 12: 도 22의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 암컷	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
1	OTC-wt (1668)	A2929	4.2	4.39	4.3	17.2±15.3
		A2930	31.4	36.85	34.1	
		A2931	12.6	13.90	13.3	
2	OT-C01 (1669)	A2932	6.6	9.82	8.2	12±7.9
		A2933	22.0	20.05	21.0	
		A2934	6.9	6.49	6.7	
3	OTC-C02 (1692)	A2935	15.5	14.42	15.0	21.3±15.3
		A2936	27.4	50.22	38.8	
		A2937	9.0	11.37	10.2	
4	OTC-C03 (1678)	A2938	10.1	9.10	9.6	8.5±7.7
		A2939	17.3	13.93	15.6	
		A2940	0.2	0.59	0.4	
5	OTC-C06 (1679)	A2941	28.3	21.11	24.7	31.1±7.4
		A2942	36.7	41.63	39.2	
		A2943	32.9	26.11	29.5	
6	OTC-C07 (1680)	A2944	6.2	9.74	7.9	16.8±8.7
		A2945	15.9	18.54	17.2	
		A2946	27.6	23.05	25.3	
7	OTC-C09 (1681)	A2947	45.4	36.86	41.1	22.2±17.3
		A2948	7.2	7.39	7.3	
		A2949	17.3	18.89	18.1	

[0251]

[0252] 표 13: 실험 1 - 고용량 - 수컷.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/ 마우스	µl 바이러스	PBS
1	OTC-wt (1668)	제1 제조	A2901	5.0E12	23.5	1.15E11	90.4	
			A2902	5.0E12	23.6	1.18E11	90.8	
			A2903	5.0E12	25.4	1.27E11	97.7	
2	OT-C01 (1669)	제1 제조	A2904	5.0E12	22.4	1.12E11	70	20
			A2904	5.0E12	22.4	1.12E11	70	20
			A2906	5.0E12	22.5	1.12E11	70.3	19.7
3	OTC-C02 (1692)	제1 제조	A2907	5.0E12	26	1.13E11	17.8	72.2
			A2908	5.0E12	22.3	1.15E11	15.3	74.7
			A2909	5.0E12	21	1.05E11	14.4	75.6
4	OTC-C03 (1678)	제1 제조	A2910	5.0E12	26.3	1.35E11	18.8	71.2
			A2911	5.0E12	26.1	1.35E11	18.6	71.4
			A2912	5.0E12	22.9	1.35E11	16.4	73.6
5	OTC-C06 (1679)	제1 제조	A2913	5.0E12	23	1.15E11	31.9	58
			A2914	5.0E12	26.8	1.34E11	37.2	52.8
			A2915	5.0E12	22.3	1.15E11	31	59
6	OTC-C07 (1680)	제1 제조	A2916	5.0E12	25	1.25E11	11.4	78.6
			A2917	5.0E12	23.8	1.19E11	10.8	79.2
			A2918	5.0E12	25.8	1.29E11	11.7	78.3
7	OTC-C09 (1681)	제1 제조	A2919	5.0E12	25.3	1.25E11	17.1	72.9
			A2920	5.0E12	25.8	1.29E11	17.4	72.6
			A2921	5.0E12	22.1	1.15E11	14.9	75
8	처리 없음		A2922		23.4			90
			A2923		23.8			90
			A2924		20.6			90

[0253]

[0254] 표 14: 실험 1 - 고용량 - 암컷.

군 (암컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마우스	µl 바이러스	PBS
1	OTC-wt (1668)	제1 제조	A2929	5.0E12	18	9.0E10	69.2	20.7
			A2930	5.0E12	16.7	8.35E10	64.2	25.8
			A2931	5.0E12	18.8	9.4E10	72.3	17.7
2	OT-C01 (1669)	제1 제조	A2932	5.0E12	19.3	9.65E10	60.3	30
			A2933	5.0E12	16	8.0E10	50	40
			A2934	5.0E12	16.5	8.25E10	51.6	38
3	OTC-C02 (1692)	제1 제조	A2935	5.0E12	18	9E10	12.3	77.7
			A2936	5.0E12	17.9	8.95E10	12.3	77.7
			A2937	5.0E12	17	8.5E10	11.6	78
4	OTC-C03 (1678)	제1 제조	A2938	5.0E12	18.1	9.05E10	12.9	77
			A2939	5.0E12	17.4	8.7E10	12.4	77.5
			A2940	5.0E12	10.2	5.1E10	7.3	83
5	OTC-C06 (1679)	제1 제조	A2941	5.0E12	17.2	8.6E10	23.9	66
			A2942	5.0E12	18.4	9.2E10	25.6	64
			A2943	5.0E12	19	9.5E10	26.4	64
6	OTC-C07 (1680)	제1 제조	A2944	5.0E12	17.3	8.65E10	7.8	82
			A2945	5.0E12	17.1	8.55E10	7.7	82
			A2946	5.0E12	15.9	7.95E10	7.2	78
7	OTC-C09 (1681)	제1 제조	A2947	5.0E12	17	8.5E10	11.5	78
			A2948	5.0E12	18.1	9.05E10	12.2	72.6
			A2949	5.0E12	17.7	8.85E10	12	75
8	처리 없음		A2950		17.1			90
			A2951		16.3			90
			A2952		18.7			90

[0255]

[0256] 표 15: 실험 1 - 저용량 - 암컷.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마우스	µl 바이러스	PBS
9	OTC-wt (1668)	제1 제조	A3215	1.25E+12	31	3.88 E+11	29.8	60.2
			A3216	1.25E+12	30	3.7E+11	28.8	61.2
			A3217	1.25E+12	29	3.6E+11	27.9	62.1
10	OT-C01 (1669)	제1 제조	A3218	1.25E+12	28	3.5E+11	21.9	68.1
			A3219	1.25E+12	31	3.8E+11	24.2	65.8
			A3220	1.25E+12	30	3.75E+11	23.4	66.6
11	OTC-C02 (1692)	제1 제조	A3221	1.25E+12	31	3.8E+11	5.3	84.7
			A3222	1.25E+12	32	4.0E+11	5.5	84.5
			A3223	1.25E+12	30.5	3.8E+11	5.2	84.8
12	OTC-C03 (1678)	제1 제조	A3224	1.25E+12	28	3.5E+11	5	85
			A3225	1.25E+12	27	3.4E+11	4.8	85.2
			A3226	1.25E+12	30	3.7E+11	5.4	84.6
13	OTC-C06 (1679)	제1 제조	A3227	1.25E+12	30	3.7E+11	10.4	79.6
			A3228	1.25E+12	29.5	3.7E+11	10.2	79.8
			A3229	1.25E+12	30	3.75E+11	10.4	79.6
14	OTC-C07 (1680)	제1 제조	A3230	1.25E+12	29	3.7E+11	3.3	86.7
			A3231	1.25E+12	32	4.0E+11	3.6	86.4
			A3232	1.25E+12	30	3.75E+11	3.4	86.6
15	OTC-C09 (1681)	제1 제조	A3233	1.25E+12	30	3.75E+11	5	84.9
			A3234	1.25E+12	30	3.75E+11	5	84.9
			A3235	1.25E+12	29	3.63E+11	4.9	85.1
16	처리 없음		A3236	1.25E+12	28			90
			A3237	1.25E+12	32			90
			A3238	1.25E+12	29			90

[0257]

[0258] 표 16: 실험군 및 용량-제2 제조.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마우스	µl 바이러스	PBS
17	OTC-wt (16137)	제2 제조	A3250	1.25E+12	29	3.63E+10	3	47
			A3251	1.25E+12	32	4.00E+10	3.3	46.7
			A3252	1.25E+12	31	3.88E+10	3.2	46.8
18	OT-C01 (16138)	제2 제조	A3253	1.25E+12	34	4.25E+10	4.4	45.6
			A3254	1.25E+12	31.5	3.94E+10	4.1	45.9
			A3255	1.25E+12	34	4.25E+10	4.4	45.6
19	OTC-C03 (16139)	제2 제조	A3256	1.25E+12	25	3.13E+10	4.7	45.3
			A3257	1.25E+12	30	3.75E+10	5.7	44.3
			A3258	1.25E+12	30	3.75E+10	5.7	44.3
20	OTC-C06 (16140)	제2 제조	A3259	1.25E+12	40	5.00E+10	6.9	43.1
			A3260	1.25E+12	30	3.75E+10	5.2	44.8
			A3261	1.25E+12	30	3.75E+10	5.2	44.8
21	처리 없음		A3262	1.25E+12	36			50
			A3263	1.25E+12	36			50

[0259]

[0260] 표 17: 도 24의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
17	OTC-wt (16137)	A3250	0.07	87%	100%	31%
		A3251	0.06	79%		
		A3252	0.10	135%		
18	OT-C01 (16138)	A3253	0.19	253%	253%	78%
		A3254	0.16	206%		
		A3255	0.28	359%		
19	OTC-C03 (16139)	A3256	0.64	836%	459%	329%
		A3257	0.24	314%		
		A3258	0.17	227%		
20	OTC-C06 (16140)	A3259	0.27	345%	451%	150%
		A3260	0.43	557%		
		A3261	0.04			

[0261]

[0262] 표 18: 도 24의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	OTC ACTIVITY (μmol 시트룰린/μg 용해물/30분)		배수 변화/ wtOTC/vg	평균 ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
17	OTC-wt (16137)	A3250	44.1	43.4	68%	100 ± 33
		A3251	28.8	31.5	99%	
		A3252	52.1	44.2	133%	
18	OT-C01 (16138)	A3253	105.6	46.4	115%	86 ± 27
		A3254	95.4	38.1	82%	
		A3255	88.8	32.1	62%	
19	OTC-C03 (16139)	A3256				229 ± 67
		A3257	158.2	58.6	276%	
		A3258	132.7	58.5	181%	
20	OTC-C06 (16140)	A3259	96.4	34.7	74%	204 ± 145
		A3260	214.6	76.2	360%	
		A3261	162.2	52.8	179%	
21	처리 없음	A3262	28.9	16.4		
		A3263	32.7	24.4		

[0263]

[0264] 표 19: 도 24의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
17	OTC-wt (16137)	A3250	10.2	10.71	10.5	7.1 ± 3.0
		A3251	5.7	4.36	5.0	
		A3252	5.8	6.01	5.9	
18	OT-C01 (16138)	A3253	11.7	9.99	10.8	13.4 ± 2.6
		A3254	14.1	12.54	13.3	
		A3255	16.3	15.81	16.0	
19	OTC-C03 (16139)	A3256	1.4	1.27	1.4	5.5 ± 3.7
		A3257	6.9	6.03	6.4	
		A3258	9.4	7.85	8.6	
20	OTC-C06 (16140)	A3259	16.1	12.84	14.5	10.3 ± 4.0
		A3260	7.4	5.77	6.6	
		A3261	10.6	9.08	9.8	

[0265]

[0266] 표 20: 실험군 및 용량 - C01, C03, C021.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (g)	Vg/ 마우스	µl 바이러스	PBS
22	OTCwt (16137)	제2 제조	A4723	1.25E+12	25	3.13E+10	2.31	47.69
			A4724	1.25E+12	27	3.38E+10	2.50	47.50
			A4709	1.25E+12	29	3.63E+10	2.69	47.31
			A4710	1.25E+12	28	3.50E+10	2.59	47.41
23	OTC1 (16138)	제2 제조	A4711	1.25E+12	28	3.50E+10	3.10	46.90
			A4712	1.25E+12	27	3.38E+10	2.99	47.01
			A4713	1.25E+12	28	3.50E+10	3.10	46.90
			A4722	1.25E+12	25	3.13E+10	2.77	47.23
24	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4715	1.25E+12	30	3.75E+10	5.24	44.76
			A4716	1.25E+12	25	3.13E+10	4.37	45.63
			A4717	1.25E+12	26	3.25E+10	4.55	45.45
			A4720	1.25E+12	23	2.88E+10	4.02	45.98
25	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4719	1.25E+12	26	3.25E+10	19.12	30.88
			A4721	1.25E+12	25	3.13E+10	18.38	31.62
			A4718	1.25E+12	25	3.13E+10	18.38	31.62
			A4708	1.25E+12	30	3.75E+10	22.06	27.94
26	처리 없음		A4726					
			A4727					

[0267]

[0268] 표 21: 도 25의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
22	OTCwt (16137)	A4723	0.016	103%	100%	42
		A4724	0.021	140%		
		A4709	0.009	57%		
23	OTC1 (16138)	A4711	0.045	296%	345%	60
		A4712	0.050	327%		
		A4713	0.063	412%		
24	OTC 3 (16139)	A4715	0.051	330%	359%	75
		A4716	0.068	444%		
		A4717	0.046	303%		
25	OTC 21 (17115)	A4719	0.078	505%	561%	56
		A4721	0.086	562%		
		A4718	0.095	616%		

[0269]

[0270] 표 22: 도 25의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	OD 490nm / vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
22	OTCwt (16137)	제2 제조	A4723	0.0153	129%	100 ± 20
			A4724	0.0112	94%	
			A4709	0.0102	86%	
			A4710	0.0106	90%	
23	OTC1 (16138)	제2 제조	A4711	0.0343	290%	341 ± 37
			A4712	0.0439	371%	
			A4713	0.0400	338%	
			A4722	0.0431	365%	
24	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4715	0.0537	454%	477 ± 59
			A4716	0.0565	478%	
			A4717	0.0493	417%	
			A4720	0.0658	557%	
25	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4719	0.0733	620%	618 ± 8
			A4721	0.0721	610%	
			A4718	0.0742	627%	
			A4708	0.0727	615%	

[0271]

[0272] 표 23: 도 25의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
				Exp. 1	Exp. 2		
22	OTCwt (16137)	제2 제조	A4723	20.3	23.4	21.9	25±7.8
			A4724	16.0	15.4	15.7	
			A4709	36.3	30.5	33.4	
			A4710	31.1	27.0	29.1	
23	OTC1 (16138)	제2 제조	A4711	21.5	26.6	24.1	22.6±3.8
			A4712	26.3	28.2	27.2	
			A4713	16.7	20.4	18.6	
			A4722	20.0	21.1	20.5	
24	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4715	31.1	31.1	31.1	23.9±6.5
			A4716	17.8	19.9	18.9	
			A4717	23.5	31.6	27.6	
			A4720	17.5	18.4	18.0	
25	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4719	13.7			18.1±4.8
			A4721	24.6			
			A4718	18.7			
			A4708	15.4			

[0273]

[0274] 표 24: 실험군 및 용량 - OTC$^{spf-ash}$ 파일럿 연구.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/ Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/ 마우스	µl 바이러스	PBS
27	OTCwt (16137)	제2 제조	A3633	5.0E +11	23.4	1.17E+ 10	9.00	41.00
			A3635	5.0E +11	25.5	1.28E+ 10	9.81	40.19
			A3636	5.0E +11	26.7	1.34E+ 10	10.27	39.73
			A3637	5.0E +11	28.7	1.44E+ 10	11.04	38.96
28	OTC1 (16138)	제2 제조	A3638	5.0E +11	28	1.40E+ 10	8.75	41.25
			A3640	5.0E +11	19.4	9.70E+ 09	6.06	43.94
			A3641	5.0E +11	26.8	1.34E+ 10	8.37	41.63
			A3642	5.0E +11	22	1.10E+ 10	6.87	43.13
29	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3643	5.0E +11	25	1.25E+ 10	1.79	48.21
			A3644	5.0E +11	23.3	1.17E+ 10	1.66	48.34
			A3645	5.0E +11	15	7.50E+ 09	1.07	48.93
			A3646	5.0E +11	17.1	8.55E+ 09	1.22	48.78
30	OTC 6 (17115)	제2 제조	A3647	5.0E +11	22.7	1.14E+ 10	3.15	46.85
			A3648	5.0E +11	21.4	1.07E+ 10	2.97	47.03
			A3657	5.0E +11	20.9	1.05E+ 10	2.90	47.10
			A3658	5.0E +11	22.4	9.50E+ 09	2.64	47.36
31	처리 없음		A3649					
			A3650					

[0275]

[0276] 표 25: 도 26의 $OTC^{spf-ash}$ 수컷 마우스에서의 소변 오로트산 측정치.

군	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	μmol 오로트산/mmol 크레아티닌				
			T0	T2 주	T4 주	T6 주	T8 주
27	OTCwt (16137)	A3633	530.6	-23.8	99.0	12.1	28.77
		A3635	1790.7	747.7	439.2	569.2	123.82
		A3636	84.6	62.8	94.4	328.8	87.54
		A3637	67.7	17.4	60.7	7.0	76.32
28	OTC1 (16138)	A3638	346.6	-12.6	44.4	11.2	43.25
		A3640	340.8	208.3	32.1	32.4	33.2
		A3641					
		A3642	240.8	6.0	215.1	5.0	28.81
29	OTC 3 (16139)	A3643	687.4	118.2	226.2	173.4	76.66
		A3644	77.6	566.5	305.9	6	52.55
		A3645	1247.8	423.7	5.0	167.9	59.43
		A3646	492.7	18.6	21.0	53.2	56.2
30	OTC 6 (17115)	A3647	273.4	519.6	183.2	134.7	173.62
		A3648	223.4	103.3	296.4	75.5	63.47
		A3657	657.9	425.8	76.1	18	69.75
		A3658	354.6	712.7	760.4	50.3	49.66
31	untr	A3649	1200.0	523.8	757.4	573.5	481.42
		A3650	670.0	577.6	991.5	500	703.48

[0277]

[0278] 표 26: 도 27의 OTC$^{spf-ash}$ 수컷 마우스에서의 혈장 암모니아 수준.

군	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	mmol NH_4			
			T0		T4 주	
27	OTCwt (16137)	A3633	2.42	2.25 ± 0.21	0.79	0.72 ± 0.05
		A3635	2.03		0.71	
		A3636	2.44		0.71	
		A3637	2.1		0.68	
28	OTC1 (16138)	A3638	2.56	2.31 ± 0.24	1.25	1.02 ± 0.19
		A3640	2.01		1.07	
		A3641	2.25		0.79	
		A3642	2.41		0.96	
29	OTC 3 (16139)	A3643	3.07	2.92 ± 0.53	0.68	0.72 ± 0.11
		A3644	3.09		0.82	
		A3645	3.37		0.79	
		A3646	2.16		0.57	
30	OTC 6 (17115)	A3647	2.26	2.60 ± 0.60	0.75	0.74 ± 0.04
		A3648	1.93		0.79	
		A3657	2.97		0.71	
		A3658	3.22		0.71	
31	비처리		3.26	2.93 ± 0.47	3.93	3.76 ± 0.24
			2.59		3.59	
	WT		1.82	1.84 ± 0.02	1.89	1.78 ± 0.30
			1.85		1.46	

[0279]

[0280] 표 27: 도 28의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/ Kg	밴드 강도 OTC/ 튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 vs.OTC-wt	평균 ± SD
27	OTCwt (16137)	제2 제조	A3633	5.0E +11	1.813	94%	100 ± 28
			A3635	5.0E +11	2.041	105%	
			A3636	5.0E +11	2.598	134%	
			A3637	5.0E +11	1.287	67%	
28	OTC1 (16138)	제2 제조	A3638	5.0E +11	5.175	267%	191 ± 117
			A3640	5.0E +11	4.822	249%	
			A3641	5.0E +11			
			A3642	5.0E +11	1.093	57%	
29	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3643	5.0E +11	7.186	349%	357 ± 143
			A3644	5.0E +11	5.176	264%	
			A3645	5.0E +11	14.581	561%	
			A3646	5.0E +11	3.411	254%	
27	OTCwt (16137)	제2 제조	A3633	5.0E +11	2.244	105%	100 ± 26
			A3635	5.0E +11	2.237	105%	
			A3636	5.0E	2.697	126%	

[0281]

				+11			
			A3637	5.0E +11	1.374	64%	
29	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3643	5.0E +11	7.186	336%	355 ± 230
			A3644	5.0E +11	5.176	242%	
			A3645	5.0E +11	14.581	682%	
			A3646	5.0E +11	3.411	160%	
30	OTC 6 (17115)	제2 제조	A3647	5.0E +11	19.657	919%	512 ± 298
			A3648	5.0E +11	5.335	250%	
			A3657	5.0E +11	7.201	337%	
			A3658	5.0E +11	11.615	543%	

[0282]

[0283] 표 28: 도 28의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	평균 ± SD	OD 490 nm / vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
27	OTCwt (16137)	제2 제조	A4723	85.9	37.2 ± 32.7	0.03	139%	100 ± 20
			A4724	18.2		0.02	70%	
			A4709	17.9		0.03	130%	
			A4710	26.6		0.01	61%	
28	OTC1 (16138)	제2 제조	A4711	62.8	94.8 ± 107.2	0.09	372%	236 ± 37
			A4712	52.0		0.05	191%	
			A4713	12.2		0.08		
			A4722	252.3		0.04	146%	
29	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4715	70.3	79.9 ± 65.1	0.12	486%	365 ± 59
			A4716	46.3		0.06	239%	
			A4717	28.7		0.07	270%	
			A4720	174.1		0.11	465%	
30	OTC 6 (17115)	제2 제조	A4719	92.5	143.3 ± 57.1	0.30		802 ± 79
			A4721	218.4		0.23	934%	
			A4718	156.1		0.15	624%	
			A4708	106.0		0.21	847%	

[0284]

[0285] 표 29: 도 28의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포	평균 ± SD
27	OTCwt (16137)	제2 제조	A4723	1.07	0.5 ± 0.4
			A4724	0.30	
			A4709	0.15	
			A4710	0.58	
28	OTC 1 (16138)	제2 제조	A4711	0.30	1.0 ± 1.6
			A4712	0.45	
			A4713	0.03	
			A4722	3.39	
29	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4715	0.23	0.3 ± 0.3
			A4716	0.26	
			A4717	0.14	
			A4720	0.72	
30	OTC 6 (17115)	제2 제조	A4719	0.14	0.3 ± 0.2
			A4721	0.44	
			A4718	0.47	
			A4708	0.21	

[0286]

[0287] 표 30: 실험군 및 용량 - OTC$^{spf-ash}$ 수컷-중간 용량.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/ Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/ 마우스	µl 바이러스	PBS
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3917	5.0E +11	20	1.00E +10	0.83	49.17
			A3918	5.0E +11	20	1.00E +10	0.83	49.17
			A3919	5.0E +11	22	1.10E +10	0.92	49.08
			A3920	5.0E +11	22	1.10E +10	0.92	49.08
			A3921	5.0E +11	20	1.00E +10	0.83	49.17
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3922	5.0E +11	14	7.00E +09	0.73	49.27
			A3923	5.0E +11	19	9.50E +09	0.99	49.01
			A3924	5.0E +11	22	1.10E +10	1.15	48.85
			A3925	5.0E +11	22	1.10E +10	1.15	48.85
			A3926	5.0E +11	22	1.10E +10	1.15	48.85
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3927	5.0E +11	20	1.00E +10	1.52	48.48
			A3930	5.0E +11	20	1.00E +10	1.52	48.48
			A3931	5.0E +11	16	8.00E +09	1.21	48.79
			A3932	5.0E +11	18	9.00E +09	1.36	48.64
			A3933	5.0E +11	19	9.50E +09	1.44	48.56

[0288]

[0289] 표 31: 실험군 및 용량 - OTC$^{spf-ash}$ 수컷-고용량.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/ Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마우스	µl 바이러스	PBS
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3937	1.0E +12	22	2.20E +10	1.83	48.17
			A3938	1.0E +12	22	2.20E +10	1.83	48.17
			A3939	1.0E +12	22	2.20E +10	1.83	48.17
			A3940	1.0E +12	19	1.90E +10	1.58	48.42
			A3941	1.0E +12	19	1.90E +10	1.58	48.42
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3976	1.0E +12	20	2.00E +10	2.08	47.92
			A3977	1.0E +12	23	2.30E +10	2.40	47.60
			A3978	1.0E +12	22	2.20E +10	2.29	47.71
			A3979	1.0E +12	21	2.10E +10	2.19	47.81
			A3991	1.0E +12	18	1.80E +10	1.88	48.13
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3992	1.0E +12	17	1.70E +10	2.58	47.42
			A3993	1.0E +12	15	1.50E +10	2.27	47.73
			A3994	1.0E +12	21	2.10E +10	3.18	46.82
			A3995	1.0E +12	21	2.10E +10	3.18	46.82
			A3996	1.0E +12	19	1.90E +10	2.88	47.12
38	처리 없음		A3934					
			A3935					

[0290]

[0291] 표 32: 실험군 및 용량 - OTC$^{spf-ash}$ 암컷-중간 용량.

군 암컷	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/ Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마 우스	µl 바이 러스	PBS
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3865	5.0E +11	20.8	1.04E+ 10	0.87	49.13
			A3866	5.0E +11	20.4	1.02E+ 10	0.85	49.15
			A3867	5.0E +11	25	1.25E+ 10	1.04	48.96
			A3868	5.0E +11	21.5	1.08E+ 10	0.90	49.10
			A3869	5.0E +11	23	1.15E+ 10	0.96	49.04
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3870	5.0E +11	22	1.10E+ 10	1.15	48.85
			A3871	5.0E +11	21	1.05E+ 10	1.09	48.91
			A3872a	5.0E +11	23	1.15E+ 10	1.20	48.80
			A3872b	5.0E +11	20.5	1.03E+ 10	1.07	48.93
			A3873	5.0E +11	26.5	1.33E+ 10	1.38	48.62
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3874	5.0E +11	23.3	1.17E+ 10	1.77	48.23
			A3875	5.0E +11	25	1.25E+ 10	1.89	48.11
			A3876	5.0E +11	23.5	1.18E+ 10	1.78	48.22
			A3877	5.0E +11	22	1.10E+ 10	1.67	48.33
			A3878	5.0E +11	21	1.05E+ 10	1.59	48.41

[0292]

[0293] 표 33: 실험군 및 용량 - OTC$^{spf-ash}$ 암컷-고용량.

군 암컷	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/ Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/ 마우 스	µl 바이 러스	PBS
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3888	1.0E +12	23	2.30E +10	1.92	48.08
			A3889	1.0E +12	22	2.20E +10	1.83	48.17
			A3890	1.0E +12	21	2.10E +10	1.75	48.25
			A3891	1.0E +12	22	2.20E +10	1.83	48.17
			A3892	1.0E +12	20	2.00E +10	1.67	48.33
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3893	1.0E +12	22	2.20E +10	2.29	47.71
			A3894	1.0E +12	21.5	2.15E +10	2.24	47.76
			A3895	1.0E +12	18.5	1.85E +10	1.93	48.07
			A3896	1.0E +12	18	1.80E +10	1.88	48.13
			A3897	1.0E +12	18.5	1.85E +10	1.93	48.07
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3898	1.0E +12	18	1.80E +10	2.73	47.27
			A3899	1.0E +12	19	1.90E +10	2.88	47.12
			A3900	1.0E +12	17	1.70E +10	2.58	47.42
			A3901	1.0E +12	17	1.70E +10	2.58	47.42
			A3902	1.0E +12	19	1.90E +10	2.88	47.12

[0294]

[0295] 표 34: 도 29의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균 ± SD
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3917	4.26	84%	100 ± 25
			A3918	5.54	109%	
			A3919	3.28	64%	
			A3920	6.43	126%	
			A3921	5.97	117%	
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3922	6.26	123%	214 ± 108
			A3923	10.38	204%	
			A3924	5.06	99%	
			A3925	17.94	352%	
			A3926	14.82	291%	
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3917	7.04	102%	100 ± 27
			A3918	3.95	57%	
			A3919	7.17	104%	
			A3920	9.11	132%	
			A3921	7.18	104%	
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3927	15.66	227%	171 ± 70
			A3930	5.40	78%	
			A3931	10.25	149%	
			A3932	15.78	229%	
			A3933			

[0296]

[0297] 표 35: 도 29의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	mmol 시트룰린	OD 490nm /vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3917	6.06	6.39	56%	100 ± 32.7
			A3918	6.35	9.16	80%	
			A3919	7.02	14.63	128%	
			A3920	6.30	11.69	102%	
			A3921	5.77	15.34	134%	
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3922	20.20	50.28	439%	194 ± 143.3
			A3923	8.80	21.59	189%	
			A3924	6.83	13.17	115%	
			A3925	8.66	8.97	78%	
			A3926	8.85	16.76	147%	
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3927	9.33	20.85	182%	397 ± 275.5
			A3930	41.18	90.58	792%	
			A3931	21.93	43.28	378%	
			A3932	19.05	27.16	237%	
			A3933				
38	비처리		A3934	5.14			

[0298]

[0299] 표 36: 도 29의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/ 세포	평균 ± SD
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3917	0.05	0.086 ± 0.034
			A3918	0.06	
			A3919	0.13	
			A3920	0.08	
			A3921	0.11	
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3922	0.31	0.146 ± 0.098
			A3923	0.13	
			A3924	0.07	
			A3925	0.07	
			A3926	0.15	
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3927	0.15	0.325 ± 0.160
			A3930	0.52	
			A3931	0.37	
			A3932	0.26	
			A3933		

[0300]

[0301] 표 37: 도 30의 OTC$^{spf-ash}$ 수컷 마우스에서의 소변 오로트산 측정치.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	μmol 오로트산/ mmol 크레아티닌				
			T0	T2 주	T4 주	T6 주	T8 주
32	OTCwt (16137)	A3917	377.0	605.7	480.6	324.2	387.2
		A3918	558.2	378.2	387.5	575.0	415.9
		A3919	345.4	336.2	175.8	150.0	218.5
		A3920	348.2	237.6	127.0	438.8	321.0
		A3921	306.8	348.0	120.9	591.4	399.2
33	OTC1 (16138)	A3922	279.3	493.6	138.9	468.0	149.5
		A3923	537.5	247.6	120.3	544.7	220.5
		A3924	497.1	390.3	512.8	310.5	170.8
		A3925		351.4	264.4	250.7	308.3
		A3926	469.8	391.4	263.8	152.3	232.8
34	OTC 3 (16139)	A3927	546.0	372.0	315.1	177.7	304.1
		A3930	404.2	80.9	63.2	39.1	68.8
		A3931	331.7	451.5	150.6	184.5	204.8
		A3932	291.9	229.1	143.0	242.7	171.9
		A3933	286.9	79.2	125.9	107.1	158.4
38	비처리	A3934	400.2	561.0	525.0	689.5	535.2

[0302]

[0303] 표 38: 도 30의 $OTC^{spf-ash}$ 마우스에서의 소변 오로트산 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	평균 ± SD
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3917	6.06	6.3 ± 4.6
			A3918	6.35	
			A3919	7.02	
			A3920	6.30	
			A3921	5.77	
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3922	20.20	10.7 ± 5.4
			A3923	8.80	
			A3924	6.83	
			A3925	8.66	
			A3926	8.85	
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3927	9.33	22.9 ± 13.3
			A3930	41.18	
			A3931	21.93	
			A3932	19.05	
			A3933		
38	비처리		A3934	5.14	
	C57Bl/6 WT			47	51.5 ± 6.4
				56	

[0304]

[0305] 표 39: 도 31의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	밴드 강도 OTC/HSP 70 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3937	0.91	54%	100%	30
			A3938	2.06	122%		
			A3939	1.51	89%		
			A3940	2.21	131%		
			A3941	1.77	105%		
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3976	4.36	258%	340%	184
			A3977	9.51	562%		
			A3978	1.27	75%		
			A3979	7.11	420%		
			A3991	6.55	387%		
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3937	0.96	51%	100%	47
			A3938	1.56	84%		
			A3939	1.52	81%		
			A3940	3.30	177%		
			A3941	2.01	107%		
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3992	25.33	1355%	535%	483
			A3993	3.65	196%		
			A3994	10.23	547%		
			A3995	3.44	184%		
			A3996	7.33	392%		

[0306]

[0307] 표 40: 도 31의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	OD 490nm/vg	배수 변화/wt OTC	평균 ± SD
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3937	59.7	0.18	81%	100 ± 32
			A3938	35.8	0.25	115%	
			A3939	32.9	0.14	64%	
			A3940	12.8	0.20	93%	
			A3941	44.0	0.32	147%	
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3976	50.6	1.12	516%	369 ± 214
			A3977	16.8	0.81	372%	
			A3978	41.0	0.22	101%	
			A3979	15.8	0.49	224%	
			A3991	51.6	1.37	632%	
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3992	11.5	0.81	373%	419 ± 399
			A3993	15.1	0.46	210%	
			A3994	54.4	2.43	1120%	
			A3995	28.1	0.42	192%	
			A3996	17.6	0.44	200%	
38	비처리			6.1			

[0308]

[0309] 표 41: 도 31의 바이러스 게놈 카피수 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
				Exp 1	Exp 2		
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3937	13.8	3.4	8.6	4.4 ± 2.8
			A3938	5.5	1.5	3.5	
			A3939	8.7	2.5	5.6	
			A3940	1.6	0.3	1.0	
			A3941	5.3	1.7	3.5	
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3976	1.9	0.5	1.2	1.5 ± 1.8
			A3977	0.6	0.2	0.4	
			A3978	7.3	2.1	4.7	
			A3979	0.9	0.3	0.6	
			A3991	1.4	0.4	0.9	
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3992	0.3	0.2	0.2	0.7 ± 0.4
			A3993	0.9	0.2	0.6	
			A3994	1.0	0.3	0.7	
			A3995	2.3	0.6	1.4	
			A3996	1.2	0.4	0.8	

[0310]

[0311] 표 42: 도 32의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 암컷	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	OD 490nm/ vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3865	59.7	0.11	34%	100 ± 82
			A3866	35.8	0.26	81%	
			A3867	32.9	0.60	192%	
			A3868	12.8	0.56	180%	
			A3869	44.0	0.04	13%	
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3870	50.6	0.72	230%	101 ± 73
			A3871	16.8	0.27	86%	
			A3872a	41.0	0.21	66%	
			A3872b	15.8	0.17	54%	
			A3873	51.6	0.22	69%	
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3874	11.5	0.13	43%	61 ± 27
			A3875	15.1	0.15	48%	
			A3876	54.4	0.13	41%	
			A3877	28.1	0.33	104%	
			A3878	17.6	0.22	70%	
	비처리			6.1			

[0312]

[0313] 표 43: 도 32의 바이러스 게놈 정량화.

군 (암컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포	평균 ± SD
32	OTCwt (16137)	제2 제조	A3865	1.13	1.77 ± 1.70
			A3866	1.62	
			A3867	0.59	
			A3868	0.78	
			A3869	4.74	
33	OTC1 (16138)	제2 제조	A3870	0.99	2.33 ± 0.96
			A3871	2.84	
			A3872a	2.35	
			A3872b	1.93	
			A3873	3.55	
34	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3874	7.39	3.60 ± 2.33
			A3875	2.18	
			A3876	3.48	
			A3877	1.31	
			A3878	3.60	

[0314]

[0315] 표 44: 도 33의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (암컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	밴드 강도 OTC/HSP70 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균	표준 편차
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3888	0.458	97%	100%	30
			A3889	0.563	119%		
			A3890	0.230	49%		
			A3891	0.537	114%		
			A3892	0.574	122%		
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3893	0.642	136%	237%	130
			A3894	1.534	325%		
			A3895	0.447	95%		
			A3896	1.932	409%		
			A3897	1.044	221%		
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3888	0.458	93%	100%	33
			A3889	0.659	134%		
			A3890	0.230	47%		
			A3891	0.537	109%		
			A3892	0.574	117%		
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3898	1.483	302%	351%	88
			A3899	1.365	278%		
			A3900	2.228	453%		
			A3901	2.166	441%		
			A3902	1.378	280%		

[0316]

[0317] 표 45: 도 33의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (암컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	OD 490 nm/vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3888	90.12	0.254	102%	100 ± 19
			A3889	51.61	0.287	116%	
			A3890	58.07	0.223	90%	
			A3891	37.20	0.178	72%	
			A3892	69.72	0.298	120%	
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3893	88.54	0.334	135%	218 ± 136
			A3894	84.37	0.889	358%	
			A3895	92.24	0.176	71%	
			A3896	59.49	0.914	368%	
			A3897	57.83	0.389	157%	
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3898	37.05	0.375	151%	265 ± 226
			A3899	77.13	0.458	185%	
			A3900	53.98	0.606	245%	
			A3901	52.95	1.627	656%	
			A3902	35.94	0.213	86%	
38	비처리			28.70			

[0318]

[0319] 표 46: 도 33의 바이러스 게놈 정량화.

군 (암컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포	평균 ± SD
35	OTCwt (16137)	제2 제조	A3888	3.35	1.96 ± 0.91
			A3889	1.26	
			A3890	1.99	
			A3891	1.00	
			A3892	1.98	
36	OTC1 (16138)	제2 제조	A3893	2.49	1.99 ± 1.83
			A3894	0.87	
			A3895	4.98	
			A3896	0.50	
			A3897	1.13	
37	OTC 3 (16139)	제2 제조	A3898	0.47	0.72 ± 0.48
			A3899	1.50	
			A3900	0.64	
			A3901	0.23	
			A3902	0.76	

[0320]

[0321] 표 47: 실험 조건 및 용량 C021-고용량.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/ 마우스	µl 바이러스	PBS
39	OTCwt (16137)	제2 제조	A4670	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A4672	1.0E+12	25	2.50E+10	2.08	47.92
			A4673	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A4681	1.0E+12	30	3.00E+10	2.50	47.50
			A4692	1.0E+12	30	3.00E+10	2.50	47.50
40	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4696	1.0E+12	20	2.00E+10	2.08	47.92
			A4675	1.0E+12	23	2.30E+10	2.40	47.60
			A4676	1.0E+12	26	2.60E+10	2.71	47.29
			A4677	1.0E+12	21	2.10E+10	2.19	47.81
			A4678	1.0E+12	24	2.40E+10	2.50	47.50
41	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4876	1.0E+12	17	1.70E+10	2.58	47.42
			A4877	1.0E+12	25	2.50E+10	3.79	46.21
			A4878	1.0E+12	21	2.10E+10	3.18	46.82
			A4882	1.0E+12	25	2.50E+10	3.79	46.21
			A4884	1.0E+12	24	2.40E+10	3.64	46.36

[0322]

[0323] 표 48: 실험 조건 및 용량 C021-중간 용량.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마우스	µl 바이러스	PBS
42	OTCwt (16137)	제2 제조	A5395	5.0E+11	24	1.20E+10	0.9	49.1
			A5398	5.0E+11	25.5	1.28E+10	0.9	49.1
			A5399	5.0E+11	29	1.45E+10	1.1	48.9
			A5400	5.0E+11	28	1.40E+10	1.0	49.0
			A5393	5.0E+11	23	1.15E+10	0.9	49.1
43	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5394	5.0E+11	23	1.15E+10	6.8	43.2
			A5396	5.0E+11	24	1.20E+10	7.1	42.9
			A5401	5.0E+11	31	1.55E+10	9.1	40.9
			A5402	5.0E+11	26	1.30E+10	7.6	42.4
			A5409	5.0E+11	29	1.45E+10	8.5	41.5

[0324]

[0325] 표 49: 실험 조건 및 용량 C021-저용량.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/마우스	µl 바이러스	PBS
44	OTCwt (16137)	제2 제조	A5272	2.5E+11	38	9.50E+09	0.7	49.3
			A5273	2.5E+11	25	6.25E+09	0.5	49.5
			A5278	2.5E+11	26	6.50E+09	0.5	49.5
			A5281	2.5E+11	23	5.75E+09	0.4	49.6
			A5272	2.5E+11	38	9.50E+09	0.7	49.3
45	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5275	2.5E+11	23	5.75E+09	3.4	46.6
			A5277	2.5E+11	22.5	5.63E+09	3.3	46.7
			A5279	2.5E+11	26	6.50E+09	3.8	46.2
			A5284	2.5E+11	30	7.50E+09	4.4	45.6
			A5361	2.5E+11	24	6.00E+09	3.5	46.5
46	비처리		A5410					
			A4795					
			A4701					

[0326]

[0327] 표 50: 도 34의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	밴드 강도 OTC/HSP70 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균 ± SD
39	OTCwt (16137)	제2 제조	A4670	0.036	112%	100 ± 49
			A4672	0.022	69%	
			A4673	0.022	69%	
			A4681	0.020	62%	
			A4692	0.062	193%	
40	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4696	0.030	94%	417 ± 120
			A4675	0.151	470%	
			A4676	0.172	537%	
			A4677	0.064	199%	
			A4678	0.145	451%	
39	OTCwt (16137)	제2 제조	A4670	0.051	195%	100 ± 54
			A4672	0.017	64%	
			A4673	0.013	50%	
			A4681	0.020	77%	
			A4692	0.035	132%	
41	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4876	0.105	404%	406 ±.54
			A4877	0.089	341%	
			A4878	0.091	348%	
			A4882	0.083	317%	
			A4884	0.119	457%	

[0328]

[0329] 표 51: 도 34의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	OD 490 nm/vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
39	OTCwt (16137)	제2 제조	A4670	66.4	0.016	106%	100 ± 68
			A4672	6.4	0.010	64%	
			A4673	1.5	0.007	43%	
			A4681	3.5	0.010	63%	
			A4692	20.1	0.035	223%	
40	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4696	12.1	0.008	54%	179 ± 81
			A4675	58.9	0.047	301%	
			A4676	51.5	0.032	206%	
			A4677	90.6	0.021	137%	
			A4678	49.6	0.031	197%	
41	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4876	20.8	0.048	306%	265 ± 85
			A4877	47.0	0.044	284%	
			A4878	20.4	0.017	112%	
			A4882	113.6	0.052	350%	
			A4884	117.1	0.042	271%	
	비처리			6.1			

[0330]

[0331] 표 52: 도 34의 바이러스 게놈 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포	평균 ± SD
39	OTCwt (16137)	제2 제조	A4670	39.6	14.66 ± 14.25
			A4672	10.7	
			A4673	10.9	
			A4681	8.5	
			A4692	3.6	
40	OTC 3 (16139)	제2 제조	A4696	16.5	16.74 ± 9.66
			A4675	10.5	
			A4676	10.1	
			A4677	33.4	
			A4678	13.2	
41	OTC 21 (17115)	제3 제조	A4876	6.4	14.38 ± 7.34
			A4877	11.3	
			A4878	11.3	
			A4882	17.4	
			A4884	25.5	

[0332]

[0333] 표 53: 도 35의 소변 오로트산 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	μmol 오로트산/ mmol 크레아티닌				
			T0	T2 주	T3 주	T6 주	T8 주
39	OTCwt (16137)	A4670	235.4	29.4	43.1	17.4	31.6
		A4672	1648.9	79.0	33.9	47.4	29.3
		A4673	127.2	90,0	17.8	62.8	55.4
		A4681	75.1	64.1	70.4	92.2	114.1
		A4692	197.3	38.3	19.5	43.1	43.0
40	OTC 3 (16139)	A4696	307.62	49.2	39.8	101.4	85.14
		A4675	214.95	79.3	51.3	200.5	113.52
		A4676	575.46	154.3	60	62.3	38.29
		A4677	252.58	61	61.1	74.2	65.9
		A4678	512.53	66.1	70	91.6	44.73
41	OTC 21 (17115)	A4876	316.0	28.3	14.8	31.3	32.2
		A4877	217.2	37.1	21.5	30.2	24.7
		A4878	273.6	6.3	34.5	63.2	49.9
		A4882	157.1	27.9	28.5	27.0	34.1
		A4884		31.2	14.8	31.7	38.7
46	비처리		851.3	511.8		309	405.2

[0334]

[0335] 표 54: 도 37의 소변 오로트산 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	μmol 오로트산/ mmol 크레아티닌				
			T0	T2 주	T4 주	T6 주	T8 주
42	OTCwt (16137)	A5395	559.02	470.19	580.13	305.10	62.97
		A5398	429.38	78.11	31.35	68.17	116.55
		A5399	519.97	46.97	50.99	56.61	165.75
		A5400	440.58	64.12	167.41	224.87	
		A5393	187.13	395.56	264.16	300.05	
43	OTC 21 (17115)	A5394	333.56	58.71	65.14	58.52	76.58
		A5396	559.02	23.52	31.11	23.52	56.60
		A5401	429.38	44.84	53.38	92.60	75.40
		A5402	519.97	20.46	23.67	35.93	58.22
		A5409	405.13	55.9	20.68	72.33	95.12

[0336]

[0337] 표 55: 도 38의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	밴드 강도 OTC/HSP70 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균 ± SD
42	OTCwt (16137)	제2 제조	A5395	0.33	51%	100 ± 49
			A5398	0.31	104%	
			A5399	0.30	79%	
			A5400	0.45	166%	
			A5393	0.33	51%	
43	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5394	2.01	151%	325 ± 232
			A5396	1.74	165%	
			A5401	1.69	352%	
			A5402	0.98	715%	
			A5409	1.40	242%	

[0338]

[0339] 표 56: 도 38의 오로트산 촉매 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	µmol 시트룰린	OD 490 nm/vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
42	OTCwt (16137)	제2 제조	A5395	1.17	0.50	209%	100 ± 74
			A5398	10.23	0.19	81%	
			A5399	6.70	0.14	58%	
			A5400	8.47	0.12	52%	
			A5393	2.81			
43	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5394	140.02	0.26	110%	220 ±106
			A5396	140.48	0.77	323%	
			A5401	135.60	0.55	231%	
			A5402	86.99	0.77	323%	
			A5409	44.61	0.27	112%	
	비처리			1.75			

[0340]

[0341] 표 57: 도 38의 바이러스 게놈 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포	평균 ± SD
42	OTCwt (16137)	제2 제조	A5395	0.17	0.74 ± 0.61
			A5398	1.00	
			A5399	1.10	
			A5400	1.40	
			A5393	0.01	
43	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5394	6.77	3.19 ± 2.08
			A5396	2.31	
			A5401	3.12	
			A5402	1.47	
			A5409	2.30	

[0342]

[0343] 표 58: 도 39의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	밴드 강도 OTC/HSP70 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균 ± SD
44	OTCwt (16137)	제2 제조	A5272	0.90	97%	100 ± 21
			A5273	0.68	74%	
			A5278	0.94	102%	
			A5281	1.16	126%	
45	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5275	2.53	193%	192 ± 58
			A5277	1.40	275%	
			A5279	1.16	152%	
			A5284	1.98	125%	
			A5361	0.90	215%	

[0344]

[0345] 표 59: 도 39의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	μmol 시트룰린	OD 490 nm/vg	배수 변화/ wtOTC	평균 ± SD
44	OTCwt (16137)	제2 제조	A5272	11.09	0.50	153%	100 ± 38
			A5273	8.95	0.19	103%	
			A5278	49.80	0.14	72%	
			A5281	45.25	0.12	73%	
45	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5275	26.30	0.26	97%	227 ± 156
			A5277	2.05	0.77	489%	
			A5279	10.80	0.55	229%	
			A5284	164.15	0.77	197%	
			A5361	15.05	0.27	121%	
	비처리			1.75			

[0346]

[0347] 표 60: 도 39의 바이러스 게놈 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	바이러스 게놈/세포		평균	군 평균 ± SD
				Exp1	Exp 2		
44	OTCwt (16137)	제2 제조	A5272	0.31	0.5	0.41	2.19±1.85
			A5273	0.58	1.0	0.79	
			A5278	2.04	6.0	4.02	
			A5281	1.65	5.4	3.54	
45	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5275	0.85	2.5	1.67	1.53±1.76
			A5277	0.13	0.1	0.11	
			A5279	0.34	0.5	0.43	
			A5284	2.16	6.8	4.50	
			A5361	0.62	1.3	0.94	

[0348]

[0349] 표 61: 도 40의 소변 오로트산 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	μmol 오로트산/ mmol 크레아티닌				
			T0	T2 주	T4 주	T6 주	T8 주
44	OTCwt (16137)	A5272	204.8	89.63	78.47	130.8	111.84
		A5273	1723.4	278.25	408.82	150.96	118
		A5278	139.9	339.79	932.68	283	86.2
		A5281	335.8	36.62	51.76	73.16	87
45	OTC 21 (17115)	A5277	400	378.36	225.73	177.03	261.88
		A5279	355	59.82	67.54	33.74	67.47
		A5284	600	55.58	82.89	88.18	114.99
		A5361	1255.9	92.19	180.56	140.2	107.25
	비처리		1140	334	279.9	511.8	252.4

[0350]

[0351] 표 62: 도 41의 OTC 촉매 활성 정량화.

군(수컷)	바이러스 명칭 (코드)	용량	마우스 코드	μmol 시트룰린	평균 ± SD
44	OTCwt (16137)	2.5E11	A5272	1.26	6.02 ± 5.7
			A5273	11.50	
			A5278	10.33	
			A5281	1.00	
42	OTCwt (16137)	5.0E11	A5395	5.59	3.94 ± 1.65
			A5398	5.11	
			A5399	3.35	
			A5400	4.23	
			A5393	1.41	
39	OTCwt (16137)	1.0E12	A4670	66.4	20.28 ± 38
			A4672	6.4	
			A4673	5.0	
			A4681	3.5	
			A4692	20.1	
41	OTC 21 (17115)	2.5E11	A5275	5.6	12.8 ± 18.2
			A5277	1.8	
			A5279	40	
			A5284	3.8	
43	OTC 21 (17115)	5E11	A5394	50	48.11 ± 24.66
			A5396	70.24	
			A5401	67.8	
			A5402	43.5	
			A5409	9	
45	OTC 21 (17115)	1E12	A4876	47	49.72 ± 39.1
			A4877	20	
			A4878	113.6	
			A4882	52	
			A4884	16	
	비처리			0.87	1.04±0.23
				1.20	
	C57-WT			49	45.63±4.9
				39.9	
				48	

[0352]

[0353] 표 63: 암모니아 챌린지 실험군 및 투여량.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	바이러스 배치	마우스 코드	Vg/Kg	마우스 체중 (gr)	Vg/ 마우스	µl 바이러스	PBS
47	OTCwt (16137)	제2 제조	A5819	5.0E+11	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A5820	5.0E+11	25	2.50E+10	2.08	47.92
			A5830	5.0E+11	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A5935	5.0E+11	30	3.00E+10	2.50	47.50
48	OTC 21 (17115)	제3 제조	A5821	5.0E+11	20	2.00E+10	2.08	47.92
			A5822	5.0E+11	23	2.30E+10	2.40	47.60
			A5932	5.0E+11	26	2.60E+10	2.71	47.29
			A5934	5.0E+11	21	2.10E+10	2.19	47.81
49	비처리		A6416		17			50
			A6417		25			50
			A6422		21			50
			A6423		25			50
50	Wt 마우스		A5405		26			50
			A5406		30			50
			A5404		21			50
			A5965		30			50

[0354]

[0355] 표 65: 도 42의 제1 암모니아 챌린지 정량화.

군	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	mmol NH_4	µmol OA/ mmol 크레아티닌	행동 시험 (스코어)			
					발작	소리 감수성	보행	총
47	OTCwt (16137)	A5819	2.58	65.3	1.5	1	2	4.5
		A5820	1.27	125.2	2	3	2	7
		A5830	0.92	93.0	1.5	2	2	5.5
		A5935	2.60	49.3	2	2	2	6
48	OTC 21 (17115)	A5821	1.19	45.6	2	3	2	7
		A5822	0.94	50.0	2	3	2	7
		A5932	1.32	57.2	2	3	2	7
		A5934	0.96	45.6	2	2.5	2	6.5
49	비처리	A6416	2.62	210	0	1	0	1
		A6417	4.59	353	1	1	1	3
		A6422	5.96	420	0	1	1	2
		A6423	10.48		0	0	0	0
50	Wt 마우스	A5405	3.86	70	1	2	2	5
		A5406	3.62	38	2	2	2	6
		A5404	3.24		2	2	2	6
		A5965	3.24		2	2	2	6

[0356]

[0357] 표 66: 도 44의 제2 암모니아 챌린지 정량화.

군	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	mmol NH_4	µmol OA/ mmol 크레아티닌	행동 시험 (스코어)			
					발작	소리 감수성	보행	총
47	OTCwt (16137)	A5819	3.37	140.7	1	1	2	4
		A5820	2.56	117.7	2	2	1	5
		A5830	2.84	93.9	1.5	2	1	4.5
		A5935	1.58	89.2	1	2	2	5
48	OTC 21 (17115)	A5821	1.86	90.9	2	2	2	6
		A5822	3.62	78.8	2	2	1	5
		A5932	1.66	81.8	1	2	1	4
		A5934	2.44	81.2	1	2	2	5
49	비처리	A6416	5.57	582.7	0	0	0 사망	0
		A6417	4.23	341.1	0	0	0 사망	0
		A6422	4.76	472.0	0	1	1	2
		A6423	6.80	378.0	0	1	1	0
50	Wt 마우스	A5405	3.87	102.3	1	2	2	5
		A5406	2.54	108.0	2	2	2	6
		A5404	2.62		2	2	2	6

[0358]

[0359] 표 67: 도 44의 웨스턴 블롯 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	Vg/Kg	밴드 강도 OTC/튜불린 (Vg에 대해 정규화됨)	배수 변화 OTC-wt	평균 ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	5.00E+11	1.179	138%	100 ± 29
		A5820	5.00E+11	0.741	87%	
		A5830	5.00E+11	0.601	70%	
		A5935	5.00E+11	0.905	106%	
48	OTC 21 (17115)	A5821	5.00E+11	6.145	717%	600.7 ± 115
		A5822	5.00E+11	4.436	518%	
		A5932	5.00E+11	5.826	680%	
		A5934	5.00E+11	4.183	488%	

[0360]

[0361] 표 68: 도 44의 OTC 촉매 활성 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	μmol 시트룰린	평균 ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	7.27	6.75 ± 2.9
		A5820	9.67	
		A5830	2.77	
		A5935	7.27	
48	OTC 21 (17115)	A5821	78.57	95.10 ± 22.15
		A5822	76.37	
		A5932	102.07	
		A5934	123.37	
49	비처리	A6416	1.87	0.87±1.4
		A6417	-0.13	
		A6422		
		A6423		
50	Wt 마우스	A5405	92.67	82.52±14.3
		A5406	72.37	
		A5404		
		A5965		

[0362]

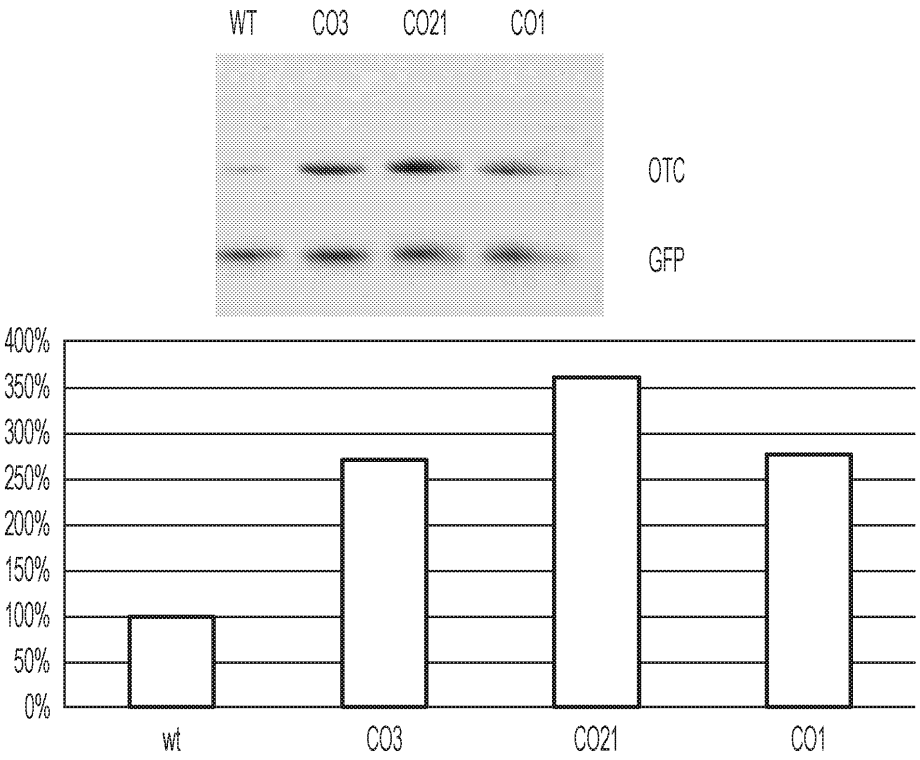
[0363] 표 69: 도 44의 바이러스 게놈 정량화.

군 (수컷)	바이러스 명칭 (코드)	마우스 코드	바이러스 게놈/세포	평균 ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	1.4	1.0 ± 0.5
		A5820	1.0	
		A5830	0.3	
		A5935	1.3	
48	OTC 21 (17115)	A5821	1.0	1.5 ± 0.5
		A5822	1.5	
		A5932	1.3	
		A5934	2.1	

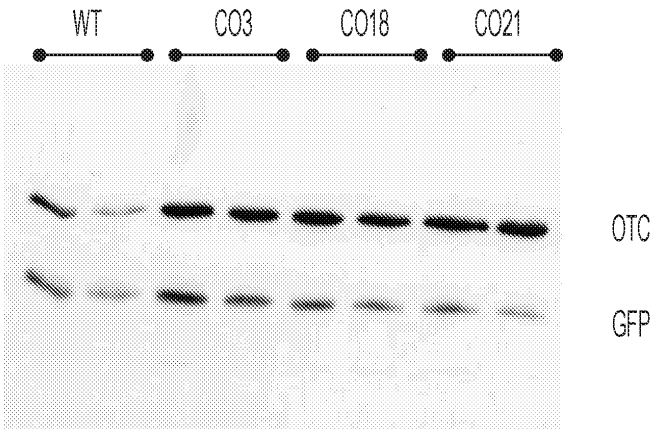
[0364]

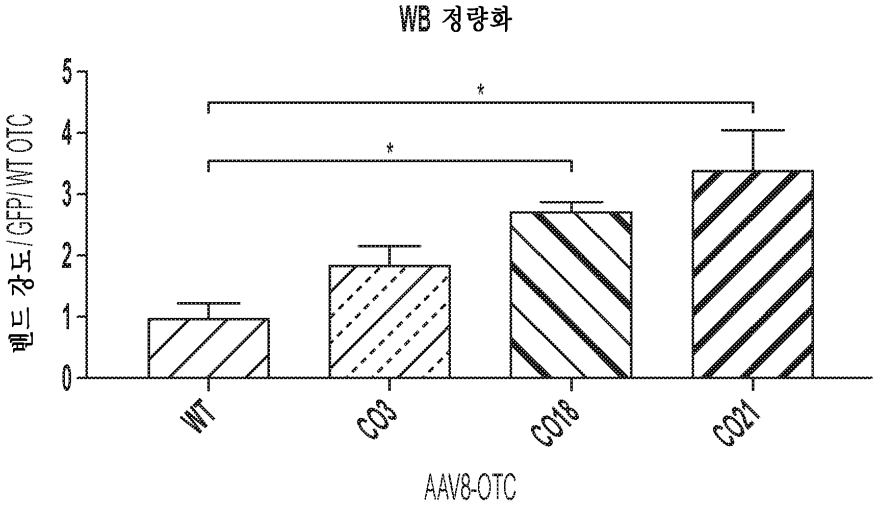
도면

도면1

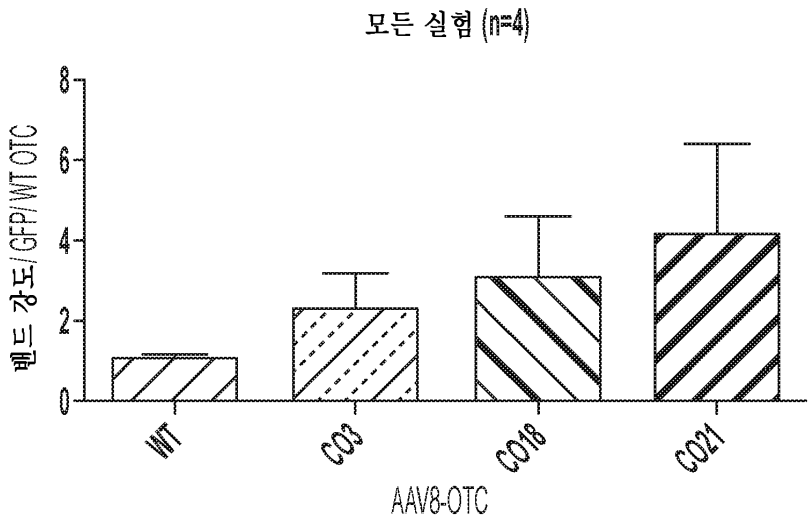

WT
CO3
CO21
CO1
OTC
GFP
400%
350%
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
wt
CO3
CO21
CO1

도면2

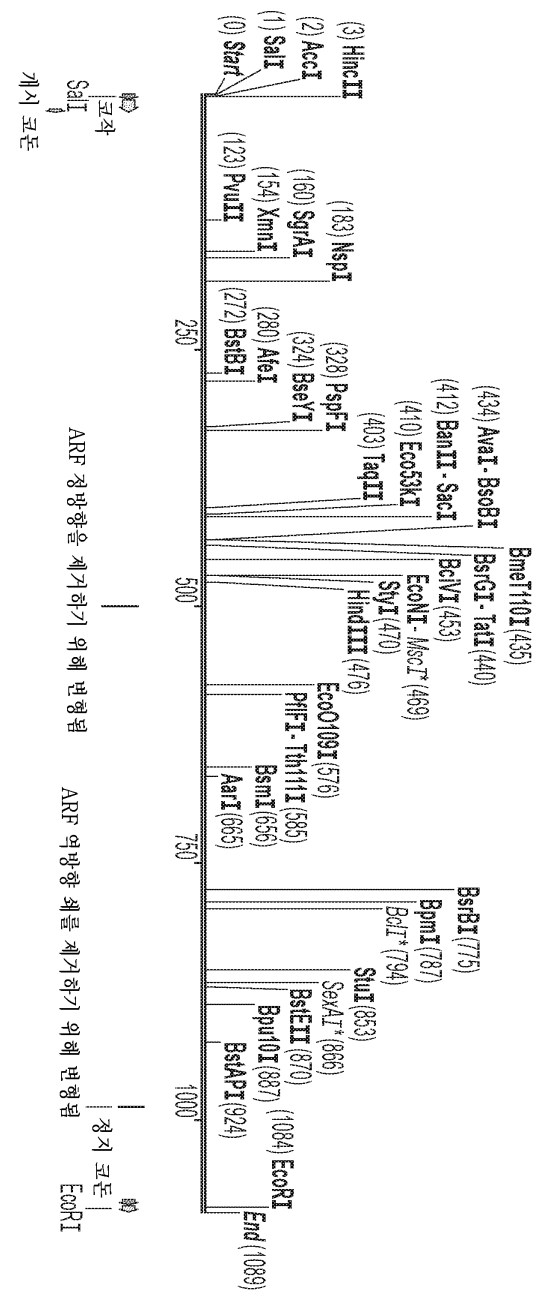

WT
CO3
CO18
CO21
OTC
GFP


WB 정량화
밴드 강도/GFP/WT OTC
0
1
2
3
4
5
*
*
WT
CO3
CO18
CO21
AAV8-OTC

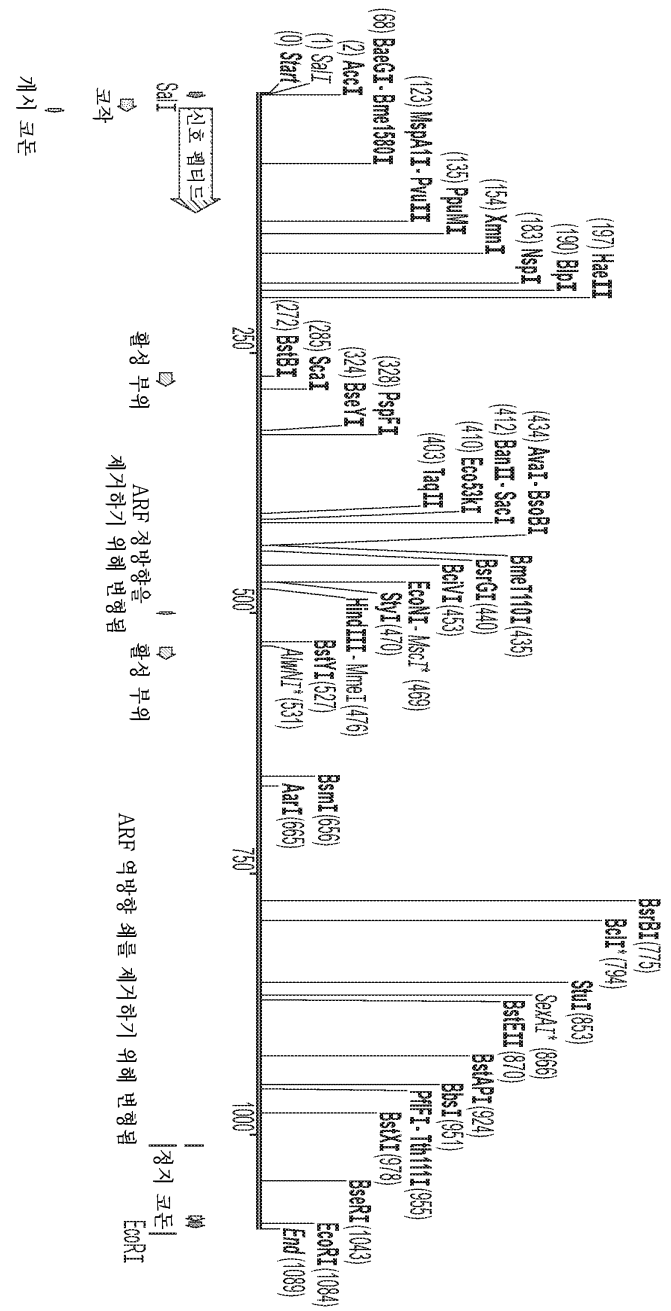
도면3


모든 실험 (n=4)
밴드 강도/GFP/WT OTC
0
2
4
6
8
WT
CO3
CO18
CO21
AAV8-OTC

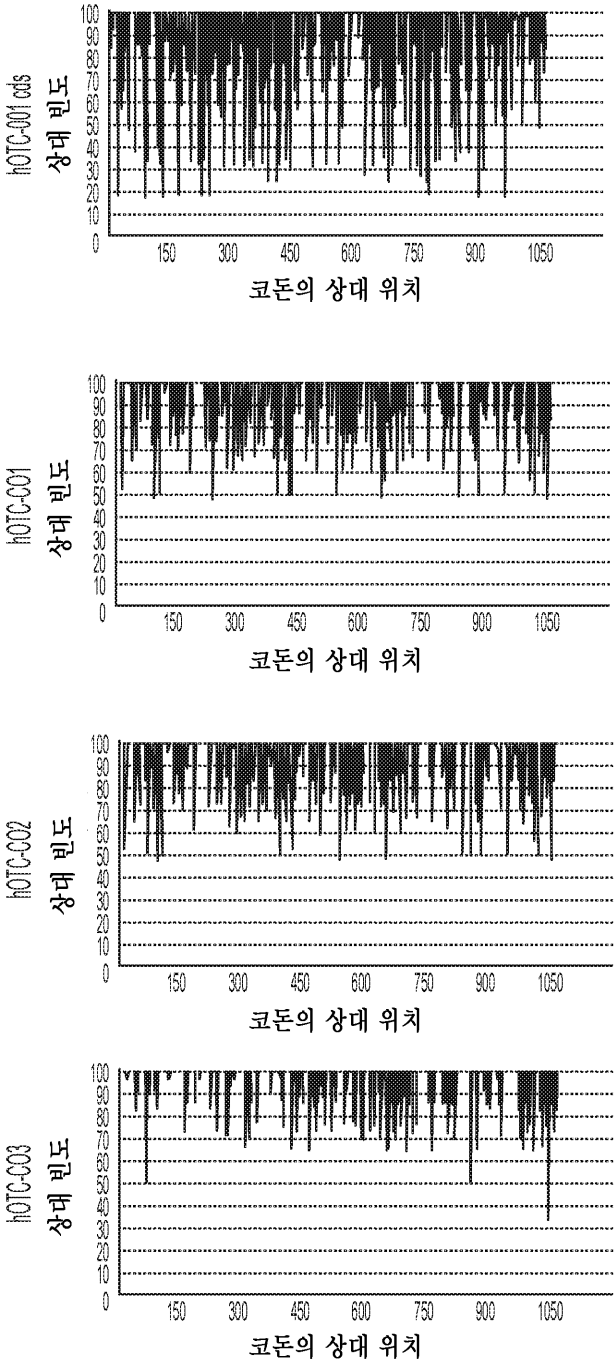
도면4


(0) Start
(1) SalI
(2) AccI
(3) HincII
(123) PvuII
(154) XmnI
(160) SgrAI
(183) NspI
(272) BstBI
(280) AfeI
(324) BseYI
(328) PspFI
(403) TaqII
(410) Eco53kI
(412) BanII - SacI
(434) AvaI - BsoBI
BmeT110I (435)
BsrGI - TatI (440)
BclVI (453)
EcoNI - MscI* (469)
StyI (470)
HindIII (476)
EcoO109I (576)
PflFI - Tth111I (585)
BsmI (656)
AarI (665)
BsrBI (775)
BpmI (787)
BclI* (794)
StuI (853)
SexAI* (866)
BstEII (870)
Bpu10I (887)
BstAPI (924)
(1084) EcoRI
End (1089)
250
500
750
1000
ARF 정방향을 제거하기 위해 변형됨
ARF 역방향 쉐를 제거하기 위해 변형됨
전사 개시 코돈
코작
SalI
정지 코돈
EcoRI

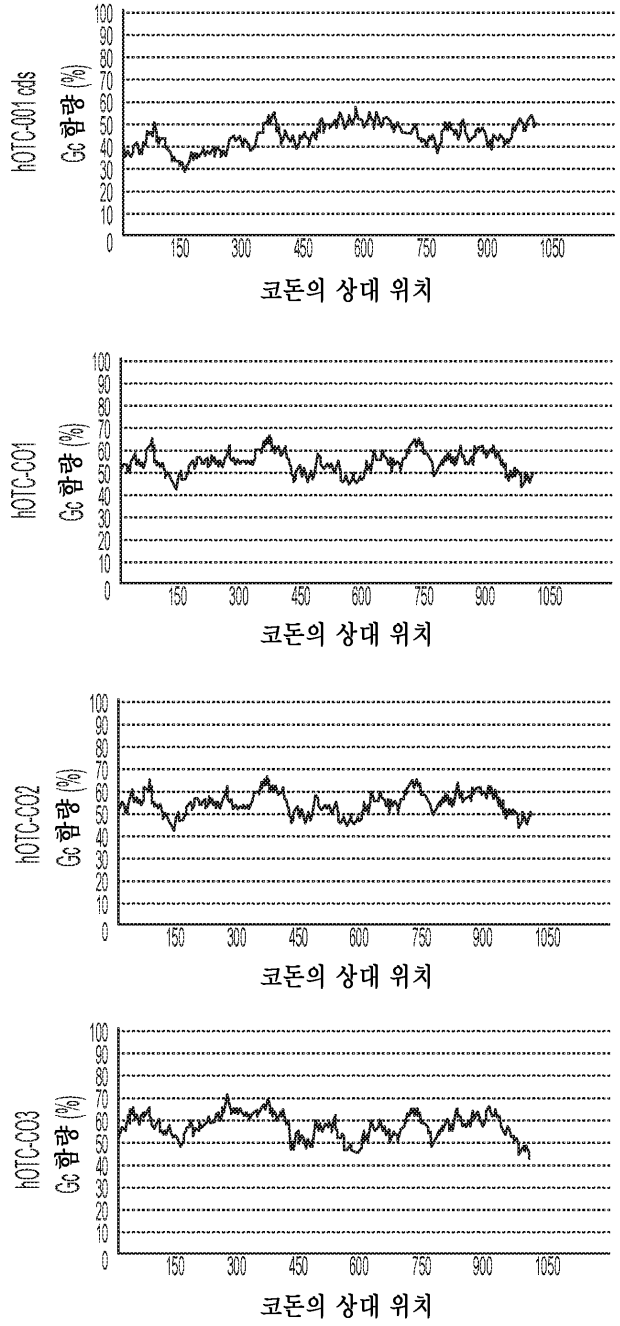
도면5


(197) HaeIII
(190) BlpI
(183) NspI
(154) XmnI
(135) PpuMI
(123) MspA1I - PvuII
(68) BaeGI - Bme1580I
(2) AccI
(1) SalI
(0) Start
(272) BstBI
(285) ScaI
(324) BseYI
(328) PspFI
(403) TaqII
(410) Eco53kI
(412) BanII - SacI
(434) AvaI - BsoBI
BmeT110I(435)
BstGI(440)
BclVI(453)
EcoNI - MscI*(469)
ShyI(470)
HindIII - NmeI(476)
BstYI(527)
AlwNI*(631)
BsmI(656)
AarI(665)
BsrBI(775)
BclI*(794)
StuI(853)
SexAI*(866)
BstEII(870)
BstAPI(924)
BbsI(951)
PflFI - Tth111I(955)
BstXI(978)
BseRI(1043)
EcoRI(1084)
End(1089)
250
500
750
1000
신호 펩티드
SalI
코작
캐시 코돈
활성 부위
ARF 정방향을 제거하기 위해 변형됨
활성 부위
ARF 역방향 쇄를 제거하기 위해 변형됨
경지 코돈
EcoRI

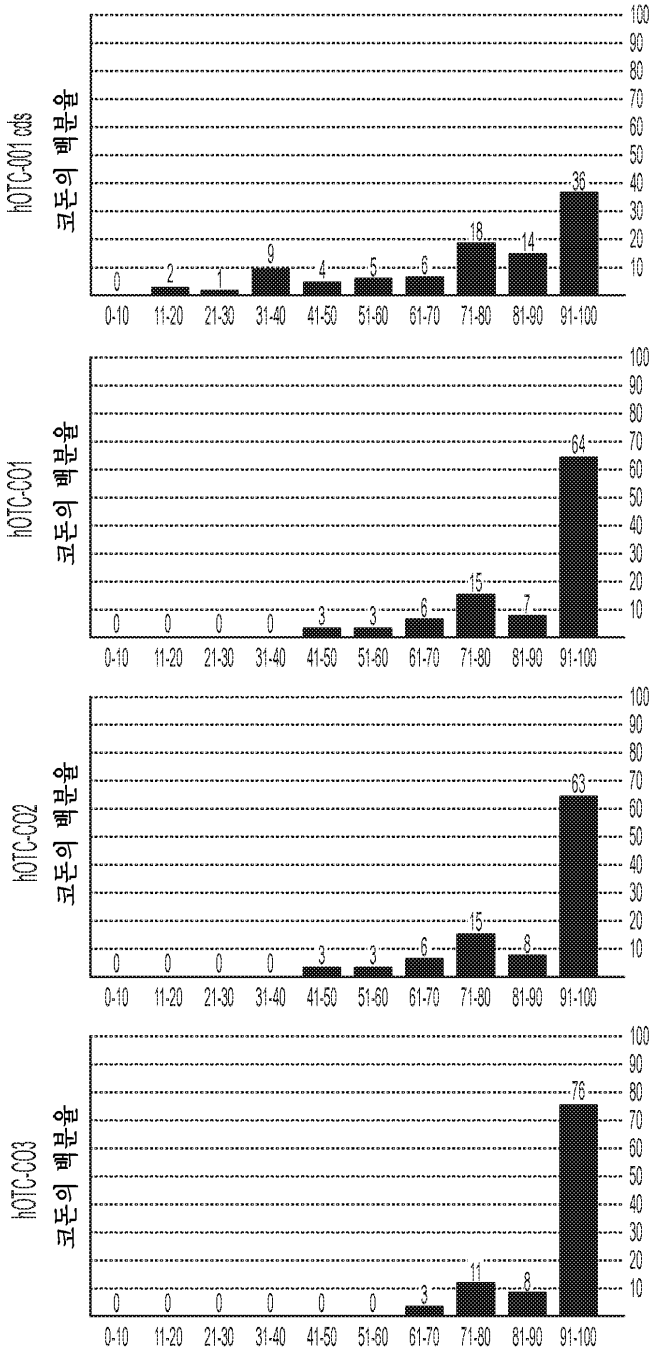
도면6i


hOTC-001 cds
상대 빈도
0
10
20
30
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
150
300
450
600
750
900
1050
코돈의 상대 위치
hOTC-C01
상대 빈도
코돈의 상대 위치
hOTC-C02
상대 빈도
코돈의 상대 위치
hOTC-C03
상대 빈도
코돈의 상대 위치

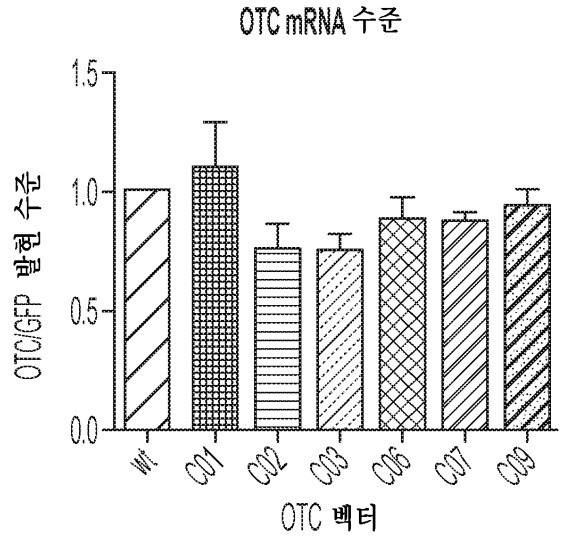
도면6ii


hOTC-001 cds
Gc 함량 (%)
코돈의 상대 위치
hOTC-C01
Gc 함량 (%)
코돈의 상대 위치
hOTC-C02
Gc 함량 (%)
코돈의 상대 위치
hOTC-C03
Gc 함량 (%)
코돈의 상대 위치

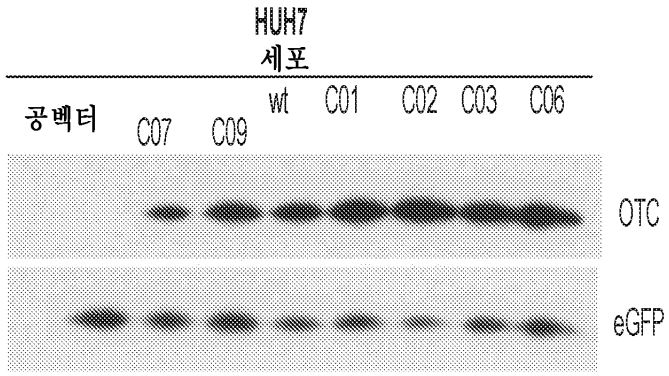
도면6iii


hOTC-001 cds
코돈이 빠른 융
0 2 1 9 4 5 6 18 14 36
hOTC-001
코돈이 빠른 융
0 0 0 0 3 3 6 15 7 64
hOTC-002
코돈이 빠른 융
0 0 0 0 3 3 6 15 8 63
hOTC-003
코돈이 빠른 융
0 0 0 0 0 0 3 11 8 76
0-10 11-20 21-30 31-40 41-50 51-60 61-70 71-80 81-90 91-100
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

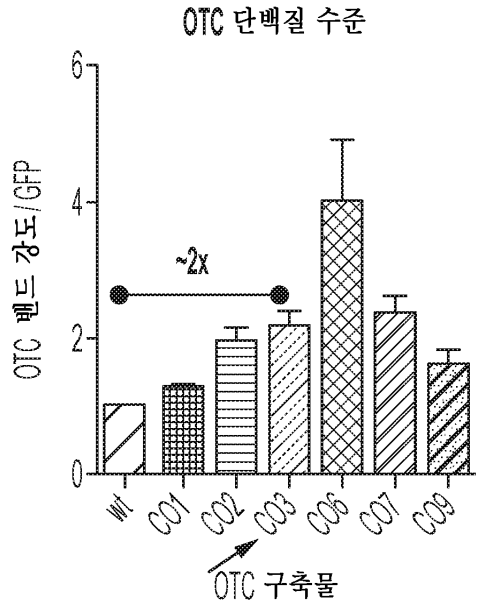
도면7


OTC mRNA 수준
OTC/GFP 발현 수준
1.5
1.0
0.5
0.0
wt
C01
C02
C03
C06
C07
C09
OTC 벡터

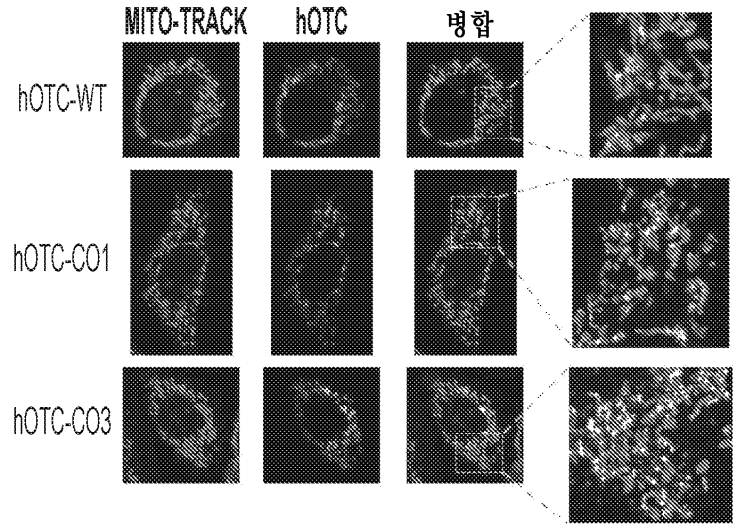
도면8a


HUH7
세포
공벡터
C07
C09
wt
C01
C02
C03
C06
OTC
eGFP

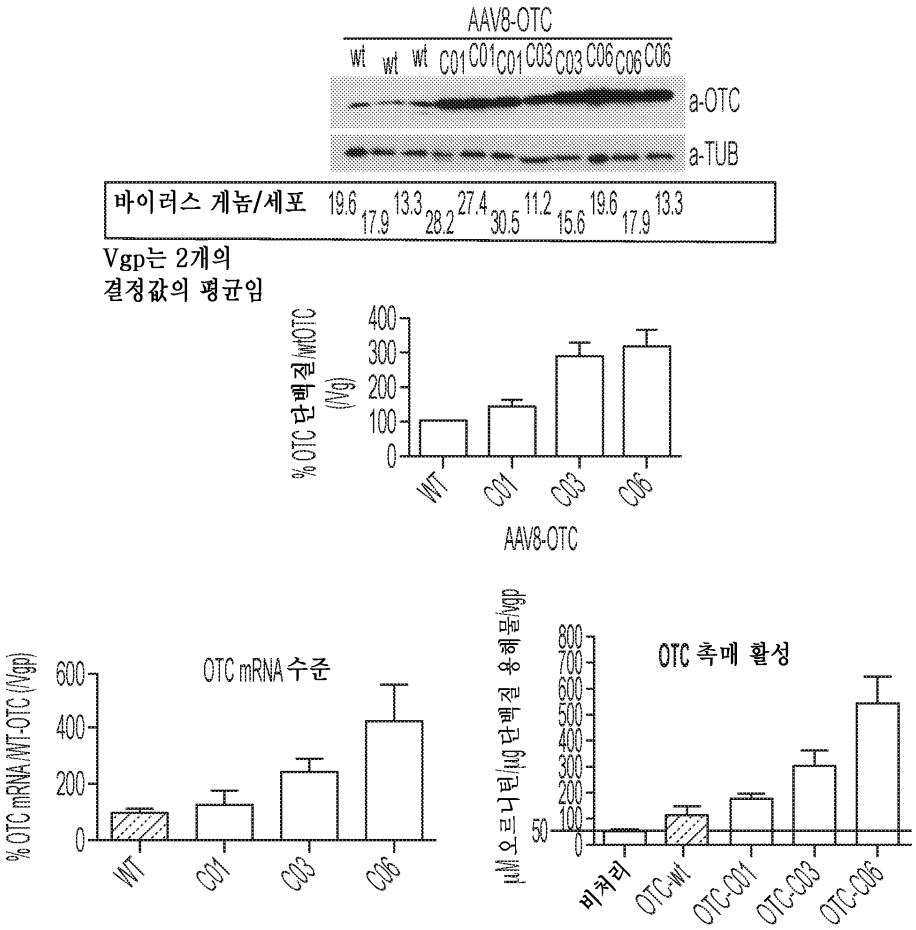
도면8b


OTC 단백질 수준
OTC 밴드 강도/GFP
6
4
2
0
~2x
wt
CO1
CO2
CO3
CO6
CO7
CO9
OTC 구축물

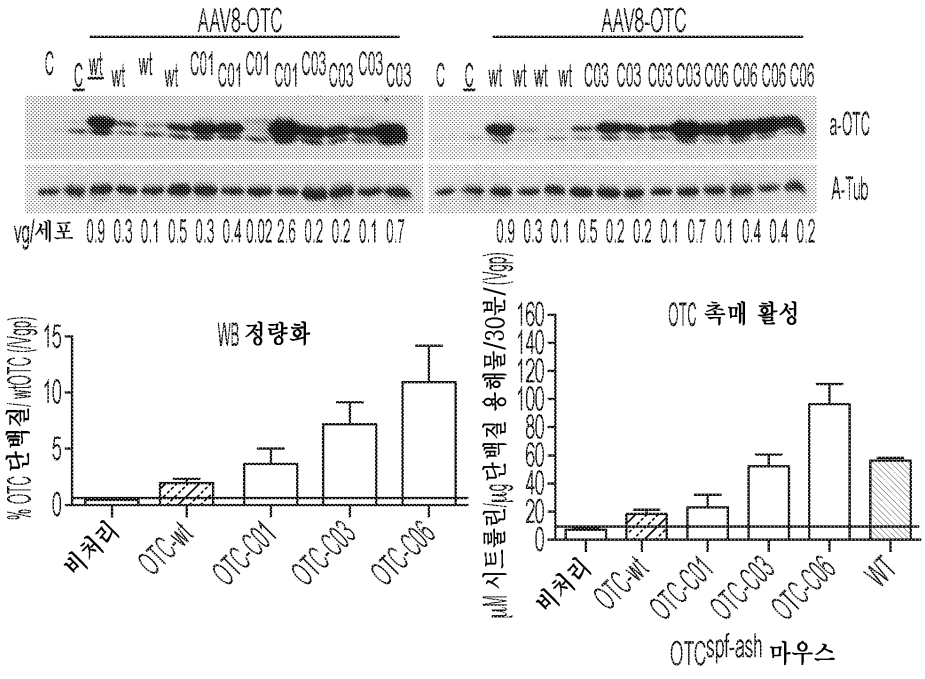
도면9


MITO-TRACK
hOTC
병합
hOTC-WT
hOTC-CO1
hOTC-CO3

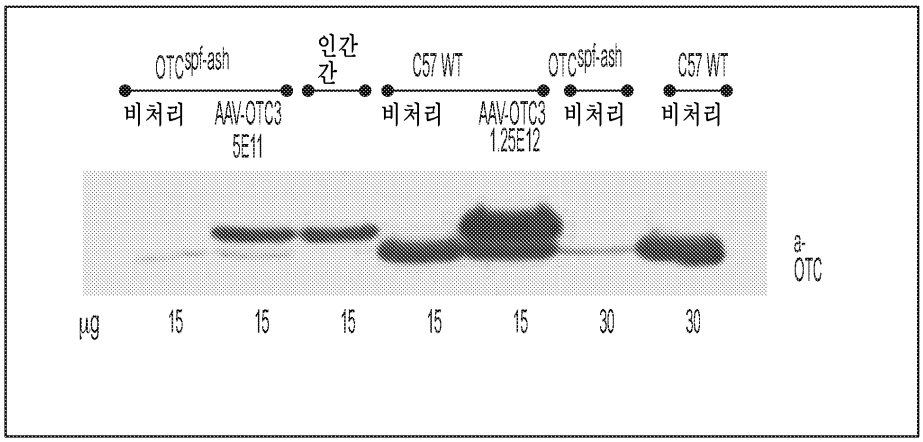
도면10


AAV8-OTC
wt wt wt C01 C01 C01 C03 C03 C06 C06 C06
a-OTC
a-TUB
바이러스 게놈/세포 19.6 17.9 13.3 28.2 27.4 30.5 11.2 15.6 19.6 17.9 13.3
Vgp는 2개의
결정값의 평균임
% OTC 단백질/wtOTC (Vg)
400
300
200
100
0
WT
C01
C03
C06
AAV8-OTC
% OTC mRNA /WT-OTC (Vgp)
OTC mRNA 수준
600
400
200
0
WT
C01
C03
C06
μM 오르니틴/μg 단백질 용해물/vgp
OTC 촉매 활성
800
700
600
500
400
300
200
100
50
0
비처리
OTC-wt
OTC-C01
OTC-C03
OTC-C06

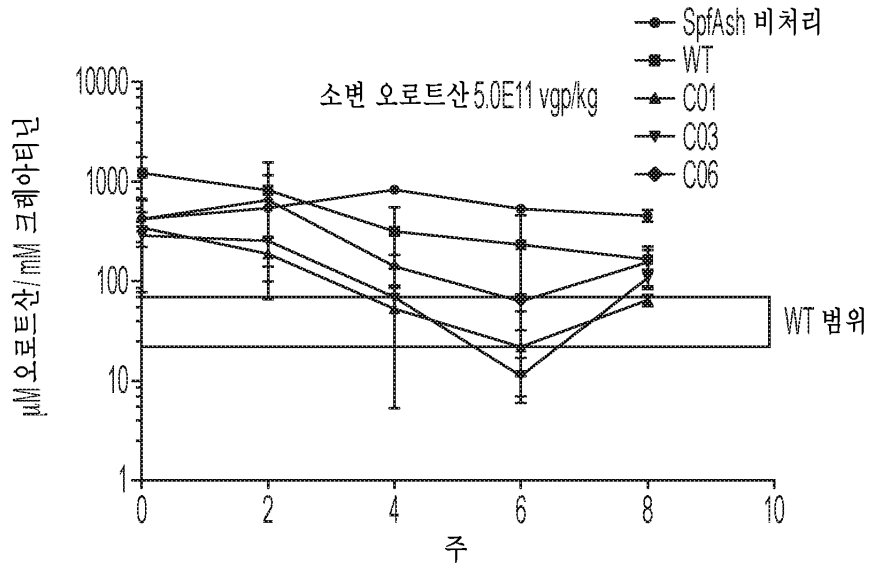
도면11


AAV8-OTC
AAV8-OTC
C C wt wt wt wt C01 C01 C01 C01 C03 C03 C03 C03
C C wt wt wt C03 C03 C03 C03 C06 C06 C06 C06
a-OTC
A-Tub
vg/세포 0.9 0.3 0.1 0.5 0.3 0.4 0.02 2.6 0.2 0.2 0.1 0.7
0.9 0.3 0.1 0.5 0.2 0.2 0.1 0.7 0.1 0.4 0.4 0.2
% OTC 단백질/wtOTC (Vgp)
WB 정량화
15
10
5
0
비처리
OTC-wt
OTC-C01
OTC-C03
OTC-C06
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분/(Vgp)
OTC 촉매 활성
160
140
120
100
80
60
40
20
0
비처리
OTC-wt
OTC-C01
OTC-C03
OTC-C06
WT
OTCspf-ash 마우스

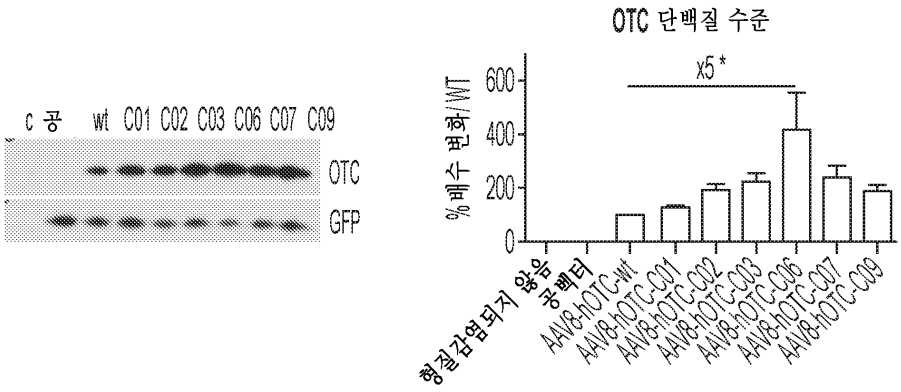
도면12



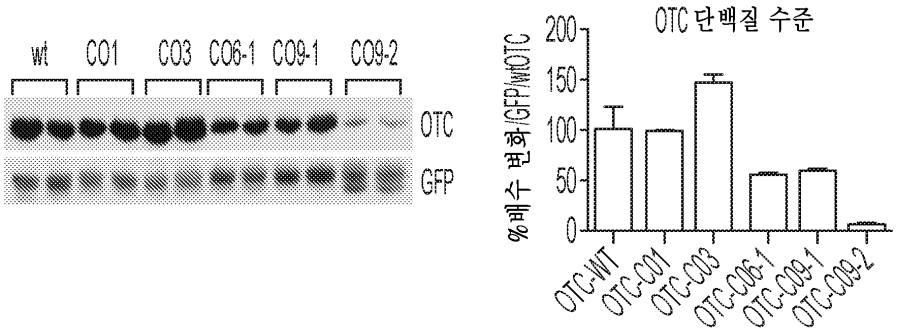
도면13



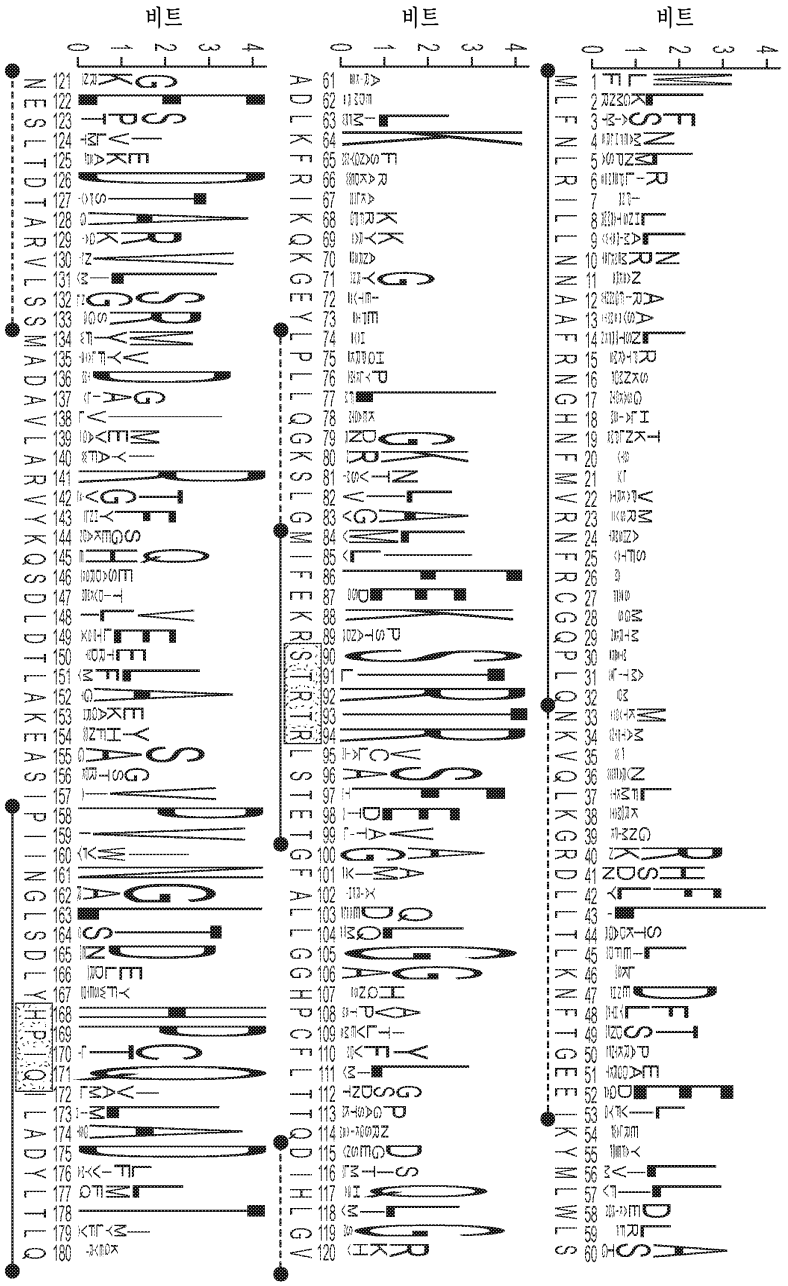
도면14



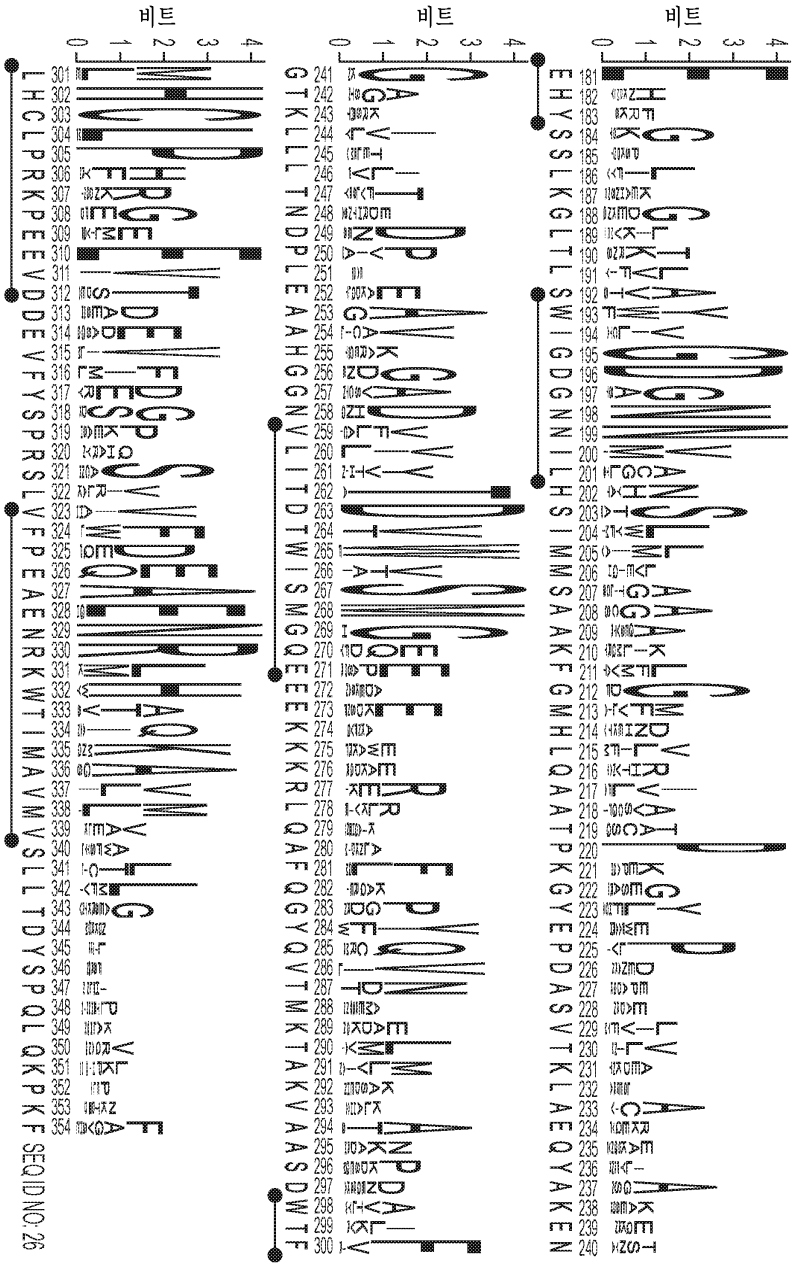
도면15


wt
CO1
CO3
CO6-1
CO9-1
CO9-2
OTC
GFP
OTC 단백질 수준
%배수 변화/GFP/wtOTC
200
150
100
50
0
OTC-WT
OTC-CO1
OTC-CO3
OTC-CO6-1
OTC-CO9-1
OTC-CO9-2

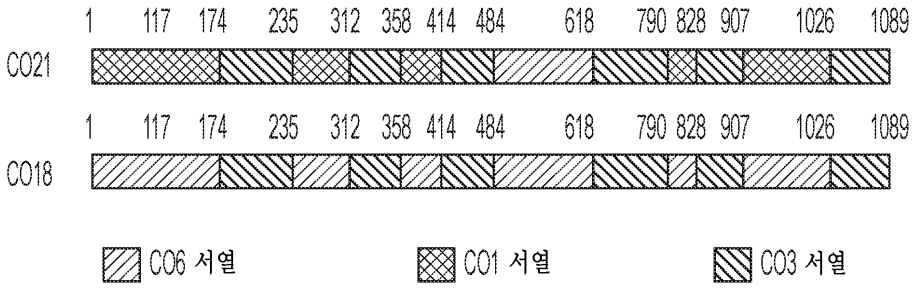
도면16i


비트
비트
비트

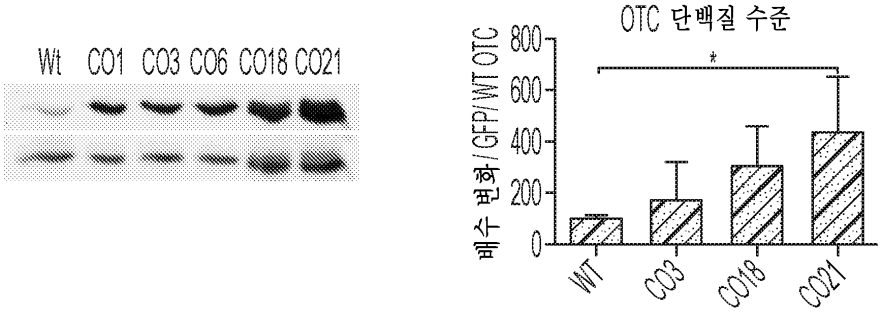
도면16ii


비트
비트
비트
SEQ ID NO: 26

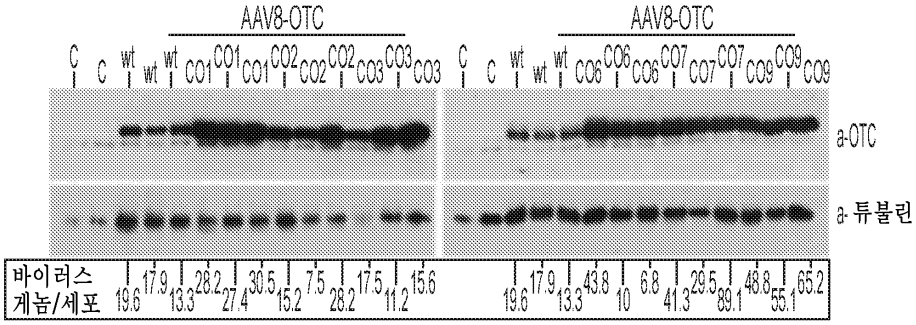
도면17

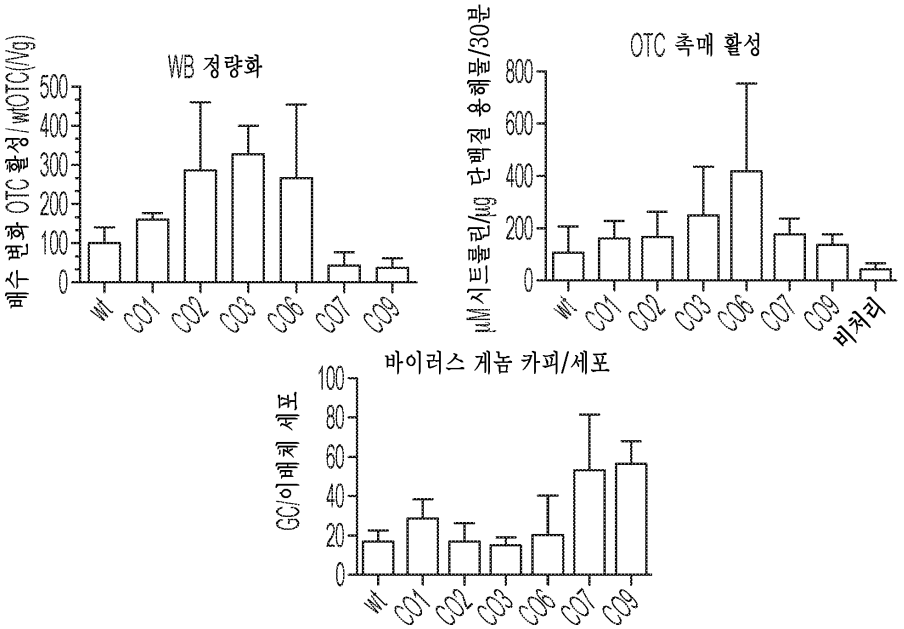

1 117 174 235 312 358 414 484 618 790 828 907 1026 1089
CO21
1 117 174 235 312 358 414 484 618 790 828 907 1026 1089
CO18
CO6 서열
CO1 서열
CO3 서열

도면18

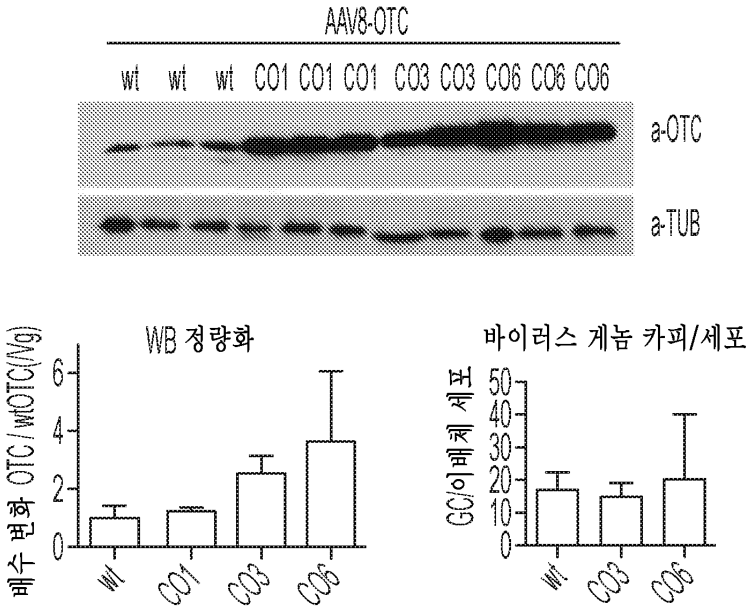

Wt CO1 CO3 CO6 CO18 CO21
OTC 단백질 수준
배수 변화/GFP/WT OTC
800
600
400
200
0
*
WT
CO3
CO18
CO21

도면19

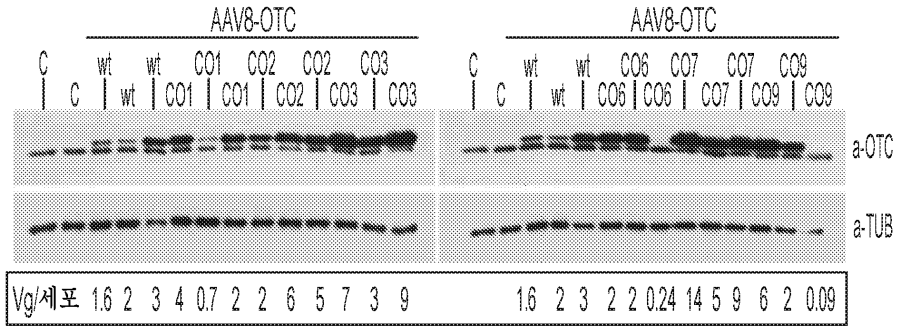

AAV8-OTC
AAV8-OTC
C c wt wt wt CO1 CO1 CO1 CO2 CO2 CO2 CO3 CO3 CO3
C c wt wt wt CO6 CO6 CO6 CO7 CO7 CO7 CO9 CO9 CO9
a-OTC
a-튜불린
바이러스 게놈/세포
19.6 17.9 13.3 28.2 27.4 30.5 15.2 7.5 28.2 17.5 11.2 15.6
19.6 17.9 13.3 43.8 10 6.8 41.3 29.5 89.1 48.8 55.1 65.2

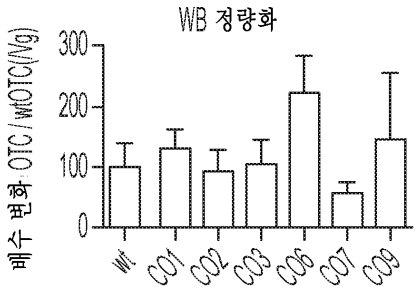

WB 정량화
배수 변화 OTC 활성/wtOTC(Vg)
500
400
300
200
100
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9
OTC 촉매 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
800
600
400
200
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9 비처리
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이배체 세포
100
80
60
40
20
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9

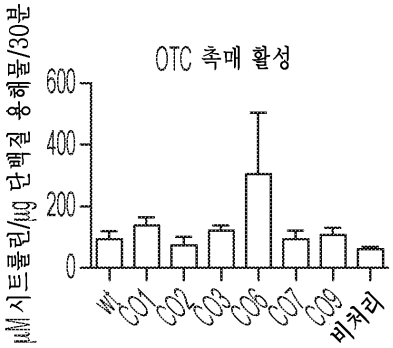
도면20

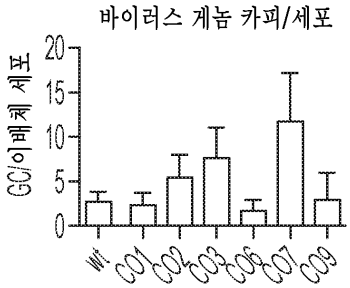

AAV8-OTC
wt wt wt CO1 CO1 CO1 CO3 CO3 CO6 CO6 CO6
a-OTC
a-TUB
WB 정량화
배수 변화 OTC/wtOTC(/Vg)
0
2
4
6
wt
CO1
CO3
CO6
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이배체 세포
0
10
20
30
40
50
wt
CO3
CO6

도면21

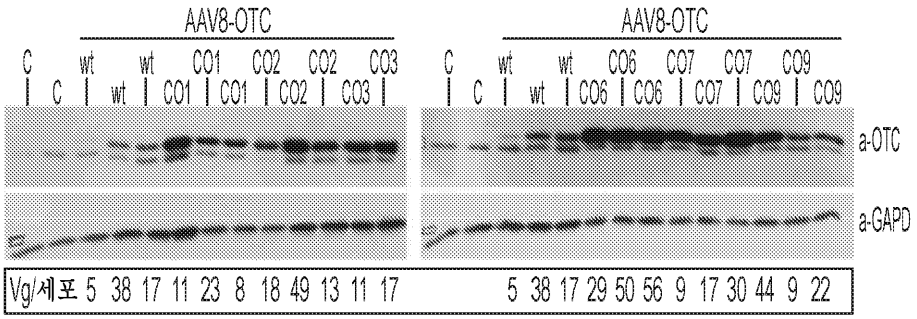

AAV8-OTC
AAV8-OTC
C C wt wt wt CO1 CO1 CO2 CO2 CO3 CO3
C C wt wt CO6 CO6 CO7 CO7 CO9 CO9
a-OTC
a-TUB
Vg/세포 1.6 2 3 4 0.7 2 2 6 5 7 3 9
1.6 2 3 2 2 0.24 14 5 9 6 2 0.09

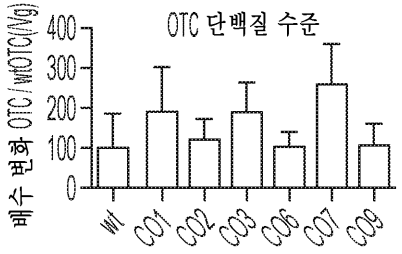

WB 정량화
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
300
200
100
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9

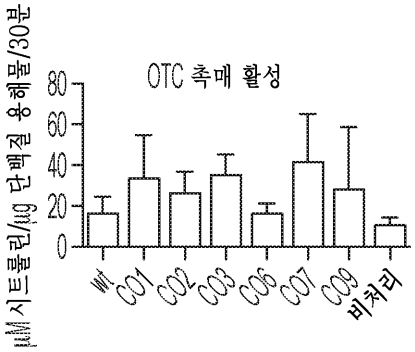

OTC 촉매 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
600
400
200
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9 비처리

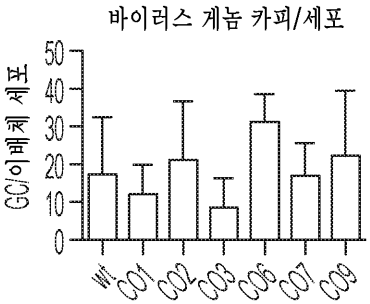

바이러스 게놈 카피/세포
GC/이뻐체 세포
20
15
10
5
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9

도면22

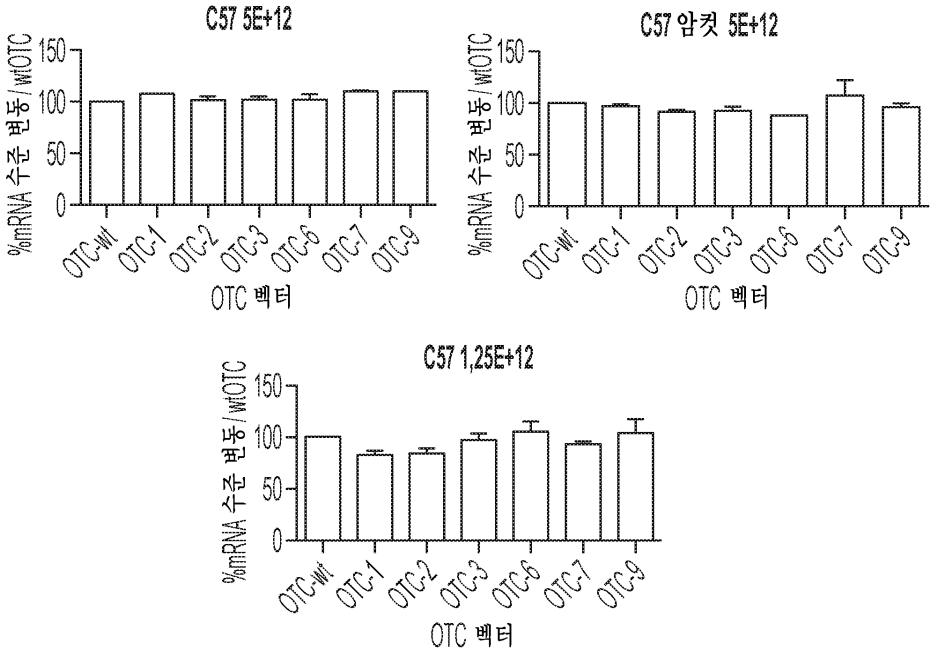

AAV8-OTC
AAV8-OTC
C C wt wt wt wt CO1 CO1 CO2 CO2 CO3 CO3
C C wt wt CO6 CO6 CO7 CO7 CO9 CO9
a-OTC
a-GAPD
Vg/세포 5 38 17 11 23 8 18 49 13 11 17
5 38 17 29 50 56 9 17 30 44 9 22


OTC 단백질 수준
배수 변화 OTC / wtOTC(Vg)
400
300
200
100
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9

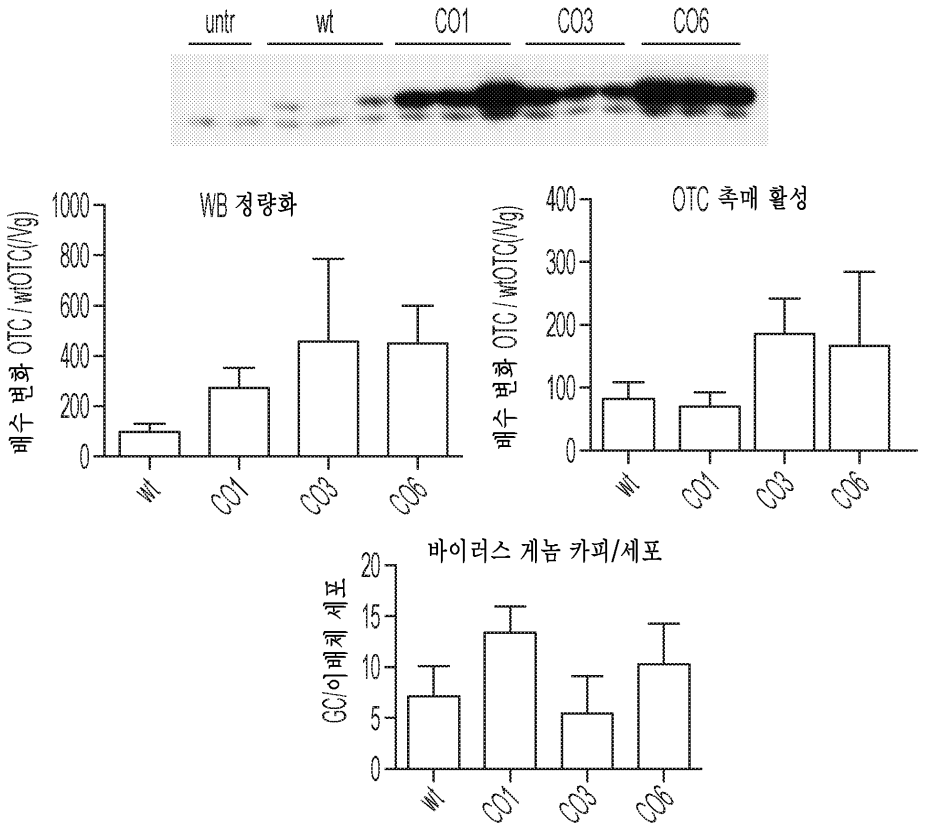

OTC 촉매 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
80
60
40
20
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9 비처리


바이러스 게놈 카피/세포
GC/이배체 세포
50
40
30
20
10
0
wt CO1 CO2 CO3 CO6 CO7 CO9

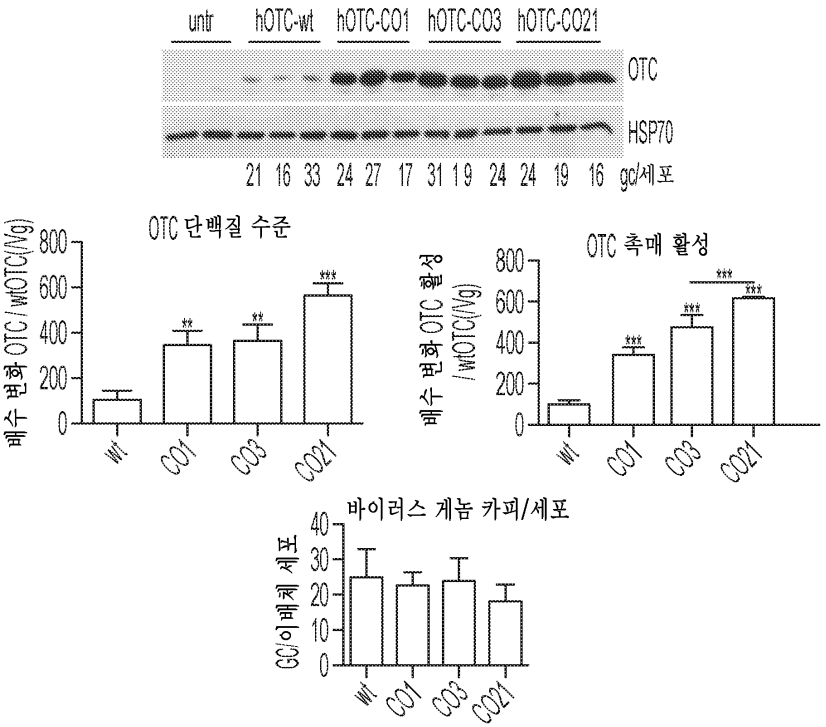
도면23


C57 5E+12
%mRNA 수준 변동 / wtOTC
150
100
50
0
OTC-wt
OTC-1
OTC-2
OTC-3
OTC-6
OTC-7
OTC-9
OTC 벡터
C57 암컷 5E+12
%mRNA 수준 변동 / wtOTC
150
100
50
0
OTC-wt
OTC-1
OTC-2
OTC-3
OTC-6
OTC-7
OTC-9
OTC 벡터
C57 1,25E+12
%mRNA 수준 변동 / wtOTC
150
100
50
0
OTC-wt
OTC-1
OTC-2
OTC-3
OTC-6
OTC-7
OTC-9
OTC 벡터

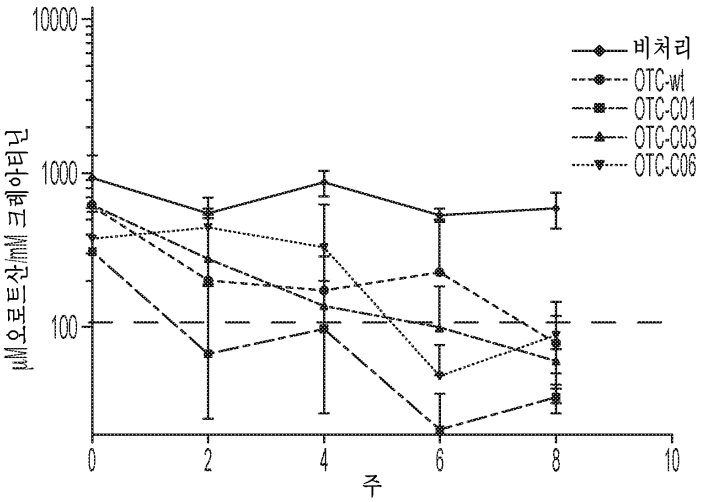
도면24


untr
wt
CO1
CO3
CO6
WB 정량화
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
1000
800
600
400
200
0
wt
CO1
CO3
CO6
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
400
300
200
100
0
wt
CO1
CO3
CO6
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이베체 세포
20
15
10
5
0
wt
CO1
CO3
CO6

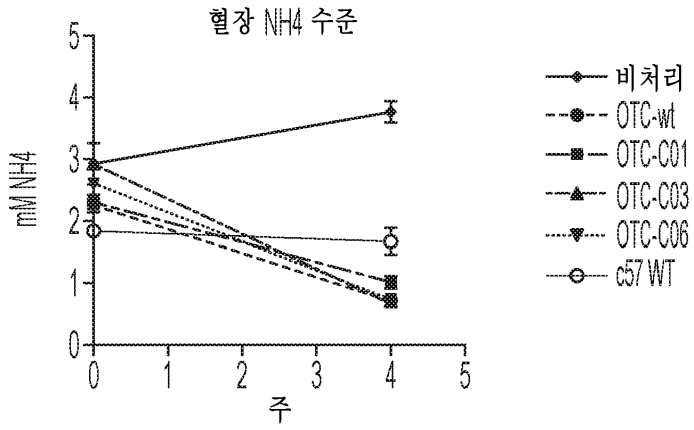
도면25


untr
hOTC-wt
hOTC-CO1
hOTC-CO3
hOTC-CO21
OTC
HSP70
21 16 33 24 27 17 31 19 24 24 19 16 gc/세포
OTC 단백질 수준
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC 활성 / wtOTC(/Vg)
wt
CO1
CO3
CO21
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이배체 세포

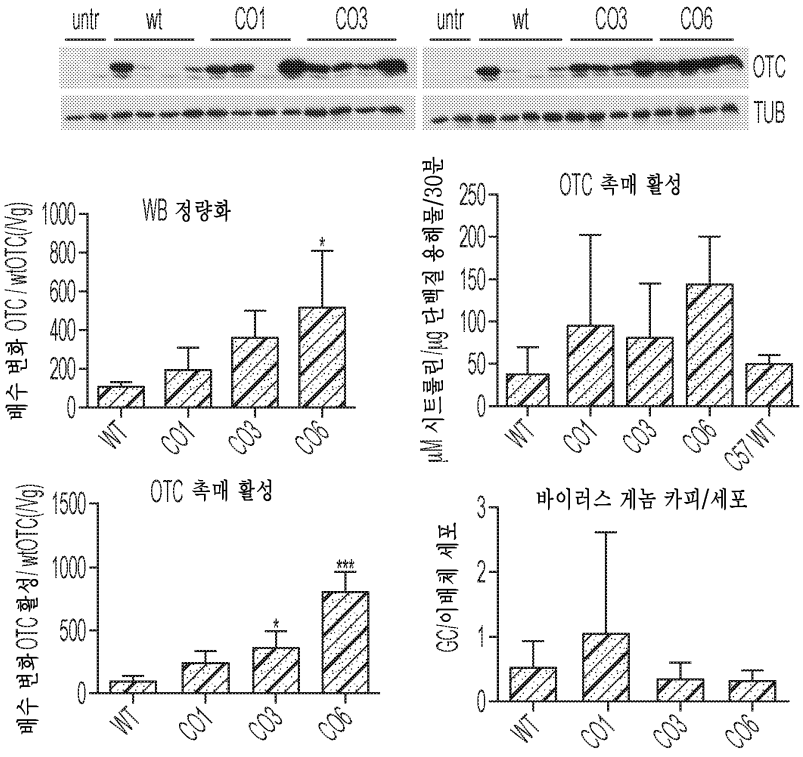
도면26


비처리
OTC-wt
OTC-C01
OTC-C03
OTC-C06
μM 오르트산/mM 크레아티닌
주

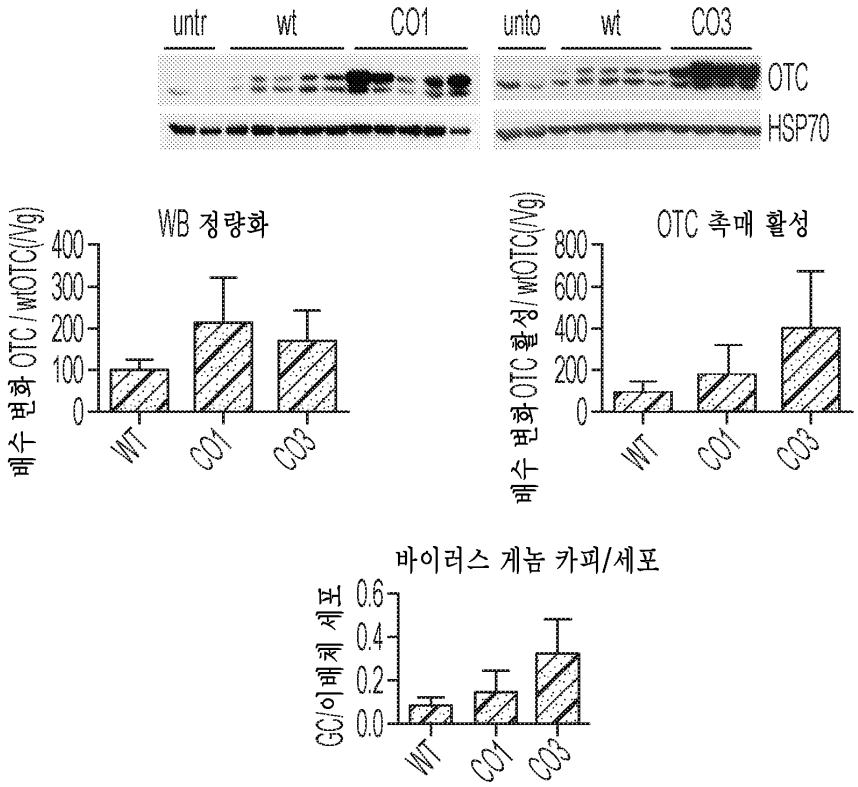
도면27


혈장 NH4 수준
mM NH4
주
비처리
OTC-wt
OTC-C01
OTC-C03
OTC-C06
c57 WT

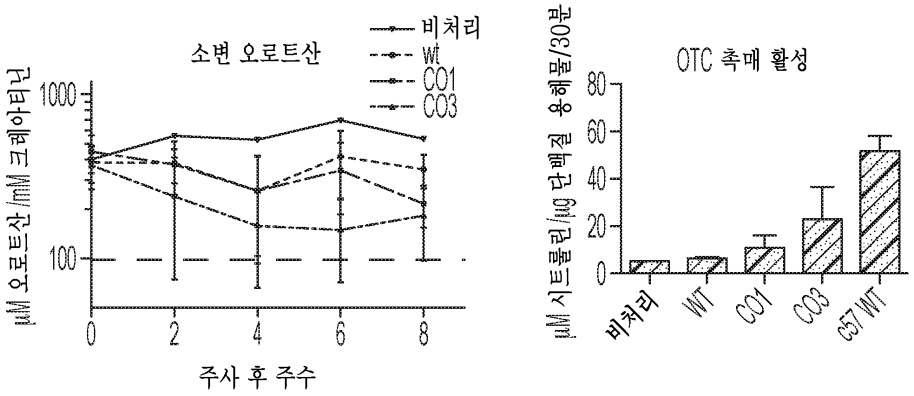
도면28


untr
wt
C01
C03
C06
OTC
TUB
WB 정량화
배수 변화 OTC / wtOTC(IVg)
OTC 촉매 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC 활성 / wtOTC(IVg)
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이베케 세포
WT
C01
C03
C06
C57 WT

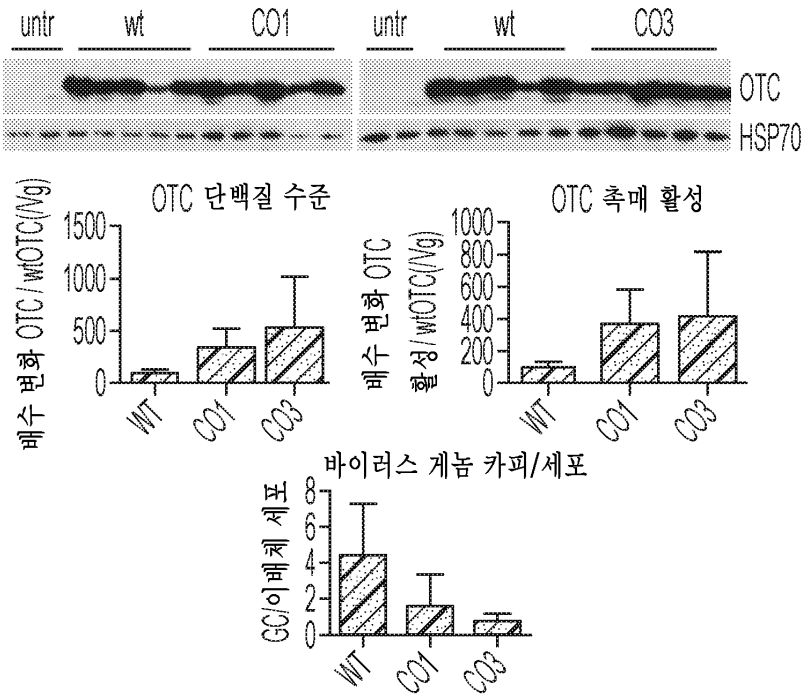
도면29


untr
wt
CO1
unto
wt
CO3
OTC
HSP70
WB 정량화
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
400
300
200
100
0
WT
CO1
CO3
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC 활성/ wtOTC(/Vg)
800
600
400
200
0
WT
CO1
CO3
바이러스 게놈 카피/세포
CC/이뮤세 세포
0.6
0.4
0.2
0.0
WT
CO1
CO3

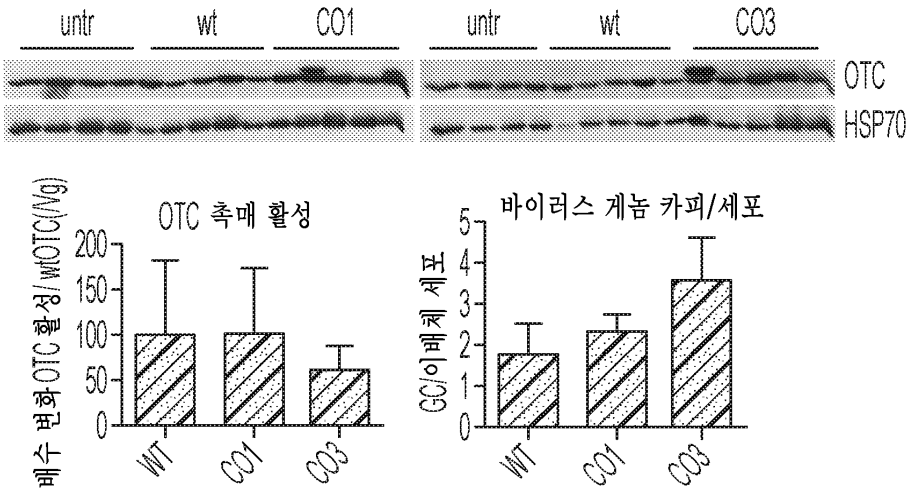
도면30


소변 오로트산
비처리
wt
CO1
CO3
μM 오로트산 /mM 크레아티닌
1000
100
0
2
4
6
8
주사 후 주수
OTC 촉매 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
80
60
40
20
0
비처리
WT
CO1
CO3
c57 WT

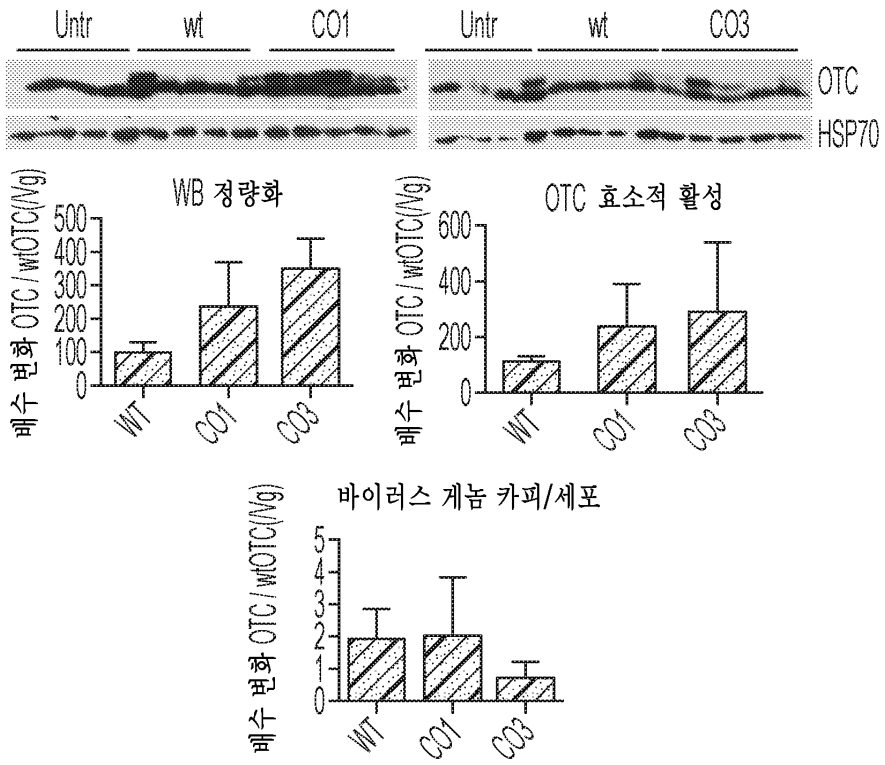
도면31


untr
wt
CO1
untr
wt
CO3
OTC
HSP70
OTC 단백질 수준
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
1500
1000
500
0
WT
CO1
CO3
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC 활성 / wtOTC(/Vg)
1000
800
600
400
200
0
WT
CO1
CO3
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이뮤세 세포
8
6
4
2
0
WT
CO1
CO3

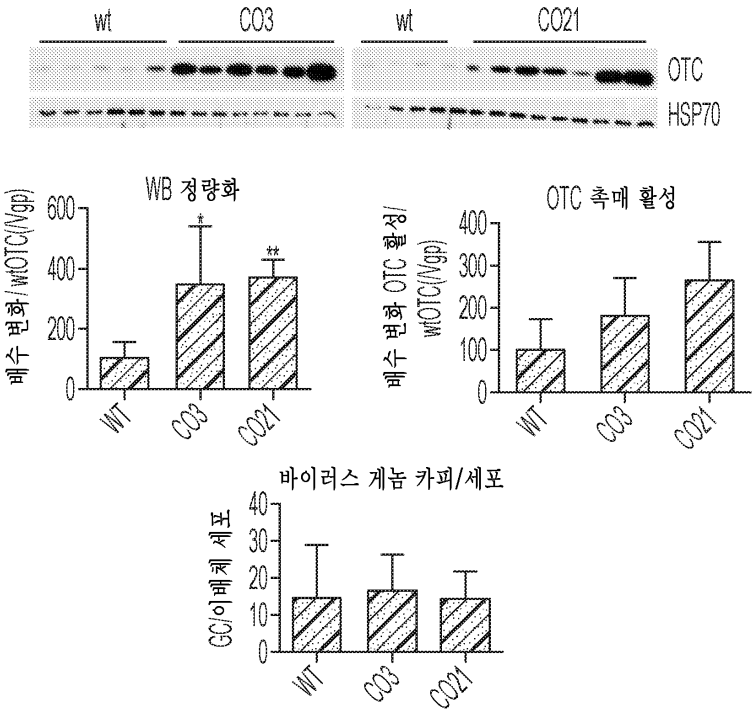
도면32


untr
wt
CO1
untr
wt
CO3
OTC
HSP70
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC 활성 / wtOTC(/Vg)
200
150
100
50
0
WT
CO1
CO3
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이뮤세 세포
5
4
3
2
1
0
WT
CO1
CO3

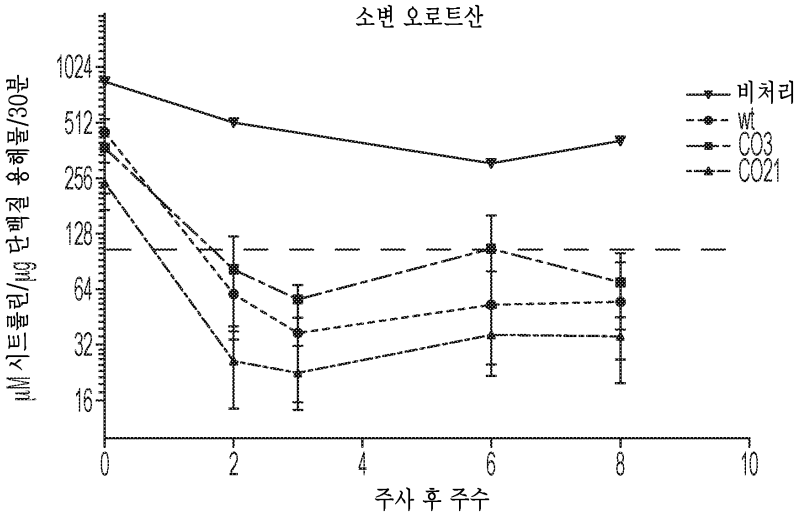
도면33


Untr
wt
CO1
Untr
wt
CO3
OTC
HSP70
WB 정량화
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
500
400
300
200
100
0
WT
CO1
CO3
OTC 효소적 활성
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
600
400
200
0
WT
CO1
CO3
바이러스 게놈 카피/세포
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
5
4
3
2
1
0
WT
CO1
CO3

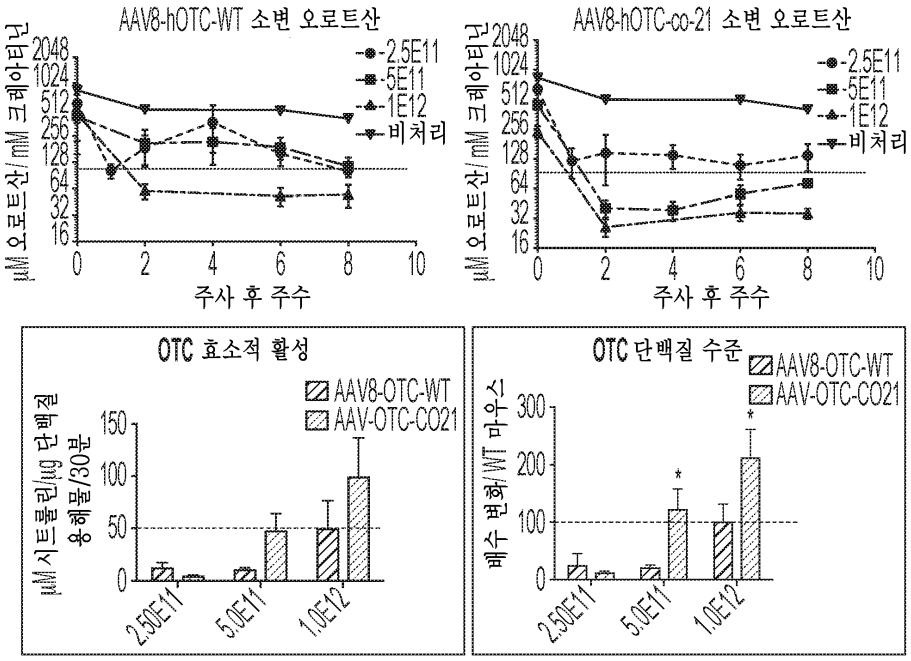
도면34


wt
CO3
wt
CO21
OTC
HSP70
WB 정량화
배수 변화 / wtOTC(/Vgp)
600
400
200
0
*
**
WT
CO3
CO21
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC 활성 / wtOTC(/Vgp)
400
300
200
100
0
WT
CO3
CO21
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이배체 세포
40
30
20
10
0
WT
CO3
CO21

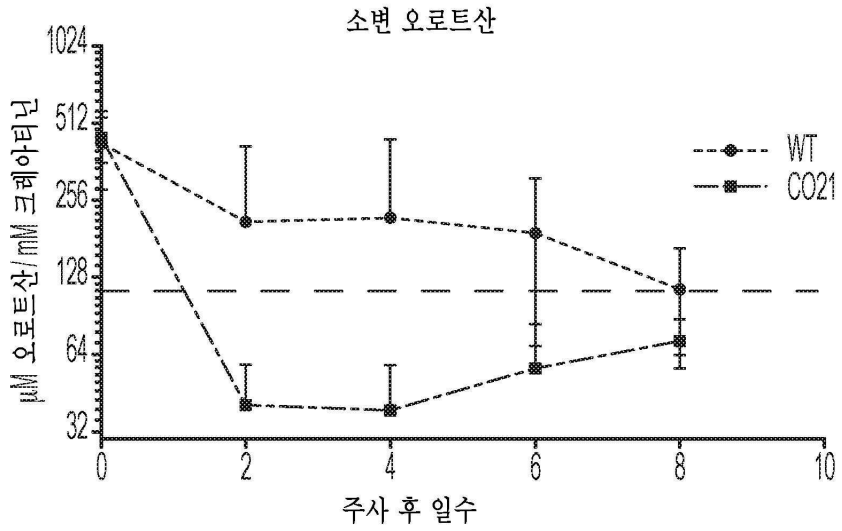
도면35


소변 오로트산
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
1024
512
256
128
64
32
16
0
2
4
6
8
10
주사 후 주수
비처리
wt
CO3
CO21

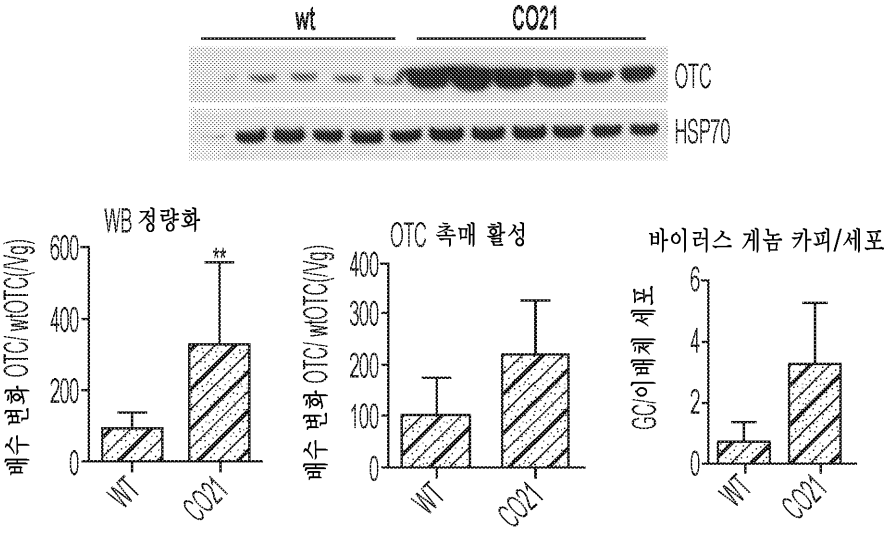
도면36


AAV8-hOTC-WT 소변 오로트산
μM 오로트산/mM 크레아티닌
2048
1024
512
256
128
64
32
16
0
2
4
6
8
10
주사 후 주수
2.5E11
5E11
1E12
비처리
AAV8-hOTC-co-21 소변 오로트산
μM 오로트산/mM 크레아티닌
주사 후 주수
OTC 효소적 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
150
100
50
0
2.50E11
5.0E11
1.0E12
AAV8-OTC-WT
AAV-OTC-CO21
OTC 단백질 수준
배수 변화/WT 마우스
300
200
100
0
*

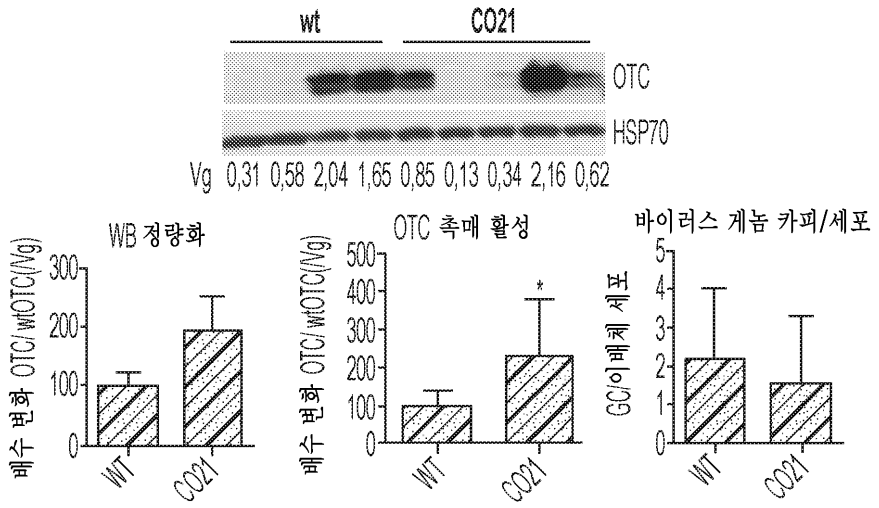
도면37


소변 오로트산
1024
512
256
128
64
32
μM 오로트산/mM 크레아티닌
0
2
4
6
8
10
주사 후 일수
WT
CO21

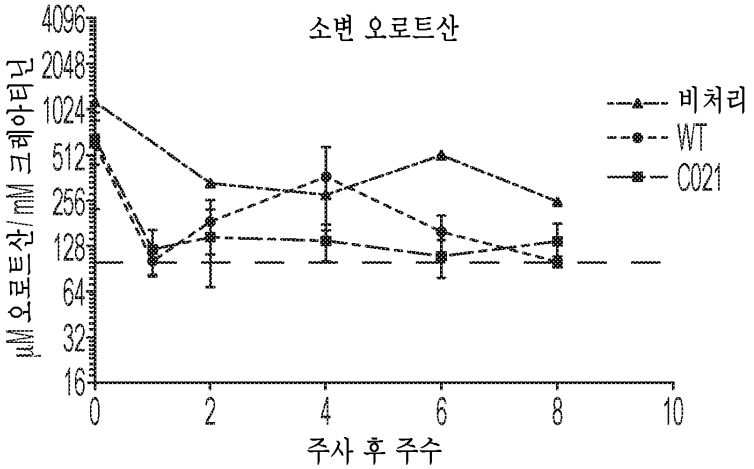
도면38


wt
CO21
OTC
HSP70
WB 정량화
배수 변화 OTC/ wtOTC(/Vg)
600
400
200
0
**
WT
CO21
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC/ wtOTC(/Vg)
400
300
200
100
0
WT
CO21
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이베게 세포
6
4
2
0
WT
CO21

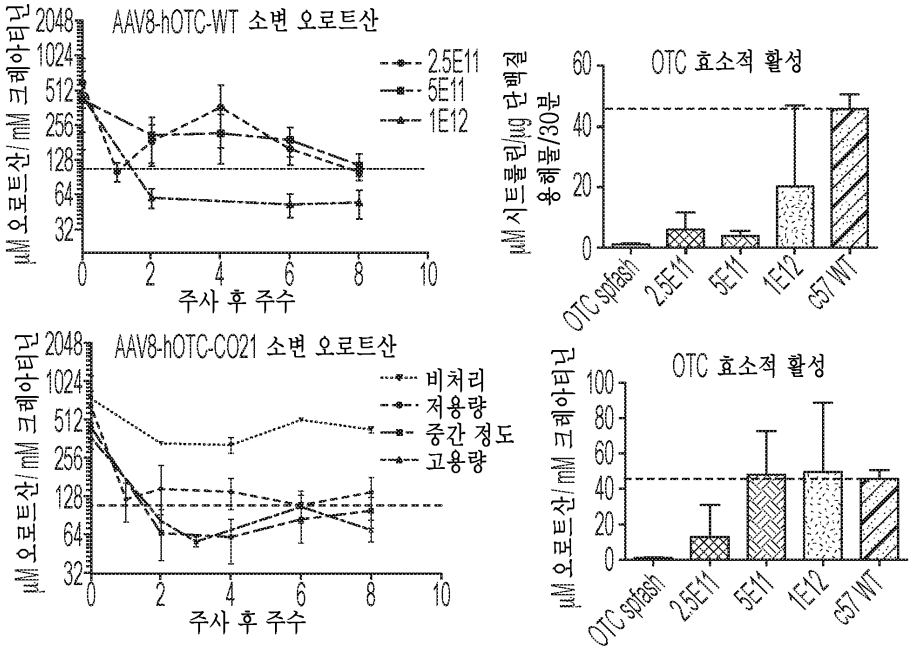
도면39


wt
C021
OTC
HSP70
Vg 0,31 0,58 2,04 1,65 0,85 0,13 0,34 2,16 0,62
WB 정량화
배수 변화 OTC/wtOTC(/Vg)
300
200
100
0
WT
C021
OTC 촉매 활성
배수 변화 OTC/wtOTC(/Vg)
500
400
300
200
100
0
*
WT
C021
바이러스 게놈 카피/세포
GC/이배체 세포
5
4
3
2
1
0
WT
C021

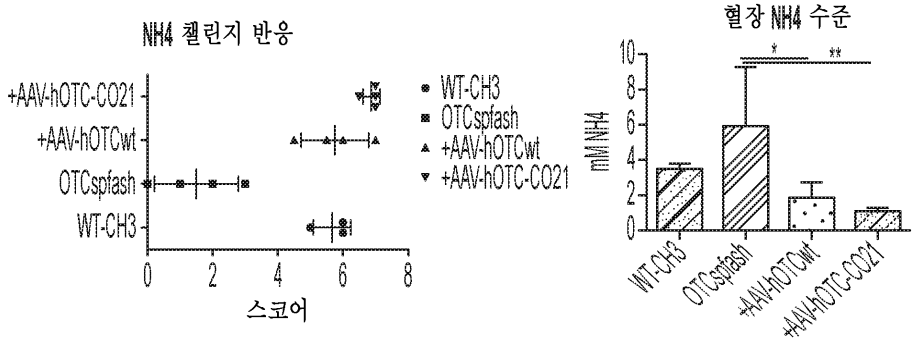
도면40

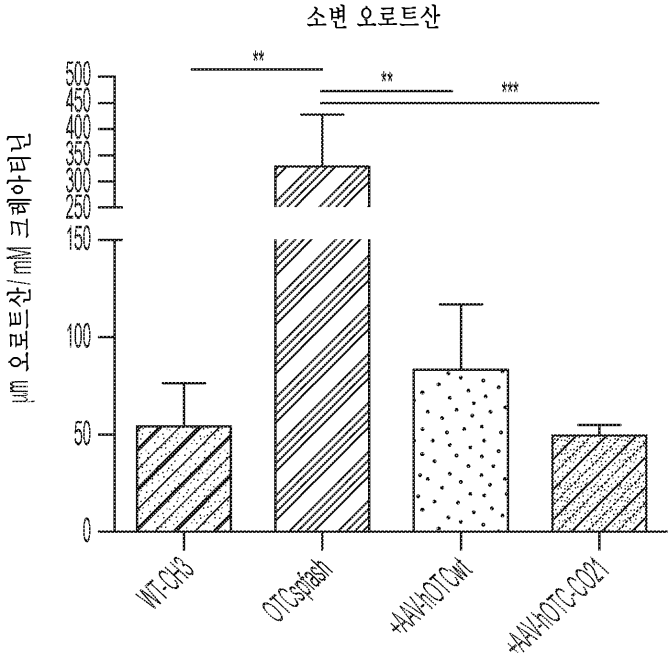

소변 오로트산
μM 오로트산/mM 크레아티닌
4096
2048
1024
512
256
128
64
32
16
0
2
4
6
8
10
주사 후 주수
비처리
WT
C021

도면41

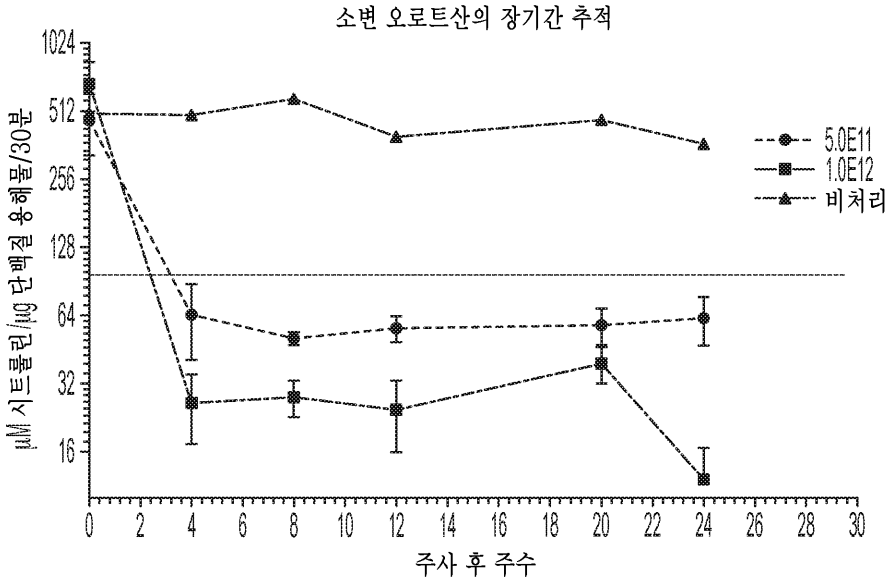

AAV8-hOTC-WT 소변 오로트산
μM 오로트산/mM 크레아티닌
2048
1024
512
256
128
64
32
0
2
4
6
8
10
주사 후 주수
2.5E11
5E11
1E12
OTC 효소적 활성
μM 시트룰린/μg 단백질
용해물/30분
60
40
20
0
OTC splash
2.5E11
5E11
1E12
c57 WT
AAV8-hOTC-CO21 소변 오로트산
비처리
저용량
중간 정도
고용량
OTC 효소적 활성
100
80
60
40
20

도면42

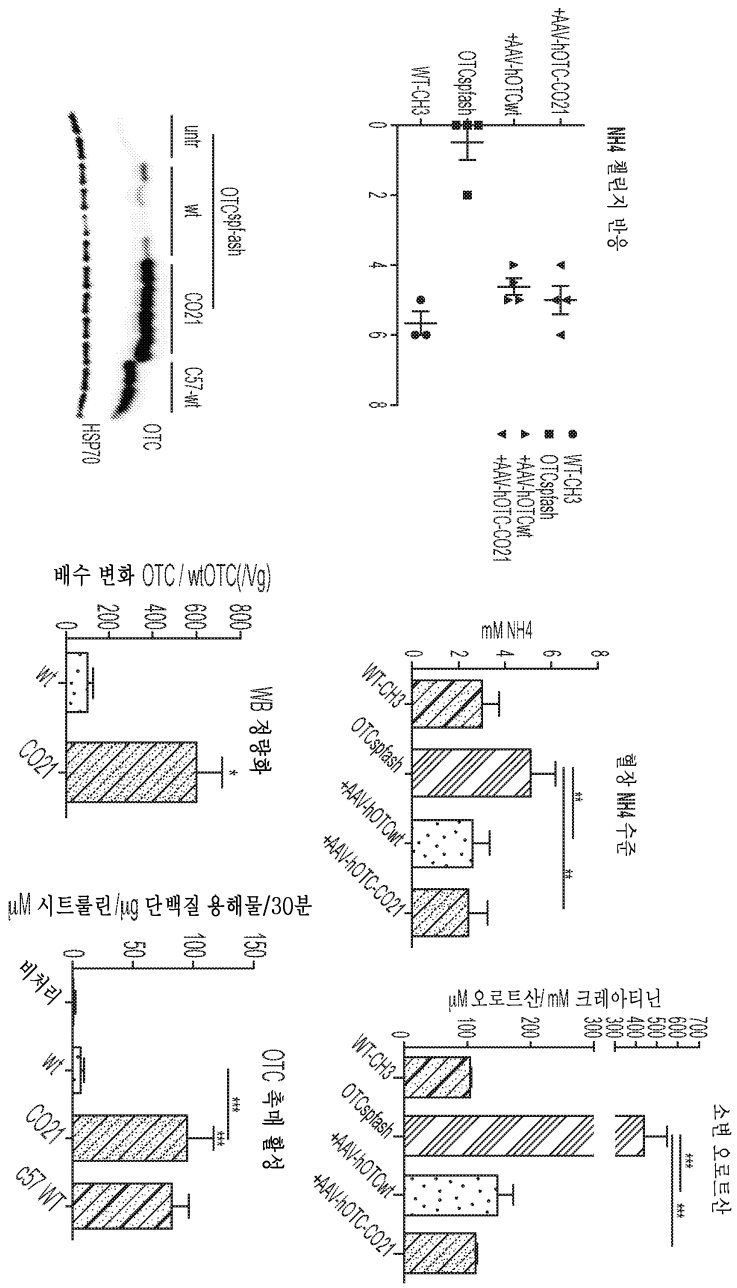

NH4 챌린지 반응
+AAV-hOTC-CO21
+AAV-hOTCwt
OTCspfash
WT-CH3
0
2
4
6
8
스코어
WT-CH3
OTCspfash
+AAV-hOTCwt
+AAV-hOTC-CO21
혈장 NH4 수준
mM NH4
10
8
6
4
2
0
*
**
WT-CH3
OTCspfash
+AAV-hOTCwt
+AAV-hOTC-CO21


소변 오로트산
μm 오로트산/mM 크레아티닌
500
450
400
350
300
250
150
100
50
0
**
**
***
WT-CH3
OTCspfash
+AAV-hOTCwt
+AAV-hOTC-CO21

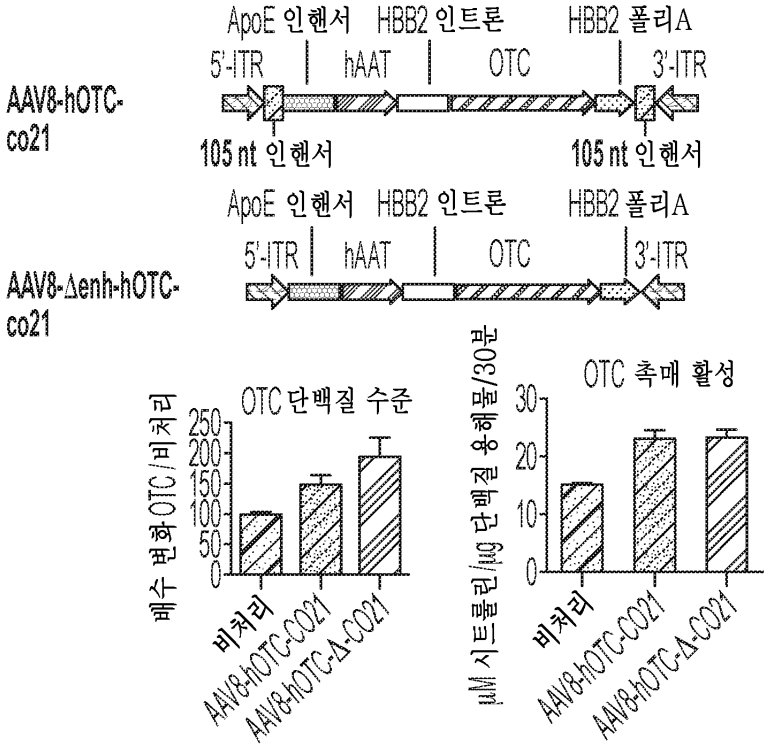
도면43


소변 오로트산의 장기간 추적
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
1024
512
256
128
64
32
16
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
주사 후 주수
5.0E11
1.0E12
비처리

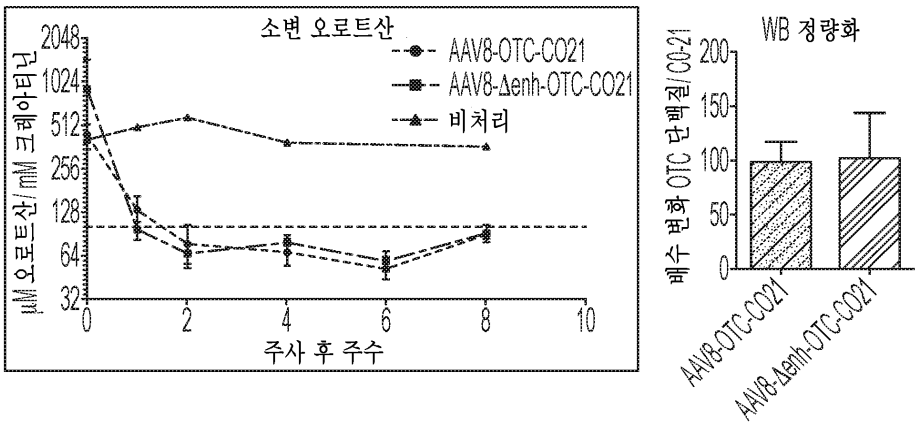
도면44


NH4 챌린지 반응
WT-CH3
OTCsplash
+AAV-hOTCwt
+AAV-hOTC-CO21
mM NH4
혈장 NH4 수준
μM 오로트산/mM 크레아티닌
소변 오로트산
OTCsplash
unTr
wt
CO21
C57-wt
OTC
HSP70
배수 변화 OTC / wtOTC(/Vg)
WB 정량화
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
비처리
C57 WT
OTC 촉매 활성

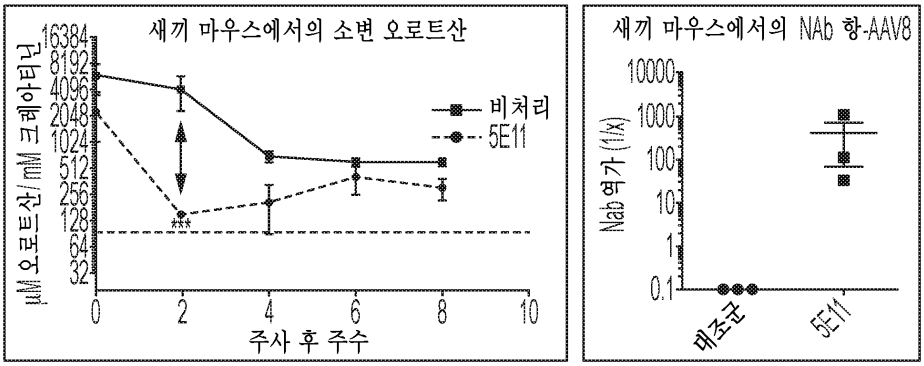
도면45


AAV8-hOTC-co21
ApoE 인핸서
HBB2 인트론
HBB2 폴리A
5'-ITR
hAAT
OTC
3'-ITR
105 nt 인핸서
105 nt 인핸서
AAV8-Δenh-hOTC-co21
ApoE 인핸서
HBB2 인트론
HBB2 폴리A
5'-ITR
hAAT
OTC
3'-ITR
OTC 단백질 수준
배수 변화 OTC/비처리
250
200
150
100
50
0
비처리
AAV8-hOTC-CO21
AAV8-hOTC-Δ-CO21
OTC 촉매 활성
μM 시트룰린/μg 단백질 용해물/30분
30
20
10
0
비처리
AAV8-hOTC-CO21
AAV8-hOTC-Δ-CO21

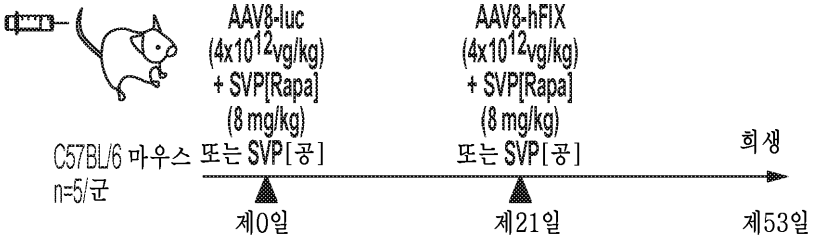
도면46

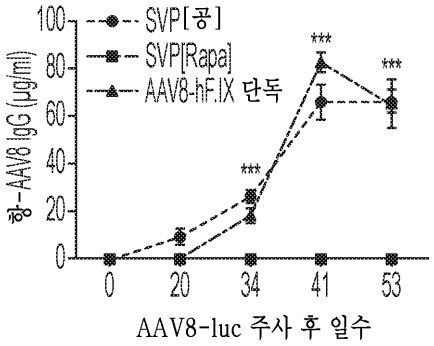

소변 오로트산
μM 오로트산/mM 크레아티닌
2048
1024
512
256
128
64
32
0
2
4
6
8
10
주사 후 주수
AAV8-OTC-CO21
AAV8-Δenh-OTC-CO21
비처리
WB 정량화
배수 변화 OTC 단백질/CO-21
200
150
100
50
0
AAV8-OTC-CO21
AAV8-Δenh-OTC-CO21

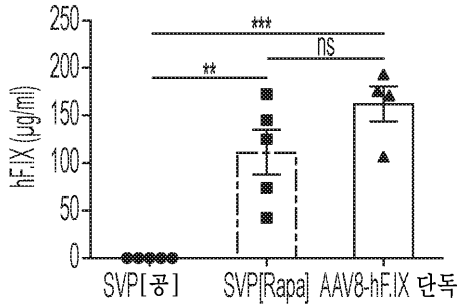
도면47



도면48

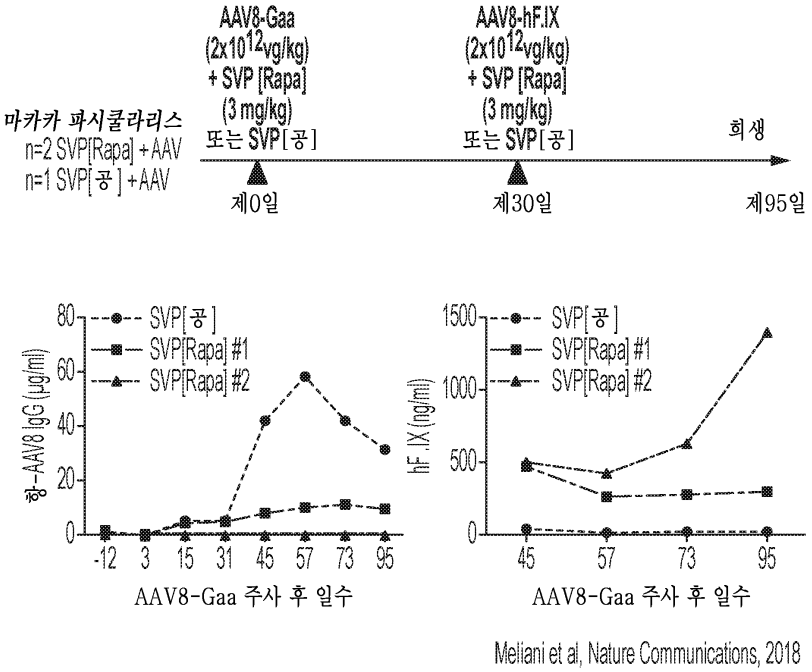






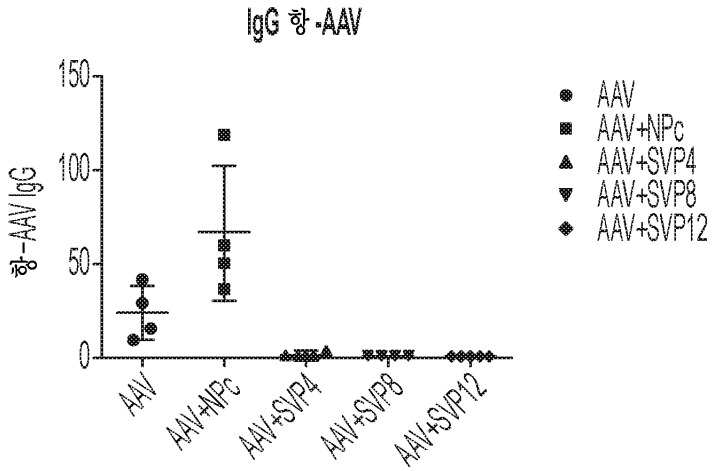
Meliani et al, Nature Communications, 2018

도면49



Meliani et al, Nature Communications, 2018

도면50



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Selecta Biosciences, Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS OF OTC CONSTRUCTS AND VECTORS

<130> S1681.70096WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/839,766

<151> 2019-04-08

<150> US 62/698,503

<151> 2018-07-16

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 1

gtcgacgccg ccaccatgct gtttaatctg aggatcctgt taaacaatgc agcttttaga 60

aatggtcaca acttcatggt tcgaaatttt cggtgtggac aaccactaca aaataaagtg 120

cagctgaagg gccgtgacct tctcactcta aaaaacttta ccggagaaga aattaaatat 180

atgctatggc tatcagcaga tctgaaattt aggataaaac agaaaggaga gtatttgcct 240

ttattgcaag ggaagtcctt aggcatgatt tttgagaaaa gaagtactcg aacaagattg 300

tctacagaaa caggctttgc acttctggga ggacatcctt gttttcttac cacacaagat 360

attcatttgg gtgtgaatga aagtctcacg gacacggccc gtgtattgtc tagcatggca 420

gatgcagtat tggctcgagt gtataaacaa tcagatttgg acaccctggc taaagaagca 480

tccatcccaa ttatcaatgg gctgtcagat ttgtaccatc ctatccagat cctggctgat 540

tacctcacgc tccaggaaca ctatagctct ctgaaaggtc ttaccctcag ctggatcggg 600

gatgggaaca atatcctgca ctccatcatg atgagcgcag cgaaattcgg aatgcacctt 660

caggcagcta ctccaaaggg ttatgagccg gatgctagtg taaccaagtt ggcagagcag 720

tatgccaaag agaatggtac caagctgttg ctgacaaatg atccattgga agcagcgcat 780

ggaggcaatg tattaattac agacacttgg ataagcatgg gacaagaaga ggagaagaaa 840

aagcggctcc aggctttcca aggttaccag gttacaatga agactgctaa agttgctgcc 900

tctgactgga catttttaca ctgcttgccc agaaagccag aagaagtgga tgatgaagtc 960

ttttattctc ctcgatcact agtgttccca gaggcagaaa acagaaagtg gacaatcatg 1020

gctgtcatgg tgtccctgct gacagattac tcacctcagc tccagaagcc taaattttga 1080

taagaattc 1089

<210> 2

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 2

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cgaatcctgc tgaacaacgc cgcttttcgg 60

aacgggcaca actttatggt gaggaacttt cgctgcggac agcccctcca gaataaggtc 120

cagctgaagg gcagggacct gctgaccctg aaaaatttca caggggagga aatcaagtat 180

atgctgtggc tgtcagctga tctgaagttc cggatcaagc agaagggcga atatctgcct 240

ctgctccagg gcaaaagcct ggggatgatc ttcgaaaagc gcagtactcg gaccagactg 300

tcaaccgaga ctggattcgc tctgctggga ggacaccctt gttttctgac cactcaggac 360

attcacctgg gagtgaacga gtccctgacc gacactgctc gcgtcctgag ctctatggcc 420

gacgctgtgc tggctcgagt ctacaaacag tccgacctgg ataccctggc caaggaagct 480

tctatcccaa ttattaacgg cctgtcagac ctgtatcacc ccatccagat tctggccgat 540

tacctgaccc tccaggagca ctattctagt ctgaaagggc tgacactgag ttggattggg 600

gacggaaaca atatcctgca ctctattatg atgtcagccg ccaagtttgg aatgcacctc 660

caggctgcaa ccccaaaagg ctacgaaccc gatgcctcag tgacaaagct ggctgaacag 720

tacgccaaag agaacggcac taagctgctg ctgaccaacg accctctgga ggccgctcac 780

ggaggcaacg tgctgatcac cgatacctgg attagtatgg gacaggagga agagaagaag 840

aagcggctcc aggccttcca gggctaccag gtgacaatga aaaccgctaa ggtcgcagcc 900

agcgattgga cctttctgca ctgcctgccc agaaagcccg aagaggtgga cgacgaggtc 960

ttctactctc ccagaagcct ggtgtttccc gaagctgaga ataggaagtg gacaattatg 1020

gcagtgatgg tcagcctgct gactgattat tcacctcagc tccagaaacc aaagttctga 1080

taagaattc 1089

<210> 3

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 3

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cgaatcctgc tgaacaacgc cgcttttcgg 60

aacgggcaca actttatggt ccgcaacttt cgctgcggac agcccctcca gaataaggtc 120

cagctgaagg gcagggacct gctgaccctg aaaaatttca caggggagga aatcaagtat 180

atgctgtggc tgtcagctga tctgaagttc cggatcaagc agaagggcga atatctgcca 240

ctgctgcagg gcaaaagcct ggggatgatc ttcgaaaagc gcagtactcg gaccagactg 300

tcaaccgaga ctggattcgc tctgctggga ggacaccctt gttttctgac aactcaggac 360

attcacctgg gagtgaacga gtccctgacc gacactgctc gcgtcctgag ctctatggcc 420

gacgctgtgc tggctcgagt ctacaaacag tccgacctgg ataccctggc caaggaagct 480

tctatcccaa ttattaacgg cctgtcagac ctgtatcacc ccatccagat tctggccgat 540

tacctgaccc tccaggagca ctattctagt ctgaaagggc tgacactgag ttggattggg 600

gacggaaaca atatcctgca ctctattatg atgtcagccg ccaagtttgg aatgcacctc 660

caggctgcaa ccccaaaagg ctacgaaccc gatgcctcag tgacaaagct ggctgaacag 720

tacgccaaag agaacggcac taagctgctg ctgaccaacg accctctgga ggccgctcac 780

ggaggcaacg tgctgatcac cgatacctgg attagtatgg gacaggagga agagaagaag 840

aagcggctcc aggccttcca gggctaccag gtcaccatga aaaccgctaa ggtcgcagcc 900

agcgattgga cctttctgca ctgcctgccc agaaagcccg aagaggtgga cgacgaggtc 960

ttctactctc cacgctccct ggtgtttccc gaagctgaga ataggaagtg gacaattatg 1020

gcagtgatgg tcagcctgct gactgattat tcacctcagc tccagaaacc aaagttctga 1080

taagaattc 1089

<210> 4

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 4

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg agaatcctgc tgaacaacgc cgcctttcgg 60

aacggccaca acttcatggt ccgcaacttc cgctgcggcc agccactgca gaacaaggtg 120

cagctgaagg gcagagacct gctgaccctg aagaacttca ccggcgagga gatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga tctgaagttc agaatcaagc agaagggcga gtacctgcca 240

ctgctgcagg gcaaaagcct gggcatgatc ttcgaaaagc gctccacccg gaccagactg 300

agcaccgaga ccggcttcgc tctgctggga ggccaccctt gcttcctgac aacccaggac 360

atccacctgg gcgtgaacga gtccctgacc gacaccgcca gagtgctgag ctctatggcc 420

gacgccgtgc tggctcgggt gtacaaacag tccgacctgg ataccctggc caaggaagct 480

tccatcccaa ttattaacgg cctgtccgac ctgtatcacc ccatccagat tctggccgat 540

tacctgaccc tgcaggagca ctatagcagc ctgaagggcc tgacactgtc ttggatcggc 600

gacggaaata atatcctgca ctctattatg atgtctgccg ccaagtttgg aatgcacctg 660

caggctgcta cccctaaagg ctacgaaccc gatgcctctg tgacaaagct ggctgaacag 720

tacgccaaag agaacggcac aaagctgctg ctgaccaacg accctctgga ggccgctcac 780

ggaggcaacg tgctgatcac cgatacctgg atttctatgg gacaggagga agagaagaag 840

aagcggctgc aggccttcca gggctaccag gtcaccatga aaaccgctaa ggtggccgcc 900

agcgattgga cctttctgca ctgcctgccc agaaagcccg aagaggtgga cgacgaggtg 960

ttctacagcc cccggagcct ggtgtttccc gaagctgaga atcggaaatg gacaattatg 1020

gctgtgatgg tgtccctgct gactgattat tctcctcaac tgcagaaacc taaattttga 1080

taagaattc 1089

<210> 5

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 5

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cgcatcctgc tgaacaacgc cgccttccgc 60

aacggccaca acttcatggt cagaaacttc cgctgcggcc agcccctgca aaacaaagtg 120

cagctgaagg gccgcgacct gctgaccctg aagaacttca ccggcgagga gatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga cctgaagttc cgcatcaagc agaagggcga gtacctgcca 240

ctgctgcaag gcaagagcct gggcatgatc ttcgagaagc gcagcacccg cacccgcctg 300

agcaccgaga ccggcttcgc cctgctgggc ggccaccccc gcttcctgac aacacaggac 360

atccacctgg gcgtgaacga gagcctgacc gacaccgccc gcgtgctgag cagcatggcc 420

gacgccgtgc tggcccgcgt gtacaagcag agcgacctgg acaccctggc caaggaggcc 480

agcatcccca tcatcaacgg cctgagcgac ctgtaccacc ccatccagat cctggccgac 540

tacctgaccc tgcaggagca ctacagcagc ctgaagggcc tgaccctgag ctggatcggc 600

gacggcaaca atatcctgca cagtattatg atgagcgccg ccaagttcgg aatgcacctg 660

caggccgcca cccccaaggg ctacgagccc gacgccagcg tgaccaagct ggccgagcag 720

tacgccaagg agaacggcac caagctgctg ctgaccaacg acccccctgga ggccgcccac 780

ggcggcaacg tgctgatcac cgacacctgg atctctatgg gccaggagga ggagaagaag 840

aagcgcctgc aggccttcca gggctaccag gtcactatga agaccgccaa ggtggccgcc 900

agcgactgga ccttcctgca ctgcctgccc cgcaagcccg aggaggtgga cgacgaggtg 960

ttctacagcc cccgcagcct ggtgttcccc gaggccgaga accgcaagtg gactattatg 1020

gccgtgatgg tctccctgct gaccgactac agcccccagc tgcagaagcc caagttctga 1080

taagaattc 1089

<210> 6

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 6

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cggatcctgc tgaacaacgc cgccttcaga 60

aacggccaca acttcatggt ccgaaacttc agatgcggcc agcctctgca gaacaaggtg 120

cagctgaagg gcagagatct gctgaccctg aagaacttca ccggcgaaga gatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga cctgaagttc cggattaagc agaagggcga gtacctgcca 240

ctgctgcagg gaaagtctct gggcatgatc ttcgagaagc ggagcaccag aaccagactg 300

agcaccgaga caggctttgc cctgctcgga ggacacccct gctttctgac aacacaggat 360

atccacctgg gcgtgaacga gagcctgacc gatacagcca gagtgctgag cagcatggct 420

gatgccgtgc tggccagagt gtacaagcag agcgatctgg acaccctggc caaagaggcc 480

agcattccca tcatcaacgg cctgagcgac ctgtatcacc ccatccagat cctggccgac 540

tacctgacac tgcaagagca ctacagcagc ctgaagggac tgaccctgtc ttggatcggc 600

gacggcaaca acatcctgca ctctattatg atgagcgccg ccaagttcgg aatgcacctg 660

caggccgcta cacccaaggg ctatgagcct gatgccagcg tgacaaagct ggccgagcag 720

tacgccaaag agaacggcac aaagctgctg ctgaccaacg atcccctgga agctgcccac 780

ggcggcaatg tgctgatcac cgatacctgg atctctatgg gccaagagga agagaagaag 840

aagcggctgc aggccttcca gggctaccaa gtgacaatga agaccgccaa ggtggccgcc 900

agcgattgga cctttctgca ctgcctgcct cggaagcctg aagaggtgga cgacgaggtg 960

ttctacagcc ctagaagcct ggtgttcccc gaggccgaga acagaaagtg gaccatcatg 1020

gctgtgatgg tgtccctgct gaccgactac tctccccagc tgcagaagcc caagttctga 1080

taagaattc 1089

<210> 7

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 7

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cggatcctgc tgaacaacgc cgccttccgg 60

aacggccaca acttcatggt ccggaacttc cgctgtggcc agcccctgca gaacaaggtg 120

cagctgaagg gcagggacct gctgaccctg aagaacttca ccggcgaaga gatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga cctgaagttc cggatcaagc agaagggcga gtacctgcca 240

ctgctgcagg gcaagtctct gggcatgatc ttcgagaagc ggagcacccg gacccggctg 300

tctaccgaga caggatttgc cctgctgggc ggccaccctt gctttctgac aacacaggat 360

atccacctgg gcgtgaacga gagcctgacc gacacagcca gagtgctgag cagcatggcc 420

gacgccgtgc tggccagagt gtacaagcag agcgacctgg acaccctggc caaagaggcc 480

agcatcccca tcatcaacgg cctgtccgac ctgtaccacc ccatccagat cctggcagac 540

tacctcacac tgcaggaaca ctacagctcc ctgaagggcc tgacactgag ctggatcggc 600

gacggcaaca atatcctgca ctctattatg atgagcgccg ccaagttcgg aatgcacctg 660

caggccgcca cccccaaggg ctacgagcct gacgccagcg tgaccaagct ggccgagcag 720

tacgccaaag agaacggcac caagctgctg ctgaccaacg accctctgga agccgcccac 780

ggcggcaacg tgctgatcac cgatacctgg atctctatgg gccaggaaga ggaaaagaag 840

aagcggctgc aggccttcca gggctaccaa gtgacaatga agaccgccaa agtggccgcc 900

agcgactgga ccttcctgca ctgcctgccc agaaagcccg aagaggtgga cgacgaggtg 960

ttctacagcc cccggtccct ggtgtttccc gaggccgaga accggaagtg gacaattatg 1020

gctgtgatgg tgtctctgct gaccgactac tccccccagc tgcagaagcc caagttctga 1080

taagaattc 1089

<210> 8

<211> 1086

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 8

gtcgacgccg ccaccatgct ctttaatctg agaatcctgc ttaacaacgc cgccttccgc 60

aacggacaca acttcatggt ccggaacttc agatgcggcc agcctctcca aaacaaggtc 120

cagcttaagg gcagagatct gctcaccctc aaaaacttca ccggagagga aatcaagtat 180

atgctgtggc tgtctgccga tcttaagttc cggatcaaac agaaggggga gtaccttccg 240

ctgctgcaag ggaagtcact cggaatgatc ttcgagaagc gctccactcg gaccaggctc 300

agcaccgaaa ctggatttgc actcctgggt ggtcatccct gtttcctgac cacccaagat 360

atccacctgg gcgtgaacga atccctgacc gacacagctc gcgtgctgtc ctccatggcc 420

gacgctgtgt tggcccgggt ctacaagcag agcgacctgg acactctggc caaggaagcc 480

tccattccga tcatcaatgg gctgtccgac ctgtaccacc caattcagat cctggcggat 540

tacttgaccc tgcaagagca ctacagctcc ctgaagggac tgaccctctc ctggattggc 600

gacgggaaca acatcctcca ctcgattatg atgtcggcgg cgaagttcgg catgcatctg 660

caagccgcca ctcctaaggg ttacgaaccg gacgcaagcg tgaccaagct cgccgaacag 720

tacgcgaagg aaaacggcac taagctgctg ctgaccaacg acccccctgga agccgctcac 780

ggcggaaacg tgctgattac ggacacctgg atcagcatgg gacaggagga ggagaagaag 840

aagcggctgc aggcgttcca gggataccag gtcaccatga aaactgccaa agtggcagcc 900

tcagactgga ctttcctgca ctgcctgcct cggaagccag aggaggtgga cgatgaagtg 960

ttctactccc ctcgctccct ggtgttcccg gaggcggaaa acaggaagtg gaccatcatg 1020

gccgtgatgg tgtcattgtt gaccgattac tcgccgcaac tgcagaagcc caagttttga 1080

gaattc 1086

<210> 9

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 9

gtcgacgccg ccaccatgct gtttaatctg agaatcctgc tgaacaatgc tgctttccgc 60

aatgggcaca actttatggt ccgaaacttc cgatgtggac agcctctgca gaacaaggtg 120

cagctgaagg gccgggacct gctgaccctg aagaatttca caggcgagga gatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga tctgaagttt aggatcaagc agaagggcga gtatctgcca 240

ctgctgcagg gcaagtccct gggcatgatc ttcgagaagc ggagcacccg gacaagactg 300

agcaccgaga caggattcgc actgctggga ggacacccat gctttctgac aacacaggac 360

atccacctgg gcgtgaacga gtctctgacc gacacagcac gggtgctgag ctccatggca 420

gatgccgtgc tggccagagt gtacaagcag agcgacctgg ataccctggc caaggaggcc 480

tccatcccca tcatcaatgg cctgtctgac ctgtatcacc caatccagat cctggccgat 540

tacctgaccc tgcaggagca ctattctagc ctgaagggcc tgacactgag ctggatcggc 600

gacggcaaca atatcctgca cagcatcatg atgtccgccg ccaagtttgg aatgcacctg 660

caggcagcaa ccccaaaggg atacgagccc gatgcctccg tgacaaagct ggccgagcag 720

tatgccaagg agaacggcac caagctgctg ctgacaaatg acccactgga ggcagcacac 780

ggaggaaacg tgctgatcac cgatacatgg atctctatgg gccaggagga ggagaagaag 840

aagcggctgc aggccttcca gggctaccag gtgaccatga agacagccaa ggtggccgcc 900

tctgattgga cctttctgca ctgtctgccc cggaagcctg aggaggtgga cgatgaggtg 960

ttctattccc ctcggagcct ggtgttccca gaggcagaga atcgcaagtg gacaatcatg 1020

gccgtgatgg tctccctgct gactgactac tccccacagc tgcagaagcc caagttttga 1080

taagaattc 1089

<210> 10

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 10

gtcgacgccg ccaccatgct cttcaatctc cgaatactcc tgaataatgc ggcattcaga 60

aatgggcaca attttatggt gcgaaatttt cgatgtgggc agcccttgca aaataaagta 120

caacttaaag gcagagatct tcttacgctc aaaaacttta ccggcgaaga gattaagtat 180

atgttgtggc tgtctgctga ccttaaattc cgaataaaac agaaaggcga ataccttccg 240

ctcctccaag ggaaatctct tgggatgatt ttcgagaaga gatctacgcg cacgcggctt 300

tcaacggaaa ctggattcgc actcttgggc ggccacccat gttttctgac tactcaagat 360

attcacttgg gagtaaatga gtcacttact gacacggcaa gagtgctctc tagcatggct 420

gatgcagtgc tggctagagt ctataaacaa tccgacctgg atacactcgc caaggaagct 480

tcaataccaa taatcaacgg gttgtctgac ttgtaccacc ctatccaaat cttggccgat 540

tatttgacac tccaggaaca ctactcaagt ctgaagggac ttacgcttag ctggataggt 600

gatggtaaca acatccttca tagcattatg atgtcagccg ccaaattcgg catgcatctg 660

caagcagcga ctcccaaggg ctatgagcct gatgcctcag tcaccaaact ggcggagcag 720

tacgctaaag agaatgggac gaagcttttg ctgacgaacg atcccctgga ggcggctcac 780

gggggaaatg tgcttatcac ggatacctgg ataagtatgg ggcaggagga agaaaaaaaa 840

aagcgattgc aagcctttca aggttaccag gttacaatga aaactgcgaa agtcgccgca 900

tctgactgga cttttctgca ctgtcttccg agaaagccgg aagaggtgga cgacgaagtg 960

ttctactctc cgcgctctct cgtgtttcct gaagcagaga accgaaagtg gaccataatg 1020

gcggtaatgg tcagcctctt gactgattat tcccctcagc tgcagaagcc aaagttttga 1080

taagaattc 1089

<210> 11

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 11

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cgcatcctgc tgaacaacgc cgccttccgc 60

aacggccaca acttcatggt cagaaacttc cgctgcggcc agcccctgca aaacaaagtg 120

cagctgaagg gccgcgacct gctgaccctg aagaacttca ccggcgagga gatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga tctgaagttc agaatcaagc agaagggcga gtacctgcca 240

ctgctgcaag gcaagagcct gggcatgatc ttcgagaagc gcagcacccg cacccgcctg 300

agcaccgaga ccggcttcgc tctgctggga ggccaccctt gcttcctgac aacccaggac 360

atccacctgg gcgtgaacga gagcctgacc gacaccgccc gcgtgctgag cagcatggcc 420

gacgccgtgc tggctcgggt gtacaaacag tccgacctgg ataccctggc caaggaagct 480

tccatcccca tcatcaacgg cctgagcgac ctgtaccacc ccatccagat cctggccgac 540

tacctgaccc tgcaggagca ctacagcagc ctgaagggcc tgaccctgag ctggatcggc 600

gacggcaaca atatcctgca ctctattatg atgtctgccg ccaagtttgg aatgcacctg 660

caggctgcta cccctaaagg ctacgaaccc gatgcctctg tgacaaagct ggctgaacag 720

tacgccaaag agaacggcac aaagctgctg ctgaccaacg accctctgga ggccgctcac 780

ggaggcaacg tgctgatcac cgacacctgg atctctatgg gccaggagga agagaagaag 840

aagcggctgc aggccttcca gggctaccag gtcaccatga aaaccgctaa ggtggccgcc 900

agcgattgga ccttcctgca ctgcctgccc cgcaagcccg aggaggtgga cgacgaggtg 960

ttctacagcc cccgcagcct ggtgttcccc gaggccgaga accgcaagtg gactattatg 1020

gccgtgatgg tgtccctgct gactgattat tctcctcaac tgcagaaacc taaattttga 1080

taagaattc 1089

<210> 12

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 12

gtcgacgccg ccaccatgct gttcaacctg cgaatcctgc tgaacaacgc cgcttttcgg 60

aacgggcaca actttatggt gaggaacttt cgctgcggac agcccctcca gaataaggtc 120

cagctgaagg gcagggacct gctgaccctg aaaaatttca caggggagga aatcaaatac 180

atgctgtggc tgagcgccga tctgaagttc agaatcaagc agaagggcga gtacctgcct 240

ctgctccagg gcaaaagcct ggggatgatc ttcgaaaagc gcagtactcg gaccagactg 300

tcaaccgaga ctggcttcgc tctgctggga ggccaccctt gcttcctgac aacccaggac 360

attcacctgg gagtgaacga gtccctgacc gacactgctc gcgtcctgag ctctatggcc 420

gacgccgtgc tggctcgggt gtacaaacag tccgacctgg ataccctggc caaggaagct 480

tccatcccca tcatcaacgg cctgagcgac ctgtaccacc ccatccagat cctggccgac 540

tacctgaccc tgcaggagca ctacagcagc ctgaagggcc tgaccctgag ctggatcggc 600

gacggcaaca atatcctgca ctctattatg atgtctgccg ccaagtttgg aatgcacctg 660

caggctgcta cccctaaagg ctacgaaccc gatgcctctg tgacaaagct ggctgaacag 720

tacgccaaag agaacggcac aaagctgctg ctgaccaacg accctctgga ggccgctcac 780

ggaggcaacg tgctgatcac cgatacctgg attagtatgg gacaggagga agagaagaag 840

aagcggctgc aggccttcca gggctaccag gtcaccatga aaaccgctaa ggtggccgcc 900

agcgattgga cctttctgca ctgcctgccc agaaagcccg aagaggtgga cgacgaggtc 960

ttctactctc ccagaagcct ggtgtttccc gaagctgaga ataggaagtg gacaattatg 1020

gcagtgatgg tgtccctgct gactgattat tctcctcaac tgcagaaacc taaattttga 1080

taagaattc 1089

<210> 13

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 13

atgctgttca acctgcgaat cctgctgaac aacgccgctt ttcggaacgg gcacaacttt 60

atggtgagga actttcgctg cggacagccc ctccagaata aggtccagct gaagggcagg 120

gacctgctga ccctgaaaaa tttcacaggg gaggaaatca aatacatgct gtggctgagc 180

gccgatctga agttcagaat caagcagaag ggcgagtacc tgcctctgct ccagggcaaa 240

agcctgggga tgatcttcga aaagcgcagt actcggacca gactgtcaac cgagactggc 300

ttcgctctgc tgggaggcca cccttgcttc ctgacaaccc aggacattca cctgggagtg 360

aacgagtccc tgaccgacac tgctcgcgtc ctgagctcta tggccgacgc cgtgctggct 420

cgggtgtaca aacagtccga cctggatacc ctggccaagg aagcttccat ccccatcatc 480

aacggcctga gcgacctgta ccaccccatc cagatcctgg ccgactacct gaccctgcag 540

gagcactaca gcagcctgaa gggcctgacc ctgagctgga tcggcgacgg caacaatatc 600

ctgcactcta ttatgatgtc tgccgccaag tttggaatgc acctgcaggc tgctaccct 660

aaaggctacg aacccgatgc ctctgtgaca aagctggctg aacagtacgc caaagagaac 720

ggcacaaagc tgctgctgac caacgaccct ctggaggccg ctcacggagg caacgtgctg 780

atcaccgata cctggattag tatgggacag gaggaagaga agaagaagcg gctgcaggcc 840

ttccagggct accaggtcac catgaaaacc gctaaggtgg ccgccagcga ttggaccttt 900

ctgcactgcc tgcccagaaa gcccgaagag gtggacgacg aggtcttcta ctctcccaga 960

agcctggtgt ttcccgaagc tgagaatagg aagtggacaa ttatggcagt gatggtgtcc 1020

ctgctgactg attattctcc tcaactgcag aaacctaaat tttga 1065

<210> 14

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 14

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 15

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 15

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 16

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 16

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn
1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln
20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe
35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys
50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys
65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr
100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala
115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys
130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile
145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr
165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser
180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala
195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu
210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly
245 250 255
Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu
260 265 270
Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met
275 280 285
Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

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

<210> 17
<211> 354
<212
> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 17
Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn
1 5 10 15
Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln
20 25 30
Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe
35 40 45
Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60
Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys
65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
85 90 95
Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr
100 105 110
Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125
Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys
130 135 140
Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile
145 150 155 160
Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr
165 170 175
Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190
Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala
195 200 205
Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu
210 215 220
Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn
225 230 235 240
Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255
Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu
260 265 270
Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met
275 280 285
Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu
290 295 300
Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320
Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 18

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 18

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 19

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 19

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu
260 265 270
Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285
Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu
290 295 300
Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg
305 310 315 320
Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala
325 330 335
Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350
Lys Phe

<210> 20
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 20
Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn
1 5 10 15
Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln
20 25 30
Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45
Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys
50 55 60
Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys
65 70 75 80
Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 21

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 21

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn
1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln
20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe
35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys
65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr
100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys
130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile
145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr
165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 22

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 22

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 23

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 23

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 24

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 24

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270

Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met

275 280 285

Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu

290 295 300

Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe

<210> 25

<211> 354

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 25

Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln

20 25 30

Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe

35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys

50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys

65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser

85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr

100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala

115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile

145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr

165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu

210 215 220

Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly

245 250 255

Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu
260 265 270
Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met
275 280 285
Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu
290 295 300
Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg

305 310 315 320
Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala
325 330 335
Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro
340 345 350
Lys Phe

<210> 26
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 26
Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn

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

65 70 75 80
Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr
100 105 110
Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala
115 120 125
Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys

130 135 140
Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile
145 150 155 160
Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr
165 170 175
Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser
180 185 190
Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala

195 200 205
Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu
210 215 220
Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn
225 230 235 240
Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly
245 250 255
Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu

260 265 270
Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met
275 280 285
Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu
290 295 300
Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg
305 310 315 320
Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala

325 330 335
Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro

340 345 350

Lys Phe