(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-535745
(P2022-535745A)
(43)公表日　令和4年8月10日(2022.8.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/86	ZZNA	4C084
C12N 15/867(2006.01)		C12N	15/867	Z	4C086
C12N 15/113(2010.01)		C12N	15/113	Z	4C087
C12N 15/864(2006.01)		C12N	15/864	100Z	
C12N 15/53 (2006.01)		C12N	15/53		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全86頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-570364(P2021-570364)
(86)(22)出願日　令和2年6月1日(2020.6.1)
(85)翻訳文提出日　令和4年1月24日(2022.1.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/035584
(87)国際公開番号　WO2020/243717
(87)国際公開日　令和2年12月3日(2020.12.3)
(31)優先権主張番号　62/855,506
(32)優先日　令和1年5月31日(2019.5.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517428713
アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８５０， ロックビル， キー ウエスト アベニュー ９７１３， フィフス フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　最適化されたフェニルアラニンヒドロキシラーゼ発現

(57)【要約】
レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクターシステムを開示する。レンチウイルスベクターシステムは、治療ベクターを含む。レンチウイルスベクターシステムは、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）に罹患した被験体の細胞におけるＰＡＨ発現を上方調節するためにコドン最適化ＰＡＨをコードするレンチウイルス粒子を産生する。本開示の態様は、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）を処置するための遺伝子医薬に関する。より具体的には、本開示の態様は、コドン最適化ＰＡＨ含有レンチウイルスベクターを含むレンチウイルスベクターに関する。

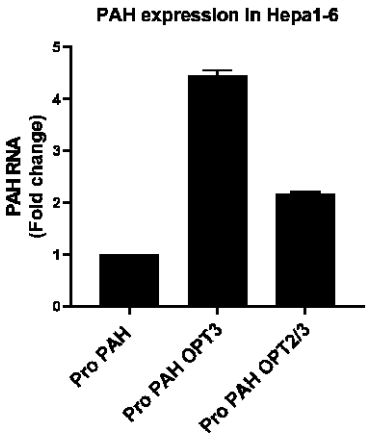


FIG. 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、
前記治療カーゴ部分が
コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント；
プロモーター；および
肝臓特異的エンハンサー
を含み、前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、前記プロモーターおよび前記肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御されている、ウイルスベクター。
【請求項２】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７０と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項３】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７０の配列を含む、請求項２に記載のウイルスベクター。
【請求項４】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７１と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項５】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７１の配列を含む、請求項４に記載のウイルスベクター。
【請求項６】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７２と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項７】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７２の配列を含む、請求項６に記載のウイルスベクター。
【請求項８】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７３と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項９】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７３の配列を含む、請求項８に記載のウイルスベクター。
【請求項１０】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７４と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項１１】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７４の配列を含む、請求項１０に記載のウイルスベクター。
【請求項１２】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７５と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項１３】

前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７５の配列を含む、請求項１２に記載のウイルスベクター。
【請求項１４】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７６と少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項１５】
前記コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７６の配列を含む、請求項１４に記載のウイルスベクター。
【請求項１６】
前記肝臓特異的エンハンサーがプロトロンビンエンハンサーを含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項１７】
前記プロモーターが肝臓特異的プロモーターを含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項１８】
前記肝臓特異的プロモーターがｈＡＡＴプロモーターを含む、請求項１７に記載のウイルスベクター。
【請求項１９】
前記治療カーゴ部分がベータグロビンイントロンをさらに含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項２０】
前記治療カーゴ部分が少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列をさらに含む、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項２１】
レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項１に記載のウイルスベクター。
【請求項２２】
前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクター、請求項２１に記載のウイルスベクター。
【請求項２３】
パッケージング細胞によって産生され、標的細胞に感染することができるレンチウイルス粒子であって、標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質および請求項１に記載のウイルスベクターを含む、レンチウイルス粒子。
【請求項２４】
被験体におけるフェニルケトン尿症（ＰＫＵ）を処置する方法であって、請求項２３に記載のレンチウイルス粒子の治療有効量を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項２５】
被験体におけるＰＫＵを処置するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントの使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権および参照による援用
本出願は、２０１９年5月３１日に出願され、「Ｃｏｄｏｎ－Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ Ｐｈｅｎｙｌａｌａｎｉｎｅ Ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ」との表題の米国仮特許出願第６２／８５５，５０６号（この開示は参照により本明細書に援用される）への優先権を主張する。
【０００２】
分野

本開示の態様は、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）を処置するための遺伝子医薬に関する。より具体的には、本開示の態様は、コドン最適化ＰＡＨ含有レンチウイルスベクターを含むレンチウイルスベクターに関する。

【背景技術】

【０００３】

背景

フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）は、無処置のままであれば、罹患した小児に知的障害、発作、行動上の問題、ならびに成長および発達不全をもたらし得る不均一な群の障害を指す。高フェニルアラニン血症が知的障害をもたらす機構は、高用量フェニルアラニンの驚くべき毒性を反映し、神経系組織のミエリン形成不全または脱髄を伴う。ＰＫＵは、北米では１２，０００人に１人の平均発生率であると報告され、男女に等しく罹患する。障害は、ヨーロッパまたはネイティブアメリカンを祖先に持つ人々において最も一般的であり、東部地中海地域では非常に高レベルに達する。

【０００４】

ＰＫＵを有する患者における神経学的変化は、生後１ヶ月以内に実証されており、成人ＰＫＵ患者の磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）は、脳の白質病変を示している。これらの病変のサイズおよび数は、血中のフェニルアラニン濃度に関係する。ＰＫＵを有する青年および成人の認知プロファイルは、対照の被験体と比較してＩＱ、処理速度、運動制御、および抑制能力の有意な低減、ならびに注意力検査での成績の低減を含み得る。

【０００５】

ＰＫＵの大部分は、肝フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）の欠乏によって引き起こされる。ＰＡＨは、酸素分子およびその非タンパク質補因子であるテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の触媒量の存在下でフェニルアラニン（Ｐｈｅ）からチロシン（Ｔｙｒ）へのヒドロキシル化を触媒する多量体肝酵素である。ＰＡＨが十分に発現されない場合、ＰＫＵ患者では、血液中のフェニルアラニンレベルが増加して高フェニルアラニン血症および有害な副作用をもたらす。ＰＡＨ活性の減少または非存在は、チロシン、ならびにメラニン、ｌ－チロキシン、およびドーパミンを含むカテコラミン神経伝達物質を含むその下流の生成物の欠乏をもたらし得る。

【０００６】

ＰＫＵは、ＰＡＨの変異および／またはＰＡＨ補因子（すなわち、ＢＨ４）の合成もしくは再生の欠損によって引き起こされ得る。特に、いくつかのＰＡＨ変異が小胞体におけるタンパク質フォールディングに影響を及ぼし、酵素触媒活性を減弱させるかまたは大きく消失させるタンパク質構造のミスセンス変異（６３％）および小さい欠失（１３％）により、分解および／または凝集の加速をもたらすことが示されている。

【０００７】

一般的に、血漿中Ｐｈｅレベル、Ｐｈｅに対する食事耐性、および治療に対する潜在的応答性に基づいて、３つの主要な表現型の群を用いてＰＫＵが分類されている。これらの群は、古典的ＰＫＵ（Ｐｈｅ＞１２００μＭ）、非定型または軽度のＰＫＵ（Ｐｈｅは６００～１２００μＭである）、および永続的な軽度の高フェニルアラニン血症（ＨＰＡ、Ｐｈｅは１２０～６００μＭである）を含む。

【０００８】

ＰＫＵの検出は、ユニバーサル新生児スクリーニング（ＮＢＳ）に依存する。かかとの穿刺から収集した血液１滴を、米国の５０全ての州で義務づけられているスクリーニングにおいてフェニルアラニンレベルに関して試験する。

【０００９】

現在、ＰＫＵに関して利用可能な２つのみの処置選択肢は、Ｐｈｅの一生涯の食事制限およびＢＨ４の補給であり、罹患した乳児における最適な臨床転帰を確実にするためには早期の治療介入が極めて重要である。しかし、高価な薬剤および特別な低タンパク食は、患者の大きい負担となっており、特にこれらの製品が私的な健康保険によって十分にカバーされていない場合には、栄養不良、心理社会的なまたは神経認知の合併症をもたらし得

る。その上、ＢＨ４療法は、ＢＨ４生合成の欠損に関連する軽度の高フェニルアラニン血症の処置にとって主に有効であるが、軽度または古典的ＰＫＵを有する患者のわずか２０～３０％が応答するに過ぎない。このため、重荷となるＰｈｅ制限食に対する代替としてＰＫＵに関する新規処置モダリティが必要である。

【００１０】

遺伝子医薬は、ＰＫＵを有効に処置する潜在性を有する。遺伝子医薬は、疾患の治療または防止目的での遺伝子構築物の送達および発現を伴い得る。遺伝子構築物の発現は、様々なプロモーター、エンハンサー、および／またはその組み合わせによってモジュレートされ得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

概要

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、モジュレートされたフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）発現のために改変されたＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。さらなる態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分がＰＡＨ発現の増強のためにコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、ならびに必要に応じてプロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーを含み、ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御されている、ウイルスベクターが提供される。

【００１２】

実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号７０と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、少なくとも９５パーセントの配列同一性を有するコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む。実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号７０の配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む。

【００１３】

一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７１と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７１の配列を含む。実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【００１４】

一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７２と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７２の配列を含む。実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【００１５】

実施形態では、肝臓特異的エンハンサーは、プロトロンビンエンハンサーを含む。実施形態では、プロトロンビンエンハンサーは、配列番号３と少なくとも７５パーセント、少

なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。実施形態では、プロトロンビンエンハンサーは配列番号３の配列を含む。

【００１６】

実施形態では、プロモーターは肝臓特異的プロモーターを含む。実施形態では、肝臓特異的プロモーターはｈＡＡＴプロモーターを含む。実施形態では、ｈＡＡＴプロモーターは、配列番号４と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。実施形態では、ｈＡＡＴプロモーターは配列番号４の配列を含む。

【００１７】

実施形態では、治療カーゴ部分はベータグロビンイントロンをさらに含む。実施形態では、ベータグロビンイントロンは、配列番号５または６と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。実施形態では、ベータグロビンイントロンは配列番号５または６の配列を含む。

【００１８】

実施形態では、治療カーゴ部分は、少なくとも１つの肝細胞核内因子結合部位をさらに含む。実施形態では、肝細胞核内因子結合部位は、配列番号７（１ＸＨＮＦ１）、８（５ＸＨＮＦ１）、９（１ＸＨＮＦ１／４）、または１０（３ＸＨＮＦ１／４）と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。実施形態では、肝細胞核内因子結合部位は、配列番号７、８、９、または１０の配列を含む。

【００１９】

実施形態では、少なくとも１つの肝細胞核内因子結合部位は、プロトロンビンエンハンサーの下流に配置される。

【００２０】

実施形態では、治療カーゴ部分は、少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列をさらに含む。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列は、配列番号１１または１２と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列は、第１のプロモーターの制御下にあり、ＰＡＨ配列は第２のプロモーターの制御下にある。実施形態では、第１のプロモーターはＨ１プロモーターである。実施形態では、第２のプロモーターは肝臓特異的プロモーターである。

【００２１】

実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである。実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、または本明細書に記載のコドン最適化ＰＡＨ配列を送達するために適した別のウイルスベクターもしくは非ウイルスシステムである。実施形態では、ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

【００２２】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７０と９５パーセントより高い配列同一性を共有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７０を含む。

【００２３】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７１と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５の配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供さ

れる。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７１を含む。

【００２４】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７２と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５の配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化配列またはそのバリアントは配列番号７２を含む。

【００２５】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７３と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３の配列を含む。

【００２６】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７４と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７４の配列を含む。

【００２７】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７５と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７５の配列を含む。

【００２８】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７６と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７６の配列を含む。

【００２９】

一態様では、配列番号７３と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３の配列を含む。実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【００３０】

一態様では、配列番号７４と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリ

アントは、配列番号７４の配列を含む。実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む治療カーゴ部分をさらに含み、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーをさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【００３１】

一態様では、配列番号７５と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化配列またはそのバリアントは配列番号７５を含む。実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む治療カーゴ部分をさらに含み、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーをさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【００３２】

一態様では、配列番号７６と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターが提供される。実施形態では、コドン最適化配列またはそのバリアントは配列番号７６を含む。実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む治療カーゴ部分をさらに含み、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーをさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【００３３】

一態様では、パッケージング細胞によって産生され、標的細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が開示される。実施形態では、レンチウイルス粒子は、標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質および本明細書で詳述されるウイルスベクターを含む。

【００３４】

一態様では、被験体におけるフェニルケトン尿症（ＰＫＵ）を処置する方法が開示される。方法は、本明細書で詳述されるレンチウイルス粒子の治療有効量を被験体に投与することを含む。

【００３５】

一態様では、被験体におけるＰＫＵを処置するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントの使用が提供される。別の態様では、被験体におけるＰＫＵを処置するための医薬の製剤化のためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントの使用が提供される。

【００３６】

一態様では、被験体におけるＰＫＵの処置に使用するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが提供される。別の態様では、被験体におけるＰＫＵの処置に使用するための医薬を製剤化するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが提供される。

【図面の簡単な説明】

【００３７】

【図１】図１は、環状の例示的な３ベクターレンチウイルスベクターシステムを示す。

【００３８】

【図２】図２は、環状の例示的な４ベクターレンチウイルスベクターシステムを示す。

【００３９】

【図３】図３は、ＰＡＨの発現を調節するために、プロトロンビンエンハンサーおよびｈＡＡＴプロモーターの変形を含有する４つの例示的なレンチウイルスベクターの線状マッ

プを示す。
【００４０】
【図４】図４Ａ～４Ｂは、ｈＰＡＨおよび様々な形態のコドン最適化ＰＡＨ配列の形質導入後のＨｅｐａ１－６細胞におけるＰＡＨのレベルを比較するイムノブロットデータを示す。図４Ａは、ｈＰＡＨをＯＰＴ２コドン最適化ＰＡＨと比較する。図４Ｂは、ｈＰＡＨをコドン最適化ＰＡＨのＯＰＴ３、ＯＰＴ２／３、およびＯＰＴ３／２バージョンと比較する。
【００４１】
【図５】図５は、レンチウイルスベクターを形質導入したＨｅｐａ１－６細胞におけるＰＡＨ　ＲＮＡ発現、ｈＰＡＨおよびＰＡＨのコドン最適化バージョンの発現を示す。
【００４２】
【図６】図６Ａ～６Ｂは、プロトロンビンエンハンサーの上流でＨＮＦ１およびＨＮＦ１／４結合部位を有するコドン最適化ＰＡＨのレベルを比較するイムノブロットデータを示す。図６Ａは、Ｈｅｐａ１－６細胞におけるイムノブロットデータを示す。図６Ｂは、Ｈｅｐ３Ｂ細胞におけるイムノブロットデータを示す。
【００４３】
【図７】図７は、プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター／マウス微小ウイルスイントロンまたはｈＡＡＴエンハンサー／トランスサイレチンプロモーター／マウス微小ウイルスイントロンのいずれかを含有する調節配列を有するコドン最適化ＰＡＨのレベルを比較するイムノブロットデータを示す。
【００４４】
【図８】図８は、変異体ＷＰＲＥ配列もしくは短鎖ＷＰＲＥ（ＷＰＲＥｓ）配列、またはＰＡＨもしくはアルブミン３’ＵＴＲ配列を含有する調節配列を有するコドン最適化ＰＡＨのレベルを比較するイムノブロットデータを示す。
【発明を実施するための形態】
【００４５】
詳細な説明
本開示の概要
本開示は、治療ベクターおよび治療ベクターの細胞への送達に関する。一態様では、治療ベクターは、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであり、治療カーゴ部分は、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント；プロモーター；および肝臓特異的エンハンサーを含み、ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。実施形態では、ベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、および／または肝臓特異的エンハンサーを含む。実施形態では、ベクターは、宿主（すなわち内因性）のＰＡＨタンパク質発現を調節するスモールＲＮＡを含む。実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。
【００４６】
定義
本明細書中で別様に定義しない限り、本開示との関連で使用する科学技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有する。さらに、文脈上別様に要求されない限り、単数の語は複数を包含し、複数の語は単数を包含する。一般に、本明細書中に記載する細胞および組織の培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸の化学およびハイブリダイゼーションとの関連で使用する学術用語およびそれらの技術は周知であり、当該技術分野において一般に使用されている。本開示の方法および技術は、別段の記載がなければ、当該技術分野において周知の、本明細書全体で引用し議論する様々な一般的およびより具体的な参考文献に記載される従来の方法にしたがって一般に行われる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　Ｊ．およびＲｕｓｓｅｌｌ　Ｄ．、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、第３版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（２０００年）；Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｓｈｏｒｔ　Ｐ

rotocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Wiley, John&Sons, Inc.（２００２年）；HarlowおよびLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual；Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.（１９９８年）；およびColiganら、Short Protocols in Protein Science、Wiley, John&Sons, Inc.（２００３年）を参照。あらゆる酵素反応または精製技術は、当該技術分野において一般に遂行されるように、または本明細書中に記載するように、製造業者の仕様にしたがって行われる。本明細書中に記載する分析化学、合成有機化学、医薬品化学、および製薬化学との関連で使用する学術用語、ならびに実験の手順および技術は、当該技術分野において周知であり一般に使用されるものである。

【００４７】

本明細書において使用する場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は交換可能に使用し、文脈がそうでないと示さない限り、複数形も包含すること、およびそれぞれの意味の範囲内に包含されることを意図する。また、本明細書中で使用する場合、「および／または」は、挙げた項目の１つまたは複数のあらゆる全ての可能な組み合わせ、ならびに、選択肢（「または」）として解釈する場合には組み合わせないことを指し、およびこれらを包含する。

【００４８】

範囲を含む全ての数値の指定、例えば、パーセント、ｐＨ、温度、時間、濃度、および分子量は、例えば０．１％または０．１の増分で（＋）または（－）の変動を含み得る近似値である。必ずしも明示的には述べないが、数値による全ての指定には「約」という用語が先行することを理解するべきである。必ずしも明示的には述べないが、本明細書中に記載する試薬は単に例示的なものであり、そのようなものの同等物が当該技術分野で公知であることも理解するべきである。

【００４９】

本明細書中で使用する場合、「約」という用語は、当業者によって理解され、また、それが使用される文脈に応じてある程度変動する。使用されている文脈を考慮して当業者に明確でない用語が使用されている場合、「約」は、その値およびその値のプラスまたはマイナス１０％までを含む。「約」という用語は、「Ｘ」＋０．１％またはＸ－０．１％などの「Ｘ」の小さな増分に加えて、「Ｘ」という正確な値も含む。

【００５０】

本明細書中で使用する場合、「の投与」または「投与する」という用語は、処置を必要とする被験体に対して本開示のベクター、ベクター組成物、医薬組成物、または本明細書に開示される他の活性剤のいずれかを、治療的に有用な形態かつ治療有効量でその個体の体内に導入できる形態で提供することを意味する。本開示のベクター、ベクター組成物、または他の活性剤を投与する方法は、本明細書に開示の方法のいずれかであり得る。

【００５１】

本明細書中で使用する場合、「コード配列」という語句は、転写され得るまたは逆転写され得る任意のウイルスベクター配列を記載する。「コード配列」は、転写され得るまたは逆転写され得る外因性の配列（例えば、細胞に形質導入されているまたはトランスフェクトされているベクター中の配列）を非限定的に含む。

【００５２】

本明細書中で使用する場合、「コドン最適化」という用語は、以下の少なくとも１つに従ってコード配列をモジュレートすることを意味する；（ｉ）天然に存在するコドン配列を、コードされたタンパク質のアミノ酸配列を保存するが、コードするＲＮＡの組成および／または構造を変更する代替コドンで置換すること；（ｉｉ）コード配列の天然に存在するグアノシンシトシン含有量と比べてコード配列のグアノシンシトシン含有量をモジュ

レートすること；（ｉｉｉ）天然に存在するコード配列におけるＣｐＧ部位の数と比べてコード配列のＣｐＧ部位の数をモジュレートすること；ならびに（ｉｖ）天然に存在するコドン配列を、（ｉｉ）グアノシンシトシン含有量および／または（ｉｉｉ）ＣｐＧ部位の数と比べて代替コドンで置換すること。コドン最適化は、特定の組織におけるｔＲＮＡ発現の文脈におけるコドンの調整を含み得る、および／または天然の組織特異的ｓｈＲＮＡもしくはｍｉＲＮＡの作用を回避する方法を含み得る。

【００５３】

本明細書中で使用する場合、「含む」という用語は、組成物および方法が、記載した要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味する。組成物および方法を定義するために使用する場合、「から本質的になる」は、組成物または方法に対して何らかの本質的な重要性を持つその他の要素を除外することを意味する。「からなる」は、特許請求される組成物および実体的な方法ステップにとって軽微ではないその他の成分の要素を除外することを意味する。これらの移行句のそれぞれによって定義される実施形態は、本開示の範囲内にある。したがって、方法および組成物は、追加のステップおよび成分を含み得るか（含む）、あるいは重要でないステップおよび組成物を含むか（から本質的になる）、あるいは記載した方法ステップまたは組成物のみを意図する（からなる）ことが意図される。

【００５４】

本明細書中で使用する場合、「ＣｐＧ部位」という用語は、その５’→３’方向に沿った塩基の線状配列においてシトシンヌクレオチドの後にグアニンヌクレオチドが続くＤＮＡの領域を指す。ＣｐＧ部位は、ＣｐＧアイランド（またはＣＧアイランド）と呼ばれるゲノム領域において高頻度で起こる。ＣｐＧジヌクレオチドにおけるシトシンは、メチル化されて５－メチルシトシンを形成することができる。哺乳動物では、ＣｐＧシトシンの７０％～８０％がメチル化される。遺伝子内のシトシンのメチル化は、その発現を変化させ得る。

【００５５】

本明細書中で使用する場合、「ＵＴＲ」という用語は、一般的にＲＮＡスプライシングの完了後に残っているメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の非翻訳領域を指す。本明細書中で使用する場合、「３’ＵＴＲ」は、翻訳終止コドンの直後に続くｍＲＮＡの非翻訳領域を指す。３’ＵＴＲは、結果としてのタンパク質に翻訳されない。

【００５６】

本明細書中で使用する場合、「アデノ随伴ウイルスベクター」という用語は、治療ＤＮＡカーゴを細胞または組織に送達するためにアデノ随伴ウイルスの構造構成成分を利用する合成送達システムを指す。「アデノ随伴ウイルスベクター」という用語はまた、本明細書において「ＡＡＶベクター」とも称され得る。

【００５７】

本明細書中で使用する場合、「アデノ随伴ウイルス」という用語は、軽度の免疫応答を生成し、宿主細胞にそれ自身の染色体外ＤＮＡコピーを配置することができ、時に宿主ゲノムにＤＮＡコピーを組み込み、相対的に非病原性である小さいウイルスを指す。アデノ随伴ウイルスは、本明細書に記載のＡＡＶ２を非限定的に含む多数の天然および合成の血清型を含む。

【００５８】

本明細書中で使用する場合、「ＡＡＶ／ＤＪ」という用語（本明細書において「ＡＡＶ－ＤＪ」とも称される）は、野生型ＡＡＶ血清型より高い形質導入率および感染率を媒介する異なるＡＡＶ血清型から操作されたＡＡＶベクターの血清型である。

【００５９】

本明細書中で使用する場合、「ＡＡＶ２」という用語（本明細書において「ＡＡＶ／２」または「ＡＡＶ－２」とも称される）は、天然に存在するＡＡＶ血清型である。

【００６０】

本明細書中で使用する場合、「ＡｐｏＥエンハンサー」という用語は、アポリポタンパク質Ｅエンハンサーを指す。

【００６１】
本明細書中で使用する場合、「発現」、「発現される」、または「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドがｍＲＮＡに転写される、もしくはＤＮＡに逆転写される過程、および／または転写されたｍＲＮＡがその後にペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳される過程を指す。発現は、真核細胞中でのｍＲＮＡのスプライシング、または転写後修飾もしくは翻訳後修飾というその他の形態を含み得る。
【００６２】
本明細書中で使用する場合、「遺伝子医薬」または「複数の遺伝子医薬」という用語は、一般的に臨床疾患または症状発現を処置するために遺伝子標的に集中する治療薬および治療戦略を指す。「遺伝子医薬」という用語は、遺伝子療法等を包含する。
【００６３】
本明細書中で使用する場合、「ｈＡＡＴ」という用語は、ｈＡＡＴプロモーターを指す。
【００６４】
本明細書中で使用する場合、「肝細胞核内因子」という用語は、肝臓において主に発現される転写因子を指す。肝細胞核内因子の種類は、肝細胞核内因子１、肝細胞核内因子２、肝細胞核内因子３、および肝細胞核内因子４を非限定的に含む。
【００６５】
本明細書中で使用する場合、「ＨＮＦ」という用語は肝細胞核内因子を指す。したがって、ＨＮＦ１は肝細胞核内因子１を指し、ＨＮＦ２は肝細胞核内因子２を指し、ＨＮＦ３は肝細胞核内因子３を指し、およびＨＮＦ４は肝細胞核内因子４を指す。
【００６６】
本明細書中で使用する場合、「ＨＮＦ結合部位」という用語は、ＨＮＦ転写因子が結合することができるＤＮＡの領域を指す。したがって、ＨＮＦ１結合部位は、ＨＮＦ１が結合することができるＤＮＡの領域であり、ＨＮＦ４結合部位は、ＨＮＦ４が結合することができるＤＮＡの領域である。
【００６７】
本明細書中で使用する場合、「ヒトベータグロビンイントロン」という用語は、ＲＮＡ成熟の際にスプライシングによって除去され、タンパク質をコードしないヒトベータグロビン遺伝子内の核酸セグメントを指す。
【００６８】
本明細書中で使用する場合、「個体」、「被験体」、および「患者」という用語は本明細書中では交換可能に使用され、任意の個体である哺乳動物被験体（例えば、マウス、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、非ヒト霊長類またはヒト霊長類）を指す。
【００６９】
本明細書中で使用する場合、「ＬＶ」という用語は、一般的に「レンチウイルス」を指す。非限定的な例として、「ＬＶ－ＰＡＨ」への言及は、ＰＡＨ配列を含有し、ＰＡＨを発現するレンチウイルスへの言及である。ＰＡＨ配列は、ｈＰＡＨ配列またはコドン最適化ＰＡＨ配列であり得る。
【００７０】
本明細書中で使用される場合、「ＬＶ－Ｐｒｏ－ｈＡＡＴ－ＰＡＨ」という用語は、プロトロンビンエンハンサー、ｈＡＡＴプロモーター、およびＰＡＨ配列を含むＬＶベクターを指す。
【００７１】
本明細書中で使用する場合、「パッケージング細胞株」という用語は、レンチウイルス粒子を発現させるために使用することができる任意の細胞株を指す。
【００７２】
本明細書中で使用する場合、２つまたはそれより多くの核酸配列またはポリペプチド配列の文脈における「同一性パーセント」または「配列同一性パーセント」という用語は、下記する配列比較アルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴＰおよびＢＬＡＳＴＮ、または当業

者に利用可能なその他のアルゴリズム）の１つを使用して、または目視検査によって測定されるように、最大の一致のために比較およびアラインメントした時に同一となるヌクレオチドまたはアミノ酸残基を特定のパーセンテージで有する２つまたはそれより多くの配列または部分配列を指す。適用に応じて、「同一性パーセント」または「配列同一性パーセント」は、比較されている配列の一領域にわたり（例えば、機能ドメインにわたり）存在し得るか、あるいは比較される２つの配列の全長にわたり存在し得る。配列比較のために、通常は１つの配列が、試験配列がそれに対して比較される参照配列の役目を持つ。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピューターに入力し、部分配列座標を指定し、必要であれば配列アルゴリズムプログラムのパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

【００７３】

本明細書中で使用する場合、「薬学的に許容される」という用語は、妥当な医学的判断の範囲内で、合理的な利益／リスク比に見合うように、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、またはその他の問題もしくは合併症を起こすことなくヒトおよび動物の組織、臓器、および／または体液との接触に使用するために好適な化合物、材料、組成物、および／または剤形を指す。

【００７４】

本明細書中で使用する場合、「フェニルアラニンヒドロキシラーゼ」という用語は、本明細書においてＰＡＨと称され得る。フェニルアラニンヒドロキシラーゼという用語は、ＰＡＨ配列の断片を含む、全ての野生型、バリアント、およびコドン最適化ＰＡＨ配列のヌクレオチドおよびペプチド配列を含む。非限定的に、フェニルアラニンヒドロキシラーゼという用語は、配列番号１、２、および７０～７６への言及を含み、それと少なくとも約７５％の同一性を有するバリアントをさらに含む。

【００７５】

本明細書中で使用する場合、「ｈＰＡＨ」という用語は、そのコドンが合成によって変更されていない、ヒトまたはヒト起源に由来するＰＡＨ配列を指す。

【００７６】

本明細書中で使用する場合、「フェニルケトン尿症」という用語は、本明細書で「ＰＫＵ」とも称され、軽度および古典的な型の疾患を含む、フェニルアラニンヒドロキシラーゼの慢性的な欠乏ならびにそれに関連する全ての症状を指す。したがって、「フェニルケトン尿症」の処置は、ＰＫＵに関連する全てまたは一部の症状に対する処置に関連し得る。

【００７７】

本明細書中で使用する場合、「プロトロンビンエンハンサー」という用語は、プロトロンビン遺伝子の転写をもたらす、タンパク質が結合することができるプロトロンビン遺伝子の領域である。

【００７８】

本明細書中で使用する場合、「Ｐｒｏ」という用語は、プロトロンビンエンハンサーを指す。

【００７９】

本明細書中で使用する場合、「ウサギベータグロビンイントロン」という用語は、ＲＮＡ成熟の際にスプライシングによって除去され、タンパク質をコードしないウサギベータグロビン遺伝子内の核酸セグメントを指す。

【００８０】

本明細書中で使用する場合、「スモールＲＮＡ」という用語は、一般に約２００ヌクレオチドまたはそれ未満の長さの、サイレンシング機能または干渉機能を持つノンコーディングＲＮＡをいう。その他の実施形態では、スモールＲＮＡは、約１７５ヌクレオチドまたはそれ未満、約１５０ヌクレオチドまたはそれ未満、約１２５ヌクレオチドまたはそれ未満、約１００ヌクレオチドまたはそれ未満、あるいは約７５ヌクレオチドまたはそれ未

満の長さである。そのようなＲＮＡとしては、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、および短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（small nuclear RNA；ｓｎＲＮＡ）、および核小体低分子ＲＮＡ（small nucleolar RNA；ｓｎｏＲＮＡ）が挙げられる。本開示の「スモールＲＮＡ」は、一般に、標的遺伝子ｍＲＮＡの分解を生じさせる経路または標的遺伝子のｍＲＮＡの翻訳を防止する経路を通じて、標的遺伝子の遺伝子発現を阻害することまたはノックダウンすることができるべきである。

【００８１】

本明細書中で使用する場合、「ｓｈＰＡＨ」という用語は、ＰＡＨを標的とするスモールヘアピンＲＮＡを指す。

【００８２】

本明細書中で使用する場合、「配列番号」という用語は、「配列ＩＤ番号」という用語と同義である。

【００８３】

本明細書中で使用する場合、「チロキシン結合グロブリン」という用語は、血流中で甲状腺ホルモンの輸送に関与する輸送タンパク質である。本明細書中で使用する場合、「ＴＢＧ」という略語は、チロキシン結合グロブリンを指す。

【００８４】

本明細書中で使用する場合、「治療有効量」という用語は、所与の病気、傷害、疾患、または状態に罹患した患者に見られる症状、進行、または合併症の発症を処置し、または防止するために好適な組成物中および好適な剤形中の本開示の活性剤の十分な量を指す。治療有効量は、患者の状態の状況またはその重篤度、および処置される被験体の年齢、体重などに応じて変化する。治療有効量は、例えば、投与経路、被験体の状態などのいくつかの要因、ならびに当業者によって理解されるその他の要因のいずれかに応じて変化し得る。

【００８５】

本明細書中で使用する場合、「治療ベクター」という用語は、レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターへの言及を非限定的に含む。さらに、レンチウイルスベクターシステムを参照して本明細書中で使用する場合、「ベクター」という用語は「プラスミド」という用語と同義である。例えば、２ベクターおよび３ベクターのパッケージングシステムを含む３ベクターシステムおよび４ベクターシステムは、３プラスミドシステムおよび４プラスミドシステムとも称され得る。

【００８６】

本明細書中で使用する場合、「処置」または「処置すること」という用語は、一般に、処置されている被験体の自然経過を変えようとする介入を指し、予防のため、または臨床病理の経過の間に行われ得る。望ましい効果としては、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の抑制、減少、または阻害、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後改善の惹起が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」は、疾患状態を標的化し、それと戦うこと、すなわち、疾患状態を改善し、または予防することを意図する。よって、特定の処置は、標的化される疾患状態、ならびに医薬療法および治療アプローチの現在または将来の状況に依存する。処置は、関連する毒性を有し得る。

【００８７】

本明細書中で使用する場合、「切断された（truncated）」という用語は、本明細書において「短縮された（shortened）」または「存在しない（without）」ことを指し得る。

【００８８】

本明細書中で使用する場合、「バリアント」という用語は、参照配列と比較した場合に、一塩基多型、一塩基多様性、変換、逆位、重複、欠失、または置換のうちの少なくとも１つを含有するヌクレオチド配列を指す。「バリアント」は、「バリアント」ヌクレオチ

ド配列に由来するアミノ酸配列、ならびにその転写後および翻訳後修飾を含む。
【００８９】
本明細書中で考えられる場合、比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ、Ａｄｖ．　Ａｐｐｌ．　Ｍａｔｈ．２巻：４８２頁（１９８１年）の局所相同性アルゴリズム、ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．４８巻：４４３頁（１９７０年）の相同性アラインメントアルゴリズム、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ．　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５巻：２４４４頁（１９８８年）の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行（ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ；Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ、５７５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｒ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．）、または目視検査（一般には後述のＡｕｓｕｂｅｌらを参照）によって実行することができる。
【００９０】
配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するために好適なアルゴリズムの一例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．２１５巻：４０３～４１０頁（１９９０年）に記載されるＢＬＡＳＴアルゴリズムである。ＢＬＡＳＴ解析を行うためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎのウェブサイトを通じて公開されている。
【００９１】
本開示の核酸配列およびタンパク質配列は、例えば関連配列を同定するために、公共データベースに対して検索を行うための「クエリ配列」としてさらに使用することができる。そのような検索は、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０年）、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．２１５巻：４０３～１０頁のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）を使用して行うことができる。ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索は、本開示中に提供される核酸分子に相同的なヌクレオチド配列を得るために、ＮＢＬＡＳＴプログラムをスコア＝１００、ワード長＝１２で用いて行うことができる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、本開示のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列を得るために、ＸＢＬＡＳＴプログラムをスコア＝５０、ワード長＝３で用いて行うことができる。比較目的のギャップ付きアラインメントを得るために、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７年）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５巻（１７号）：３３８９～３４０２頁に記載されるようにＧａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴを利用することができる。ＢＬＡＳＴプログラムおよびＧａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴプログラムを利用する場合、各プログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトのパラメーターを使用することができる。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ．を参照。
【００９２】
態様および実施形態の説明
一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む、ウイルスベクターが提供される。
【００９３】
一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントおよびプロモーターを含む、ウイルスベクターが提供される。
【００９４】
一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントおよびエンハンサーを含む、ウイルスベクターが提供される。
【００９５】
一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コ

ドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む、ウイルスベクターが提供される。

【００９６】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御されている、ウイルスベクターが提供される。

【００９７】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントおよびプロモーターを含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントがプロモーターによって動作可能に制御されている、ウイルスベクターが提供される。

【００９８】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントおよびエンハンサーを含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントがエンハンサーによって動作可能に制御されている、ウイルスベクターが提供される。実施形態では、エンハンサーは肝臓特異的エンハンサーである。

【００９９】

実施形態では、本明細書中で記載のプロモーターのいずれかは、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、および合成プロモーターのうちの少なくとも１つである。

【０１００】

実施形態では、組織特異的プロモーターは肝臓特異的プロモーターである。実施形態では、肝臓特異的プロモーターはｈＡＡＴプロモーターである。実施形態では、ｈＡＡＴプロモーターは、配列番号４と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントを有する配列を含む。例えば、実施形態では、ｈＡＡＴプロモーターは、配列番号４と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である配列を含む。実施形態では、ｈＡＡＴプロモーターは配列番号４の配列を含む。

【０１０１】

実施形態では、本明細書に記載の肝臓特異的エンハンサーのいずれかは、天然に存在するエンハンサーおよび合成エンハンサーのうちの少なくとも１つである。

【０１０２】

実施形態では、肝臓特異的エンハンサーはプロトロンビンエンハンサーである。実施形態では、プロトロンビンエンハンサーは、配列番号３と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。例えば、実施形態では、プロトロンビンエンハンサーは、配列番号３と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である配列を含む。実施形態では、プロトロンビンエンハンサーは配列番号３を含む。

【０１０３】
実施形態では、ウイルスベクターは、プロモーターに対して５’であるエンハンサーを含む。実施形態では、ウイルスベクターは、プロモーターに対して３’であるエンハンサーを含む。
【０１０４】
実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントのいずれかは、天然に存在するＰＡＨ配列のバリアントである。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントのいずれかは、合成ＰＡＨ配列のバリアントである。
【０１０５】
実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号７０と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列は、配列番号７０と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、ウイルスベクターは、配列番号７０の配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７０と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。
【０１０６】
実施形態では、本明細書に記載の治療カーゴ部分のいずれかはイントロンをさらに含む。実施形態では、イントロンは、任意の植物または動物種に由来する。実施形態では、イントロンはベータグロビンイントロンである。実施形態では、ベータグロビンイントロンはヒトベータグロビンイントロンである。実施形態では、ベータグロビンイントロンはウサギベータグロビンイントロンである。実施形態では、ベータグロビンイントロンは、配列番号５または６と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。例えば、実施形態では、ベータグロビンイントロンは、配列番号５または６と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パ

ーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、ベータグロビンイントロンは、配列番号５または６の配列を含む。

【０１０７】

実施形態では、本明細書に記載の治療カーゴ部分のいずれかは、核内受容体が結合することができる部位をさらに含む。実施形態では、核内受容体は肝臓において発現される。実施形態では、部位は肝細胞核内因子結合部位である。

【０１０８】

実施形態では、肝細胞核内因子結合部位は、配列番号７、８、９、または１０と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。例えば、実施形態では、肝細胞核内因子結合部位は、配列番号７、８、９、または１０と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、肝細胞核内因子結合部位は、配列番号７、８、９、または１０の配列を含む。

【０１０９】

実施形態では、本明細書に記載の肝細胞核内因子結合部位のいずれかは、プロトロンビンエンハンサーの下流に配置される。実施形態では、本明細書に記載の肝細胞核内因子結合部位のいずれかは、プロトロンビンエンハンサーの上流に配置される。本明細書中で使用する場合、下流とは、機能的なＲＮＡの転写方向に沿って連続するヌクレオチド位置で測定される距離を指す。上流とは、機能的ＲＮＡの転写方向とは反対の連続する位置で測定される距離を指す。

【０１１０】

実施形態では、本明細書に記載の治療カーゴ部分のいずれかは、少なくとも１つの既定のＰＡＨ　ｍＲＮＡ配列に結合することができる少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列をさらに含む。

【０１１１】

実施形態では、本明細書に記載の少なくとも１つのスモールＲＮＡのいずれかは、スモール核ＲＮＡである。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡは、スモール核小体ＲＮＡである。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡはマイクロＲＮＡである。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡは、低分子干渉ＲＮＡである。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡは、短鎖ヘアピンＲＮＡである。

【０１１２】

実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列は、配列番号１１または１２と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの同一性を有する配列を含む。例えば、実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列は、配列番号１１または１２と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、少なくとも１つのスモールＲＮＡ配列は、配列番号１１または１２の配列を含む。

【０１１３】

実施形態では、本明細書に記載のウイルスベクターのいずれかは、レンチウイルスベク

ターおよびＡＡＶベクターのうちの少なくとも１つである。さらなる実施形態では、以下のウイルスベクターもまた、本開示の態様にしたがって使用することができる：単純ヘルペスウイルス１型；アデノウイルス、モロニーマウス白血病ウイルス；ＨＴＬＶ－１およびＨＴＬＶ－２を非限定的に含むオンコレトロウイルスに基づくベクター；ウマ伝染性貧血ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、またはビスナマエディレンチウイルスに基づくレンチウイルスベクター；麻疹ウイルスベクター；ムンプスウイルスベクター；アルボウイルスベクター；ウマ伝染性貧血ウイルスベクター；およびアレナウイルスに基づくベクター。一態様では、本開示にしたがう遺伝子送達は、ＰＡＨをコードする遺伝子以外の位置で相補的遺伝子コピーの組み込みをもたらし得る、ＰＡＨをコードする染色体外ＤＮＡもしくはＲＮＡエレメントの作製をもたらし得る、相同組み換えを通じて天然のＰＡＨ遺伝子の代わりとなり得るか、ゲノム編集を利用して、正常なＰＡＨ遺伝子もしくはそれから離れた場所に相補的遺伝子配列を挿入し得るかまたは染色体ＰＡＨ遺伝子の配列を改変するために遺伝子変換を利用し得る。別の態様では、相補的ＤＮＡを、肝臓の、肝臓に移植された単離された肝細胞または肝細胞幹細胞のＤＮＡトランスフェクションを通じて環状または線状形態で送達してもよい。別の態様では、相補的ＲＮＡを、肝臓の、肝臓に移植された単離された肝細胞または肝細胞幹細胞のトランスフェクションを通じて送達してもよい。別の態様では、単離されたＤＮＡまたはＲＮＡを直接送達して、ＰＡＨ遺伝子の遺伝子変換を達成してもよく、近位もしくは遠位の座で相補的遺伝子を挿入してもよく、またはＰＡＨ遺伝子の負の相補的染色体対立遺伝子の発現をモジュレートしてもよい。

【０１１４】

一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化配列またはそのバリアントが、配列番号７１と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７１と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化配列またはそのバリアントは、配列番号７１の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７１と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１１５】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１１６】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含む。

【０１１７】

実施形態では、プロモーターは、本明細書に記載の任意のプロモーターであり得る。実施形態では、エンハンサーは、本明細書に記載の任意のエンハンサーであり得る。

【０１１８】

一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化配列またはそのバリアントが、配列番号７２と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７２と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化配列またはそのバリアントは、配列番号７２の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７２と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１１９】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１２０】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含む。

【０１２１】

実施形態では、プロモーターは、本明細書に記載の任意のプロモーターであり得る。実施形態では、エンハンサーは、本明細書に記載の任意のエンハンサーであり得る。

【０１２２】
一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７３と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１２３】
実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１２４】
実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含む。

【０１２５】
実施形態では、プロモーターは、本明細書に記載の任意のプロモーターであり得る。実施形態では、エンハンサーは、本明細書に記載の任意のエンハンサーであり得る。

【０１２６】
一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７４と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７４と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、

９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７４の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７４と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１２７】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１２８】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含む。

【０１２９】

実施形態では、プロモーターは、本明細書に記載の任意のプロモーターであり得る。実施形態では、エンハンサーは、本明細書に記載の任意のエンハンサーであり得る。

【０１３０】

一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７５と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７５と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７５の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７５と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、

９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１３１】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１３２】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含む。

【０１３３】

実施形態では、プロモーターは、本明細書に記載の任意のプロモーターであり得る。実施形態では、エンハンサーは、本明細書に記載の任意のエンハンサーであり得る。

【０１３４】

一態様では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むウイルスベクターであって、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが、配列番号７６と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列は、配列番号７６と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７６の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１３５】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、および肝臓特異的エンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１３６】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアント、プロモーター、およびエンハンサーを含む治療カーゴ部分をさらに含む。

【０１３７】

実施形態では、プロモーターは、本明細書に記載の任意のプロモーターであり得る。実施形態では、エンハンサーは、本明細書に記載の任意のエンハンサーであり得る。

【０１３８】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７０と９０パーセントより高い配列同一性を共有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７０と９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７０を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７０と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１３９】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７１と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５の配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７１と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７１を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７１と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、

９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１４０】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７２と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５の配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７２と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７２を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７２と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１４１】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７３と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント

、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７３を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７３と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１４２】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７４と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７４と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７４を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７４と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％

、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１４３】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７５と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７５と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７５の配列を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７５と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１４４】

一態様では、治療カーゴ部分を含むウイルスベクターであって、治療カーゴ部分が、配列番号７６と少なくとも７５パーセント、少なくとも８０パーセント、少なくとも８５パーセント、少なくとも９０パーセント、または少なくとも９５パーセントの配列同一性を有する配列を含むコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む、ウイルスベクターが提供される。例えば、実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７６と７５パーセント、７６パーセント、７７パーセント、７８パーセント、７９パーセント、８０パーセント、８１パーセント、８２パーセント、８３パーセント、８４パーセント、８５パーセント、８６パーセント、８７パーセント、８８パーセント、８９パーセント、９０パーセント、９１パーセント、９２パーセント、９３パーセント、９４パーセント、９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセント、または９９パーセント同一である。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは配列番号７６を含む。実施形態では、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、配列番号７６と９０．０％、９０．１％、９０．２％、９０．３％、９０．４％、９０．５％、９０．６％、９０．７％、９０．８％、９０．９％、９１．０％、９１．１％、９１．２％、９１．３％、９１．４％、９１．５％、９１．６％、９１．７％、９１．８％、９１．９％、９２．０％、９２．１％、９２．２％、９２．３％、９２．４％、９２．５％、９２．６％、９２．７％、９２．８％、９２．９％、９３．０％、９３．１％、９３．２％、９３．３％、９３．４％、９３．５％、９３．６％、９３．７％、９３．８％、９３．９％、９４．０％、９４．１％、９４．２％、９４．３％、９４．

４％、９４．５％、９４．６％、９４．７％、９４．８％、９４．９％、９５．０％、９５．１％、９５．２％、９５．３％、９５．４％、９５．５％、９５．６％、９５．７％、９５．８％、９５．９％、９６．０％、９６．１％、９６．２％、９６．３％、９６．４％、９６．５％、９６．６％、９６．７％、９６．８％、９６．９％、９７．０％、９７．１％、９７．２％、９７．３％、９７．４％、９７．５％、９７．６％、９７．７％、９７．８％、９７．９％、９８．０％、９８．１％、９８．２％、９８．３％、９８．４％、９８．５％、９８．６％、９８．７％、９８．８％、９８．９％、９９．０％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１４５】

実施形態では、ウイルスベクターは、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含む治療カーゴ部分をさらに含み、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーをさらに含み、コドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントは、プロモーターおよび肝臓特異的エンハンサーの両方によって動作可能に制御される。

【０１４６】

一態様では、パッケージング細胞によって産生され、標的細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が開示される。実施形態では、レンチウイルス粒子は、標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質および本明細書で詳述するウイルスベクターを含む。

【０１４７】

一態様では、被験体におけるフェニルケトン尿症（ＰＫＵ）を処置する方法が開示される。方法は、本明細書で詳述するレンチウイルス粒子の治療有効量を被験体に投与することを含む。

【０１４８】

一態様では、被験体におけるＰＫＵを処置するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントの使用が提供される。別の態様では、被験体におけるＰＫＵを処置するための医薬を製剤化するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントの使用が提供される。

【０１４９】

一態様では、被験体におけるＰＫＵの処置に使用するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが提供される。別の態様では、被験体におけるＰＫＵの処置に使用するための医薬を製剤化するためのコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントが提供される。

【０１５０】

一態様では、ＰＡＨ配列の発現を増強するレンチウイルスベクターが提供される。実施形態では、ＰＡＨ配列またはＰＡＨ　３’ＵＴＲ配列のうちの少なくとも１つが改変される。さらなる実施形態では、そのような改変は、ＰＡＨ配列のｍＲＮＡ転写物の二次構造を変更する。さらなる実施形態では、そのような改変は、ｍＲＮＡ　ＰＡＨの二次構造配列およびｍＲＮＡ　３’ＵＴＲの二次構造配列のうちの少なくとも１つの変更を含む。さらなる実施形態では、そのような改変は、ＰＡＨ　ｍＲＮＡのコード領域および３’ＵＴＲ領域の相互作用を変更する。さらなる実施形態では、そのような改変は、ＰＡＨタンパク質産生に及ぼすＰＡＨ二次構造の負の調節効果を阻害する。

【０１５１】

実施形態では、モジュレートされたＰＡＨ配列は、天然に存在するＰＡＨ配列が、その任意のバリアントを含むそのヌクレオチドの任意の１つまたは複数の任意の付加、欠失、置換、または改変を含む、改変されている任意の配列を含む。実施形態では、改変は、天然に存在する配列のグアノシンシトシン含有量、天然に存在する配列の１つもしくは複数のコドン、または天然に存在する配列の１つもしくは複数のＣｐＧ部位のうちの１つまたは複数をモジュレートすることを含む。実施形態では、改変は、コドン最適化ＰＡＨ配列を含む。ＰＡＨコドン最適化配列は、本明細書に記述および記載の配列を含む任意の適し

たＰＡＨコドン最適化配列であり得る。実施形態では、改変ＰＡＨ配列（コドン最適化配列を含む）をコードするベクターは、改変されていない（例えば、コドン最適化されていない）ＰＡＨ配列をコードするベクターと比べて高いＰＡＨ発現をもたらす。

【０１５２】

実施形態では、改変ＰＡＨ配列は、配列番号１、７０、７１、または７２のいずれかと少なくとも７０％、７５％、８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％、しかし１００％未満の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、改変ＰＡＨは、配列番号７０、７１、または７２の配列のいずれかを含む。

【０１５３】

実施形態では、モジュレートされたＰＡＨ　３’ＵＴＲ配列は、天然に存在するＰＡＨ３’ＵＴＲ配列が、その任意のバリアントを含むそのヌクレオチドの任意の１つまたは複数の任意の付加、欠失、置換、または改変を含む、改変されている任意の配列を含む。実施形態では、モジュレートされたＰＡＨ　３’ＵＴＲ配列は、そのヌクレオチドの１つまたは複数の置換または欠失のうちの少なくとも１つを含む。さらなる実施形態では、３’ＵＴＲヌクレオチドの全てまたは実質的に全てが置換または欠失される。

【０１５４】

実施形態では、改変された３’ＵＴＲ配列は、異なる遺伝子の３’ＵＴＲ配列に由来する３’ＵＴＲ配列を含む。実施形態では、ＰＡＨの３’ＵＴＲ配列は、異なる遺伝子の３’ＵＴＲ配列によって置換されている。実施形態では、３’ＵＴＲ配列はアルブミン３’ＵＴＲを含む。実施形態では、アルブミン３’ＵＴＲは、配列番号８６と少なくとも７０％、７５％、８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％、しかし１００％未満の配列同一性を有する配列を含む。実施形態では、アルブミン３’ＵＴＲは配列番号８６の配列を含む。

【０１５５】

実施形態では、改変されたＰＡＨ　３’ＵＴＲ配列を含むＰＡＨ配列をコードするレンチウイルスベクターは、ＰＡＨ　３’ＵＴＲが破壊されていないＰＡＨ配列をコードするレンチウイルスベクターより高いＰＡＨ発現をもたらす。

【０１５６】

実施形態では、改変ＰＡＨ　３’ＵＴＲおよび改変ＰＡＨ配列（コドン最適化配列を含む）をコードするレンチウイルスベクターは、改変されていないＰＡＨ　３’ＵＴＲおよび／または改変されていない（例えば、コドン最適化されていない）ＰＡＨ配列のいずれかをコードするベクターと比べて高いＰＡＨ発現をもたらす。

【０１５７】

フェニルケトン尿症

ＰＫＵは、ＰＡＨの変異および／またはＰＡＨ補因子（すなわち、ＢＨ４）の合成もしくは再生の欠損によって引き起こされると考えられている。特に、いくつかのＰＡＨ変異が、小胞体におけるタンパク質のフォールディングに影響を及ぼし、酵素触媒活性を減弱させるかまたはほぼ消失させるタンパク質構造のミスセンス変異（約６３％）および小さい欠失（約１３％）により、分解および／または凝集を加速させることが示されている。ＰＡＨの機能性に影響を及ぼし得る多数の変異が存在するため、ＰＫＵを処置するための有効な治療アプローチは、異常なＰＡＨ、ならびにＰＡＨ補充療法を投与および／または生成することができる様式に対処する必要がある。

【０１５８】

一般的に、診断時に測定されたＰｈｅレベル、Ｐｈｅに対する食事耐性、および治療に対する潜在的応答性に基づいて、３つの主要な表現型の群がＰＫＵにおいて分類されている。これらの群は、古典的ＰＫＵ（約Ｐｈｅ＞１２００μＭ）、非定型または軽度のＰＫＵ（Ｐｈｅは約６００～１２００μＭである）、および永続的な軽度の高フェニルアラニン血症（ＨＰＡ、Ｐｈｅは１２０～６００μＭである）を含む。

【０１５９】

ＰＫＵの検出は、ユニバーサル新生児スクリーニング（ＮＢＳ）に依存する。かかとの

穿刺から収集した血液１滴を、米国における５０全ての州で義務づけられており、ほとんどの先進諸国でルーチンとして使用されるスクリーニングにおいてフェニルアラニンレベルに関して試験する。

【０１６０】

遺伝子医薬

遺伝子医薬は、疾患の治療または予防を目的として、遺伝子構築物を宿主細胞に送達するために使用されるウイルスベクターへの言及を含む。

【０１６１】

遺伝子構築物には、既存の欠陥を修正または補完する機能的遺伝子または遺伝子の一部、調節タンパク質をコードするＤＮＡ配列、アンチセンス、低分子ヘアピンＲＮＡ、低分子相同性ＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ　ｈｏｍｏｌｏｇｙ　ＲＮＡ）、長い非コードＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡまたはその他を含む調節性ＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ配列、ならびに病状を変化させるために、重大な細胞因子について競合するように設計されたＲＮＡまたはタンパク質のいずれかをコードするデコイ配列が含まれ得るが、これらに限定されない。実施形態では、遺伝子医薬は、特定の疾患の処置または緩和を与えるために、これらの治療的遺伝子構築物を標的細胞へ送達することを含む。

【０１６２】

機能的なＰＡＨ遺伝子をｉｎ　ｖｉｖｏで肝臓に送達することによって、ＰＡＨ活性を再構成して、血液中のＰｈｅの正常なクリアランスをもたらし、したがって食事制限または頻繁な酵素補充療法の必要性をなくすことができる。この治療アプローチの効果は、内因性のＰＡＨに対するｓｈＲＮＡの標的化によって改善することができる。本開示の一態様では、胎児がＰＫＵ遺伝子型に対するリスクがあると同定されている場合には、機能的なＰＡＨ遺伝子またはそのバリアントをまた子宮内に送達することができる。実施形態では、機能的ＰＡＨ遺伝子またはそのバリアントは、コドン最適化ＰＡＨ遺伝子である。実施形態では、胎児がＰＫＵ表現型のリスクがあるかどうかを決定するために、診断ステップを実行することができる。診断ステップが、胎児がＰＫＵ表現型のリスクがあると決定する場合、胎児を、本明細書で詳述する遺伝子医薬によって処置することができる。処置は子宮内またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで行うことができる。

【０１６３】

レンチウイルスベクターシステム

本明細書における種々の態様および実施形態に従うレンチウイルスのビリオン（粒子）は、ビリオン（ウイルス粒子）を産生するために必要なウイルスタンパク質をコードするベクターシステムによって発現される。種々の実施形態では、レンチウイルスのＰｏｌタンパク質をコードする核酸配列を含有する１つのベクターは、プロモーターに作動可能に連結されて、逆転写および組込みのために提供される。別の実施形態では、Ｐｏｌタンパク質は、複数のベクターによって発現される。別の実施形態では、プロモーターに作動可能に連結された、ウイルスカプシドを形成するためのレンチウイルスのＧａｇタンパク質をコードする核酸配列を含有するベクターが提供される。実施形態では、このｇａｇの核酸配列は、ｐｏｌの核酸配列の少なくとも一部とは別のベクター上にある。他の実施形態では、ｇａｇの核酸配列は、ｐｏｌタンパク質をコードする全てのｐｏｌの核酸配列とは別のベクター上にある。

【０１６４】

野生型復帰変異体を得る機会をさらに最小化するための粒子の作製に使用される多数の改変を、本明細書におけるベクターに対して行うことができる。これらとしては、ＬＴＲのＵ３領域の欠失、ｔａｔの欠失、およびマトリックス（ＭＡ）の欠失が挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖのベクターは、レンチウイルスパッケージング配列と称される、レンチウイルスＲＮＡをパッケージングするレンチウイルスゲノム由来のヌクレオチドを含有しない。

【０１６５】

実施形態では、粒子を形成するベクター（複数可）は、エンベロープタンパク質を発現

するレンチウイルスゲノムからの核酸配列を含有しない。実施形態では、プロモーターに作動可能に連結されたエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含有する別のベクターが使用される。実施形態では、エンベロープタンパク質をコードするこの別のベクターは、レンチウイルスパッケージング配列を含有しない。一実施形態では、エンベロープ核酸配列をコードする配列は、レンチウイルスエンベロープタンパク質をコードする。

【０１６６】

別の実施形態では、エンベロープタンパク質は、レンチウイルス由来のものではなく、異なるウイルスに由来する。生じる粒子は、シュードタイプ化粒子と称される。エンベロープの適切な選択により、実質的にあらゆる細胞に「感染」することができる。例えば、エンドサイトーシス区画を標的化するエンベロープタンパク質をコードするｅｎｖ遺伝子を使用することができる。そのようなｅｎｖ遺伝子およびエンベロープタンパク質が由来し得るウイルスの例としては、インフルエンザウイルス（例えば、インフルエンザＡウイルス、インフルエンザＢウイルス、インフルエンザＣウイルス、インフルエンザＤウイルス、イサウイルス、クアランジャウイルス、およびトゴトウイルス）、ベシクロウイルス（例えば、インディアナベシクロウイルス）、アルファウイルス（数ある中でも例えば、セムリキフォレストウイルス、シンドビスウイルス、アウラウイルス、バーマフォレストウイルス、ベバルウイルス、カバソウウイルス（Ｃａｂａｓｓｏｕ　ｖｉｒｕｓ）、ゲタウイルス、ハイランズＪウイルス、トロカラウイルス（Ｔｒｏｃａｒａ　ｖｉｒｕｓ）、ウナウイルス、ヌドゥムウイルス、およびミドルブルグウイルス）、アレナウイルス（例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、マチュポウイルス、フニンウイルスおよびラッサ熱ウイルス）、フラビウイルス（数ある中でも例えば、ダニ媒介性脳炎ウイルス、デングウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ＧＢウイルス、アポイウイルス、バガザウイルス、エッジヒルウイルス、ジュグラウイルス（Ｊｕｇｒａ　ｖｉｒｕｓ）、カダムウイルス（Ｋａｄａｍ　ｖｉｒｕｓ）、ダカールコウモリウイルス、モドックウイルス、ポワッサンウイルス、ウスツウイルス、およびサルビエハウイルス（Ｓａｌ　Ｖｉｅｊａ　ｖｉｒｕｓ））、ラブドウイルス（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、流行性耳下腺炎または麻疹）およびオルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）が挙げられる。

【０１６７】

好ましく使用され得る他のエンベロープタンパク質としては、内在性レトロウイルス（例えば、ネコ内在性レトロウイルスおよびヒヒ内在性レトロウイルス）ならびに密接に関連するガンマレトロウイルス（数ある中でも例えば、モロニー白血病ウイルス、ＭＬＶ－Ｅ、ＭＬＶ－Ａ、テナガザル白血病ウイルス、ＧＡＬＶ、ネコ白血病ウイルス、コアラレトロウイルス、トレーガーアヒル脾臓壊死ウイルス、クサリヘビレトロウイルス、ヒヨコ合胞体ウイルス（Ｃｈｉｃｋ　ｓｙｎｃｙｔｉａｌ　ｖｉｒｕｓ）、ガードナー－アーンスタインネコ肉腫ウイルス、およびブタＣ型がんウイルス）に由来するものが挙げられる。これらのガンマレトロウイルスは、初代細胞を標的化するためのｅｎｖ遺伝子およびエンベロープタンパク質の供給源として使用することができる。宿主細胞が初代細胞である場合、ガンマレトロウイルスは特に好ましい。

【０１６８】

エンベロープタンパク質は、特定の所望の宿主細胞を標的化するために選択することができる。例えば、ドーパミン受容体などの特定の受容体を標的化することは、脳送達のために使用することができる。別の標的は血管内皮であり得る。これらの細胞は、フィロウイルス科の任意のウイルス（例えば、クウェバウイルス、ディアンロウイルス（Ｄｉａｎｌｏｖｉｒｕｓｅｓ）、エボラウイルス、およびマールブルグウイルス）に由来するエンベロープタンパク質を使用して標的化することができる。エボラウイルスの種としては、タイフォレストエボラウイルス、ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、およびレストンエボラウイルスが挙げられる。

【０１６９】

追加的に、実施形態では、糖タンパク質は、転写後修飾を起こすことができる。例えば

、一実施形態では、エボラのＧＰは、翻訳後に修飾されてＧＰ１およびＧＰ２糖タンパク質になることができる。別の実施形態では、シュードタイプ化エンベロープを有する異なるレンチウイルスカプシドを使用することができる（例えば、ＦＩＶまたはＳＨＩＶ［米国特許第５，６５４，１９５号］）。ＳＨＩＶシュードタイプ化ベクターは、サルなどの動物モデルにおいて容易に使用することができる。

【０１７０】

本明細書中で提供される通りのレンチウイルスベクターシステムは、通常、ｇａｇ遺伝子、ｐｏｌ遺伝子、またはｒｅｖ遺伝子のうちの少なくとも１つを含む少なくとも１つのヘルパープラスミドを含む。ｇａｇ遺伝子、ｐｏｌ遺伝子、およびｒｅｖ遺伝子のそれぞれが個々のプラスミド上に提供されてもよいし、あるいは１つまたは複数の遺伝子が一緒に同一のプラスミド上に提供されてもよい。一実施形態では、ｇａｇ遺伝子、ｐｏｌ遺伝子、およびｒｅｖ遺伝子は、同一のプラスミド上に提供される（例えば、図１）。別の実施形態では、ｇａｇ遺伝子およびｐｏｌ遺伝子は第１のプラスミド上に提供され、ｒｅｖ遺伝子は第２のプラスミド上に提供される（例えば、図２）。したがって、３ベクター（例えば、図１）および４ベクター（例えば、図２）システムの両方を使用して、本明細書に記載のレンチウイルスを産生することができる。実施形態では、治療ベクター、少なくとも１つのエンベローププラスミド、および少なくとも１つのヘルパープラスミドを、パッケージング細胞、例えばパッケージング細胞株にトランスフェクトする。パッケージング細胞株の非限定的な例は、２９３Ｔ／１７　ＨＥＫ細胞株である。治療ベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも１つのヘルパープラスミドをパッケージング細胞株にトランスフェクトすると、レンチウイルス粒子が最終的に産生される。本明細書で提供されるレンチウイルスベクターシステムは、典型的にｇａｇ、ｐｏｌ、またはｒｅｖ遺伝子のうちの少なくとも１つを含む少なくとも１つのヘルパープラスミドを含む。ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｒｅｖ遺伝子の各々は個々のプラスミドに提供されてもよく、または１つもしくは複数の遺伝子が同じプラスミドに共に提供されてもよい。一実施形態では、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｒｅｖ遺伝子は同じプラスミドに提供される（例えば、図１）。別の実施形態では、ｇａｇおよびｐｏｌ遺伝子が第１のプラスミドに提供され、ｒｅｖ遺伝子が第２のプラスミドに提供される（例えば、図２）。したがって、３ベクターシステムおよび４ベクターシステムの両方が、本明細書中に記載するようなレンチウイルスを製造するために使用され得る。実施形態では、治療ベクター、少なくとも１つのエンベローププラスミド、および少なくとも１つのヘルパープラスミドは、パッケージング細胞、例えば、パッケージング細胞株中にトランスフェクトされる。パッケージング細胞株の非限定的な例は、２９３Ｔ／１７　ＨＥＫ細胞株である。治療ベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも１つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株中にトランスフェクトされた時に、レンチウイルス粒子が最終的に産生される。

【０１７１】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムが開示される。システムは、本明細書中に記載するレンチウイルスベクター、細胞に感染するために最適化されたエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミド、ならびにｇａｇ遺伝子、ｐｏｌ遺伝子、およびｒｅｖ遺伝子を発現するための少なくとも１つのヘルパープラスミドを含み、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも１つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株中にトランスフェクトされた時に、レンチウイルス粒子がパッケージング細胞株によって産生され、レンチウイルス粒子は、ＰＡＨの産生を阻害することができる。

【０１７２】

別の態様では、本明細書で治療ベクターとも称されるレンチウイルスベクターは、以下のエレメントを含む：ハイブリッド５’長鎖末端反復配列（ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター／５’長鎖末端反復配列（ＬＴＲ））（配列番号１３～１４）、プサイパッケージングシグナル（ＲＮＡパッケージング部位）（配列番号１５）、Ｒｅｖ応答エレメント（ＲＲＥ）（配列番号１６）、中心ポリプリントラクト（ｃＰＰＴ）（ポリプリン

トラクト）（配列番号１７）、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（ｈＡＡＴ）（配列番号４）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）（配列番号１、２、および７０～７６）、長鎖ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）配列（配列番号１８）、およびデルタＵ３　３’ＬＴＲ（配列番号１９）。実施形態では、本明細書で治療ベクターとも称されるレンチウイルスベクターは、以下のエレメントを含む：ハイブリッド５’長鎖末端反復配列（ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター／５’長鎖末端反復配列（ＬＴＲ））（配列番号１３～１４）、プサイパッケージングシグナル（ＲＮＡパッケージング部位）（配列番号１５）、Ｒｅｖ応答エレメント（ＲＲＥ）（配列番号１６）、中心ポリプリントラクト（ｃＰＰＴ）（ポリプリントラクト）（配列番号１７）、Ｈ１プロモーター（配列番号２０）、ＰＡＨ　ｓｈＲＮＡ（配列番号１１および１２）、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（ｈＡＡＴ）（配列番号４）、長鎖ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）配列（配列番号１８）、およびデルタＵ３　３’ＬＴＲ（配列番号１９）。実施形態では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化が、本明細書中で言及する配列を改変するために使用され得る。

【０１７３】

別の態様では、ヘルパープラスミドは、以下のエレメントを含む：ＣＭＶエンハンサー／ニワトリベータアクチンプロモーター（配列番号２１）；ＨＩＶ構成成分ｇａｇ（配列番号２２）；ＨＩＶ構成成分ｐｏｌ（配列番号２３）；ＨＩＶ　Ｉｎｔ（配列番号２４）；ＨＩＶ　ＲＲＥ（配列番号２５）；およびＨＩＶ　Ｒｅｖ（配列番号２６）。別の態様では、ヘルパープラスミドは、ｇａｇ遺伝子（配列番号２２）およびｐｏｌ遺伝子（配列番号２３）を発現させるための第１のヘルパープラスミド、ならびにｒｅｖ遺伝子（配列番号２６）を発現させるための第２のおよび別のプラスミドを含むように改変され得る。実施形態では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化が、本明細書中で言及する配列を改変するために使用され得る。

【０１７４】

別の態様では、エンベローププラスミドは、以下のエレメントを含む：サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（配列番号２７）および水疱性口内炎ウイルスＧ糖タンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）（配列番号２８）。実施形態では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化が、本明細書中で言及する配列を改変するために使用され得る。

【０１７５】

様々な態様では、レンチウイルスのパッケージングのために使用されるプラスミドは、ベクター機能を失うことなく、様々なエレメントの置換、付加、サブトラクション、または変異によって改変される。例えば、非限定的に、以下のエレメントは、パッケージングシステムを含むプラスミド中の類似のエレメントを置き換えることができる：伸長因子－１アルファ（ＥＦ－１アルファ）およびユビキチンＣ（ＵｂＣ）プロモーターは、ＣＭＶまたはＣＡＧプロモーターを置き換えることができる。ＳＶ４０ポリＡおよびｂＧＨポリＡは、ウサギベータグロビンポリＡを置き換えることができる。別の態様では、ヘルパープラスミド中のＨＩＶ配列は、異なるＨＩＶの株またはクレードから構築することができる。例えば、ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質を、ガンマレトロウイルス（例えば、中でもテナガザル白血病ウイルス、ＧＡＬＶ、マウス白血病ウイルス１０Ａ１、ＭＬＶ、コアラレトロウイルス、トレーガーアヒル脾臓壊死ウイルス、バイパーレトロウイルス、ニワトリ合胞体ウイルス、ガードナー－アーンスタインネコ肉腫ウイルス、およびブタＣ型腫瘍ウイルス）、内因性レトロウイルス（例えば、中でもネコ内因性ウイルス（ＲＤ１１４）、ヒト内因性レトロウイルス、例えばＨＥＲＶ－Ｗ、およびヒヒ内因性レトロウイルス、ＢａＥＶ）、リッサウイルス（例えば、狂犬病ウイルス、ＦＵＧ）、マンマレナウイルス（例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ＬＣＭＶ、インフルエンザウイルス、例えばＡ型インフルエンザウイルス、Ａ型インフルエンザ家禽ペストウイルス（Influenza A fowl plague virus）、ＦＰＶ、Ｂ型インフルエンザウイルス、Ｃ型インフルエンザウイルス、Ｄ型インフルエンザウイルス、イサウイルス、クアランジャウイルス、およびトゴトウイルス）、アルファウイルス（例えば、ロスリバーアルファウイルス、ＲＲＶ、または

エボラウイルス、ＥｂｏＶ、例えばスーダンエボラウイルス、タイ森林エボラウイルス、ザイールエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、およびレストンエボラウイルス）に由来する膜糖タンパク質で置換することができる。

【０１７６】

様々なレンチウイルスパッケージングシステムは市販のものを入手でき（例えば、Ｌｅｎｔｉ－ｖｐａｋ ｐａｃｋａｇｉｎｇ ｋｉｔ、ＯｒｉＧｅｎｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）、また本明細書中に記載するように設計することもできる。さらに、レンチウイルスパッケージングシステムの態様を置換または改変して、レンチウイルス粒子の産生効率などのいくつもの関連因子を向上させることは関連分野の当業者の技術的範囲内である。

【０１７７】

別の態様では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターもまた使用することができる。実施形態では、ＡＡＶベクターはＡＡＶ－ＤＪ血清型である。実施形態では、ＡＡＶベクターは、血清型１～１１のいずれかである。実施形態では、ＡＡＶ血清型はＡＡＶ－２である。実施形態では、ＡＡＶベクターは、ヒト肝細胞の最適な形質導入のために操作された非天然型である。

【０１７８】

ＡＡＶベクターの構築。本開示の態様では、ＰＡＨコード配列（配列番号１、２、および７０～７６）およびプロトロンビンエンハンサー（配列番号３）をｈＡＡＴプロモーター（配列番号４）と共にｐＡＡＶプラスミド（Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に挿入する。ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ制限部位が隣接するＰＡＨコード配列を、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ、ＫＹ）により合成する。ｐＡＡＶプラスミドおよびＰＡＨ配列を、ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ酵素によって消化し、共にライゲートする。ＰＡＨ配列の挿入をシークエンシングによって確認する。次に、ＭｌｕＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位が隣接するプロトロンビンエンハンサーおよびｈＡＡＴプロモーターを、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ、ＫＹ）により合成する。ＰＡＨコード配列およびプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター配列を含有するｐＡＡＶプラスミドを、ＭｌｕＩおよびＥｃｏＲＩ酵素によって消化し、共にライゲートする。プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターの挿入を、シークエンシングによって確認する。

【０１７９】

さらに、ＰＡＨを発現させるための代表的なＡＡＶプラスミドシステムは、ＡＡＶヘルパープラスミド、ＡＡＶプラスミド、およびＡＡＶ Ｒｅｖ／Ｃａｐプラスミドを含み得る。ＡＡＶヘルパープラスミドは、左ＩＴＲ（配列番号２９）、プロトロンビンエンハンサー（配列番号３）、ヒトアンチアルファトリプシンプロモーター（配列番号４）、ＰＡＨエレメント（配列番号１、２、および７０～７６）、ポリＡエレメント（配列番号３０）、および右ＩＴＲ（配列番号３１）を含有し得る。ＡＡＶプラスミドは、適したプロモーターエレメント（配列番号２１または配列番号２７）、Ｅ２Ａエレメント（配列番号３２）、Ｅ４エレメント（配列番号３３）、ウイルス関連（ＶＡ）ＲＮＡエレメント（配列番号３４）、およびポリＡエレメント（配列番号３０）を含有し得る。ＡＡＶ Ｒｅｐ／Ｃａｐプラスミドは、適したプロモーターエレメント（配列番号２１または配列番号２７）、Ｒｅｐエレメント（配列番号３５；ＡＡＶ２ Ｒｅｐ）、Ｃａｐエレメント（配列番号３６（ＡＡＶ２ Ｃａｐ）、３７（ＡＡＶ８ Ｃａｐ）、または３８（ＡＡＶ ＤＪ Ｃａｐ））、およびポリＡエレメント（配列番号３０）を含有し得る。

【０１８０】

実施形態では、プロトロンビンエンハンサーおよびＰＡＨ配列を含むＡＡＶ／ＤＪプラスミド（ＡＡＶ／ＤＪ－Ｐｒｏ－ＰＡＨ）が提供される。実施形態では、ＰＡＨ配列は、本明細書に開示のコドン最適化ＰＡＨ配列のいずれかである。実施形態では、プロトロンビンエンハンサー、イントロン、およびＰＡＨ配列を含むＡＡＶ／ＤＪプラスミド（ＡＡＶ／ＤＪ－Ｐｒｏ－イントロン－ＰＡＨ）が提供される。実施形態では、イントロンはヒ

トベータグロビンイントロンである。実施形態では、イントロンはウサギベータグロビンイントロンである。実施形態では、ＧＦＰを含むＡＡＶ／ＤＪプラスミド（ＡＡＶ／ＤＪ－ＧＦＰ）が提供される。

【０１８１】

実施形態では、プロトロンビンエンハンサーおよびＰＡＨ配列を含むＡＡＶ２プラスミド（ＡＡＶ２－Ｐｒｏ－ＰＡＨ）が提供される。実施形態では、ＰＡＨ配列は、本明細書に開示のコドン最適化ＰＡＨ配列のいずれかである。実施形態では、プロトロンビンエンハンサー、イントロン、およびＰＡＨ配列を含むＡＡＶ２プラスミド（ＡＡＶ２－Ｐｒｏ－イントロン－ＰＡＨ）が提供される。実施形態では、イントロンは、ヒトベータグロビンイントロンである。実施形態では、イントロンは、ウサギベータグロビンイントロンである。実施形態では、ＧＦＰを含むＡＡＶ２（ＡＡＶ２－ＧＦＰ）が提供される。

【０１８２】

実施形態では、本明細書に開示のＡＡＶベクターのいずれかは調節性ＲＮＡを発現するコード配列を含有し得る。実施形態では、調節性ＲＮＡは、ｌｎｃＲＮＡである。実施形態では、調節性ＲＮＡはマイクロＲＮＡである。実施形態では、調節性ＲＮＡはｐｉＲＮＡである。実施形態では、調節性ＲＮＡはｓｈＲＮＡである。実施形態では、調節性ＲＮＡは、配列番号１１または１２と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、またはそれより高いパーセント同一性を有する配列を含むスモールＲＮＡ配列である。

【０１８３】

ＡＡＶ粒子の産生。ＡＡＶ－ＰＡＨプラスミドを、プラスミドｐＡＡＶ－ＲＣ２（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）およびｐＨｅｌｐｅｒ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）と組み合わせてもよい。ｐＡＡＶ－ＲＣ２プラスミドは、ＲｅｐおよびＡＡＶ－２カプシド遺伝子を含有してもよく、ｐＨｅｌｐｅｒは、アデノウイルスＥ２Ａ、Ｅ４、およびＶＡ遺伝子を含有し得る。ＡＡＶカプシドはまた、ＡＡＶ－８（配列番号３９）またはＡＡＶ－ＤＪ（配列番号４０）配列も含み得る。ＡＡＶ粒子を産生するために、これらのプラスミドを１：１：１（ｐＡＡＶ－ＰＡＨ：ｐＡＡＶ－ＲＣ２：ｐＨｅｌｐｅｒ）の比で２９３Ｔ細胞にトランスフェクトしてもよい。１５０ｍｍディッシュ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ）での細胞のトランスフェクションの場合、１０マイクログラムの各プラスミドをＤＭＥＭ　１ｍｌに添加してもよい。別のチューブでは、６０マイクロリットルのトランスフェクション試薬ＰＥＩ（１マイクログラム／ｍｌ）（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を１ｍｌのＤＭＥＭに添加してもよい。２本のチューブを共に混合し、１５分間インキュベートしてもよい。次いでトランスフェクション混合物を細胞に加えてもよく、細胞を３日後に収集する。凍結／融解溶解により細胞をドライアイス／イソプロパノールに溶解してもよい。３７℃で３０分間、ベンゾナーゼヌクレアーゼ（Ｓｉｇｍａ）を細胞溶解液に加えてもよい。４℃で１５分間の１２，０００ｒｐｍでの遠心分離により細胞デブリを次いでペレット化してもよい。上清を収集した後、標的細胞に加えてもよい。

【０１８４】

投薬量および剤形

本開示の組成物は、疾患の様々な段階の間にＰＫＵ患者を処置するために使用することができる。開示されるベクター組成物は、目的の遺伝子または配列の短期、中期、または長期の発現を可能にし、本開示のベクターのエピソームでの維持を可能にする。したがって、投与レジメンは、処置される状態および投与方法に基づいて変化し得る。

【０１８５】

実施形態では、ベクター組成物は、必要とする被験体に様々な用量で投与され得る。具体的には、被験体は、約≧10^6感染量（１用量は、平均で１つの標的細胞を形質導入するために必要である）を投与され得る。より具体的には、被験体は、約≧10^7、約≧10^8、約≧10^9、約≧10^{10}、約≧10^{11}、または約≧10^{12}感染量／ｋｇ体重

、またはこれらの値の間の任意の数の用量を投与され得る。投与の上限は、各々の疾患適応症に関して決定され、各々の個々の生成物または生産ロットの毒性／安全性プロファイルに依存する。

【０１８６】

さらに、本開示のベクターは、１日に１回または２回、あるいは任意のその他の好適な期間で定期的に投与され得る。例えば、ベクター組成物は、週に１回、２週間に１回、３週間に１回、１カ月に１回、２カ月毎、３カ月毎、６カ月毎、９カ月毎、１年に１回、１８カ月毎、２年毎、３０カ月毎、または３年毎に、必要とする被験体に投与され得る。

【０１８７】

実施形態では、本開示のベクター組成物は、医薬組成物として投与される。実施形態では、医薬組成物は、多様な剤形に製剤化され得、これらの剤形としては、臨床適用のための経鼻、経肺、経口、局所、または非経口の剤形が挙げられるが、これらに限定されない。各剤形は、様々な可溶化剤、崩壊剤、界面活性剤、充填剤、増粘剤、結合剤、湿潤剤などの希釈剤、またはその他の薬学的に許容される賦形剤を含み得る。医薬組成物は、注射、ガス注入（ｉｎｓｕｆｆｌａｔｉｏｎ）、注入、または皮内曝露用にも製剤化され得る。例えば、注射製剤は、好適なｐＨおよび張度の水性または非水性の溶液中に本開示のベクターを含み得る。

【０１８８】

本開示のベクター組成物は、ガイド下の注射による肝臓への直接注射を介して被験体に投与され得る。一部の実施形態では、ベクターは、動脈または静脈循環を介して全身に投与され得る。一部の実施形態では、ベクター組成物は、脾臓または膵臓を含む肝臓のすぐ周囲の組織にガイドされたカニューレ挿入を介して投与され得る。一部の実施形態では、ベクター組成物は、ガイドされたカニューレ挿入または針を介して腎臓に投与され得る。一部の実施形態では、ベクター組成物は、黒質を含む脳の特定の領域にガイドされたカニューレ挿入または針を介して投与され得る。一部の実施形態では、ベクター組成物は、門脈または門脈洞に注射によって送達されてもよく、注射によって臍帯静脈に送達されてもよい。

【０１８９】

本開示のベクター組成物は、例えば、鼻腔内投与、口腔内投与、舌下投与、経口投与、直腸投与、眼投与、非経口（静脈内、皮内、筋肉内、皮下、腹腔内）投与、経肺投与、膣内投与、局所投与、局部投与、乱切後の局部投与、粘膜投与、エアロゾルを介して、アガロースまたはゼラチンなどの半固体媒体中で、あるいは口腔内または経鼻噴霧製剤を介してなど、任意の薬学的に許容される方法を使用して投与され得る。

【０１９０】

さらに、本開示のベクター組成物は、例えば、固体剤形、錠剤、丸剤、ロゼンジ剤、カプセル剤、液体分散液剤、ゲル剤、エアロゾル剤、肺エアロゾル剤、鼻エアロゾル剤、軟膏剤、クリーム剤、半固体剤形、液剤、乳剤、および懸濁剤などの任意の薬学的に許容される剤形に製剤化され得る。さらに、医薬組成物は、制御放出製剤、徐放製剤、即時放出製剤、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。さらに、医薬組成物は、経皮送達システムであり得る。

【０１９１】

実施形態では、医薬組成物は、経口投与用の固体剤形として製剤化され得、固体剤形は、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、または丸剤であり得る。実施形態では、固体剤形は、例えば、炭酸カルシウム、デンプン、スクロース、ラクトース、微結晶性セルロース、またはゼラチンなどの１つまたは複数の賦形剤を含み得る。加えて、固体剤形は、賦形剤に加えて、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤を含み得る。一部の実施形態では、経口剤形は、即時放出形態または放出調節形態であり得る。放出調節剤形としては、制御放出または持続放出、腸管での放出などが挙げられる。放出調節剤形において使用される賦形剤は、当業者に一般に公知である。

【０１９２】

実施形態では、医薬組成物は、舌下剤形または口腔内剤形として製剤化され得る。そのような剤形は、舌下に投与される舌下錠または舌下溶液組成物および頬と歯肉との間に配置される口腔内錠を含む。

【０１９３】

実施形態では、医薬組成物は、経鼻剤形として製剤化され得る。本開示のそのような剤形としては、経鼻送達用の溶液組成物、懸濁物組成物、およびゲル組成物が挙げられる。

【０１９４】

実施形態では、医薬組成物は、懸濁剤、乳剤、またはシロップ剤などの経口投与用の液体剤形として製剤化され得る。実施形態では、液体剤形は、水および液体パラフィンなどの一般に使用される単純な希釈剤に加えて、保湿剤、甘味剤、芳香剤、または防腐剤などの様々な賦形剤を含み得る。実施形態では、組成物は、小児患者への投与のために好適となるように製剤化され得る。

【０１９５】

実施形態では、医薬組成物は、滅菌水性液剤、懸濁剤、乳剤、非水性液剤、または坐剤などの非経口投与用剤形として製剤化され得る。実施形態では、液剤または懸濁剤は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、またはオレイン酸エチルなどの注射可能エステルを含み得る。

【０１９６】

医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、投与の時間および様式、排泄速度、ならびに疾患の重篤度に応じて変化し得る。

【０１９７】

実施形態では、ＰＫＵの処置は、針または血管内カニューレ挿入を使用して肝臓への本開示のベクター構築物のガイドされた直接注射によって達成される。実施形態では、ベクター組成物は、静脈もしくは動脈へのカニューレ挿入によって、または注射、皮内送達、筋肉内送達、もしくは肝臓付近の排出器官への注射によって脳脊髄液、血液、またはリンパ循環中に投与される。

【０１９８】

以下の実施例は、本発明の態様の実例を挙げるために与えたものである。しかしながら、本発明は、これらの実施例に記載する特定の条件にも詳細にも限定されないことを理解するべきである。本明細書中で参照する全ての出版物は、参照により具体的に組み込まれる。

【実施例】

【０１９９】

（実施例１．レンチウイルスベクターシステムの開発）

【０２００】

図１に要約するように、レンチウイルスベクターシステムを開発した（環状形態）。

【０２０１】

治療ベクター、エンベローププラスミド、およびヘルパープラスミドのトランスフェクション後に２９３Ｔ／１７　ＨＥＫ細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡから購入）中でレンチウイルス粒子を産生した。２９３Ｔ／１７　ＨＥＫ細胞のトランスフェクションは、機能的なウイルス粒子を産生し、プラスミドＤＮＡの取込み効率を増加させるために試薬ポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）を使用した。最初に、血清を含まない培養培地中にプラスミドおよびＤＮＡを３：１の比（ＰＥＩのＤＮＡに対する質量比）で別々に加えた。２～３日後、細胞培地を収集し、高速遠心分離および／または濾過とその後の陰イオン交換クロマトグラフィーによってレンチウイルス粒子を精製した。レンチウイルス粒子の濃度は、形質導入単位／ｍｌ（ＴＵ／ｍｌ）によって表すことができる。ＴＵの決定は、培養液中のＨＩＶ　ｐ２４レベルの測定（ｐ２４タンパク質はレンチウイルス粒子中に組み込まれる）、定量ＰＣＲによる形質導入細胞あたりのウイルスＤＮＡコピー数の測定、または細胞の感染および光の使用（ベクターがルシフェラーゼまたは蛍光タンパク質マーカーをコードする場合）

によって達成した。

【０２０２】

３ベクターシステム（すなわち、２ベクターのレンチウイルスパッケージングシステムを含む）を、レンチウイルス粒子を産生するために設計した。３ベクターシステムの概略図を図１に示す。図１に関して簡潔に述べれば、一番上のベクターはヘルパープラスミドであり、これはこの場合、Ｒｅｖを含む。図１の中央に見られるベクターはエンベローププラスミドである。一番下のベクターは、本明細書中に記載する治療ベクターである。

【０２０３】

図１を参照して、ヘルパープラスＲｅｖプラスミドは、ＣＭＶエンハンサー／ニワトリベータアクチンプロモーター（配列番号２１）；ニワトリベータアクチンイントロン（配列番号３９）；ＨＩＶ　Ｇａｇ（配列番号２２）；ＨＩＶ　Ｐｏｌ（配列番号２３）；ＨＩＶインテグラーゼ（配列番号２４）；ＨＩＶ　ＲＲＥ（配列番号２５）；ＨＩＶ　Ｒｅｖ（配列番号２６）；およびウサギベータグロビンポリＡ（配列番号４０）を含む。

【０２０４】

エンベローププラスミドは、ＣＭＶプロモーター（配列番号２７）；ベータグロビンイントロン（配列番号５または６）；ＶＳＶ－Ｇエンベロープ糖タンパク質（配列番号２８）；およびウサギベータグロビンポリＡ（配列番号４０）を含む。

【０２０５】

ヘルパー（プラスＲｅｖ）プラスミドおよびエンベローププラスミドを含有する２ベクターレンチウイルスパッケージングシステムを含む３ベクターシステムの合成を開示する。

【０２０６】

材料および方法：

【０２０７】

ヘルパープラスミドの構築：Ｇａｇ、Ｐｏｌ、およびインテグラーゼ遺伝子を含有するｐＮＬ４－３　ＨＩＶプラスミド（ＮＩＨ　Ａｉｄｓ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）由来のＤＮＡ断片の初期ＰＣＲ増幅によってヘルパープラスミドを構築した。ｐＣＤＮＡ３プラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中の同じ部位に挿入するために使用され得るＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩ制限部位を有する断片を増幅するためのプライマーを設計した。フォワードプライマーは（５’－ＴＡＡＧＣＡＧＡＡＴＴＣＡＴＧＡＡＴＴＴＧＣＣＡＧＧＡＡＧＡＴ－３’）（配列番号４１）であり、リバースプライマーは（５’－ＣＣＡＴＡＣＡＡＴＧＡＡＴＧＧＡＣＡＣＴＡＧＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣＧＡＡＴ－３’）（配列番号４２）であった。

【０２０８】

Ｇａｇ、Ｐｏｌ、インテグラーゼの断片の配列は以下の通りであった：

【０２０９】

GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGA
GGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAA
AGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATC
TGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTAC
CAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACA
GAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAA
AATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGA
AAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGA
ACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACA
GAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAG
ATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACA
CCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGC
AATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAG
ACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATA

GGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATT
TACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATG
AACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGC
TGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGAT
TTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCAC
TAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGG
GAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAAT
AGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGC
CATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACACTAAT
GATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAAT
ATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCAT
GGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACC
CCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGA
AACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGAT
ATGTAACTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAG
AAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAA
CATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGA
GTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTC
TACCTGGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAA
ATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCC
AAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAAC
CTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAA
AGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATT
GTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATAT
ATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTT
AAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATT
TCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTT
GGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATT
AAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTAC
AAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGT
GCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACA
AAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATC
CAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATA
CAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGA
TTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATT
AA（配列番号４３）。

【０２１０】

次に、ＸｂａＩおよびＸｍａＩ隣接制限部位と共にＲＲＥ、Ｒｅｖ、およびウサギベータグロビンポリＡの配列を含有するＤＮＡ断片は、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓによって合成された。次いで、ＸｂａＩおよびＸｍａＩ制限部位においてＤＮＡ断片をプラスミドに挿入した。ＤＮＡ配列は以下の通りであった：

【０２１１】

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTC
AGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCG
ACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATT
CGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCT
CTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAAC
TTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATAT
TGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGC
AGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTAT

TGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAG
CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGC
TGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAA
ATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAA
TTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACA
TATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGC
AACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAG
TATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTG
AGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA
ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGT
CATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT
GCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGC
CCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAA
TTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG
TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATT
GCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGC
ATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
GCGGCCGCCCCGGG（配列番号４４）。

【０２１２】

最後に、ｐＣＤＮＡ３．１のＣＭＶプロモーターをＣＡＧプロモーター（ＣＭＶエンハンサー、ニワトリベータアクチンプロモータープラスニワトリベータアクチンイントロン配列）で置換した。ＭｌｕＩおよびＥｃｏＲＩ隣接制限部位と共にＣＡＧエンハンサー／プロモーター／イントロン配列を含有するＤＮＡ断片は、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓによって合成された。次いで、ＭｌｕＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位においてＤＮＡ断片をプラスミドに挿入した。ＤＮＡ配列は以下の通りであった：

【０２１３】

ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA
CGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG
GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA
GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA
ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTT
CTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC
GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAG
CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG
CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC
CCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT
TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGC
TTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
TGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGC
GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTG
TGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCC
TGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT

GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT
GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCG
GCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTAT
GGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGA
AATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCG
CCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCC
CTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGA
CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGAATTC（配列番号４５）。

【０２１４】

ＶＳＶ－Ｇエンベローププラスミドの構築：

【０２１５】

水疱性口内炎インディアナウイルス糖タンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）配列は、隣接ＥｃｏＲＩ制限部位を用いてＥｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓによって合成された。次いで、ＥｃｏＲＩ制限部位においてＤＮＡ断片をｐＣＤＮＡ３．１プラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に挿入し、ＣＭＶ特異的プライマーを使用するシークエンシングによって正しい配向であることを決定した。

【０２１６】

ＤＮＡ配列は以下の通りであった：

【０２１７】

ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCA
CCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCTTCTAATTAC
CATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGC
CTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGT
GTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTAT
ATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCAT
TGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTG
GATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCAT
GTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAA
ATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACT
ATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCACCTTCTTC
TCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAA
CTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATT
GGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTT
GCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCA
GACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCC
TCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGAT
CTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCACCATAATCAA
TGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAA
TCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGG
GATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGAC
CAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCG
ATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCT
GCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAA
AAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCT
CTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTA
TCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATA
GAGATGAACCGACTTGGAAAGTGA（配列番号２８）。

【０２１８】

３ベクターレンチウイルスパッケージングシステムを含む４ベクターシステムもまた、

本明細書に記載の方法および材料を使用して設計および産生されている。４ベクターシステムの概略図を図２に示す。図２に関して簡潔に述べれば、一番上のベクターはヘルパープラスミドであり、これはこの場合、Ｒｅｖを含まない。第２のベクターは、別のＲｅｖプラスミドである。第３のベクターはエンベローププラスミドである。一番下のベクターは、本明細書に記載の治療ベクターである。

【０２１９】

図２を参照して、ヘルパープラスミドは、ＣＭＶエンハンサー／ニワトリベータアクチンプロモーター（配列番号２１）；ニワトリベータアクチンイントロン（配列番号３９）；ＨＩＶ　Ｇａｇ（配列番号２２）；ＨＩＶ　Ｐｏｌ（配列番号２３）；ＨＩＶインテグラーゼ（配列番号２４）；ＨＩＶ　ＲＲＥ（配列番号２５）；およびウサギベータグロビンポリＡ（配列番号４０）を含む。

【０２２０】

Ｒｅｖプラスミドは、ＲＳＶプロモーターおよびＨＩＶ　Ｒｅｖ（配列番号４６）；ならびにウサギベータグロビンポリＡ（配列番号４０）を含む。

【０２２１】

エンベローププラスミドは、ＣＭＶプロモーター（配列番号２７）；ベータグロビンイントロン（配列番号５または６）；ＶＳＶ－Ｇエンベロープ糖タンパク質（配列番号２８）；およびウサギベータグロビンポリＡ（配列番号４０）を含む。

【０２２２】

一態様では、ＰＡＨを発現する治療レンチウイルスベクターは、図３のベクターＡに示すエレメントの全てを含む。別の態様では、ＰＡＨを発現する治療レンチウイルスベクターは、図３のベクターＢに示すエレメントの全てを含む。別の態様では、ＰＡＨを発現する治療レンチウイルスベクターは、図３のベクターＣに示すエレメントの全てを含む。別の態様では、ＰＡＨを発現する治療レンチウイルスベクターは、図３のベクターＤに示すエレメントの全てを含む。

【０２２３】

ヘルパー、Ｒｅｖ、およびエンベローププラスミドを含有する３ベクターレンチウイルスパッケージングシステムを含む４ベクターシステムの合成を開示する。

【０２２４】

材料および方法：

【０２２５】

Ｒｅｖを含まないヘルパープラスミドの構築：

【０２２６】

ＲＲＥおよびウサギベータグロビンポリＡ配列を含有するＤＮＡ断片を挿入することによって、Ｒｅｖを含まないヘルパープラスミドを構築した。この配列は、隣接ＸｂａＩおよびＸｍａＩ制限部位を用いてＥｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓによって合成された。次いで、ＸｂａＩおよびＸｍａＩ制限部位においてＲＲＥ／ウサギポリＡベータグロビン配列をヘルパープラスミドに挿入した。

【０２２７】

ＤＮＡ配列は以下の通りである：

【０２２８】

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAG

CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGC
TGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAA
ATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAA
TTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACA
TATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGC
AACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAG
TATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTG
AGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA
ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGT
CATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT
GCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGC
CCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAA
TTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG
TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATT
GCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGC
ATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
GCGGCCGCCCCGGG（配列番号４４）。

【０２２９】

Ｒｅｖプラスミドの構築：

【０２３０】

ＲＳＶプロモーターおよびＨＩＶ　Ｒｅｖ配列は、隣接ＭｆｅＩおよびＸｂａＩ制限部位を用いて、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓによって単一のＤＮＡ断片として合成された。次いで、ＣＭＶプロモーターがＲＳＶプロモーターで置換されたＭｆｅＩおよびＸｂａＩ制限部位において、ＤＮＡ断片をｐＣＤＮＡ３．１プラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に挿入した。ＤＮＡ配列は以下の通りであった：

【０２３１】

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTT
AGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTA
GTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTC
TTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACC
GTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAA
CAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAAT
TGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTCACCACATTG
GTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGC
CATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTC
GAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA
ACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGA
CAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATC
TGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTA
ACGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTG
GAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA（配列番号４６）
。

【０２３２】

パッケージングシステムに使用するプラスミドは、類似のエレメントによって改変することができ、イントロン配列は、ベクター機能を失うことなく潜在的に取り除くことが可能である。例えば、以下のエレメントは、パッケージングシステム中の類似のエレメント

を置き換えることができる。
【０２３３】
プロモーター：伸長因子－１アルファ（ＥＦ１－アルファ）プロモーター（配列番号４７）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター（配列番号４８）、チロキシン結合グロブリンプロモーター（配列番号６０）、およびユビキチンＣ（ＵｂＣ）プロモーター（配列番号４９）は、ＣＭＶプロモーター（配列番号２７）またはＣＭＶエンハンサー／ニワトリベータアクチンプロモーター（配列番号２１）を置き換えることができる。これらの配列を、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。
【０２３４】
ポリＡ配列：ＳＶ４０ポリＡ（配列番号５０）およびｂＧＨポリＡ（配列番号３０または配列番号５１）は、ウサギベータグロビンポリＡ（配列番号４０）を置き換えることができる。これらの配列を、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。
【０２３５】
ＨＩＶ　Ｇａｇ、Ｐｏｌ、およびインテグラーゼ配列：ヘルパープラスミド中のＨＩＶ配列は、異なるＨＩＶの株またはクレードから構築することができる。例えば、Ｂａｌ株由来のＨＩＶ　Ｇａｇ（配列番号２２）；ＨＩＶ　Ｐｏｌ（配列番号２３）；およびＨＩＶ　Ｉｎｔ（配列番号２４）を、本明細書中に概説したように、ヘルパー／ヘルパープラスＲｅｖプラスミド中に含有されるｇａｇ、ｐｏｌ、およびｉｎｔ配列で交換することができる。これらの配列を、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。
【０２３６】
エンベロープ：ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質を、ネコ内因性ウイルス（ＲＤ１１４）エンベロープ（配列番号５２）、テナガザル白血病ウイルス（ＧＡＬＶ）エンベロープ（配列番号５３）、狂犬病（ＦＵＧ）エンベロープ（配列番号５４）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）エンベロープ（配列番号５５）、Ａ型インフルエンザ家禽ペストウイルス（ＦＰＶ）エンベロープ（配列番号５６）、ロスリバーアルファウイルス（ＲＲＶ）エンベロープ（配列番号５７）、マウス白血病ウイルス１０Ａ１（ＭＬＶ　１０Ａ１）エンベロープ（配列番号５８）、またはエボラウイルス（ＥｂｏＶ）エンベロープ（配列番号５９）由来の膜糖タンパク質で置換することができる。これらのエンベロープの配列は、本明細書中の配列部分として特定される。さらに、これらの配列を、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。
【０２３７】
要約すると、３ベクターシステムと４ベクターシステムとを以下の通りに、比較および対比することができる。３ベクターレンチウイルスベクターシステムは以下を含み得る：（１）ヘルパープラスミド：ＨＩＶ　Ｇａｇ、Ｐｏｌ、インテグラーゼ断片（配列番号４３）、ＲＲＥ、およびＲｅｖ；（２）エンベローププラスミド：ＶＳＶ－Ｇエンベロープ；ならびに（３）治療ベクター：ＲＳＶ、５’ＬＴＲ、プサイパッケージングシグナル、ＲＲＥ、ｃＰＰＴ、プロトロンビンエンハンサー、アルファ１アンチトリプシンプロモーター、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、ＷＰＲＥ、および３’デルタＬＴＲ。４ベクターレンチウイルスベクターシステムは以下を含み得る：（１）ヘルパープラスミド：ＨＩＶ　Ｇａｇ、Ｐｏｌ、インテグラーゼ断片（配列番号４３）、およびＲＲＥ；（２）Ｒｅｖプラスミド：Ｒｅｖ；（３）エンベローププラスミド：ＶＳＶ－Ｇエンベロープ；ならびに（４）治療ベクター：ＲＳＶ、５’ＬＴＲ、プサイパッケージングシグナル、ＲＲＥ、ｃＰＰＴ、プロトロンビンエンハンサー、アルファ１アンチトリプシンプロモーター、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、ＷＰＲＥ、および３’デルタＬＴＲ。上記のエレメントに対応する配列は、本明細書中の配列表の部分において特定される。
【０２３８】
（実施例２）

治療ベクター

【０２３９】

例示的な治療ベクターは、例えば図３に示すように設計および開発されている。

【０２４０】

最初に図３のベクターＡを左から右に参照して、重要な遺伝子エレメントは以下の通りである：ハイブリッド５’長鎖末端反復配列（ＲＳＶ／ＬＴＲ）、プサイ配列（ＲＮＡパッケージング部位）、ＲＲＥ（Ｒｅｖ－応答エレメント）、ｃＰＰＴ（ポリプリントラクト）、プロトロンビンエンハンサー、ｈＡＡＴプロモーター、実施形態では本明細書に詳述するコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むＰＡＨ配列、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、およびＵ３領域に欠失を有するＬＴＲ。

【０２４１】

次に、図３のベクターＢを左から右に参照して、重要な遺伝子エレメントは以下の通りである：ハイブリッド５’長鎖末端反復配列（ＲＳＶ／ＬＴＲ）、プサイ配列（ＲＮＡパッケージング部位）、ＲＲＥ（Ｒｅｖ－応答エレメント）、ｃＰＰＴ（ポリプリントラクト）、プロトロンビンエンハンサーの上流の１つのＨＮＦ１／ＨＮＦ４（肝細胞核内因子）結合部位、ｈＡＡＴプロモーター、実施形態では本明細書に詳述するコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むＰＡＨ配列、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、およびＵ３領域に欠失を有するＬＴＲ。

【０２４２】

次に、図３のベクターＣを左から右に参照して、重要な遺伝子エレメントは以下の通りである：ハイブリッド５’長鎖末端反復配列（ＲＳＶ／ＬＴＲ）、プサイ配列（ＲＮＡパッケージング部位）、ＲＲＥ（Ｒｅｖ－応答エレメント）、ｃＰＰＴ（ポリプリントラクト）、プロトロンビンエンハンサーの上流の３つのＨＮＦ１／４（肝細胞核内因子）結合部位、ｈＡＡＴプロモーター、実施形態では本明細書に詳述するコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むＰＡＨ配列、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、およびＵ３領域に欠失を有するＬＴＲ。

【０２４３】

次に、図３のベクターＤを左から右に参照して、重要な遺伝子エレメントは以下の通りである：ハイブリッド５’長鎖末端反復配列（ＲＳＶ／ＬＴＲ）、プサイ配列（ＲＮＡパッケージング部位）、ＲＲＥ（Ｒｅｖ－応答エレメント）、ｃＰＰＴ（ポリプリントラクト）、プロトロンビンエンハンサーの上流の５つのＨＮＦ１（肝細胞核内因子）結合部位、ｈＡＡＴプロモーター、実施形態では本明細書に詳述するコドン最適化ＰＡＨ配列またはそのバリアントを含むＰＡＨ配列、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、およびＵ３領域に欠失を有するＬＴＲ。

【０２４４】

図３に一般的に概要したベクターを産生するために、本明細書に記載のおよびそうでなければ当業者によって理解される方法および材料を使用した。

【０２４５】

阻害性ＲＮＡの設計：Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）（ＮＭ＿０００２７７．１）ｍＲＮＡの配列を使用して、ヒト細胞におけるＰＡＨレベルをノックダウンするための潜在的ｓｈＲＮＡ候補体を検索した。潜在的ＲＮＡｓｈＲＮＡ配列を、ｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡ設計プログラム、例えばＢｒｏａｄ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ｐｏｒｔａｌｓ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｇｐｐ／ｐｕｂｌｉｃ／）主催のＧＰＰウェブポータル、またはＴｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（ｈｔｔｐｓ：／／ｒｎａｉｄｅｓｉｇｎｅｒ．ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ．ｃｏｍ／ｒｎａｉｅｘｐｒｅｓｓ／）のＢＬＯＣＫ－ｉＴ　ＲＮＡｉ　Ｄｅｓｉｇｎｅｒから選択した候補体から選択した。個々に選択したｓｈＲＮＡ配列を、ｓｈＲＮＡ発現を調節するために、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターＨ１（Ｈ１プロモーター）（配列番号２０）のすぐ３’側でレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルスｓｈＲＮＡ構築物を使用して、細胞を形質導入し、特定のｍＲＮＡレベルの変化を測定した。

【０２４６】
ベクター構築：ＰＡＨを標的化するｓｈＲＮＡ配列を合成するために、ＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　ＭＷＧ　Ｏｐｅｒｏｎにより合成した。重複するセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を混合し、７０℃から室温へと冷却しながらアニーリングさせた。レンチウイルスベクターを、制限酵素ＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩによって３７℃で１時間消化した。消化したレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動により精製し、Ｔｈｅｒｍｏ　ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＤＮＡゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。ＤＮＡ濃度を決定し、ベクターをオリゴに混合し（３：１の比）、アニーリングおよびライゲートさせた。ライゲーション反応は、室温で３０分間、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによって行った。２．５マイクロリットルのライゲーション混合物を２５マイクロリットルのＳＴＢＬ３コンピテント細菌細胞に加えた。４２℃での熱ショック後に形質転換が達成された。アンピシリンを含有する寒天プレート上に細菌細胞を広げ、薬物抵抗性コロニー（アンピシリン抵抗性プラスミドの存在を指し示す）を回収し、ＬＢブロス中で拡大増殖させた。オリゴ配列の挿入を確認するために、Ｔｈｅｒｍｏ　ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＤＮＡミニプレップキットによって、回収した細菌培養物からプラスミドＤＮＡを抽出した。レンチウイルスベクター中へのｓｈＲＮＡ配列の挿入を、ｓｈＲＮＡの発現を調節するために使用されるプロモーター用の特異的プライマーを使用してＤＮＡシークエンシングにより検証した。以下のコード配列を使用して、ＰＡＨをノックダウンする例示的なｓｈＲＮＡ配列を決定した。

【０２４７】
ＰＡＨ　ｓｈＲＮＡ配列　＃１：
TCGCATTTCATCAAGATTAATCTCGAGATTAATCTTGATGAAATGCGATTTTT（配列番号１１）

【０２４８】
ＰＡＨ　ｓｈＲＮＡ配列　＃２：
ACTCATAAAGGAGCATATAAGCTCGAGCTTATATGCTCCTTTATGAGTTTTTT（配列番号１２）

【０２４９】
（実施例３）
肝臓特異的プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター

【０２５０】
Ｈｅｐａ１－６マウスヘパトーマおよびＨｅｐ３Ｂヒト癌細胞に、肝臓特異的プロトロンビンエンハンサー（配列番号３）、およびヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（配列番号４）を含有するレンチウイルスベクターを形質導入し、プロトロンビンエンハンサーおよびヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーターを含有するＤＮＡ断片を作製した。結果としてのＤＮＡ配列は以下の通りである：
GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT（配列番号６１）。これらの感染の結果を、本明細書のさらなる実施例において詳述する。

【０２５１】
（実施例４）

プロトロンビンエンハンサーおよび肝細胞核内因子（ＨＮＦ）結合部位を有するｈＡＡＴプロモーター

Ｈｅｐａ１－６マウスヘパトーマおよびＨｅｐ３Ｂヒト癌細胞に、肝臓特異的プロトロンビンエンハンサー（配列番号３）、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（配列番号４）、および１つまたは複数の肝細胞核内因子（ＨＮＦ）結合部位を含有するレンチウイルスベクターを形質導入した。プロトロンビンエンハンサー、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター、および５つのＨＮＦ１結合部位（下線のフォントで指定する）を含有するＤＮＡ断片を含む、結果としてのＤＮＡ配列は以下の通りであった：

【化１】

GTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTA
ATCATTAACATCGATGCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCT
CTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAG
GGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCT
AAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACA
CAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTG
GAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAG
ATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTT
GGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAAT
ACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGG
GACAGTGAAT（配列番号 62）

プロトロンビンエンハンサー、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター、および１つのＨＮＦ１／ＨＮＦ４結合部位（ＨＮＦ１を下線のフォントで指定し；ＨＮＦ４を太字のフォントで指定する）を含有するＤＮＡ断片を含む、結果としてのＤＮＡ配列は以下の通りである：

【化２】

GTTAATCATTAAC**GCTTGTACTTTGGTACA**ATCGATGCGAGAACTTGTGCCTCC
CCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTA
CTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGG

【化３】

ATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCT
GACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGG
TACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGC
GTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTG
TTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCC
GTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCT
CAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT （配列番号 77）

プロトロンビンエンハンサー、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター、および３つのＨＮＦ１／ＨＮＦ４結合部位（ＨＮＦ１を下線のフォントで指定し；ＨＮＦ４を太字

のフォントで指定する）を含有するＤＮＡ断片を含む、結果としてのＤＮＡ配列は以下の通りである：

【化４】

GTTAATCATTAAC**GCTTGTACTTTGGTACA**GTTAATCATTAAC**GCTTGTACTTT**
GGTACAGTTAATCATTAAC**GCTTGTACTTTGGTACA**ATCGATGCGAGAACTTGT
GCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTT
GGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCC
CGGGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGAC
TGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAG
CCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGC
AAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGC
CCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCT
CCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGT
CTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT（配列番号 63）

これらのベクターからのコドン最適化ＰＡＨの発現を、本明細書のさらなる実施例で詳述する。

【０２５２】

（実施例５）

ＰＡＨを含有するベクターを合成するための材料および方法

【０２５３】

遺伝子の遠位および近位末端にＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ制限酵素部位が位置するＨｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ｈＰＡＨ）ｍＲＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＭ＿０００２７７．１）の配列を、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ、ＫＹ）により化学合成した。ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ制限酵素によって処置したｈＰＡＨを、ＡｐｏＥ（ＮＭ＿０００００１．１１、Ｕ３５１１４．１）またはプロトロンビン（ＡＦ４７８６９６．１）、およびｈＡＡＴ（ＨＧ９８３８５．１）座制御領域の部分を含むハイブリッドプロモーターの制御下でｐＣＤＨレンチウイルスプラスミド（Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＣＡ）にライゲートした。

【０２５４】

レンチウイルスベクターおよびｈＰＡＨ配列を、制限酵素ＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩ（ＮＥＢ、Ｉｐｓｗｉｃｈ、ＭＡ）によって３７℃で２時間消化した。消化したレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動によって精製し、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ（Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）のＤＮＡゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。ＤＮＡ濃度を決定し、インサートのベクターに対する比３：１を使用して、ＰＡＨ配列と混合した。混合物をＴ４ ＤＮＡリガーゼ（ＮＥＢ）によって室温で３０分間ライゲートした。２．５マイクロリットルのライゲーション混合物を２５マイクロリットルのＳＴＢＬ３コンピテント細菌細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）に加えた。形質転換を４２℃での熱ショックによって行った。細菌細胞を、アンピシリンを含有する寒天プレートに画線し、コロニーをＬＢブロス中で拡大増殖させた。ＰＡＨ配列の挿入を確認するために、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒのＤＮＡミニプレップキットによって、回収した細菌培養物からプラスミドＤＮＡを抽出した。レンチウイルスベクター（ＬＶ）中へのＰＡＨ配列の挿入を、ＤＮＡシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）により検証した。次に、ＣｌａＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位を有するＡｐｏＥエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターまたはプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター配列を、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓにより合成した。ＰＡＨコード配列およびハイブリッドプロモーターを

含有するレンチウイルスベクターを、ＣｌａＩおよびＥｃｏＲＩ酵素によって消化し、共にライゲートした。ハイブリッドプロモーターを含有するプラスミドをＤＮＡシークエンシングによって確認した。次に、ｈＰＡＨおよびハイブリッドプロモーター配列を含有するレンチウイルスベクターを使用してレンチウイルス粒子をパッケージングし、形質導入された細胞におけるそのＰＡＨ発現能に関して試験した。哺乳動物細胞に、レンチウイルス粒子を形質導入した。細胞を、３日後に収集し、タンパク質をＰＡＨ発現に関するイムノブロットによって分析した。

【０２５５】

ｈＰＡＨ配列の調節：

肝臓特異的エンハンサー－プロモーターを、レンチウイルスベクターに加え、肝臓特異的にＰＡＨ発現を調節した。具体的には、プロトロンビンエンハンサーを、レンチウイルスベクター中でヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーターと組み合わせて、ＰＡＨ発現を調節した。導入遺伝子の発現を肝細胞に限定することは、フェニルケトン尿症を処置するための遺伝子医薬に関するベクターの安全性および標的特異性に関する重要な検討事項である。

【０２５６】

（実施例６）

コドン最適化ＰＡＨ配列の合成

【０２５７】

コドン内のある特定の塩基を、Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ｈＰＡＨ）ｍＲＮＡ（Ｇｅｎ　Ｂａｎｋ：ＮＭ＿０００２７７．１）配列において変化させ、ＯＰＴ２　ＰＡＨ配列（配列番号２）およびＯＰＴ３　ＰＡＨコドン最適化配列（配列番号７０）を作製した。ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ制限部位に挟まれたＯＰＴ２およびＯＰＴ３　ＰＡＨ配列を、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　ＧｅｎｏｍｉｃｓおよびＩＤＴにより合成し、ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩによって消化したレンチウイルスベクターにライゲートした。

【０２５８】

ハイブリッドＰＡＨコドン最適化配列を、ＳｔｕＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）による制限エンドヌクレアーゼ消化によって構築した。Ｃ末端断片を、ＯＰＴ２またはＯＰＴ３配列のいずれかを含有するＬＶ－Ｐｒｏ－ｈＡＡＴ－ＰＡＨプラスミドから消化した。Ｃ末端ＯＰＴ３断片を、Ｎ末端ＯＰＴ２配列を含有するプラスミドにライゲートし直して、ＯＰＴ２／３配列（配列番号７１）を作製した。Ｃ末端ＯＰＴ２配列を、Ｎ末端ＯＰＴ３配列を含有するプラスミドにライゲートし直して、ＯＰＴ３／２配列（配列番号７２）を作製した。断片の正確な方向をシークエンシングによって確認した（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）。

【０２５９】

（実施例７）

Ｈｅｐａ１－６細胞においてＰＡＨのコドン最適化バージョンを発現するＬＶ－Ｐｒｏ－ｈＡＡＴ－ｈＰＡＨによるＰＡＨの発現

【０２６０】

本実施例は、Ｐｒｏ　ｈＡＡＴおよびＰＡＨのコドン最適化バージョンを含有するレンチウイルスベクターを使用するＰＡＨの発現の実例を示す。

【０２６１】

実施例６に記載のように、ｈＰＡＨをコドン最適化し（ＧｅｎｅＡｒｔ　ＴｈｅｒｍｏおよびＩＤＴ）、合成し（ＩＤＴおよびＥｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）、およびプロトロンビンエンハンサー－ｈＡＡＴプロモーターを含有するレンチウイルスベクターに挿入した。配列の挿入を、ＤＮＡシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって確認した。

【０２６２】

次に、ｈＰＡＨまたはコドン最適化ｈＰＡＨを含有するレンチウイルスベクターを使用

して、マウスＨｅｐａ１－６細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）を形質導入した。細胞にレンチウイルス粒子を５感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入し、３日後、タンパク質発現を、ＰＡＨ発現に関してイムノブロットによって分析した。細胞を、１％ＮＰ－４０およびプロテアーゼ阻害剤混合物（Ｔｈｅｒｍｏ）を含有するＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）緩衝液によって溶解した。細胞溶解物を、１００００ＲＰＭで１５分間遠心分離し、タンパク質濃度をタンパク質アッセイ試薬（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって決定した。タンパク質溶解物を４～１２％Ｔｒｉｓ－Ｂｉｓゲル（Ｔｈｅｒｍｏ）上で分離し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ転写ユニットにおいて１２時間転写した。ＰＡＨの発現を、抗ＰＡＨ抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）を使用するイムノブロットによって検出し、抗ベータアクチン抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）をローディングコントロールのために使用した。ＰＡＨ発現は、プロトロンビンエンハンサーおよびｈＡＡＴプロモーターによって駆動された。様々な例において、レンチウイルスベクターは、ｈＰＡＨまたはｈＰＡＨ遺伝子のコドン最適化バージョンのいずれかを組み込んだ。

【０２６３】

図４Ａは、Ｈｅｐａ１－６細胞におけるプロトロンビン－ｈＡＡＴ　ＰＡＨおよびプロトロンビン－ｈＡＡＴコドン最適化ＰＡＨ（ＯＰＴ２；配列番号２）を含有するレンチウイルスベクターからのＰＡＨ発現を実証するデータを示す。ＰＡＨのコドン最適化バージョン（ＯＰＴ２）の発現はｈＰＡＨの発現より４４％少なかった。図４Ｂは、Ｈｅｐａ１－６細胞におけるプロトロンビン－ｈＡＡＴ　ＰＡＨまたはＰＡＨの３つの異なるコドン最適化バージョンのいずれかを含有するレンチウイルスベクターからのイムノブロットによってＰＡＨタンパク質発現を比較する。イムノブロットの第１のレーンは、非形質導入細胞からなり、第２のレーンはＰＡＨのヒトバージョン（ｈＰＡＨ）を発現するレンチウイルスを形質導入した細胞であり（１に設定）、第３のレーンはＰＡＨのコドン最適化バージョン３（ＯＰＴ３；配列番号７０）を発現するレンチウイルスを形質導入した細胞であり（２．６倍の増加）、第４のレーンは、ＰＡＨのコドン最適化バージョン２／３（ＯＰＴ２／３；配列番号７１）を発現するレンチウイルスを形質導入した細胞であり（１．９倍の増加）、および最後のレーンは、ＰＡＨのコドン最適化バージョン３／２（ＯＰＴ３／２；配列番号７２）を発現するレンチウイルスを形質導入した細胞（１．４倍の増加）である。各々のイムノブロットについてのバンドの強度は、Ａｄｏｂｅ　ＰｈｏｔｏＳｈｏｐ（登録商標）を使用してデンシトメトリーによって決定した。

【０２６４】

図４Ａおよび４Ｂに示すように、コドン最適化ＯＰＴ３　ＰＡＨ配列による形質導入は、（ｉ）コドン最適化ＯＰＴ２（配列番号２）、ＯＰＴ２／３（配列番号７１）、およびＯＰＴ３／２　ＰＡＨ（配列番号７２）配列による形質導入と比べて、ならびに（ｉｉ）ｈＰＡＨ配列（配列番号１）による形質導入と比べてＰＡＨ発現の増加をもたらした。

【０２６５】

（実施例８）

Ｈｅｐａ１－６細胞におけるｈＰＡＨおよびＰＡＨのコドン最適化バージョンの形質導入後のＰＡＨ　ｍＲＮＡの発現レベルの測定

【０２６６】

本実施例は、ＰＡＨ　ＲＮＡの発現が、図５に示すように、コドン最適化されていないＰＡＨ配列（配列番号１）と比べてプロトロンビン－ｈＡＡＴコドン最適化ＰＡＨ（ＯＰＴ３（配列番号７０）およびＯＰＴ２／３（配列番号７１））を含有するレンチウイルスベクターを５ＭＯＩで形質導入したＨｅｐａ１－６癌細胞において増加することの実例を示す。

【０２６７】

ｈＰＡＨを、コドン最適化し（ＧｅｎｅＡｒｔ　Ｔｈｅｒｍｏ）、合成し（ＩＤＴおよびＥｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）、プロトロンビンエンハンサー－ｈＡＡＴプロモーターを含有するレンチウイルスベクターに挿入した。配列の挿入を、ＤＮＡシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって確認した。非最適化ＰＡＨま

たはコドン最適化ＰＡＨを含有するレンチウイルスベクターを使用して、Ｈｅｐａ１－６マウス癌細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）に形質導入した。細胞に、レンチウイルス粒子を形質導入し、３日後にＲＮＡをＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）によって抽出し、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ３（Ｔｈｅｒｍｏ）によるｑＰＣＲによって分析した。ｈＰＡＨ　ＲＮＡ発現を、ＴａｑＭａｎプローブおよびプライマー（ＩＤＴ）：ｈＰＡＨに関して、ｈＰＡＨ　ＦＡＭ　ＴａｑＭａｎプローブ（５’－ＴＣＧＴＧＡＡＡＧＣＴＣＡＴＧＧＡＣＡＧＴＧＧＣ－３’：配列番号６４）およびプライマーセット（ＰＡＨ　ＴａｑＭａｎフォワードプライマー：５’－ＡＧＡＴＣＴＴＧＡＧＧＣＡＴＧＡＣＡＴＴＧＧ－３’：配列番号６５；およびＰＡＨ　ＴａｑＭａｎリバースプライマー：５’－ＧＴＣＣＡＧＣＴＣＴＴＧＡＡＴＧＧＴＴＣＴＴ－３’：配列番号６６）によって検出した。総ＲＮＡ（１００ｎｇ）をアクチンＦＡＭプローブ（５’－ＡＧＣＧＧＧＡＡＡＴＣＧＴＧＣＧＴＧＡＣ－３’：配列番号６７）およびプライマーセット（アクチンフォワードプライマー：５’－ＧＧＡＣＣＴＧＡＣＴＧＡＣＴＡＣＣＴＣＡＴ－３’：配列番号６８；およびアクチンリバースプライマー：５’－ＣＧＴＡＧＣＡＣＡＧＣＴＴＣＴＣＣＴＴＡＡＴ－３’：配列番号６９）で正規化した。

【０２６８】

図５に示すように、３つの群を比較する：ＰＡＨ（配列番号１）（バー１）またはＰＡＨのコドン最適化バージョン（ＯＰＴ３（配列番号７０）およびＯＰＴ２／３（配列番号７１、それぞれ、バー２および３）のコード領域を発現するレンチウイルスベクターを５ＭＯＩで形質導入したＨｅｐａ１－６細胞。ＰＡＨ　ＲＮＡレベルを、ＰＡＨ（配列番号１）（１に設定）を発現するＨｅｐａ１－６細胞からのＲＮＡの倍率変化として表記する。コドン最適化バージョン（ＯＰＴ３：配列番号７０）からＰＡＨを発現する細胞では、ＰＡＨ（配列番号１）と比較して発現が４．５倍増加した。コドン最適化バージョン（ＯＰＴ２／３：配列番号７１）からＰＡＨを発現する細胞では、ＰＡＨ（配列番号１）と比較して発現が２．２倍増加した。

【０２６９】

（実施例９）

ＨｅｐａＩ－６細胞およびＨｅｐ３Ｂ細胞におけるＨＮＦ１またはＨＮＦ１／４結合部位を含有するコドン最適化ＰＡＨ配列およびプロトロンビンエンハンサーによるＰＡＨのレンチウイルス送達による発現

【０２７０】

本実施例は、図６Ａ～６Ｂに示すように、コドン最適化ｈＰＡＨの発現が、プロトロンビンエンハンサーおよび上流のＨＮＦ１／４結合部位と共にｈＡＡＴプロモーターを含有するレンチウイルスベクターを形質導入した場合に、マウスＨｅｐａ１－６およびヒトＨｅｐ３Ｂ癌細胞において増加することの実例を示す。本実施例はまた、ｈＰＡＨコード配列のコドン最適化バージョン（ＯＰＴ３）が、Ｈｅｐａ１－６細胞およびＨｅｐ３Ｂ細胞において非最適化ｈＰＡＨコード領域配列より多く発現することも示す。本実施例は、プロトロンビンエンハンサーと組み合わせて肝細胞核内因子－１および－４（ＨＮＦ１およびＨＮＦ１／４）結合部位を発現するレンチウイルスベクターがＨｅｐａ１－６細胞およびＨｅｐ３Ｂ細胞においてＰＡＨタンパク質のレベルを増加させることの実例もさらに示す。

【０２７１】

ｈＰＡＨ（最適化および非最適化）およびＨＮＦ１／４結合部位を有するプロトロンビンエンハンサーの変形を合成し（Ｅｕｒｏｆｉｎ　ＧｅｎｏｍｉｃｓおよびＩＤＴ）、ｈＡＡＴプロモーターを含有するレンチウイルスベクターに挿入した。配列の挿入をＤＮＡシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって確認した。次に、確認されたＰＡＨ配列を含有するレンチウイルスベクターを使用して、Ｈｅｐａ１－６マウス肝臓がん細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、Ｍａｎａｓｓａｓ）に形質導入した。細胞に、レンチウイルス粒子を５ＭＯＩで形質導入し、３日後にタンパク質をＰＡＨ発現に関してイムノブロットによって分析した。細胞を

、１％ＮＰ－４０およびプロテアーゼ阻害剤混合物（Ｔｈｅｒｍｏ）を含有するＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）緩衝液によって溶解した。細胞溶解物を、１００００ＲＰＭで１５分間遠心分離し、タンパク質濃度をタンパク質アッセイ試薬（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって決定した。タンパク質溶解物を、４～１２％Ｔｒｉｓ－Ｂｉｓゲル（Ｔｈｅｒｍｏ）上で分離し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ転写ユニットに１２時間転写した。ＰＡＨの発現を、抗ＰＡＨ抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）を使用してイムノブロットによって検出し、抗ベータアクチン抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）をローディングコントロールのために使用した。ＰＡＨ発現は、プロトロンビンエンハンサーおよびｈＡＡＴプロモーターにより駆動された。レンチウイルスベクターは、様々な例においてｈＰＡＨ遺伝子のコドン最適化バージョンまたはコドンが変更されないままであるｈＰＡＨ遺伝子のいずれかを組み込んだ。加えて、これらの構築物におけるＰＡＨ発現は、上流のＨＮＦ１またはＨＮＦ１／４結合部位を有する肝臓特異的プロトロンビンエンハンサーを含有するｈＡＡＴプロモーターによって駆動された。イムノブロットについてのバンドの強度は、Ａｄｏｂｅ ＰｈｏｔｏＳｈｏｐ（登録商標）を使用するデンシトメトリーによって決定した。

【０２７２】

図６Ａに示すように、６つの群を比較する：（１）Ｈｅｐａ１－６細胞単独（レーン１）、（２）プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターによりｈＰＡＨのコード領域を発現するレンチウイルスベクター（レーン２）（１に設定）、（３）プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン３）（５．７倍の増加）、（４）プロトロンビンエンハンサーの上流に１つのＨＮＦ－１および－４結合部位を有するプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン４）（５．６倍の増加）、（５）プロトロンビンエンハンサーの上流に３つのＨＮＦ－１および－４結合部位を有するプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン５）（５．８倍の増加）、ならびに（６）プロトロンビンエンハンサーの上流に５つのＨＮＦ－１結合部位を有するプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン６）（５．９倍の増加）。本実験に使用したｈＰＡＨについての配列は、配列番号１であった。本実験に使用したコドン最適化ＰＡＨのために使用した配列は、配列番号７０であった。

【０２７３】

図６Ｂに示すように、６つの群を比較する：（１）Ｈｅｐ３Ｂ細胞単独（レーン１）、（２）プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターによりｈＰＡＨ（配列番号１）のコード領域を発現するレンチウイルスベクター（配列番号６１）（レーン２）（１に設定）、（３）プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）によりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）（配列番号７０）を発現するレンチウイルスベクター（レーン３）（４．１倍の増加）、（４）プロトロンビンエンハンサーの上流に１つのＨＮＦ－１および－４結合部位（配列番号９）を有するプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン４）（５．３倍の増加）、（５）プロトロンビンエンハンサーの上流に３つのＨＮＦ－１および－４結合部位（配列番号１０）を有するプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン５）（４．８倍の増加）、および（６）プロトロンビンエンハンサーの上流に５つのＨＮＦ－１結合部位（配列番号８）を有するプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターによりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン６）（４．５倍の増加）。

【０２７４】

図６Ａおよび６Ｂは、ＰＡＨの発現が、ＰＡＨを形質導入したＨｅｐａ１－６およびＨｅｐ３Ｂ癌細胞と比べて、プロトロンビンエンハンサーの上流にＨＮＦ１またはＨＮＦ１／４結合部位を有するＰＡＨ（ＯＰＴ３）のコドン最適化バージョンを含有するレンチウ

イルスベクターを形質導入した場合、Ｈｅｐａ１－６およびＨｅｐ３Ｂ癌細胞において増加することを実証する。

【０２７５】

（実施例１０）

コドン最適化ＰＡＨ配列、およびｈＡＡＴエンハンサー／トランスサイレチンプロモーター／マウス微小ウイルスイントロンまたはプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター／マウス微小ウイルスイントロンのいずれかを含有する調節配列を有する、Ｈｕｈ－７細胞におけるレンチウイルス送達によるｈＰＡＨの発現

【０２７６】

本実施例は、図７に示すように、コドン最適化ヒトＰＡＨの発現が、イントロンおよび代替のエンハンサー／プロモーターの組み合わせを含有する代替の構築物と比較して、肝臓特異的調節エレメントを含有するレンチウイルスベクターによりヒト肝細胞癌細胞において増加することの実例を示す。

【０２７７】

プロトロンビンエンハンサー（配列番号６１）と組み合わせたｈＡＡＴプロモーターは、ＰＡＨ発現を増加させたが、マウス微小ウイルスのイントロン配列（配列番号８０）を加えても発現を増強しなかった。プロトロンビンエンハンサーおよびｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）をコドン最適化ＰＡＨ配列（配列番号７０）と組み合わせると、ｈＡＡＴプロモーター（配列番号８２）およびトランスサイレチンエンハンサー（配列番号８１）と比較してＰＡＨのより高い発現をもたらした。

【０２７８】

肝臓特異的調節配列を合成し（ＩＤＴ）、最適化ＰＡＨ配列の上流でレンチウイルスベクターに挿入した。配列の挿入をＤＮＡシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって確認した。次に、確認された配列を含有するレンチウイルスベクターを使用して、Ｈｕｈ－７肝臓がん細胞（Ｊａｐａｎｅｓｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓ　Ｃｅｌｌ　Ｂａｎｋ）を形質導入した。細胞に、レンチウイルス粒子を５０ＭＯＩで形質導入し、３日後にタンパク質をＰＡＨ発現に関してイムノブロットによって分析した。細胞を、１％ＮＰ－４０およびプロテアーゼ阻害剤混合物（Ｔｈｅｒｍｏ）を含有するＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）緩衝液によって溶解した。細胞溶解物を、１２，０００ＲＰＭで１５分間遠心分離し、タンパク質濃度をタンパク質アッセイ試薬（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって決定した。タンパク質溶解物を、４～１２％Ｔｒｉｓ－Ｂｉｓゲル（Ｔｈｅｒｍｏ）上で分離し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ転写ユニットに１６時間転写した。ＰＡＨの発現を、抗ＰＡＨ抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）を使用してイムノブロットによって検出し、抗ベータアクチン抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）をローディングコントロールのために使用した。イムノブロットのバンドの強度は、Ａｄｏｂｅ　ＰｈｏｔｏＳｈｏｐ（登録商標）を使用するデンシトメトリーによって決定した。

【０２７９】

図７に示すように、４つの群を比較する：（ｉ）Ｈｕｈ－７細胞単独（レーン１）；（ｉｉ）コドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３；配列番号７０）およびプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）を発現するレンチウイルスベクター（レーン２）（ベースラインのバンド強度を１に設定した）；（ｉｉｉ）プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターおよびマウス微小ウイルスのイントロン配列（配列番号７８）によりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン３）（バンド強度０．８０）；および（ｉｖ）ｈＡＡＴプロモーター／トランスサイレチンエンハンサーおよびマウス微小ウイルスのイントロン配列（配列番号７９）によりコドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３）を発現するレンチウイルスベクター（レーン４）（バンド強度０．３６）。

【０２８０】

結果は、マウス微小ウイルスのイントロン配列をコードするレンチウイルスベクターが

、このイントロン配列を欠如するレンチウイルスベクターと比べて低いＰＡＨ発現をもたらしたことの実例を示す（図７のレーン２をレーン３と比較する）。この知見は、以前の研究が、マウス微小ウイルスのイントロン配列がベクターからの外因性の遺伝子発現を増加させることを示唆しているために予想外である。加えて、本実施例は、意外にも肝臓特異的遺伝子発現のために使用したプロモーター／エンハンサーの組み合わせを含有するレンチウイルスベクターが、本明細書に提供される追加のイントロンを有しないプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーターの特定の組み合わせを含有するレンチウイルスベクターより低いＰＡＨ発現をもたらしたことを示している（図７のレーン２をレーン４と比較）。

【０２８１】

（実施例１１）

変異体ＷＰＲＥ配列または短鎖ＷＰＲＥ（ＷＰＲＥｓ）配列のいずれかを有し、ＰＡＨまたはアルブミン３’ＵＴＲ配列のいずれかを含有するコドン最適化ＰＡＨ配列による、Ｈｕｈ－７細胞におけるレンチウイルス送達によるｈＰＡＨの発現

【０２８２】

本実施例は、図８に示すように、コドン最適化ヒトＰＡＨの発現が、３’ＵＴＲおよび代替のＷＰＲＥ配列を含む代替のベクター構築物と比較して肝臓特異的調節エレメントを含有するレンチウイルスベクターにより、ヒト肝細胞癌細胞において増加することの実例を示す。

【０２８３】

ＷＰＲＥを、Ｘタンパク質配列（配列番号８７）を有しないより短い変異体バージョンに改変すると、ＰＡＨの発現は、野生型ＷＰＲＥ（配列番号１８）を含有するベクターより低いが類似であった。ＰＡＨ遺伝子（配列番号８５）またはアルブミン遺伝子（配列番号８６）のいずれかからの３’ＵＴＲ配列を、ＰＡＨコード配列の下流に加えると、ＰＡＨ最適化バージョンの３－ＰＡＨ　３’ＵＴＲ配列（配列番号８３）またはＰＡＨ最適化バージョン３－アルブミン３’ＵＴＲ配列（配列番号８４）のいずれかをもたらし、３’ＵＴＲを含有しないベクターと比べてＰＡＨの発現が減少した。

【０２８４】

ＷＰＲＥおよび３’ＵＴＲ配列を合成し（ＩＤＴ）、最適化ＰＡＨ配列の上流でレンチウイルスベクターに挿入した。配列の挿入をＤＮＡシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって確認した。次に、確認された配列を含有するレンチウイルスベクターを使用して、Ｈｕｈ－７肝臓がん細胞（Ｊａｐａｎｅｓｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓ　Ｃｅｌｌ　Ｂａｎｋ）に形質導入した。細胞に、レンチウイルス粒子を５０ＭＯＩで形質導入し、３日後にタンパク質をＰＡＨ発現に関してイムノブロットによって分析した。細胞を、１％ＮＰ－４０およびプロテアーゼ阻害剤混合物（Ｔｈｅｒｍｏ）を含有するＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）緩衝液によって溶解した。細胞溶解物を、１２，０００ＲＰＭで１５分間遠心分離し、タンパク質濃度をタンパク質アッセイ試薬（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって決定した。タンパク質溶解物を、４～１２％Ｔｒｉｓ－Ｂｉｓゲル（Ｔｈｅｒｍｏ）上で分離し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ転写ユニットに１６時間転写した。ＰＡＨの発現を、抗ＰＡＨ抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）を使用してイムノブロットによって検出し、抗ベータアクチン抗体（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）をローディングコントロールのために使用した。イムノブロットのバンドの強度は、Ａｄｏｂｅ　ＰｈｏｔｏＳｈｏｐ（登録商標）を使用するデンシトメトリーによって決定した。

【０２８５】

図８に示すように、５つの群を比較する：（ｉ）Ｈｕｈ－７細胞単独（レーン１）；（ｉｉ）コドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３；配列番号７０）、プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）、および野生型ＷＰＲＥ（配列番号１８）を発現するレンチウイルスベクター（レーン２）（ベースラインバンド強度を１に設定した）；（ｉｉｉ）コドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３；配列番号７０）、プロトロンビンエンハ

ンサー／ｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）、およびＸ－タンパク質の発現を欠如する変異体ＷＰＲＥ（配列番号８７）を発現するレンチウイルスベクター（レーン３）（バンド強度０．８１）；（ｉｖ）コドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３；配列番号７０）、プロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）を発現し、ＰＡＨ　３’ＵＴＲ（配列番号８５）を有するレンチウイルスベクター（レーン４）（バンド強度０．６８）；ならびに（ｖ）コドン最適化ｈＰＡＨ（ＯＰＴ３；配列番号７０）およびプロトロンビンエンハンサー／ｈＡＡＴプロモーター（配列番号６１）を発現し、アルブミン３’ＵＴＲ（配列番号８６）（レーン５）を有するレンチウイルスベクター（バンド強度は０．８５）。

【０２８６】

結果は、変異体ＷＰＲＥを正常に使用される野生型ＷＰＲＥに代えて用いる、またはヒトＰＡＨ遺伝子の天然の３’ＵＴＲを加える、または細胞の形質導入のために使用されるヒトアルブミン遺伝子の３’ＵＴＲを加えるレンチウイルスベクターが、野生型ＷＰＲＥを含有し、３’ＵＴＲ配列を含有しないＰｒｏ－ｈＡＡＴ－ＰＡＨ（ＯＰＴ３）ベクターと比較してＰＡＨのより低い発現をもたらすことの実例を示す。結果はまた、アルブミンＰＡＨ　３’ＵＴＲをコードするレンチウイルスベクターと比べて天然のヒトＰＡＨ　３’ＵＴＲをコードするレンチウイルスベクターを使用した場合、ＰＡＨ発現に負の効果を及ぼすことの実例も示す（図８のレーン４をレーン５と比較する）。この知見は、天然のヒトＰＡＨ　３’ＵＴＲと比べてアルブミンＰＡＨ　３’ＵＴＲを使用する場合に起こるＰＡＨ　ｍＲＮＡの二次構造の変化が原因であり得る。二次構造のこの変化は、ＰＡＨのコード領域と３’ＵＴＲとの間の相互作用を低減し、それによってより高いＰＡＨ発現レベルをもたらし得る。その上、この例で示すように、３’ＵＴＲ　ＰＡＨを欠如するレンチウイルスベクターを使用する場合、ＰＡＨの発現レベルは最高である（図８のレーン４および５をレーン２と比較する）。

【０２８７】

配列表

【表１－１】

配列番号	説明	配列
1	hPAH	ATGTCCACTGCGGTCCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGGAAACTCT CTGACTTTGGACAGGAAACAAGCTATATTGAAGACAACTGCAATCA AAATGGTGCCATATCACTGATCTTCTCACTCAAAGAAGAAGTTGGTG CATTGGCCAAAGTATTGCGCTTATTTGAGGAGAATGATGTAAACCTG ACCCACATTGAATCTAGACCTTCTCGTTTAAAGAAAGATGAGTATGA ATTTTTCACCCATTTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACAAACA TCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACTGTCCATGAGCTT TCACGAGATAAGAAGAAAGACACAGTGCCCTGGTTCCCAAGAACCA TTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCG GAACTGGATGCTGACCACCCTGGTTTTAAAGATCCTGTGTACCGTGC AAGACGGAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTACAACTACCGCCATGGG CAGCCCATCCCTCGAGTGGAATACATGGAGGAAGAAAAGAAAACAT GGGGCACAGTGTTCAAGACTCTGAAGTCCTTGTATAAAACCCATGCT TGCTATGAGTACAATCACATTTTTCCACTTCTTGAAAAGTACTGTGG CTTCCATGAAGATAACATTCCCCAGCTGGAAGACGTTTCTCAATTCC TGCAGACTTGCACTGGTTTCCGCCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTTT CCTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCTTCCACTGCA CACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCATGTATACCCCCGAACCT GACATCTGCCATGAGCTGTTGGGACATGTGCCCTTGTTTTCAGATCG CAGCTTTGCCCAGTTTTCCCAGGAAATTGGCCTTGCCTCTCTGGGTG CACCTGATGAATACATTGAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTTACT GTGGAGTTTGGGCTCTGCAAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATATG GTGCTGGGCTCCTGTCATCCTTTGGTGAATTACAGTACTGCTTATCA GAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGGAGAAGACAGCCATCC AAAATTACACTGTCACGGAGTTCCAGCCCCTGTATTACGTGGCAGAG AGTTTTAATGATGCCAAGGAGAAAGTAAGGAACTTTGCTGCCACAA TACCTCGGCCCTTCTCAGTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATT GAGGTCTTGGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTTGGCTGATTCCAT TAACAGTGAAATTGGAATCCTTTGCAGTGCCCTCCAGAAAATAAAGT AA
2	コドン最適化PAH (Opt2)	ATGAGTACGGCTGTGCTCGAGAATCCAGGTTTGGGCCGAAAGCTGT CTGATTTTGGACAGGAGACATCTTATATTGAAGACAACTGCAACCAG AATGGTGCGATATCCCTTATTTTTTCTCTGAAAGAAGAAGTAGGTGC GCTGGCAAAGGTCTTGCGGCTGTTTGAAGAGAACGATGTTAATCTTA CTCATATTGAGTCCAGACCATCACGGCTGAAAAAAGACGAGTACGA ATTTTTTACTCACTTGGACAAACGAAGCTTGCCGGCTCTTACTAATA TCATTAAGATCCTCCGGCATGACATAGGGGCGACAGTGCATGAGCTT TCAAGGGATAAAAAGAAAGATACCGTCCCCTGGTTTCCAAGGACCA TACAAGAACTCGACCGATTCGCGAACCAGATCCTTTCATATGGTGCT GAGTTGGATGCTGACCACCCCGGCTTCAAAGACCCGGTCTACCGAG CGCGGCGGAAACAATTTGCTGACATCGCATACAATTACAGGCATGG CCAGCCAATTCCTAGAGTAGAATACATGGAAGAAGAGAAAAAAACC TGGGGTACCGTCTTCAAGACGCTGAAATCATTGTATAAAACTCATGC ATGTTACGAATATAACCATATTTTTCCGTTGCTCGAGAAATATTGCG GGTTCCACGAAGATAACATCCCACAACTCGAGGATGTATCTCAGTTC CTCCAGACCTGTACGGGGTTTCGACTTAGGCCTGTCGCGGGTTTGCT CAGTTCTCGAGACTTCCTGGGTGGATTGGCGTTTCGGGTATTCCATT GCACGCAGTATATCCGACACGGAAGTAAGCCAATGTACACGCCAGA

【表１－２】

		ACCCGATATCTGTCACGAATTGCTTGGACACGTTCCTCTGTTTTCTGA TCGATCATTCGCTCAGTTTTCACAGGAAATCGGCCTGGCATCTTTGG GAGCGCCGGATGAATATATTGAGAAGCTCGCTACAATTTACTGGTTC ACGGTAGAATTTGGGTTGTGCAAGCAGGGTGATAGTATTAAAGCAT ACGGTGCGGGATTGCTGTCCTCATTCGGGGAGCTTCAGTATTGCCTG TCCGAGAAACCCAAGCTGTTGCCGTTGGAATTGGAAAAAACCGCTA TCCAAAATTACACAGTAACGGAGTTCCAACCTTTGTACTACGTAGCC GAGTCATTTAACGATGCAAAGGAGAAGGTCAGAAATTTTGCTGCGA CGATACCCAGACCGTTCTCAGTAAGGTACGATCCTTACACTCAGAGG ATTGAAGTCCTGGATAATACGCAACAGCTCAAGATCCTGGCAGACT CCATAAATTCTGAAATCGGCATCTTGTGTTCAGCACTGCAAAAGATA AAATAA
3	プロトロンビン エンハンサー(Pro)	GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAG
4	ヒトアルファ1 アンチトリプシン プロモーター (hAAT)	GATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCAC GCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAG GTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCC AGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCC AGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTG GTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTG CTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCAC CACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
5	ウサギベータ グロビン イントロン	GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAAA TTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAAT GGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTT TCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTT TTCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACG AATTTTTAAATTCACTTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCT CTAATCACTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTC AGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGA ATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATTGGT AGAAACAACTACACCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTA CAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAA ACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTCTTTCCTACA G
6	ヒトベータグロ ビンイントロン	GGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTC TTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGATAA GTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGT AATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTA TTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACA ATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATT TCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCA TATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCT ACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCT GGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATA CCTCTTATCTTCCTCCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTG CTGGCCCATCACTTTGGCAAAG
7	1X 肝細胞核 内因子 1 (1XHNF1)	GTTAATCATTAAC

【表１－３】

8	5X 肝細胞核 内因子 1 (5XHNF1)	GTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCA TTAACGTTAATCATTAAC
9	1X 肝細胞核 内因子 1/4 (1XHNF1/4)	GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACA
10	3X 肝細胞核 内因子 1/4 (3XHNF1/4)	GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTG TACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACA
11	PAH shRNA 配列 #1	TCGCATTTCATCAAGATTAATCTCGAGATTAATCTTGATGAAATGCG ATTTTT
12	PAH shRNA 配列 #2	ACTCATAAAGGAGCATATAAGCTCGAGCTTATATGCTCCTTTATGAG TTTTTT
13	ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGA GTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCG ATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAA CAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATT GCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACG
14	5'長鎖末端反復配列 (LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAA CTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGAT CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
15	プサイパッケージングシグナル (RNAパッケージング部位)	TACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAG
16	Rev応答エレメント (RRE)	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGG GCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCT GGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGC AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA GGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTC C
17	中央ポリプリントラクト(cPPT) (ポリプリントラクト)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAA AAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTA
18	長鎖WPRE配列	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCT TAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCC TTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTG TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTC AGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCAC TGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCG CTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTG GTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTT GCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGC CCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGC

【表１－４】

		GGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC CTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG
19	デルタ U3 3'LTR	TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTGCT TGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTC TGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTT GAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAG TAGTAGTTCATGTCA
20	H1 プロモーター	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTG TCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGAT GGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCG CTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTT GGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTT
21	CMV エンハンサー/ ニワトリベータ アクチン プロモーター	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG ACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAG CCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCC AATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGC GGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGG GGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGA GCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG
22	HIV Gag	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGAT GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAAT TAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGT TAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTG GGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGAT CATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATA GAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAG CAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACA GGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACA TCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAAT GCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGA TACCCATGTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTA AACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA TGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGT GCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAA CCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAAC AAATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT CTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATG TATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAAC CCTTTAGAGACTATGTAGACCGATTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAG CAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTTGG TCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGG ACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTG GGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCC AAGTAACAAATCCAGCTACCATAATGATACAGAAAGGCAATTTTAG GAACCAAAGAAAGACTGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGG CACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGA

10 20 30 40 50

【表１－５】

		AATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGAC AGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCC AGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAA GAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACTCCCTCTCAGAAGC AGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCA CTCTTTGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAA
23	HIV Pol	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTG GAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAAT CTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCT GTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTT AAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGC CAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGA AAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAA GGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAG TATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGT AGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTT CAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAG TAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGAT AAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAA TGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGA TGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCT TAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATAC ATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATA GAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATT TACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGG ATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGT GCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTA GTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAG TAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACAGA AGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAA CAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCA TCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAAT GGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGG AAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACACTAATGATGTGAAACAA TTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATAT GGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACATG GGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCTGAG TGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTT AGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTTCTATGTAGATGGG GCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAACTG ACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCA GAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGAT TAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCAT TCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATA ATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTAC CAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGGTTGGT CAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA
24	HIV インテグラーゼ (HIV Int)	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATC ACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTA GTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAG GGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCA GCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTC ATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGAC AGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAGATGG CCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTCACCAGTA

【表１－６】

		CTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATT TGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGA ATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGA ACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTA AAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACA AATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGA GATCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAG GGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAG AAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGG TGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA
25	HIV RRE	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGG GCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTC TGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCG CAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA GGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTC CT
26	HIV Rev	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCA GTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAG AGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGC ACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACC GCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTAC AATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
27	CMV プロモーター	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAT TAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTC AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA TGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTT GACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAG TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA GGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTT ACTG
28	水疱性口内炎 インディアナ ウイルス糖 タンパク質 VSV-G	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTCATTGGGGTGAATTGC AAGTTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAA ATGTTCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATT GGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAA GAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCA AATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATA ACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGA AAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTC CCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGT GATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAG GAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTA CATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATA AGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCACC TTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCA CAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGC

【表１－７】

		CTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCA GGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAG ATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGA CCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGAT TATTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCC AATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAA CCGGTCCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAG ACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAAT GGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGGGAT GACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTC TGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACAT GGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTT CGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATG AGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAG CTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTT TTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGT TGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAG ATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTGA
29	左 ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC AAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTT CCT
30	ポリA エレメント	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC
31	右 ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG
32	E2A エレメント	TTAAAAGTCGAAGGGGTTCTCGCGCTCGTCGTTGTGCGCCGCGCTGG GGAGGGCCACGTTGCGGAACTGGTACTTGGGCTGCCACTTGAACTC GGGGATCACCAGTTTGGGCACTGGGGTCTCGGGGAAGGTCTCGCTC CACATGCGCCGGCTCATCTGCAGGGCGCCCAGCATGTCAGGCGCGG AGATCTTGAAATCGCAGTTGGGGCCGGTGCTCTGCGCGCGCGAGTTG CGGTACACTGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGACTGGGGTACT TCACACTAGCCAGCACGCTCTTGTCGCTGATCTGATCCTTGTCCAGG TCCTCGGCGTTGCTCAGGCCGAACGGGGTCATCTTGCACAGCTGGCG GCCCAGGAAGGGCACGCTCTGAGGCTTGTGGTTACACTCGCAGTGC ACGGGCATCAGCATCATCCCCGCGCCGCGCTGCATATTCGGGTAGA GGGCCTTGACGAAGGCCGCGATCTGCTTGAAAGCTTGCTGGGCCTTG GCCCCCTCGCTGAAAAACAGGCCGCAGCTCTTCCCGCTGAACTGATT ATTCCCGCACCCGGCATCATGGACGCAGCAGCGCGCGTCATGGCTG GTCAGTTGCACCACGCTCCGTCCCCAGCGGTTCTGGGTCACCTTGGC CTTGCTGGGTTGCTCCTTCAGCGCACGCTGCCCGTTCTCACTGGTCAC ATCCATCTCCACCACGTGGTCCTTGTGGATCATCACCGTCCCATGCA GACACTTGAGCTGGCCTTCCACCTCGGTGCAGCCGTGGTCCCACAGG GCACTGCCGGTGCACTCCCAGTTCTTGTGCGCGATCCCGCTGTGGCT GAAGATGTAACCTTGCAACAGGCGACCCATGATGGTGCTAAAGCTC TTCTGGGTGGTGAAGGTCAGTTGCAGACCGCGGGCCTCCTCGTTCAT CCAGGTCTGGCACATCTTTTGGAAGATCTCGGTCTGCTCGGGCATGA GCTTGTAAGCATCGCGCAGGCCGCTGTCGACGCGGTAGCGTTCCATC AGCACATTCATGGTATCCATGCCCTTCTCCCAGGACGAGACCAGAGG

【表１－８】

		CAGACTCAGGGGGTTGCGCACGTTCAGGACACCGGGGGTCGCGGGC TCGACGATGCGTTTTCCGTCCTTGCCTTCCTTCAACAGAACCGGCGG CTGGCTGAATCCCACTCCCACGATCACGGCTTCTTCCTGGGGCATCT CTTCGTCTGGGTCTACCTTGGTCACATGCTTGGTCTTTCTGGCTTGCT TCTTTTTTGGAGGGCTGTCCACGGGGACCACGTCCTCCTCGGAAGAC CCGGATCCCACCCGCTGATACTTTCGGCGCTTGGTTGGCAGAGGAGG TGGCGGCGAGGGGCTCCTCTCCTGCTCCGGCGGATAGCGCGCTGAA CCGTGGCCCCGGGGCGGAGTGGCCTCTCGGTCCATGAACCGGCGCA CGTCCTGACTGCCGCCGGCCAT
33	E4 エレメント	TCATGTATCTTTATTGATTTTTACACCAGCACGGGTAGTCAGTCTCCC ACCACCAGCCCATTTCACAGTGTAAACAATTCTCTCAGCACGGGTGG CCTTAAATAGGGCAATATTCTGATTAGTGCGGGAACTGGACTTGGGG TCTATAATCCACACAGTTTCCTGGCGAGCCAAACGGGGGTCGGTGAT TGAGATGAAGCCGTCCTCTGAAAAGTCATCCAAGCGAGCCTCACAG TCCAAGGTCACAGTATTATGATAATCTGCATGATCACAATCGGGCAA CAGGGGATGTTGTTCAGTCAGTGAAGCCCTGGTTTCCTCATCAGATC GTGGTAAACGGGCCCTGCGATATGGATGATGGCGGAGCGAGCTGGA TTGAATCTCGGTTTGCAT
34	VA RNA	AGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAAGGGTATCA TGGCGGACGACCGGGGTTCGAGCCCCGTATCCGGCCGTCCGCCGTG ATCCATGCGGTTACCGCCCGCGTGTCGAACCCAGGTGTGCGACGTCA GACAACGGGGGAGTGCTCCTTT
35	AAV2 Rep	ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTC TGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCA CCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGC TTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGG AGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAA GCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGT ACAACCACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATAC GTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAG AGGGTTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGC TCCGGGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAA GATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCC CAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAACTAA TACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAG GGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATT CCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTG GGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCC AATCAGGAGCCTCGAACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCT TGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACG TGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGACCCAAG AGACTCAACTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCA GAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTT CAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCCTCGGCTC GGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCCAGCAGACGTCTTCATGG TGCCACAGTATGGATACCTCACCCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGT AGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAGATGCT GCGTACCGGAAACAACTTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGACGTTC CTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATG AATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAAACAC TCCAAGTGGAACCACCACGCAGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCG GAGCGAGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCTGGACC CTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAAC

【表１－９】

		AACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATG GCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAA GGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTG GGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCAT GATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACG GAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGAC AAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCAT GGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCA AAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGG TGGATTCGGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAACA CCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGCAAAGTTT GCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGAT CGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGA AATTCAGTACACTTCCAACTACAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTA CTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAGAGCCTCGCCCCATTGGCACC AGATACCTGACTCGTAATCTGTAA
36	AAV2 Cap	ATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGA CGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCG AGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCT GATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGAC TTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCGGAGGCCCTTTT CTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGC TCGTGGAAACCACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTG AGTCAGATTCGCGAAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCG AGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGG CGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAAT TACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAA TATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAAC GGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGGAGCA GAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGA TCAAAAACTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGG ACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGC CTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCA AGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAAC CGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCC AGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCA ATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCA AGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGAC CAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCG TAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAG ATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGG AGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCA GAAATGCAAGTCCTCGGCCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTC ACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGA CCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAA CTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGG AAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGT GGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCC GCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGT CAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTA CGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAAT CTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTC AAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTC CCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCGTATCAG AAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTG

【表１－１０】

		CACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTG AACAATAA
37	AAV8 Cap	ATGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCG CCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACA TGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCC TGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGAC ATCGGGAGGAGCCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACC CCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGGCCCA AGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCAC GCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACC ATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCA TGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCAGGCC GTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCAGAT GCTGAGAACCGGCAACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACG TGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCGGCTG ATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCA AACAACAGGAGGCACGGCAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAGCCAA GGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTGCCAG GACCCTGTTACCGCCAACAACGCGTCTCAACGACAACCGGGCAAAA CAACAATAGCAACTTTGCCTGGACTGCTGGGACCAAATACCATCTGA ATGGAAGAAATTCATTGGCTAATCCTGGCATCGCTATGGCAACACAC AAAGACGACGAGGAGCGTTTTTTTCCCAGTAACGGGATCCTGATTTT TGGCAAACAAAATGCTGCCAGAGACAATGCGGATTACAGCGATGTC ATGCTCACCAGCGAGGAAGAAATCAAAACCACTAACCCTGTGGCTA CAGAGGAATACGGTATCGTGGCAGATAACTTGCAGCAGCAAAACAC GGCTCCTCAAATTGGAACTGTCAACAGCCAGGGGGCCTTACCCGGT ATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGG CCAAGATTCCTCACACGGACGGCAACTTCCACCCGTCTCCGCTGATG GGCGGCTTTGGCCTGAAACATCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAA CACGCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGC TGAACTCTTTCATCACGCAATACAGCACCGGACAGGTCAGCGTGGA AATTGAATGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCC GAGATCCAGTACACCTCCAACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTT TGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCA CCCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA
38	AAV DJ Cap	ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTC TGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCA CCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGC TTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGG AGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAA GCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGT ACAACCACGCCGACGCCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATAC GTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAG AGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGC TCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAA GATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTCCCAGACCCT CAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCT TACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAG GGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATT CCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTG

10 20 30 40 50

【表１－１１】

		GGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACA GCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGC ACCCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCA CCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGGC CCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGT CACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGC ACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCT CGGCTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGT TCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCAG GCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCA GATGCTGAGAACCGGCAACAACTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGG ACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGA CTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAG CCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAACTGGCTG CCAGGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGG ATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCA AGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTC TCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGA AAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCC GTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG CAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTT CCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCA TCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCTCCC CTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCGCCTCAGATCCTGAT CAAGAACACGCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGT CAAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGC GTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGG AACCCCGAGATCCAGTACACCTCCAACTACTACAAATCTACAAGTGT GGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCA TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA
39	ニワトリベータアクチンイントロン	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTC GCGCCGCCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTT TAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGG GCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGC GTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGC CCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGT GCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAAC CCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTC GGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCG GGCGGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCG CCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCGGA GCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTT ATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCT GGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGG CGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGG AGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCATCTCCAG CCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGG CAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGG
40	ウサギベータグロビンポリA	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCC TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA

【表１－１２】

		ATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGG GAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTT TGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTAT AAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTA TTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGT TTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTT TACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTG TCCCTCTTCTCTTATGAAGATC
41	フォワード プライマー	TAAGCAGAATTCATGAATTTGCCAGGAAGAT
42	リバース プライマー	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT
43	Gag, Pol, インテグラーゼ 断片	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGG GAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATA GAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTA CACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGC ACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATT AAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACA GAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATAC TCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAA TTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGA AGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAA TCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTT AGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAA ACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACA GGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAA ATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCA ATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGC ATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGG ATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTT GGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAAT TAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAA AGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACA GAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAA AACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACC CATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCC AATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAAC AGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACACTAATGATGTGAAA CAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAA TATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAAC ATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCT GAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCA GTTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTTCTATGTAGAT GGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTA ACTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAA ATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCG GGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAA TCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCA AATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGG GTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAAT TGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAATAGAT AAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCA

【表１－１３】

		ATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGT AGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGA CAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTT AGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATAT ATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCA TACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTAC ATACAGACAATGGCAGCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATC CCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAA AATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCA GTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGA TTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAAC AGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAA AATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAG GACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACA AGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGAT CATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCA AGTAGACAGGATGAGGATTAA
44	RRE、REV、およびウサギベータグロビンポリA配列を含有するDNA断片	TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATC AGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCC CAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAG GTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATC CTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCT ACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAA CTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTC CTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAA TGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAG CAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGT TGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCT GGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTC CCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTG ACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTG GAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATC ATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATAT GCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCAT CAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAA AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTT TTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGA TTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCT TATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTC ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCC AGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAG CAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCG CCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT TATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACT TGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA AATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG
45		ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG

【表１－１４】

	CAGエンハンサー/プロモーター/イントロン配列を含有するDNA断片	CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT GGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGA GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCC ACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGAT GGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCA ATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGT CGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCC GCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGG CGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATG ACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCC GGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCG TGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGC GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCG TGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGG GGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGG GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCC CCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTG CGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGG GGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCG GGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTA ATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGG AGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGG GCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGC CTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG GGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGC GGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGAATTC
46	RSVプロモーターおよびHIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAG GGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGA GTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAA TGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATG AGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCC GATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCA ACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATT GCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCA TTTGACCATTCACCACATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTT TAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC CTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAG CGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAA CCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGT GAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGG ATTGTGGAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATT GGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCT AGA
47		CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT

【表１－１５】

	伸長因子−1アルファ(EF−1アルファ)プロモーター	CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA TAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCC GCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCC TCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCC TGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGG GTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTG CTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAAT CTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGC CATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGA TAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTT TTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCC GCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCA CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG GGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTG AGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCT TCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGT TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTT GAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
48	PGKプロモーター	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCGCAGG GACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGA CCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTCGCAGCGTCACCCGGA TCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCCGGCGACGCTTCCTGCTCCG CCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCTTGCGGTTCGCGGCGTGCCGGACGTG ACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAG CGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCA ATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAG GGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTT CCTGCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGT CGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG
49	UbCプロモーター	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCCTCCTCACGGCGA GCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTTCCTGATCCTTC CGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCC TTAGAACCCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGG GTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGA GGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGG GCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACA GCTAGTTCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTCGCGGTTCTTGTTTGTGG ATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCG GGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGG AGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCC TGAACTGGGGGTTGGGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGA GTCTTGAATGGAAGACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAA ACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGG CCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGG CACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACT CGGGTTTGTCGTCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTG GGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCTCGTCGTGTCGTGA CGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCG GTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGGG CCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTCTGGTGA

【表１－１６】

		GGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGTAC CTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACTATGCGCTCGG GGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTTAGGCACCTTTTGAAATGT AATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTAGTAAA
50	SV40 ポリ A	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAA ATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT CCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
51	bHG ポリ A	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
52	RD114 エンベロープ	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGCCTAATAATAGT TCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGCAAGGCTATCGCATTAGTACAA AAACAACATGGTAAACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCAGGTATCCG AGGCCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAACTTGCCCAGGCAAGAC GGCCTACTTAATGACCAACCAAAAATGGAAATGCAGAGTCACTCCA AAAAATCTCACCCCTAGCGGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCCTGTA ACACTTTCCAGGACTCGATGCACAGTTCTTGTTATACTGAATACCGG CAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACACGGCCACCTTGCTTA AAATACGGTCTGGGAGCCTCAACGAGGTACAGATATTACAAAACCC CAATCAGCTCCTACAGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAGCCCG TTTGCTGGAGTGCCACAGCCCCCATCCATATCTCCGATGGTGGAGGA CCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGACAGTCCAAAAAAGGCTAGAAC AAATTCATAAGGCTATGCATCCTGAACTTCAATACCACCCCTTAGCC CTGCCCAAAGTCAGAGATGACCTTAGCCTTGATGCACGGACTTTTGA TATCCTGAATACCACTTTTAGGTTACTCCAGATGTCCAATTTTAGCCT TGCCCAAGATTGTTGGCTCTGTTTAAAACTAGGTACCCCTACCCCTC TTGCGATACCCACTCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTCCCTAG CGAATGCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCCTCTTGGTTCAACCGATG CAGTTCTCCAACTCGTCCTGTTTATCTTCCCCTTTCATTAACGATACG GAACAAATAGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAACTGCACCTCTGT AGCCAATGTCAGTAGTCCTTTATGTGCCCTAAACGGGTCAGTCTTCC TCTGTGGAAATAACATGGCATACACCTATTTACCCCAAAACTGGACA GGACTTTGCGTCCAAGCCTCCCTCCTCCCCGACATTGACATCATCCC GGGGGATGAGCCAGTCCCCATTCCTGCCATTGATCATTATATACATA GACCTAAACGAGCTGTACAGTTCATCCCTTTACTAGCTGGACTGGGA ATCACCGCAGCATTCACCACCGGAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCCGT CACCCAGTATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATGTCCAAG TCTTATCCGGTACCATACAAGATTTACAAGACCAGGTAGACTCGTTA GCTGAAGTAGTTCTCCAAAATAGGAGGGGACTGGACCTACTAACGG CAGAACAAGGAGGAATTTGTTTAGCCTTACAAGAAAAATGCTGTTTT TATGCTAACAAGTCAGGAATTGTGAGAAACAAAATAAGAACCCTAC AAGAAGAATTACAAAAACGCAGGGAAAGCCTGGCATCCAACCCTCT CTGGACCGGGCTGCAGGGCTTTCTTCCGTACCTCCTACCTCTCCTGG GACCCCTACTCACCCTCCTACTCATACTAACCATTGGGCCATGCGTT TTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCA GGCTCTGGTTTTGACTCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGT ACGAGCCATGA
53	GALV エンベロープ	ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTTCGGCACCAGATGAGTCC TGGGAGCTGGAAAAGACTGATCATCCTCTTAAGCTGCGTATTCGGAG ACGGCAAAACGAGTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGAC CCTCACCTGGCAGGTACTGTCCCAAACTGGGGACGTTGTCTGGGACA AAAAGGCAGTCCAGCCCCTTTGGACTTGGTGGCCCTCTCTTACACCT

【表１－１７】

		GATGTATGTGCCCTGGCGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCCGGG ATCCGATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTCCTGATTCAGACT ATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGGGAGCCATAGGGTGCAG CTACCCTCGGGCTAGGACCAGGATGGCAAATTCCCCCTTCTACGTGT GTCCCCGAGCTGGCCGAACCCATTCAGAAGCTAGGAGGTGTGGGGG GCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTTGTGAGACCACGGGT ACCGTTTATTGGCAACCCAAGTCCTCATGGGACCTCATAACTGTAAA ATGGGACCAAAATGTGAAATGGGAGCAAAAATTTCAAAAGTGTGAA CAAACCGGCTGGTGTAACCCCCTCAAGATAGACTTCACAGAAAAAG GAAAACTCTCCAGAGATTGGATAACGGAAAAAACCTGGGAATTAAG GTTCTATGTATATGGACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAG AGGTCACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTGGGCCCAGACCCTGTCCTT GCGGAACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCCTCACTCTCCCTCTCTCCCC ACGGAAAGCGCCGCCCACCCCTCTACCCCCGGCGGCTAGTGAGCAA ACCCCTGCGGTGCATGGAGAAACTGTTACCCTAAACTCTCCGCCTCC CACCAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTTGTGCAGGGGGCCTTCCTAA CCTTGAATGCTACCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTTGCTGGCTCTGT TTGGGCATGAGCCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTTCAGGAGA GGTCGCTTATACCTCCAACCATACCCGATGCCACTGGGGGGCCCAAG GAAAGCTTACCCTCACTGAGGTCTCCGGACTCGGGTCATGCATAGGG AAGGTGCCTCTTACCCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCCAT CAATTCCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCCTCAAACCATAGCT GGTGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACCCCCTGCCTCTCCACCTCAGTT TTTAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGTCCAGGTCCAGCTGATCCCCCG CATCTATTACCATTCTGAAGAAACCTTGTTACAAGCCTATGACAAAT CACCCCCCAGGTTTAAAAGAGAGCCTGCCTCACTTACCCTAGCTGTC TTCCTGGGGTTAGGGATTGCGGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGC CCTAATTAAAGGGCCCATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGCCTC CAAATCGCCATTGACGCTGACCTCCGGGCCCTTCAGGACTCAATCAG CAAGCTAGAGGACTCACTGACTTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAA ATAGGAGAGGCCTTGACTTACTATTCCTTAAAGAAGGAGGCCTCTGC GCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGTTTTTATGTAGACCACTCAGGTGC AGTACGAGACTCCATGAAAAAACTTAAAGAAAGACTAGATAAAAGA CAGTTAGAGCGCCAGAAAAACCAAAACTGGTATGAAGGGTGGTTCA ATAACTCCCCTTGGTTTACTACCCTACTATCAACCATCGCTGGGCCC CTATTGCTCCTCCTTTTGTTACTCACTCTTGGGCCCTGCATCATCAAT AAATTAATCCAATTCATCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTTT AGTCCTTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACGAGGAAAACCTT TAA
54	FUG エンベロープ	ATGGTTCCGCAGGTTCTTTTGTTTGTACTCCTTCTGGGTTTTTCGTTGT GTTTCGGGAAGTTCCCCATTTACACGATACCAGACGAACTTGGTCCC TGGAGCCCTATTGACATACACCATCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGT TGTGGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGG AACTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGTGAACGGGTTCAC TTGCACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTG GTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTTCCGCCCCACCCCA GACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCCA GATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATACCCCGACTACCACTGGCTT CGAACTGTAAGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCAAG TGTGACAGATTTGGACCCATATGACAAATCCCTTCACTCAAGGGTCT TCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAACGGTGTCCTCTACCTACTGC TCAACTAACCATGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACC AAGGACACCTTGTGACATTTTTACCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCA TCCAACGGGAACAAGACTTGCGGCTTTGTGGATGAAAGAGGCCTGT ATAAGTCTCTAAAAGGAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTT

【表１－１８】

		GGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAAACATCAG ATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCAGTTGGTGAATTTGCACGAC TTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTTAA GAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACC AAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACTTGTCCC AGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAG GCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATCCC CTCAAAAGGGTGTTTGAAAGTTGGAGGAAGGTGCCATCCTCATGTG AACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATATTAGGGCCTGACGACCATGT CCTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGT TGTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCCTGGCAGACCCT TCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTTGTTGAAGT TCACCTCCCCGATGTGTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTC TCCCGAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGGCCATGAT TGGCCTGGTGTTGATATTTTCCCTAATGACATGGTGCAGAGTTGGTA TCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTAT ACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA
55	LCMV エンベロープ	ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCTCACATCATCGA TGAGGTGATCAACATTGTCATTATTGTGCTTATCGTGATCACGGGTA TCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTGTGGGATATTCGCATTGATC AGTTTCCTACTTCTGGCTGGCAGGTCCTGTGGCATGTACGGTCTTAA GGGACCCGACATTTACAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAG TTTGATATGTCACATCTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTCAGC CAACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTAGAAT TGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAACTTTTGCAATCTG ACCTCTGCCTTCAACAAAAAGACCTTTGACCACACACTCATGAGTAT AGTTTCGAGCCTACACCTCAGTATCAGAGGGAACTCCAACTATAAG GCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACTT GACATTCTCAGATCGACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCTTC AGAGGTAGAGTCCTAGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGGGAAAT ACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCAAGACCAC CTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACCTGATTATACAAAATAGA ACCTGGGAAAACCACTGCACATATGCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAG GATTCTCCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAGACTAG CGGGCACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGGGTGGAGAAT CCAGGTGGTTATTGCCTGACCAAATGGATGATTCTTGCTGCAGAGCT TAAGTGTTTCGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAATCAT GATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGACTAATTGACTACAACAAGGC TGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCTTGCACTTAT TCAAAACAACAGTGAATTCTTTGATTTCAGATCAACTACTGATGAGG AACCACTTGAGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACTCAAA GTTTTGGTACCTAGAACATGCAAAGACCGGCGAAACTAGTGTCCCC AAGTGCTGGCTTGTCACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCACTT CAGTGATCAAATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTACAGAGATG TTGAGGAAGGATTACATAAAGAGGCAGGGGAGTACCCCCCTAGCAT TGATGGACCTTCTGATGTTTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCT TCCTGCACCTTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAGGTGG CTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACAAAGGAATTTGTAGTT GTGGTGCATTTAAGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTCTGGAAAAGACG CTGA
56	FPV エンベロープ	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTGTGGCAGTCATCCCCAC AAATGCAGACAAAATTTGTCTTGGACATCATGCTGTATCAAATGGCA CCAAAGTAAACACACTCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTGTCAATGC AACGGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATTTGCTCAAAA GGGAAAAGAACCACTGATCTTGGCCAATGCGGACTGTTAGGGACCA

【表１－１９】

		TTACCGGACCACCTCAATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGAT CTAATAATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTTGTTACCCGGGGA AGTTTGTTAATGAAGAGGCATTGCGACAAATCCTCAGAGGATCAGG TGGGATTGACAAAGAAACAATGGGATTCACATATAGTGGAATAAGG ACCAACGGAACAACTAGTGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCATTCT ATGCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAGACAATGCTGCTTTC CCACAAATGACAAAATCATACAAAAACACAAGGAGAGAATCAGCTC TGATAGTCTGGGGAATCCACCATTCAGGATCAACCACCGAACAGAC CAAACTATATGGGAGTGGAAATAAACTGATAACAGTCGGGAGTTCC AAATATCATCAATCTTTTGTGCCGAGTCCAGGAACACGACCGCAGAT AAATGGCCAGTCCGGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATC CCAATGATACAGTTACTTTTAGTTTCAATGGGGCTTTCATAGCTCCA AATCGTGCCAGCTTCTTGAGGGGAAAGTCCATGGGGATCCAGAGCG ATGTGCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGG AGGGACTATAACAAGCAGATTGCCTTTTCAAAACATCAATAGCAGA GCAGTTGGCAAATGCCCAAGATATGTAAAACAGGAAAGTTTATTAT TGGCAACTGGGATGAAGAACGTTCCCGAACCTTCCAAAAAAAGGAA AAAAAGAGGCCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAAAATGGTT GGGAAGGTCTGGTCGACGGGTGGTACGGTTTCAGGCATCAGAATGC ACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAGACTACAAAAGCACCCAATCGGC AATTGATCAGATAACCGGAAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACC AACCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCACTGAGGTGGAAA AGCAGATTGGCAATTTAATTAACTGGACCAAAGACTCCATCACAGA AGTATGGTCTTACAATGCTGAACTTCTTGTGGCAATGGAAAACCAGC ACACTATTGATTTGGCTGATTCAGAGATGAACAAGCTGTATGAGCGA GTGAGGAAACAATTAAGGGAAAATGCTGAAGAGGATGGCACTGGTT GCTTTGAAATTTTTCATAAATGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATA AGGAACAATACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGATGC AAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTGAGTAGTGGCTACAA AGATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGCTTTTTGCTTCT TGCCATTGCAATGGGCCTTGTTTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACA TGCGGTGCACTATTTGTATATAA
57	RRV エンベロープ	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACTAGACCATACCT AGCACATTGCGCCGATTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATAGCCCAG TTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGCATGCTTAA GATCCAAGTCTCCGCCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCAC GCCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTCATGATGTTCAGGAATC TAAGAGAGATTCCTTGAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATAC ATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAGGCGA CTACCTCAAGGTTTCGTTCGAGGACGCAGATTCGCACGTGAAGGCAT GTAAGGTCCAATACAAGCACAATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAA GTTCGTGGTTAGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCAT ACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGATTGACATGCATAC ACCGCCAGATATACCGGATCGCACCCTGCTATCACAGACGGCGGGC AACGTCAAAATAACAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACTGTA CCTGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGACAAGACCAT CAACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTGCCGTCACCAGCCAT GACAAATGGCAATTTACCTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGAC AGCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTAACGTCA CCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCCTGAGATTACACCCAGATCATCCGACGCTCTTCTC CTATAGGAGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGACGGAAGAAGGGATTG AGTACCAGTGGGGCAACAACCCGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACT GACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCAG

【表１－２０】

		TACTATTATGGACTATACCCCGCCGCCACTATTGCCGCAGTATCCGG GGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAACTCTGGCGGCCACATGCTGCATGC TGGCCACCGCGAGGAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCC AGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCTGCGCACCG AGGGCGAATGCA
58	MLV 10A1 エンベロープ	ATGGAAGGTCCAGCGTTCTCAAAACCCCTTAAAGATAAGATTAACC CGTGGAAGTCCTTAATGGTCATGGGGGTCTATTTAAGAGTAGGGATG GCAGAGAGCCCCCATCAGGTCTTTAATGTAACCTGGAGAGTCACCA ACCTGATGACTGGGCGTACCGCCAATGCCACCTCCCTTTTAGGAACT GTACAAGATGCCTTCCCAAGATTATATTTTGATCTATGTGATCTGGT CGGAGAAGAGTGGGACCCTTCAGACCAGGAACCATATGTCGGGTAT GGCTGCAAATACCCCGGAGGGAGAAAGCGGACCCGGACTTTTGACT TTTACGTGTGCCCTGGGCATACCGTAAAATCGGGGTGTGGGGGGCC AAGAGAGGGCTACTGTGGTGAATGGGGTTGTGAAACCACCGGACAG GCTTACTGGAAGCCCACATCATCATGGGACCTAATCTCCCTTAAGCG CGGTAACACCCCCTGGGACACGGGATGCTCCAAAATGGCTTGTGGC CCCTGCTACGACCTCTCCAAAGTATCCAATTCCTTCCAAGGGGCTAC TCGAGGGGGCAGATGCAACCCTCTAGTCCTAGAATTCACTGATGCA GGAAAAAAGGCTAATTGGGACGGGCCCAAATCGTGGGGACTGAGAC TGTACCGGACAGGAACAGATCCTATTACCATGTTCTCCCTGACCCGC CAGGTCCTCAATATAGGGCCCCGCATCCCCATTGGGCCTAATCCCGT GATCACTGGTCAACTACCCCCCTCCCGACCCGTGCAGATCAGGCTCC CCAGGCCTCCTCAGCCTCCTCCTACAGGCGCAGCCTCTATAGTCCCT GAGACTGCCCCACCTTCTCAACAACCTGGGACGGGAGACAGGCTGC TAAACCTGGTAGAAGGAGCCTATCAGGCGCTTAACCTCACCAATCCC GACAAGACCCAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTCGGGACCTCCTTA TTACGAAGGAGTAGCGGTCGTGGGCACTTATACCAATCATTCTACCG CCCCGGCCAGCTGTACGGCCACTTCCCAACATAAGCTTACCCTATCT GAAGTGACAGGACAGGGCCTATGCATGGGAGCACTACCTAAAACTC ACCAGGCCTTATGTAACACCACCCAAAGTGCCGGCTCAGGATCCTAC TACCTTGCAGCACCCGCTGGAACAATGTGGGCTTGTAGCACTGGATT GACTCCCTGCTTGTCCACCACGATGCTCAATCTAACCACAGACTATT GTGTATTAGTTGAGCTCTGGCCCAGAATAATTTACCACTCCCCCGAT TATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCGTACCAAATATAAGAGGGAGC CAGTATCGTTGACCCTGGCCCTTCTGCTAGGAGGATTAACCATGGGA GGGATTGCAGCTGGAATAGGGACGGGGACCACTGCCCTAATCAAAA CCCAGCAGTTTGAGCAGCTTCACGCCGCTATCCAGACAGACCTCAAC GAAGTCGAAAAATCAATTACCAACCTAGAAAAGTCACTGACCTCGT TGTCTGAAGTAGTCCTACAGAACCGAAGAGGCCTAGATTTGCTCTTC CTAAAAGAGGGAGGTCTCTGCGCAGCCCTAAAAGAAGAATGTTGTT TTTATGCAGACCACACGGGACTAGTGAGAGACAGCATGGCCAAACT AAGGGAAAGGCTTAATCAGAGACAAAAACTATTTGAGTCAGGCCAA GGTTGGTTCGAAGGGCAGTTTAATAGATCCCCCTGGTTTACCACCTT AATCTCCACCATCATGGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTACT CTTTGGACCCTGCATTCTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACA GGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGACTCAACAATATCACCAG CTAAAACCTATAGAGTACGAGCCATGA
59	EboV エンベロープ	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAG GACATCATTCTTTCTTTGGGTAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTTC CATCCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCACATTACAGGTTAGTGATG TCGACAAACTGGTTTGCCGTGACAAACTGTCATCCACAAATCAATTG AGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACG TGCCATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCCACCA AAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAACTGCTACA ATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGC

【表１－２１】

		GCCAGACGGGATTCGGGGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAA GTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCACAAAG AGGGTGCTTTCTTCCTGTATGACCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACC GAGGAACGACTTTCGCTGAAGGTGTCGTTGCATTTCTGATACTGCCC CAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGG TCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATT AGATATCAAGCTACCGGTTTTGGAACCAATGAGACAGAGTATTTGTT CGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACTTGAATCAAGATTCACAC CACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAA AAGGAGCAATACCACGGGAAAACTAATTTGGAAGGTCAACCCCGAA ATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAAACTAAAAAAA CCTCACTAGAAAAATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTCACAGCTGTAT CAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAGAGTCCGGCGCGAACTTC TTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACTGAAGACCACAAAATCATG GCTTCAGAAAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGGAA GGGAAGCTGCAGTGTCGCATCTGACAACCCTTGCCACAATCTCCACG AGTCCTCAACCCCCCACAACCAAACCAGGTCCGGACAACAGCACCC ACAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTT GAACAACATCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACAGCCTCCGACA CTCCCCCCGCCACGACCGCAGCCGGACCCCTAAAAGCAGAGAACAC CAACACGAGCAAGGGTACCGACCTCCTGGACCCCGCCACCACAACA AGTCCCCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACACTCATC ACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGCAGCGGGAAGCTAGGCTT AATTACCAATACTATTGCTGGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGGG AGGAGAGCTCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCA ACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAATC GGACTGGCCTGGATACCATATTTCGGGCCAGCAGCCGAGGGAATTT ACATAGAGGGGCTGATGCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTT GAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTGTTCCTG AGAGCCACAACCGAGCTACGCACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGC AATTGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTTTGG GACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAGAACATAAC AGACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTTGATAAAACCCTTC CGGACCAGGGGGACAATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAAT GGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGTTATC GCTTTATTCTGTATATGCAAATTTGTCTTTTAG
60	チロキシン結合グロブリンプロモーター (TBG)	CTTTCTCTTTTGTTTTACATGAAGGGTCTGGCAGCCAAAGCAATCAC TCAAAGTTCAAACCTTATCATTTTTTGCTTTGTTCCTCTTGGCCTTGG TTTTGTACATCAGCTTTGAAAATACCATCCCAGGGTTAATGCTGGGG TTAATTTATAACTAAGAGTGCTCTAGTTTTGCAATACAGGACATGCT ATAAAAATGGAAAGATGTTGCTTTCTGAG
61	プロトロンビンエンハンサーおよびヒトアルファ1アンチトリプシンプロモーターを含有するDNA断片	GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATCTTGCTACCAG TGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTA AGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACC TTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTT TCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCG GGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCC CTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCA GCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACG AGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGG GACAGTGAAT

【表１－２２】

62	プロトロンビンエンハンサー、ヒトアルファ1アンチトリプシンプロモーター、および5つのHNF1結合部位を含有するDNA断片	GTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCA TTAACGTTAATCATTAACATCGATGCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTG TTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGG GTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGG GTAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTC CCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGA CGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCA GTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGC GGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTC CGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCG TTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCT GTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
63	プロトロンビンエンハンサー、ヒトアルファ1アンチトリプシンプロモーター、および3つのHNF1/HNF4結合部位を含有するDNA断片	GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTG TACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAATCGAT GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATTCTGCAGTGA GAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACT CACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGC CAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTG CCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCA GCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACC TTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCA CTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGG CACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
64	hPAH FAM TaqMan プローブ	TCGTGAAAGCTCATGGACAGTGGC
65	PAH TaqMan フォワードプライマー	AGATCTTGAGGCATGACATTGG
66	PAH TaqMan リバースプライマー	GTCCAGCTCTTGAATGGTTCTT
67	アクチン FAM プローブ	AGCGGGAAATCGTGCGTGAC
68	アクチンフォワードプライマー	GGACCTGACTGACTACCTCAT
69	アクチンリバースプライマー	CGTAGCACAGCTTCTCCTTAAT
70	コドン最適化PAH (OPT3)	ATGTCTACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGGCCTGGGCAGAAAGCTGA GCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACAACTGCAACCA GAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGC GCCCTGGCCAAGGTGCTGAGACTGTTCGAAGAGAACGACGTGAACC TGACACACATCGAGAGCAGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGT ACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGCGGAGCCTGCCTGCTCTGACC AACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCACG AACTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCAG AACCATCCAAGAGCTGGACAGATTCGCCAACCAGATCCTGAGCTAT GGCGCCGAGCTGGACGCTGATCACCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTA CCGGGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTACAACTACCGG

【表１－２３】

		CACGGCCAGCCTATTCCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAGA AAACCTGGGGCACCGTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGTACAAGAC CCACGCCTGCTACGAGTACAACCACATCTTCCCACTGCTCGAGAAGT ACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGCTCGAGGACGTGTCC CAGTTCCTGCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCTGTTGCCGG ACTGCTGAGCAGCAGAGATTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGT TCCACTGTACCCAGTACATCAGACACGGCAGCAAGCCCATGTACAC CCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAGCTGCTGGGACATGTGCCCCTGT TCAGCGATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAGATCGGACTGGC TTCTCTGGGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCT ACTGGTTCACCGTGGAGTTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGATAGCAT CAAGGCTTATGGCGCTGGCCTGCTGTCTAGCTTTGGCGAGCTGCAGT ACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCCCCTGGAACTGGAAAA GACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGTACT ACGTGGCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAAGTGCGGAACTT CGCCGCCACCATTCCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACA CACAGCGGATCGAGGTGCTGGACAACACACAGCAGCTGAAAATTCT GGCCGACAGCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTGCAGCGCCCTG CAGAAAATCAAGTGA
71	コドン最適化 PAH (OPT2/3)	ATGAGTACGGCTGTGCTCGAGAATCCAGGTTTGGGCCGAAAGCTGT CTGATTTTGGACAGGAGACATCTTATATTGAAGACAACTGCAACCAG AATGGTGCGATATCCCTTATTTTTTCTCTGAAAGAAGAAGTAGGTGC GCTGGCAAAGGTCTTGCGGCTGTTTGAAGAGAACGATGTTAATCTTA CTCATATTGAGTCCAGACCATCACGGCTGAAAAAAGACGAGTACGA ATTTTTTACTCACTTGGACAAACGAAGCTTGCCGGCTCTTACTAATA TCATTAAGATCCTCCGGCATGACATAGGGGCGACAGTGCATGAGCTT TCAAGGGATAAAAAGAAAGATACCGTCCCCTGGTTTCCAAGGACCA TACAAGAACTCGACCGATTCGCGAACCAGATCCTTTCATATGGTGCT GAGTTGGATGCTGACCACCCCGGCTTCAAAGACCCGGTCTACCGAG CGCGGCGGAAACAATTTGCTGACATCGCATACAATTACAGGCATGG CCAGCCAATTCCTAGAGTAGAATACATGGAAGAAGAGAAAAAAACC TGGGGTACCGTCTTCAAGACGCTGAAATCATTGTATAAAACTCATGC ATGTTACGAATATAACCATATTTTTCCGTTGCTCGAGAAATATTGCG GGTTCCACGAAGATAACATCCCACAACTCGAGGATGTATCTCAGTTC CTCCAGACCTGTACGGGGTTTCGACTTAGGCCTGTTGCCGGACTGCT GAGCAGCAGAGATTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGTTCCACT GTACCCAGTACATCAGACACGGCAGCAAGCCCATGTACACCCCTGA GCCTGATATCTGCCACGAGCTGCTGGGACATGTGCCCCTGTTCAGCG ATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAGATCGGACTGGCTTCTCTG GGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCTACTGGTT CACCGTGGAGTTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGATAGCATCAAGGCT TATGGCGCTGGCCTGCTGTCTAGCTTTGGCGAGCTGCAGTACTGTCT GAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCCCCTGGAACTGGAAAAGACCGCC ATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGTACTACGTGGC CGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAAGTGCGGAACTTCGCCGCC ACCATTCCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACACACAGCG GATCGAGGTGCTGGACAACACACAGCAGCTGAAAATTCTGGCCGAC AGCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTGCAGCGCCCTGCAGAAAA TCAAGTGA
72	コドン最適化 PAH (OPT3/2)	ATGTCTACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGGCCTGGGCAGAAAGCTGA GCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACAACTGCAACCA GAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGC GCCCTGGCCAAGGTGCTGAGACTGTTCGAAGAGAACGACGTGAACC

【表１－２４】

		TGACACACATCGAGAGCAGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGT ACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGCGGAGCCTGCCTGCTCTGACC AACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCACG AACTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCAG AACCATCCAAGAGCTGGACAGATTCGCCAACCAGATCCTGAGCTAT GGCGCCGAGCTGGACGCTGATCACCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTA CCGGGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTACAACTACCGG CACGGCCAGCCTATTCCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAGA AAACCTGGGGCACCGTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGTACAAGAC CCACGCCTGCTACGAGTACAACCACATCTTCCCACTGCTCGAGAAGT ACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGCTCGAGGACGTGTCC CAGTTCCTGCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCTGTCGCGGG TTTGCTCAGTTCTCGAGACTTCCTGGGTGGATTGGCGTTTCGGGTATT CCATTGCACGCAGTATATCCGACACGGAAGTAAGCCAATGTACACG CCAGAACCCGATATCTGTCACGAATTGCTTGGACACGTTCCTCTGTT TTCTGATCGATCATTCGCTCAGTTTTCACAGGAAATCGGCCTGGCAT CTTTGGGAGCGCCGGATGAATATATTGAGAAGCTCGCTACAATTTAC TGGTTCACGGTAGAATTTGGGTTGTGCAAGCAGGGTGATAGTATTAA AGCATACGGTGCGGGATTGCTGTCCTCATTCGGGGAGCTTCAGTATT GCCTGTCCGAGAAACCCAAGCTGTTGCCGTTGGAATTGGAAAAAAC CGCTATCCAAAATTACACAGTAACGGAGTTCCAACCTTTGTACTACG TAGCCGAGTCATTTAACGATGCAAAGGAGAAGGTCAGAAATTTTGC TGCGACGATACCCAGACCGTTCTCAGTAAGGTACGATCCTTACACTC AGAGGATTGAAGTCCTGGATAATACGCAACAGCTCAAGATCCTGGC AGACTCCATAAATTCTGAAATCGGCATCTTGTGTTCAGCACTGCAAA AGATAAAATAA
73	OPT3の DNA断片	AGAACCATCCAAGAG
74	OPT3の DNA断片	TATTCCTCGGGTCGAGTAC
75	OPT3の DNA断片	AGAGATCGGACTGGCT
76	OPT3の DNA断片	TCCTCGGCCTTTCAG
77	プロトロンビン エンハンサー、 ヒトアルファ1 アンチトリプシン プロモーター、 および1つの HNF1/HNF4 結合部位を 含有する DNA断片	GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAATCGATGCGAGAACTTG TGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAA TATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAG TAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCC AGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCT CCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGAC TCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGC GTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTT AGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATT CACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATAC GGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTG ACCTGGGACAGTGAAT
78	プロトロンビン エンハンサー -hAATプロモー	GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATCTTGCTACCAG TGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTA

【表１－２５】

	ター−マウス微小ウイルスイントロン	AGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACC TTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTT TCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCG GGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCC CTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCA GCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACG AGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGG GACAGTGAATAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGG GTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTT CAGGTTGG
79	hAATプロモーター−トランスサイレチンエンハンサー−マウス微小ウイルスイントロン	GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCG GAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGATGCTCTAATCTCTCTAG ACAAGGTTCATATTTGTATGGGTTACTTATTCTCTCTTTGTTGACTAA GTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGCAGTCAGATTGGCAGGGATA AGCAGCCTAGCTCAGGAGAAGTGAGTATAAAAGCCCCAGGCTGGGA GCAGCCATCAAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGG GTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTT CAGGTTGG
80	マウス微小ウイルスイントロン	AAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGT TTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGG
81	トランスサイレチンエンハンサー	CCGATGCTCTAATCTCTCTAGACAAGGTTCATATTTGTATGGGTTACT TATTCTCTCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTG CAGTCAGATTGGCAGGGATAAGCAGCCTAGCTCAGGAGAAGTGAGT ATAAAAGCCCCAGGCTGGGAGCAGCCATCA
82	hAAT プロモーター	GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCG GAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCA
83	PAH 最適化バージョン 3-PAH 3'UTR	ATGTCTACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGGCCTGGGCAGAAAGCTGA GCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACAACTGCAACCA GAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGC GCCCTGGCCAAGGTGCTGAGACTGTTCGAAGAGAACGACGTGAACC TGACACACATCGAGAGCAGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGT ACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGCGGAGCCTGCCTGCTCTGACC AACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCACG AACTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCAG AACCATCCAAGAGCTGGACAGATTCGCCAACCAGATCCTGAGCTAT GGCGCCGAGCTGGACGCTGATCACCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTA CCGGGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTACAACTACCGG CACGGCCAGCCTATTCCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAGA AAACCTGGGGCACCGTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGTACAAGAC CCACGCCTGCTACGAGTACAACCACATCTTCCCACTGCTCGAGAAGT ACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGCTCGAGGACGTGTCC CAGTTCCTGCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCTGTTGCCGG ACTGCTGAGCAGCAGAGATTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGT TCCACTGTACCCAGTACATCAGACACGGCAGCAAGCCCATGTACAC CCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAGCTGCTGGGACATGTGCCCCTGT TCAGCGATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAGATCGGACTGGC TTCTCTGGGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCT ACTGGTTCACCGTGGAGTTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGATAGCAT CAAGGCTTATGGCGCTGGCCTGCTGTCTAGCTTTGGCGAGCTGCAGT ACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCCCCTGGAACTGGAAAA GACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGTACT ACGTGGCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAAGTGCGGAACTT

【表１－２６】

		CGCCGCCACCATTCCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACA CACAGCGGATCGAGGTGCTGGACAACACACAGCAGCTGAAAATTCT GGCCGACAGCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTGCAGCGCCCTG CAGAAAATCAAGTGAGTCGACAGCCATGGACAGAATGTGGTCTGTC AGCTGTGAATCTGTTGATGGAGATCCAACTATTTCTTTCATCAGAAA AAGTCCGAAAAGCAAACCTTAATTTGAAATAACAGCCTTAAATCCTT TACAAGATGGAGAAACAACAAATAAGTCAAAATAATCTGAAATGAC AGGATATGAGTACATACTCAAGAGCATAATGGTAAATCTTTTGGGGT CATCTTTGATTTAGAGATGATAATCCCATACTCTCAATTGAGTTAAA TCAGTAATCTGTCGCATTTCATCAAGATTA
84	PAH最適化バージョン3−アルブミン3'UTR	ATGTCTACCGCCGTGCTGGAAAATCCTGGCCTGGGCAGAAAGCTGA GCGACTTCGGCCAAGAGACAAGCTACATCGAGGACAACTGCAACCA GAACGGCGCCATCAGCCTGATCTTCAGCCTGAAAGAAGAAGTGGGC GCCCTGGCCAAGGTGCTGAGACTGTTCGAAGAGAACGACGTGAACC TGACACACATCGAGAGCAGACCCAGCAGACTGAAGAAGGACGAGT ACGAGTTCTTCACCCACCTGGACAAGCGGAGCCTGCCTGCTCTGACC AACATCATCAAGATCCTGCGGCACGACATCGGCGCCACAGTGCACG AACTGAGCCGGGACAAGAAAAAGGACACCGTGCCATGGTTCCCCAG AACCATCCAAGAGCTGGACAGATTCGCCAACCAGATCCTGAGCTAT GGCGCCGAGCTGGACGCTGATCACCCTGGCTTTAAGGACCCCGTGTA CCGGGCCAGAAGAAAGCAGTTTGCCGATATCGCCTACAACTACCGG CACGGCCAGCCTATTCCTCGGGTCGAGTACATGGAAGAGGAAAAGA AAACCTGGGGCACCGTGTTCAAGACCCTGAAGTCCCTGTACAAGAC CCACGCCTGCTACGAGTACAACCACATCTTCCCACTGCTCGAGAAGT ACTGCGGCTTCCACGAGGACAATATCCCTCAGCTCGAGGACGTGTCC CAGTTCCTGCAGACCTGCACCGGCTTTAGACTGAGGCCTGTTGCCGG ACTGCTGAGCAGCAGAGATTTTCTCGGCGGCCTGGCCTTCAGAGTGT TCCACTGTACCCAGTACATCAGACACGGCAGCAAGCCCATGTACAC CCCTGAGCCTGATATCTGCCACGAGCTGCTGGGACATGTGCCCCTGT TCAGCGATAGAAGCTTCGCCCAGTTCAGCCAAGAGATCGGACTGGC TTCTCTGGGAGCCCCTGACGAGTACATTGAGAAGCTGGCCACCATCT ACTGGTTCACCGTGGAGTTCGGCCTGTGCAAGCAGGGCGATAGCAT CAAGGCTTATGGCGCTGGCCTGCTGTCTAGCTTTGGCGAGCTGCAGT ACTGTCTGAGCGAGAAGCCTAAGCTGCTGCCCCTGGAACTGGAAAA GACCGCCATCCAGAACTACACCGTGACCGAGTTCCAGCCTCTGTACT ACGTGGCCGAGAGCTTCAACGACGCCAAAGAAAAAGTGCGGAACTT CGCCGCCACCATTCCTCGGCCTTTCAGCGTCAGATACGACCCCTACA CACAGCGGATCGAGGTGCTGGACAACACACAGCAGCTGAAAATTCT GGCCGACAGCATCAACAGCGAGATCGGCATCCTGTGCAGCGCCCTG CAGAAAATCAAGTGAGTCGACATTCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACA GGCTTAAATTGTTTTCACTGGTGTAAATTGCAGAAAGATGATCTAAG TAATTTGGCATTTATTTTAATAGGTTTGAAAAACACATGCCATTTTAC AAATAAGACTTATATTTGTCCTTTTGTTTTTCAGCCTACCATGAGAAT AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGCTTATTCATCTGTTTTTCTTT TTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTT TAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAA AGAATCTAATAGAGTGGTACAGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTGTT GCTATCCTGAAAATTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTTCTCTC TTATTCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTTGTGGGCTAATTAAA TAAATCATTAATACTCTTCTAAGTTATGGATTATAAACATTCAAAAT AATATTTTGACATTATGATAATTCTGAATAAAAGAACAAAAACCATG GTATAGGTAAGGAATATAAAACATGGCTTTTACCTTAGAAAAAACA ATTCTAAAATTCATATGGAATCAAAAAAGAGCCTGCA
85	PAH 3'UTR	AGCCATGGACAGAATGTGGTCTGTCAGCTGTGAATCTGTTGATGGAG ATCCAACTATTTCTTTCATCAGAAAAAGTCCGAAAAGCAAACCTTAA

【表１－２７】

		TTTGAAATAACAGCCTTAAATCCTTTACAAGATGGAGAAACAACAA ATAAGTCAAAATAATCTGAAATGACAGGATATGAGTACATACTCAA GAGCATAATGGTAAATCTTTTGGGGTCATCTTTGATTTAGAGATGAT AATCCCATACTCTCAATTGAGT
86	アルブミン 3'UTR	ATTCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTTCACTGGT GTAAATTGCAGAAAGATGATCTAAGTAATTTGGCATTTATTTTAATA GGTTTGAAAAACACATGCCATTTTACAAATAAGACTTATATTTGTCC TTTTGTTTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGAT CAAAAGCTTATTCATCTGTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACA CCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTC TGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGTAC AGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTGTTGCTATCCTGAAAATTCTGTA GGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTTCTCTCTTATTCCACTTCGGTAGAGG ATTTCTAGTTTCTTGTGGGCTAATTAAATAAATCATTAATACTCTTCT AAGTTATGGATTATAAACATTCAAAATAATATTTTGACATTATGATA ATTCTGAATAAAAGAACAAAAACCATGGTATAGGTAAGGAATATAA AACATGGCTTTTACCTTAGAAAAAACAATTCTAAAATTCATATGGAA TCAAAAAAGAGCCTGCA
87	WPRE (X-タンパク質配列を有しないWPRE)	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCT TAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCC TCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTG TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTC CGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCAC TGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCG CTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTT GCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGT GGTGTTGTCGGTACC

【図面】

【図１】

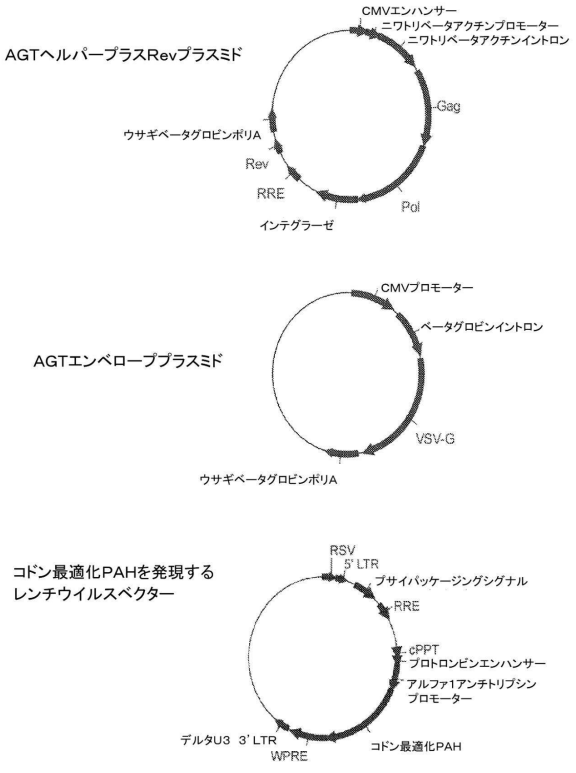


FIG. 1

【図２】

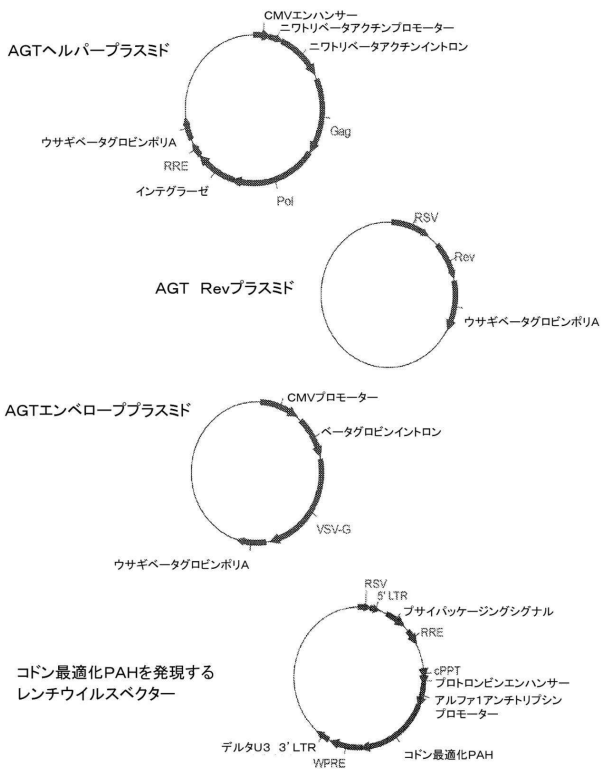


FIG. 2

【図３】

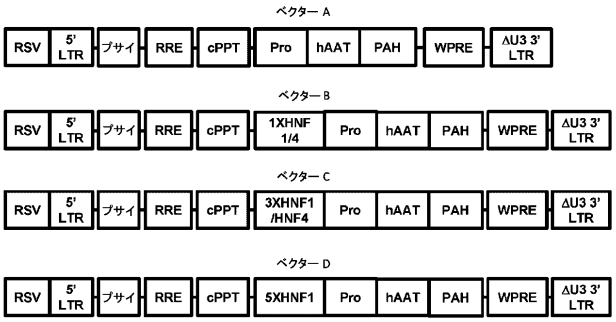


FIG. 3

【図４】

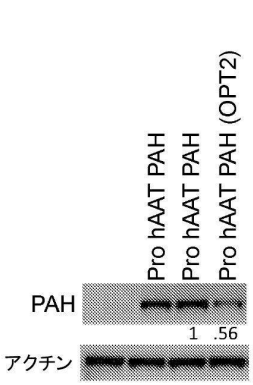


FIG. 4A

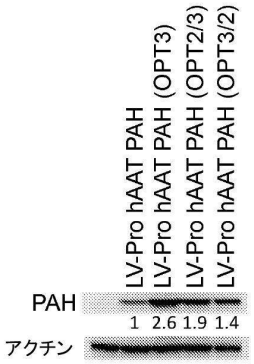


FIG. 4B

【図５】

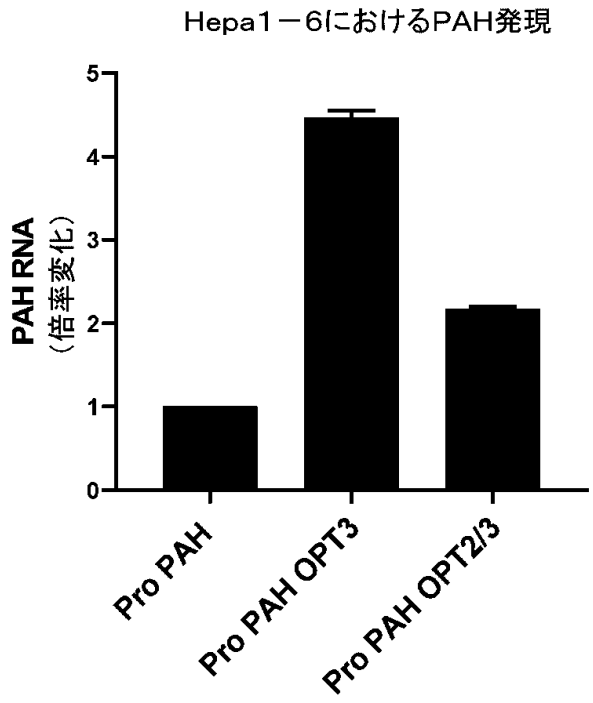


FIG. 5

【図６】

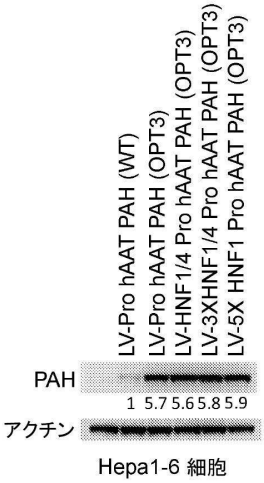


FIG. 6A

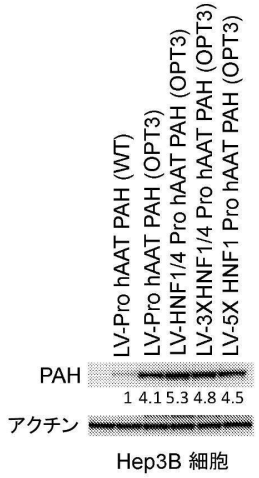


FIG. 6B

【図７】



FIG. 7

【図８】

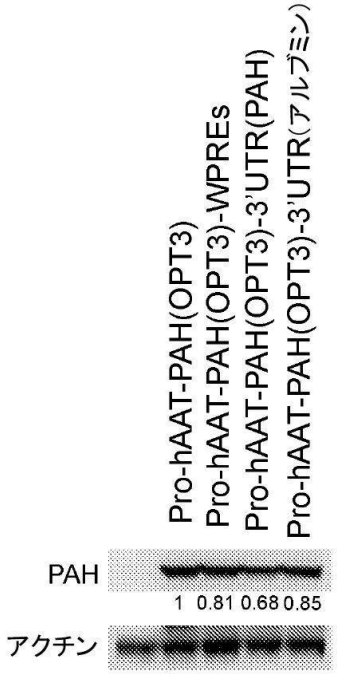


FIG. 8

【配列表】
2022535745000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/035584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 35/76; A61K 38/44; A61K 48/00; A61P 3/00; C12N 9/02; C12N 15/52 (2020.01)
CPC - A61K 38/44; A61K 48/00; A61K 48/005; A61P 3/00; C12N 9/0071; C12N 15/86 (2020.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
see Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2018/187231 A2 (AMERICAN GENE TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 11 October 2018 (11.10.2018) entire document	1, 16-25 --- 2, 8, 12
Y	WO 2018/126112 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 05 July 2018 (05.07.2018) entire document	2, 12
Y	US 2014/0105965 A1 (BANCEL et al) 17 April 2014 (17.04.2014) entire document	8
A	US 2017/0314041 A1 (RANA THERAPEUTICS, INC.) 02 November 2017 (02.11.2017) entire document	1-25
A	US 2015/0110858 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.) 23 April 2015 (23.04.2015) entire document	1-25

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 August 2020	04 SEP 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*3/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	

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

弁護士　山本 健策

(72)発明者　ラフーゼン， テイラー
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８５０， ロックビル， キー ウエスト アベニュー ９７１３ ， フィフス フロア

(72)発明者　シャオ， リンジ
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８５０， ロックビル， キー ウエスト アベニュー ９７１３ ， フィフス フロア

(72)発明者　パウザ， チャールズ デイビッド
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８５０， ロックビル， キー ウエスト アベニュー ９７１３ ， フィフス フロア

Ｆターム（参考）　4C084　AA13 NA05 NA14 ZC211 ZC212
4C086　AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA06 NA05 NA14 ZA02 ZC21
4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA14 ZA02 ZC21