(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-531282
(P2021-531282A)
(43)公表日　令和3年11月18日(2021.11.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 9/51	***(2006.01)***	A61K	9/51		4C076
A61P 3/00	***(2006.01)***	A61P	3/00	ZNA	4C084
A61K 35/76	***(2015.01)***	A61K	35/76		4C086
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00		4C087
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	48/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-502772 (P2021-502772)
(86)(22)出願日　令和1年7月16日 (2019.7.16)
(85)翻訳文提出日　令和3年3月18日 (2021.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/042069
(87)国際公開番号　WO2020/018583
(87)国際公開日　令和2年1月23日 (2020.1.23)
(31)優先権主張番号　62/839,766
(32)優先日　平成31年4月28日 (2019.4.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/698,503
(32)優先日　平成30年7月16日 (2018.7.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　511254321
セレクタ　バイオサイエンシーズ　インコーポレーテッド
ＳＥＬＥＣＴＡ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４７２、ウォータータウン、グローブストリート　６５
６５　Ｇｒｏｖｅ　Ｓｔｒｅｅｔ，Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ，ＭＡ　０２４７２，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人　100102842
弁理士　葛和　清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＯＴＣコンストラクトおよびベクターの方法および組成物

(57)【要約】
本明細書において提供されるのは、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)をコードする核酸、例えばOTCのコドン最適化された配列を含む核酸、ならびに関連するベクター、例えばAAVベクターに関する、方法および組成物である。また、提供されるのは、尿素サイクル異常症に関連する酵素をコードする配列および発現制御配列を含むAAVベクターを、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアと組み合わせて投与するための方法である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
尿素サイクル異常症を有するか、またはこれを有することが疑われる対象に、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターと免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアとを、同時に投与すること
を含む方法であって、AAVベクターが、尿素サイクル異常症に関連する酵素をコードする核酸配列および発現制御配列を含む、前記方法。
【請求項２】
尿素サイクル異常症が、オルニチントランスカルバミラーゼシンテターゼ(OTC)欠損症である、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
AAVベクターおよび免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアが、AAVベクターに対する体液性および細胞性免疫応答を低下させるために有効な量におけるものである、請求項1または2に記載の方法。
【請求項４】
AAVベクターおよび免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアが、早期の疾患の発症の間に同時に投与される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
対象は、さらなる治療剤としてステロイドを投与されない、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
さらなる治療剤として、より少ない量において、ステロイドを投与することをさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
対象は、AAVベクターおよび免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアを同時に先に投与されている、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
その後の時点においてAAVベクターを対象に投与することをさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
AAVベクターおよび免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアの同時投与が繰り返される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
尿素サイクル異常症に関連する酵素をコードする配列が、コドン最適化された配列である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
尿素サイクル異常症に関連する酵素が、OTCである、請求項10に記載の方法。
【請求項１２】
OTCをコードする配列が、OTC-CO3またはOTC-CO21のOTCをコードする配列である、請求項11に記載の方法。
【請求項１３】
OTCをコードする配列が、配列番号1～11または13またはその一部において記載される配列である、請求項11に記載の方法。
【請求項１４】
OTCをコードする配列が、配列番号13のOTCをコードする配列である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
発現制御配列が、肝臓特異的プロモーターである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】

免疫抑制剤が、ラパマイシンである、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
AAVベクターが、AAV8ベクターである、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
免疫抑制剤が、合成ナノキャリア中にカプセル化されている、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
合成ナノキャリアが、ポリマー性ナノ粒子を含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
ポリマー性ナノ粒子が、ポリエステルまたはポリエーテルに結合したポリエステルを含む、請求項19に記載の方法。
【請求項２１】
ポリエステルが、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)またはポリカプロラクトンを含む、請求項20に記載の方法。
【請求項２２】
ポリマー性ナノ粒子が、ポリエステルおよびポリエーテルに結合したポリエステルを含む、請求項20または21に記載の方法。
【請求項２３】
ポリエーテルが、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む、請求項20～22のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
動的光散乱を用いて得られた合成ナノキャリアの集合の粒子サイズ分布の平均が、110nmより大きな直径である、請求項20～23のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
直径が、150nmより大きい、請求項24に記載の方法。
【請求項２６】
直径が、200nmより大きい、請求項25に記載の方法。
【請求項２７】
直径が、250nmより大きい、請求項26に記載の方法。
【請求項２８】
直径が、5μmより小さい、請求項24～27のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
直径が、4μmより小さい、請求項28に記載の方法。
【請求項３０】
直径が、3μmより小さい、請求項29に記載の方法。
【請求項３１】
直径が、2μmより小さい、請求項30に記載の方法。
【請求項３２】
直径が、1μmより小さい、請求項31に記載の方法。
【請求項３３】
直径が、500nmより小さい、請求項32に記載の方法。
【請求項３４】
直径が、450nmより小さい、請求項33に記載の方法。
【請求項３５】
直径が、400nmより小さい、請求項34に記載の方法。
【請求項３６】
直径が、350nmより小さい、請求項35に記載の方法。
【請求項３７】
直径が、300nmより小さい、請求項36に記載の方法。

【請求項３８】
合成ナノキャリア中に含まれる免疫抑制剤のロードが、合成ナノキャリア全体での平均において、0.1％～50％(重量/重量)である、請求項1～37のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
ロードが、0.1％～25％である、請求項38に記載の方法。
【請求項４０】
ロードが、1％～25％である、請求項39に記載の方法。
【請求項４１】
ロードが、2％～25％である、請求項40に記載の方法。
【請求項４２】
合成ナノキャリアの集合のアスペクト比が、1：1、1：1.2、1：1.5、1：2、1：3、1：5、1：7または1：10より大きい、請求項1～41のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
請求項1～42のいずれか一項に記載されるようなAAVベクターの用量
を含む、組成物。
【請求項４４】
請求項1～43のいずれか一項に記載されるような合成ナノキャリアの用量をさらに含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
組成物が、キットである、請求項43または44に記載の組成物。
【請求項４６】
キットが、使用のための説明をさらに含む、請求項45に記載の組成物。
【請求項４７】
キットが、請求項1～42のいずれか一項に記載の方法を実施するための説明をさらに含む、請求項45に記載の組成物。
【請求項４８】
本明細書において提供されるOTCのいずれか1つをコードする核酸配列を含む核酸を含む、組成物。
【請求項４９】
配列が、OTC-CO3またはOTC-CO21のOTCをコードする、請求項48に記載の組成物。
【請求項５０】
OTCをコードする配列が、配列番号1～11または13またはその一部において記載される配列である、請求項48に記載の組成物。
【請求項５１】
OTCをコードする配列が、配列番号13のOTCをコードする配列である、請求項48に記載の組成物。
【請求項５２】
核酸の配列が、発現制御配列を含む、請求項48～51のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５３】
発現制御配列が、プロモーターである、請求項52に記載の組成物。
【請求項５４】
プロモーターが、肝臓特異的プロモーターである、請求項53に記載の組成物。
【請求項５５】
OTCをコードする、配列番号4、8または9、またはその一部などの、本明細書において提供される配列のいずれか1つにおいて記載される配列を含む核酸を含む、組成物。
【請求項５６】
核酸が、発現制御配列をさらに含む、請求項55に記載の組成物。
【請求項５７】
発現制御配列が、プロモーターである、請求項56に記載の組成物。
【請求項５８】

プロモーターが、肝臓特異的プロモーターである、請求項57に記載の組成物。
【請求項５９】
請求項48～58のいずれか一項に記載の組成物を含むウイルスベクターを含む、組成物。
【請求項６０】
ウイルスベクターが、AAVベクターである、請求項59に記載の組成物。
【請求項６１】
AAVベクターが、AAV8ベクターである、請求項60に記載の組成物。
【請求項６２】
請求項1～61のいずれか一項に記載のウイルスベクターを含む、組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、2018年7月16日に出願された米国仮出願シリアル番号62/698,503、および2019年4月28日に出願された米国仮出願シリアル番号62/839,766の35 U.S.C.§119(e)下における利益を主張し、当該仮出願の各々の全内容は、本明細書において参考として援用される。
【背景技術】
【０００２】
発明の分野
本発明は、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)をコードする核酸、例えばOTCのコドン最適化された配列を含む核酸、ならびに関連するベクター、例えばAAVベクターに関する、方法および組成物に関する。また、提供されるのは、尿素サイクル異常症に関連する酵素をコードする配列および発現制御配列を含むAAVベクターを、免疫抑制剤へ連結した(coupled to)合成ナノキャリアと組み合わせて投与する方法である。
【発明の概要】
【０００３】
発明の要旨
本明細書において提供されるのは、OTCをコードする核酸、例えばOTCのコドン最適化された配列を含む核酸、ならびに関連するベクター、例えばAAVベクターに関する、方法および組成物である。また、本明細書において提供されるのは、尿素サイクル異常症に関連する酵素をコードする核酸配列および発現制御配列を含むAAVベクターを、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアと組み合わせて投与するための、方法および組成物である。投与は、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つにおいて、本明細書において提供される目的のいずれか1つのための治療上の利益を有していてよい。
【０００４】
別の側面において、例のいずれか1つにおいて記載されるような方法または組成物が提供される。一態様において、本明細書において提供されるベクターまたは核酸配列のいずれか1つを含む組成物が提供される。
【０００５】
別の側面において、組成物のいずれか1つは、提供される方法のいずれか1つにおける使用のためのものである。
別の側面において、方法または組成物のいずれか1つは、本明細書において記載される疾患または障害のいずれか1つを処置することにおける使用のためのものである。別の側面において、方法または組成物のいずれか1つは、AAV抗原および/またはAAVベクターの発現生成物に対する免疫応答(すなわち、体液性および/または細胞性)を低下させること、酵素をコードする配列の発現を増大させることにおける使用のため、またはAAVベクターの繰り返し投与のためのものである。
【図面の簡単な説明】
【０００６】

【図１】図1は、3つの異なるコンストラクトの遺伝子導入効率を示す。GFPプラスミドを用いて、遺伝子導入効率を正規化した(wt)。
【図２】図2は、2つ組において、各々のコンストラクトを遺伝子導入した場合の結果を示す。ウェスタンブロット(上)をグラフ(下)において、WB定量において、バンド強度により定量した。
【図３】図3は、全ての実験(n＝4)からの各々のコンストラクトのバンド強度を示す。
【図４】図4は、CO3配列の特徴を示す。
【図５】図5は、CO21配列の特徴を示す。
【図６－１】図6は、コドン最適化分析のために用いた多様な異なるアルゴリズムを示し、これは、コドン使用、潜在的スプライス部位(cryptic splicing sites)、アンチセンス鎖におけるORF(ARF＞50bp)、二次構造、GC含有量、およびCpGアイランドを含む。
【図６－２】図6は、コドン最適化分析のために用いた多様な異なるアルゴリズムを示し、これは、コドン使用、潜在的スプライス部位(cryptic splicing sites)、アンチセンス鎖におけるORF(ARF＞50bp)、二次構造、GC含有量、およびCpGアイランドを含む。
【図６－３】図6は、コドン最適化分析のために用いた多様な異なるアルゴリズムを示し、これは、コドン使用、潜在的スプライス部位(cryptic splicing sites)、アンチセンス鎖におけるORF(ARF＞50bp)、二次構造、GC含有量、およびCpGアイランドを含む。
【図７】図7は、pSMD2__hOTCコンストラクトで遺伝子導入されたHuh7細胞におけるOTC mRNA発現レベルをリアルタイムPCRを用いて示す(n＝2)。
【図８Ａ】図8A～8Bは、pSMD2_hOTCコンストラクトで遺伝子導入されたHUH7におけるOTC発現を示す；ウェスタンブロット分析(図8A)およびバンド定量(図8B)を示す。
【図８Ｂ】図8A～8Bは、pSMD2_hOTCコンストラクトで遺伝子導入されたHUH7におけるOTC発現を示す；ウェスタンブロット分析(図8A)およびバンド定量(図8B)を示す。
【図９】図9は、hOTCの細胞内局在を染色により示す。
【図１０】図10は、C57Bl/6NにおけるAAVバッチ5.0E12vgp/kgからの結果を示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-CO1、AAV8-CO3、およびAAV8-CO6。AAV8-OTC野生型を、対照として用いた。
【０００７】
【図１１】図11は、$OTC^{spf-ash}$マウス(5×10^{11}Vg/Kg)の実験の結果を示す。
【図１２】図12は、ヒトおよびマウスOTCのウェスタンブロットによる比較を示す。
【図１３】図13は、肝臓中に同じ(5×10^{11}Vg/Kg)の濃度のウイルスを有する$OTC^{spf-ash}$マウスの尿中オロト酸を示す(n＝2)。
【図１４】図14は、HUH7肝細胞腫株におけるAAV8-hOTC-COバリアントの第1の群の発現レベルを示す。6つの異なるコンストラクト：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO2、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6、AAV8-hOTC-CO7、AAV8-hOTC-CO9を試験した。AAV8-hOTC野生型および空AAV8ベクターを、対照として用いた(n＝2、*＝P＜0.05)。
【図１５】図15は、HUH7肝細胞腫株におけるAAV8-hOTC-COバリアントの第2の群の発現レベルを示す。5つの異なるコンストラクト：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6-１、AAV8-hOTC-CO9-1、AAV8-hOTC-CO9-2を試験した。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝2、*＝P＜0.05)。
【図１６－１】図16は、ヒトにおける566のOTC配列のアラインメントのロゴ表記(logo representation)を示す。番号付けは、ヒト配列に対する挿入物を取り除くために、ヒト配列に対応する。文字のサイズは、配列保存の程度を示す。
【図１６－２】図16は、ヒトにおける566のOTC配列のアラインメントのロゴ表記を示す。番号付けは、ヒト配列に対する挿入物を取り除くために、ヒト配列に対応する。文字のサイズは、配列保存の程度を示す。
【図１７】図17は、hOTC-COバリアントの第3の群を作製するためのシャッフル(shuffle)したhOTC cDNAコンストラクトの模式図を示す。hOTC-CO21およびhOTC-CO18コンストラクトは、hOTC-CO1、hOTC-CO3、およびhOTC-CO6コンストラクトの保存された領域をシャッフルすることにより設計した。番号付けは、野生型ヒトOTCタンパク質のアミノ酸配列に対

応する。
【図１８】図18は、HUH7肝細胞腫株におけるAAV8-hOTC-CO1コンストラクトの発現レベルを示す。5つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6、AAV8-hOTC-CO18およびAAV8-hOTC-CO21。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝4、*＝P＜0.05)。
【図１９】図19は、高用量AAV(5.0E12ウイルスゲノム/キログラム(vg/kg))で形質導入されたオスC57Bl/6Nマウスにおける0TCの発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。6つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO2、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6、AAV8-hOTC-CO7、およびAAV8-hOTC-CO9。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝3、*＝P＜0.05)。
【０００８】
【図２０】図20は、AAV(5.0E12vg/kg)で形質導入されたオスC57Bl/6Nマウスからの結果を示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、およびAAV8-hOTC-CO6。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝3、*＝P＜0.05)。
【図２１】図21は、AAV(1.25E12vg/kg)で形質導入されたオスC57Bl/6Nマウスにおける0TCの発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。6つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO2、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6、AAV8-hOTC-CO7、およびAAV8-hOTC-CO9。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝3、*＝P＜0.05、**＝P＜0.01、***＝P＜0.001)。発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。
【図２２】図22は、AAV(5.0E12vg/kg)で形質導入されたメスC57Bl/6Nマウスにおける0TCの発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。6つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO2、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6、AAV8-hOTC-CO7、およびAAV8-hOTC-CO9。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた。
【図２３】図23は、1.25E12vg/kgまたは5.0E12vg/kgのコンストラクトで処置されたオスおよびメスC57Bl/6NマウスにおけるAAV8-hOTC-CO1コンストラクトのmRNAレベルを示す。6つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO2、AAV8-hOTC-CO3、AAV8-hOTC-CO6、AAV8-hOTC-CO7、およびAAV8-hOTC-CO9。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた。
【図２４】図24は、AAV(1.25E12vg/kg)で形質導入されたオスC57Bl/6Nマウスにおける0TCの発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、およびAAV8-hOTC-CO6。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝2、*＝P＜0.05)。
【図２５】図25は、AAV(1.25E12vgp/kg)で形質導入されたC57Bl/6Nマウスにおける0TCの発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、およびAAV8-hOTC-CO21。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝4、*＝P＜0.05)。
【図２６】図26は、5.0E11vg/kgで処置された$OTC^{spf-ash}$マウスの尿中オロト酸を示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、およびAAV8-hOTC-CO21。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝4)。
【図２７】図27は、5.0E11vg/kgで処置された$OTC^{spf-ash}$マウスの血漿アンモニア(NH_4)レベルを示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、およびAAV8-hOTC-CO21。AAV8-hOTC野生型およびC57Bl/6N野生型マウスを、対照として用いた(n＝4)。
【図２８】図28は、AAV(5.0E11vgp/kg)で形質導入された$OTC^{spf-ash}$マウスにおける0TCの発現レベル、0TCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。3つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1、AAV8-hOTC-CO3、およびAAV8-hOTC-CO06。AAV8-hOTC野生型およびC57Bl/6N野生型マウスを、対照として用いた(n＝4、*＝P＜0.05、**＝P＜0.01、***＝P＜0.001)。
【図２９】図29は、AAV(5.0E11vgp/kg)で形質導入された$OTC^{spf-ash}$マウスにおける0TCの

発現レベル、OTCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。2つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1およびAAV8-hOTC-CO3。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝4)。

【０００９】

【図３０】図30は、5.0E11vg/kgで処置されたOTC$^{spf-ash}$マウスの尿中オロト酸および触媒活性を示す。2つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1およびAAV8-hOTC-CO3。AAV8-hOTC野生型およびC57Bl/6N野生型マウスを、対照として用いた(n＝5)。

【図３１】図31は、AAV(1.0E12vgp/kg)で形質導入されたOTC$^{spf-ash}$マウスにおけるOTCの発現レベル、OTCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。2つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1およびAAV8-hOTC-CO3。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝5)。

【図３２】図32は、AAV(5.0E11vgp/kg)で形質導入されたメスOTC$^{spf-ash}$マウスにおけるOTCの発現レベル、OTCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。2つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1およびAAV8-hOTC-CO3。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝5)。

【図３３】図33は、AAV(1.0E12vgp/kg)で形質導入されたメスOTC$^{spf-ash}$マウスにおけるOTCの発現レベル、OTCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。2つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO1およびAAV8-hOTC-CO3。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝5)。

【図３４】図34は、AAV(1.0E12vgp/kg)で形質導入されたオスOTC$^{spf-ash}$マウスにおけるOTCの発現レベル、OTCの触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数/細胞を示す。2つの異なるコンストラクトを試験した：AAV8-hOTC-CO3およびAAV8-hOTC-CO21。AAV8-hOTC野生型を対照として用いた(n＝5、*＝P＜0.05、**＝P＜0.01)。

【図３５】図35は、肝臓中に同じ(1.0E12vgp/kg)濃度のウイルスを有するOTC$^{spf-ash}$オスマウスの尿中オロト酸を示す(n＝5)。

【図３６】図36は、3つの用量のうちの1つ(2.5E11vgp/kg、5.0E11vgp/kg、1.0E12vgp/kg)のAAV8-hOTC野生型またはAAV8-hOTC-CO21を注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスにおける尿中オロト酸、OTC酵素活性およびOTCタンパク質レベルを示す。

【図３７】図37は、5.0E11vg/kgのAAV8-hOTC-wtまたはAAV8-hOTC-CO21で処置されたOTC$^{spf-ash}$オスマウスにおける尿中オロト酸レベルを示す(n＝5)。

【図３８】図38は、2.5E11vg/kgのAAV8-hOTC-wtまたはAAV8-hOTC-CO21で処置されたOTC$^{spf-ash}$オスマウスのタンパク質発現および触媒活性を示す(n＝5、*＝P＜0.05)。

【図３９】図39は、2.5E11vg/kgのAAV8-hOTC-wtまたはAAV8-hOTC-CO21で処置されたOTC$^{spf-ash}$オスマウスのタンパク質発現および触媒活性を示す(n＝5、*＝P＜0.05)。

【００１０】

【図４０】図40は、2.5E11vg/kgのAAV8-OTC-wtまたはAAV8-hOTC-CO21で処置されたOTC$^{spf-ash}$オスマウスにおける尿中オロト酸を示す。

【図４１】図41は、3つの用量のうちの1つ(2.5E11、5.0E11または1.0E12vg/kg)のAAV8-hOTC-wtまたはAAV8-hOTC-CO21で処置されたOTC$^{spf-ash}$オスマウスにおける尿中オロト酸およびOTC酵素活性を示す。

【図４２】図42は、5E11vgp/kgのAAV8-hOTC野生型またはAAV8-hOTC-CO21ウイルスを注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスにおける、行動試験の結果、血漿アンモニア(NH_4)レベル、および尿中オロト酸レベルを示す。B6EiC3Sn-WT(WT-CH3)マウスを対照として用いた(n＝4、*＝P＜0.05、**＝P＜0.01、***＝P＜0.001)。

【図４３】図43は、5E11vgp/kgまたは1E12vgp/kgのAAV8-hOTC-CO21を注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスの尿中オロト酸を示す。

【図４４】図44は、5E11vpg/kgのAAV8-hOTC野生型またはAAV8-hOTC-CO21ウイルスを注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスにおける、行動試験の結果、血漿アンモニア(NH_4)レベル、尿中オロト酸レベル、タンパク質発現レベル、およびOTC酵素活性を示す。Bi6EiC3Sn-WT(WT-CH3)またはC57Bl/6N野生型(Ｃ５７-WT)マウスを対照として用いた(n＝4、*＝P＜0.05、**

＝P＜0.01、***＝P＜0.001)。
【図４５】図45は、AAV8-hOTC-CO21およびAAV8-hOTC-Δエンハンサー-CO21(AAV8-hOTC-Δ-CO21)を発現するヒト肝細胞におけるOTCの発現および酵素活性を示す。未処置のOTC$^{spf-ash}$マウスを、対照として用いた。
【図４６】図46は、AAV8-hOTC-CO21およびAAV8-hOTC-Δ-CO21を注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスの尿中オロト酸およびOTCの発現を示す。未処置のOTC$^{spf-ash}$マウスを、対照として用いた。
【図４７】図47は、5.0E11vgp/kgのAAV8-hOTC-CO21ウイルスを注射された若齢(P30)OTC$^{spf-ash}$マウスの尿中オロト酸および抗AAV8抗体(Nab)を示す。未処置のOTC$^{spf-ash}$マウスを、対照として用いた。
【図４８】図48は、4.0E12vg/kgのAAV8-ルシフェラーゼ(AAV8-ｌｕｃ)および8mg/kgのSVP[Rapa]またはSVP[空]を注射され、その後、4.0E12vg/kgのAAV8-hFIXおよび8vg/kgのSVP[Rapa]またはSVP[空]を注射されたC57BL/6マウスにおける、抗AAV8 IgG抗体のレベルおよびhFIXの発現を示す(n＝5/群)。
【図４９】図49は、2.0E12vg/kgのAAV8-Gaaおよび3mg/kgのSVP[Rapa]またはSVP[空]を注射され、その後、2.0E12vg/kgのAAV8-hFIXおよび3mg/kgのSVP[Rapa]またはSVP[空]を注射された、Macaca fascicularis非ヒト霊長類における抗AAV8 IgG抗体のレベルおよびhFIXの発現を示す(n＝2のSVP[Rapa]＋AAV、n＝1のSVP[Empty]＋AAV)。
【００１１】
【図５０】図50は、AAV8-OTC CO21のみ(「AAV」、黒丸)、AAV8-OTC CO21＋空のナノ粒子対照(「AAV＋NPc」、黒四角)、AAV8-OTC CO21＋4mg/kgのSVP-ラパマイシン(「AAV＋SVP4」、黒三角)、AAV8-OTC CO21＋8mg/kgのSVP-ラパマイシン(「AAV＋SVP8」、逆黒三角)、またはAAV8-OTC CO21＋12mg/kgのSVP-ラパマイシン(「AAV＋SVP12」、黒ひし形)を注射された2週間後の、OTC$^{spf-ash}$マウスにおける、抗AAV8 IgG抗体のレベルを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
発明の詳細な説明
本発明を詳細に記載する前に、本発明が、特に例示される材料またはプロセスのパラメーターに限定されず、当該材料またはプロセスのパラメーターは、それ自体が変化し得ることが、理解されるべきである。また、本明細書において用いられる専門用語は、発明の特定の態様を記載することを目的とするものであり、本発明を記載するための代替的な専門用語の使用の限定を意図するものではない。
【００１３】
本明細書において、上または下のいずれであっても、引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、その全体において、全ての目的のために、本明細書により参考として援用される。かかる参考としての援用は、援用される、本明細書において引用される刊行物、特許および特許出願のいずれかが、先行技術を構成することを認定することを意図しない。
【００１４】
本明細書および添付の請求の範囲において用いられる場合、内容が明らかに他を指定しない限り、単数形「a」、「an」および「the」は、複数の指示物を含む。例えば、「a polymer」への言及は、2つ以上のかかる分子の混合物または異なる分子量の単一のポリマー種の混合物を含み、「a synthetic nanocarrier」への言及は、2つ以上のかかる合成ナノキャリアの混合物または複数のかかる合成ナノキャリアを含み、「a DNA molecule」への言及は、2つ以上のかかるDNA分子の混合物または複数のかかるDNA分子を含み、「an immunoisuppressant」への言及は、2つ以上のかかる免疫抑制剤分子の混合物または複数のかかる免疫抑制剤分子を含む、など。
【００１５】
本明細書において用いられる場合、用語「含む(comprise)」またはそのバリアント、例えば「含む(comprises)」もしくは「含むこと(comprising)」は、任意の列挙される完全

体(integer)(例えば、特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定(a feature, element, characteristic, property, method/process step or limitation))または完全体の群(例えば、特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定(features, elements, characteristics, properties, methods/process steps or limitations))の包含を示すように読まれるべきであるが、任意の他の完全体または完全体の群の除外を示すように読まれるべきではない。したがって、本明細書において用いられる場合、用語「含むこと(comprising)」は、包括的であり、さらなる、列挙されない完全体または方法/プロセスステップを除外するものではない。

【００１６】

本明細書において提供される組成物および方法のいずれかの態様において、「含むこと(comprising)」は、「～から本質的になる(consisting essentially of)」または「～からなる(consisting of)」と置き換えることができる。句「～から本質的になる(consisting essentially of)」は、本明細書において、特定の完全体もしくはステップ、または請求される発明の特徴もしくは機能に物質的に影響を及ぼさないものを必要とするように用いられる。本明細書において用いられる場合、用語「～からなる(consisting)」は、列挙される完全体(例えば、特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定(a feature, element, characteristic, property, method/process step or limitation))または完全体の群(例えば、特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定(features, elements, characteristics, properties, methods/process steps or limitations))のみの存在を示すように用いられる。

【００１７】

Ａ．導入

尿素サイクル欠損症(UCD)は、一般に、尿素サイクルにおける6つの酵素のうちの1つの欠損をもたらす遺伝子障害により引き起こされ、血液中のアンモニアの蓄積をもたらす。食事のタンパク質制限およびアンモニア除去薬にもかかわらず、UCDを有する小児は、高アンモニア血症に関する糖尿病を発症し、多くが、人生の初めの20年間の間に死亡する。臓器のアベイラビリティーおよび生涯にわたる免疫抑制処置により限定される侵襲的手技である肝臓移植を別として、最も一般的なUCDであるオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症(OTCd)のための決定的な処置は存在しない。オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症(OTCd)は、一遺伝子性のX連鎖型の尿素サイクル疾患であり、概算される有病率は、1 5,000～60,000人(出生数)である。最も重篤なOTC欠損症患者は、生後すぐに、昏睡および若年死亡をもたらし得る重篤なアンモニア急性発作を伴う症状を呈する。第2のグループの患者は、酵素の活性が部分的に残留することに起因する発達遅延および知的障害を含む遅発性の徴候により特徴づけられる(Campbell et al., 1973；Wraith, 2001；Gordon, 2003)。

【００１８】

例として、肝臓特異的プロモーターの転写制御下においてヒトOTC導入遺伝子を発現する、一連のssAAVベクターコンストラクトを開発した。wt-hOTCを、様々なアルゴリズムによりコドン最適化(Codon-Optimize：CO)した。これらの候補ベクターを、AAV8中にパッケージングし、OTCspf-ash(5×10^{11}および1×10^{12}vgp/kg)マウスに形質導入した。細胞1つあたりのウイルスゲノムコピーの数、タンパク質レベル、触媒活性、尿中オロト酸レベル、および血漿アンモニアレベルを測定することにより、OTCspf-ashマウスの表現型を修正することにおいて特に効率的であるCO-hOTCコンストラクトを同定した。かかるコンストラクトを含む組成物を、本明細書においていくつかの側面において提供する。かかるコンストラクトを本明細書において提供される方法および組成物のいずれか1つにおいて用いることができる。

【００１９】

加えて、ウイルスベクターは導入遺伝子発現などの多様な適用のための有望な治療剤である一方で、ウイルスベクターに対する細胞性および体液性の免疫応答が、繰り返し投与に関し、効力を減少させ、および/またはかかる治療剤を使用する能力を低下させ得るこ

とに、留意する。これらの免疫応答は、抗体、B細胞およびT細胞の応答を含み、当該ウイルスベクターのウイルス抗原(ウイルスキャプシドまたはコートタンパク質またはこれらのペプチドなど)に対して特異的であり得る。

【００２０】

ラパマイシンなどの免疫抑制剤を含む生分解性合成ナノキャリアと組み合わせた投与のための、OTC遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製して、抗体応答(例えば免疫原性治療用酵素に対する)などの免疫応答を予防するために用いることができることを見出した。研究において、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアは、AAVに対する体液性および細胞性免疫応答を遮断し、これは、OTCdについて2つの利点を有し得る：1)患者を、幼少のうちに処置しつつ、治療的発現レベルを維持するために人生のより後の時期に再投与する可能性を維持する能力、および2)代謝的な急性発作を引き起こし得るステロイドの使用を最少化する。したがって、本明細書において提供されるのは、対象を、本明細書において提供されるコンストラクトのいずれか1つを含む組み換えAAVベクターで、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアと組み合わせて処置するための、方法および組成物である。

【００２１】

したがって、本発明者らは、驚くべきことに、かつ予想外に、本明細書において開示される発明を実施することにより上記の課題および限定を解決することができることを見出した。処置のためのウイルスベクターの効果的な使用に対する前述の障害に対する解決方法を提供する方法および組成物が、提供される。

発明は、ここで、以下により詳細に記載されるであろう。

【００２２】

Ｂ．定義

「さらなる治療剤」とは、ウイルスベクターおよび/または免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアに加えられる任意の治療剤を指す。いくつかの態様において、さらなる治療剤は、副腎皮質ステロイドなどのステロイドである。

【００２３】

「投与すること」または「投与」または「投与する」とは、材料を、対象に、薬理学的に有用な様式において、与えるかまたは分配することを意味する。当該用語は、「投与されることを引き起こすこと」を含むことを意図される。「投与されることを引き起こすこと」とは、直接的または間接的に、他者に、当該材料を投与させること、当該材料を投与する衝動を起こさせること、当該材料を投与するように奨励すること、当該材料を投与することを補助すること、当該材料を投与することを誘導するかまたは指示することを意味する。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、AAVベクターおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアを同時に投与するステップを含んでもよいか、またはこれをさらに含む。いくつかの態様において、同時投与(concomitant administration)は、繰り返し行われる。なおさらなる態様において、同時投与は、同時の投与(simultaneous administration)である。「同時の(simultaneous)」とは、臨床家が、同じ時間または実質的に同じ時間における投与であって、所望される治療成績に対する影響に関して、投与の間の任意の時間を、実質的に無(nil)であるかまたは無視し得ると考えるものを意味する。いくつかの態様において、同時の、とは、投与が、5、4、3、2、1分間、またはそれより短い時間の中で起こることを意味する。

【００２４】

「有効量」とは、本明細書において提供されるような対象への投与のための組成物または投与形態に関して、対象において1つ以上の所望される結果、例えばウイルスベクターもしくはその発現生成物および/または効果的な導入遺伝子発現に対する免疫応答の低下または除去を提供する、組成物または投与形態の量を指す。有効量は、in vitroまたはin vivoでの目的のためのものであってよい。in vivoでの目的のために、量は、臨床家が、対象にとって臨床上の利益を有し得ると考えるであろうものであってよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つにおいて、投与される組成物は、本明細書において提

供されるような有効量のうちのいずれか1つにおけるものであってよい。

【００２５】

有効量は、望ましくない免疫応答のレベルを低下させることを含み得るが、いくつかの態様において、それは、望ましくない免疫応答を完全に予防することを含む。有効量はまた、望ましくない免疫応答の発生を遅延させることを含んでもよい。有効量はまた、所望される治療エンドポイントまたは所望される治療結果をもたらす量であってもよい。有効量は、いくつかの態様において、対象において、ウイルスベクターのウイルス抗原および/または発現生成物などの抗原に対する免疫寛容原性免疫応答をもたらす。有効量はまた、導入遺伝子発現(ウイルスベクターにより送達される導入遺伝子)の増大をもたらし得る。このことは、対象における多様な目的の組織または系における導入遺伝子タンパク質濃度を測定することにより、決定することができる。この発現の増大は、局所的に測定しても全身で測定してもよい。前述のもののいずれかの達成は、慣用的な方法によりモニタリングすることができる。

【００２６】

提供される組成物および方法のいずれか1つのいくつかの態様において、有効量は、免疫応答の低下または除去などの所望される免疫応答が、対象において、少なくとも1週間、少なくとも2週間または少なくとも1か月間にわたり持続するものである。提供される組成物および方法のいずれか1つの他の態様において、有効量は、免疫応答の低下または除去などの、測定可能な所望される免疫応答をもたらすものである。いくつかの態様において、有効量は、測定可能な所望される免疫応答を、少なくとも1週間、少なくとも2週間または少なくとも1か月間にわたりもたらすものである。

【００２７】

有効量は、無論、処置されている特定の対象；状態、疾患または障害の重篤度；年齢、身体的条件、サイズおよび体重を含む個々の患者のパラメーター；処置の期間；併用治療(ある場合は)の性質；投与の具体的な経路、ならびに保健の実務家の知識および専門知識の範囲内の類似の要因に依存するであろう。これらの要因は、当業者に周知であり、慣用的な実験のみを用いて取り組むことができる。

【００２８】

「接着させる(attach)」または「接着している(attached)」または「連結させる(couple)」または「連結している(coupled)」(など)は、1つの実体(例えば部分)を別のものに化学的に会合させることを意味する。いくつかの態様において、接着は、共有的であり、これは、接着が、2つの実体の間の共有結合の存在に関して起こることを意味する。非共有的な態様において、非共有的な接着は、非共有的な相互作用により媒介され、これは、これらに限定されないが、電荷相互作用、親和性相互作用、金属配位、物理吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、TTスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファンデルワールス相互作用、磁気相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用、および/またはこれらの組み合わせを含む。態様において、カプセル化は、接着の一形態である。

「平均」とは、本明細書において用いられる場合、別段に記述されない限り、算術平均を指す。

【００２９】

「コドン最適化された」とは、一般にアミノ酸配列の変化をもたらすことなく、しかし、より高い、またはより効率的な発現をもたらすように、コドンを変化させることによる、タンパク質をコードする核酸配列の最適化を指す。コドン最適化は、生物において、遺伝子の転写および翻訳効率を増大させることにより、タンパク質のコード遺伝子、例えばOTC、のタンパク質発現を改善するために用いられる技術である。生体における標的遺伝子のタンパク質発現の低下は、これらに限定されないが、希少コドンの存在、GC含有量、mRNA構造、反復配列、および制限酵素切断部位の存在を含む多数の要因に起因し得る。様々なコドン最適化アルゴリズムが、これらの要因を多様なレベルで考慮し、重みづけする。典型的には、複数の異なるコドン最適化アルゴリズムが、特定の配列について用いられ、並べて比較されるであろう。

【００３０】
いくつかの態様において、コドン最適化は、核酸配列、例えばmRNA配列におけるコドンの配列を変更するように行われる。いくつかの態様において、コードされたアミノ酸配列を変更することなく、核酸配列が変更される。コドンは、RNA翻訳のタンパク質への間に相補的なトランスファーRNA(tRNA)により結合される、mRNA中のヌクレオチド配列の3つの塩基対のブロックである。いくつかの場合において、mRNA配列は、希少コドンを取り除くために変更される。希少コドンは、標的遺伝子が発現する生物において存在しないかまたは低いレベルで存在するtRNAに相補的であるコドンである。標的遺伝子中の希少コドンの存在は、タンパク質の翻訳を減少させるか、遮断することすらあり得る。いくつかの態様において、所与の生物について、アミノ酸配列を変化させることなく、核酸配列を、希少コドンを取り除くように変化させることにより、タンパク質の発現を改善することができる。

【００３１】
いくつかの場合において、核酸配列、例えば、mRNA配列は、当該核酸配列のGC含有量を増大または減少させるように改変される。核酸配列のグアノシン/シトシン(GC)含有量は、当該核酸配列中のヌクレオチドのうちGまたはCであるもののパーセンテージである。グアノシンとシトシンとは、相補的であり、二本鎖ヌクレオチドにおいて3つの水素結合を形成し、一方、アデニンとチミン、またはアデニンとウラシルとは、2つの水素結合のみを形成する。この水素結合の数の増加は、核酸分子の安定性を増大させる。いくつかの態様においては、アミノ酸配列を変化させることなく、核酸配列を、GC含有量を増大させるように変化させることにより、タンパク質発現を改善することができる。いくつかの態様においては、アミノ酸配列を変化させることなく、核酸配列を、GC含有量を減少させるように変化させることにより、タンパク質の発現を改善することができる。

【００３２】
mRNAの構造は、生物においてmRNAのタンパク質への翻訳を制御することにおいて、重要な役割を果たす。mRNAが二次、三次または四次構造を形成する場合、これらの構造は、コドンを、ｔRNAまたはリボソームによる結合に対してアクセス不可能にし、このことが翻訳を阻害する。mRNAの二次および三次構造は、ステムループおよびシュードノットを含み、三次構造は、二次構造よりも複雑な三次元のmRNA形態である。mRNAの四次構造として、mRNA-mRNAホモダイマーおよびmRNA-mRNAヘテロダイマーが挙げられる。いくつかの態様において、アミノ酸配列を変化させることなく、核酸配列、例えばmRNA配列を、mRNAの二次、三次または四次構造の形成を減少または回避するように変化させることにより、タンパク質の発現を改善することができる。

【００３３】
いくつかの態様において、核酸配列、例えばmRNA配列中の反復配列の存在は、標的遺伝子の転写および翻訳を阻害することによりタンパク質の発現を減少させる。反復配列は、利用可能なヌクレオチドおよびtRNAのプールを使い果たすことにより、転写および翻訳を減少させる。加えて、反復配列はまた、mRNAの二次および三次構造の形成を可能にすることにより、翻訳を減少させ得る。いくつかの態様において、アミノ酸配列を変化させることなく、核酸配列を、反復配列を取り除くかこれを減少させるように変化させることにより、タンパク質の発現を改善することができる。

【００３４】
いくつかの態様において、核酸配列、例えばmRNA配列中の制限酵素切断部位の存在は、核酸、例えばmRNAの転写および翻訳を阻害することにより、タンパク質発現を減少させる。制限酵素は、特異的配列において結合した後に核酸を切断するタンパク質である。これらの切断された核酸は、転写または翻訳のための好適な基質ではない可能性がある。いくつかの態様において、アミノ酸配列を変化させることなく、核酸配列を、制限酵素切断部位を取り除くように変化させることにより、タンパク質発現を改善することができる。

【００３５】
「同時に(concomitantly)」とは、2つ以上の材料/剤を、対象に、時間的に相関した様

式において、好ましくは免疫応答の修飾をもたらすために十分に相関した時間において、投与することを意味し、およびさらにより好ましくは、2つ以上の材料/剤は、組み合わせて投与される。態様において、同時投与は、特定された期間内、好ましくは1か月間以内、より好ましくは1週間以内、なおより好ましくは1日以内、およびさらにより好ましくは1時間以内の、2つ以上の材料/剤の投与を包含する。態様において、材料/剤は、繰り返して同時に投与してもよい；すなわち、1回より多くの機会における同時投与である。

【００３６】

「用量」とは、薬理学的に、および/または免疫学的に活性な材料の、所与の時間にわたる対象への投与のための、特定の量を指す。一般的に、本発明の方法および組成物における免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアの用量とは、免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアの量を指す。あるいは、用量は、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの用量に言及する場合には、所望される量の免疫抑制剤を提供する合成ナノキャリアの数に基づいて、投与することができる。用量が、繰り返しの投与に関して用いられる場合、用量とは、繰り返される用量の各々の量を指し、これらは、同じであっても異なっていてもよい。

【００３７】

「早期の疾患の発症」とは、疾患の発症の平均年齢よりも早いか、または疾患の発症が予測される年齢よりも早い年齢における、対象における疾患の発症を指す。いくつかの態様において、早期の疾患の発症は、小児期において起こる。早期の疾患の発症は、臨床家により決定され得る。

【００３８】

「カプセル化する」とは、物質の少なくとも一部を、合成ナノキャリア中に封入することを意味する。いくつかの態様において、物質は、合成ナノキャリア中に完全に封入される。他の態様において、カプセル化される物質のほとんどまたは全てが、合成ナノキャリアにとって外部である局所環境に暴露されない。他の態様において、50％、40％、30％、20％、10％または5％(重量/重量)以下が、局所環境に暴露される。カプセル化は、吸収とは区別し得る。吸収は、物質のほとんどまたは全てを合成ナノキャリアの表面上に配置し、物質を、合成ナノキャリアにとって外部である局所環境に暴露したままにする。

【００３９】

「発現制御配列」は、発現に影響を及ぼし得る任意の配列であって、プロモーター、エンハンサーおよびオペレーターを含み得る。提供される方法または組成物のいずれか1つの一態様において、発現制御配列は、プロモーターである。提供される方法または組成物のいずれか1つの一態様において、発現制御配列は、肝臓特異的プロモーターである。「肝臓特異的プロモーター」とは、肝臓の細胞において、排他的にまたは優先的に発現をもたらすものである。

【００４０】

「同一性」とは、一次元の配列アラインメントにおいて同一に配置されるアミノ酸または残基または核酸塩基のパーセンテージを意味する。同一性とは、比較されている配列がどれくらい近くに関連しているかの尺度である。一態様において、2つの配列の間の同一性は、BESTFITプログラムを用いて決定することができる。加えて、パーセント同一性はまた、NCBI(Bethesda, Maryland)により開発された、多様な公共で利用可能なソフトウェアツールを用いて計算することができ、これらは、インターネットを通して得ることができる(ftp:/ncbi.nlm.nih.gov/pub/)。例示的なツールとして、http://wwww.ncbi.nlm.nih.govにおいて利用可能なBLASTシステムが挙げられる。ペアワイズおよびClustalWアラインメント(BLOSUM30マトリックスセッティング)ならびにKyte-Doolittle疎水性親水性指標分析は、MacVector配列分析ソフトウェア(Oxford Molecular Group)を用いて得ることができる。前述の核酸のWatson-Crick相補物(全長の相補物を含む)もまた、本発明により包含される。「免疫抑制剤」とは、好ましくはAPC上でのその効果を通して、免疫寛容原性効果を引き起こし得る化合物を意味する。免疫寛容原性効果とは、一般に、全身性または局所的に、APCまたは他の免疫細胞による修飾であって、耐久的な様式において、抗原に

対する望ましくない免疫応答を減少させるか、これを阻害するか、またはこれを予防するものを指す。一態様において、免疫抑制剤は、APCに、1つ以上の免疫エフェクター細胞における制御性の表現型を促進させるものである。例えば、制御性の表現型は、抗原特異的CD4＋T細胞またはB細胞の産生、誘導、刺激または動員の阻害、抗原特異的抗体の産生の阻害、Treg細胞(例えばCD4＋CD25highFoxP3＋Treg細胞)の産生、誘導、刺激または動員などにより、特徴づけることができる。このことは、CD4＋T細胞またはB細胞の、制御性の表現型への変換の結果であり得る。このことはまた、CD8＋T細胞、マクロファージおよびiNKT細胞などの他の免疫細胞におけるFoxP3の誘導の結果であり得る。一態様において、免疫抑制剤は、APCが抗原をプロセッシングした後の、APCの応答に影響を及ぼすものである。別の態様において、免疫抑制剤は、抗原のプロセッシングを妨害しないものである。さらなる態様において、免疫抑制剤は、アポトーシスシグナル分子ではない。別の態様において、免疫抑制剤は、リン脂質ではない。

【００４１】

免疫抑制剤として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：スタチン；ラパマイシンまたはラパマイシンアナログ(すなわちラパログ)などのmTOR阻害剤；TGF-βシグナル伝達剤；TGF-β受容体アゴニスト；トリコスタチンAなどのヒストンデアセチラーゼ阻害剤；副腎皮質ステロイド；ロテノンなどのミトコンドリア機能の阻害剤；P38阻害剤；6Bio、デキサメタゾン、TCPA-1、IKK VIIなどのNF-κβ阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；ミソプロストールなどのプロスタグランジンE2アゴニスト(PGE2)；ロリプラムなどのホスホジエステラーゼ4阻害剤(PDE4)などのホスホジエステラーゼ阻害剤；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；G-タンパク質共役型(coupled)受容体アゴニスト；G-タンパク質共役型受容体アンタゴニスト；糖質コルチコイド；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体アクチベーター；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤；TGX-221などのPI3KB阻害剤；3-メチルアデニンなどのオートファジー阻害剤；アリール炭化水素受容体阻害剤；プロテアソーム阻害剤I(PSI)；およびP2X受容体遮断薬などの酸化型ATP。免疫抑制剤はまた、以下を含む：IDO、ビタミンD3、レチノイン酸、シクロスポリンAなどのシクロスポリン、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン(Aza)、6-メルカプトプリン(6-MP)、6-チオグアニン(6-TG)、FK506、サングリフェリンA、サルメテロール、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)、アスピリンおよび他のCOX阻害剤、ニフルミン酸、エストリオールおよびトリプトライド。他の例示的な免疫抑制剤として、限定されないが、以下が挙げられる：小分子薬、天然生成物、抗体(例えばCD20、CD3、CD4に対する抗体)、生物製剤(biologics)に基づく薬物、炭水化物に基づく薬物、RNAi、アンチセンス核酸、アプタマー、メトトレキサート、NSAID；フィンゴリモド；ナタリズマブ；アレムツズマブ；抗CD3；タクロリムス(FK506)、アバタセプト、ベラタセプトなど。「ラパログ」とは、本明細書において用いられる場合、ラパマイシン(シロリムス)に構造的に関連する分子(アナログ)を指す。ラパログの例として、限定することなく、テムシロリムス(CCI-779)、エベロリムス(RAD001)、リダフォロリムス(AP-23573)、およびゾタロリムス(ABT-578)が挙げられる。ラパログのさらなる例は、例えば、WO公開WO 1998/002441および米国特許第8,455,510号において見出すことができ、これらのラパログは、本明細書において参考として援用される。

【００４２】

免疫抑制剤は、APCに対して直接的に免疫寛容原性効果を提供する化合物であっても、または、それは、間接的に(すなわち、投与の後、何らかの方法において処理された後で)免疫寛容原性効果を提供する化合物であってもよい。さらなる免疫抑制剤は、は、当業者に公知であり、本発明は、この側面において限定されない。態様において、免疫抑制剤は、本明細書において提供される剤のいずれかを含んでいてもよい。

【００４３】

「ロード(load)」とは、合成ナノキャリアと連結する場合に、合成ナノキャリア全体に

おける材料の乾燥処方重量に基づいた、合成ナノキャリアへ連結した免疫抑制剤の量である(重量/重量)。一般に、かかるロードは、合成ナノキャリアの集合全体にわたる平均として計算される。一態様において、ロードは、合成ナノキャリア全体にわたる平均で、0.1%～99%である。別の態様において、ロードは、0.1%～50%である。別の態様において、ロードは、0.1%～20%である。さらなる態様において、ロードは、0.1%～10%である。なおさらなる態様において、ロードは、1%～10%である。なおさらなる態様において、ロードは、7%～20%である。さらに別の態様において、ロードは、合成ナノキャリアの集合全体にわたる平均で、少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも11%、少なくとも12%、少なくとも13%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも17%、少なくとも18%、少なくとも19%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%である。さらなる態様において、ロードは、合成ナノキャリアの集合全体にわたる平均で、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%または20%である。上の態様のうちのいくつかの態様において、ロードは、90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%である。さらなる態様において、ロード゛は、25%以下である。態様において、ロードは、例において記載され得るとおり、または当該分野において別段に公知であるように計算される。

【００４４】

「合成ナノキャリアの最大寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定されるナノキャリアの最大の寸法を意味する。「合成ナノキャリアの最小寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定される合成ナノキャリアの最小の寸法を意味する。例えば、球体の合成ナノキャリアについて、合成ナノキャリアの最大および最小寸法は、実質的に同一であり、その直径のサイズであろう。同様に、立方状の合成ナノキャリアについて、合成ナノキャリアの最小寸法は、その高さ、幅または長さのうちの最小のものであり、一方、合成ナノキャリアの最大寸法は、その高さ、幅または長さのうちの最大のものであろう。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいて、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法が、100nm以上である。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいて、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法が、5μm以下である。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいて、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%最小寸法が、110nmより大きい、より好ましくは120nmより大きい、より好ましくは130nmより大きい、より好ましくは150nmよりなお大きい。合成ナノキャリア最大および最小寸法のアスペクト比は、態様に依存して異なり得る。例えば、合成ナノキャリアの最小寸法に対する最大寸法のアスペクト比は、1:1～1,000,000:1、好ましくは1:1～100,000:1、より好ましくは1:1～10,000:1、より好ましくは1:1～1000:1、なおより好ましくは1:1～100:1、およびさらにより好ましくは1:1～10:1で異なり得る。

【００４５】

好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいて、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法が、3μm以下、より好ましくは2μm以下、より好ましくは1μm以下、より好ましくは800nm以下、より好ましくは600nm以下、およびより好ましくはなお500nm以下である。好

ましい態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいて、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法が、100nm以上、より好ましくは120nm以上、より好ましくは130nm以上、より好ましくは140nm以上、およびより好ましくはなお150nm以上である。合成ナノキャリアの寸法(例えば有効直径)の測定値は、いくつかの態様において、合成ナノキャリアを液体(通常は水性の)溶媒中で懸濁することにより、動的光散乱(DLS)を用いて(例えばBrookhaven ZetaPALS装置を用いて)、得ることができる。例えば、合成ナノキャリアの懸濁液を、水性バッファーから精製水中に希釈して、約0.01～0.1mg/mの最終的な合成ナノキャリア懸濁液濃度を達成することができる。希釈された懸濁液は、DLS分析のための好適なキュベットの内側で直接調製しても、またはこれに移してもよい。キュベットを、次いでDLS中に置き、制御された温度まで平衡化させ、次いで、溶媒の粘度および試料の屈折率について適切なインプットに基づいて安定かつ再現可能な分布を得るために十分な時間にわたりスキャンする。有効直径、または分布の平均を、次いで報告する。高アスペクト比の、または非球状の合成ナノキャリアの有効サイズを決定することは、より正確な測定値を得るために、電子顕微鏡法などの増加的な技術を必要とし得る。合成ナノキャリアの「寸法」または「サイズ」または「直径」とは、例えば動的光散乱を用いて得られた、粒子サイズ分布の平均を意味する。

【００４６】

「薬学的に受入可能な賦形剤」または「薬学的に受入可能なキャリア」とは、組成物を処方するために薬理学的に活性な材料と一緒に用いられる、薬理学的に不活性な材料を意味する。薬学的に受入可能な賦形剤として、これらに限定されないが、糖(例えばグルコース、ラクトースなど)、抗菌剤などの保存剤、再構成補助剤、着色料、食塩水(リン酸緩衝化食塩水など)、およびバッファーを含む、当該分野において公知の多様な材料が挙げられる。

【００４７】

「ポリヌクレオチド」または「核酸配列」または「核酸」は、本明細書において交換可能に用いられ、例えば、DNA、RNA(例えばmRNAなど)またはcDNAであってよい。本明細書において記載されるAAVベクターおよび導入遺伝子は、ポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、導入遺伝子、例えばOTCをコードする。

【００４８】

態様において、本発明の組成物は、全長の相補物、または本発明のポリペプチドのいずれかをコードする縮重物(degenerate)(遺伝子コードの縮重に起因するもの)などの相補物を含む。

【００４９】

また本明細書において提供されるのは、本発明のポリヌクレオチドのいずれかにハイブリダイズするポリヌクレオチドである。選択されたパーセント同一性の関連する核酸配列を同定するために、標準的な核酸ハイブリダイゼーションの手法を用いることができる。用語「ストリンジェントな条件」とは、本明細書において用いられる場合、当該分野においてよく知られるパラメーターを指す。かかるパラメーターとして、塩、温度、プローブの長さなどが挙げられる。結果として生じるハイブリダイゼーションの際の塩基ミスマッチの量は、ほぼ0%(「高ストリンジェンシー」)～約30%(「低ストリンジェンシー」)の範囲であってよい。高ストリンジェンシー条件の一例は、65℃でのハイブリダイゼーションバッファー(3.5×SSC、0.02%のFicoll、0.02%のポリビニルピロリドン、0.02%のウシ血清アルブミン、2.5mMのNaH_2PO_4(pH7)、0.5%のSDS、2mMのEDTA)中でのハイブリダイゼーションである。SSCは、0.15Mの塩化ナトリウム/0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7である；SDSは、ドデシル硫酸ナトリウムであり、EDTAは、エチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーションの後で、核酸をトランスファーしたメンブレンを、例えば2×SSC中で室温で洗浄し、次いで、0.1～0.5×SSC/0.1×SDS中で、68℃までの温度で洗浄する。

【００５０】

「反復用量」または「反復投与」または類似のものは、同じ材料の、それより前の用量または投与の後で対象に投与される、少なくとも1回のさらなる用量または投与を意味する。例えば、ウイルスベクターの反復用量は、同じ材料の先の用量の後の、ウイルスベクターの少なくとも１回のさらなる用量を意味する。材料は同じであってよいが、一方で、反復用量中の材料の量は、それより前の用量とは異なっていてもよい。例えば、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つの一態様において、反復用量中のイルスベクターの量は、それより前の用量のウイルスベクターの量よりも少なくてもよい。あるいは、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つの一態様において、反復用量は、それより前の用量中のウイルスベクターの量と少なくとも等しい量であってよい。反復用量は、先の用量の数週間後、数か月後または数年後に投与してもよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、反復用量または投与は、当該用量または投与の直前に起こる用量または投与量の、少なくとも1週間後に投与される。反復投与は、それが、対象に対して有益な効果をもたらす場合に、効果的であると考えられる。好ましくは、効果的な反復投与は、低下した免疫応答と組み合わせて、例えばウイルスベクターに対して、有益な効果をもたらす。

【００５１】

「低下した量」とは、例えば先の投与において、対象に投与されたか、または、本明細書において提供されるようなAAVベクターと免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとの同時投与が行われない場合に対象に対する投与のために選択されたであろう、当該治療剤の量よりも少ない、治療剤の用量を指す。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、方法は、本明細書において記載されるような治療剤の低下した量を選択するステップを含むか、これをさらに含んでもよい。「選択すること」とは、「選択させること」を含むことを意図される。「選択させること」とは、ある実体に、前述の低下した量を選択させること、前述の低下した量を選択するように衝動を起こさせること、前述の低下した量を選択するように奨励すること、前述の低下した量を選択することを補助すること、前述の低下した量を選択することを誘導もしくは指示すること、または当該実体と協調して前述の低下した量を選択するために行動することを意味する。

【００５２】

「対象」とは、ヒトおよび霊長類などの温血哺乳動物；鳥類；ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマおよびブタなどの家庭内飼育動物または農場の動物；マウス、ラットおよびモルモットなどの実験動物；魚類；爬虫類；動物園および野生の動物；などを含む、動物を意味する。本明細書において用いられる場合、対象は、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つを必要とするものであってよい。いくつかの態様において、対象は、UCD、例えばOTCdを有するか、またはこれを有することが疑われる。いくつかの態様において、対象は、UCD、例えばOTCdを発症するリスクがある。いくつかの態様において、対象は、小児または若年の対象であり、例えば、18歳未満、16歳未満、15歳未満、14歳未満、13歳未満、12歳未満、11歳未満、10歳未満、9歳未満、8歳未満、7歳未満、6歳未満、5歳未満、4歳未満、3歳未満、または2歳未満である。いくつかの態様において、対象は、1～10歳である。いくつかの態様において、対象は、成人の対象である。

【００５３】

「合成ナノキャリア」は、天然には存在しない離散物体であって、サイズが5マイクロン以下である少なくとも1つの寸法を有するものを指す。アルブミンナノ粒子が、一般に、合成ナノキャリアとして挙げられる；しかし、ある態様において、合成ナノキャリアは、アルブミンナノ粒子を含まない。態様において、合成ナノキャリアは、キトサンを含まない。他の態様において、合成ナノキャリアは、脂質ベースのナノ粒子ではない。さらなる態様において、合成ナノキャリアは、リン脂質を含まない。

【００５４】

合成ナノキャリアは、これらに限定されないが、1つまたは複数の脂質ベースのナノ粒子(本明細書においてまた、脂質ナノ粒子、すなわち、それらの構造を構成する材料の大部分が脂質であるナノ粒子として言及される)、ポリマー性ナノ粒子、金属ナノ粒子、界

面活性剤ベースのエマルジョン、デンドリマー、バッキーボール、ナノワイヤー、ウイルス様粒子(すなわち、ウイルスの構造タンパク質から主に構成されるが、感染性ではないか、低い感染性を有する粒子)、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子(本明細書においてまた、タンパク質粒子、すなわち、それらの構造を構成する材料の大部分がペプチドまたはタンパク質である粒子として言及される)(アルブミンナノ粒子など)、および/または脂質-ポリマーナノ粒子などのナノ材料の組み合わせを用いて開発されたナノ粒子であってよい。合成ナノキャリアは、多様な異なる形状であってよく、これは、これらに限定されないが、球状、立方状、錐体状、長方形、円柱状、環状などを含む。本発明による合成ナノキャリアは、1つ以上の表面を含む。本発明の実施における使用のために適応させることができる例示的な合成ナノキャリアは、以下を含む：(1)Grefらに対する米国特許第5,543,158号において開示される生分解性ナノ粒子、(2)Saltzmanらに対する公開された米国特許出願20060002852のポリマー性ナノ粒子、(3)DeSimoneらに対する公開された米国特許出願20090028910のリソグラフィー構築されたナノ粒子、(4)von Andrianらに対するWO2009/051837の開示、(5)Penadesらに対する公開された米国特許出願2008/0145441において開示されるナノ粒子、(6)de los Riosらに対する公開された米国特許出願20090226525において開示されるタンパク質ナノ粒子、(7)Sebbelらに対する公開された米国特許出願20060222652において開示されるウイルス様粒子、(8)Bachmannらに対する公開された米国特許出願20060251677において開示されるウイルス様粒子に結合した核酸、(9)WO2010047839A1もしくはWO2009106999A2において開示されるウイルス様粒子、(10)P. Paolicelliら、「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」、Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)において開示されるナノ沈殿ナノ粒子、(11)米国公開2002/0086049において開示されるアポトーシス細胞、アポトーシス体、または合成もしくは半合成の模倣物、あるいは(12)Lookら、「Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice」、J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)のもの。

【００５５】

約１００ｎｍ以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明による合成ナノキャリアは、補体を活性化するヒドロキシル基を有する表面を含まないか、または代替的に、補体を活性化するヒドロキシル基ではない部分から本質的になる表面を含む。好ましい態様において、約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明による合成ナノキャリアは、補体を実質的に活性化する表面を含まないか、または代替的に、補体を実質的に活性化しない部分から本質的になる表面を含む。より好ましい態様において、約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明による合成ナノキャリアは、補体を活性化する表面を含まないか、または代替的に、補体を活性化しない部分から本質的になる表面を含む。態様において、合成ナノキャリアは、ウイルス様粒子を除外する。態様において、合成ナノキャリアは、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7より大きいか、または1:10より大きいアスペクト比を有していてもよい。

【００５６】

「尿素サイクル異常症」とは、それにより尿素サイクルの酵素の欠損が存在する、任意の障害または欠損を指す。一般に、このことは、対象においてかかる欠損をもたらす変異により引き起こされる。したがって、「尿素サイクル異常症に関連する酵素」は、対象において障害をもたらす欠損が存在する酵素である。

【００５７】

「ウイルスベクター」とは、キャプシドおよび/またはコートタンパク質などのウイルスの成分を有するベクターコンストラクトであって、治療用タンパク質などの治療剤をコードする導入遺伝子または核酸材料を含みこれを送達するように適応させたものを意味し、この導入遺伝子または核酸材料は、本明細書において提供されるように発現させることができる。「発現された」または「発現」などは、導入遺伝子または核酸材料が細胞中に形質導入され、形質導入された細胞によりプロセッシングされた後の、機能的な(すなわち、所望される目的のために生理学的に活性である)生成物の合成を指す。かかる生成物

はまた、本明細書において「発現生成物」として言及される。ウイルスベクターは、限定することなく、AAV8などのアデノ随伴ウイルスをベースにしていてもよい。したがって、本明細書において提供されるAAVベクターは、AAV8などのAAVをベースにしたウイルスベクターであり、キャプシドおよび/またはコートタンパク質などのウイルスの成分を有し、それらから、導入遺伝子または核酸材料の送達のためにパッケージングをすることができる。

【００５８】

Ｃ．本発明の方法における使用のための組成物

上述のとおり、臓器のアベイラビリティーおよび生涯にわたる免疫抑制処置により限定される侵襲的手技である肝臓移植を別として、最も一般的なUCD、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症(OTCd)のための根治的な処置は存在しない。加えて、また上述のとおり、ウイルスベクターに対する体液性および細胞性免疫応答などの免疫応答は、その効力に対して有害な影響を及ぼし得、また再投与を妨害し得る。重要なことに、本明細書において提供される方法および組成物は、OTCの強力な発現を達成すること、および/またはOTC(例えばコドン最適化された配列によりコードされたもの)をコードするウイルスベクターに対する免疫応答を低下させることにより、前述の障害を克服することが見出された。

【００５９】

導入遺伝子

例えば本明細書において提供されるウイルスベクターの、導入遺伝子または核酸材料は、例えば疾患または障害を有する対象にとって有益である、任意のタンパク質またはその部分をコードし得る。一般に、対象は、当該タンパク質の対象の内在型バージョンが、欠損しているか、または限定された量で生産されるか、もしくは全く生産されない、疾患または障害を有するか、またはこれを有することが疑われる。対象は、本明細書において提供されるような疾患または障害のうちのいずれか1つを有するものであってよく、導入遺伝子または核酸材料は、本明細書において提供されるような治療用タンパク質またはその部分のうちのいずれか1つをコードするものである。いくつかの態様において、導入遺伝子は、コドン最適化されていてもよい。本明細書において提供される導入遺伝子または核酸材料は、対象におけるその内在型バージョンにおける何らかの欠損(内在型バージョンの発現における欠損を含む)を通して、対象において疾患または障害をもたらす、任意のタンパク質の機能的バージョンをコードしていてもよい。かかる疾患または障害の例として、これらに限定されないが、オルニチントランスカルバミラーゼシンテターゼ欠損症(OTCd)などの尿素サイクル酵素の欠損が挙げられる。つまり、導入遺伝子または核酸材料によりコードされる治療用タンパク質は、オルニチントランスカルバミラーゼシンテターゼ(OTC)を含むということになる。

【００６０】

導入遺伝子または核酸材料の配列もまた、発現制御配列を含んでいてもよい。発現制御配列は、プロモーター、エンハンサーおよびオペレーターを含み、一般に、発現コンストラクトがその中で利用されるべき発現系に基づいて選択される。いくつかの態様において、プロモーターおよびエンハンサーの配列は、遺伝子発現を増大させる能力のために選択され、一方、オペレーター配列は、遺伝子発現を制御する能力のために選択され得る。導入遺伝子はまた、宿主細胞における相同組み換えを亢進し、および好ましくは促進する配列を含んでもよい。導入遺伝子はまた、宿主細胞における複製のために必要とされる配列を含んでもよい。

【００６１】

例示的な発現制御配列は、肝臓特異的プロモーター配列、例えば本明細書において提供され得る任意のものを含む。一般に、プロモーターは、所望される発現生成物をコードする配列の上流(すなわち5')に動作可能なように繋げられる(operatively linked)。導入遺伝子はまた、コード配列の下流(すなわち3')に作動可能に繋げられた(operably linked)好適なポリアデニル化配列を含んでもよい。

【００６２】

本開示により企図される例示的な導入遺伝子配列は、例のセクションの後で表１において表される。いくつかの態様において、導入遺伝子配列は、表１における核酸配列のうちの1つ以上に対して同一であってもよい。導入遺伝子配列は、いくつかの態様において、本明細書において提供されるようなCO3またはCO21のものである。

【００６３】

いくつかの態様において、導入遺伝子配列は、配列番号1～13(表1)の核酸配列のうちのいずれか1つに対して、少なくとも60％、少なくとも65％、少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％同一な核酸配列である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、部分的に、本発明の態様として企図される。いくつかの態様において、導入遺伝子配列は、本明細書において提供される導入遺伝子配列のうちの1つ以上、例えばCO3またはCO21のものに対して、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％同一である。

【００６４】

いくつかの態様において、導入遺伝子配列は、表１におけるアミノ酸配列、例えば配列番号14～25のうちの1つ以上に対して同一であるポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、導入遺伝子配列は、配列番号14～25(表1)のアミノ酸配列のうちのいずれか1つに対して、少なくとも60％、少なくとも65％、少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％の同一であるアミノ酸配列をコードする。

本明細書において提供される配列のうちのいずれか1つを含む核酸、またはOTCをコードするその部分が、一側面において提供される。かかる核酸の組成物もまた、提供される。

【００６５】

ウイルスベクター

ウイルスは、それらが感染する細胞内でそれらのゲノムを輸送するための特化した機構を進化させてきた；かかるウイルスをベースにしたウイルスベクターは、特定の用途のために細胞に形質導入するために適合させることができる。本明細書において提供されるように用いることができるウイルスベクターの例は、当該分野において公知であるか、本明細書において記載される。好適なウイルスベクターとして、例えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベースのベクターが挙げられる。

【００６６】

本明細書において提供されるウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)をベースにしていてもよい。AAVベクターは、治療的適用、例えば本明細書において記載されるものにおける使用のために、特に着目されてきた。AAVは、ヒトの疾患を引き起こすことは知られていないDNAウイルスである。一般に、AAVは、効率的な複製のために、ヘルパーウイルスによる共感染(例えばアデノウィルスまたはヘルパーウイルス)、またはヘルパー遺伝子の発現を必要とする。AAVベースのベクターの説明については、例えば米国特許第8,679,837号、同第8,637,255号、同第8,409,842号、同第7,803,622号、および同第7,790,449号、ならびに米国公開番号20150065562、20140155469、20140037585、20130096182、20120100606および20070036757を参照。AAVベクターは、組み換えAAVベクターであってもよい。AAVベクターはまた、例えば米国特許公開2007/01110724および2004/0029106ならびに米国特許第7,465,583号および同第7,186,699号において記載される自己相補的(sc)AAVベクターであってよい。

【００６７】

ウイルスベクターがベースとしているアデノ随伴ウイルスは、AAV8などの特定の血清型のものであってよい。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様においては、したがって、AAVベクターは、AAV8ベクターである。

【００６８】

免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア

本明細書において提供されるウイルスベクターは、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア

と組み合わせて投与することができる。一般に、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアの構造を構成する材料に加える要素である。例えば、合成ナノキャリアが1つ以上のポリマーからなる一態様において、免疫抑制剤は、1つ以上のポリマーに加える化合物であり、いくつかの態様においては、これに接着している化合物である。合成ナノキャリアの材料がまた免疫寛容原性効果をもたらす態様において、免疫抑制剤は、免疫寛容原性効果をもたらす合成ナノキャリアの材料に加えて存在する要素である。

【００６９】

広範な他の合成ナノキャリアは、発明により、いくつかの態様においては免疫抑制剤へ連結させて、用いることができる。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、球体または球状体である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、扁平または板状である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、立方体または立方状である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、卵円または楕円である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、円柱、錐状体、錐体である。

【００７０】

いくつかの態様において、各々の合成ナノキャリアが、類似の特性を有するように、サイズまたは形状に関して相対的に均一である合成ナノキャリアの集合を用いることが望ましい。例えば、合成ナノキャリアの合計数に基づいて、提供される組成物または方法のいずれか1つの合成ナノキャリアの少なくとも80％、少なくとも90％、または少なくとも95％は、合成ナノキャリアの平均直径または平均寸法の5％、10％、または20％内に該当する最小寸法または最大寸法を有していてもよい。

【００７１】

合成ナノキャリアは、中実(solid)であっても中空(hollow)であってもよく、1つ以上の層を含んでいてもよい。いくつかの態様において、各々の層は、他の層と比較して特有の組成物および特有の特性を有する。一例ではあるが、合成ナノキャリアは、コア/シェル構造を有していてもよく、ここで、コアは、1つの層(例えばポリマー性のコア)であり、シェルは、第2の層(例えば脂質二重層または単層)である。合成ナノキャリアは、複数の異なる層を含んでいてもよい。

【００７２】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の脂質を含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、リポソームを含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質二重層を含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質単層を含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、ミセルを含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質層(例えば脂質二重層、脂質単層など)に取り囲まれた、ポリマー性マトリックスを含むコアを含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質層(例えば脂質二重層、脂質単層など)に取り囲まれた非ポリマー性のコア(例えば金属粒子、量子ドット、セラミック粒子、骨粒子、ウイルス粒子、タンパク質、核酸、炭水化物など)を含んでもよい。

【００７３】

他の態様において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子などを含んでもよい。いくつかの態様において、非ポリマー性の合成ナノキャリアは、非ポリマー性の構成成分の凝集体、例えば金属原子(例えば金原子)の凝集体である。

【００７４】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の両親媒性の実体を含んでもよい。いくつかの態様において、両親媒性の実体は、安定性の増大、均一性の改善、または粘度の増大により、合成ナノキャリアの生成を促進することができる。いくつかの態様において、両親媒性の実体は、脂質膜(例えば脂質二重層、脂質単層など)の内部表面と関連していてもよい。当該分野において公知の多くの両親媒性の実体は、本発明による合成ナノキャリアを作製することにおける使用のために好適である。かかる両親媒性の実体として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：ホスホグリセリド；ホスフ

ァチジルコリン；ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)；ジオレイルホスファチジルエタノールアミンアミン(DOPE)；ジオレイルオキシプロピルトリエチルアンモニウム(DOTMA)；ジオレオイルホスファチジルコリン；コレステロール；コレステロールエステル；ジアシルグリセロール；コハク酸ジアシルグリセロール；ジホスファチジルグリセロール(DPPG)；ヘキサンデカノール；ポリエチレングリコール(PEG)などの脂肪アルコール；ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル；パルミチン酸またはオレイン酸などの界面活性脂肪酸；脂肪酸；脂肪酸モノグリセリド；脂肪酸ジグリセリド；脂肪酸アミド；ソルビタントリオレエート(Span(登録商標)85)グリココール酸；ソルビタンモノラウレート(Span(登録商標)20)；ポリソルベート20(Tween(登録商標)20)；ポリソルベート60(Tween(登録商標)60)；ポリソルベート65(Tween(登録商標)65)；ポリソルベート80(Tween(登録商標)80)；ポリソルベート85(Tween(登録商標)85)；ポリオキシエチレンモノステアレート；サーファクチン；ポロキサマー；ソルビタントリオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル；レシチン；リゾレシチン；ホスファチジルセリン；ホスファチジルイノシトール；スフィンゴミエリン；ホスファチジルエタノールアミン(セファリン)；カルジオリピン；ホスファチジン酸；セレブロシド；ジセチルホスフェート；ジパルミトイルホスファチジルグリセロール；ステアリルアミン；ドデシルアミン；ヘキサデシル-アミン；パルミチン酸アセチル；リシノール酸グリセロール；ステアリン酸ヘキサデシル ；ミリスチン酸イソプロピル；チロキサポール；ポリ(エチレングリコール)5000-ホスファチジルエタノールアミン；ポリ(エチレングリコール)400-モノステアレート；リン脂質；高界面活性特性を有する合成および/または天然の洗剤；デオキシコレート；シクロデキストリン；カオトロピック塩；イオン対形成剤；およびこれらの組み合わせ。両親媒性の実体の構成成分は、様々な両親媒性の実体の混合物であってもよい。当業者は、これが、例示的であるが網羅的ではない、界面活性を有する物質のリストであることを理解するであろう。本発明により用いられるべき合成ナノキャリアの生成において、任意の両親媒性の実体を用いることができる。

【００７５】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の炭水化物を含んでもよい。炭水化物は、天然であっても合成であってもよい。炭水化物は、誘導体化された天然の炭水化物であってもよい。ある態様において、炭水化物は、単糖または二糖を含み、これは、これらに限定されないが、グルコース、フルクトース、ガラクトース、リボース、ラクトース、スクロース、マルトース、トレハロース、セロビオース、マンノース、キシロース、アラビノース、グルクロン酸、ガラクツロン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、およびノイラミン酸を含む。ある態様において、炭水化物は、多糖であり、これは、これらに限定されないが、プルラン、セルロース、微結晶性セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシセルロース(HC)、メチルセルロース(MC)、デキストラン、シクロデキストラン、グリコーゲン、ヒドロキシエチルデンプン、カラギーナン、グリコン(glycon)、アミロース、キトサン、N,O-カルボキシメチルキトサン、アルギン(algin)およびアルギン酸(alginic acid)、デンプン、キチン、イヌリン、コンニャク、グルコマンナン、プスツラン、ヘパリン、ヒアルロン酸、カードランおよびキサンタンを含む。態様において、合成ナノキャリアは、多糖などの炭水化物を含まない(または特にこれを除外する)。ある態様において、炭水化物は、糖アルコールなどの炭水化物誘導体を含んでもよく、これは、これらに限定されないが、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、およびラクチトールを含む。

【００７６】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、1つ以上のポリマーを含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端化されたプルロニック(登録商標)ポリマーである1つ以上のポリマーを含む。いくつかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、

90％、95％、97％、または99％(重量/重量)は、非メトキシ末端化されたプルロニック(登録商標)ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーのすべてが、非メトキシ末端化されたプルロニック(登録商標)ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端化ポリマーである1つ以上のポリマーを含む。いくつかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの少なくとも1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、または99％(重量/重量)は、非メトキシ末端化ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーのすべては、非メトキシ末端化ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、プルロニック(登録商標)ポリマーを含まない1つ以上のポリマーを含む。いくつかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの少なくとも1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、または99％(重量/重量)は、プルロニック(登録商標)ポリマーを含まない。いくつかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーのすべてが、プルロニック(登録商標)ポリマーを含まない。いくつかの態様において、かかるポリマーは、コーティング層(例えばリポソーム、脂質単層、ミセルなど)により取り囲まれていてもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアの要素は、ポリマーに接着していてもよい。

【００７７】

免疫抑制剤は、多数の方法のいずれかにより合成ナノキャリアに連結させることができる。一般に、接着は、免疫抑制剤と合成ナノキャリアとの間に結合の結果であってよい。この結合は免疫抑制剤が合成ナノキャリアの表面に接着していること、および/または合成ナノキャリア内に含まれている(カプセル化されている)ことの結果であってよい。いくつかの態様において、しかし、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアへの結合ではなく、むしろ合成ナノキャリアの構造の結果として、合成ナノキャリアによりカプセル化される。好ましい態様において、合成ナノキャリアは、本明細書において提供されるようなポリマーを含み、免疫抑制剤は、当該ポリマーに接着している。

【００７８】

接着が、免疫抑制剤と合成ナノキャリアとの間の結合の結果として生じる場合、接着は、連結部分を介して起こりえる。連結部分は、それを通して免疫抑制剤が合成ナノキャリアに結合する、任意の部分であってよい。連結部分は、任意の部分であってよい。かかる部分は、アミド結合またはエステル結合などの共有結合、ならびに、免疫抑制剤を合成ナノキャリアに(共有的または非共有的に)結合させる別の分子を含む。かかる分子は、リンカーまたはポリマーまたはこれらの単位を含む。例えば、連結部分は、免疫抑制剤が静電的に結合する、荷電したポリマーを含んでもよい。別の例として、連結部分は、それが共有結合するポリマーまたはその単位を含んでもよい。

【００７９】

好ましい態様において、合成ナノキャリアは、本明細書において提供されるようなポリマーを含む。これらの合成ナノキャリアは、完全にポリマー性であっても、または、これらは、ポリマーと他の材料との混合物であってもよい。

【００８０】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアのポリマーは、会合してポリマー性マトリックスを形成する。これらの態様のうちのいくつかにおいて、免疫抑制剤などの構成成分は、ポリマー性マトリックスの1つ以上のポリマーと共有的に会合していてもよい。いくつかの態様において、共有的会合は、リンカーにより媒介される。いくつかの態様において、構成成分は、ポリマー性マトリックスの1つ以上のポリマーと非共有的に会合していてもよい。例えば、いくつかの態様において、構成成分は、ポリマー性マトリックス内にカプセル化されていても、ポリマー性マトリックスにより囲まれていても、および/またはポリマー性マトリックス全体に分散していてもよい。あるいはまたは加えて、構成成分は、疎水性相互作用、電荷相互作用、ファンデルワールス力などにより、ポリマー性マト

リックスの1つ以上のポリマーと会合していてもよい。それらからポリマー性マトリックスを形成するための広範なポリマーおよび方法が、従来公知である。

【００８１】

ポリマーは、天然のポリマーであっても、非天然(合成)のポリマーであってもよい。ポリマーは、ホモポリマーであっても、2つ以上のモノマーを含むコポリマーであってもよい。配列に関して、コポリマーは、ランダム、ブロックであっても、または、ランダム配列とブロック配列との組み合わせを含んでもよい。典型的には、本発明によるポリマーは、有機ポリマーである。

【００８２】

いくつかの態様において、ポリマーは、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミド、またはポリエーテル、またはこれらの単位を含む。他の態様において、ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、またはポリカプロラクトン、またはこれらの単位を含む。いくつかの態様においては、ポリマーが生分解性であることが好ましい。したがって、これらの態様においては、ポリマーがポリ(エチレングリコール)またはポリプロピレングリコールなどのポリエーテルまたはこれらの単位を含む場合、ポリマーが生分解性となるように、ポリマーは、ポリエーテルと生分解性ポリマーとのブロック-コ-ポリマーを含むことが好ましい。他の態様において、ポリマーは、ポリエーテルまたはその単位、例えばポリ(エチレングリコール)またはポリプロピレングリコールまたはその単位を、それのみでは含まない。

【００８３】

本発明における使用のために好適なポリマーの他の例として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：ポリエチレン、ポリカーボネート(例えばポリ(1,3-ジオキサン-2オン))、ポリ無水物(例えばポリ(セバシン酸無水物))、ポリプロピルフマレート、ポリアミド(例えばポリカプロラクタム)、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル(例えばポリラクチド、ポリグリコリド、ポリラクチド-コ-グリコリド、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酸(例えばポリ(β-ヒドロキシアルカノエート)))、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリ尿素、ポリスチレンおよびポリアミン、ポリリジン、ポリリジン-PEGコポリマー、ならびにポリ(エチレンイミン)、ポリ(エチレンイミン)-PEGコポリマー。

【００８４】

いくつかの態様において、本発明によるポリマーは米国食品医薬品局(FDA)により21 C.F.R.§177.2600下において、ヒトにおける使用について承認されているポリマーを含み、これは、これらに限定されないが、ポリエステル(例えばポリ乳酸、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリ(1,3-ジオキサン-2オン))；ポリ無水物(例えばポリ(セバシン酸無水物))；ポリエーテル(例えばポリエチレングリコール)；ポリウレタン；ポリメタクリレート；ポリアクリレート；およびポリシアノアクリレートを含む。

【００８５】

いくつかの態様において、ポリマーは、親水性であってよい。例えば、ポリマーは、アニオン性の基(例えばリン酸基、硫酸基、カルボン酸基)；カチオン性の基(例えば四級アミン基)；または極性基(例えばヒドロキシル基、チオール基、アミン基)を含んでもよい。いくつかの態様において、親水性ポリマー性マトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に親水性の環境を生じる。いくつかの態様において、ポリマーは、疎水性であってよい。いくつかの態様において、疎水性ポリマー性マトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に疎水性の環境を生じる。ポリマーの親水性または疎水性の選択は、合成ナノキャリア内に組み込まれる材料の性質に影響を有し得る。

【００８６】

いくつかの態様において、ポリマーは、1つ以上の部分および/または官能基により修飾

されていてもよい。多様な部分または官能基を、本発明により用いることができる。いくつかの態様において、ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)により、炭水化物により、および/または多糖から誘導されるアクリル性ポリアセタールにより修飾してもよい(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301)。ある態様は、Grefらに対する米国特許第5543158号、またはvon Andrianらに対するWO公開WO2009/051837の一般的教示を用いて行ってもよい。

【００８７】

いくつかの態様において、ポリマーは、脂質または脂肪酸基により修飾されていてもよい。いくつかの態様において、脂肪酸基は、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、またはリグノセリン酸のうちの1つ以上であってよい。いくつかの態様において、脂肪酸基は、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、アルファ-リノール酸、ガンマ-リノール酸、アラキドン酸、ガドレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、またはエルカ酸のうちの1つ以上であってよい。

【００８８】

いくつかの態様において、ポリマーは、ポリエステルであってよく、これは、乳酸およびグリコール酸の単位を含むコポリマー、例えば、本明細書において集合的に「PLGA」として言及されるポリ(乳酸-コ-グリコール酸)およびポリ(ラクチド-コ-グリコリド)；ならびに本明細書において「PGA」として言及されるグリコール酸単位を含むホモポリマー、および本明細書において集合的に「PLA」として言及される乳酸単位を含むホモポリマー、例えばポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D,L-乳酸、ポリ-L-ラクチド、ポリ-D-ラクチド、およびポリ-D,L-ラクチドを含む。いくつかの態様において、例示的なポリエステルとして、例えば、ポリヒドロキシ酸；PEGコポリマーおよびラクチドとグリコリドとのコポリマー(例えばPLA-PEGコポリマー、PGA-PEGコポリマー、PLGA-PEGコポリマー)およびこれらの誘導体が挙げられる。いくつかの態様において、ポリエステルとして、例えば、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(カプロラクトン)-PEGコポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-L-リジン)、ポリ(セリンエステル)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)、ポリ[α-(4-アミノブチル)-L-グリコール酸]、およびこれらの誘導体が挙げられる。

【００８９】

いくつかの態様において、ポリマーは、PLGAであってよい。PLGAは、生体適合性かつ生分解性の乳酸とグリコール酸とのコポリマーであり、PLGAの多様な形態は、乳酸：グリコール酸の比により特徴づけられる。乳酸は、L-乳酸、D-乳酸、またはD,L-乳酸であってよい。PLGAの分解速度は、乳酸:グリコール酸比を変更することにより調整することができる。いくつかの態様において、本発明により用いられるべきPLGAは、約85:15、約75:25、約60:40、約50:50、約40:60、約25:75または約15:85の乳酸:グリコール酸比により特徴づけられる。

【００９０】

いくつかの態様において、ポリマーは、1つ以上のアクリル性ポリマーであってよい。ある態様において、アクリルポリマーとして、例えば、以下が挙げられる：アクリル酸およびメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、メタクリル酸アルキルアミドコポリマー、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(メタクリル酸無水物)、メチルメタクリレート、ポリメタクリレート、ポリ(メチルメタクリレート)コポリマー、ポリアクリルアミド、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、グリシジルメタクリレートコポリマー、ポリシアノアクリレート、および前述のポリマーのうちの1つ以上を含む組み合わせ。アクリル性ポリマーは、低含有量の四級アンモニウム基を有する、アクリル酸およびメタクリル酸のエステルの完全に重合したコポリマーを含んでもよい。

【００９１】

いくつかの態様において、ポリマーは、カチオン性ポリマーであってよい。一般的に、

カチオン性ポリマーは、負に荷電した核酸の鎖を凝縮および/または保護することができる。ポリ(リジン)(Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; and Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7)、ポリ(エチレンイミン)(PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297)、およびポリ(アミドアミン)デンドリマー(Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897；Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703；およびHaensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)などのアミン含有ポリマーは、生理学的pHにおいて正に荷電し、核酸とイオン対を形成する。態様において、合成ナノキャリアは、カチオン性ポリマーを含まなくともよい(またはこれを除外してもよい)。

【００９２】

いくつかの態様において、ポリマーは、カチオン性の側鎖を有する分解性ポリエステルであってよい(Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658；Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010；Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250；Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633；およびZhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399)。これらのポリエステルの例として、ポリ(L-ラクチド-コ-L-リジン)(Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010)、ポリ(セリンエステル)(Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)(Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; and Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)、およびポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)(Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658；およびLim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)が挙げられる。

【００９３】

これらのおよび他のポリマーの特性およびそれらを調製するための方法は、当該分野において周知である(例えば、米国特許第6,123,727号；同第5,804,178号；同第5,770,417号；同第5,736,372号；同第5,716,404号；同第6,095,148号；同第5,837,752号；同第5,902,599号；同第5,696,175号；同第5,514,378号；同第5,512,600号；同第5,399,665号；同第5,019,379号；同第5,010,167号；同第4,806,621号；同第4,638,045号；および同第4,946,929号；Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480； Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460；Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94；Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7；ならびにUhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181を参照)。より一般的には、好適なポリマーを合成するための多様な方法は、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Goethals編、Pergamon Press、1980年；Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons、第四版、2004年；AllcockらによるContemporary Polymer Chemistry、Prentice-Hall、1981年；Deming et al., 1997, Nature, 390:386において；ならびに米国特許第6,506,577号、同第6,632,922号、同第6,686,446号、および同第6,818,732号において記載される。

【００９４】

いくつかの態様において、ポリマーは、直鎖状または分枝状ポリマーであってよい。いくつかの態様において、ポリマーは、デンドリマーであってよい。いくつかの態様において、ポリマーは、互いに実質的に架橋されていてもよい。いくつかの態様において、ポリマーは、実質的に架橋を含まなくともよい。いくつかの態様において、ポリマーは、架橋のステップを経験することなく、本発明により用いることができる。さらに、合成ナノキャリアが、前述のおよび他のポリマーのうちのいずれかのブロックコポリマー、グラフトコポリマー、ブレンド、混合物、および/または付加物を含んでもよいことが、理解されるべきである。当業者は、本明細書において列記されるポリマーが、例示的ではあるが網羅的ではない、本発明により使用することができるポリマーのリストを表すことを理解するであろう。

【００９５】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、ポリマー性構成成分を含まない。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子など

を含んでもよい。いくつかの態様において、非ポリマー性合成ナノキャリアは、非ポリマー性構成成分の凝集体、例えば金属原子(例えば金原子)の凝集体である。

【００９６】

本明細書において提供されるような任意の免疫抑制剤を、いくつかの態様において、合成ナノキャリアと連結させることができる。免疫抑制剤として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：スタチン、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログ(ラパログ)などのmTOR阻害剤；TGF-βシグナル伝達剤；TGFβ受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤；副腎皮質ステロイド；ロテノンなどのミトコンドリア機能の阻害剤；P38阻害剤；NF-κβ阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；プロスタグランジンE2アゴニスト；ホスホジエステラーゼ4阻害剤などのホスホジエステラーゼ阻害剤；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；G-タンパク質共役型受容体アゴニスト；G-タンパク質共役型受容体アンタゴニスト；糖質コルチコイド；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体アクチベーター；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤および酸化型ATP。免疫抑制剤はまた、IDO、ビタミンD3、シクロスポリンA、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アスピリン、ニフルミン酸、エストリオール、トリプトライド、インターロイキン(例えばIL-1、IL-10)、シクロスポリンA、サイトカインを標的とするsiRNA、またはサイトカイン受容体などを含む。

【００９７】

mTOR阻害剤の例として、ラパマイシンおよびそのアナログ(例えばCCL-779、RAD001、AP23573、C20-メタリルラパマイシン(C20-Marap)、C16-(S)-ブチルスルホンアミドラパマイシン(C16-BSrap)、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン(C16-iRap)(Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107))、AZD8055、BEZ235(NVP-BEZ235)、クリソファン酸(クリソファノール)、デフォロリムス(MK-8669)、エベロリムス(RAD0001)、KU-0063794、PI-103、PP242、テムシロリムス、およびWYE-354(Selleck, Houston, TX, USAから入手可能)が挙げられる。

【００９８】

発明による組成物は、保存剤、バッファー、食塩水、リン酸緩衝化食塩水などの薬学的に受入可能な賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態に到達するために、従来の製薬および配合技術を用いて製造することができる。一態様において、組成物は、注射のために、保存剤と一緒に、無菌食塩水中に懸濁される。

【００９９】

Ｄ．組成物を使用および製造する方法、ならびに関連する方法

ウイルスベクターは、当業者に公知であるか、本明細書において別段に記載されるような方法により作製することができる。例えば、ウイルスベクターは、例えば、米国特許第4,797,368およびLaughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983)において記載される方法を用いて、構築および/または精製することができる。

【０１００】

AAVベクターは、組み換え方法を用いて生成することができる。典型的には、方法は、AAVキャプシドタンパク質またはそのフラグメント；機能的なrep遺伝子；AAV逆位末端反復配列(ITR)および導入遺伝子を含む組み換えAAVベクター；ならびに組み換えAAVベクターのAAVキャプシドタンパク質へのパッケージングを可能にするための十分なヘルパー機能をコードする核酸配列を含む宿主細胞を培養することを含む。いくつかの態様において、ウイルスベクターは、AAV8などのAAV血清型の逆位末端反復配列(ITR)を含んでもよい。

【０１０１】

rAAVベクターをAAVキャプシド中でパッケージングするために宿主細胞中で培養されるべき構成成分は、宿主細胞に、トランスで(in trans)提供してもよい。あるいは、必要とされる構成成分(例えば組み換えAAVベクター、rep、cap配列、および/またはヘルパー機能)のうちのいずれか1つ以上を、当業者に公知の方法を用いて、必要とされる構成成分の

うちの1つ以上を含むように操作された安定な宿主細胞により提供させてもよい。最も好適には、かかる安定な宿主細胞は、必要とされる構成成分を、誘導性プロモーターの制御下に含んでもよい。しかし、必要とされる構成成分は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。本発明のrAAVを生成するために必要とされる組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列、およびヘルパー機能は、任意の適切な遺伝子エレメントを用いて、宿主細胞中に送達してパッケージングすることができる。選択される遺伝子エレメントは、本明細書において記載されるものを含む任意の好適な方法により送達することができる。本発明の任意の態様 を構築するために用いられる方法は、核酸操作の分野における当業者に公知であり、遺伝子工学、組み換え工学、および合成技術を含む。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Yを参照。同様に、rAAVビリオンを作製する方法は、周知であり、好適な方法の選択肢は、本発明の限定要因ではない。例えば、K. Fisher et al, J. Virol., 70:520-532 (1993)および米国特許第5,478,745号を参照。

【０１０２】

いくつかの態様において、組み換えAAVベクターは、三重遺伝子導入方法(例えば米国特許第6,001,650号において詳細に記載されるようなもの；三重遺伝子導入方法に関するその内容は、本明細書において参考として援用される)を用いて生成することができる。典型的には、組み換えAAVは、宿主細胞を、組み換えAAVベクター(導入遺伝子を含むもの)で遺伝子導入して、AAV粒子、AAVヘルパー機能ベクター、およびアクセサリー機能ベクターをパッケージングすることにより、生成することができる。一般に、AAVヘルパー機能ベクターは、増殖性AAVの複製およびキャプシド化のためにトランスで機能するAAVヘルパー機能配列(repおよびcap)をコードする。好ましくは、AAVヘルパー機能ベクターは、任意の検出可能な野生型AAVビリオン(すなわち、機能的なrepおよびcap遺伝子を含むAAVビリオン)を生成することなく、効率的なAAVベクター生成を支持する。アクセサリー機能ベクターは、非AAV由来ウイルスのための、および/または複製のためにAAVが依存する細胞の機能のためのヌクレオチド配列をコードしていてもよい。アクセサリー機能は、AAVの複製のために必要とされるそれらの機能を含み、これは、限定することなく、AAVの遺伝子転写の活性化、ステージ特異的なAAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現生成物の合成、およびAAVキャプシドアセンブリーに関与する部分を含む。ウイルスベースのアクセサリー機能は、アデノウィルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型以外)、およびワクシニアウイルスなどの公知のヘルパーウイルスのいずれかから誘導することができる。

ウイルスベクターを生成するための他の方法は、当該分野において公知である。さらに、ウイルスベクターは、市販されている。

【０１０３】

免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアに関して、構成成分を合成ナノキャリアに接着するための方法は、有用であり得る。

ある態様において、接着は、共有性リンカーを介するものであってよい。態様において、本発明による免疫抑制剤は、アルキン基を含む免疫抑制剤によるアジド基の1,3-二極性環付加反応により、またはアジド基を含む免疫抑制剤によるアルキンの1,3-二極性環付加反応により形成される、1,2,3-トリアゾールリンカーを介して、外部表面に共有的に接着されていてもよい。かかる環付加反応は、好ましくは、、Cu(I)触媒と共に好適なCu(I)-リガンド、およびCu(II)化合物を触媒活性Cu(I)化合物に還元するための還元剤の存在下において、行われる。このCu(I)により触媒されるアジド-アルキン環付加(CuAAC)はまた、クリック反応としても言及され得る。

【０１０４】

加えて、共有的連結は、アミドリンカー、ジスルフィドリンカー、チオエーテルリンカー、ヒドラゾンリンカー、ヒドラジドリンカー、イミンもしくはオキシムリンカー、ウレアもしくはチオウレアリンカー、アミジンリンカー、アミンリンカー、またはスルホンアミドリンカーを含む、共有性リンカーを含んでもよい。

アミドリンカーは、免疫抑制剤などの1つの構成成分上のアミンと、ナノキャリアなどの第2の構成成分のカルボン酸基との間のアミド結合を介して形成される。リンカー中のアミド結合は、好適に保護されたアミノ酸および活性化されたカルボン酸(N-ヒドロキシサクシニミド活性化エステルなど)による反応を形成する従来のアミド結合のうちのいずれかを用いて行うことができる。

【０１０５】

ジスルフィドリンカーは、例えばR_1-S-S-R_2の形態の、2つの硫黄原子の間のジスルフィド(S-S)結合の形成を介して行われる。ジスルフィド結合は、チオール/メルカプタン基(-SH)を含む構成成分の、別の活性型チオール基との、またはチオール/メルカプタン基を含む構成成分の、活性型チオール基を含む構成成分との、チオール交換により形成することができる。

トリアゾールリンカー、特に、

【化１】

ここで、R_1およびR_2は、任意の化学実体であってよい、

の形態の1,2,3-トリアゾールは、第1の構成成分に接着しているアジドの、免疫抑制剤などの第2の構成成分に接着している末端アルキンによる1,3-二極性環付加反応により、生成することができる。1,3-二極性環付加反応は、触媒を用いるかまたはこれを用いずに、好ましくはCu(I)-触媒を用いて行われ、これは、1,2,3-トリアゾール官能基を通して2つの構成成分を繋げる。この化学は、Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002)およびMeldal, et al, Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015により詳細に記載され、しばしば、「クリック」反応またはCuAACとして言及される。

【０１０６】

チオエーテルリンカーは、例えばR_1-S-R_2の形態における、硫黄-炭素(チオエーテル)結合の形成により、生成することができる。チオエーテルは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン(-SH)基の、第2の構成成分上のハライドまたはエポキシドなどのアルキル化剤によるアルキルにより、生成することができる。チオエーテルリンカーは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン基の、マイケルアクセプターとしてのマレイミド基またはビニルスルホン基を含む第2の構成成分上の電子不足のアルケン基に対するマイケル付加により、形成することができる。別の方法において、チオエーテルリンカーは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン基の、第2の構成成分上のアルケン基による、ラジカルチオール-エン反応により調製することができる。

【０１０７】

ヒドラゾンリンカーは、1つの構成成分上のヒドラジド基の、第2の構成成分上のアルデヒド/ケトン基との反応により生成される。

ヒドラジドリンカーは、1つの構成成分上のヒドラジン基の、第2の構成成分上のカルボン酸基との反応により形成される。かかる反応は、一般に、活性化試薬によりカルボン酸が活性化されるアミド結合の形成と類似の化学を用いて行われる。

【０１０８】

イミンまたはオキシムリンカーは、1つの構成成分上のアミンまたはN-アルコキシアミン(またはアミノオキシ)基の、第2の構成成分上のアルデヒドまたはケトン基との反応により、形成される。

ウレアまたはチオウレアリンカーは、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上

のイソシアネートまたはチオイソシアネート基との反応により調製される。
アミジンリンカーは、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のイミドエステル基との反応により調製される。
【０１０９】
アミンリンカーは、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のハライド、エポキシドまたはスルホネートエステル基などのアルキル化性の基によるアルキル化反応により生成される。あるいは、アミンリンカーはまた、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のアルデヒドまたはケトン基による、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはトリアセトキシ水酸化ホウ素ナトリウムなどの好適な還元剤による還元性アミン化により、生成することができる。
【０１１０】
スルホンアミドリンカーは、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のスルホニルハライド(スルホニル塩化物など)基との反応により生成される。
スルホンリンカーは、ビニルスルホンへの求核試薬のマイケル付加により生成される。ビニルスルホンまたは求核試薬のいずれかは、ナノキャリアの表面上にあっても、構成成分に接着していてもよい。
【０１１１】
構成成分はまた、非共有的な抱合方法を介して抱合させることができる。例えば、負に荷電した免疫抑制剤は、静電的吸着を通して正に荷電した構成成分に報告させることができる。金属リガンドを含む構成成分は、金属-リガンド錯体を介して金属錯体に抱合させることができる。
【０１１２】
態様において、構成成分は、合成ナノキャリアのアセンブリーの前に、ポリマー、例えばポリ乳酸-ブロック-ポリエチレングリコールに接着していてもよい。合成ナノキャリアを、その表面上で、反応性の基または活性化可能な基により形成させてもよい。後者の場合、構成成分は、合成ナノキャリアの表面により提示される接着化学と適合性の基により調製してもよい。他の態様において、ペプチド構成成分は、好適なリンカーを用いて、VLPまたはリポソームに接着していてもよい。リンカーとは、2つの分子を一緒に連結させることができる化合物または試薬である。一態様において、リンカーは、Hermanson 2008において記載されるような、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性の試薬であってよい。例えば、表面上にカルボキシ基を含むVLPまたはリポソーム 合成ナノキャリアを、EDCの存在下において、ホモ二官能性リンカーであるアジピン酸ジヒドラジド(ADH)で処置し、ADHリンカーにより対応する合成ナノキャリアを形成させることができる。結果として生じるADHにより繋げられた合成ナノキャリアを、次いで、ナノキャリア上のADHリンカーの他方の末端を介して、酸性基を含むペプチド構成成分と抱合させて、対応するVLPまたはリポソームペプチドの抱合体を生成する。
【０１１３】
態様において、ポリマー鎖の末端にアジドまたはアルキン基を含むポリマーを調製する。次いで、このポリマーを用いて、複数のアルキンまたはアジド基がそのナノキャリアの表面上に配置されるような様式において、合成ナノキャリアを調製する。あるいは、別の経路により合成ナノキャリアを調製して、その後、アルキンまたはアジド基により官能化してもよい。構成成分は、アルキン(ポリマーがアジドを含む場合)またはアジド(ポリマーがアルキンを含む場合)基のいずれかの存在により、調製される。次いで、構成成分を、1,4-二置換1,2,3-トリアゾールリンカーを通して構成成分を粒子に共有的に接着する触媒を用いて、またはこれを用いずに、1,3-二極性環付加反応を介してナノキャリアと反応させる。
【０１１４】
構成成分が小分子である場合、合成ナノキャリアのアセンブリーの前に構成成分をポリマーに接着することは、有利であり得。態様において、構成成分をポリマーに接着して、次いで、このポリマー抱合体を合成ナノキャリアの構築において用いるのではなく、むし

ろ、構成成分を合成ナノキャリアに接着するために用いられる表面の基により、それらの表面基の使用を通して合成ナノキャリアを調製することは、有利であり得る。

【０１１５】

利用可能な抱合方法の詳細な説明については、Hermanson G T「Bioconjugate Techniques」、第2版、Academic Press, Inc.により出版(2008年)を参照。共有的接着に加えて、構成成分は、予め形成された合成ナノキャリアの吸着により接着しても、または、合成ナノキャリアの形成の間のカプセル化により接着してもよい。

【０１１６】

合成ナノキャリアは、当該分野において公知の広範な方法を用いて調製することができる。例えば、合成ナノキャリアは、ナノ沈殿、流路(fluidic channel)を用いるフローフォーカシング(flow focusing)、スプレー乾燥、シングルまたはダブルエマルジョン溶媒蒸発、溶媒抽出、相分離、ミリング(milling)、マイクロエマルジョンの手法、マイクロ加工(microfabrication)、ナノ加工(nanofabrication)、犠牲層(sacrificial layers)、単一および複合コアセルベーションなどの方法、ならびに当業者に周知の他の方法により、形成させることができる。あるいはまたは加えて、単分散半導体、伝導性、磁性、有機性、および他のナノ材料のための水性および有機性溶媒合成が、記載されている(Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48； Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545；およびTrindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843)。さらなる方法は、文献において記載されている(例えば、Doubrow編、「Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy」、CRC Press, Boca Raton, 1992；Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13；Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275；およびMathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755；米国特許第5578325号および同第6007845号；P. Paolicelliら、「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」、Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)を参照)。

【０１１７】

材料は、これらに限定されないが、以下を含む多様な方法を用いて、所望されるとおり合成ナノキャリア中にカプセル化することができる：C. Astete et al.,「Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles」J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247?289 (2006)；K. Avgoustakis「Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticle: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery」Current Drug Delivery 1:321-333 (2004)；C. Reis et al.,「Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles」Nanomedicine 2:8? 21 (2006)；P. Paolicelli et al.,「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)。材料を合成ナノキャリア中にカプセル化するために好適な他の方法を用いてもよく、これは、限定することなく、Ungerに対して2003年10月14日に発行された米国特許第6,632,671号において開示される方法を含む。

【０１１８】

ある態様において、合成ナノキャリアは、ナノ沈殿のプロセまたはスプレー乾燥により調製される。合成ナノキャリアを調製するために用いられる条件は、所望されるサイズまたは特性(例えば疎水性、親水性、外部の形態学、「粘着性(stickiness)」、形状など)の粒子を得るために、改変してもよい。合成ナノキャリアを調製する方法および用いられる条件(例えば溶媒、温度、濃度、気流の速度など)は、合成ナノキャリアに接着されるべき材料、および/またはポリマーマトリックスの組成に依存し得る。

【０１１９】

上の方法のいずれかにより調製される合成ナノキャリアが、所望される範囲の外のサイズ範囲を有する場合、合成ナノキャリアを、例えば篩を用いて、サイズ分類することができる。

合成ナノキャリアの要素は、例えば1つ以上の共有結合により、合成ナノキャリア全体

に、接着させても、または、1つ以上のリンカーを用いることにより接着させてもよい。合成ナノキャリアを官能化するさらなる方法は、Saltzmanらへの公開された米国特許出願2006/0002852、DeSimone らへの公開された米国特許出願2009/0028910、またはMurthyらへの公開された国際特許出願WO/2008/127532A1から適応させてもよい。

【０１２０】

あるいはまたは加えて、合成ナノキャリアは、非共有的相互作用を介して直接的にまたは間接的に構成成分に接着させてもよい。非共有的態様において、非共有的接着は、これらに限定されないが、電荷相互作用、親和性相互作用、金属配位、物理的吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、TTスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファンデルワールス相互作用、磁気相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用、および/またはこれらの組み合わせを含む、非共有的相互作用により媒介される。かかる接着は、合成ナノキャリアの外部表面または内部表面上にあるように配置することができる。態様において、カプセル化および/または吸着は、接着の一形態である。

【０１２１】

本明細書において提供される組成物は、以下を含んでもよい：無機または有機のバッファー(例えばリン酸、炭酸、酢酸またはクエン酸のナトリウムまたはカリウム塩)およびｐＨ調整剤(例えば塩酸、水酸化ナトリウムまたはカリウム、クエン酸または酢酸の塩、アミノ酸およびそれらの塩)、抗酸化剤(例えばアスコルビン酸、アルファ-トコフェロール)、界面活性剤(例えばポリソルベート20、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン9-10ノニルフェノール、デソキシコール酸ナトリウム(sodium desoxycholate))、溶液および/またはクライオ(cryo)/リオ(lyo)安定剤(例えばスクロース、ラクトース、マンニトール、トレハロース)、浸透圧調整剤(例えば塩または糖)、抗菌剤(例えば安息香酸、フェノール、ゲンタマイシン)、消泡剤(例えばポリジメチルシロゾン(polydimethylsilozone))、保存剤(例えばチメロサール、2-フェノキシエタノール、EDTA)、ポリマー性安定化剤および粘度調整剤(例えばポリビニルピロリドン、ポロキサマー488、カルボキシメチルセルロース)および共溶媒(例えばグリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール)。

【０１２２】

発明による組成物は、薬学的に受入可能な賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態に到達するために、従来の製薬および配合の技術を用いて製造することができる。本発明を実施することにおける使用のために好適な技術は、Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice、Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-ObengおよびSuzanne M. Kresta編、2004年、John Wiley & Sons, Inc.；およびPharmaceutics: The Science of Dosage Form Design、第2版、M. E. Auten編、2001年、Churchill Livingstoneにおいて見出すことができる。一態様において、組成物は、注射のために、保存剤と共に、無菌食塩水中に懸濁される。

【０１２３】

本発明の組成物は、任意の好適な様式において製造することができ、本発明は決して、本明細書において記載される方法を用いて生成することができる組成物に限定されないことが、理解されるべきである。適切な製造の方法の選択は、会合している特定の部分の特性への配慮を必要とする場合がある。

【０１２４】

いくつかの態様において、組成物は、無菌条件下において製造されるか、最後に滅菌される。このことは、結果として生じる組成物が無菌かつ非感染性であることを確実にし、それにより、非無菌の組成物と比較して、安全性を改善する。このことは、組成物を投与されている対象が免疫欠損を有するか、感染症をり患しているか、および/または感染に対して感受性である場合には特に、価値ある安全性の尺度を提供する。

【０１２５】

本発明による投与は、これらに限定されないが、皮下、静脈内および腹腔内経路を含む、多様な経路によるものであってよい。本明細書において言及される組成物は、従来の方法を用いる投与、いくつかの態様においては同時投与のために、製造および調製すること

ができる。

【０１２６】

本発明の組成物は、有効量、例えば本明細書において別の箇所で記載される有効量において、投与することができる。いくつかの態様において、免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアは、投与形態中で、免疫応答を低下させるか、および/またはウイルスベクターの対象への再投与を可能にするための有効量において存在する。いくつかの態様において、免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアは、投与形態中で、対象において効果的な導入遺伝子発現を増大させるかまたはこれを達成するための有効量において存在する。投与形態は、多様な頻度において投与することができる。いくつかの態様において、ウイルスベクターによる免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの繰り返し投与が行われる。

【０１２７】

本発明の側面は、本明細書において提供されるような投与の方法のためのプロトコルを決定することに関する。プロトコルは、少なくともウイルスベクターおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの頻度、投与量を変化させること、およびその後に所望されるまたは望ましくない免疫応答を評価することにより、決定することができる。本発明の実施のための好ましいプロトコルは、ウイルスベクターに対する免疫応答および/もしくは発現される生成物を低下させ、ならびに/または導入遺伝子発現を促進する。プロトコルは、少なくとも、ウイルスベクターおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの投与の頻度および用量を含む。

【０１２８】

本開示の別の側面は、キットに関する。いくつかの態様において、キットは、本明細書において提供される組成物のいずれか1つ以上を含む。好ましくは、組成物は、本明細書において提供されるようないずれか1つ以上の用量を提供する量におけるものである。組成物は、キットにおいて、1つの容器中にあっても、1つより多くの容器中にあってもよい。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、容器は、バイアルまたはアンプルである。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、組成物は、それらを後の時点で再構成することができるように、各々凍結乾燥形態において、別々の容器中、または同じ容器中にある。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、再構成、混合、投与などのための指示を、さらに含む。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、指示は、本明細書において記載される方法のうちのいずれか1つの説明を含む。指示は、例えば印刷された挿入物またはラベルのような、任意の好適な形態におけるものであってよい。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、組成物をin vivoで対象に送達することができる1つ以上のシリンジまたは他のデバイスを、さらに含む。

【０１２９】

例

例1：in vitroでのssAAVベクターコンストラクト実験

肝臓特異的プロモーターの転写制御下においてヒトOTC導入遺伝子を発現する一連のssAAVベクターコンストラクトを開発した。rAAV-hOTCベクター(AAV2/8、すなわち、AAV8キャプシドタンパク質を有するように操作されたAAV2ウイルス)は、野生型AAV2の逆位末端反復配列(ITR)により挟まれたヒトOTC(hOTC)発現カセットを含む。骨格、プロモーター、および制御エレメントは、ベクターpSMD2に基づく(Ronzitti, et al., 2016)。hOTC導入遺伝子の転写は、アポリポタンパク質E(ApoE)エンハンサーおよびヒトアルファ-１-アンチトリプシン(hAAT)プロモーターを含むハイブリッドプロモーターにより駆動され、ヘモグロビンベータ(HBB)ポリアデニル化シグナルにより終結する。コード領域およびプロモーターは、50塩基対よりも長い代替的なオープンリーディングフレームおよび潜在的スプライス部位の除去により修飾された、ヒトヘモグロビンベータ由来の合成イントロン(HBB２)により分離される(Ronzitti, et al., 2016)。

【０１３０】

wt-hOTCを、様々なアルゴリズムによりコドン最適化(CO)した。最適化のプロセスは、アミノ酸の一次配列を変更しないように保ちつつ、ヌクレオチド配列を変化させることにより、OTC mRNAの翻訳および安定性を改善することを目的とする。WO 2015/138357特許A2(Wang L., Wilson J.M.)からの野生型OTC cDNA配列およびコドン最適化された(CO)LW4配列もまた、比較対照として用いるために合成した(CO1)。様々なCO cDNAのヌクレオチド配列は、30～20％の範囲でWT cDNA配列とは異なる。ベクターを、次いで、AAV8血清型中にパッケージングして、Huh7細胞に形質導入するために用いた。OTCコンストラクトおよびpGG2-eGFPプラスミド(遺伝子導入効率を正規化するため)を同時導入したHuh7細胞を用いて、全RNAおよびタンパク質を生成した。qRT-PCRおよびウェスタンブロッティングを用いて、mRNA、タンパク質、および活性レベルを分析した。

【０１３１】

効率を正規化するために、GFPプラスミドを用いて遺伝子導入を実証した。結果として生じたDNAを増幅し(上、図1)、CO3およびCO21コンストラクトが、最大の遺伝子導入効率を示した(下、図１)。CO3およびCO21コンストラクトの特徴を、それぞれ図4および5において示す。コンストラクトを2つ組において実行し、次いで増幅した場合、野生型(GFPプラスミド)とCO18およびCO21ベクターとの間で著しい差異が見られた(図2)。実験のすべてからの結果(n＝4)を、平均化し、図3において表す。CO3を、同じ様式において試験した；結果を図7～8Bにおいて示す。

処置された細胞をまた、染色して、OTCの細胞内局在を調べた(図9)。

DNAの質および量における多大な差異を回避するために、全DNAの調製を、同じ日に同じDNAプレップキットにより並行して行った。

【０１３２】

例2：マウスにおけるssAAVベクターコンストラクト実験

肝臓特異的プロモーターの転写制御下においてヒトOTC導入遺伝子を発現する一連のssAAVベクターコンストラクトを開発した。wt-hOTCを、様々なアルゴリズムによりコドン最適化した(CO)(図6、表1)。コドン使用、潜在的スプライス部位、アンチセンス鎖におけるORFアンチセンス鎖における(ARF＞50bp)、二次構造、GC含有量、およびCpGアイランドを含む様々なアルゴリズムを調べ、次いで、マニュアル分析を行って、候補コンストラクトを決定した。ベクターを、次いでAAV8血清型中にパッケージングして、オスおよびメスのWT C57Bl/6およびOTC$^{spf-ash}$マウスに形質導入するために用いた。

【０１３３】

加えて、タンパク質レベル、触媒活性(図10～11)、および尿中オロト酸レベル(図13)を測定し、OTC$^{spf-ash}$マウス(CO3)の表現型を修正することにおいて特に効率的であったCO-hOTCコンストラクトの同定をもたらした。タンパク質、活性およびmRNA定量を、ウイルスゲノムにより正規化した。

【０１３４】

表1．例示的な導入遺伝子配列

太大文字は、開始および停止コドンを示し、スモールキャピタルは、Kozak配列を示す。

【表１－１】

名称	配列	配列番号
hOCT-001_cds_(WT)	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTTAATCTGAGGATCCTGTTAAACAATGCAGCTTTTAG AAATGGTCACAACTTCATGGTTCGAAATTTTCGGTGTGGACAACCACTACAAAATAA AGTGCAGCTGAAGGGCCGTGACCTTCTCACTCTAAAAAACTTTACCGGAGAAGAAA TTAAATATATGCTATGGCTATCAGCAGATCTGAAATTTAGGATAAAACAGAAAGGAG AGTATTTGCCTTTATTGCAAGGGAAGTCCTTAGGCATGATTTTTGAGAAAAGAAGTA CTCGAACAAGATTGTCTACAGAAACAGGCTTTGCACTTCTGGGAGGACATCCTTGTT TTCTTACCACACAAGATATTCATTTGGGTGTGAATGAAAGTCTCACGGACACGGCCC GTGTATTGTCTAGCATGGCAGATGCAGTATTGGCTCGAGTGTATAAACAATCAGATT TGGACACCCTGGCTAAAGAAGCATCCATCCCAATTATCAATGGGCTGTCAGATTTGT	1

【表１－２】

	ACCATCCTATCCAGATCCTGGCTGATTACCTCACGCTCCAGGAACACTATAGCTCTC TGAAAGGTCTTACCCTCAGCTGGATCGGGGATGGGAACAATATCCTGCACTCCATC ATGATGAGCGCAGCGAAATTCGGAATGCACCTTCAGGCAGCTACTCCAAAGGGTTA TGAGCCGGATGCTAGTGTAACCAAGTTGGCAGAGCAGTATGCCAAAGAGAATGGTA CCAAGCTGTTGCTGACAAATGATCCATTGGAAGCAGCGCATGGAGGCAATGTATTA ATTACAGACACTTGGATAAGCATGGGACAAGAAGAGGAGAAGAAAAAGCGGCTCCA GGCTTTCCAAGGTTACCAGGTTACAATGAAGACTGCTAAAGTTGCTGCCTCTGACT GGACATTTTTACACTGCTTGCCCAGAAAGCCAGAAGAAGTGGATGATGAAGTCTTTT ATTCTCCTCGATCACTAGTGTTCCCAGAGGCAGAAAACAGAAAGTGGACAATCATG GCTGTCATGGTGTCCCTGCTGACAGATTACTCACCTCAGCTCCAGAAGCCTAAATTT TGA**TAA**gaattc	
hOCT-CO1	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTC GGAACGGGCACAACTTTATGGTGAGGAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAA TAAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACAGGGGAG GAAATCAAGTATATGCTGTGGCTGTCAGCTGATCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAA GGGCGAATATCTGCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAG CGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTGGATTCGCTCTGCTGGGAGGAC ACCCTTGTTTTCTGACCACTCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACC GACACTGCTCGCGTCCTGAGCTCTATGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACA AACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGC CTGTCAGACCTGTATCACCCCATCCAGATTCTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGA GCACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACTGAGTTGGATTGGGGACGGAAACAATA TCCTGCACTCTATTATGATGTCAGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTCCAGGCTGCA ACCCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTACG CCAAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCTCA CGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGAAGAG AAGAAGAAGCGGCTCCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTGACAATGAAAACCGCTA AGGTCGCAGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAGA GGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCAGAAGCCTGGTGTTTCCCGAAGCTGAG AATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTCAGCCTGCTGACTGATTATTCACC TCAGCTCCAGAAACCAAAGTTCTGAT**AA**gaattc	2
hOCT-CO2	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTC GGAACGGGCACAACTTTATGGTCCGCAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAAT AAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACAGGGGAGG AAATCAAGTATATGCTGTGGCTGTCAGCTGATCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAAG GGCGAATATCTGCCACTGCTGCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAGC GCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTGGATTCGCTCTGCTGGGAGGACA CCCTTGTTTTCTGACAACTCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCG ACACTGCTCGCGTCCTGAGCTCTATGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACAAA CAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGCCT GTCAGACCTGTATCACCCCATCCAGATTCTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGAGC ACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACTGAGTTGGATTGGGGACGGAAACAATATC CTGCACTCTATTATGATGTCAGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTCCAGGCTGCAAC CCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTACGCC AAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCTCACG GAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGAAGAGAA GAAGAAGCGGCTCCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACCGCTAAG GTCGCAGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAGAGG	3

【表１－３】

	TGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCACGCTCCCTGGTGTTTCCCGAAGCTGAGAAT AGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTCAGCCTGCTGACTGATTATTCACCTCA GCTCCAGAAACCAAAGTTCTGAT**AA**gaattc	
hOCT-CO3	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGAGAATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTTC GGAACGGCCACAACTTCATGGTCCGCAACTTCCGCTGCGGCCAGCCACTGCAGAA CAAGGTGCAGCTGAAGGGCAGAGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAG GAGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAGAATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAGGGCAAAAGCCTGGGCATGATCTTCGAAAAG CGCTCCACCCGGACCAGACTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGC CACCCTTGCTTCCTGACAACCCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGTCCCTGA CCGACACCGCCAGAGTGCTGAGCTCTATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGTA CAAACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCAATTATTAAcG GCCTGTCCGACCTGTATCACCCCATCCAGATTCTGGCCGATTACCTGACCCTGCAG GAGCACTATAGCAGCCTGAAGGGCCTGACACTGTCTTGGATCGGCGACGGAAATA ATATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGGCT GCTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTA CGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCT CACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTTCTATGGGACAGGAGGAAG AGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACCGC TAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAA GAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGGAGCCTGGTGTTTCCCGAAGCTG AGAATCGGAAATGGACAATtATGGCTGTGATGGTGTCCCTGCTGACTGATTATTCTC CTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGAT**AA**gaattc	4
hOCT-CO6	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGCATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCC GCAACGGCCACAACTTCATGGTcagaAACTTCCGCTGCGGCCAGCCCCTGCAaAACA AaGTGCAGCTGAAGGGCCGCGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAGGA GATCAAaTACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGCATCAAGCAGAAGG GCGAGTACCTGCCaCTGCTGCAaGGCAAGAGCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCG CAGCACCCGCACCCGCCTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCCCTGCTGGGCGGCCA CCCCTGCTTCCTGACaACaCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACC GACACCGCCCGCGTGCTGAGCAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCCCGCGTGTAC AAGCAGAGCGACCTGGACACCCTGGCCAAGGAGGCCAGCATCCCCATCATCAACG GCCTGAGCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCA GGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAA CAAtATCCTGCACAGtATtATGATGAGCGCCGCCAAGTTCGGaATGCACCTGCAGGC CGCCACCCCCAAGGGCTACGAGCCCGACGCCAGCGTGACCAAGCTGGCCGAGCA GTACGCCAAGGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCCCTGGAGGCC GCCCACGGCGGCAACGTGCTGATCACCGACACCTGGATCtctATGGGCCAGGAGGA GGAGAAGAAGAAGCGCCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTcACtATGAAGACCG CCAAGGTGGCCGCCAGCGACTGGACCTTCCTGCACTGCCTGCCCCGCAAGCCCGA GGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGCAGCCTGGTGTTCCCCGAGGC CGAGAACCGCAAGTGGACtATtATGGCCGTGATGGTctccCTGCTGACCGACTACAGC CCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGAT**AA**gaattc	5
hOTC-CO6-1	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGGATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCA GAAACGGCCACAACTTCATGGTCCGAAACTTCAGATGCGGCCAGCCTCTGCAGAAC AAGGTGCAGCTGAAGGGCAGAGATCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAAG AGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGGATTAAGCAGAAG GGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAGGGAAAGTCTCTGGGCATGATCTTCGAGAAGC GGAGCACCAGAACCAGACTGAGCACCGAGACAGGCTTTGCCCTGCTCGGAGGACA CCCCTGCTTTCTGACAACACAGGATATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACC GATACAGCCAGAGTGCTGAGCAGCATGGCTGATGCCGTGCTGGCCAGAGTGTACA AGCAGAGCGATCTGGACACCCTGGCCAAAGAGGCCAGCATTCCCATCATCAACGG	6

【表１－４】

	CCTGAGCGACCTGTATCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACACTGCAAG AGCACTACAGCAGCCTGAAGGGACTGACCCTGTCTTGGATCGGCGACGGCAACAA CATCCTGCACTCTATTATGATGAGCGCCGCCAAGTTCGGAATGCACCTGCAGGCCG CTACACCCAAGGGCTATGAGCCTGATGCCAGCGTGACAAAGCTGGCCGAGCAGTA CGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGATCCCCTGGAAGCTGCC CACGGCGGCAATGTGCTGATCACCGATACCTGGATCTCTATGGGCCAAGAGGAAG AGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAAGTGACAATGAAGACCGC CAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCTCGGAAGCCTGAA GAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCTAGAAGCCTGGTGTTCCCCGAGGCCG AGAACAGAAAGTGGACCATCATGGCTGTGATGGTGTCCCTGCTGACCGACTACTCT CCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGAT**AA**gaattc	
hOCT-CO7	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGGATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCC GGAACGGCCACAACTTCATGGTCCGGAACTTCCGCTGTGGCCAGCCCCTGCAGAA CAAGGTGCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAA GAGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAGGGCAAGTCTCTGGGCATGATCTTCGAGAAG CGGAGCACCCGGACCCGGCTGTCTACCGAGACAGGATTTGCCCTGCTGGGCGGC CACCCTTGCTTTCTGACAACACAGGATATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGAC CGACACAGCCAGAGTGCTGAGCAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCCAGAGTGTA CAAGCAGAGCGACCTGGACACCCTGGCCAAAGAGGCCAGCATCCCCATCATCAAC GGCCTGTCCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCAGACTACCTCACACTGCA GGAACACTACAGCTCCCTGAAGGGCCTGACACTGAGCTGGATCGGCGACGGCAAC AATATCCTGCACTCTATTATGATGAGCGCCGCCAAGTTCGGAATGCACCTGCAGGC CGCCACCCCCAAGGGCTACGAGCCTGACGCCAGCGTGACCAAGCTGGCCGAGCA GTACGCCAAAGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAAGCC GCCCACGGCGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATCTCTATGGGCCAGGAAG AGGAAAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAAGTGACAATGAAGAC CGCCAAAGTGGCCGCCAGCGACTGGACCTTCCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCC GAAGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGGTCCCTGGTGTTTCCCGAGG CCGAGAACCGGAAGTGGACAATTATGGCTGTGATGGTGTCTCTGCTGACCGACTAC TCCCCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGAT**AA**gaattc	7
hOTC-CO9	GTCGACgccgccacc**ATG**CTCTTTAATCTGAGAATCCTGCTTAACAACGCCGCCTTCCG CAACGGACACAACTTCATGGTCCGGAACTTCAGATGCGGCCAGCCTCTCCAAAACA AGGTCCAGCTTAAGGGCAGAGATCTGCTCACCCTCAAAAACTTCACCGGAGAGGAA ATCAAGTATATGCTGTGGCTGTCTGCCGATCTTAAGTTCCGGATCAAACAGAAGGG GGAGTACCTTCCGCTGCTGCAAGGGAAGTCACTCGGAATGATCTTCGAGAAGCGC TCCACTCGGACCAGGCTCAGCACCGAAACTGGATTTGCACTCCTGGGTGGTCATCC CTGTTTCCTGACCACCCAAGATATCCACCTGGGCGTGAACGAATCCCTGACCGACA CAGCTCGCGTGCTGTCCTCCATGGCCGACGCTGTGTTGGCCCGGGTCTACAAGCA GAGCGACCTGGACACTCTGGCCAAGGAAGCCTCCATTCCGATCATCAATGGGCTG TCCGACCTGTACCACCCAATTCAGATCCTGGCGGATTACTTGACCCTGCAAGAGCA CTACAGCTCCCTGAAGGGACTGACCCTCTCCTGGATTGGCGACGGGAACAACATC CTCCACTCGATTATGATGTCGGCGGCGAAGTTCGGCATGCATCTGCAAGCCGCCA CTCCTAAGGGTTACGAACCGGACGCAAGCGTGACCAAGCTCGCCGAACAGTACGC GAAGGAAAACGGCACTAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCCCTGGAAGCCGCTCAC GGCGGAAACGTGCTGATTACGGACACCTGGATCAGCATGGGACAGGAGGAGGAGA AGAAGAAGCGGCTGCAGGCGTTCCAGGGATACCAGGTCACCATGAAAACTGCCAA AGTGGCAGCCTCAGACTGGACTTTCCTGCACTGCCTGCCTCGGAAGCCAGAGGAG GTGGACGATGAAGTGTTCTACTCCCCTCGCTCCCTGGTGTTCCCGGAGGCGGAAA ACAGGAAGTGGACCATCATGGCCGTGATGGTGTCATTGTTGACCGATTACTCGCCG CAACTGCAGAAGCCCAAGTTTTG**A**gaattc	8

【表１－５】

hOTC-CO9-1	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTTAATCTGAGAATCCTGCTGAACAATGCTGCTTTCCG CAATGGGCACAACTTTATGGTCCGAAACTTCCGATGTGGACAGCCTCTGCAGAACA AGGTGCAGCTGAAGGGCCGGGACCTGCTGACCCTGAAGAATTTCACAGGCGAGGA GATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTTAGGATCAAGCAGAAGG GCGAGTATCTGCCACTGCTGCAGGGCAAGTCCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCG GAGCACCCGGACAAGACTGAGCACCGAGACAGGATTCGCACTGCTGGGAGGACAC CCATGCTTTCTGACAACACAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGTCTCTGACCGA CACAGCACGGGTGCTGAGCTCCATGGCAGATGCCGTGCTGGCCAGAGTGTACAAG CAGAGCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAGGCCTCCATCCCCATCATCAATGGCC TGTCTGACCTGTATCACCCAATCCAGATCCTGGCCGATTACCTGACCCTGCAGGAG CACTATTCTAGCCTGAAGGGCCTGACACTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATAT CCTGCACAGCATCATGATGTCCGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGGCAGCA ACCCCAAAGGGATACGAGCCCGATGCCTCCGTGACAAAGCTGGCCGAGCAGTATG CCAAGGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGACAAATGACCCACTGGAGGCAGCACA CGGAGGAAACGTGCTGATCACCGATACATGGATCTCTATGGGCCAGGAGGAGGAG AAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTGACCATGAAGACAGCCA AGGTGGCCGCCTCTGATTGGACCTTTCTGCACTGTCTGCCCCGGAAGCCTGAGGA GGTGGACGATGAGGTGTTCTATTCCCCTCGGAGCCTGGTGTTCCCAGAGGCAGAG AATCGCAAGTGGACAATCATGGCCGTGATGGTCTCCCTGCTGACTGACTACTCCCC ACAGCTGCAGAAGCCCAAGTTTTGAT**AA**gaattc	9
hOTC-CO9-2	GTCGACgccgccacc**ATG**CTCTTCAATCTCCGAATACTCCTGAATAATGCGGCATTCAG AAATGGGCACAATTTTATGGTGCGAAATTTTCGATGTGGGCAGCCCTTGCAAAATAA AGTACAACTTAAAGGCAGAGATCTTCTTACGCTCAAAAACTTTACCGGCGAAGAGAT TAAGTATATGTTGTGGCTGTCTGCTGACCTTAAATTCCGAATAAAACAGAAAGGCGA ATACCTTCCGCTCCTCCAAGGGAAATCTCTTGGGATGATTTTCGAGAAGAGATCTAC GCGCACGCGGCTTTCAACGGAAACTGGATTCGCACTCTTGGGCGGCCACCCATGT TTTCTGACTACTCAAGATATTCACTTGGGAGTAAATGAGTCACTTACTGACACGGCA AGAGTGCTCTCTAGCATGGCTGATGCAGTGCTGGCTAGAGTCTATAAACAATCCGA CCTGGATACACTCGCCAAGGAAGCTTCAATACCAATAATCAACGGGTTGTCTGACTT GTACCACCCTATCCAAATCTTGGCCGATTATTTGACACTCCAGGAACACTACTCAAG TCTGAAGGGACTTACGCTTAGCTGGATAGGTGATGGTAACAACATCCTTCATAGCAT TATGATGTCAGCCGCCAAATTCGGCATGCATCTGCAAGCAGCGACTCCCAAGGGCT ATGAGCCTGATGCCTCAGTCACCAAACTGGCGGAGCAGTACGCTAAAGAGAATGG GACGAAGCTTTTGCTGACGAACGATCCCCTGGAGGCGGCTCACGGGGGAAATGTG CTTATCACGGATACCTGGATAAGTATGGGGCAGGAGGAAGAAAAAAAAAAGCGATT GCAAGCCTTTCAAGGTTACCAGGTTACAATGAAAACTGCGAAAGTCGCCGCATCTG ACTGGACTTTTCTGCACTGTCTTCCGAGAAAGCCGGAAGAGGTGGACGACGAAGT GTTCTACTCTCCGCGCTCTCTCGTGTTTCCTGAAGCAGAGAACCGAAAGTGGACCA TAATGGCGGTAATGGTCAGCCTCTTGACTGATTATTCCCCTCAGCTGCAGAAGCCA AAGTTTTGAT**AA**gaattc	10
hOTC-CO18	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGCATCCTGCTGAACAACGCCGCCTTCC GCAACGGCCACAACTTCATGGTCAGAAACTTCCGCTGCGGCCAGCCCCTGCAAAA CAAAGTGCAGCTGAAGGGCCGCGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGGCGAG GAGATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAGAATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCACTGCTGCAAGGCAAGAGCCTGGGCATGATCTTCGAGAAG CGCAGCACCCGCACCCGCCTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGC CACCCTTGCTTCCTGACAACCCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGA CCGACACCGCCCGCGTGCTGAGCAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGT ACAAACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCCATCATCAAC GGCCTGAGCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGC AGGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCA	11

【表１－６】

	ACAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGG CTGCTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAG TACGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCG CTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGACACCTGGATCTCTATGGGCCAGGAGGA AGAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACC GCTAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTCCTGCACTGCCTGCCCCGCAAGCCCG AGGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGCAGCCTGGTGTTCCCCGAGG CCGAGAACCGCAAGTGGACTATTATGGCCGTGATGGTGTCCCTGCTGACTGATTAT TCTCCTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGAT**AA**gaattc	10
hOTC CO21 (whole sequence)	GTCGACgccgccacc**ATG**CTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTC GGAACGGGCACAACTTTATGGTGAGGAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAA TAAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACAGGGGAG GAAATCAAATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAGAATCAAGCAGAA GGGCGAGTACCTGCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAG CGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGCC ACCCTTGCTTCCTGACAACCCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACC GACACTGCTCGCGTCCTGAGCTCTATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGTACA AACAGTCCGACCTGGATACCCTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCCATCATCAACGGC CTGAGCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCAGG AGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAA TATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCGCCAAGTTTGGAATGCACCTGCAGGCTG CTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTAC GCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGACCAACGACCCTCTGGAGGCCGCTC ACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGAAGA GAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAGGTCACCATGAAAACCGCT AAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAG AGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCAGAAGCCTGGTGTTTCCCGAAGCTGA GAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTGTCCCTGCTGACTGATTATTCTC CTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGAT**AA**gaattc	12
hOTC CO21 (ORF)	ATGCTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTCGGAACG GGCACAACTTTATGGTGAGGAACTTTCGCTGCGGACAGCCCCTCCAGAA TAAGGTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTCACA GGGGAGGAAATCaaatacatgctgtggctgagcgccgatctgaagttca gaatcaagcagaagggcgagtacCTGCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCT GGGGATGATCTTCGAAAAGCGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAG ACTggcttcgctctgctgggaggccacccttgcttcctgacaacccagG ACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCGACACTGCTCGCGTCCT GAGCTCTatggccgacgccgtgctggctcgggtgtacaaacagtccgac ctggataccctggccaaggaagcttccATCCCCATCATCAACGGCCTGA GCGACCTGTACCACCCCATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCA GGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGAC GGCAACAATATCCTGcactctattatgatgtctgccgccaagtttggaa tgcacctgcaggctgctacccctaaaggctacgaacccgatgcctctgt gacaaagctggctgaacagtacgccaaagagaacggcacaaagctgctg ctgaccaacgaccctctggaggccgctcacggaggcaacGTGCTGATCA CCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGgaagagaagaagaagcggct gcaggccttccagggctaccaggtcaccatgaaaaccgctaaggtggcc gccagcgatTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCAGAAAGCCCGAAGAGG TGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCAGAAGCCTGGTGTTTCCCGAAGC	13

【表１－７】

	TGAGAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGatggtgtccctgctgact gattattctcctcaactgcagaaacctaaattttga	
hOTC- 001_cds_ (WT)	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	14
hOTC-CO1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	15
hOTC-CO2	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	16
hOTC-CO3	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	17
hOTC-CO6	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	18
hOTC- CO6-1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL	19

【表１－８】

	LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	
hOTC-CO7	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	20
hOTC-CO9	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	21
hOTC-CO9-1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	22
hOTC-CO9-2	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	23
hOTC-CO18	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	24
hOTC-CO21	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTLKNFT GEEIKYMLWLSADLKFRIKQKGEYLPLLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALLGGHPCFLTTQDIHLGVNESLTDTARVLSSMADAVLARVYKQSD	25

【表１－９】

	LDTLAKEASIPIINGLSDLYHPIQILADYLTLQEHYSSLKGLTLSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEKKKRLQAFQGYQVTMKTAKVA ASDWTFLHCLPRKPEEVDDEVFYSPRSLVFPEAENRKWTIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	

【０１３５】

例3：肝臓を標的としたin vitro研究

マウスおよび非ヒト霊長類において、いくつかのAAVキャプシドバリアントを、高い効率で肝臓を標的とする能力についてスクリーニングするために、in vitroおよびin vivoでの研究を行った。AAVベクターとラパマイシンをカプセル化している合成ナノキャリアとの組み合わせの安全性および効率を評価するために、さらなる前臨床研究を行い、早期の致死率を有する疾患において繰り返し投与することを可能にする治療的アプローチを開発する実現可能性を実証した。

【０１３６】

例4：AAV8-hOTC-COコンストラクトのin vitro試験

ヒト肝細胞腫細胞株HUH7を用いて、AAV8-hOTC-COコンストラクトの発現レベルを評価した。AAV8-hOTC-CO1(CO1)、AAV8-hOTC-CO2(CO2)、AAV8-hOTC-CO3(CO3)、AAV8-hOTC-CO6(CO6)、AAV8-hOTC-CO7(CO7)、AAV8-hOTC-CO9(CO9)コンストラクトプラスミドを、内部対照としてpGFPプラスミドと一緒に、HUH7細胞において、リポフェクタミンを用いて一過性に同時導入した(リポフェクタミン2000、Thermo Fisher Scientific)。遺伝子導入の24時間後、全タンパク質ライセートを調製し、ウェスタンブロット分析によりOTC発現について分析した。

【０１３７】

結果は、全ての操作された配列について、hOTC-wt(WT)コンストラクトと比較して、OTCタンパク質発現の全体的な増大を示した(図14)。CO6は、最も効率的なコンストラクトであり、WTコンストラクトよりも約5倍高い発現効率の増大を有し、続いてCO3およびCO7が、WTおよびCO1コンストラクトと比較して、約2.5倍高い発現を有した。

翻訳可能性が改善されたさらなるAAV8-hOTC-COコンストラクトを作製するために、2つの戦略を採用した：1)バイオインフォマティクスアルゴリズムを用いることにより、OTC CO6およびCO9コンストラクトを、「再最適化」した(表2)；および2)OTCタンパク質の、種間で最も保存された領域の分析に基づいて(図16)、これらの領域を選択し、最も効率的なAAV8-hOTC-COコンストラクトの間でシャッフルした。

【０１３８】

表2．hOTC-CO配列の説明

【表２】

名称	説明
hOTC-wt	gene bankからのWTヒトOTCコード配列
hOTC-CO1	CO LW4配列(Wang, L, 2012, Molecular Genetics and Metabolism)
hOTC-CO2	予測される潜在的スプライス部位を取り除くことにより最適化されたCO1
hOTC-CO3	さらなる部位を取り除くことにより最適化されたCO1
hOTC-CO6	JCatアルゴリズムにより行われた最適化
hOTC-CO7	GeneArtにより行われた最適化
hOTC-CO9	DNA 2.0により行われた最適化
hOTC-CO6-1	GeneArtにより再最適化されたCO6
hOTC-CO9-1	GeneArtにより再最適化されたCO9
hOTC-CO9-2	IDTにより再最適化されたCO9
hOTC-CO18	CO1、CO3およびCO6の間の保存領域をシャッフルすることに基づくキメラ配列
hOTC-CO21	CO1、CO3およびCO6の間の保存領域をシャッフルすることに基づくキメラ配列

【０１３９】

3つの新たなコドンが「再」最適化されたコンストラクトの群を試験した(CO6-1、CO9-1、およびCO9-2)。HUH7細胞に、WT、CO1、CO3、CO6-1、CO9-1、CO9-2コンストラクトで遺伝子導入した。CO6-1、CO9-1およびCO9-2タンパク質のOTCタンパク質発現レベルは、WT、CO1、および他の先に試験されたコンストラクトと比較して、著しく低下していた(図15)。

【０１４０】

より効率的な生成物を維持するために、コドン最適化されたOTC配列の第3の群を作製した。OTC ORF配列の機能的分析は、タンパク質ドメインおよび種間で保存された領域を同定するために、分析した。これらの領域を、CO1、CO3およびCO6配列の間でシャッフルして、CO18およびCO21配列を得た(図17)。CO18およびCO21コンストラクトが、OTCタンパク質レベルをWTよりも5～6倍高くまで増大することにおいて、最も効率的であった(図18)。CO21を、OTC欠損症の遺伝子治療の候補として選択した。

【０１４１】

WT、CO1およびCO3コンストラクトのミトコンドリアへの細胞内局在を、HUH7細胞において試験した。HUH7細胞に、WT、CO1およびCO3コンストラクトで遺伝子導入し、24時間後、細胞をミトコンドリアマーカーで染色した(MitoTracker(登録商標) Red CMXRos, Invitrogen)および抗OTC抗体(Abcam ab203859)。結果として生じた調製物を、共焦点顕微鏡法により分析した。ミトコンドリアマーカーとのその強力な共局在により示されるとおり、全てのhOTCコンストラクトの局在は、ミトコンドリアにあった(図9)。

【０１４２】

例5：AAV8-hOTC-COコンストラクトのin vivo試験

本明細書において記載される研究のために、2つのマウス動物モデルを用いた：Jackson Laboratoryからの野生型(WT)C57Bl/6マウスおよびOTC$^{spf-ash}$マウス(B6EiC3Sn a/A-Otc$^{spf-ash}$、ストック番号001811)。in vitroでの評価の後で、AAV8-hOTC-COコンストラクトを、WT C57Bl/6マウスにおいてin vivoで試験し、最も効率的なコンストラクトを、OTC^{sp}

f-ashマウスにおいて試験した。これらの実験は、コドン最適化されたコンストラクトと野生型hOTCとの比較を含んだ。

【０１４３】

無作為に処置群に割り当てた成体8週齢のオスおよびメスマウスにおいて、AAV8-hOTC-CO0コンストラクトを試験した。単一の尾静脈注射によりマウスを処置した。実質的なOTCタンパク質発現をもたらすために、5つの異なる用量(5.0E12vg/kg、1.25E12vg/kg、1.0E12vg/kg、5.0E11vg/kg、および2.5E11vg/kg)を試験した。実際には、外因性hOTC発現のレベルが、分析における内在型OTCの干渉を限定するために十分に高いことを試験した。

【０１４４】

処置の後で、特定の時間においてマウスを安楽死させ、肝臓を回収して、OTCタンパク質レベル、OTC触媒活性、および細胞あたりのウイルスゲノムの定量のために分析した。ゲノムウイルスのコピーは、市販のキット(Promega Wizard(商標)ゲノムDNA精製キット)を用いて肝臓粉末から抽出されたゲノムDNAのqPCRにより決定した。ウイルスゲノムの測定を、同じDNA調製物から3回繰り返し、平均値を報告する。

【０１４５】

１０ミリグラムの肝臓粉末を、自動ホモジェナイザーを用いて、200μlのミトコンドリアバッファー(0.5%のTriton、10mMのHEPES(pH7.4)、2mMのジチオトレイトール)で溶解した。10分間にわたる最大スピードにおける遠心分離により細胞デブリを除去し、全タンパク質濃度を、ブラッドフォードアッセイにより決定した。ウェスタンブロット分析は、10%のSDS-PAGEゲル中に、等量のタンパク質(10μg)をロードし、ニトロセルロース上にトランスファーし、α-OTC抗体(Abcam ab203859、5%のミルク-PBST中の希釈率：1:3,000)によりインキュベートすることにより行った。抗チューブリンまたはGAPDHを、ローディング対照として用いた。

【０１４６】

OTC酵素活性を３回測定した。1マイクログラム(1μg)の全肝臓タンパク質を、175μlの新たに調製した反応バッファー(5mMのオルチニン、15mMのカルバミルリン酸、270mMのトリエタノールアミン、pH7.7)と共に、30分にわたり37℃でインキュベートした。反応は、62.5μLの3:1のリン酸：硫酸溶液により停止させた。12.5μLの3%の2,3-ブタンジオンモノキシムを、次いですぐに反応に添加し、反応を95℃で15分間にわたりインキュベートし、光から保護した。試料を96ウェルプレートに移し、吸光度を490nmにおいて測定した。反応を、2つ組において行い、平均値を報告する。タンパク質レベルおよび酵素活性を、ウイルスゲノム値により正規化した。

【０１４７】

WT C57Bl/6マウスにおける試験

無作為に処置群に割り当てられたWT C57Bl/6マウスにおいて、CO1、CO2、CO3、CO6、CO7、CO9およびWTコンストラクトを試験した。マウスを、1回の尾静脈注射で処置した。実験群および用量は、表13～15にあるとおりである。

【０１４８】

高用量(5.0E12vg/kg)によるオスWT C57Bl/6マウスの形質導入の結果、CO3およびCO6が、CO1およびWTコンストラクトと比較して、タンパク質発現および活性の両方に関して最も効率的なコンストラクトであった(図19～20、表3～6)。特に、CO3コンストラクトを注射されたマウスは、等しいウイルスゲノムコピー濃度でWTを注射されたマウスより、3～4倍高い肝臓OTCレベルおよび活性を有した(図19～20、表3～6)。さらに、CO6を注射されたマウスは、WTを注射されたマウスより、4～6倍高い肝臓OTCレベルおよび活性を有した(図19～20)。ウイルスゲノムコピー数は、タンパク質レベルおよび活性と一致した(図19)。

【０１４９】

より低い用量(1.25E12vg/kg)によるオスマウスの形質導入により、CO6コンストラクトが最も効率的であり、WTバージョンより３～４倍高いOTC活性を示すことを確認した(図21、表7～9)。CO3コンストラクトは、等しいウイルスゲノムコピー数でWTを注射されたマウスより、1.5倍高い肝臓OTC活性をもたらした(図21、表7～9)。

【０１５０】
逆に、メスC57Bl/6マウスの形質導入は、数個体の動物において、オスと比較して、より高い変動性およびより低いウイルスゲノム負荷を示した(図22、表10～12)。実際に、メスマウスにおける低下したAAV形質導入は、既に報告されている(Davidoff et al., 2003)。5.0E12vg/kgのCO3を注射されたメスC57Bl/6マウスは、WTより3～4倍高いOTCの発現および活性を有した(図22、表10～12)。形質導入されたマウスの肝臓においてhOTC mRNAレベルを測定した場合、異なるコンストラクト間で統計学的差異は存在せず、このことは、コドン最適化が、遺伝子転写効率に影響を及ぼさなかったことを示している(図23)。
【０１５１】
まとめると、これらのデータは、HUH7遺伝子導入が、コドン最適化されたコンストラクトをスクリーニングするための信頼し得る試験方法であること、およびin vivoで導入遺伝子発現において野生型導入遺伝子よりも効率的であり得る操作されたhOTCカセットを生成することにおいて、コドン最適化戦略が有効であったことを示唆する。特に、CO3およびCO6は、上昇したレベルの触媒的に活性なOTCタンパク質を生成することにおいて、高度に効率的であることが確認された。
【０１５２】
$OTC^{spf-ash}$マウスにおける試験
$OTC^{spf-ash}$マウスにおいて実験を行うために、AAV-hOTC-COコンストラクトの第2のバッチを調製した。この第2のバッチを、まず、形質導入効率を第1のバッチのものと比較するために、オスWT C57BL/6マウスにおいて試験した(図24、表16～19)。タンパク質発現、OTC触媒活性、および細胞1つあたりのウイルスゲノムコピー数について、先の実験におけるものと同様の結果を得た
【０１５３】
in vitroでの結果に基づいて、CO21、CO1、およびCO3コンストラクトを、WT C57BL/6マウスにおいて試験した。AAV8-OTC-CO21は、タンパク質発現を増大することにおいて最も効率的であり、WTコンストラクトと比較して6～8倍高いOTC発現および触媒活性、ならびにCO3コンストラクトと比較して2倍高い触媒活性を有した(図25、表20～23)。
【０１５４】
成体8週齢の$OTC^{spf-ash}$マウスにおいて、WT、CO1、CO3、およびCO6コンストラクトを試験した(表24)。$OTC^{spf-ash}$マウスは、確立されたOTCdのモデルであり、臨床研究において広く用いられている(Moscioni, et al., 2006；Cunningham, et al., 2011；Wang, et al., 2012)。$OTC^{spf-ash}$マウスは、X染色体上に位置するOTC遺伝子のエクソン4の最後のヌクレオチドにおいて、品質を低下させるグアニンからアデノシンへの変異を担持する。このことは、異常なサイレンシング、および正確にスプライシングされたmRNAのうちのわずか5%の生成、および5～10%の残りのOTC酵素活性をもたらす。ヘミ接合性$OTC^{spf-ash}$オスマウスは、生存可能であるが、通常の食餌で維持した場合、より短い寿命を示す。臨床的には、$OTC^{spf-ash}$マウスは、発達遅滞、被毛疎、高アンモニア血症、および尿中オロト酸の増加を呈する。窒素ロードによる成長の負荷により、これらのマウスは、アンモニアにより誘導される脳症を発症する。通常の食餌を与えられているマウスにおける重篤な神経傷害の不在は、これらのマウスを、遅発型OTC欠損(この疾患の温和な形態)のモデルとして用いることができることを示す。
【０１５５】
$OTC^{spf-ash}$マウスにおいて、実験の統計学的有意に達するために必要な最小の群サイズは、G*Powerソフトウェア(バージョン3.1.9.3)を用いて計算した：α＝0.05、1-β＝0.8とし、両側(two tails)で、類似の群サイズ、効果サイズ高で、600μmol/mmolクレアチニンの未処置の$OTC^{spf-ash}$マウスにおける、および100μmolオロト酸/mmolクレアチニンの、200μmol/mmolクレアチニン±SDの処置マウスにおける、尿中オロト酸の値を考慮した。これは、当該欠損の修正における温和な効果に相当する(野生型マウスのレベルは、約60～100μmolオロト酸/mmolクレアチニンである)。計算された最小サイズの群は、マウス3個体であり、本明細書において記載される実験のためには、4個体を用いた。

【０１５６】
尿中オロト酸を用いて、AAV8-hOTCコンストラクト形質導入の後の表現型修正を評価した。尿中オロト酸は、本明細書において記載されるとおり、安定同位体希釈(stable-isotope-dilution)液体クロマトグラフィー質量分析により定量した。1.5mLのチューブ中に尿を回収し、清澄化のために1分間、最大スピードで遠心分離した。10μLの尿を、90μLの安定同位体バッファー(1.25mMのNH_4OAc中0.2mMの1,3-($^{15}N_2$)オロト酸)中で希釈した。液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析を用いて、ネイティブな、および安定な同位体オロト酸について、それぞれ111.1＞155.1および157＞113の移行を用いて、試料をオロト酸について分析した。移動相は、アセトニトリル-0.1%のギ酸からなった。結果を、クレアチニンレベルに対して標準化し、市販の酵素学的キットを用いて測定した(マウスクレアチニンアッセイキット、80350、Crystal Chem)。Cunningham, et al., 2009から適応させた。

【０１５７】
尿中オロト酸を、注射の1日前、および注射の後2週間ごとに測定した。$OTC^{spf-ash}$マウスに注射された全てのrAAV8-hOTCコンストラクトは、注射の8週間後において、オロト酸レベルを低下させ、生理学的レベルを回復させることができた。全てのrAAVベクターは、ベクター送達の8週間後に、尿中オロト酸の正常化をもたらし、CO1およびCO3は、より高い動態学を有し、処置の2週間後においてオロト酸を回復させた(図26、表25)。

【０１５８】
血漿アンモニアレベルもまた、測定した；しかし、$OTC^{spf-ash}$マウスの血液中でのその変動(fluctuations)に起因して、それ自体では、信頼性が高い試験パラメーターであるとみなすことはできない。顎下穿刺により50μLの血液をEDTAを含有するチューブ中に回収し、すぐに氷上に置いた。3,000rcfにおける15分間にわたる遠心分離により血漿を抽出し、すぐに市販のキット(アンモニアアッセイキット、MAK310、Sigma)を用いてアンモニアを測定した。

【０１５９】
WT、CO1、CO3、およびCO6による注射の4週間後、アンモニアレベルは、生理学的レベルより下に、著しく低下した(図27、表26)。オス$OTC^{spf-ash}$マウスの肝臓を、タンパク質発現、OTC触媒活性、およびウイルスゲノムコピー数について分析した。WT C57Bl/6マウスと一致して、CO3およびCO6は、形質導入効率を著しく改善し、ウイルスゲノムコピー数に対して正規化した場合に、それぞれ4倍および６倍の導入遺伝子発現の増大を媒介した(図28、表27～29)。OTC触媒活性は、タンパク質レベルと強力な相関を示した(図28)。

【０１６０】
5.0E11vg/kgの用量で注射されたヘミ接合性$OTC^{spf-ash}$オスマウスを、上記の実験と同じ実験原理に従って分析した。オロト酸を、注射の1日前に、およびウイルス投与の後2週間ごとに定期的に測定した。マウスを、ウイルス投与の8週間後に安楽死させ、肝臓を回収して、OTCタンパク質発現、触媒活性およびウイルスゲノムコピー数を評価した。CO3を注射されたマウスは、WT処置動物と比較して3～4倍の肝臓OTC発現および触媒活性の顕著な増大を有したが、全体的なウイルスゲノムコピー数、および結果的に、hOTCの発現および活性は、重要なことに、先に記載された実験と比較して低下した(図29～30、表34～36)。オロト酸レベルは低下したが、生理学的正常値には達しなかった(図30、表37～38)。

【０１６１】
1.0E12vg/kgのAAV8用量を注射されたヘミ接合性$OTC^{spf-ash}$オスマウスを、８週間後に安楽死させ、肝臓を回収して、OTCタンパク質発現、OTC触媒活性およびウイルスゲノムコピー数を評価した。この実験により、WTおよびCO1コンストラクトと比較して改善された、タンパク質発現および触媒活性に関する、CO3の効力が確認された(図31、表39～41)。

【０１６２】
WT、CO1およびCO3コンストラクトを2つの用量(5.0E11vg/kgおよび1.0E12vg/kg)で注射されたヘテロ接合性メス$OTC^{spf-ash}$マウスは、低下した効率および増大した変動性を有し、これは、WT C57Bl/6マウス実験において既に観察されたとおりである(図32、表42～43)

。しかし、1.0E12vg/kg処置マウスの肝臓におけるhOTCタンパク質の定量および活性分析により、CO3コンストラクトが最も効率的なコンストラクトであることが確認され、効率は、WTと比較して4～5倍増大し、CO1に関しては1.5～2倍増大した(図33、表44～46)。

【０１６３】

CO21コンストラクトを、次いで、OTC$^{spf-ash}$マウスにおいて、並列比較実験において、WTおよびCO3コンストラクトと一緒に、1.0E12vg/kgの初期用量において評価した。さらに、CO21コンストラクトを潜在的な臨床候補としてさらに特徴づけるために、3つの異なる用量：1.0E12vg/kg、5.0E11vg/kg、および2.5E11vg/kgを用いて、CO21についての用量発見研究を行った(表47～49)。用量発見実験は、WTコンストラクトとの並列比較において行った。

【０１６４】

1.0E12vg/kgの用量を注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスの分析により、3つ全てのコンストラクトが、OTCの表現型を修正することができ、注射の2週間後に尿中オロト酸濃度を生理学的レベルに低下させることが示された(図35、表53)。しかし、CO21が、最良の動態学および効率を実証し、経時的により安定な低下を示した(図35)。CO3またはCO21を注射されたマウスの肝臓におけるOTCタンパク質レベルおよび触媒活性の分析は、WTと比較して、匹敵する改善を示した(図34、表50～52)。

【０１６５】

中間用量(5.0E11vg/kg)を注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスからの尿中オロト酸の分析により、オロト酸レベルを生理学的範囲まで低下させることにより表現型を修正することにおいて、CO21の効力がより強いことが示された。逆に、WTを同じ用量で注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスは、治療効果未満の効果をもたらし、オロト酸は生理学的レベルより高かった(図36、37、表54～57)。OTCタンパク質レベルおよび触媒活性の分析により、オロト酸の測定を確認した。実際に、CO21で処置されたマウスは、4倍高い肝臓hOTC発現を有し、これは、OTC表現型を修正すると考えられる(図36、38、表55～57)。

【０１６６】

最後に、より低い用量(2.5E11vg/kg)のWTおよびCO21(2.5E11)を注射されたOTC$^{spf-ash}$マウスは、部分的に修正されることが見出された。尿中オロト酸をグラフで示すと、レベルは病理学的閾値付近で変動しており、不安定であったが、注射の2週間後に、オロト酸の著しい低下が観察された(図40、表61)。CO21は、WTより3倍近く高いhOTC発現効率を維持した(図39、表58～60)。

【０１６７】

まとめると、これらのデータは、CO21が、肝臓において触媒的に活性なhOTCを発現することにおいて、WTよりも約5倍効率的であることを示唆する。より高い発現効率に起因して、CO21は、5.0E11vg/kgの用量において治療効果を提供すし、OTC$^{spf-ash}$表現型を修正するために十分なタンパク質を提供する(図41、表62)。5.0E11vg/kgは、OTC$^{spf-ash}$マウスにおいて、OTCタンパク質の生理学的レベルを回復し、尿中オロト酸を正常値まで低下させるために、十分な用量である。したがって、AAV8-hOTC-CO21コンストラクトは、OTC$^{spf-ash}$マウスにおいて効率的かつ安全なOTC欠損症の修正を媒介する。

【０１６８】

例6：In vivoでのアンモニア負荷

OTC$^{spf-ash}$マウスは、野生型マウスと比較して増大した血中アンモニアレベルを有する。OTC$^{spf-ash}$マウスにおいてアンモニア負荷において、血液からのアンモニア(NH_4)クリアランスの効率を試験した。OTC$^{spf-ash}$マウスに、単一用量の5.0E11vg/kgのAAV8-hOTC-WT(WT)またはAAV8-hOTC-CO21(CO21)を注射した(表63)。注射の4および8週間後、マウスを、7.5mmol/kgの0.64MのNH_4Cl溶液を腹腔内注射するアンモニア負荷実験に供した。B6EiC3Sn-WT(WT-CH3)マウスを、対照として用いた。

【０１６９】

NH_4Cl注射の20分後、マウスを、アンモニア(NH_4)発作を評価するために行動学的試験に供した。表64のスキームに従って、行動学的スコアを各々のマウスに割り当てた(図42、4

4)。運動失調は、動物をブラインドトンネル試験(blind tunnel test)に供することにより測定した。マウスの足を非毒性の塗料中に浸漬し(1つの色で前足を、第2の色で後ろ足を)、マウスをブラインドトンネルの一方の端に置いた(幅10cm×長さ50cm×高さ10cm)。歩行を分析するためにトンネルの底部に白い紙を敷いた。マウスを100dbのベルから1.5メートルに置いて、ベルを3回、各5秒間にわたり鳴らした後に行動を観察することにより、音響に対する応答を決定した。

【０１７０】

行動学的試験の後で、マウスから50μlの血液を回収し、市販のキット(アンモニアアッセイキット、MAK310、Sigma)を用いてアンモニアを測定した。尿中オロト酸もまた測定した。

【０１７１】

表64：行動学的スコアスケール.

【表Ａ】

カテゴリー	行動の説明	スコア
発作の強度	発作なし	2
	ミオクローヌス:自発性痙攣	1
	強直間代性発作:肢(複数)の強直性伸展	0
運動失調	正常歩行	2
	異常歩行	1
	自身を支持することができない:横臥	0
音響への応答	正常、音響に対する応答なし	3
	四肢の攣縮	2
	跳躍	1
	瀕死または横臥	0

【０１７２】

注射の4週間後におけるアンモニア負荷実験は、wt動物に匹敵する行動学的試験のスコアによりおよびNH_4レベル測定により示されるとおり、OTC$^{spf-ash}$マウスをアンモニア負荷から保護することにおいて、CO21が高度に効率的であることを実証した(図42、44、表65～69)。さらに、修正は、注射から8週間まで維持され(安定であり)、注射から8週間において、CO21処置マウスはなおNH_4から保護されており、WT動物に匹敵した(図42、44)。WTコンストラクトは、第2のアンモニア負荷実験の間は特に、アンモニアクリアランスにおいて、割り当てられた全行動学的スコアは、WT動物に割り当てられたスコアよりもわずかに高かったCO21より効率が低かった(図44)。全ての測定されたデータは、OTCタンパク質発現および活性の分子分析と一致する(図42～44)。

【０１７３】

例7：エンハンサー配列の欠失はAAV8-hOTC-CO21のin vivoでの安全性を改善する

AAV8-hOTC-CO21コンストラクトは、5'および3'逆位末端反復配列(ITR)に隣接して、105ヌクレオチド(nt)のエンハンサー配列を含む。エンハンサー配列を、欠失させる(AAV8-hOTC-Δ-CO21、AAV8-hOTC-Δenh-CO21としてもまた言及される)を欠失させて、AAV8-hOTC-CO21コンストラクトのin vivoでの安全性を増大させる。ヒト肝細胞に、AAV8-hOTC-CO21またはAAV8-hOTC-Δ-CO21で形質導入した。AAV8-hOTC-Δ-CO21は、AAV8-hOTC-CO21と比較して増大したタンパク質レベルおよび類似の触媒活性レベルを示した(図45)。

【０１７４】

OTC$^{spf-ash}$マウスに、AAV8-hOTC-CO21またはAAV8-hOTC-Δ-CO21のいずれかを注射した。AAV8-hOTC-Δ-CO21コンストラクトは、尿中オロト酸を低下させ、AAV8-hOTC-CO21コンストラクトに類似するタンパク質レベルをもたらした(図46)。

【０１７５】

例8：マウスにおいて免疫原性を低下させる

小児の患者は、遺伝子治療に対する3つの主な課題を提示する：患者が成長するにつれての経時的なベクターの喪失、AAVの投与が、患者を再処置する可能性を限定する中和抗体の産生を引き起こすこと、およびAAVに対する細胞性免疫応答が、肝臓の炎症および導入遺伝子発現の喪失をもたらすこと。

【０１７６】

導入遺伝子(例えばルシフェラーゼ、アルファ-酸グルコシダーゼ、因子IX凝固因子)をコードするAAV8コンストラクトを、合成ナノ粒子の存在下においてWT C57BL/6マウスまたは非ヒト霊長類(Macaca fasicularis)に注射し、AAV8-導入遺伝子タンパク質に対する抗体の生成を調べた。

【０１７７】

非ヒト霊長類実験のために、3個体のオスカニクイザル(Macaca fasicularis)を、それらの中和性AAV8抗体の欠失に基づいて選択した。第0日において、動物は、処置群に無作為化され、静脈注入を受け(30ml/hのSVP[Rapa](3mg/kgのラパマイシン、n＝2 SVP[Rapa]＃1およびSVP[Rapa]＃2またはSVP[空](n＝1)、その後すぐに、AAV8-アルファ-酸グルコシダーゼ(AAV8-Gaa)ベクター(2.0E12vg/kg)の静脈内注入を受けた。1か月後、各々の動物は、SVP[Rapa](3mg/kgのラパマイシン、n＝2 SVP[Rapa]＃1およびSVP[Rapa]＃2またはSVP[空](n＝1)2回目の注入を受け、その後、AAV8-ヒト因子IX凝固因子ベクター(AAV8-hFI.X)(2.0E12vg/kg)の注入を受けた。

【０１７８】

マウスおよび非ヒト霊長類実験において、基線および示された時点において、末梢血を回収し、血清を単離するか、すぐにクエン酸またはEDTAを含むチューブに移して血漿を単離した。剖検において、フレッシュなRPMI培地中で脾臓および鼠径部リンパ節を回収して、多様な臓器を回収し、さらなる分析のために-80℃で保存した。

【０１７９】

ポリマーポリ乳酸(PLA)およびポリ乳酸-ポリエチレングリコール(PLA-PEG)からなる合成ナノ粒子(SVP)を、Kishimoto, et al., 2016, Nat. Nanotechnology and Maldonado, et al., 2015, PNASにおいて記載される水中油型単エマルジョン蒸発法を用いて合成した。簡単に述べると、ラパマイシン、PLAおよびPLA-PEGブロックコポリマーをジクロロメタン溶液中に溶解して、油相を形成した。油相を、リン酸バッファー中のポリビニルアルコールの水溶液に添加し、その後超音波処理した。このようにして形成されたエマルジョンを、リン酸緩衝溶液を含むビーカーに添加し、室温で2時間にわたり攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させた。結果として生じるラパマイシンを含むナノ粒子を、76,6000×gにおける4℃での遠心分離により、2回洗浄し、ペレットを、リン酸緩衝溶液中で再懸濁した。ラパマイシンを含まない裸(bare)のナノ粒子を、ラパマイシンなしで、同一の条件下において調製した。

【０１８０】

Meliani, et al., 2018, Nature Communications, Mingozzi, et al., 2013, Sci. Transl. Med and Meliani, et al., 2017, Blood Adv.におけるもののようなELISAおよびin vitro中和アッセイを用いて、抗体測定アッセイを行った。簡単に述べると、ELISAアッセイのために、Nunc(商標)MaxiSorp(商標)プレート(Thermo Fisher Scientific)を、AAV粒子(2.0E12粒子/mL)で、および免疫グロブリンの連続希釈(マウスの試料についてはIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3；非ヒト霊長類の試料についてはIgGおよびIgM)でコーティングし、標準曲線を得た。一晩の4℃でのインキュベーションの後で、プレートを、PBS-0.05％のTween-20を含有する2％のウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングし、適切な希釈試料を、2つ組においてプレーティングした。試料を、室温で3時間にわたりインキュベート

した。プレートを、次いで洗浄し、HRPに連結した二次抗体をウェルに添加し、1時間にわたり37℃でインキュベートした。プレートを、次いで洗浄し、SIGMAFAST(商標)OPD基質を用いて、492nmにおける吸光度を測定し、結合した抗体の存在を検出した。

【０１８１】

ヒトF.IX導入遺伝子の血漿レベルは、本明細書において記載されるELISAアッセイにおいて測定した。マウス血漿中のhFI.X抗原レベルの検出は、hF.IXに対するモノクローナル抗体(GAFIX-AP、Affinity Biologicals)を用いて行った。非ヒト霊長類の試料において、抗hFIX抗体(MA1-43012、Thermo Fisher Scientified)および抗hFiIX-HRP抗体(CL20040APHP、Tebu-bio)を、それぞれコーティングおよび検出のために用いた。

【０１８２】

選択された血清試料はまた、Meliani, et al., 2015, Hum. Gene. Ther. Methodsにおけるものを用いて、in vitroでの細胞ベースの試験を用いて、抗AAV中和抗体力価について分析した。簡単に述べると、熱により不活性化した試料の連続希釈を、ルシフェラーゼを発現するベクターと混合し、1時間にわたりいインキュベートした。インキュベーションの後で、試料を細胞に添加し、24時間後に、残りのルシフェラーゼ発現を測定した。中和する力価は、非阻害対照と比較して少なくとも50％のルシフェラーゼ発現の阻害を測定した、最も高い試料希釈率として決定した。このアッセイにおいて、1:10の中和抗体(Nab)の力価は、10倍希釈の後で観察される残りのルシフェラーゼシグナルが非阻害対照の50％よりも低い試料の力価を表す。

【０１８３】

P30の幼若OTC$^{spf-ash}$マウスに、5.0E11vg/kgのAAV8-hOTC-CO21(CO21)を注射して、免疫原性を評価した。尿中オロト酸および中和抗体(NAb)を測定した(図47)。AAV8-hOTC-CO21を注射されたマウスにおける尿中オロト酸濃度は、注射の2週間後まで低下したが、その後増大した。中和抗体もまた、AAV8-hOTC-CO21を注射されたOTC$^{spf-ash}$幼若マウスにおいて産生された。本明細書において提示される結果は、経時的なベクターの喪失が起こること、およびAAVの投与が中和抗体の産生を引き起こすことを実証する。このことは、潜在的に、患者を再処置する可能性を限定し、AAVに対する細胞性免疫応答をもたらし、これが、肝臓の炎症および導入遺伝子発現の喪失をもたらす。

【０１８４】

AAV8コンストラクトを、免疫抑制剤ラパマイシンを含む合成ウイルスの粒子(SVP)中にパッケージングし、ラパマイシン(rapa)がin vivoで免疫原性を抑制する能力を調べた。C57BL/6マウスに、4.0E12vg/kgのAAV8-ルシフェラーゼおよびSVP[rapa](8mg/kg)またはSVP[空]を注射した。21日後、マウスに、4.0E12vg/kgのAAV8-hFIXおよびSVP[rapa](8mg/kg)またはSVP[空]を注射した。抗AAV8 IgGおよびhFIXのレベルを、マウスにおいて測定した(図48)。SVP[rapa]の投与は、SVP[空]またはAAV8-hFIXのみを投与されたマウスと比較して、抗AAV8 IgGレベルを低下させた。SVP[rapa]を投与されたマウスにおけるhFIXのレベルは、AAV8-hFIXのみを投与されたマウスと類似し、SVP[空]を投与されたマウスと比較して、著しく増大した(図48)。

【０１８５】

SVP[rapa]またはSVP[空]中にパッケージングされたAAV8コンストラクトの免疫原性を、非ヒト霊長類(Macaca fasicularis)においてさらに調べた。非ヒト霊長類に、2.0E12vg/kgのAAV8-Gaaおよび3mg/kgのSVP[rapa]またはSVP[空]のいずれかを注射した。30日後に、非ヒト霊長類に、2.0E12vg/kgのAAV8-hFIXおよび3mg/kgのSVP[rapa]またはSVP[空]を注射した。非ヒト霊長類において、抗AAV8 IgGおよびhFIXのレベルを測定した(図49)。SVP[rapa]の投与は、SVP[空]を投与された非ヒト霊長類と比較して、抗AAV8 IgGレベルを低下させた。SVP[rapa]を投与された非ヒト霊長類におけるhFIXのレベルは、SVP[空]を投与された非ヒト霊長類と比較して、増大した。本明細書において提示される結果は、AAVベクターと合成ナノキャリアとの同時投与により、導入遺伝子発現を増大させ、AAVベクターに対する免疫応答を低下させることができることを示唆する。

【０１８６】

例9．SVP-ラパマイシンは、OTC$^{spf-ash}$マウスにおけるAAV8-OTC CO21に対する抗AAV8 IgG応答を阻害する

OTC$^{spf-ash}$マウスにおける、ラパマイシンへ連結した合成ナノキャリア(SVP-ラパマイシン)の様々な用量およびAAV8-OTC CO21コンストラクトの、AAV8 IgG応答に対する効果を調べた。OTC$^{spf-ash}$マウスは、以下のとおり投与した：第0日において(1)AAV8-OTC CO21のみ(「AAV」)、(2)AAV8-OTC CO21＋空のナノ粒子対照(「AAV＋NPc」)、(3)AAV8-OTC CO21＋4mg/kgのSVP-ラパマイシン(「AAV＋SVP4」)、(4)AAV8-OTC CO21＋8mg/kgのSVP-ラパマイシン(「AAV＋SVP8」)、または(5)AAV8-OTC CO21＋12mg/kgのSVP-ラパマイシン(「AAV＋SVP12」)。投与の2週間後に抗AAV8 IgG抗体応答を評価し、結果を図50において示す。図において示されるとおり、AAV9-OTC CO21ベクターおよびラパマイシンを含む合成ナノキャリアの投与は、投与されるラパマイシンを含む合成ナノキャリアの用量にかかわらず、抗AAV8 IgG応答を阻害した。

【０１８７】

例10

この例において表されるのは、例1～9において記載される表3～69である。

表3：図19のウェスタンブロット定量.

【表３－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン (Vgに対して正規化)	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
1	OTC-wt (1668)	A2901	0.03	0.74	100	41
		A2902	0.03	0.79		
		A2903	0.06	1.47		
2	OT-C01 (1669)	A2904	0.07	1.79	162	15
		A2905	0.06	1.60		
		A2906	0.06	1.48		
3	OTC-C02 (1692)	A2907	0.07	1.81	286	174
		A2908	0.19	4.87		
		A2909	0.07	1.91		
4	OTC-C03 (1678)	A2910	0.10	2.62	329	73
		A2911	0.15	4.06		
		A2912	0.12	3.18		
1	OTC-wt	A2901	0.05	0.67	100	38

【表３－２】

	(1668)	A2902	0.06	0.91		
		A2903	0.10	1.41		
5	OTC-C06 (1679)	A2913	0.04	0.61	269	186
		A2914	0.22	3.27		
		A2915	0.29	4.19		
6	OTC-C07 (1680)	A2916	0.06	0.83	43	35
		A2917	0.01	0.16		
		A2918	0.02	0.29		
7	OTC-C09 (1681)	A2919	0.04	0.61	36	27
		A2920	0.01	0.08		
		A2921	0.03	0.41		

【０１８８】

表4：図19のOTC触媒活性定量.

【表４－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	OTC 活性 (μmol シトルリン /μgライセート/30 分)			個体平均 ± SD	群平均 ± SD
			Exp 1	Exp 2	Exp 3		
1	OTC-wt (1668)	A2901	45.36	112.6	88.6	82.2 ± 34.1	105.7±81.1
		A2902	29.32	69.0	18.5	38.9 ± 26.6	
		A2903	35.14	274.6	278.2	196.0 ± 139.3	
2	OT-C01 (1669)	A2904	77.44	116.9	218.2	137.5 ± 72.6	160.8±25.8
		A2905	135.76	139.1	290.7	188.5 ± 88.5	
		A2906	119.72	135.4	214.0	156.4± 50.5	
3	OTC-C02 (1692)	A2907	59.94	154.6	211.6	142.0 ± 76.6	165.5±36.0
		A2908	70.14	197.1	353.7	207.0 ± 142.0	
		A2909	81.8	117.4	243.4	147.5 ±84.9	
4	OTC-C03 (1678)	A2910	74.52	161.9	110.8	115.7 ± 43.9	250.5±119.2
		A2911	77.44	267.0	537.1	293.8 ± 231.0	
		A2912	164.92	306.1	554.9	342.0 ± 197.4	
5	OTC-C06	A2913	182.42	161.2	311.7	218.4 ± 81.5	417.1±194.9
		A2914	115.34	386.1	773.5	425.0 ±	

【表４－２】

	(1679)					330.8	
		A2915	138.68	610.0	1075.3	608.0 ± 468.3	
6	OTC-C07 (1680)	A2916	204.3	156.0	235.2	198.5 ± 39.9	176.7±49.9
		A2917	147.42	200.2	288.5	212.0 ± 71.3	
		A2918	135.76	99.4	124.0	119.7 ± 18.6	
7	OTC-C09 (1681)	A2919	112.42	138.1	208.3	152.9 ± 49.6	136.4±19.9
		A2920	145.96	94.7	185.5	142.1 ± 45.5	
		A2921	131.38	85.9	125.7	114.3 ±24.8	
8	未処置	A2922	7.88	55.36	55.4	39.5 ± 27.4	41.2±2.4
		A2923	10.11	62.43	56.1	42.9 ± 28.6	

【０１８９】

表5：図19のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表５－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞		平均	群平均 ± SD
			Exp 1	Exp 2		
1	OTC-wt (1668)	A2901	20.7	18.6	19.6	16.9±3.3
		A2902	24.5	11.4	17.9	
		A2903	9.7	16.9	13.3	
2	OT-C01 (1669)	A2904	39.6	16.9	28.2	28.7±1.6
		A2905	25.1	29.6	27.4	
		A2906	40.9	20.1	30.5	
3	OTC-C02 (1692)	A2907	16.7	13.8	15.2	17.0±10.5
		A2908	8.8	6.2	7.5	
		A2909	29.4	27.1	28.2	
4	OTC-C03 (1678)	A2910	16.6	18.5	17.5	14.8±3.2
		A2911	13.4	9.0	11.2	
		A2912	20.0	11.3	15.6	
5	OTC-C06 (1679)	A2913	56.7	30.9	43.8	20.2±20.5
		A2914	11.0	9.0	10.0	
		A2915	7.6	6.1	6.8	
6	OTC-C07 (1680)	A2916	39.5	43.0	41.3	53.3±31.6
		A2917	28.6	30.3	29.5	
		A2918	88.6	89.7	89.1	
7	OTC-C09	A2919	52.4	45.3	48.8	56.4±8.3

【表５－２】

	(1681)	A2920	64.3	46.0	55.1	
		A2921	75.4	55.0	65.2	

【０１９０】

表6：図20のウェスタンブロット定量.

【表６】

群（オス）	ウイルス名(コード)	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
1	OTC-wt (1668)	A2901	0.48	0.67	100	43
		A2902	0.61	0.85		
		A2903	1.07	1.48		
2	OT-C01 (1669)	A2904	0.99	1.37	125	12
		A2905	0.90	1.24		
		A2906	0.82	1.13		
4	OTC-C03 (1678)	A2910	1.34	1.85	254	61
		A2911	2.04	2.81		
		A2912	2.15	2.97		
5	OTC-C06 (1679)	A2913	0.71	0.97	365	243
		A2914	3.09	4.27		
		A2915	4.13	5.71		

【０１９１】

表7：図21のウェスタンブロット定量.

【表７－１】

群（オス）	ウイルス名(コード)	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
9	OTC-wt (1668)	A3215	0.30	96%	100%	39
		A3216	0.19	63%		
		A3217	0.43	141%		
10	OT-C01 (1669)	A3218	0.29	96%	131%	31
		A3219	0.45	148%		
		A3220	0.46	150%		
11	OTC-	A3221	0.41	133%	94%	35

【表７－２】

	C02 (1692)	A3222	0.20	66%		
		A3223	0.25	81%		
12	OTC-C03 (1678)	A3224	0.26	86%	105%	41
		A3225	0.46	151%		
		A3226	0.23	76%		
9	OTC-wt (1668)	A3215	0.36	100%	100%	18
		A3216	0.30	82%		
		A3217	0.43	118%		
13	OTC-C06 (1679)	A3227	0.64	175%	222%	63
		A3228	0.72	196%		
		A3229	1.07	293%		
14	OTC-C07 (1680)	A3230	0.15	42%	58%	17
		A3231	0.28	76%		
		A3232	0.20	55%		
15	OTC-C09 (1681)	A3233	0.25	69%	146%	108
		A3234	0.81	223%		
		A3235				

【０１９２】

表8：図21のOTC触媒活性定量.

【表８－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	OTC活性(μmolシトルリン/μgライセート/30分)			平均	平均±SD
			Exp. 1	Exp. 1	Exp. 3		
9	OTC-wt (1668)	A3215	128.7	143.0	92.9	121.6	94.1± 27.4
		A3216	113.4	101.1	67.3	93.9	
		A3217	85.9	21.0	93.7	66.9	
10	OT-C01 (1669)	A3218	67.7	311.0	114.8	164.5	138.8±29
		A3219	94.6	95.1	133.2	107.6	
		A3220	113.9	157.5	161.9	144.4	
11	OTC-C02 (1692)	A3221	69.0	53.0	70.8	64.3	74.2±30
		A3222	49.2	52.9	49.2	50.4	
		A3223	93.5	130.0	100.2	107.9	
12	OTC-C03 (1678)	A3224	122.5	84.3	150.4	119.1	123.1± 15.2
		A3225	105.5	92.4	133.0	110.3	
		A3226	85.7	181.3	152.7	139.9	

【表８－２】

13	OTC-C06 (1679)	A3227	164.0	93.2	197.6	151.6	305.5±198.6
		A3228	232.3	226.9	246.7	235.3	
		A3229	491.3	596.9	500.8	529.7	
14	OTC-C07 (1680)	A3230	54.7	41.4	95.8	64.0	93.9± 30.2
		A3231	116.1	62.4	101.7	93.4	
		A3232	85.5	162.4	125.1	124.4	
15	OTC-C09 (1681)	A3233	129.1	143.1	104.2	125.5	108±24.9
		A3234	153.1	31.4	86.5	90.3	
		A3235					
16	未処置	A3236	55.1	88.4	57.5	67.0	62.9±6.8
		A3237	55.8	62.3	46.9	55.0	
		A3238	55.6	91.2	53.4	66.7	

【０１９３】

表9：図21のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表９－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞		平均	群平均±SD
			Exp. 1	Exp. 2		
9	OTC-wt (1668)	A3215	1.61	1.85	1.73	2.7±1.1
		A3216	1.98	2.94	2.46	
		A3217	3.15	4.68	3.92	
10	OT-C01 (1669)	A3218	3.58	3.60	3.59	2.3±1.4
		A3219	0.73	0.94	0.84	
		A3220	2.21	2.84	2.52	
11	OTC-C02 (1692)	A3221	2.16	2.86	2.51	5.4±2.5
		A3222	6.34	7.78	7.06	
		A3223	5.23	8.13	6.68	
12	OTC-C03 (1678)	A3224	6.92	12.57	9.74	7.6±3.4
		A3225	3.21	4.14	3.67	
		A3226	9.13	9.75	9.44	
13	OTC-C06 (1679)	A3227	1.91	2.03	1.97	1.7±1.2
		A3228	2.02	3.45	2.73	
		A3229	0.24	0.41	0.32	
14	OTC-C07 (1680)	A3230	14.28	20.16	17.22	11.8±5.4
		A3231	5.16	7.56	6.36	

【表９－２】

		A3232	9.27	14.12	11.69	
15	OTC-C09 (1681)	A3233	5.97	6.40	6.18	2.9±3.1
		A3234	1.81	2.86	2.34	
		A3235	0.09	0.21	0.15	

【０１９４】

表10：図22のウェスタンブロット定量.

【表１０－１】

群メス	ウイルス名(コード)	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン (Vgに対して正規化)	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
1	OTC-wt (1668)	A2929	0.11	195%	100%	86
		A2930	0.01	27%		
		A2931	0.04	78%		
2	OT-C01 (1669)	A2932	0.10	193%	191%	112
		A2933	0.04	77%		
		A2934	0.16	302%		
3	OTC-C02 (1692)	A2935	0.08	142%	122%	51
		A2936	0.03	64%		
		A2937	0.09	160%		
4	OTC-C03 (1678)	A2938	0.13	242%	190%	75
		A2939	0.07	137%		
		A2940				
1	OTC-wt (1668)	A2929	0.11	159%	100%	59
		A2930	0.03	41%		
		A2931	0.07	100%		
5	OTC-C06 (1679)	A2941	0.10	145%	103%	37
		A2942	0.06	90%		
		A2943	0.05	75%		
6	OTC-C07 (1680)	A2944	0.26	375%	261%	100
		A2945	0.15	213%		
		A2946	0.13	193%		
7	OTC-	A2947	0.05	71%	107%	54

【表１０－２】

	C09 (1681)	A2948	0.12	169%		
		A2949	0.06	81%		

【０１９５】

表11：図22のOTC触媒活性定量.

【表１１】

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

【０１９６】

表12：図22のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表１２】

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

【０１９７】

表13：実験1-高用量-オス.

【表１３－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重(gr)	Vg/マウス	µlウイルス	PBS
1	OTC-wt (1668)	第1プレップ	A2901	5.0E12	23.5	1.15E11	90.4	
			A2902	5.0E12	23.6	1.18E11	90.8	
			A2903	5.0E12	25.4	1.27E11	97.7	
2	OT-C01	第1	A2904	5.0E12	22.4	1.12E11	70	20

【表１３－２】

	(1669)	プレップ	A2904	5.0E12	22.4	1.12E11	70	20
			A2906	5.0E12	22.5	1.12E11	70.3	19.7
3	OTC-C02 (1692)	第1プレップ	A2907	5.0E12	26	1.13E11	17.8	72.2
			A2908	5.0E12	22.3	1.15E11	15.3	74.7
			A2909	5.0E12	21	1.05E11	14.4	75.6
4	OTC-C03 (1678)	第1プレップ	A2910	5.0E12	26.3	1.35E11	18.8	71.2
			A2911	5.0E12	26.1	1.35E11	18.6	71.4
			A2912	5.0E12	22.9	1.35E11	16.4	73.6
5	OTC-C06 (1679)	第1プレップ	A2913	5.0E12	23	1.15E11	31.9	58
			A2914	5.0E12	26.8	1.34E11	37.2	52.8
			A2915	5.0E12	22.3	1.15E11	31	59
6	OTC-C07 (1680)	第1プレップ	A2916	5.0E12	25	1.25E11	11.4	78.6
			A2917	5.0E12	23.8	1.19E11	10.8	79.2
			A2918	5.0E12	25.8	1.29E11	11.7	78.3
7	OTC-C09 (1681)	第1プレップ	A2919	5.0E12	25.3	1.25E11	17.1	72.9
			A2920	5.0E12	25.8	1.29E11	17.4	72.6
			A2921	5.0E12	22.1	1.15E11	14.9	75
8	処置なし		A2922		23.4			90
			A2923		23.8			90
			A2924		20.6			90

【０１９８】

表14：実験1-高用量-メス.

【表１４－１】

群（メス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重 (gr)	Vg/マウス	µlウイルス	PBS
1	OTC-wt (1668)	第1プレップ	A2929	5.0E12	18	9.0E10	69.2	20.7
			A2930	5.0E12	16.7	8.35E10	64.2	25.8
			A2931	5.0E12	18.8	9.4E10	72.3	17.7
2	OT-C01 (1669)	第1プレップ	A2932	5.0E12	19.3	9.65E10	60.3	30
			A2933	5.0E12	16	8.0E10	50	40
			A2934	5.0E12	16.5	8.25E10	51.6	38
3	OTC-C02 (1692)	第1プレップ	A2935	5.0E12	18	9E10	12.3	77.7
			A2936	5.0E12	17.9	8.95E10	12.3	77.7
			A2937	5.0E12	17	8.5E10	11.6	78
4	OTC-C03	第1	A2938	5.0E12	18.1	9.05E10	12.9	77

【表１４－２】

	(1678)	プレップ	A2939	5.0E12	17.4	8.7E10	12.4	77.5
			A2940	5.0E12	10.2	5.1E10	7.3	83
5	OTC-C06 (1679)	第1プレップ	A2941	5.0E12	17.2	8.6E10	23.9	66
			A2942	5.0E12	18.4	9.2E10	25.6	64
			A2943	5.0E12	19	9.5E10	26.4	64
6	OTC-C07 (1680)	第1プレップ	A2944	5.0E12	17.3	8.65E10	7.8	82
			A2945	5.0E12	17.1	8.55E10	7.7	82
			A2946	5.0E12	15.9	7.95E10	7.2	78
7	OTC-C09 (1681)	第1プレップ	A2947	5.0E12	17	8.5E10	11.5	78
			A2948	5.0E12	18.1	9.05E10	12.2	72.6
			A2949	5.0E12	17.7	8.85E10	12	75
8	処置なし		A2950		17.1			90
			A2951		16.3			90
			A2952		18.7			90

【０１９９】

表15：実験1-低用量-メス.

【表１５－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重 (gr)	Vg/マウス	µl ウイルス	PBS
9	OTC-wt (1668)	第1プレップ	A3215	1.25E+12	31	3.88 E+11	29.8	60.2
			A3216	1.25E+12	30	3.7E+11	28.8	61.2
			A3217	1.25E+12	29	3.6E+11	27.9	62.1
10	OT-C01 (1669)	第1プレップ	A3218	1.25E+12	28	3.5E+11	21.9	68.1
			A3219	1.25E+12	31	3.8E+11	24.2	65.8
			A3220	1.25E+12	30	3.75E+11	23.4	66.6
11	OTC-C02 (1692)	第1プレップ	A3221	1.25E+12	31	3.8E+11	5.3	84.7
			A3222	1.25E+12	32	4.0E+11	5.5	84.5
			A3223	1.25E+12	30.5	3.8E+11	5.2	84.8
12	OTC-C03 (1678)	第1プレップ	A3224	1.25E+12	28	3.5E+11	5	85
			A3225	1.25E+12	27	3.4E+11	4.8	85.2
			A3226	1.25E+12	30	3.7E+11	5.4	84.6
13	OTC-C06 (1679)	第1プレップ	A3227	1.25E+12	30	3.7E+11	10.4	79.6
			A3228	1.25E+12	29.5	3.7E+11	10.2	79.8
			A3229	1.25E+12	30	3.75E+11	10.4	79.6

【表１５－２】

14	OTC-C07 (1680)	第1プレップ	A3230	1.25E+12	29	3.7E+11	3.3	86.7
			A3231	1.25E+12	32	4.0E+11	3.6	86.4
			A3232	1.25E+12	30	3.75E+11	3.4	86.6
15	OTC-C09 (1681)	第1プレップ	A3233	1.25E+12	30	3.75E+11	5	84.9
			A3234	1.25E+12	30	3.75E+11	5	84.9
			A3235	1.25E+12	29	3.63E+11	4.9	85.1
16	処置なし		A3236	1.25E+12	28			90
			A3237	1.25E+12	32			90
			A3238	1.25E+12	29			90

【０２００】

表16：実験群および用量-第2の調製.

【表１６－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重（gr）	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
17	OTC-wt (16137)	第2プレップ	A3250	1.25E+12	29	3.63E+10	3	47
			A3251	1.25E+12	32	4.00E+10	3.3	46.7
			A3252	1.25E+12	31	3.88E+10	3.2	46.8
18	OT-C01 (16138)	第2プレップ	A3253	1.25E+12	34	4.25E+10	4.4	45.6
			A3254	1.25E+12	31.5	3.94E+10	4.1	45.9
			A3255	1.25E+12	34	4.25E+10	4.4	45.6
19	OTC-C03 (16139)	第2プレップ	A3256	1.25E+12	25	3.13E+10	4.7	45.3
			A3257	1.25E+12	30	3.75E+10	5.7	44.3
			A3258	1.25E+12	30	3.75E+10	5.7	44.3
20	OTC-C06 (16140)	第2プレップ	A3259	1.25E+12	40	5.00E+10	6.9	43.1
			A3260	1.25E+12	30	3.75E+10	5.2	44.8
			A3261	1.25E+	30	3.75E	5.2	44.8

【表１６－２】

				12		+10		
21	処置なし		A3262	1.25E+12	36			50
			A3263	1.25E+12	36			50

【０２０１】

表17：図24のウェスタンブロット定量.

【表１７】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
17	OTC-wt (16137)	A3250	0.07	87%	100%	31%
		A3251	0.06	79%		
		A3252	0.10	135%		
18	OT-C01 (16138)	A3253	0.19	253%	253%	78%
		A3254	0.16	206%		
		A3255	0.28	359%		
19	OTC-C03 (16139)	A3256	0.64	836%	459%	329%
		A3257	0.24	314%		
		A3258	0.17	227%		
20	OTC-C06 (16140)	A3259	0.27	345%	451%	150%
		A3260	0.43	557%		
		A3261	0.04			

【０２０２】

表18：図24のOTC触媒活性定量.

【表１８－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	マウスコード	OTC活性(μmolシトルリン/μgライセート/30分)		倍率変化/wtOTC/vg	平均 ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
17	OTC-wt (16137)	A3250	44.1	43.4	68%	100 ± 33
		A3251	28.8	31.5	99%	
		A3252	52.1	44.2	133%	
18	OT-C01	A3253	105.6	46.4	115%	86 ± 27
		A3254	95.4	38.1	82%	

【表１８－２】

	(16138)	A3255	88.8	32.1	62%	
19	OTC-C03 (16139)	A3256				229 ± 67
		A3257	158.2	58.6	276%	
		A3258	132.7	58.5	181%	
20	OTC-C06 (16140)	A3259	96.4	34.7	74%	204 ± 145
		A3260	214.6	76.2	360%	
		A3261	162.2	52.8	179%	
21	処置なし	A3262	28.9	16.4		
		A3263	32.7	24.4		

【０２０３】

表19：図24のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表１９】

群(オス)	ウイルス名(コード)	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞		平均	群平均± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
17	OTC-wt (16137)	A3250	10.2	10.71	10.5	7.1 ± 3.0
		A3251	5.7	4.36	5.0	
		A3252	5.8	6.01	5.9	
18	OT-C01 (16138)	A3253	11.7	9.99	10.8	13.4 ± 2.6
		A3254	14.1	12.54	13.3	
		A3255	16.3	15.81	16.0	
19	OTC-C03 (16139)	A3256	1.4	1.27	1.4	5.5 ± 3.7
		A3257	6.9	6.03	6.4	
		A3258	9.4	7.85	8.6	
20	OTC-C06 (16140)	A3259	16.1	12.84	14.5	10.3 ± 4.0
		A3260	7.4	5.77	6.6	
		A3261	10.6	9.08	9.8	

【０２０４】

表20：実験群および用量-C01、C03、C021.

【表２０－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重(g)	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
22	OTCwt (16137)	第2	A4723	1.25E +12	25	3.13E+ 10	2.31	47.69

【表２０－２】

		プレップ	A4724	1.25E+12	27	3.38E+10	2.50	47.50
			A4709	1.25E+12	29	3.63E+10	2.69	47.31
			A4710	1.25E+12	28	3.50E+10	2.59	47.41
23	OTC1 (16138)	第2プレップ	A4711	1.25E+12	28	3.50E+10	3.10	46.90
			A4712	1.25E+12	27	3.38E+10	2.99	47.01
			A4713	1.25E+12	28	3.50E+10	3.10	46.90
			A4722	1.25E+12	25	3.13E+10	2.77	47.23
24	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4715	1.25E+12	30	3.75E+10	5.24	44.76
			A4716	1.25E+12	25	3.13E+10	4.37	45.63
			A4717	1.25E+12	26	3.25E+10	4.55	45.45
			A4720	1.25E+12	23	2.88E+10	4.02	45.98
25	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A4719	1.25E+12	26	3.25E+10	19.12	30.88
			A4721	1.25E+12	25	3.13E+10	18.38	31.62
			A4718	1.25E+12	25	3.13E+10	18.38	31.62
			A4708	1.25E+12	30	3.75E+10	22.06	27.94
26	処置なし		A4726					
			A4727					

【０２０５】

表21：図25のウェスタンブロット定量.

【表２１－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン (Vgに対して	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差

【表２１－２】

			正規化)			
22	OTCwt (16137)	A4723	0.016	103%	100%	42
		A4724	0.021	140%		
		A4709	0.009	57%		
23	OTC1 (16138)	A4711	0.045	296%	345%	60
		A4712	0.050	327%		
		A4713	0.063	412%		
24	OTC 3 (16139)	A4715	0.051	330%	359%	75
		A4716	0.068	444%		
		A4717	0.046	303%		
25	OTC 21 (17115)	A4719	0.078	505%	561%	56
		A4721	0.086	562%		
		A4718	0.095	616%		

【０２０６】

表22：図25のOTC触媒活性定量.

【表２２】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	OD 490nm / vg	倍率変化/ wtOTC	平均 ± SD
22	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4723	0.0153	129%	100 ± 20
			A4724	0.0112	94%	
			A4709	0.0102	86%	
			A4710	0.0106	90%	
23	OTC1 (16138)	第2プレップ	A4711	0.0343	290%	341 ± 37
			A4712	0.0439	371%	
			A4713	0.0400	338%	
			A4722	0.0431	365%	
24	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4715	0.0537	454%	477 ± 59
			A4716	0.0565	478%	
			A4717	0.0493	417%	
			A4720	0.0658	557%	
25	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A4719	0.0733	620%	618 ± 8
			A4721	0.0721	610%	
			A4718	0.0742	627%	
			A4708	0.0727	615%	

【０２０７】

表23：図25のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表２３】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞		平均	群平均±SD
				Exp. 1	Exp. 2		
22	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4723	20.3	23.4	21.9	25±7.8
			A4724	16.0	15.4	15.7	
			A4709	36.3	30.5	33.4	
			A4710	31.1	27.0	29.1	
23	OTC1 (16138)	第2プレップ	A4711	21.5	26.6	24.1	22.6±3.8
			A4712	26.3	28.2	27.2	
			A4713	16.7	20.4	18.6	
			A4722	20.0	21.1	20.5	
24	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4715	31.1	31.1	31.1	23.9±6.5
			A4716	17.8	19.9	18.9	
			A4717	23.5	31.6	27.6	
			A4720	17.5	18.4	18.0	
25	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A4719	13.7			18.1±4.8
			A4721	24.6			
			A4718	18.7			
			A4708	15.4			

【０２０８】

表24：実験群および用量-OTC$^{spf-ash}$パイロット研究.

【表２４－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重 (gr)	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
27	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3633	5.0E+11	23.4	1.17E+10	9.00	41.00
			A3635	5.0E+11	25.5	1.28E+10	9.81	40.19
			A3636	5.0E+11	26.7	1.34E+10	10.27	39.73
			A3637	5.0E+11	28.7	1.44E+10	11.04	38.96

【表２４－２】

28	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3638	5.0E+11	28	1.40E+10	8.75	41.25
			A3640	5.0E+11	19.4	9.70E+09	6.06	43.94
			A3641	5.0E+11	26.8	1.34E+10	8.37	41.63
			A3642	5.0E+11	22	1.10E+10	6.87	43.13
29	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3643	5.0E+11	25	1.25E+10	1.79	48.21
			A3644	5.0E+11	23.3	1.17E+10	1.66	48.34
			A3645	5.0E+11	15	7.50E+09	1.07	48.93
			A3646	5.0E+11	17.1	8.55E+09	1.22	48.78
30	OTC 6 (17115)	第2プレップ	A3647	5.0E+11	22.7	1.14E+10	3.15	46.85
			A3648	5.0E+11	21.4	1.07E+10	2.97	47.03
			A3657	5.0E+11	20.9	1.05E+10	2.90	47.10
			A3658	5.0E+11	22.4	9.50E+09	2.64	47.36
31	処置なし		A3649					
			A3650					

【０２０９】

表25：図26におけるOTC$^{spf-ash}$オスマウスにおける尿中オロト酸測定.

【表２５－１】

群	ウイルス名(コード)	マウスコード	μmol オロト酸 /mmol クレアチニン				
			T0	T2 週間	T4 週間	T6 週間	T8 週間
27	OTCwt (16137)	A3633	530.6	-23.8	99.0	12.1	28.77
		A3635	1790.7	747.7	439.2	569.2	123.82
		A3636	84.6	62.8	94.4	328.8	87.54
		A3637	67.7	17.4	60.7	7.0	76.32
28	OTC1	A3638	346.6	-12.6	44.4	11.2	43.25

【表２５－２】

	(16138)	A3640	340.8	208.3	32.1	32.4	33.2
		A3641					
		A3642	240.8	6.0	215.1	5.0	28.81
29	OTC 3 (16139)	A3643	687.4	118.2	226.2	173.4	76.66
		A3644	77.6	566.5	305.9	6	52.55
		A3645	1247.8	423.7	5.0	167.9	59.43
		A3646	492.7	18.6	21.0	53.2	56.2
30	OTC 6 (17115)	A3647	273.4	519.6	183.2	134.7	173.62
		A3648	223.4	103.3	296.4	75.5	63.47
		A3657	657.9	425.8	76.1	18	69.75
		A3658	354.6	712.7	760.4	50.3	49.66
31	未処置	A3649	1200.0	523.8	757.4	573.5	481.42
		A3650	670.0	577.6	991.5	500	703.48

【０２１０】

表26：図27におけるOTC$^{spf-ash}$オスマウスにおける血漿アンモニアレベル．

【表２６－１】

群	ウイルス名(コード)	マウスコード	mmol NH_4			
			T0		T4 週間	
27	OTCwt (16137)	A3633	2.42	2.25 ± 0.21	0.79	0.72 ± 0.05
		A3635	2.03		0.71	
		A3636	2.44		0.71	
		A3637	2.1		0.68	
28	OTC1 (16138)	A3638	2.56	2.31 ± 0.24	1.25	1.02 ± 0.19
		A3640	2.01		1.07	
		A3641	2.25		0.79	
		A3642	2.41		0.96	
29	OTC 3 (16139)	A3643	3.07	2.92 ± 0.53	0.68	0.72 ± 0.11
		A3644	3.09		0.82	
		A3645	3.37		0.79	
		A3646	2.16		0.57	
30	OTC 6 (17115)	A3647	2.26	2.60 ± 0.60	0.75	0.74 ± 0.04
		A3648	1.93		0.79	
		A3657	2.97		0.71	

【表２６－２】

		A3658	3.22		0.71	
31	未処置		3.26	2.93 ± 0.47	3.93	3.76 ± 0.24
			2.59		3.59	
	WT		1.82	1.84 ± 0.02	1.89	1.78 ± 0.30
			1.85		1.46	

【０２１１】
表27：図28のウェスタンブロット定量.

【表２７－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	バンド強度OTC/チューブリン(Vgに対して正規化)	倍率変化 vs.OTC-wt	平均 ± SD
27	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3633	5.0E+11	1.813	94%	100 ± 28
			A3635	5.0E+11	2.041	105%	
			A3636	5.0E+11	2.598	134%	
			A3637	5.0E+11	1.287	67%	
28	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3638	5.0E+11	5.175	267%	191 ± 117
			A3640	5.0E+11	4.822	249%	
			A3641	5.0E+11			
			A3642	5.0E+11	1.093	57%	
29	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3643	5.0E+11	7.186	349%	357 ± 143
			A3644	5.0E+11	5.176	264%	
			A3645	5.0E+11	14.581	561%	

【表２７－２】

			A3646	5.0E+11	3.411	254%	
27	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3633	5.0E+11	2.244	105%	100 ± 26
			A3635	5.0E+11	2.237	105%	
			A3636	5.0E+11	2.697	126%	
			A3637	5.0E+11	1.374	64%	
29	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3643	5.0E+11	7.186	336%	355 ± 230
			A3644	5.0E+11	5.176	242%	
			A3645	5.0E+11	14.581	682%	
			A3646	5.0E+11	3.411	160%	
30	OTC 6 (17115)	第2プレップ	A3647	5.0E+11	19.657	919%	512 ± 298
			A3648	5.0E+11	5.335	250%	
			A3657	5.0E+11	7.201	337%	
			A3658	5.0E+11	11.615	543%	

【０２１２】

表28：図28のOTC触媒活性定量.

【表２８－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	平均 ± SD	OD 490 nm / vg	倍率変化/ wtOTC	平均 ± SD
27	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4723	85.9	37.2 ± 32.7	0.03	139%	100 ± 20
			A4724	18.2		0.02	70%	
			A4709	17.9		0.03	130%	
			A4710	26.6		0.01	61%	
28	OTC1 (16138)	第2プレップ	A4711	62.8	94.8 ± 107.2	0.09	372%	236 ± 37
			A4712	52.0		0.05	191%	
			A4713	12.2		0.08		

【表２８－２】

			A4722	252.3		0.04	146%	
29	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4715	70.3	79.9 ± 65.1	0.12	486%	365 ± 59
			A4716	46.3		0.06	239%	
			A4717	28.7		0.07	270%	
			A4720	174.1		0.11	465%	
30	OTC 6 (17115)	第2プレップ	A4719	92.5	143.3 ± 57.1	0.30		802 ± 79
			A4721	218.4		0.23	934%	
			A4718	156.1		0.15	624%	
			A4708	106.0		0.21	847%	

【０２１３】

表29：図28のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表２９】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞	平均 ± SD
27	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4723	1.07	0.5 ± 0.4
			A4724	0.30	
			A4709	0.15	
			A4710	0.58	
28	OTC 1 (16138)	第2プレップ	A4711	0.30	1.0 ± 1.6
			A4712	0.45	
			A4713	0.03	
			A4722	3.39	
29	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4715	0.23	0.3 ± 0.3
			A4716	0.26	
			A4717	0.14	
			A4720	0.72	
30	OTC 6 (17115)	第2プレップ	A4719	0.14	0.3 ± 0.2
			A4721	0.44	
			A4718	0.47	
			A4708	0.21	

【０２１４】

表30：実験群および用量-OTC$^{spf-ash}$オス-中間用量.

【表３０】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重(gr)	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3917	5.0E+11	20	1.00E+10	0.83	49.17
			A3918	5.0E+11	20	1.00E+10	0.83	49.17
			A3919	5.0E+11	22	1.10E+10	0.92	49.08
			A3920	5.0E+11	22	1.10E+10	0.92	49.08
			A3921	5.0E+11	20	1.00E+10	0.83	49.17
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3922	5.0E+11	14	7.00E+09	0.73	49.27
			A3923	5.0E+11	19	9.50E+09	0.99	49.01
			A3924	5.0E+11	22	1.10E+10	1.15	48.85
			A3925	5.0E+11	22	1.10E+10	1.15	48.85
			A3926	5.0E+11	22	1.10E+10	1.15	48.85
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3927	5.0E+11	20	1.00E+10	1.52	48.48
			A3930	5.0E+11	20	1.00E+10	1.52	48.48
			A3931	5.0E+11	16	8.00E+09	1.21	48.79
			A3932	5.0E+11	18	9.00E+09	1.36	48.64
			A3933	5.0E+11	19	9.50E+09	1.44	48.56

【０２１５】

表31：実験群および用量-OTC$^{spf-ash}$オス-高用量.

【表３１－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重(gr)	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
35	OTCwt	第2	A3937	1.0E	22	2.20E+	1.83	48.17

【表３１－２】

	(16137)	プレップ		+12		10		
			A3938	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A3939	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A3940	1.0E+12	19	1.90E+10	1.58	48.42
			A3941	1.0E+12	19	1.90E+10	1.58	48.42
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3976	1.0E+12	20	2.00E+10	2.08	47.92
			A3977	1.0E+12	23	2.30E+10	2.40	47.60
			A3978	1.0E+12	22	2.20E+10	2.29	47.71
			A3979	1.0E+12	21	2.10E+10	2.19	47.81
			A3991	1.0E+12	18	1.80E+10	1.88	48.13
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3992	1.0E+12	17	1.70E+10	2.58	47.42
			A3993	1.0E+12	15	1.50E+10	2.27	47.73
			A3994	1.0E+12	21	2.10E+10	3.18	46.82
			A3995	1.0E+12	21	2.10E+10	3.18	46.82
			A3996	1.0E+12	19	1.90E+10	2.88	47.12
38	処置なし		A3934					
			A3935					

【０２１６】

表32：実験群および用量-OTC$^{spf-ash}$メス-中間用量.

【表３２－１】

群メス	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重(gr)	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3865	5.0E+11	20.8	1.04E+10	0.87	49.13
			A3866	5.0E	20.4	1.02E+	0.85	49.15

【表３２－２】

				+11		10		
			A3867	5.0E+11	25	1.25E+10	1.04	48.96
			A3868	5.0E+11	21.5	1.08E+10	0.90	49.10
			A3869	5.0E+11	23	1.15E+10	0.96	49.04
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3870	5.0E+11	22	1.10E+10	1.15	48.85
			A3871	5.0E+11	21	1.05E+10	1.09	48.91
			A3872a	5.0E+11	23	1.15E+10	1.20	48.80
			A3872b	5.0E+11	20.5	1.03E+10	1.07	48.93
			A3873	5.0E+11	26.5	1.33E+10	1.38	48.62
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3874	5.0E+11	23.3	1.17E+10	1.77	48.23
			A3875	5.0E+11	25	1.25E+10	1.89	48.11
			A3876	5.0E+11	23.5	1.18E+10	1.78	48.22
			A3877	5.0E+11	22	1.10E+10	1.67	48.33
			A3878	5.0E+11	21	1.05E+10	1.59	48.41

【０２１７】

表33：実験群および用量-OTC$^{spf-ash}$メス-高用量.

【表３３－１】

群メス	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重(gr)	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3888	1.0E+12	23	2.30E+10	1.92	48.08
			A3889	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A3890	1.0E+12	21	2.10E+10	1.75	48.25
			A3891	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17

【表３３－２】

			A3892	1.0E+12	20	2.00E+10	1.67	48.33
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3893	1.0E+12	22	2.20E+10	2.29	47.71
			A3894	1.0E+12	21.5	2.15E+10	2.24	47.76
			A3895	1.0E+12	18.5	1.85E+10	1.93	48.07
			A3896	1.0E+12	18	1.80E+10	1.88	48.13
			A3897	1.0E+12	18.5	1.85E+10	1.93	48.07
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3898	1.0E+12	18	1.80E+10	2.73	47.27
			A3899	1.0E+12	19	1.90E+10	2.88	47.12
			A3900	1.0E+12	17	1.70E+10	2.58	47.42
			A3901	1.0E+12	17	1.70E+10	2.58	47.42
			A3902	1.0E+12	19	1.90E+10	2.88	47.12

【０２１８】

表34：図29のウェスタンブロット定量.

【表３４－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	バンド強度 OTC/チューブリン (Vgに対して正規化)	OTC-wtの倍率変化	平均 ± SD
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3917	4.26	84%	100 ± 25
			A3918	5.54	109%	
			A3919	3.28	64%	
			A3920	6.43	126%	
			A3921	5.97	117%	
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3922	6.26	123%	214 ± 108
			A3923	10.38	204%	
			A3924	5.06	99%	

【表３４－２】

			A3925	17.94	352%	
			A3926	14.82	291%	
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3917	7.04	102%	100 ± 27
			A3918	3.95	57%	
			A3919	7.17	104%	
			A3920	9.11	132%	
			A3921	7.18	104%	
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3927	15.66	227%	171 ± 70
			A3930	5.40	78%	
			A3931	10.25	149%	
			A3932	15.78	229%	
			A3933			

【０２１９】

表35：図29のOTC触媒活性定量.

【表３５】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	mmol シトルリン	OD 490nm /vg	倍率変化/ wtOTC	平均 ± SD
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3917	6.06	6.39	56%	100 ± 32.7
			A3918	6.35	9.16	80%	
			A3919	7.02	14.63	128%	
			A3920	6.30	11.69	102%	
			A3921	5.77	15.34	134%	
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3922	20.20	50.28	439%	194 ± 143.3
			A3923	8.80	21.59	189%	
			A3924	6.83	13.17	115%	
			A3925	8.66	8.97	78%	
			A3926	8.85	16.76	147%	
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3927	9.33	20.85	182%	397 ± 275.5
			A3930	41.18	90.58	792%	
			A3931	21.93	43.28	378%	
			A3932	19.05	27.16	237%	
			A3933				
38	未処置		A3934	5.14			

【０２２０】

表36：図29のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表３６】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞	平均 ± SD
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3917	0.05	0.086 ± 0.034
			A3918	0.06	
			A3919	0.13	
			A3920	0.08	
			A3921	0.11	
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3922	0.31	0.146 ± 0.098
			A3923	0.13	
			A3924	0.07	
			A3925	0.07	
			A3926	0.15	
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3927	0.15	0.325 ± 0.160
			A3930	0.52	
			A3931	0.37	
			A3932	0.26	
			A3933		

【０２２１】

表37：図30におけるOTC$^{spf-ash}$オスマウスにおける尿中オロト酸測定.

【表３７－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	マウスコード	μmolオロト酸/ mmolクレアチニン				
			T0	T2 週間	T4 週間	T6 週間	T8 週間
32	OTCwt (16137)	A3917	377.0	605.7	480.6	324.2	387.2
		A3918	558.2	378.2	387.5	575.0	415.9
		A3919	345.4	336.2	175.8	150.0	218.5
		A3920	348.2	237.6	127.0	438.8	321.0
		A3921	306.8	348.0	120.9	591.4	399.2
33	OTC1 (16138)	A3922	279.3	493.6	138.9	468.0	149.5
		A3923	537.5	247.6	120.3	544.7	220.5
		A3924	497.1	390.3	512.8	310.5	170.8
		A3925		351.4	264.4	250.7	308.3
		A3926	469.8	391.4	263.8	152.3	232.8

【表３７－２】

34	OTC 3 (16139)	A3927	546.0	372.0	315.1	177.7	304.1
		A3930	404.2	80.9	63.2	39.1	68.8
		A3931	331.7	451.5	150.6	184.5	204.8
		A3932	291.9	229.1	143.0	242.7	171.9
		A3933	286.9	79.2	125.9	107.1	158.4
38	未処置	A3934	400.2	561.0	525.0	689.5	535.2

【０２２２】

表38：図30におけるOTC$^{spf-ash}$マウスにおける尿中オロト酸定量.

【表３８】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	平均 ± SD
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3917	6.06	6.3 ± 4.6
			A3918	6.35	
			A3919	7.02	
			A3920	6.30	
			A3921	5.77	
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3922	20.20	10.7 ± 5.4
			A3923	8.80	
			A3924	6.83	
			A3925	8.66	
			A3926	8.85	
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3927	9.33	22.9 ± 13.3
			A3930	41.18	
			A3931	21.93	
			A3932	19.05	
			A3933		
38	未処置		A3934	5.14	
	C57Bl/6 WT			47	51.5 ± 6.4
				56	

【０２２３】

表39：図31のウェスタンブロット定量.

【表３９】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	バンド強度OTC/HSP70(Vgに対して正規化)	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3937	0.91	54%	100%	30
			A3938	2.06	122%		
			A3939	1.51	89%		
			A3940	2.21	131%		
			A3941	1.77	105%		
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3976	4.36	258%	340%	184
			A3977	9.51	562%		
			A3978	1.27	75%		
			A3979	7.11	420%		
			A3991	6.55	387%		
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3937	0.96	51%	100%	47
			A3938	1.56	84%		
			A3939	1.52	81%		
			A3940	3.30	177%		
			A3941	2.01	107%		
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3992	25.33	1355%	535%	483
			A3993	3.65	196%		
			A3994	10.23	547%		
			A3995	3.44	184%		
			A3996	7.33	392%		

【０２２４】

表40：図31のOTC触媒活性定量.

【表４０－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	OD 490nm/vg	倍率変化/wt OTC	平均 ± SD
35	OTCwt	第2	A3937	59.7	0.18	81%	100 ±

【表４０－２】

	(16137)	プレップ	A3938	35.8	0.25	115%	32
			A3939	32.9	0.14	64%	
			A3940	12.8	0.20	93%	
			A3941	44.0	0.32	147%	
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3976	50.6	1.12	516%	369 ± 214
			A3977	16.8	0.81	372%	
			A3978	41.0	0.22	101%	
			A3979	15.8	0.49	224%	
			A3991	51.6	1.37	632%	
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3992	11.5	0.81	373%	419 ± 399
			A3993	15.1	0.46	210%	
			A3994	54.4	2.43	1120%	
			A3995	28.1	0.42	192%	
			A3996	17.6	0.44	200%	
38	未処置			6.1			

【０２２５】

表41：図31のウイルスゲノムコピー数の定量.

【表４１－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞		平均	群平均 ± SD
				Exp 1	Exp 2		
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3937	13.8	3.4	8.6	4.4 ± 2.8
			A3938	5.5	1.5	3.5	
			A3939	8.7	2.5	5.6	
			A3940	1.6	0.3	1.0	
			A3941	5.3	1.7	3.5	
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3976	1.9	0.5	1.2	1.5 ± 1.8
			A3977	0.6	0.2	0.4	
			A3978	7.3	2.1	4.7	
			A3979	0.9	0.3	0.6	
			A3991	1.4	0.4	0.9	
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3992	0.3	0.2	0.2	0.7 ± 0.4
			A3993	0.9	0.2	0.6	
			A3994	1.0	0.3	0.7	

【表４１－２】

			A3995	2.3	0.6	1.4	
			A3996	1.2	0.4	0.8	

【０２２６】

表42：図32のOTC触媒活性定量.

【表４２】

群メス	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	OD 490nm/vg	倍率変化/wtOTC	平均 ± SD
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3865	59.7	0.11	34%	100 ± 82
			A3866	35.8	0.26	81%	
			A3867	32.9	0.60	192%	
			A3868	12.8	0.56	180%	
			A3869	44.0	0.04	13%	
33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3870	50.6	0.72	230%	101 ± 73
			A3871	16.8	0.27	86%	
			A3872a	41.0	0.21	66%	
			A3872b	15.8	0.17	54%	
			A3873	51.6	0.22	69%	
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3874	11.5	0.13	43%	61 ± 27
			A3875	15.1	0.15	48%	
			A3876	54.4	0.13	41%	
			A3877	28.1	0.33	104%	
			A3878	17.6	0.22	70%	
	未処置			6.1			

【０２２７】

表43：図32のウイルスゲノム定量.

【表４３－１】

群(メス)	ウイルス名(コード)	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞	平均 ± SD
32	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3865	1.13	1.77 ± 1.70
			A3866	1.62	
			A3867	0.59	
			A3868	0.78	
			A3869	4.74	

【表４３－２】

33	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3870	0.99	2.33 ± 0.96
			A3871	2.84	
			A3872a	2.35	
			A3872b	1.93	
			A3873	3.55	
34	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3874	7.39	3.60 ± 2.33
			A3875	2.18	
			A3876	3.48	
			A3877	1.31	
			A3878	3.60	

【０２２８】

表44：図33のウェスタンブロット定量.

【表４４－１】

群（メス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	バンド強度 OTC/HSP70（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均	標準偏差
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3888	0.458	97%	100%	30
			A3889	0.563	119%		
			A3890	0.230	49%		
			A3891	0.537	114%		
			A3892	0.574	122%		
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3893	0.642	136%	237%	130
			A3894	1.534	325%		
			A3895	0.447	95%		
			A3896	1.932	409%		
			A3897	1.044	221%		
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3888	0.458	93%	100%	33
			A3889	0.659	134%		
			A3890	0.230	47%		
			A3891	0.537	109%		
			A3892	0.574	117%		
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3898	1.483	302%	351%	88
			A3899	1.365	278%		

【表４４－２】

			A3900	2.228	453%		
			A3901	2.166	441%		
			A3902	1.378	280%		

【０２２９】

表45：図33のOTC触媒活性定量.

【表４５】

群（メス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	OD 490 nm/vg	倍率変化/wtOTC	平均 ± SD
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3888	90.12	0.254	102%	100 ± 19
			A3889	51.61	0.287	116%	
			A3890	58.07	0.223	90%	
			A3891	37.20	0.178	72%	
			A3892	69.72	0.298	120%	
36	OTC1 (16138)	第2プレップ	A3893	88.54	0.334	135%	218 ± 136
			A3894	84.37	0.889	358%	
			A3895	92.24	0.176	71%	
			A3896	59.49	0.914	368%	
			A3897	57.83	0.389	157%	
37	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A3898	37.05	0.375	151%	265 ± 226
			A3899	77.13	0.458	185%	
			A3900	53.98	0.606	245%	
			A3901	52.95	1.627	656%	
			A3902	35.94	0.213	86%	
38	未処置			28.70			

【０２３０】

表46：図33のウイルスゲノム定量.

【表４６－１】

群（メス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞	平均 ± SD
35	OTCwt (16137)	第2プレップ	A3888	3.35	1.96 ± 0.91
			A3889	1.26	
			A3890	1.99	
			A3891	1.00	

【表４６－２】

			A3892	1.98	
36	OTC1 (16138)	第2 プレップ	A3893	2.49	1.99 ± 1.83
			A3894	0.87	
			A3895	4.98	
			A3896	0.50	
			A3897	1.13	
37	OTC 3 (16139)	第2 プレップ	A3898	0.47	0.72 ± 0.48
			A3899	1.50	
			A3900	0.64	
			A3901	0.23	
			A3902	0.76	

【０２３１】

表47：実験条件および用量CO21-高用量.

【表４７】

群 (オス)	ウイルス名 (コード)	ウイルス バッチ	マウス コード	Vg/Kg	マウス体重 (gr)	Vg/ マウス	µl ウイルス	PBS
39	OTCwt (16137)	第2 プレップ	A4670	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A4672	1.0E+12	25	2.50E+10	2.08	47.92
			A4673	1.0E+12	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A4681	1.0E+12	30	3.00E+10	2.50	47.50
			A4692	1.0E+12	30	3.00E+10	2.50	47.50
40	OTC 3 (16139)	第2 プレップ	A4696	1.0E+12	20	2.00E+10	2.08	47.92
			A4675	1.0E+12	23	2.30E+10	2.40	47.60
			A4676	1.0E+12	26	2.60E+10	2.71	47.29
			A4677	1.0E+12	21	2.10E+10	2.19	47.81
			A4678	1.0E+12	24	2.40E+10	2.50	47.50
41	OTC 21 (17115)	第3 プレップ	A4876	1.0E+12	17	1.70E+10	2.58	47.42
			A4877	1.0E+12	25	2.50E+10	3.79	46.21
			A4878	1.0E+12	21	2.10E+10	3.18	46.82
			A4882	1.0E+12	25	2.50E+10	3.79	46.21
			A4884	1.0E+12	24	2.40E+10	3.64	46.36

【０２３２】

表48：実験条件および用量CO21-中間用量.

【表４８】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重（gr）	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
42	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5395	5.0E+11	24	1.20E+10	0.9	49.1
			A5398	5.0E+11	25.5	1.28E+10	0.9	49.1
			A5399	5.0E+11	29	1.45E+10	1.1	48.9
			A5400	5.0E+11	28	1.40E+10	1.0	49.0
			A5393	5.0E+11	23	1.15E+10	0.9	49.1
43	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5394	5.0E+11	23	1.15E+10	6.8	43.2
			A5396	5.0E+11	24	1.20E+10	7.1	42.9
			A5401	5.0E+11	31	1.55E+10	9.1	40.9
			A5402	5.0E+11	26	1.30E+10	7.6	42.4
			A5409	5.0E+11	29	1.45E+10	8.5	41.5

【０２３３】

表49：実験条件および用量CO21-低用量.

【表４９】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	Vg/Kg	マウス体重（gr）	Vg/マウス	μlウイルス	PBS
44	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5272	2.5E+11	38	9.50E+09	0.7	49.3
			A5273	2.5E+11	25	6.25E+09	0.5	49.5
			A5278	2.5E+11	26	6.50E+09	0.5	49.5
			A5281	2.5E+11	23	5.75E+09	0.4	49.6
			A5272	2.5E+11	38	9.50E+09	0.7	49.3
45	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5275	2.5E+11	23	5.75E+09	3.4	46.6
			A5277	2.5E+11	22.5	5.63E+09	3.3	46.7
			A5279	2.5E+11	26	6.50E+09	3.8	46.2
			A5284	2.5E+11	30	7.50E+09	4.4	45.6
			A5361	2.5E+11	24	6.00E+09	3.5	46.5
46	未処置		A5410					
			A4795					
			A4701					

【０２３４】

表50：図34のウェスタンブロット定量.

【表５０】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	バンド強度 OTC/HSP70（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均 ± SD
39	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4670	0.036	112%	100 ± 49
			A4672	0.022	69%	
			A4673	0.022	69%	
			A4681	0.020	62%	
			A4692	0.062	193%	
40	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4696	0.030	94%	417 ± 120
			A4675	0.151	470%	
			A4676	0.172	537%	
			A4677	0.064	199%	
			A4678	0.145	451%	
39	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4670	0.051	195%	100 ± 54
			A4672	0.017	64%	
			A4673	0.013	50%	
			A4681	0.020	77%	
			A4692	0.035	132%	
41	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A4876	0.105	404%	406 ±.54
			A4877	0.089	341%	
			A4878	0.091	348%	
			A4882	0.083	317%	
			A4884	0.119	457%	

【０２３５】

表51：図34のOTC触媒活性定量.

【表５１－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	OD 490 nm/vg	倍率変化/ wtOTC	平均 ± SD
39	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4670	66.4	0.016	106%	100 ± 68
			A4672	6.4	0.010	64%	
			A4673	1.5	0.007	43%	
			A4681	3.5	0.010	63%	

【表５１－２】

			A4692	20.1	0.035	223%	
40	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4696	12.1	0.008	54%	179 ± 81
			A4675	58.9	0.047	301%	
			A4676	51.5	0.032	206%	
			A4677	90.6	0.021	137%	
			A4678	49.6	0.031	197%	
41	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A4876	20.8	0.048	306%	265 ± 85
			A4877	47.0	0.044	284%	
			A4878	20.4	0.017	112%	
			A4882	113.6	0.052	350%	
			A4884	117.1	0.042	271%	
	未処置			6.1			

【０２３６】

表52：図34のウイルスゲノム定量.

【表５２】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞	平均 ± SD
39	OTCwt (16137)	第2プレップ	A4670	39.6	14.66 ± 14.25
			A4672	10.7	
			A4673	10.9	
			A4681	8.5	
			A4692	3.6	
40	OTC 3 (16139)	第2プレップ	A4696	16.5	16.74 ± 9.66
			A4675	10.5	
			A4676	10.1	
			A4677	33.4	
			A4678	13.2	
41	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A4876	6.4	14.38 ± 7.34
			A4877	11.3	
			A4878	11.3	
			A4882	17.4	
			A4884	25.5	

【０２３７】

表53：図35の尿中オロト酸定量.

【表５３】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	μmolオロト酸/ mmolクレアチニン				
			T0	T2 週間	T3 週間	T6 週間	T8 週間
39	OTCwt (16137)	A4670	235.4	29.4	43.1	17.4	31.6
		A4672	1648.9	79.0	33.9	47.4	29.3
		A4673	127.2	90,0	17.8	62.8	55.4
		A4681	75.1	64.1	70.4	92.2	114.1
		A4692	197.3	38.3	19.5	43.1	43.0
40	OTC 3 (16139)	A4696	307.62	49.2	39.8	101.4	85.14
		A4675	214.95	79.3	51.3	200.5	113.52
		A4676	575.46	154.3	60	62.3	38.29
		A4677	252.58	61	61.1	74.2	65.9
		A4678	512.53	66.1	70	91.6	44.73
41	OTC 21 (17115)	A4876	316.0	28.3	14.8	31.3	32.2
		A4877	217.2	37.1	21.5	30.2	24.7
		A4878	273.6	6.3	34.5	63.2	49.9
		A4882	157.1	27.9	28.5	27.0	34.1
		A4884		31.2	14.8	31.7	38.7
46	未処置		851.3	511.8		309	405.2

【０２３８】

表54：図37の尿中オロト酸定量.

【表５４－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	μmol オロト酸/ mmolクレアチニン				
			T0	T2 週間	T4 週間	T6 週間	T8 週間
42	OTCwt (16137)	A5395	559.02	470.19	580.13	305.10	62.97
		A5398	429.38	78.11	31.35	68.17	116.55
		A5399	519.97	46.97	50.99	56.61	165.75
		A5400	440.58	64.12	167.41	224.87	
		A5393	187.13	395.56	264.16	300.05	
43	OTC 21 (17115)	A5394	333.56	58.71	65.14	58.52	76.58
		A5396	559.02	23.52	31.11	23.52	56.60
		A5401	429.38	44.84	53.38	92.60	75.40

【表５４－２】

		A5402	519.97	20.46	23.67	35.93	58.22
		A5409	405.13	55.9	20.68	72.33	95.12

【０２３９】

表55：図38のウェスタンブロット定量.

【表５５】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	バンド強度 OTC/HSP70（Vgに対して正規化）	OTC−wtの倍率変化	平均 ± SD
42	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5395	0.33	51%	100 ± 49
			A5398	0.31	104%	
			A5399	0.30	79%	
			A5400	0.45	166%	
			A5393	0.33	51%	
43	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5394	2.01	151%	325 ± 232
			A5396	1.74	165%	
			A5401	1.69	352%	
			A5402	0.98	715%	
			A5409	1.40	242%	

【０２４０】

表56：図38のオロト酸触媒定量.

【表５６】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	OD 490 nm/vg	倍率変化/wtOTC	平均 ± SD
42	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5395	1.17	0.50	209%	100 ± 74
			A5398	10.23	0.19	81%	
			A5399	6.70	0.14	58%	
			A5400	8.47	0.12	52%	
			A5393	2.81			
43	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5394	140.02	0.26	110%	220 ±106
			A5396	140.48	0.77	323%	
			A5401	135.60	0.55	231%	
			A5402	86.99	0.77	323%	
			A5409	44.61	0.27	112%	
	未処置			1.75			

【０２４１】

表57：図38のウイルスゲノム定量.

【表５７】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞	平均 ± SD
42	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5395	0.17	0.74 ± 0.61
			A5398	1.00	
			A5399	1.10	
			A5400	1.40	
			A5393	0.01	
43	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5394	6.77	3.19 ± 2.08
			A5396	2.31	
			A5401	3.12	
			A5402	1.47	
			A5409	2.30	

【０２４２】

表58：図39のウェスタンブロット定量.

【表５８】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	バンド強度 OTC/HSP70（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均 ± SD
44	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5272	0.90	97%	100 ± 21
			A5273	0.68	74%	
			A5278	0.94	102%	
			A5281	1.16	126%	
45	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5275	2.53	193%	192 ± 58
			A5277	1.40	275%	
			A5279	1.16	152%	
			A5284	1.98	125%	
			A5361	0.90	215%	

【０２４３】

表59：図39のOTC触媒活性定量.

【表５９】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	μmol シトルリン	OD 490 nm/vg	倍率変化/ wtOTC	平均 ± SD
44	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5272	11.09	0.50	153%	100 ± 38
			A5273	8.95	0.19	103%	
			A5278	49.80	0.14	72%	
			A5281	45.25	0.12	73%	
45	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5275	26.30	0.26	97%	227 ± 156
			A5277	2.05	0.77	489%	
			A5279	10.80	0.55	229%	
			A5284	164.15	0.77	197%	
			A5361	15.05	0.27	121%	
	未処置			1.75			

【０２４４】

表60：図39のウイルスゲノム定量.

【表６０】

群（オス）	ウイルス名（コード）	ウイルスバッチ	マウスコード	ウイルスゲノム/細胞		平均	群平均 ± SD
				Exp1	Exp 2		
44	OTCwt (16137)	第2プレップ	A5272	0.31	0.5	0.41	2.19±1.85
			A5273	0.58	1.0	0.79	
			A5278	2.04	6.0	4.02	
			A5281	1.65	5.4	3.54	
45	OTC 21 (17115)	第3プレップ	A5275	0.85	2.5	1.67	1.53±1.76
			A5277	0.13	0.1	0.11	
			A5279	0.34	0.5	0.43	
			A5284	2.16	6.8	4.50	
			A5361	0.62	1.3	0.94	

【０２４５】

表61：図40の尿中オロト酸定量.

【表６１－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	マウスコード	μmol オロト酸/ mmolクレアチニン				
			T0	T2 週間	T4 週間	T6 週間	T8 週間
44	OTCwt (16137)	A5272	204.8	89.63	78.47	130.8	111.84
		A5273	1723.	278.25	408.82	150.96	118

【表６１－２】

			4				
		A5278	139.9	339.79	932.68	283	86.2
		A5281	335.8	36.62	51.76	73.16	87
45	OTC 21 (17115)	A5277	400	378.36	225.73	177.03	261.88
		A5279	355	59.82	67.54	33.74	67.47
		A5284	600	55.58	82.89	88.18	114.99
		A5361	1255.9	92.19	180.56	140.2	107.25
	未処置		1140	334	279.9	511.8	252.4

【０２４６】

表62：図41におけるOTC触媒活性定量.

【表６２－１】

群(オス)	ウイルス名(コード)	用量	マウスコード	μmol シトルリン	平均 ± SD
44	OTCwt (16137)	2.5E11	A5272	1.26	6.02 ± 5.7
			A5273	11.50	
			A5278	10.33	
			A5281	1.00	
42	OTCwt (16137)	5.0E11	A5395	5.59	3.94 ± 1.65
			A5398	5.11	
			A5399	3.35	
			A5400	4.23	
			A5393	1.41	
39	OTCwt (16137)	1.0E12	A4670	66.4	20.28 ± 38
			A4672	6.4	
			A4673	5.0	
			A4681	3.5	
			A4692	20.1	
41	OTC 21 (17115)	2.5E11	A5275	5.6	12.8 ± 18.2
			A5277	1.8	
			A5279	40	
			A5284	3.8	
43	OTC 21 (17115)	5E11	A5394	50	48.11 ± 24.66
			A5396	70.24	
			A5401	67.8	

【表６２－２】

			A5402	43.5	
			A5409	9	
45	OTC 21 (17115)	1E12	A4876	47	49.72 ± 39.1
			A4877	20	
			A4878	113.6	
			A4882	52	
			A4884	16	
	未処置			0.87	1.04±0.23
				1.20	
	C57-WT			49	45.63±4.9
				39.9	
				48	

【０２４７】

表63：アンモニア負荷実験群および投与量.

【表６３】

群 (オス)	ウイルス名 (コード)	ウイルス バッチ	マウス コード	Vg/Kg	マウス 体重 (gr)	Vg/ マウス	µl ウイルス	PBS
47	OTCwt (16137)	第2 プレップ	A5819	5.0E+11	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A5820	5.0E+11	25	2.50E+10	2.08	47.92
			A5830	5.0E+11	22	2.20E+10	1.83	48.17
			A5935	5.0E+11	30	3.00E+10	2.50	47.50
48	OTC 21 (17115)	第3 プレップ	A5821	5.0E+11	20	2.00E+10	2.08	47.92
			A5822	5.0E+11	23	2.30E+10	2.40	47.60
			A5932	5.0E+11	26	2.60E+10	2.71	47.29
			A5934	5.0E+11	21	2.10E+10	2.19	47.81
49	未処置		A6416		17			50
			A6417		25			50
			A6422		21			50
			A6423		25			50
50	Wt マウス		A5405		26			50
			A5406		30			50
			A5404		21			50
			A5965		30			50

【０２４８】

表65：図42の第1のアンモニア負荷定量.
【表６５】

群	ウイルス名(コード)	マウスコード	mmol NH_4	μmol OA/mmol クレアチニン	行動試験(スコア)			
					発作	音感受性	歩行	合計
47	OTCwt (16137)	A5819	2.58	65.3	1.5	1	2	4.5
		A5820	1.27	125.2	2	3	2	7
		A5830	0.92	93.0	1.5	2	2	5.5
		A5935	2.60	49.3	2	2	2	6
48	OTC 21 (17115)	A5821	1.19	45.6	2	3	2	7
		A5822	0.94	50.0	2	3	2	7
		A5932	1.32	57.2	2	3	2	7
		A5934	0.96	45.6	2	2.5	2	6.5
49	未処置	A6416	2.62	210	0	1	0	1
		A6417	4.59	353	1	1	1	3
		A6422	5.96	420	0	1	1	2
		A6423	10.48		0	0	0	0
50	Wt マウス	A5405	3.86	70	1	2	2	5
		A5406	3.62	38	2	2	2	6
		A5404	3.24		2	2	2	6
		A5965	3.24		2	2	2	6

【０２４９】
表66：図44の第2のアンモニア負荷定量.
【表６６－１】

群	ウイルス名(コード)	マウスコード	mmol NH_4	μmol OA/mmol	行動試験(スコア)			
					発作	音感受性	歩行	合計
47	OTCwt (16137)	A5819	3.37	140.7	1	1	2	4
		A5820	2.56	117.7	2	2	1	5
		A5830	2.84	93.9	1.5	2	1	4.5
		A5935	1.58	89.2	1	2	2	5
48	OTC 21 (17115)	A5821	1.86	90.9	2	2	2	6
		A5822	3.62	78.8	2	2	1	5
		A5932	1.66	81.8	1	2	1	4
		A5934	2.44	81.2	1	2	2	5

【表６６－２】

49	未処置	A6416	5.57	582.7	0	0	0 死亡	0
		A6417	4.23	341.1	0	0	0 死亡	0
		A6422	4.76	472.0	0	1	1	2
		A6423	6.80	378.0	0	1	1	0
50	Wtマウス	A5405	3.87	102.3	1	2	2	5
		A5406	2.54	108.0	2	2	2	6
		A5404	2.62		2	2	2	6

【０２５０】

表67：図44のウェスタンブロット定量.

【表６７】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	Vg/Kg	バンド強度 OTC/チューブリン（Vgに対して正規化）	OTC-wtの倍率変化	平均 ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	5.00E+11	1.179	138%	100 ± 29
		A5820	5.00E+11	0.741	87%	
		A5830	5.00E+11	0.601	70%	
		A5935	5.00E+11	0.905	106%	
48	OTC 21 (17115)	A5821	5.00E+11	6.145	717%	600.7 ± 115
		A5822	5.00E+11	4.436	518%	
		A5932	5.00E+11	5.826	680%	
		A5934	5.00E+11	4.183	488%	

【０２５１】

表68：図44のOTC触媒活性定量.

【表６８－１】

群（オス）	ウイルス名（コード）	マウスコード	μmol シトルリン	平均 ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	7.27	6.75 ± 2.9
		A5820	9.67	
		A5830	2.77	
		A5935	7.27	
48	OTC 21 (17115)	A5821	78.57	95.10 ± 22.15
		A5822	76.37	
		A5932	102.07	
		A5934	123.37	

【表６８－２】

49	未処置	A6416	1.87	0.87±1.4
		A6417	-0.13	
		A6422		
		A6423		
50	Wt マウス	A5405	92.67	82.52± 14.3
		A5406	72.37	
		A5404		
		A5965		

【０２５２】
表69：図44のウイルスゲノム定量.

【表６９】

群 (オス)	ウイルス名 (コード)	マウス コード	ウイルス ゲノム/細胞	平均 ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	1.4	1.0 ± 0.5
		A5820	1.0	
		A5830	0.3	
		A5935	1.3	
48	OTC 21 (17115)	A5821	1.0	1.5 ± 0.5
		A5822	1.5	
		A5932	1.3	
		A5934	2.1	

【図１】

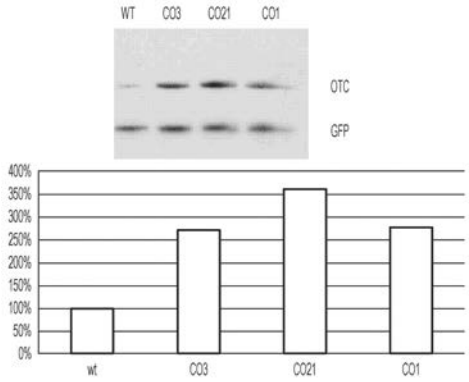


FIG. 1

【図２】

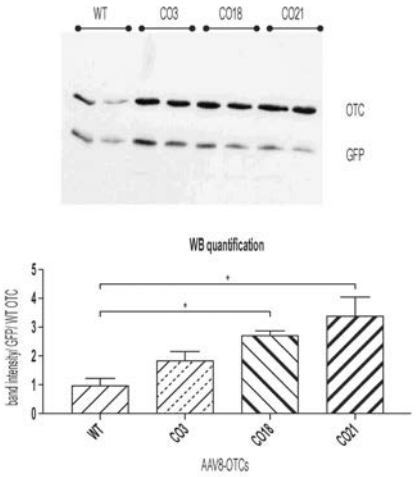


FIG. 2

【図３】

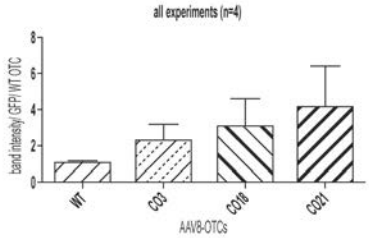


FIG. 3

【図４】

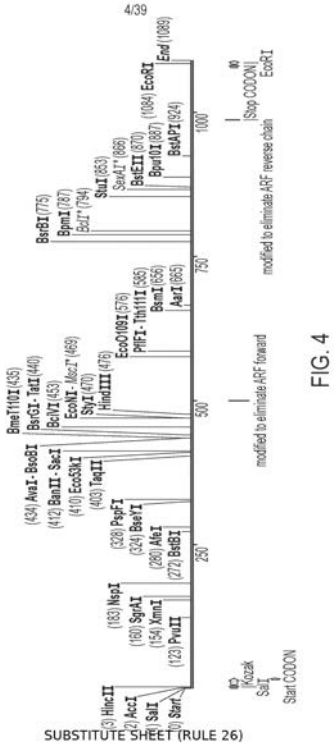


FIG. 4

【図５】

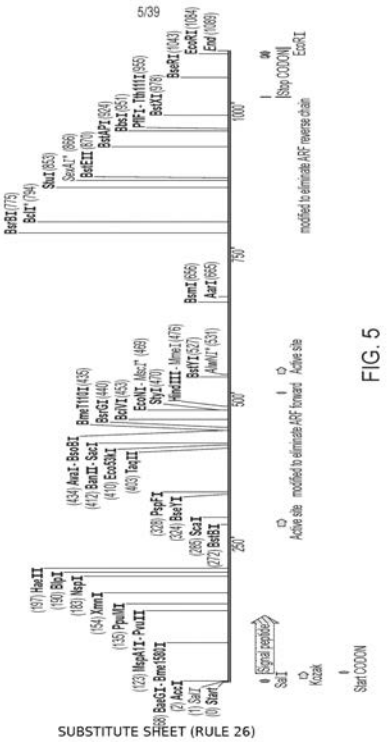


FIG. 5

【図６－１】

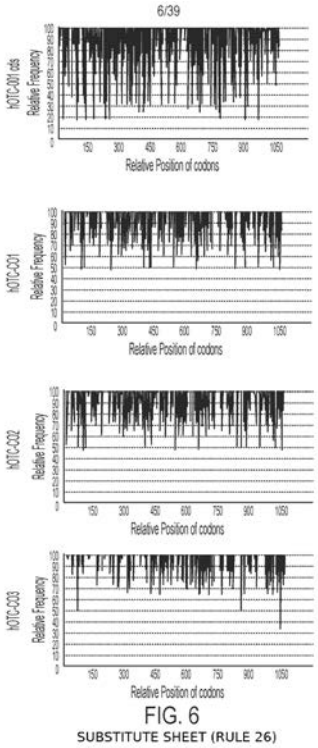


FIG. 6

【図６－２】

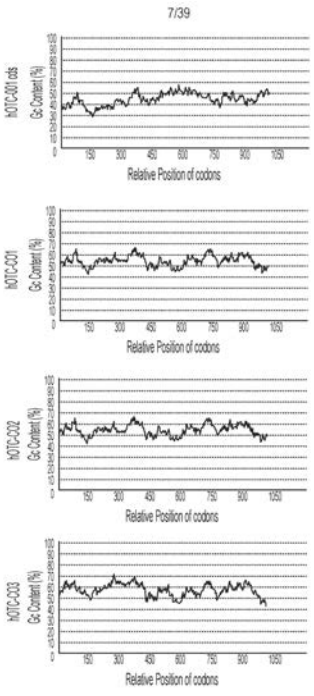


FIG. 6
CONTINUED

【図６－３】

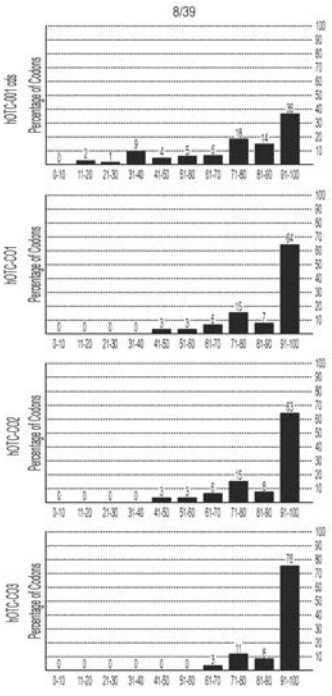


FIG. 6
CONTINUED

【図７】

9/39

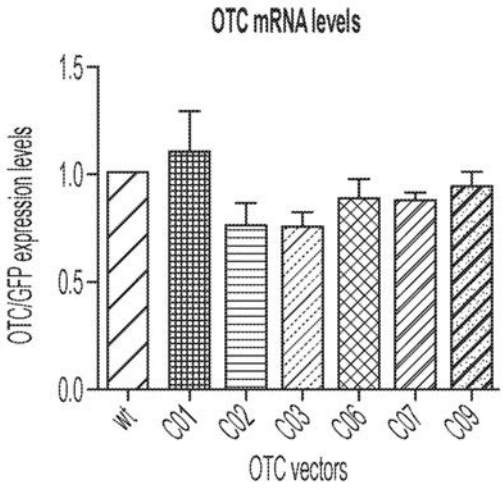


FIG. 7

【図８Ａ】

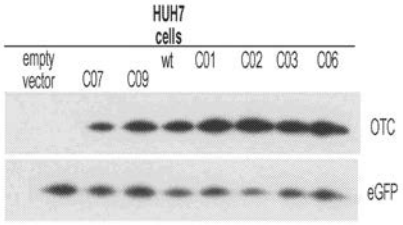


FIG. 8A

【図８Ｂ】

10/39

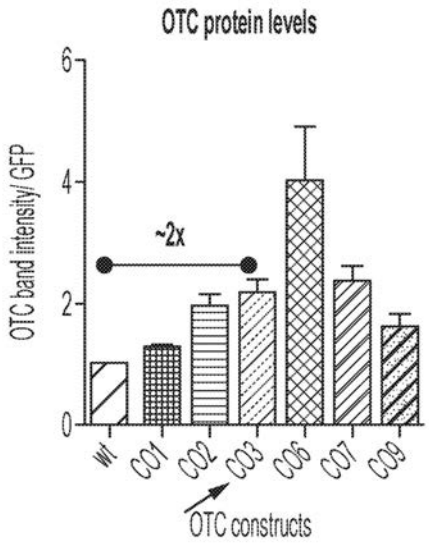


FIG. 8B

【図９】

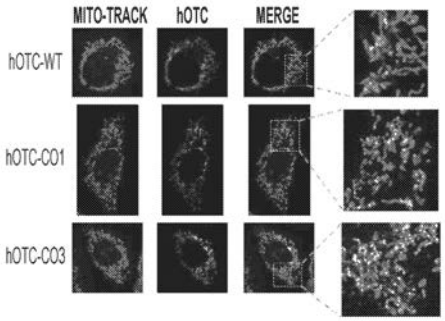


FIG. 9

【図１０】

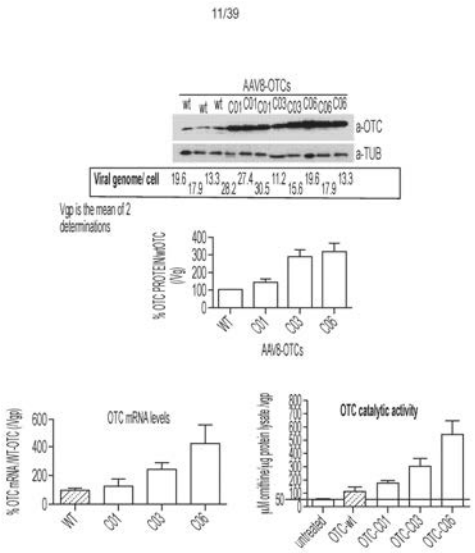


FIG. 10

【図１１】

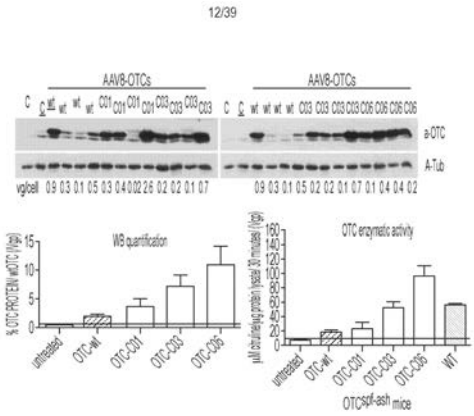


FIG. 11

【図１２】

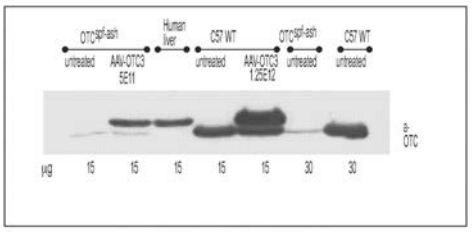


FIG. 12

【図１３】

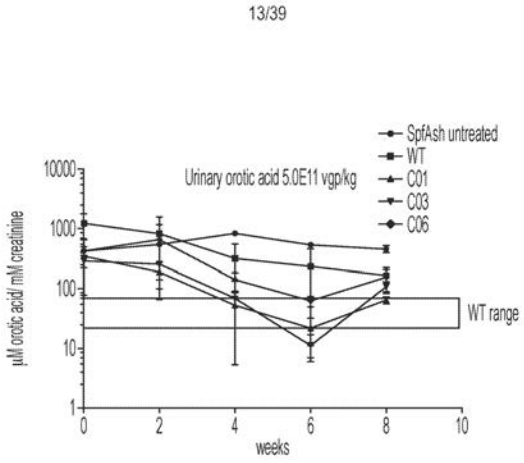


FIG. 13

【図１４】

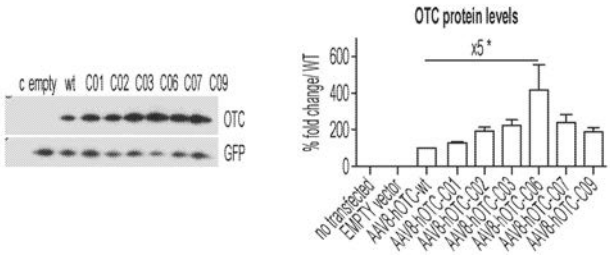


FIG. 14

【図１５】

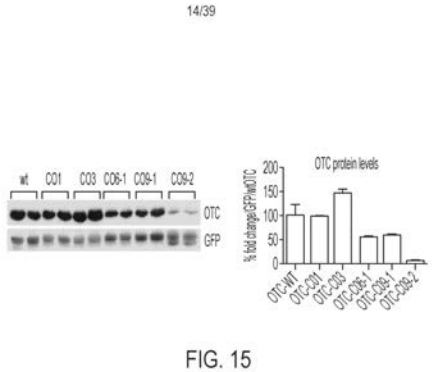


FIG. 15

【図１６－１】

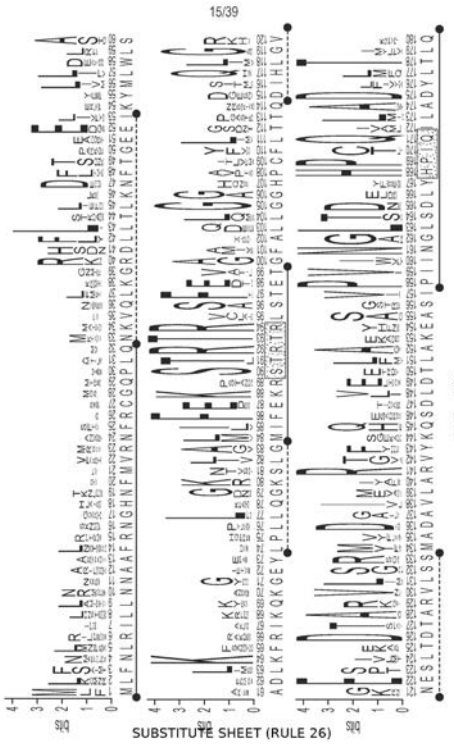
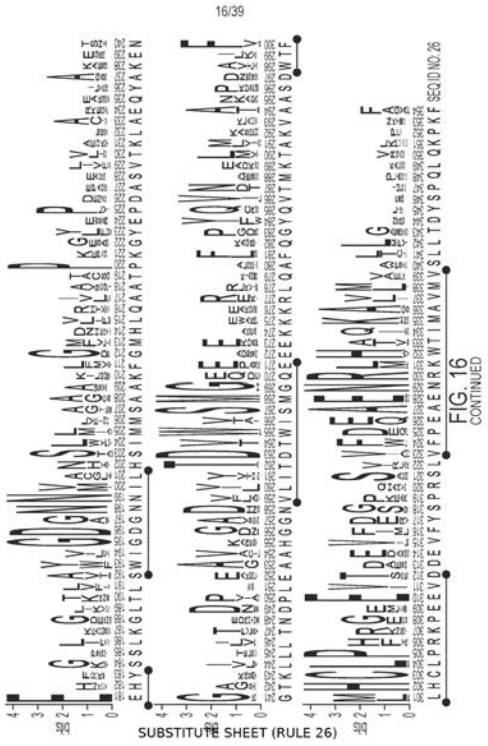


FIG. 16

【図１６－２】



【図１７】

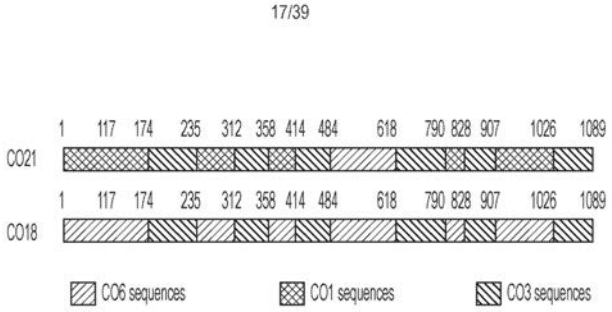


FIG. 17

【図１８】

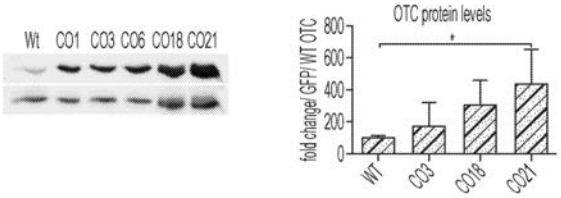


FIG. 18

【図１９】

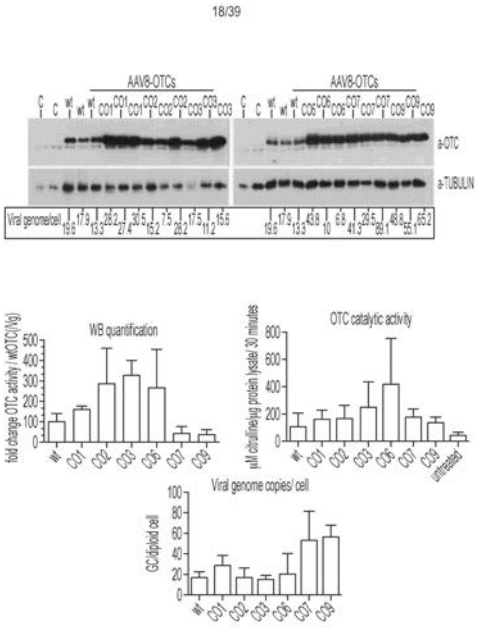


FIG. 19

【図２０】

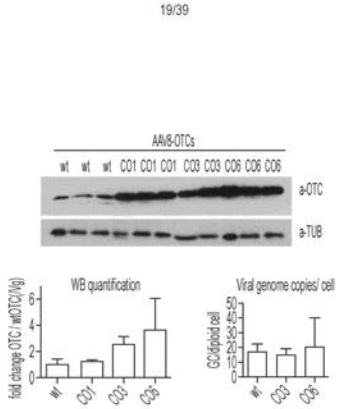


FIG. 20

【図２１】

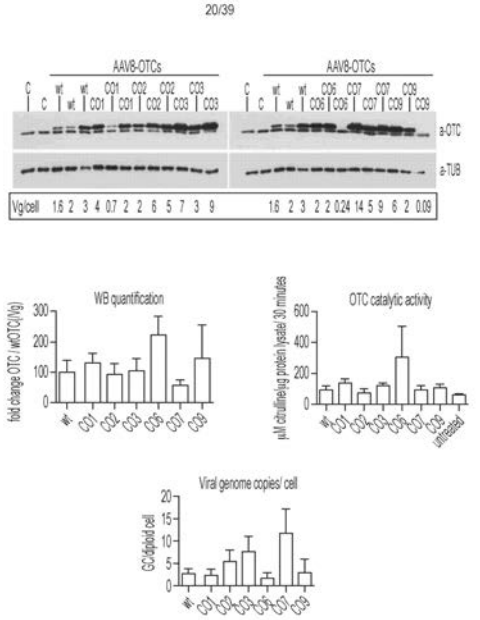


FIG. 21

【図２２】

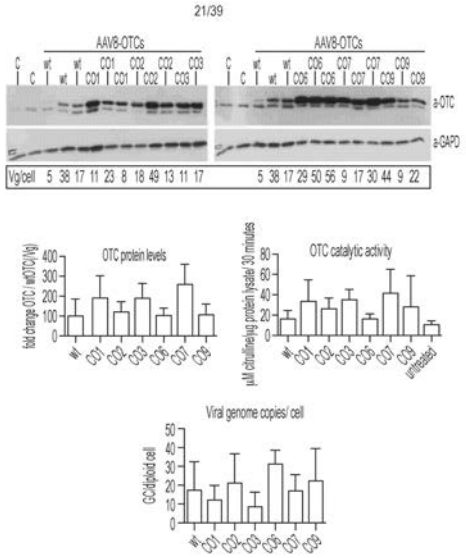


FIG. 22

【図２３】

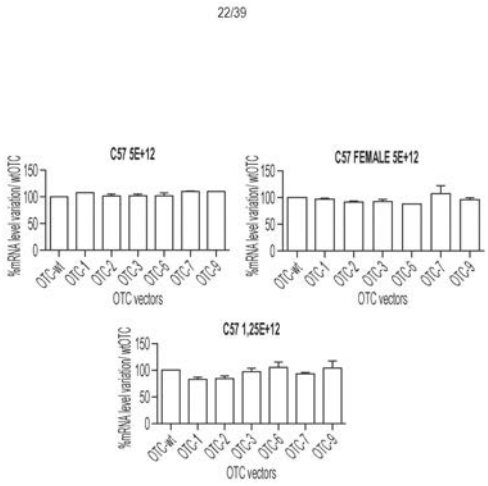


FIG. 23

【図２４】

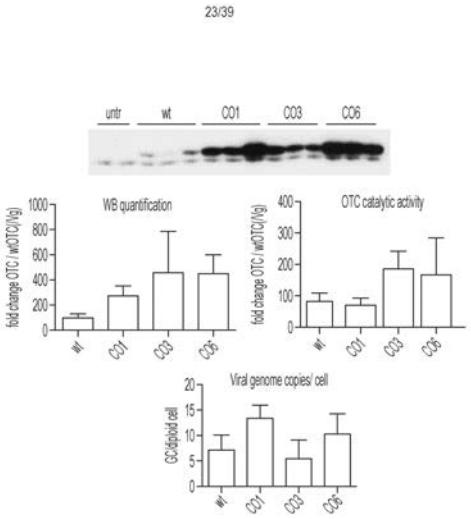


FIG. 24

【図２５】

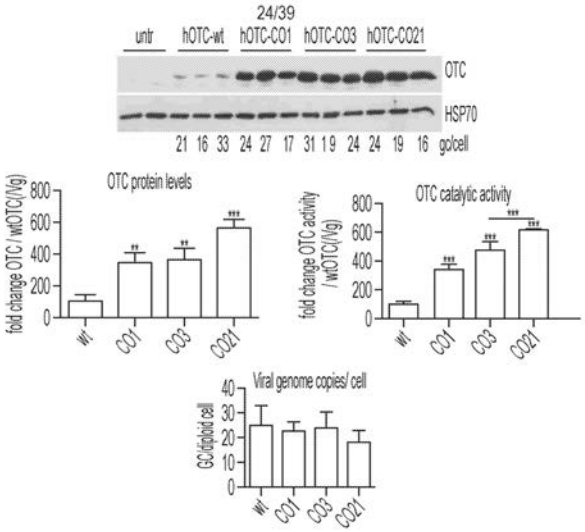


FIG. 25

【図２６】

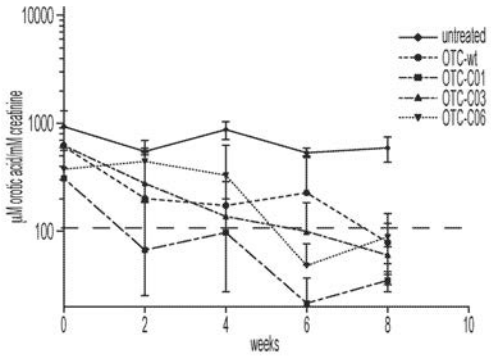


FIG. 26

【図２７】

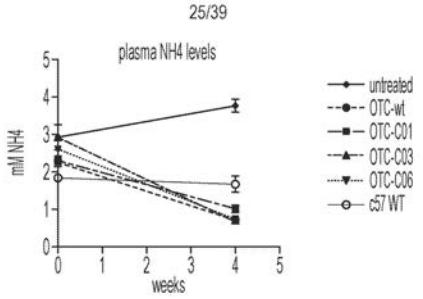


FIG. 27

【図２８】

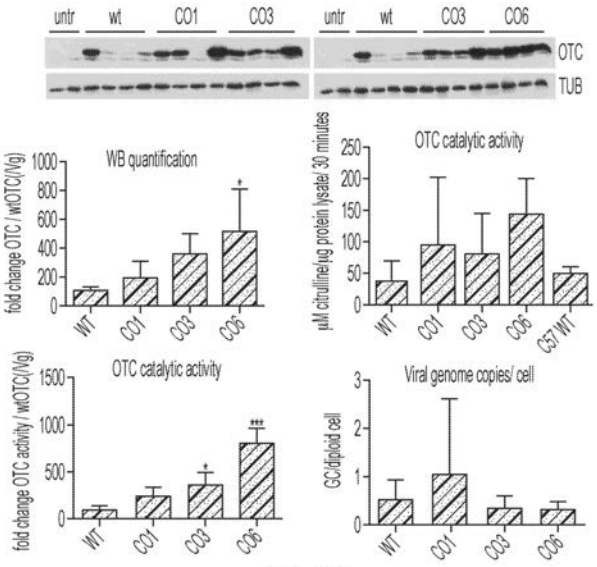


FIG. 28

【図２９】

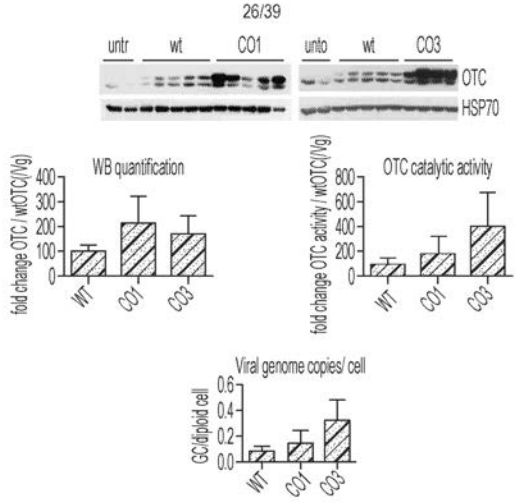


FIG. 29

【図３１】

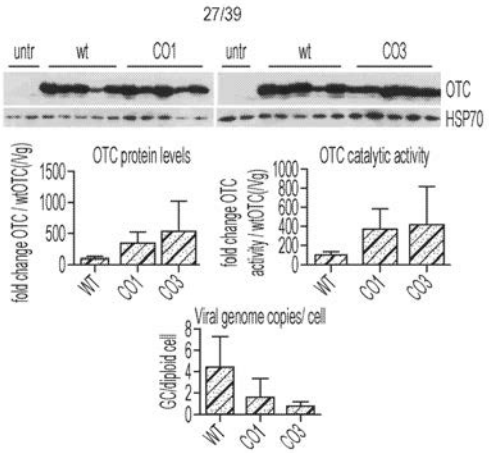


FIG. 31

【図３０】

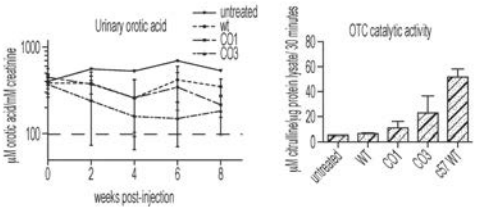


FIG. 30

【図３２】

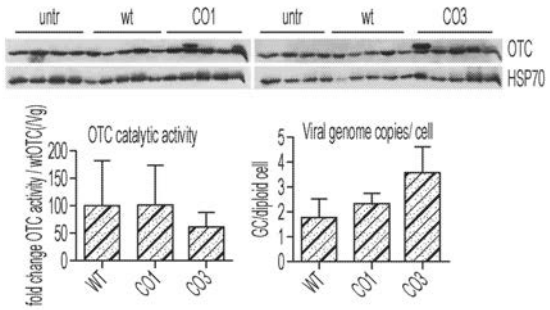


FIG. 32

【図３３】

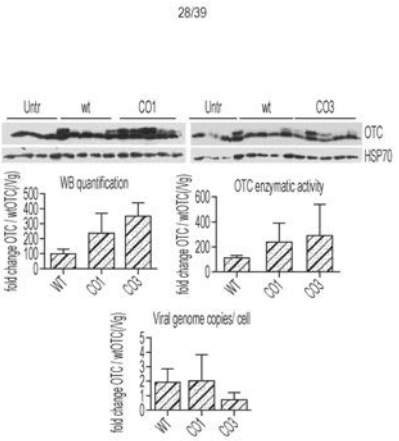


FIG. 33

【図３４】

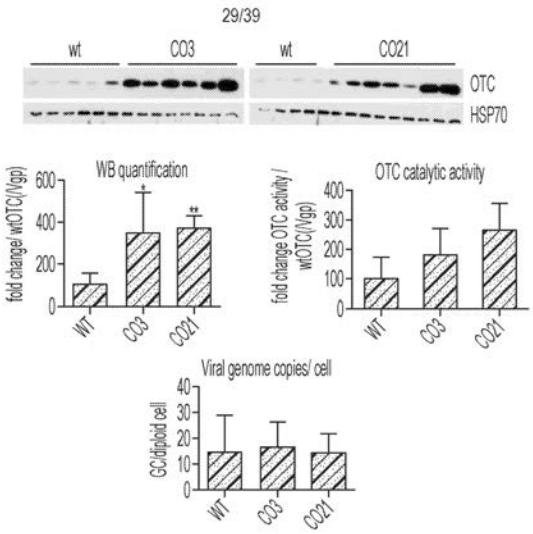


FIG. 34

【図３５】

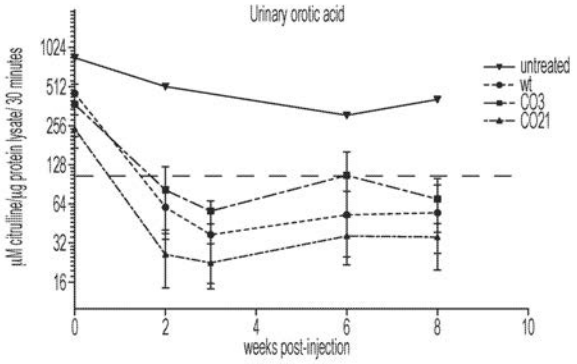


FIG. 35

【図３６】

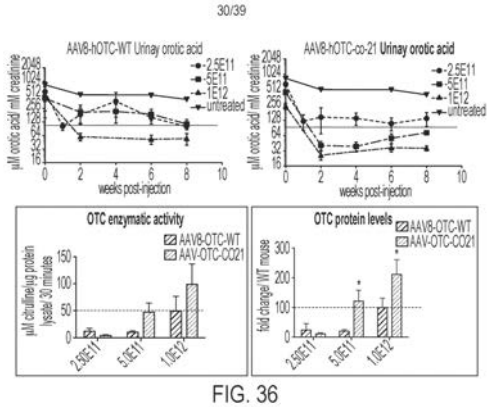


FIG. 36

【図３７】

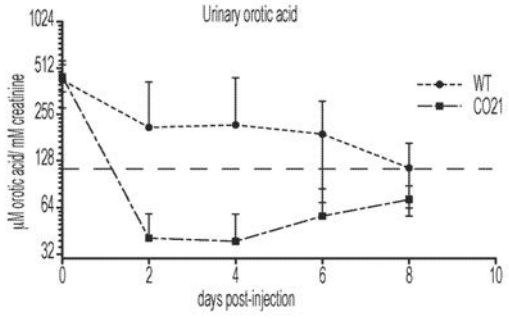


FIG. 37

【図３８】

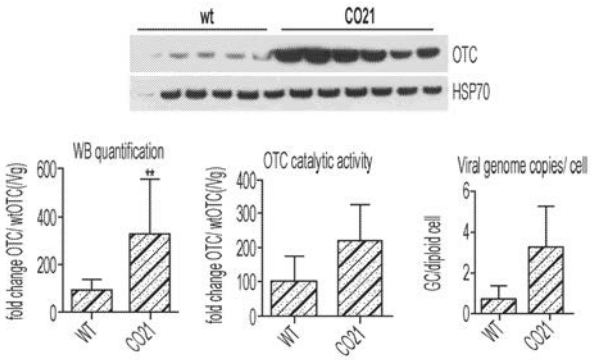


FIG. 38

【図３９】

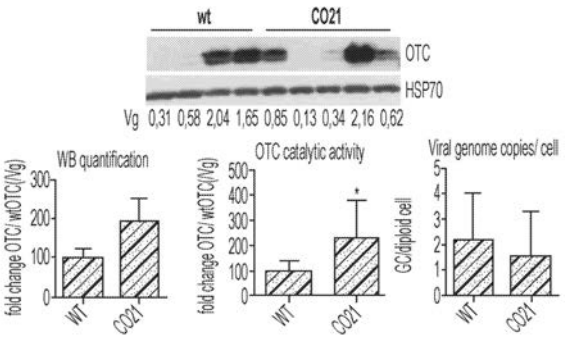


FIG. 39

【図４０】

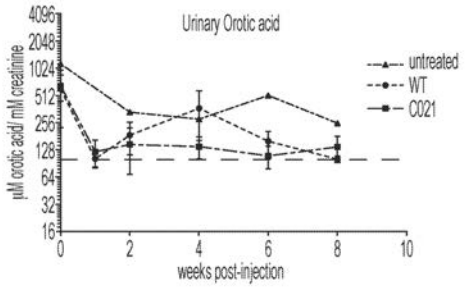


FIG. 40

【図４１】

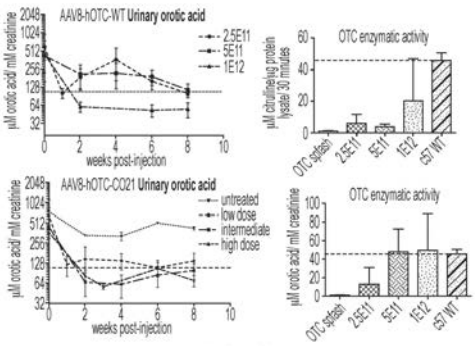
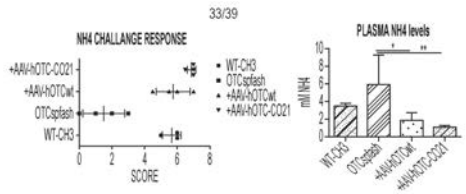


FIG. 41

【図４２】



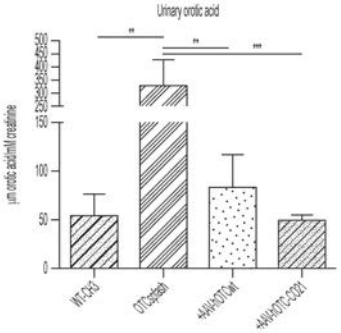


FIG. 42

【図４３】

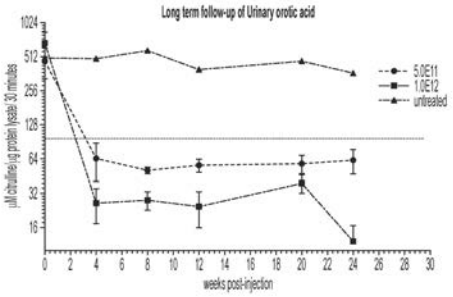


FIG. 43

【図４４】

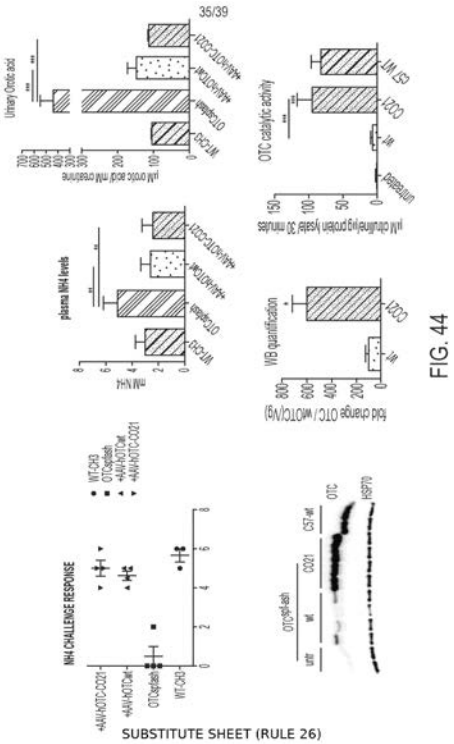


FIG. 44

【図４５】

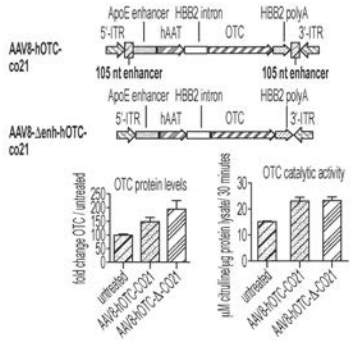


FIG. 45

【図４６】

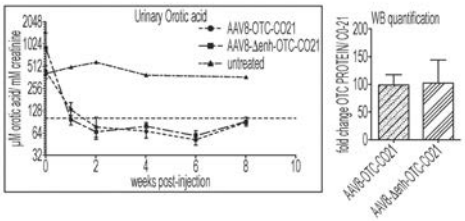


FIG. 46

【図４７】

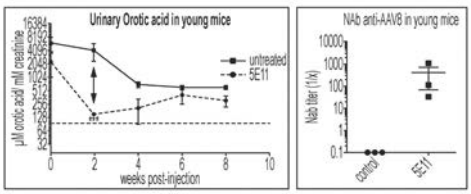


FIG. 47

【図４８】

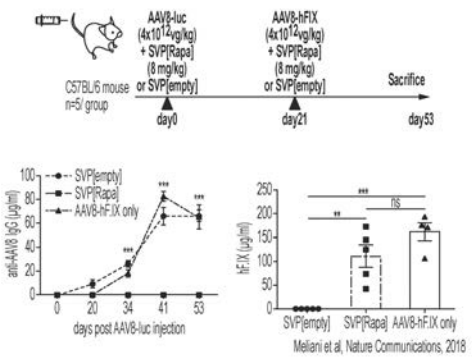


FIG. 48

【図４９】

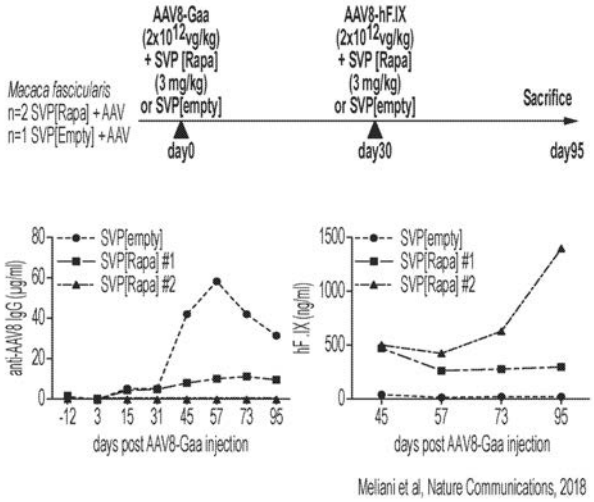


FIG. 49

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【図５０】

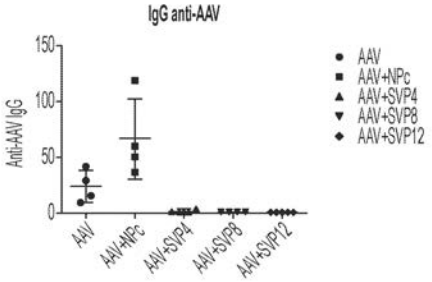


FIG. 50

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【配列表】
2021531282000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/042069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 A61K48/00 C12N9/10 C12N9/88 C12N15/861
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE SABBATA G ET AL: "Development of a novel AAV vector in combination with tolerogenic nanoparticles for the treatment of ornithine transcarbamylase deficiency", HUMAN GENE THERAPY 2017 MARY ANN LIEBERT INC. NLD, vol. 28, no. 12, 2017, XP009515740, ISSN: 1557-7422 the whole document ----- -/--	1-62

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August 2019	16/09/2019

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Chavanne, Franz

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/042069

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R J CHANDLER ET AL: "Liver-directed adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a lethal murine model of citrullinemia type 1", GENE THERAPY, vol. 20, no. 12, 17 October 2013 (2013-10-17), pages 1188-1191, XP55546713, GB ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2013.53 abstract page 5, paragraph 3	43, 45-47, 59-62
X	WO 2015/138148 A1 (MICROSOFT TECHNOLOGY LICENSING LLC [US]) 17 September 2015 (2015-09-17) abstract paragraphs [0008], [0010] sequence 5	43, 45-50, 52-62
X	WO 2018/127382 A1 (ETHRIS GMBH [DE]) 12 July 2018 (2018-07-12) sequences 22, 33	48-50, 52,53, 55-57

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2019/042069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015138148 A1	17-09-2015	CN 106105184 A	09-11-2016
		EP 3117601 A1	18-01-2017
		US 2015254870 A1	10-09-2015
		WO 2015138148 A1	17-09-2015
WO 2018127382 A1	12-07-2018	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	***31/56***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/56	
Ａ６１Ｋ	***47/69***	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	47/69	
Ａ６１Ｐ	***37/06***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｋ	***47/34***	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ	***47/10***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/10	
Ａ６１Ｋ	***31/436***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/436	
Ａ６１Ｋ	***9/14***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/14	
Ｃ１２Ｎ	*15/864*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*15/54*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/54	

(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,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　ケラー，ペーター
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０１９１５、ビバリー、ベリーウッド　レーン　３
(72)発明者　キシモト，タカシ，ケイ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４２０、レキシントン、クーリッジ　アベニュー　４６
(72)発明者　ムーロ，アンドレス
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４７２、ウォータータウン、ビルディング　ワン、アーセナル　ストリート　４８０
(72)発明者　デ　サバタ，ジュリア
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４７２、ウォータータウン、ビルディング　ワン、アーセナル　ストリート　４８０

Ｆターム(参考)　4C076 AA31 AA65 AA95 EE12 EE23 EE59
4C084 AA13 AA19 MA37 NA13 NA14 ZB09 ZC21
4C086 AA01 AA02 CB22 DA08 MA02 MA03 MA05 MA37 NA13 NA14
ZB08 ZC21
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14