(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-534124
(P2024-534124A)
(43)公表日　令和6年9月18日(2024.9.18)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/86 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/86	ＺＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*15/16 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/16		４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/19		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全113頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-512008(P2024-512008)
(86)(22)出願日　令和4年8月22日(2022.8.22)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月3日(2024.4.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/075280
(87)国際公開番号　WO2023/028455
(87)国際公開日　令和5年3月2日(2023.3.2)
(31)優先権主張番号　63/236,215
(32)優先日　令和3年8月23日(2021.8.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　512147244
バイオベラティブ セラピューティクス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５１， ウォルサム， セカンド アベニュー ２２５
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100216105
弁理士　守安 智
(72)発明者　アジャイ・メゴディア
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１．ウォルサム．セカンド・アヴェニュー２２５．バイオベラティブ・セラピューティクス・インコーポレイテッド
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　逆位末端反復配列によるクローズドエンドＤＮＡの作製

(57)【要約】
本開示は、第１の逆位末端反復（ＩＴＲ）、第２のＩＴＲ、および標的配列をコードする遺伝子カセットを含む核酸分子を提供する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、ヒトボカウイルスのＩＴＲである。また、遺伝子治療適用において核酸分子を使用する方法も開示される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
異種ポリヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを挟む、第１の逆位末端反復（ＩＴＲ）および第２のＩＴＲを含む核酸分子であって、
第１のＩＴＲは、配列番号１と少なくとも約７５％同一であるポリヌクレオチド配列を含み、第２のＩＴＲは、配列番号２と少なくとも約７５％同一であるポリヌクレオチド配列を含む、核酸分子。
【請求項２】
第１のＩＴＲは、配列番号１と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％同一であるポリヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の核酸分子。
【請求項３】
第１のＩＴＲは、配列番号１に示されたポリヌクレオチド配列を含む、請求項１または２に記載の核酸分子。
【請求項４】
第２のＩＴＲは、配列番号２と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％同一であるポリヌクレオチド配列を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項５】
第２のＩＴＲは、配列番号２に示されたポリヌクレオチド配列を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項６】
第１のＩＴＲは、配列番号１に示されたポリヌクレオチド配列を含み、第２のＩＴＲは、配列番号２に示されたポリヌクレオチド配列を含む、請求項５に記載の核酸分子。
【請求項７】
プロモーターをさらに含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項８】
プロモーターは、組織特異的プロモーターである、請求項７に記載の核酸分子。
【請求項９】
プロモーターは、器官または組織内における異種ポリヌクレオチド配列の発現を駆動し、器官または組織は、筋肉、中枢神経系（ＣＮＳ）、眼、肝臓、心臓、腎臓、膵臓、肺、皮膚、膀胱、尿路、脾臓、骨髄系およびリンパ系細胞系列、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項７または８に記載の核酸分子。
【請求項１０】
プロモーターは、肝細胞、上皮細胞、内皮細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、類洞細胞、求心性ニューロン、遠心性ニューロン、介在ニューロン、グリア細胞、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア、上衣細胞、肺上皮細胞、シュワン細胞、サテライト細胞、光受容体細胞、網膜神経節細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、樹状細胞、またはこれらの任意の組合せにおける異種ポリヌクレオチド配列の発現を駆動する、請求項７～９のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項１１】
プロモーターは、異種ポリヌクレオチド配列に対して５’側に配置される、請求項７～１０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項１２】
プロモーターは、マウストランスサイレチンプロモーター（ｍＴＴＲ）、天然ヒト第ＶＩＩＩ因子プロモーター、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（ｈＡＡＴ）、ヒトアルブミン最小プロモーター、マウスアルブミンプロモーター、トリステトラプロリン（ＴＴＰ）プロモーター、ＣＡＳＩプロモーター、ＣＡＧプロモーター、サイトメガロ

ウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、α１アンチトリプシン（ＡＡＴ）プロモーター、筋クレアチニンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモーター、ミオシン重鎖アルファ（αＭＨＣ）プロモーター、ミオグロビン（ＭＢ）プロモーター、デスミン（ＤＥＳ）プロモーター、ＳＰｃ５－１２プロモーター、２Ｒ５Ｓｃ５－１２プロモーター、ｄＭＣＫプロモーター、ｔＭＣＫプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、またはＡ１ＡＴプロモーターである、請求項７～１１のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項１３】

異種ポリヌクレオチド配列は、イントロン配列をさらに含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項１４】

イントロン配列は、異種ポリヌクレオチド配列に対して５’側に配置される、請求項１３に記載の核酸分子。

【請求項１５】

イントロン配列は、プロモーターに対して３’側に配置される、請求項１３または１４に記載の核酸分子。

【請求項１６】

イントロン配列は、合成イントロン配列を含む、請求項１３～１５のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項１７】

遺伝子カセットは、転写後調節エレメントをさらに含む、請求項１～１６のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項１８】

転写後調節エレメントは、異種ポリヌクレオチド配列に対して３’側に配置される、請求項１７に記載の核酸分子。

【請求項１９】

転写後調節エレメントは、ウッドチャック肝炎ウイルス調節エレメント（ＷＰＲＥ）、マイクロＲＮＡ結合性部位、ＤＮＡ核ターゲティング配列、ＴＬＲ９阻害配列、またはこれらの任意の突然変異を含む、請求項１７または１８に記載の核酸分子。

【請求項２０】

遺伝子カセットは、３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列をさらに含む、請求項１～１９のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項２１】

３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列は、ｂＧＨポリ（Ａ）、アクチンポリ（Ａ）、ヘモグロビンポリ（Ａ）、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項２０に記載の核酸分子。

【請求項２２】

遺伝子カセットは、エンハンサー配列をさらに含む、請求項１～２１のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項２３】

エンハンサー配列は、第１のＩＴＲと第２のＩＴＲとの間に配置される、請求項２２に記載の核酸分子。

【請求項２４】

核酸分子は、５’側から３’側へと、第１のＩＴＲ、遺伝子カセット、および第２のＩＴＲを含み、遺伝子カセットは、組織特異的プロモーター配列、イントロン配列、異種ポリヌクレオチド配列、転写後調節エレメント、および３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列を含む、請求項１～２３のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項２５】

遺伝子カセットは、５’側から３’側へと、組織特異的プロモーター配列、イントロン配列、異種ポリヌクレオチド配列、転写後調節エレメント、および３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列を含む、請求項２４に記載の核酸分子。

【請求項２６】
遺伝子カセットは、配列番号３のヌクレオチド配列を含む、請求項２５に記載の核酸分子。
【請求項２７】
遺伝子カセットは、一本鎖核酸である、請求項１～２６のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項２８】
遺伝子カセットは、二本鎖核酸である、請求項１～２６のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項２９】
異種ポリヌクレオチド配列は、治療用タンパク質をコードする、請求項１～２８のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３０】
異種ポリヌクレオチド配列は、凝固因子、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、その断片、またはこれらの任意の組合せをコードする、請求項１～２９のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３１】
異種ポリヌクレオチド配列は、凝固因子をコードする、請求項１～３０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３２】
異種ポリヌクレオチド配列は、増殖因子をコードする、請求項１～３０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３３】
異種ポリヌクレオチド配列は、ホルモンをコードする、請求項１～３０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３４】
異種ポリヌクレオチド配列は、サイトカインをコードする、請求項１～３０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３５】
異種ポリヌクレオチド配列は、抗体またはその断片をコードする、請求項１～３０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３６】
異種ポリヌクレオチド配列は、Ｘ連鎖ジストロフィン、ＭＴＭ１（ミオチュブラリン）、チロシンヒドロキシラーゼ、ＡＡＤＣ、シクロヒドロラーゼ、ＳＭＮ１、ＦＸＮ（フラタキシン）、ＧＵＣＹ２Ｄ、ＲＳ１、ＣＦＨ、ＨＴＲＡ、ＡＲＭＳ、ＣＦＢ／ＣＣ２、ＣＮＧＡ／ＣＮＧＢ、Ｐｒｆ６５、ＡＲＳＡ、ＰＳＡＰ、ＩＤＵＡ（ＭＰＳ　Ｉ）、ＩＤＳ（ＭＰＳ　ＩＩ）、ＰＡＨ、ＧＡＡ（酸性アルファグルコシダーゼ）、ＧＡＬＴ、ＯＴＣ、ＣＭＤ１Ａ、ＬＡＭＡ２、またはこれらの任意の組合せをコードする、請求項１～３０のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３７】
異種ポリヌクレオチド配列は、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）をコードする、請求項１～２８のいずれか１項に記載の核酸分子。
【請求項３８】
ｍｉＲＮＡは、ＳＯＤ１、ＨＴＴ、ＲＨＯ、ＣＤ３８、またはこれらの任意の組合せを含む標的遺伝子の発現を下方調節する、請求項３７に記載の核酸分子。
【請求項３９】
凝固因子は、第Ｉ因子（ＦＩ）、第ＩＩ因子（ＦＩＩ）、第ＩＩＩ因子（ＦＩＩＩ）、第ＩＶ因子（ＦＩＶ）、第Ｖ因子（ＦＶ）、第ＶＩ因子（ＦＶＩ）、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）、第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）、第Ｘ因子（ＦＸ）、第ＸＩ因子（ＦＸＩ）、第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）、第ＸＩＩＩ因子（ＦＸＩＩＩ）、フォ

ンウィレブラント因子（ＶＷＦ）、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロネクチン、アンチトロンビンＩＩＩ、ヘパリン補因子ＩＩ、プロテインＣ、プロテインＳ、プロテインＺ、プロテインＺ関連プロテアーゼ阻害剤（ＺＰＩ）、プラスミノーゲン、アルファ２アンチプラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤１（ＰＡＩ－１）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤２（ＰＡＩ－２）、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項３１に記載の核酸分子。

【請求項４０】

異種ポリヌクレオチド配列は、コドン最適化されている、請求項１～３９のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項４１】

異種ポリヌクレオチド配列は、ヒトにおける発現のためにコドン最適化されている、請求項４０に記載の核酸分子。

【請求項４２】

送達剤と共に製剤化される、請求項１～４１のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項４３】

送達剤は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む、請求項４２に記載の核酸分子。

【請求項４４】

送達剤は、リポソーム、非脂質ポリマー分子、エンドソーム、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項４２に記載の核酸分子。

【請求項４５】

静脈内投与、経皮投与、皮内投与、神経内投与、眼内投与、髄腔内投与、皮下投与、肺内投与、もしくは経口投与、またはこれらの任意の組合せのために製剤化される、請求項１～４４のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項４６】

静脈内投与のために製剤化される、請求項４５に記載の核酸分子。

【請求項４７】

ｉｎ　ｓｉｔｕ注入による投与のために製剤化される、請求項１～４４のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項４８】

吸入による投与のために製剤化される、請求項１～４４のいずれか１項に記載の核酸分子。

【請求項４９】

請求項１～４１のいずれか１項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項５０】

請求項１～４１のいずれか１項に記載の核酸分子、または請求項４９に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項５１】

昆虫細胞である、請求項５０に記載の宿主細胞。

【請求項５２】

請求項１～４１のいずれか１項に記載の核酸を含む医薬組成物。

【請求項５３】

請求項４９に記載のベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項５４】

請求項５０に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項５５】

請求項１～４８のいずれか１項に記載の核酸分子と、核酸分子を、それを必要とする対象へと投与するための指示書とを含むキット。

【請求項５６】

請求項１～４１のいずれか１項に記載の核酸分子を作製するためのバキュロウイルス系

。
【請求項５７】
請求項１～４１のいずれか１項に記載の核酸分子は、昆虫細胞内において作製される、請求項５６に記載のバキュロウイルス系。
【請求項５８】
そのコードタンパク質の発現の低減を呈するように、変異体ＶＰ８０遺伝子を含む組換えバクミドをさらに含む、請求項５６または５７に記載のバキュロウイルス系。
【請求項５９】
請求項１～４８のいずれか１項に記載の核酸分子を含む、ナノ粒子送達系。
【請求項６０】
それを必要とする対象において、異種ポリヌクレオチド配列を発現させる方法であって、対象へと、請求項１～４８のいずれか１項に記載の核酸分子、請求項４９に記載のベクター、または請求項５２～５４のいずれか１項に記載の医薬組成物を投与する工程を含む方法。
【請求項６１】
それを必要とする対象における疾患または障害を処置する方法であって、対象へと、請求項１～４８のいずれか１項に記載の核酸分子、請求項４９に記載のベクター、または請求項５２～５４のいずれか１項に記載の医薬組成物を投与する工程を含む方法。
【請求項６２】
出血障害を処置する方法であって、
核酸分子を、それを必要とする対象へと投与する工程
を含み、核酸分子は、配列番号３のヌクレオチド配列を含む、方法。
【請求項６３】
障害は、Ａ型血友病である、請求項６１または６２に記載の方法。
【請求項６４】
核酸分子は、静脈内投与、経皮投与、皮内投与、神経内投与、眼内投与、髄腔内投与、皮下投与、経口投与、肺内投与、またはこれらの任意の組合せにより投与される、請求項６０～６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６５】
核酸分子は、静脈内投与される、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
核酸分子は、ｉｎ　ｓｉｔｕ注入により投与される、請求項６０～６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６７】
核酸分子は、吸入により投与される、請求項６０～６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
対象は、哺乳動物である、請求項６０～６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６９】
哺乳動物は、ヒトである、請求項６７に記載の方法。
【請求項７０】
ＨＢｏＶ１　Ｒｅｐをコードする配列であって、挿入されたＨＢｏＶ１　Ｒｅｐ配列は、レポーター遺伝子またはその機能的部分のリーディングフレームを破壊する、配列と、
配列番号３、９、１４、３３、または３５のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む異種配列と
を含む、組換えバクミド。
【請求項７１】
第１のバクミドと第２のバクミドとを含む組換えバクミドのセットであって、
第１のバクミドは、Ｒｅｐをコードする配列を含み、挿入されたＲｅｐは、レポーター遺伝子またはその機能的部分のリーディングフレームを破壊し；
第２のバクミドは、配列番号３、９、１４、３３、または３５のヌクレオチド配列を含

む核酸分子を含む異種配列を含む、組換えバクミドのセット。
【請求項７２】
配列番号３、９、１４、３３、または３５の核酸配列を含む安定細胞株であって、核酸配列は、安定細胞株のゲノム内に安定的に組み込まれた、安定細胞株。
【請求項７３】
クローズドエンド化ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）分子を作出する方法であって、昆虫細胞に、請求項６９に記載のバクミドを含む組換えバキュロウイルスを感染させる工程を含む方法。
【請求項７４】
クローズドエンド化ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）分子を作出する方法であって、昆虫細胞に、請求項７０に記載の組換えバクミドのセットを含む組換えバキュロウイルスを感染させる工程を含む方法。
【請求項７５】
クローズドエンド化ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）分子を作出する方法であって、Ｒｅｐタンパク質をコードするバキュロウイルスを、請求項７１に記載の安定細胞株へと導入する工程を含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、参照によりその全体において本明細書に組み入れられる、２０２１年８月２３日に出願された、米国特許仮出願第６３／２３６，２１５号に対する優先権を主張する。
【０００２】
電子的に提出された配列表への言及
ＸＭＬフォーマットにより電子的に提出された配列表（名称：ＳＡ９－４８１＿ＳｅｑＬｉｓｔｉｎｇ．ｘｍｌ；サイズ：１１７，２８５バイト；および作成日：２０２２年８月２２日）の内容は、参照によりその全体において本明細書に組み入れられる。
【背景技術】
【０００３】
遺伝子治療は、様々な疾患を処置する持続的手段に対する、潜在的可能性をもたらす。過去において、多くの遺伝子治療による処置は、典型的に、ウイルスベクターの使用に依拠する。この目的のために選択される、各々が、それらを、多かれ、少なかれ、遺伝子治療に適するものとする、顕著に異なる特性を伴う、多数のウイルス性作用物質が存在する。しかし、一部のウイルスベクターの、所望されない特性は、臨床安全性についての懸念を結果としてもたらし、それらの治療的使用を制限している。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、一般的な遺伝子治療用ベクターであるが、その欠点を伴わない。ＡＡＶゲノムのコード配列は、ウイルスの複製およびパッケージングのほか、導入遺伝子の発現に要求される、逆位末端反復（ＩＴＲ）により挟まれる。ＡＡＶ　ＩＴＲのＴ字形ヘアピン構造は、ＡＡＶベクター内における、導入遺伝子の発現を阻害する、宿主細胞タンパク質による結合を受けやすい。既存のＡＡＶベクター技術の限界を回避しながら、標的配列の効率的かつ持続的発現をもたらすことが必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本明細書では、異種ポリヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを挟む、第１の逆位末端反復（ＩＴＲ）および／または第２のＩＴＲを含む、核酸分子およびその使用が開示される。

【０００６】
本明細書の一態様では、異種ポリヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを挟む、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲを含む核酸分子であって、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲは、ボカウイルスＩＴＲまたはその断片／誘導体（例えば、１型ヒトボカウイルスＩＴＲ）である、核酸分子が提供される。本明細書の別の態様では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲを含む核酸分子であって、第１のＩＴＲは、配列番号１と少なくとも約７５％同一であるポリヌクレオチド配列を含み、第２のＩＴＲは、配列番号２と少なくとも約７５％同一であるポリヌクレオチド配列を含む、核酸分子が提供される。
【０００７】
一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号１と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号１に示されたポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号１と少なくとも約５０％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。
【０００８】
一部の実施形態では、第２のＩＴＲは、配列番号２と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、第２のＩＴＲは、配列番号２に示されたポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号２と少なくとも約５０％同一であるポリヌクレオチド配列を含む。
【０００９】
一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号１に示されたポリヌクレオチド配列を含み、第２のＩＴＲは、配列番号２に示されたポリヌクレオチド配列を含む。
【００１０】
一部の実施形態では、核酸分子は、異種ポリヌクレオチド配列と、プロモーター、エンハンサー、イントロン、転写終結シグナル、または転写後調節エレメントなど、少なくとも１つの発現制御配列とを含む、遺伝子カセットをさらに含む。
【００１１】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、プロモーターをさらに含む。一部の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、器官内における異種ポリヌクレオチド配列の発現を駆動し、この場合、器官は、筋肉、中枢神経系（ＣＮＳ）、視器官、肝臓、心臓、腎臓、膵臓、肺、皮膚、膀胱、尿路、脾臓、骨髄系およびリンパ系細胞系列、またはこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、肝細胞、上皮細胞、内皮細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、類洞細胞、求心性ニューロン、遠心性ニューロン、介在ニューロン、グリア細胞、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア、上衣細胞、肺上皮細胞、シュワン細胞、サテライト細胞、光受容体細胞、網膜神経節細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、樹状細胞、またはこれらの任意の組合せにおける異種ポリヌクレオチド配列の発現を駆動する。一部の実施形態では、プロモーターは、異種ポリヌクレオチド配列に対して５’側に配置される。一部の実施形態では、プロモーターは、マウストランスサイレチンプロモーター（ｍＴＴＲ）、天然ヒト第ＶＩＩＩ因子プロモーター、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（ｈＡＡＴ）、ヒトアルブミン最小プロモーター、マウスアルブミンプロモーター、トリステトラプロリン（ＴＴＰ）プロモーター、ＣＡＳＩプロモーター、ＣＡＧプロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、α１アンチトリプシン（ＡＡＴ）プロモーター、筋クレアチニンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモーター、ミオシン重鎖アルファ（αＭＨＣ）プロモーター、ミオグロビン（ＭＢ）プロモーター、デスミン（ＤＥＳ）プロモーター、ＳＰｃ５－１２プロモーター、２Ｒ５Ｓｃ５－１２プロモーター、ｄＭＣＫプロモーター、ｔＭＣＫプロモーター、またはホスホグリセリン酸キナーゼ（Ｐ

ＧＫ）プロモーターである。
【００１２】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、イントロン配列をさらに含む。一部の実施形態では、イントロン配列は、異種ポリヌクレオチド配列に対して５’側に配置される。一部の実施形態では、イントロン配列は、プロモーターに対して３’側に配置される。一部の実施形態では、イントロン配列は、合成イントロン配列を含む。
【００１３】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、転写後調節エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、異種ポリヌクレオチド配列に対して３’側に配置される。一部の実施形態では、調節エレメントは、突然変異型ウッドチャック肝炎ウイルス調節エレメント（ＷＰＲＥ）、マイクロＲＮＡ結合性部位、ＤＮＡ核ターゲティング配列、またはこれらの任意の組合せを含む。
【００１４】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列をさらに含む。一部の実施形態では、３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列は、ｂＧＨポリ（Ａ）、アクチンポリ（Ａ）、ヘモグロビンポリ（Ａ）、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。
【００１５】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、エンハンサー配列をさらに含む。一部の実施形態では、エンハンサー配列は、第１のＩＴＲと第２のＩＴＲとの間に配置される。
【００１６】
一部の実施形態では、核酸分子は、５’側から３’側へと、第１のＩＴＲ、遺伝子カセット、および第２のＩＴＲを含み、この場合遺伝子カセットは、組織特異的プロモーター配列、イントロン配列、異種ポリヌクレオチド配列、転写後調節エレメント、および３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列を含む。
【００１７】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、５’側から３’側へと、組織特異的プロモーター配列、イントロン配列、異種ポリヌクレオチド配列、転写後調節エレメント、および３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列を含む。
【００１８】
一部の実施形態では、遺伝子カセットは、一本鎖核酸である。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、二本鎖核酸である。
【００１９】
一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、治療用タンパク質をコードする。
【００２０】
一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、凝固因子、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、その断片、またはこれらの任意の組合せをコードする。一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、凝固因子をコードする。一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、増殖因子をコードする。一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、ホルモンをコードする。一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、サイトカインをコードする。
【００２１】
一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、ＦＶＩＩＩタンパク質をコードする。
【００２２】
一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、Ｘ連鎖ジストロフィン、ＭＴＭ１（ミオチュブラリン）、チロシンヒドロキシラーゼ、ＡＡＤＣ、シクロヒドロラーゼ、ＳＭＮ１、ＦＸＮ（フラタキシン）、ＧＵＣＹ２Ｄ、ＲＳ１、ＣＦＨ、ＨＴＲＡ、ＡＲＭＳ、ＣＦＢ／ＣＣ２、ＣＮＧＡ／ＣＮＧＢ、Ｐｒｆ６５、ＡＲＳＡ、ＰＳＡＰ、ＩＤＵＡ（ＭＰＳ　Ｉ）、ＩＤＳ（ＭＰＳ　ＩＩ）、ＰＡＨ、ＧＡＡ（酸性アルファグルコシダーゼ

）、ＧＡＬＴ、ＯＴＣ、ＣＭＤ１Ａ、ＬＡＭＡ２、またはこれらの任意の組合せをコードする。

【００２３】

一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）をコードする。一部の実施形態では、ｍｉＲＮＡは、ＳＯＤ１、ＨＴＴ、ＲＨＯ、ＣＤ３８、またはこれらの任意の組合せを含む標的遺伝子の発現を下方調節する。

【００２４】

一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、凝固因子をコードし、この場合、凝固因子は、第Ｉ因子（ＦＩ）、第ＩＩ因子（ＦＩＩ）、第ＩＩＩ因子（ＦＩＩＩ）、第ＩＶ因子（ＦＩＶ）、第Ｖ因子（ＦＶ）、第ＶＩ因子（ＦＶＩ）、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）、第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）、第Ｘ因子（ＦＸ）、第ＸＩ因子（ＦＸＩ）、第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）、第ＸＩＩＩ因子（ＦＸＩＩＩ）、フォンウィレブラント因子（ＶＷＦ）、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロネクチン、アンチトロンビンＩＩＩ、ヘパリン補因子ＩＩ、プロテインＣ、プロテインＳ、プロテインＺ、プロテインＺ関連プロテアーゼ阻害剤（ＺＰＩ）、プラスミノーゲン、アルファ２アンチプラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤１（ＰＡＩ－１）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤２（ＰＡＩ２）、またはこれらの任意の組合せを含む。

【００２５】

一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、コドン最適化されている。一部の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、ヒトにおける発現のためにコドン最適化されている。

【００２６】

一部の実施形態では、核酸分子は、送達剤と共に製剤化される。一部の実施形態では、送達剤は、脂質ナノ粒子を含む。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン性である。一部の実施形態では、送達剤は、リポソーム、非脂質ポリマー分子、エンドソーム、またはこれらの任意の組合せを含む。

【００２７】

一部の実施形態では、核酸分子は、静脈内投与、経皮投与、皮内投与、神経内投与、眼内投与、髄腔内投与、皮下投与、肺内投与、もしくは経口投与、またはこれらの任意の組合せのために製剤化される。一部の実施形態では、核酸分子は、静脈内投与のために製剤化される。一部の実施形態では、核酸分子は、ｉｎ　ｓｉｔｕ注入による投与のために製剤化される。一部の実施形態では、核酸分子は、吸入による投与のために製剤化される。

【００２８】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される核酸分子を含むベクターが提供される。

【００２９】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される核酸分子、または本明細書で記載されるベクターを含む宿主細胞が提供される。一部の実施形態では、宿主細胞は、昆虫細胞である。

【００３０】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される核酸分子を含む医薬組成物が提供される。

【００３１】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載されるベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。

【００３２】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。

【００３３】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される核酸分子と、核酸分子を、それを必要とする対象へと投与するための指示書とを含むキットが提供される。

【００３４】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される核酸分子を作製するためのバキュロウイルス系が提供される。

【００３５】

一部の実施形態では、核酸分子は、昆虫細胞内において作製される。

【００３６】

本明細書の別の態様では、本明細書で記載される核酸分子を含む、ナノ粒子送達系が提供される。

【００３７】

本明細書の別の態様では、それを必要とする対象において、異種ポリヌクレオチド配列を発現させる方法であって、対象へと、本明細書で記載される核酸分子、本明細書で記載されるベクター、または本明細書で記載される医薬組成物を投与する工程を含む方法が提供される。

【００３８】

本明細書の別の態様では、それを必要とする対象における疾患または障害を処置する方法であって、対象へと、本明細書で記載される核酸分子、本明細書で記載されるベクター、または本明細書で記載される医薬組成物を投与する工程を含む方法が提供される。

【００３９】

一部の実施形態では、核酸分子は、静脈内投与、経皮投与、皮内投与、皮下投与、経口投与、肺内投与、神経内投与、眼内投与、髄腔内投与、またはこれらの任意の組合せにより投与される。一部の実施形態では、核酸分子は、静脈内投与される。一部の実施形態では、核酸分子は、ｉｎ　ｓｉｔｕ注入により投与される。一部の実施形態では、核酸分子は、吸入により投与される。

【００４０】

一部の実施形態では、対象は、哺乳動物である。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【図面の簡単な説明】

【００４１】

【図１－１】図１Ａ～１Ｃは、本発明の一実施形態に従う、バキュロウイルス系内のｃｅＤＮＡ作製のために使用されるアプローチについての概略表示を示す図である。図１Ａは、異なる遺伝子座において、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ遺伝子およびＲｅｐ遺伝子をコードする、単一の組換えＢＥＶを、ｃｅＤＮＡ作製のための、Ｓｆ９細胞内の感染に使用した場合における、Ｏｎｅ　ＢＡＣアプローチについての概略図を示す。図１Ｂは、Ｓｆ９細胞に、ｃｅＤＮＡ作製のために、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮおよび／またはＲｅｐ遺伝子をコードする組換えＢＥＶを共感染させた場合における、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチについての概略図を示す。図１Ｃは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットを、Ｓｆ９細胞ゲノムへと、安定的に組み込み、ｃｅＤＮＡ作製のために、Ｒｅｐ遺伝子をコードする組換えＢＥＶを感染させることによりレスキューした場合における、安定細胞株アプローチについての概略図を示す。

【図１－２】図１－１の続き。

【図２】図２Ａ～２Ｂは、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現構築物についての概略表示を示す図である。図２Ａは、エンハンサーエレメント（Ａ１ＭＢ２）を伴う肝臓特異的改変マウストランスサイレチン（ｍＴＴＲ）プロモーター（ｍＴＴＲ４８２）、ハイブリッド合成イントロン（キメライントロン）、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、およびウシ成長ホルモンポリアデニル化（ｂＧＨｐＡ）シグナルの調節下にある、ＸＴＥＮ　１４４ペプチド（ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ）と融合されたＢドメイン欠失型（ＢＤＤ）コドン最適化ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｃｏＦＶＩＩＩ）から構成される、本発明の一実施形態に従う発現構築物についての、線形概略マップを示す。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセット

は、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）野生型（ＷＴ）ＩＴＲにより挟まれる（配列番号１および配列番号２）。図２Ｂは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセット（配列番号３）を、ｐＦａｓｔＢａｃ１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へと挿入することにより作製される、本発明の一実施形態に従うＴｎ７導入ベクターについての概略マップを示す。

【図３】図３Ａ～３Ｃは、本発明の実施形態に従う、複製（Ｒｅｐ）遺伝子発現構築物についての概略表示を示す図である。図３Ａは、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター下にある、Ｓｆコドン最適化ＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子に続き、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（ＳＶ４０　ＰＡＳ）をコードする合成ＤＮＡについての線形概略マップを示す。図３Ｂは、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１合成ＤＮＡ（配列番号４）を、ｐＦａｓｔＢａｃ１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へと挿入することにより作製される、本発明の実施形態に従う、Ｔｎ７導入ベクターについての概略マップを示す。図３Ｃは、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１合成ＤＮＡ（配列番号４）を、参照のために、その全体において本明細書に組み入れられる、「Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ」、米国特許出願第６３／０６９，０７３号において記載される通りに創出された、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターへと挿入することにより作製される、本発明の実施形態に従う、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターについての概略マップを示す。

【図４】図４Ａ～４Ｃは、本発明の実施形態に従う、複製（Ｒｅｐ）遺伝子発現構築物についての概略表示を示す図である。図４Ａは、ＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントに先立たれた、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ｐＩＥ１）プロモーター下にある、Ｓｆコドン最適化ＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子に続き、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（ＳＶ４０　ＰＡＳ）をコードする合成ＤＮＡについての線形概略マップを示す。図４Ｂは、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１合成ＤＮＡ（配列番号４）を、ｐＦａｓｔＢａｃ１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へと挿入することにより作製される、本発明の実施形態に従う、Ｔｎ７導入ベクターについての概略マップを示す。図４Ｃは、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１合成ＤＮＡ（配列番号４）を、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターへと挿入することにより作製される、本発明の実施形態に従う、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターについての概略マップを示す。

【図５】図５Ａ～５Ｄは、本発明の実施形態に従う、複製（Ｒｅｐ）遺伝子発現構築物についての概略表示を示す図である。図５Ａは、ＯｐＭＮＰＶ最初期２（ＯｐＩＥ２）プロモーター下にある、Ｓｆコドン最適化ＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子に続き、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（ＳＶ４０　ＰＡＳ）をコードする合成ＤＮＡについての線形概略マップを示す。図５Ｂは、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ｐＩＥ１）プロモーター下にある、Ｓｆコドン最適化ＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子に続き、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（ＳＶ４０　ＰＡＳ）をコードする合成ＤＮＡについての線形概略マップを示す。図５Ｃは、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１合成ＤＮＡ（配列番号４）を、ｐＦａｓｔＢａｃ１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へと挿入することにより作製される、本発明の実施形態に従う、Ｔｎ７導入ベクターについての概略マップを示す。図５Ｄは、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ｐＩＥ１）プロモーター下にある、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１合成ＤＮＡ（配列番号４）を、米国特許出願第６３／０６９，０７３号において記載される通りに創出された、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターへと挿入することにより作製される、本発明の実施形態に従う、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターについての概略マップを示す。

【図６Ａ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲと共にコードする、組換えバキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）の作出を示す図である。図６Ａは、クローンヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（ＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}）と共にコードする組換えＢＩＶＶＢａｃバクミドの、制限酵素マッピングについての、アガロースゲル電気泳動画像である。

【図６Ｂ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲと共にコードする、組換えバキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）の作出を示す図である。図６Ｂは、表示の通り、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（配列番号３）により挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードする、組換えＢＥＶ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}）についての概略表示である。

【図７Ａ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮと、Ｒｅｐ遺伝子発現カセットとから構成されるＯｎｅ　ＢＡＣについての概略表示、およびこれについての確認研究を示す図である。図７Ａ～７Ｃは、図７Ｄ～７Ｆにおいて、赤矢印により指し示される通り、外側／内側のＰＣＲプライマー（配列番号５および配列番号６）によりスクリーニングされる、ＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ａ）、ＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ｂ）、およびＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ｃ）の組換えバクミドクローンについての、アガロースゲル電気泳動画像である。

【図７Ｂ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮと、Ｒｅｐ遺伝子発現カセットとから構成されるＯｎｅ　ＢＡＣについての概略表示、およびこれについての確認研究を示す図である。図７Ａ～７Ｃは、図７Ｄ～７Ｆにおいて、赤矢印により指し示される通り、外側／内側のＰＣＲプライマー（配列番号５および配列番号６）によりスクリーニングされる、ＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ａ）、ＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ｂ）、およびＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ｃ）の組換えバクミドクローンについての、アガロースゲル電気泳動画像である。

【図７Ｃ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮと、Ｒｅｐ遺伝子発現カセットとから構成されるＯｎｅ　ＢＡＣについての概略表示、およびこれについての確認研究を示す図である。図７Ａ～７Ｃは、図７Ｄ～７Ｆにおいて、赤矢印により指し示される通り、外側／内側のＰＣＲプライマー（配列番号５および配列番号６）によりスクリーニングされる、ＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ａ）、ＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ｂ）、およびＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}（図７Ｃ）の組換えバクミドクローンについての、アガロースゲル電気泳動画像である。

【図７Ｄ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮと、Ｒｅｐ遺伝子発現カセットとから構成されるＯｎｅ　ＢＡＣについての概略表示、およびこれについての確認研究を示す図である。図７Ｄは、表示の通り、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリン（ｐＰｏｌｈ）プロモーターの下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１と、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲにより挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットとをコードする、組換えバキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}）についての概略マップを示す。

【図７Ｅ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮと、Ｒｅｐ遺伝子発現カセットとから構成されるＯｎｅ　ＢＡＣについての概略表示、およびこれについての確認研究を示す図である。図７Ｅは、表示の通り、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲにより挟まれた、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ｐＩＥ１）プロモーター下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１、およびＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードする、組換えＢＥＶ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}）についての概略マップを示す。

【図７Ｆ】ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮと、Ｒｅｐ遺伝子発現カセットとから構成されるＯｎｅ　ＢＡＣについての概略表示、およびこれについての確認研究を示す図である。図７Ｆは、表示の通り、ＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメント（ｐＨＲ５．ＩＥ１）により先立たれたＡｃＭＮＰＶ最初期１プロモーターの下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１と、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲにより挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットとをコードする、組換えＢＥＶ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}）についての概略マップを示す。

【図８Ａ】本発明の一実施形態に従う、Ｏｎｅ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図８Ａは、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}）により挟まれた、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子と、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットとをコードする、組換えＢＥＶを使用して、Ｓｆ９細胞内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクター作製のＯｎｅ　ＢＡＣアプローチについての概略図である。

【図８Ｂ】本発明の一実施形態に従う、Ｏｎｅ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図８Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}　ＢＥＶについての概略マップを示す。

【図８Ｃ】本発明の一実施形態に従う、Ｏｎｅ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図８Ｃは、（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}）ＢＥＶの滴定ウイルス原液（Ｐ２）を感染させたＳｆ９細胞から単離されたｃｅＤＮＡベクターについての、アガロースゲル電気泳動画像である。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを、矢印により指し示す。

【図９－１】図９Ａ～９Ｄは、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１をコードする配列を含む、組換えバキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）についての概略、およびこれについての確認研究を示す図である。図９Ａは、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリン下、ＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントにより先立たれた最初期１プロモーター下、またはＯｐＭＮＰＶ最初期２プロモーター（それぞれ、ＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}、ＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}、およびＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}）下にある、ＨＢｏＶ１．ＮＳ１の組換えバクミドクローンの、制限酵素マッピングについての、アガロースゲル電気泳動画像である。図９Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}についての概略マップを示す。図９Ｃは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}についての概略マップを示す。図９Ｄは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}についての概略マップを示す。

【図９－２】図９－１の続き。

【図１０Ａ】本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１０Ａは、Ｓｆ９細胞に、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}）により挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードし、かつ／またはＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}）下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子をコードする、組換えＢＥＶを共感染させた場合における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクター作製のＴｗｏ　ＢＡＣアプローチについての概略図である。

【図１０Ｂ】本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１０Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}　ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶについての概略マップを示す。

【図１０Ｃ】本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１０Ｃは、表示の通り、比を一定とするＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}　ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶのＭＯＩを相違させるか、またはＭＯＩを一定とするこれらの比を相違させて共感

染させたＳｆ９細胞から単離されたｃｅＤＮＡベクターについての、アガロースゲル電気泳動画像である。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを、矢印により指し示す。

【図１１Ａ】本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１１Ａは、Ｓｆ９細胞に、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}）により挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードし、かつ／またはＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}）、もしくはＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントにより先立たれた最初期１プロモーター（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}）下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子をコードする、組換えＢＥＶを共感染させた場合における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクター作製のＴｗｏ　ＢＡＣアプローチについての概略図である。

【図１１Ｂ】本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１１Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}　ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶについての概略マップを示す。

【図１１Ｃ】本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１１Ｃは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}　ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶ（左画像）、またはＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}ＢＥＶ（右画像）のＭＯＩを相違させて共感染させたＳｆ９細胞から単離されたｃｅＤＮＡベクターについての、アガロースゲル電気泳動画像である。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを、矢印により指し示す。

【図１２】図１２Ａ～１２Ｃは、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲにより挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードする安定細胞株の作出において使用される材料を示す図である。図１２Ａは、ＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントにより先立たれ、ＡｃＭＮＰＶ　ｐ１０ポリアデニル化シグナル（Ｐ１０　ＰＡＳ）を後続させる、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ＩＥ１）プロモーター下にある、ネオマイシン耐性マーカーをコードするプラスミドについての概略マップを示す。図１２Ｂは、ＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントにより先立たれ、ＡｃＭＮＰＶ　ｐ１０ポリアデニル化シグナル（Ｐ１０　ＰＡＳ）を後続させる、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ＩＥ１）プロモーター下にある、増強型緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）マーカーをコードするプラスミドについての概略マップを示す。図１２Ｃは、安定細胞株を作出するように、Ｓｆ９細胞ゲノムへと、安定的に組み込まれた、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲにより挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセット（配列番号３）についての概略マップを示す。

【図１３－１】図１３Ａ～１３Ｅは、本発明の一実施形態に従う、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチを使用する、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの作製／精製についてのワークフローを示す図である。図１３Ａは、無血清ＥＳＦ９２１培地中における、１ｍＬ当たりの細胞密度２．５～３．０×１０^{6}個を達成するように、細胞を、小スケール培養フラスコ（０．５Ｌ）から、大スケール培養フラスコ（１．５Ｌ）へと、逐次的にスケールアップした、Ｓｆ９細胞の拡大および持続（０～２日目における）の概略を示す。図１３Ｂは、細胞に、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}）により挟まれた、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードし、かつ／またはＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}）下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子をコードする、組

換えＢＥＶを、それぞれ、細胞１個当たり０．１および０．０１プラーク形成単位（ｐｆｕ）で共感染させた、Ｓｆ９大型培養フラスコ（１．５Ｌ）における感染およびインキュベーションの持続（２～６日目における）の概略を示す。図１３Ｃは、感染細胞の細胞密度および生存率を、毎日測定し、細胞生存率が、７０～８０％に達したら、低速遠心分離により、細胞をペレット化した、処理の持続を伴う、Ｐｌａｓｍｉｄ Ｇｉｇａ Ｐｒｅｐ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎキット、およびアガロースゲル電気泳動（６～７日目における）についての画像を示す。ＰｕｒｅＬｉｎｋ（商標）ＨｉＰｕｒｅ Ｅｘｐｉ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｇｉｇａｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）により、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクターを、感染細胞ペレットから精製し、アリコートを、アガロースゲル電気泳動にかけて、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、および／またはＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）の生産性を決定した。図１３Ｄは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡ（約８．５ｋｂの断片）を、高分子量ＤＮＡから分離するために、Ｇｉｇａ－ｐｒｅｐにより精製されたＤＮＡを、Ｐｒｅｐ Ｃｅｌｌ内のＰｒｅｐａｒａｔｉｖｅ Ａｇａｒｏｓｅ Ｇｅｌへとロードした、処理の持続を伴う、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｍｏｄｅｌ ４９１ Ｐｒｅｐ Ｃｅｌｌ、およびアガロースゲル電気泳動（７～１２日目における）についての画像を示す。Ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ Ａｇａｒｏｓｅ Ｇｅｌ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓから、７０～８０分間隔で回収された溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル上で解析して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡの純度を決定した。図１３Ｅは、Ｐｒｅｐ Ｃｅｌｌから回収された画分を配合し、３ＭのＮａＯＡｃ（ｐＨ５．５）１０分の１倍容量、および１００％のエタノール３倍容量により沈殿させて、精製ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡを得た、アガロースゲル電気泳動についての画像を示す。ゲル画像は、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡの純度を、出発材料と比較して示し、矢印は、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを指し示す。

【図１３－２】図１３－１の続き。

【図１４】図１４Ａ～１４Ｂは、Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ Ｃｏａｔｅｓｔ（登録商標）ＳＰ Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩＩ発色アッセイにより測定された、血漿ＦＶＩＩＩ活性レベルについてのグラフ表示を示す図である。図１４Ａは、流体尾静脈注射を介して、１ｋｇ当たりの一本鎖ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）１６００または４００μｇを全身注射された、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+/+}$／ＨｅｍＡマウスから、異なる間隔で回収された血液サンプル中において測定された、血漿ＦＶＩＩＩ活性レベルの、グラフへのプロットを示す。図１４Ｂは、流体尾静脈注射を介して、１ｋｇ当たりのＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ ｃｅＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）８０、４０、または１２μｇを全身注射された、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+/+}$／ＨｅｍＡマウスから、異なる間隔で回収された血液サンプル中において測定された、血漿ＦＶＩＩＩ活性レベルの、グラフへのプロットを示す。誤差バーは、標準偏差を表す。

【図１５】図１５Ａ～１５Ｃは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Tn7}バクミドＤＮＡと、本発明の一実施形態に従うＶＰ８０ ｓｇＲＮＡとを共トランスフェクトされたＳｆ９細胞についての、赤色蛍光顕微鏡画像（上パネル）または明視野顕微鏡画像（下パネル）を示す図である。図１５Ａは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Tn7}バクミドＤＮＡと、Ｃａｓ９単独とを共トランスフェクトされた細胞についての顕微鏡画像を示す。図１５Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Tn7}バクミドＤＮＡと、ｓｇＲＮＡ．ＶＰ８０．Ｔ１とを共トランスフェクトされた細胞についての顕微鏡画像を示す。図１５Ｃは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Tn7}バクミドＤＮＡと、ｓｇＲＮＡ．ＶＰ８０．Ｔ２とを共トランスフェクトされた細胞についての顕微鏡画像を示す。

【図１６】図１６Ａ～１６Ｃは、ＶＰ８０ＫＯ ＢＥＶの作出を示す図である。図１６Ａおよび図１６Ｂは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９により誘導されるインデルを決定する、ＢＥＶクローンである、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１ΔＶＰ８０^{Tn}

^{7}、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１ΔＶＰ８０^{Ｔｎ７}についてのＴＩＤＥ解析を例示する。図１６Ｃは、表示の通り、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１ΔＶＰ８０^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、またはＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１ΔＶＰ８０^{Ｔｎ７} ＢＥＶのＭＯＩを相違させて共感染させたＳｆ９細胞から単離された、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクターについてのアガロースゲル電気泳動画像である。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを、矢印により指し示す。

【図１７Ａ】Ｔｗｏ ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの作製を示す図である。図１７Ａは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクター作製のＴｗｏ ＢＡＣアプローチについての概略図である。

【図１７Ｂ】Ｔｗｏ ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの作製を示す図である。図１７Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７} ＢＥＶについての概略マップを示す。

【図１７Ｃ】Ｔｗｏ ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの作製を示す図である。図１７Ｃは、ＭＯＩを、１．０、２．０、３．０、４．０、または５．０として、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７} ＢＥＶを共感染させたＳｆ９細胞から単離された、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクターについてのアガロースゲル電気泳動画像である。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクター（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを、矢印により指し示す。

【図１８－１】図１８Ａ～１８Ｄは、Ｏｎｅ ＢＡＣアプローチを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡベクターの作製を示す図である。図１８Ａは、Ｓｆ９細胞内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクター作製のＯｎｅ ＢＡＣアプローチについての概略図である。図１８Ｂは、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ} ＢＥＶについての概略マップを示す。図１８Ｃは、Ｓｆ９細胞内において、Ｐ２まで増幅されたクローンである、ＨＢｏＶ１ ＯｎｅＢＡＣ ＢＥＶから単離された、ｃｅＤＮＡについてのアガロースゲル電気泳動画像である。図１８Ｄは、ＭＯＩを、０．１、０．２、０．３、０．４、または０．５として、ＨＢｏＶ１ ＯｎｅＢＡＣ ＢＥＶを感染させたＳｆ９細胞から単離された、ｃｅＤＮＡについてのアガロースゲル電気泳動画像である。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）、バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）、およびＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のサイズに対応するＤＮＡバンドを、矢印により指し示す。

【図１８－２】図１８－１の続き。

【図１９－１】図１９Ａ～１９Ｃは、ｉｎ ｖｉｖｏにおける、ＨＢｏＶ１ ｓｓＤＮＡおよびＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの作出および試験を示す図である。図１９Ａは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１についての、アガロースゲル電気泳動画像である。図１９Ｂは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡについての、アガロースゲル電気泳動画像である。図１９Ｃは、ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮおよびｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮについて、正常のパーセントに照らして正規化されたＦＶＩＩＩ発現レベルを示す。誤差バーは、標準偏差を表す。

【図１９－２】図１９－１の続き。

【図２０】図２０Ａ～２０Ｂは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの単量体形態および多量体形態についての試験を示す図である。図２０Ａは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの単量体形態および多量体形態についての、アガロースゲル電気

泳動画像である。図２０Ｂは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡの単量体形態および多量体形態を注射されたマウスにおいて、正常のパーセントに照らして正規化されたＦＶＩＩＩ発現レベルを示す。誤差バーは、標準偏差を表す。

【図２１－１】図２１Ａ～２１Ｃは、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ構築物内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮの発現を駆動する、肝臓特異的ｍＴＴＲプロモーターおよびヒトＡ１ＡＴプロモーターについての試験を示す図である。図２１Ａは、ＨＢｏＶ１　ＷＴ　ＩＴＲにより挟まれた、肝臓特異的ｍＴＴＲプロモーターまたはＡ１ＡＴプロモーターを伴う、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットについての概略図である。図２１Ｂは、記載される通り、制限酵素消化により作出された、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１についての、アガロースゲル電気泳動画像である。図２１Ｃは、図２１Ａに描示された、ｍＴＴＲプロモーター構築物またはＡ１ＡＴプロモーター構築物を注射されたマウスにおいて、正常のパーセントに照らして正規化されたＦＶＩＩＩ発現レベルを示す。誤差バーは、標準偏差を表す。

【図２１－２】図２１－１の続き。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

本明細書では、異種ポリヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを挟む、第１の改変逆位末端反復（ＩＴＲ）および／または第２の改変ＩＴＲを含む、核酸分子およびその使用が開示される。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）に由来する。

【００４３】

本開示の例示的構築物は、付属の図面および配列表に例示される。本明細書および特許請求の範囲の明確な理解のために、下記に、以下の定義が提供される。

【００４４】

定義

「ある（ａ）」実体または「ある（ａｎ）」実体という用語は、この実体のうちの１つまたはそれ以上を指すことが注目される：例えば、「あるヌクレオチド配列」とは、１つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を表すことが理解される。同様に、「ある治療用タンパク質」および「あるｍｉＲＮＡ」とは、それぞれ、１つまたはそれ以上の治療用タンパク質、および１つまたはそれ以上のｍｉＲＮＡを表すことが理解される。このように、本明細書では、「ある（ａ）」（または「ある（ａｎ）」）、「１つまたはそれ以上の」、および「少なくとも１つの」という用語は、互換的に使用される。

【００４５】

本明細書では、「約」という用語は、約、およそ、ほぼ、またはこれらの近傍にあることを意味するように使用される。数値範囲と共に使用される場合、「約」という用語は、境界を、示された数値の上側および下側に拡張することにより、この範囲を修飾する。本明細書では一般に、「約」という用語は、数値を、上方または下方（高値または低値）における１０パーセントの変動により、言明された値の上側および下側に修飾するように使用される。

【００４６】

本明細書で使用される、「および／または」とはまた、選択的に（「または」）解釈される場合に、関連する列挙項目のうちの１つまたはそれ以上の、任意の／全ての可能な組合せ、ならびに組合せの欠如も指し、これを包含する。

【００４７】

「核酸」、「核酸分子」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド（複数可）配列」、および「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用され、リボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジン、またはシチジン；「ＲＮＡ分子」）、もしくはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン；「ＤＮＡ分子」）のリン酸エステルポリマー形態、またはホスホロチオエートおよびチオエステルなど、一本鎖形態にあるか、もしくは二本鎖ヘリックス内にある、これら

の任意のリン酸エステル類似体を指す。一本鎖核酸配列とは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）または一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）を指す。二本鎖である、ＤＮＡ－ＤＮＡヘリックス、ＤＮＡ－ＲＮＡヘリックス、およびＲＮＡ－ＲＮＡヘリックスも可能である。核酸分子という用語、特に、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子という用語は、分子の一次構造および二次構造だけを指し、分子を、いかなる特定の三次形態にも限定しない。したがって、この用語は、とりわけ、直鎖状ＤＮＡ分子または環状ＤＮＡ分子（例えば、制限断片）、プラスミド、超らせんＤＮＡ、および染色体において見出される二本鎖ＤＮＡを含む。特定の二本鎖ＤＮＡ分子の構造について論じる場合、本明細書では、配列は、通常の慣行に従い、５’側から３’側の方向に、ＤＮＡの非転写鎖（すなわち、ｍＲＮＡと相同な配列を有する鎖）に沿った配列だけを示して記載される。「組換えＤＮＡ分子」とは、分子生物学的操作を受けたＤＮＡ分子である。ＤＮＡは、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、合成ＤＮＡ、および半合成ＤＮＡを含むがこれらに限定されない。本開示の「核酸組成物」は、本明細書で記載される、１つまたはそれ以上の核酸を含む。

【００４８】

本明細書で使用される、「逆位末端反復」（または「ＩＴＲ」）とは、下流において、その逆相補体、すなわち、回文配列を後続させた、ヌクレオチド（初期配列）のセットを含む、一本鎖核酸配列の５’末端または３’末端に配置された、核酸部分配列を指す。初期配列と、逆相補体との間に介在するヌクレオチド配列は、ゼロを含む、任意の長さでありうる。一実施形態では、本開示に有用なＩＴＲは、１つまたはそれ以上の「回文配列」を含む。ＩＴＲは、任意の数の機能を有しうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるＩＴＲは、ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、Ｔ字形ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、Ｔ字形以外のヘアピン構造、例えば、Ｕ字形ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の生存を、長期間にわたり促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の、恒久的生存（例えば、細胞の全寿命にわたり）を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の安定性を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の保持を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の存続を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の分解を阻害または阻止する。

【００４９】

一実施形態では、ＩＴＲの初期配列および／または逆相補体は、約２～６００ヌクレオチド、約２～５５０ヌクレオチド、約２～５００ヌクレオチド、約２～４５０ヌクレオチド、約２～４００ヌクレオチド、約２～３５０ヌクレオチド、約２～３００ヌクレオチド、または約２～２５０ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約５～６００ヌクレオチド、約１０～６００ヌクレオチド、約１５～６００ヌクレオチド、約２０～６００ヌクレオチド、約２５～６００ヌクレオチド、約３０～６００ヌクレオチド、約３５～６００ヌクレオチド、約４０～６００ヌクレオチド、約４５～６００ヌクレオチド、約５０～６００ヌクレオチド、約６０～６００ヌクレオチド、約７０～６００ヌクレオチド、約８０～６００ヌクレオチド、約９０～６００ヌクレオチド、約１００～６００ヌクレオチド、約１５０～６００ヌクレオチド、約２００～６００ヌクレオチド、約３００～６００ヌクレオチド、約３５０～６００ヌクレオチド、約４００～６００ヌクレオチド、約４５０～６００ヌクレオチド、約５００～６００ヌクレオチド、または約５５０～６００ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約５～５５０ヌクレオチド、約５～５００ヌクレオチド、約５～４５０ヌクレオチド、約５～４００ヌクレオチド、約５～３５０ヌクレオチド、約５～３００ヌクレオチド、または約５～２５０ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約１０～５５０ヌクレオチド、約１５～５００ヌクレオチド、約２０～４５０ヌクレオチド、約２５～４００ヌクレオチド、約３０～３５０ヌクレオチド、約３５～３００ヌクレオチド、または約４０～２５０ヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約２２５ヌクレオチド、約２

５０ヌクレオチド、約２７５ヌクレオチド、約３００ヌクレオチド、約３２５ヌクレオチド、約３５０ヌクレオチド、約３７５ヌクレオチド、約４００ヌクレオチド、約４２５ヌクレオチド、約４５０ヌクレオチド、約４７５ヌクレオチド、約５００ヌクレオチド、約５２５ヌクレオチド、約５５０ヌクレオチド、約５７５ヌクレオチド、または約６００ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約４００ヌクレオチドを含む。

【００５０】

他の実施形態では、ＩＴＲの初期配列および／または逆相補体は、約２～２００ヌクレオチド、約５～２００ヌクレオチド、約１０～２００ヌクレオチド、約２０～２００ヌクレオチド、約３０～２００ヌクレオチド、約４０～２００ヌクレオチド、約５０～２００ヌクレオチド、約６０～２００ヌクレオチド、約７０～２００ヌクレオチド、約８０～２００ヌクレオチド、約９０～２００ヌクレオチド、約１００～２００ヌクレオチド、約１２５～２００ヌクレオチド、約１５０～２００ヌクレオチド、または約１７５～２００ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約２～１５０ヌクレオチド、約５～１５０ヌクレオチド、約１０～１５０ヌクレオチド、約２０～１５０ヌクレオチド、約３０～１５０ヌクレオチド、約４０～１５０ヌクレオチド、約５０～１５０ヌクレオチド、約７５～１５０ヌクレオチド、約１００～１５０ヌクレオチド、または約１２５～１５０ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約２～１００ヌクレオチド、約５～１００ヌクレオチド、約１０～１００ヌクレオチド、約２０～１００ヌクレオチド、約３０～１００ヌクレオチド、約４０～１００ヌクレオチド、約５０～１００ヌクレオチド、または約７５～１００ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、約２～５０ヌクレオチド、約１０～５０ヌクレオチド、約２０～５０ヌクレオチド、約３０～５０ヌクレオチド、約４０～５０ヌクレオチド、約３～３０ヌクレオチド、約４～２０ヌクレオチド、または約５～１０ヌクレオチドを含む。別の実施形態では、初期配列および／または逆相補体は、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１１ヌクレオチド、１２ヌクレオチド、１３ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１９ヌクレオチド、または２０ヌクレオチドからなる。他の実施形態では、初期配列と、逆相補体との間に介在するヌクレオチドは、０ヌクレオチド、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１１ヌクレオチド、１２ヌクレオチド、１３ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１９ヌクレオチド、または２０ヌクレオチドである（例えば、これらからなる）。

【００５１】

したがって、本明細書で使用される「ＩＴＲ」は、それ自身に折り返しフォールディングし、二本鎖セグメントを形成する場合がある。例えば、配列であるＧＡＴＣＸＸＸＧＡＴＣは、フォールディングされると、二重ヘリックスを形成するように、ＧＡＴＣの初期配列と、その相補体（３’ＣＴＡＧ５’）とを含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、初期配列と、逆相補体との間に、連続回文配列（例えば、ＧＡＴＣＧＡＴＣ）を含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、初期配列と、逆相補体との間に、中断回文配列（例えば、ＧＡＴＣＸＸＸＧＡＴＣ）を含む。一部の実施形態では、連続回文配列または中断回文配列の相補性部分は、互いと相互作用して、「ヘアピンループ」構造を形成する。一本鎖ヌクレオチド分子上の少なくとも２つの相補性配列が塩基対合して二本鎖部分を形成すると、本明細書で使用される、「ヘアピンループ」構造が生じる。一部の実施形態では、ＩＴＲの一部だけが、ヘアピンループを形成する。他の実施形態では、ＩＴＲの全体が、ヘアピンループを形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、それが由来する野生型ＩＴＲの、Ｒｅｐ結合性エレメント（ＲＢＥ）を保持する。ＲＢＥの保存は、ＩＴＲの安定性およ

び製造目的のために重要でありうる。

【００５２】

本明細書で使用される、「パルボウイルス」という用語は、自律複製型である、パルボウイルスおよびディペンドウイルスを含むがこれらに限定されないパルボウイルス科を包含する。自律性パルボウイルスは、例えば、ボカウイルス属、ディペンドウイルス属、エリスロウイルス属、アムドウイルス属、パルボウイルス属、デンソウイルス属、イテラウイルス属、コントラウイルス属、アベパルボウイルス属、コピパルボウイルス属、プロトパルボウイルス属、テトラパルボウイルス属、アンビデンソウイルス属、ブレビデンソウイルス属、ヘパンデンソウイルス属、およびペンスチルデンソウイルス属のメンバーを含む。例示的な自律性パルボウイルスは、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）、ブタパルボウイルス、マウス微小ウイルス、イヌパルボウイルス、ミンク腸炎ウイルス、ウシパルボウイルス、ニワトリパルボウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコパルボウイルス、ガチョウパルボウイルス（ＧＰＶ）、Ｈ１パルボウイルス、マスコビーダックパルボウイルス、ヘビパルボウイルス、およびＢ１９ウイルスを含むがこれらに限定されない。当業者には、他の自律性パルボウイルスも公知である。例えば、Ｆｉｅｌｄｓら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、２巻、６９章（４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照されたい。

【００５３】

本明細書で使用される、「ＡＡＶ以外の」という用語は、パルボウイルス科のうちの、任意のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を除外する、パルボウイルス科に由来する核酸、タンパク質、およびウイルスを包含する。「ＡＡＶ以外の」は、ボカウイルス属、ディペンドウイルス属、エリスロウイルス属、アムドウイルス属、パルボウイルス属、デンソウイルス属、イテラウイルス属、コントラウイルス属、アベパルボウイルス属、コピパルボウイルス属、プロトパルボウイルス属、テトラパルボウイルス属、アンビデンソウイルス属、ブレビデンソウイルス属、ヘパンデンソウイルス属、およびペンスチルデンソウイルス属の自律複製型メンバーを含むがこれらに限定されない。

【００５４】

本明細書で使用される、「アデノ随伴ウイルス」（ＡＡＶ）という用語は、１型ＡＡＶ、２型ＡＡＶ、３型ＡＡＶ（３Ａおよび３Ｂ型を含む）、４型ＡＡＶ、５型ＡＡＶ、６型ＡＡＶ、７型ＡＡＶ、８型ＡＡＶ、９型ＡＡＶ、１０型ＡＡＶ、１１型ＡＡＶ、１２型ＡＡＶ、１３型ＡＡＶ、ヘビＡＡＶ、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、ヒツジＡＡＶ、ヤギＡＡＶ、エビＡＡＶ、Ｇａｏら（Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７８：６３８１（２００４））およびＭｏｒｉｓら（Ｖｉｒｏｌ．、３３：３７５（２００４））により開示されている、ＡＡＶ血清型およびクレード、ならびに現在公知であるか、またはその後において発見された、他の任意のＡＡＶを含むがこれらに限定されない。例えば、ＦＩＥＬＤＳら、ＶＩＲＯＬＯＧＹ、２巻、６９章（４版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照されたい。

【００５５】

本明細書で使用される、「～から誘導された」という用語は、指定された分子もしくは生物、または指定された分子もしくは生物に由来する情報（例えば、アミノ酸配列または核酸配列）から単離されるか、またはこれらを使用して作製された成分を指す。例えば、第２の核酸配列（例えば、ＩＴＲ）に由来する核酸配列（例えば、ＩＴＲ）は、第２の核酸配列のヌクレオチド配列と同一であるか、または実質的に同様であるヌクレオチド配列を含みうる。ヌクレオチドまたはポリペプチドの場合、誘導された分子種は、例えば、自然発生の突然変異誘発、人工の指向性突然変異誘発、または人工のランダム突然変異誘発により得られる。ヌクレオチドまたはポリペプチドを誘導するのに使用される突然変異誘発は、意図的に方向付けられる場合もあり、意図的にランダムである場合もあり、各々の混合の場合もある。第１のヌクレオチドまたはポリペプチドから誘導される、異なるヌクレオチドまたはポリペプチドを創出する、ヌクレオチドまたはポリペプチドの突然変異誘発は、第１のヌクレオチドまたはポリペプチドから誘導される、異なるヌクレオチドまた

はポリペプチドの場合があり、誘導されたヌクレオチドまたはポリペプチドの同定は、例えば、本明細書で論じられる、適切なスクリーニング法によりなされる。ポリペプチドの突然変異誘発は、典型的に、ポリヌクレオチドをコードするポリペプチドの操作を伴う。

【００５６】

「カプシド非含有」または「カプシドなし」のベクターまたは核酸分子とは、カプシドを含まないベクター構築物を指す。

【００５７】

本明細書で使用される、「コード領域」または「コード配列」とは、アミノ酸へと翻訳可能なコドンからなる、ポリヌクレオチドの部分である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ、またはＴＡＡ）は、典型的に、アミノ酸へと翻訳されないが、コード領域の部分と考えられるのに対し、任意の隣接する配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合性部位、転写終結因子、イントロンなどは、コード領域の部分ではない。コード領域の境界は、典型的に、結果として得られるポリペプチドのアミノ末端をコードする５’末端における開始コドンと、結果として得られるポリペプチドのカルボキシル末端をコードする３’末端における翻訳終止コドンとにより決定される。２つまたはそれ以上のコード領域が、単一のポリヌクレオチド構築物内に存在しうる、例えば、単一のベクター上に存在する場合もあり、別個のポリヌクレオチド構築物内、例えば、別個の（異なる）ベクター上に存在する場合もある。したがって、単一のベクターは、単一のコード領域だけを含有する場合もあり、２つまたはそれ以上のコード領域を含む場合もある。

【００５８】

哺乳動物細胞により分泌される、ある特定のタンパク質は、増殖するタンパク質鎖の、粗面小胞体を越える移出が誘発されたら、成熟タンパク質から切断される、分泌型シグナルペプチドと関連する。当業者は、シグナルペプチドが、一般に、ポリペプチドのＮ末端へと融合され、完全ポリペプチドまたは「全長」ポリペプチドから切断されて、ポリペプチドの分泌形態または「成熟」形態をもたらすことを承知している。ある特定の実施形態では、この配列の天然シグナルペプチドまたは機能的誘導体は、それと作動可能に関連するポリペプチドの分泌を方向付ける能力を保持する。代替的に、異種哺乳動物シグナルペプチド、例えば、ヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）、またはマウスβ－グルクロニダーゼシグナルペプチド、またはその機能的な誘導体が使用されうる。

【００５９】

「下流」という用語は、参照ヌクレオチド配列に対して３’側に配置されたヌクレオチド配列を指す。ある特定の実施形態では、下流のヌクレオチド配列は、転写の起始部に後続する配列に関する。例えば、遺伝子の翻訳開始コドンは、転写開始部位の下流に配置される。

【００６０】

「上流」という用語は、参照ヌクレオチド配列に対して５’側に配置されたヌクレオチド配列を指す。ある特定の実施形態では、上流のヌクレオチド配列は、コード領域の５’側、または転写の起始部に配置された配列に関する。例えば、大半のプロモーターは、転写開始部位の上流に配置される。

【００６１】

本明細書で使用される、「遺伝子カセット」という用語は、適切な宿主細胞内の、特定のポリヌクレオチド配列の発現を方向付けることが可能なＤＮＡ配列であって、目的のポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むＤＮＡ配列を意味する。遺伝子カセットは、コード領域の上流（５’側非コード配列）、コード領域内、またはコード領域の下流（３’側非コード配列）に配置され、関連するコード領域の転写、ＲＮＡプロセシング、安定性、または翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を包含しうる。コード領域が、真核細胞内の発現のために意図される場合、ポリアデニル化シグナル配列および転写終結配列は、通例、コード配列に対して３’側に配置されるであろう。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ｍｉＲＮＡをコードするポリヌクレオチドを含む。一

部の実施形態では、遺伝子カセットは、異種ポリヌクレオチド配列を含む。

【００６２】

産物、例えば、ｍｉＲＮＡまたは遺伝子産物（例えば、治療用タンパク質などのポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドは、１つまたはそれ以上のコード領域と作動可能に関連する、プロモーターおよび／または他の発現（例えば、転写または翻訳）制御配列を含みうる。作動可能な関連にある場合、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドのコード領域は、遺伝子産物の発現を、調節領域（複数可）の影響下または制御下に置くような形で、１つまたはそれ以上の調節領域と関連する。例えば、プロモーター機能の誘導が、コード領域によりコードされる遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの転写を結果としてもたらし、プロモーターと、コード領域との間の連結の性格が、遺伝子産物の発現を方向付けるプロモーターの能力に干渉しないか、またはＤＮＡ鋳型が転写される能力に干渉しない場合、コード領域と、プロモーターとは、「作動可能に関連する」。プロモーター以外の、他の発現制御配列、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルもまた、遺伝子産物の発現を方向付けるように、コード領域と作動可能に関連しうる。

【００６３】

「発現制御配列」とは、宿主細胞内のコード配列の発現をもたらす、プロモーター、エンハンサー、終結因子などの調節性ヌクレオチド配列を指す。発現制御配列は、一般に、作動可能に連結されたコード核酸の、効率的な転写および翻訳を容易とする、任意の調節性ヌクレオチド配列を包含する。発現制御配列の非限定例は、プロモーター、エンハンサー、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、ＲＮＡプロセシング部位、エフェクター結合性部位、またはステム－ループ構造を含む。当業者には、様々な発現制御配列が公知である。これらは、限定せずに述べると、サイトメガロウイルス（イントロンＡを伴う、最初期プロモーター）、サルウイルス４０（初期プロモーター）、およびレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルスなど）に由来する、プロモーターセグメントおよびエンハンサーセグメントなどであるがこれらに限定されない、脊椎動物細胞内において機能する発現制御配列を含む。他の発現制御配列は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギβ－グロビンのほか、真核細胞内の遺伝子発現を制御することが可能な他の配列など、脊椎動物遺伝子に由来する発現制御配列を含む。さらなる適切な発現制御配列は、組織特異的プロモーターおよび組織特異的エンハンサーのほか、リンホカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンにより誘導されるプロモーター）を含む。他の発現制御配列は、イントロン配列、転写後調節エレメント、およびポリアデニル化シグナルを含む。さらなる例示的発現制御配列については、本開示の他の箇所で論じられる。

【００６４】

同様に、当業者には、様々な翻訳制御エレメントも公知である。これらは、リボソーム結合性部位、翻訳開始／終結コドン、およびピコルナウイルスに由来するエレメント（特に、内部リボソーム侵入部位、またはＩＲＥＳ）を含むがこれらに限定されない。

【００６５】

本明細書で使用される、「発現」という用語は、ポリヌクレオチドが、遺伝子産物、例えば、ＲＮＡまたはポリペプチドをもたらす過程を指す。「発現」は、限定せずに述べると、ポリヌクレオチドの、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、または他の任意のＲＮＡ産物への転写、およびｍＲＮＡの、ポリペプチドへの翻訳を含む。発現は、「遺伝子産物」をもたらす。本明細書で使用された、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写により産生されるメッセンジャーＲＮＡ、または転写物から翻訳されるポリペプチドでありうる。本明細書で記載される遺伝子産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化またはスプライシングを伴う核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、またはタンパク質分解性切断を伴うポリペプチドをさらに含む。本明細書で使用される、「収量」という用語は、遺伝

子の発現によりもたらされるポリペプチドの量を指す。

【００６６】

「ベクター」とは、核酸の、宿主細胞へのクローニングおよび／または導入のための、任意の媒体を指す。ベクターは、別の核酸セグメントが、接合されたセグメントの複製をもたらすように接合されたレプリコンでありうる。「レプリコン」とは、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて、自律的複製単位として機能する、すなわち、それ自身による制御下における複製が可能である、任意の遺伝子エレメント（例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウイルス）を指す。「ベクター」という用語は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｅｘ ｖｉｖｏ、またはｉｎ ｖｉｖｏにおいて、核酸を、細胞へと導入するための媒体を含む。当技術分野では、例えば、プラスミド、改変真核生物ウイルス、または改変細菌ウイルスを含む、多数のベクターが公知であり、使用されている。ポリヌクレオチドの、適切なベクターへの挿入は、適切なポリヌクレオチド断片を、相補性の粘着末端を有する、選び出されたベクターへとライゲーションすることにより達せられる。

【００６７】

ベクターは、ベクターを組み込んだ細胞の選択または同定をもたらす、選択用マーカーまたは選択用レポーターをコードするように操作される。選択用マーカーまたは選択用レポーターの発現は、ベクター上に含有された、他のコード領域を組み込み、発現する宿主細胞の同定および／または選択を可能とする。当技術分野で公知であり、使用される、選択用マーカー遺伝子の例は、アンピシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ヒグロマイシン、除草剤であるビアラフォス、スルホンアミドなどに対する耐性をもたらす遺伝子；および表現型マーカーとして使用される遺伝子、すなわち、アントシアニン調節的遺伝子、イソペンテニルトランスフェラーゼ（ｉｓｏｐｅｎｔａｎｙｌ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）遺伝子などを含む。当技術分野で公知であり、使用される、レポーターの例は、ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、β－グルクロニダーゼ（Ｇｕｓ）などを含む。選択用マーカーはまた、レポーターであるとも考えられる。

【００６８】

本明細書で使用される、「宿主細胞」という用語は、ｓｓＤＮＡまたはベクターのレシピエントとして使用されるか、または使用されている、例えば、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を指す。「宿主細胞」という用語は、形質導入された元の細胞の後代を含む。したがって、本明細書で使用される、「宿主細胞」は、一般に、外因性ＤＮＡ配列を形質導入された細胞を指す。単一の親細胞の後代は、天然の突然変異、偶発的な突然変異、または意図的な突然変異のために、形状またはゲノムＤＮＡ相補体もしくは全ＤＮＡ相補体において、必ずしも、元の親と、完全に同一ではないことが理解される。一部の実施形態では、宿主細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける宿主細胞でありうる。

【００６９】

「選択用マーカー」という用語は、マーカー遺伝子の効果、すなわち、抗生剤に対する耐性、除草剤に対する耐性、比色マーカー、酵素、蛍光マーカーなどに基づく選択が可能である同定因子、通例、抗生剤耐性遺伝子または化学物質耐性遺伝子を指し、この場合、効果は、目的の核酸の継承を跡付け、かつ／または目的の核酸を継承した細胞もしくは生物を同定するのに使用される。当技術分野で公知であり、使用される、選択用マーカー遺伝子の例は、アンピシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ヒグロマイシン、除草剤であるビアラフォス、スルホンアミドなどに対する耐性をもたらす遺伝子；および表現型マーカーとして使用される遺伝子、すなわち、アントシアニン調節的遺伝子、イソペンテニルトランスフェラーゼ（ｉｓｏｐｅｎｔａｎｙｌ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）遺伝子などを含む。

【００７０】

「レポーター遺伝子」という用語は、レポーター遺伝子の効果に基づく同定が可能である同定因子をコードする核酸を指し、この場合、効果は、目的の核酸の継承を跡付け、目

的の核酸を継承した細胞もしくは生物を同定し、かつ／または遺伝子発現の誘導もしくは遺伝子の転写を測定するのに使用される。当技術分野で公知であり、使用される、レポーター遺伝子の例は、ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、β－グルクロニダーゼ（Ｇｕｓ）などを含む。選択用マーカー遺伝子もまた、レポーター遺伝子であると考えられる。

【００７１】

「プロモーター」および「プロモーター配列」は、互換的に使用され、コード配列または機能的ＲＮＡの発現を制御することが可能なＤＮＡ配列を指す。一般に、コード配列は、プロモーター配列に対して３’側に配置される。プロモーターは、それらの全体において、天然の遺伝子に由来するか、または天然において見出される、異なるプロモーターに由来する、異なるエレメントから構成されるか、なおまたは合成ＤＮＡセグメントを含む。当業者により、異なるプロモーターは、異なる組織または細胞型における遺伝子の発現を方向付ける場合もあり、異なる発生段階にある遺伝子の発現を方向付ける場合もあり、異なる環境条件もしくは生理学的条件に応答する遺伝子の発現を方向付ける場合もあることが理解される。遺伝子を、大半の細胞型内において、大半の時点において発現させるプロモーターは、一般に、「構成的プロモーター」と称される。遺伝子を、特異的細胞型内において発現させるプロモーターは、一般に、「細胞特異的プロモーター」または「組織特異的プロモーター」と称される。遺伝子を、発生または細胞分化の特異的段階において発現させるプロモーターは、一般に、「発生特異的プロモーター」または「細胞分化特異的プロモーター」と称される。プロモーターを誘導する薬剤、生体分子、化学物質、リガンド、光などへの細胞の曝露、またはこれらによる細胞の処置の後において、遺伝子を発現するように誘導され、遺伝子を発現させるプロモーターは、一般に、「誘導的プロモーター」または「調節的プロモーター」と称される。大半の場合に、調節的配列の正確な境界は、完全に規定されていないので、異なる長さのＤＮＡ断片が、同一のプロモーター活性を有しうることが、さらに認識される。さらなる例示的プロモーターについては、本開示の他の箇所で論じられる。

【００７２】

プロモーター配列は、典型的に、その３’末端において、転写開始部位により結合され、バックグラウンドを上回る、検出可能なレベルにおいて転写を誘発するのに必要である、最小限の数の塩基またはエレメントを組み入れるように、上流（５’方向）に伸張する。プロモーター配列内には、転写開始部位（例えば、ヌクレアーゼＳ１を伴うマッピングにより規定されると好都合である）のほか、ＲＮＡポリメラーゼの結合の一因となる、タンパク質結合性ドメイン（コンセンサス配列）が見出されるであろう。

【００７３】

一部の実施形態では、核酸分子は、組織特異的プロモーターを含む。ある特定の実施形態では、組織特異的プロモーターは、肝臓、肝細胞、および／または内皮細胞における、治療用タンパク質の発現を駆動する。特定の一実施形態では、プロモーターは、ＴＴＰプロモーターを含む。特定の一実施形態では、プロモーターは、ｍＴＴＲプロモーターを含む。特定の一実施形態では、プロモーターは、Ａ１ＡＴプロモーターを含む。

【００７４】

「プラスミド」という用語は、細胞の中心的代謝の一部ではなく、通例、環状二本鎖ＤＮＡ分子の形態にある遺伝子を保有することが多い、染色体外エレメントを指す。このようなエレメントは、選択された遺伝子産物のためのプロモーター断片およびＤＮＡ配列を、適切な３’側非翻訳配列と共に、細胞へと導入することが可能である、固有の構築物へと、多数のヌクレオチド配列が接続されるか、または組み換えられた、任意の供給源に由来する、一本鎖または二本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡの、直鎖状、環状、または超らせん状である、自律複製型配列、ゲノム組込み配列、ファージまたはヌクレオチド配列でありうる。

【００７５】

使用される、真核生物用ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、またはヘルペスウイルスベクターを含むがこれらに限定されない。非ウイルスベクターは、プラスミド、リポソーム、帯電脂質（サイトフェクチン）、ＤＮＡ－タンパク質複合体、および生体ポリマーを含む。

【００７６】

「クローニングベクター」とは、別の核酸セグメントが、接合されたセグメントの複製をもたらすように接合される、プラスミド、ファージ、またはコスミドなど、逐次的に複製される単位長の核酸であり、複製起点を含む、「レプリコン」を指す。ある特定のクローニングベクターは、１つの細胞型、例えば、細菌における複製、および別の細胞、例えば、真核細胞における発現が可能である。クローニングベクターは、典型的に、目的の核酸配列の挿入のための、ベクターおよび／または１つもしくはそれ以上の複数のクローニング部位を含む細胞の選択のために使用される、１つまたはそれ以上の配列を含む。

【００７７】

「発現ベクター」という用語は、宿主細胞への挿入の後に、挿入された核酸配列の発現を可能とするようにデザインされた媒体を指す。挿入された核酸配列は、上記で記載された通り、調節領域とのとの作動可能な関連下に置かれる。

【００７８】

ベクターは、当技術分野で周知の方法、例えば、トランスフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、ＤＥＡＥデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション（リソソーム融合）、遺伝子銃の使用、またはＤＮＡベクタートランスポーターにより、宿主細胞へと導入される。本明細書で使用される、「培養物」、「～を培養するために」、「～を培養すること」とは、細胞を、細胞の増殖もしくは分裂を可能とするｉｎ　ｖｉｔｒｏ条件下においてインキュベートするか、または細胞を、生存状態に維持することを意味する。本明細書で使用される、「培養細胞」とは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて繁殖された細胞を意味する。

【００７９】

本明細書で使用される、「ポリペプチド」という用語は、単数形の「ポリペプチド」のほか、複数形の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（また、ペプチド結合としても公知である）により、直鎖状に連結された単量体（アミノ酸）から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、２つまたはそれ以上のアミノ酸による、１つまたはそれ以上の任意の鎖を指し、具体的長さの産物を指さない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または２つもしくはそれ以上のアミノ酸による、１つもしくはそれ以上の鎖を指すのに使用される、他の任意の用語が、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のうちのいずれかの代わりに使用される場合もあり、これらと互換的に使用される場合もある。「ポリペプチド」という用語はまた、限定せずに述べると、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解性切断、または非自然発生アミノ酸による修飾を含む、ポリペプチドの発現後修飾産物を指すことも意図される。ポリペプチドは、天然の生体供給源に由来する場合もあり、組換え技術により作製される場合もあるが、必ずしも、指示された核酸配列から翻訳されるわけではない。ポリペプチドは、化学合成による作出を含む、任意の方式により作出される。

【００８０】

「アミノ酸」という用語は、アラニン（ＡｌａまたはＡ）；アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）；アスパラギン（ＡｓｎまたはＮ）；アスパラギン酸（ＡｓｐまたはＤ）；システイン（ＣｙｓまたはＣ）；グルタミン（ＧｌｎまたはＱ）；グルタミン酸（ＧｌｕまたはＥ）；グリシン（ＧｌｙまたはＧ）；ヒスチジン（ＨｉｓまたはＨ）；イソロイシン（ＩｌｅまたはＩ）：ロイシン（ＬｅｕまたはＬ）；リシン（ＬｙｓまたはＫ）；メチオニン（ＭｅｔまたはＭ）；フェニルアラニン（ＰｈｅまたはＦ）；プロリン（ＰｒｏまたはＰ）

；セリン（ＳｅｒまたはＳ）；トレオニン（ＴｈｒまたはＴ）；トリプトファン（ＴｒｐまたはＷ）；チロシン（ＴｙｒまたはＹ）；およびバリン（ＶａｌまたはＶ）を含む。非常套的アミノ酸もまた、本開示の範囲内にあり、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、およびＥｌｌｍａｎら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．、２０２：３０１～３３６（１９９１）において記載されているアミノ酸残基類似体など、他のアミノ酸残基類似体を含む。このような非自然発生のアミノ酸残基を作出するために、Ｎｏｒｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１８２（１９８９）；およびＥｌｌｍａｎら、前出の手順が使用されうる。略述すると、これらの手順は、非自然発生アミノ酸残基を伴うサプレッサーｔＲＮＡの化学的活性化に続き、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける、ＲＮＡの転写および翻訳を伴う。非常套的アミノ酸の導入はまた、当技術分野で公知のペプチド化学反応を使用しても達成される。本明細書で使用される、「極性アミノ酸」という用語は、正味の電荷はゼロであるが、それらの側鎖の異なる部分において、ゼロでない部分電荷を有するアミノ酸（例えば、Ｍ、Ｆ、Ｗ、Ｓ、Ｙ、Ｎ、Ｑ、Ｃ）を含む。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に参与しうる。本明細書で使用される、「帯電アミノ酸」という用語は、それらの側鎖上において、ゼロでない正味電荷を有しうるアミノ酸（例えば、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｅ、Ｄ）を含む。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に参与しうる。

【００８１】

本開示にはまた、ポリペプチドの断片または変異体、およびこれらの任意の組合せも含まれる。本開示のポリペプチド結合性ドメインまたはポリペプチド結合性分子に言及する場合における、「断片」または「変異体」という用語は、参照ポリペプチドの特性（例えば、ＦｃＲｎ結合性ドメインまたはＦｃ変異体に対する、ＦｃＲｎの結合アフィニティー、ＦＶＩＩＩ変異体についての凝固活性、またはＶＷＦ断片に対する、ＦＶＩＩＩの結合活性）のうちの、少なくとも一部を保持する、任意のポリペプチドを含む。ポリペプチドの断片は、本明細書の他の箇所で論じられる、特異的抗体断片に加えて、タンパク質分解性断片のほか、欠失断片を含むが、自然発生の全長ポリペプチド（または成熟ポリペプチド）を含まない。本開示のポリペプチド結合性ドメインまたはポリペプチド結合性分子の変異体は、上記で記載された断片を含み、また、アミノ酸の置換、欠失、または挿入のために、アミノ酸配列が変更されたポリペプチドも含む。変異体は、天然変異体の場合もあり、非自然発生変異体の場合もある。非自然発生変異体は、当技術分野で公知の突然変異誘発法を使用して作製される。変異体ポリペプチドは、保存的なアミノ酸の置換、欠失、または付加を含む場合もあり、非保存的なアミノ酸の置換、欠失、または付加を含む場合もある。

【００８２】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基により置き換えられるアミノ酸置換である。当技術分野では、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝型側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが規定されている。したがって、ポリペプチド内のアミノ酸が、同じ側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸により置き換えられる場合、置換は、保存的であると考えられる。別の実施形態では、アミノ酸の連なりは、側鎖ファミリーメンバーの、順序および／または組成が異なる、構造的に類似する連なりにより保存的に置き換えられる。

【００８３】

当技術分野で公知である、「同一性パーセント」という用語は、配列を比較することにより決定される、２つもしくはそれ以上のポリペプチド配列、または２つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列の間の関係である。当技術分野において、「同一性」とはまた

、場合によって、このような配列の連なりの間のマッチにより決定される、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の間の配列類縁性の程度も意味する。「同一性」は、「Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．編）、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８）；「Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ」（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．編）、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）；「Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ」、Ｉ部（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．およびＧｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．編）、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ（１９９４）；「Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」（Ｖｏｎ Ｈｅｉｊｎｅ，Ｇ．編）、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８７）；および「Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ」（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．およびＤｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．編）、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９１）において記載された方法を含むがこれらに限定されない、公知の方法により、たやすく計算される。同一性を決定する、好ましい方法は、被験配列の間の最も良好なマッチをもたらすようにデザインされる。同一性を決定する方法は、一般に入手可能なコンピュータプログラムにおいてコード化されている。配列アライメントおよび同一性パーセントの計算は、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥバイオインフォマティクス計算ソフトパッケージ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）の、Ｍｅｇａｌｉｇｎプログラム、ＧＣＧプログラムパッケージ（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ ９．０、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ）、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）；ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５：４０３（１９９０））；およびＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．１２２８ Ｓ．Ｐａｒｋ Ｓｔ．Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ ５３７１５ ＵＳＡ）などの配列解析ソフトウェアを使用して実施される。本出願の文脈では、解析のために、配列解析ソフトウェアが使用される場合、解析の結果は、そうでないことが指定されない限りにおいて、参照されるプログラムの「デフォルト値」に基づくことが理解されるであろう。本明細書で使用される、「デフォルト値」とは、最初に初期化されたときに、ソフトウェアにより元からロードされていた、値またはパラメータの任意のセットを意味する。クエリー配列（例えば、核酸配列）と、参照配列との同一性パーセントを決定する目的では、参照配列内のヌクレオチドにマッチするクエリー配列内のヌクレオチドだけが、同一性パーセントを計算するのに使用される。したがって、クエリー配列またはその指定部分（例えば、ヌクレオチド１～５２２）と、参照配列との同一性パーセントの決定において、同一性パーセントは、マッチしたヌクレオチドの数を、完全クエリー配列内のヌクレオチド総数により除することにより計算されるであろう。

【００８４】

本明細書で使用された、本開示の特定の配列内のヌクレオチドに対応するヌクレオチドは、本開示の配列のアライメントにより、参照配列に照らした同一性を最大化するように同定される。参照配列内の、同等のアミノ酸を同定するのに使用される番号は、本開示の配列内の、対応するアミノ酸を同定するのに使用される番号に基づく。

【００８５】

本明細書で使用される、「～を処置する」、「処置」、「～を処置すること」とは、例えば、疾患もしくは状態の重症度の軽減；疾患経過の持続期間の短縮；疾患もしくは状態と関連する、１つもしくはそれ以上の症状の改善；疾患もしくは状態を伴う対象への、必ずしも、疾患もしくは状態の治癒を伴わない、有益な効果の施与；または疾患もしくは状態と関連する、１つもしくはそれ以上の症状の予防を指す。

【００８６】

本明細書で使用される、「～を投与すること」とは、薬学的に許容される核酸分子、これから発現されるポリペプチド、または本開示の核酸分子を含むベクターを、薬学的に許容される経路を介して、対象へと施すことを意味する。投与経路は、静脈内、例えば、静

脈内注射および静脈内注入でありうる。さらなる投与経路は、例えば、皮下投与、筋内投与、経口投与、経鼻投与、および肺内投与を含む。核酸分子、ポリペプチド、およびベクターは、少なくとも１つの賦形剤を含む医薬組成物の部分として投与されうる。

【００８７】

本明細書で使用される、「脂質ナノ粒子」とは、１つまたはそれ以上のカチオン性脂質を含む、ナノメートルスケール（例えば、１ｎｍ～１，０００ｎｍ）の、少なくとも１つの寸法を有する粒子を指す。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、核酸（例えば、ｍＲＮＡ）などの活性薬剤または治療剤を、関連する標的部位（例えば、細胞、組織、器官、腫瘍など）へと送達するのに使用される製剤中に組み入れられる。一部の実施形態では、本明細書で開示される脂質ナノ粒子は、核酸を含む。このような脂質ナノ粒子は、典型的に、中性脂質、帯電脂質、ステロイド、およびポリマーコンジュゲート脂質から選択される、１つまたはそれ以上の賦形剤を含む。一部の実施形態では、核酸などの活性薬剤または治療剤は、脂質ナノ粒子の脂質部分に封入される場合もあり、脂質ナノ粒子の脂質部分の一部または全部により、水性腔内に封入される場合もあり、これにより、活性薬剤または治療剤を、酵素による分解、または有害な免疫応答など、宿主生物もしくは宿主細胞の機構により誘発される、他の所望されない効果から保護する。

【００８８】

本明細書で使用される、「薬学的に許容される」とは、生理学的に許容可能であり、典型的に、ヒトへと投与された場合に、胸焼け、めまいなど、毒性もしくはアレルギー性または類似する望ましくない反応をもたらさない、分子実体および組成物を指す。場合により、本明細書で使用される、「薬学的に許容される」という用語は、動物における使用について、より特定すると、ヒトにおける使用について、米国連邦政府もしくは州政府の規制機関により承認されているか、または米国薬局方もしくは他の一般に認識された薬局方に収載されていることを意味する。

【００８９】

本明細書で使用される、「それを必要とする対象」という語句は、本開示の核酸分子、ポリペプチド、またはベクターの投与から利益を得る、哺乳動物対象などの対象を含む。一部の実施形態では、対象は、ヒト対象である。一部の実施形態では、対象は、血友病を伴う個体である。対象は、成人の場合もあり、年少者（例えば、１２歳未満）の場合もある。

【００９０】

本明細書で使用される、「治療用タンパク質」という用語は、対象へと投与される、当技術分野で公知である、任意のポリペプチドを指す。一部の実施形態では、治療用タンパク質は、凝固因子、増殖因子、抗体、これらの機能的断片、またはこれらの組合せから選択されるタンパク質を含む。本明細書で使用される、「凝固因子」という用語は、対象における出血挿間の持続を防止するか、またはこれを減少させる、自然発生であるか、または組換えにより作製された分子またはその類似体を指す。言い換えると、「凝固因子」という用語は、凝固促進活性を有する分子、すなわち、血液を凝固（ｃｏａｇｕｌａｔｅまたはｃｌｏｔ）させる、フィブリノーゲンの、不溶性フィブリンのメッシュへの転換の一因となる分子を意味する。本明細書で使用される、「凝固因子」は、活性化型凝固因子、そのチモーゲン、または活性化可能凝固因子を含む。「活性化可能凝固因子」とは、活性形態へと転換されることが可能である、不活性形態にある（例えば、そのチモーゲン形態にある）凝固因子である。「凝固因子」という用語は、第Ｉ因子（ＦＩ）、第ＩＩ因子（ＦＩＩ）、第ＩＩＩ因子（ＦＩＩＩ）、第ＩＶ因子（ＦＩＶ）、第Ｖ因子（ＦＶ）、第ＶＩ因子（ＦＶＩ）、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）、第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）、第Ｘ因子（ＦＸ）、第ＸＩ因子（ＦＸＩ）、第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）、第ＸＩＩＩ因子（ＦＸＩＩＩ）、フォンウィレブラント因子（ＶＷＦ）、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロネクチン、アンチトロンビンＩＩＩ、ヘパリン補因子ＩＩ、プロテインＣ、プロテインＳ、プロテインＺ、プロテインＺ関連プロテアーゼ阻害剤（ＺＰＩ）、プラスミノーゲン、アルファ２アンチプラスミン、組織プラスミノー

ゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤１（ＰＡＩ－１）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤２（ＰＡＩ２）、これらのチモーゲン、これらの活性化形態、またはこれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない。

【００９１】

本明細書で使用される、「凝固活性」とは、フィブリン凝固物の形成に至る生化学的反応のカスケードに参与し、かつ／または出血もしくは出血挿間の重症度、持続、もしくは頻度を低減する能力を意味する。

【００９２】

本明細書で使用される、「増殖因子」という用語は、サイトカインおよびホルモンを含む、当技術分野で公知である、任意の増殖因子を含む。

【００９３】

本明細書で使用される、「異種」または「外因性」という用語は、所与の文脈において、例えば、細胞内またはポリペプチド内に、通常見出されない分子を指す。例えば、外因性分子または異種分子は、細胞へと導入され、例えば、トランスフェクションまたは遺伝子操作の他の形態による、細胞の操作後だけにおいて存在するが、異種アミノ酸配列は、それが、天然において見出されないタンパク質内に存在する場合もある。

【００９４】

本開示のヌクレオチド配列との比較として、本明細書で使用される場合における、「参照ヌクレオチド配列」は、ＦＶＩＩＩ配列に対応する部分が、最適化されていないことを除き、本開示のヌクレオチド配列と、本質的に同一であるポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子のための、参照ヌクレオチド配列は、配列番号３２である。

【００９５】

ヌクレオチド配列に関して、本明細書で使用される、「最適化された」という用語は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を指し、この場合、ポリヌクレオチド配列は、このポリヌクレオチド配列の特性を増強するように突然変異している。一部の実施形態では、最適化は、転写レベルを上昇させるか、翻訳レベルを上昇させるか、定常状態におけるｍＲＮＡレベルを上昇させるか、基本転写因子などの調節タンパク質への結合を増大もしくは低下させるか、スプライシングを増大もしくは低下させるか、またはポリヌクレオチド配列によりもたらされるポリペプチドの収量を増大させるようになされる。ヌクレオチド配列を最適化するように、ポリヌクレオチド配列に対してなされる変化の例は、コドン最適化、Ｇ／Ｃ含量最適化、リピート配列の除去、ＡＴリッチエレメントの除去、潜在スプライス部位の除去、転写または翻訳を抑制するシス活性化エレメントの除去、ｐｏｌｙ－Ｔまたはｐｏｌｙ－Ａ配列の付加または除去、コザックコンセンサス配列など、転写を増強する転写開始部位の近傍における配列の付加、ステムループ構造を形成しうる配列の除去、不安定化配列の除去、ＣｐＧモチーフの除去、および２つまたはそれ以上のこれらの組合せを含む。

【００９６】

核酸分子

本開示のある特定の態様は、遺伝子治療のためのＡＡＶベクターの欠陥を克服することを目的とする。特に、本開示のある特定の態様は、第１のＩＴＲ、第２のＩＴＲ、および遺伝子カセットを含む核酸分子を対象とする。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、治療用タンパク質および／または治療用ｍｉＲＮＡをコードする。一部の実施形態では、第１のＩＴＲと第２のＩＴＲは、異種ポリヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを挟む。一部の実施形態では、核酸分子は、カプシドタンパク質、複製タンパク質、および／またはアセンブリータンパク質をコードする遺伝子を含まない。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、治療用タンパク質をコードする。一部の実施形態では、治療用タンパク質は、凝固因子を含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ｍｉＲＮＡをコードする。ある特定の実施形態では、遺伝子カセットは、第１のＩＴＲと第２のＩＴＲとの間に配置される。一部の実施形態では、核酸分子は、１つまたはそれ以上の非コード領域をさら

に含む。ある特定の実施形態では、１つまたはそれ以上の非コード領域は、プロモーター配列、イントロン、転写後調節エレメント、３’ＵＴＲポリ（Ａ）配列、またはこれらの任意の組合せを含む。

【００９７】

一実施形態では、遺伝子カセットは、一本鎖核酸である。別の実施形態では、遺伝子カセットは、二本鎖核酸である。別の実施形態では、遺伝子カセットは、クローズドエンド二本鎖ｃｅＤＮＡである。

【００９８】

一部の実施形態では、核酸分子は、（ａ）パルボウイルス科の、ＡＡＶ以外のメンバー（例えば、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ）に由来するＩＴＲである、第１のＩＴＲ；（ｂ）組織特異的プロモーター配列、例えば、ＴＴＰプロモーターまたはＴＴＲプロモーター；（ｃ）イントロン、例えば、合成イントロン；（ｄ）ｍｉＲＮＡまたは治療用タンパク質、例えば、凝固因子をコードするヌクレオチド；（ｅ）転写後調節エレメント、例えば、ＷＰＲＥ；（ｆ）３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列、例えば、ｂＧＨｐＡ；（ｇ）パルボウイルス科の、ＡＡＶ以外のメンバー（例えば、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ）に由来するＩＴＲである、第２のＩＴＲを含む。一部の実施形態では、核酸分子は、（ａ）パルボウイルス科の、ＡＡＶ以外のメンバー（例えば、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ）に由来するＩＴＲである、第１のＩＴＲ；（ｂ）組織特異的プロモーター配列、例えば、ｍＴＴＲプロモーター；（ｃ）イントロン、例えば、合成イントロン；（ｄ）ｍｉＲＮＡまたは治療用タンパク質、例えば、凝固因子をコードするヌクレオチド；（ｅ）転写後調節エレメント、例えば、ＷＰＲＥ；（ｆ）３’ＵＴＲポリ（Ａ）テール配列、例えば、ｂＧＨｐＡ；（ｇ）パルボウイルス科の、ＡＡＶ以外のメンバー（例えば、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ）に由来するＩＴＲである、第２のＩＴＲを含む。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、ヒトアルファ１アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）プロモーターである。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、配列番号３６のヌクレオチド配列を含む。

【００９９】

本明細書の一部の実施形態では、配列番号９と少なくとも約７５％同一であるヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを含む、単離核酸分子が開示される。本明細書の一部の実施形態では、配列番号９に対する、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子が開示される。

【０１００】

本明細書の一部の実施形態では、配列番号３３と少なくとも約７５％同一であるヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを含む、単離核酸分子が開示される。本明細書の一部の実施形態では、配列番号３３に対する、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子が開示される。

【０１０１】

本明細書の一部の実施形態では、配列番号１４と少なくとも約７５％同一であるヌクレオチド配列を含む遺伝子カセットを含む、単離核酸分子が開示される。本明細書の一部の実施形態では、配列番号１４に対する、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子が開示される。

【０１０２】

本明細書の別の態様では、第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）ポリペプチドを発現する遺伝子カセットを含み、遺伝子カセットは、配列番号３５と少なくとも約８５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子が開示される。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号３５と少なくとも約９０％同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号３５と少なくとも約９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である

ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３５と少なくとも５０％同一である。

【０１０３】

本明細書ではまた、第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）ポリペプチドを発現する遺伝子カセットを含み、遺伝子カセットは、配列番号３５のヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子も開示される。

【０１０４】

ある特定の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）に由来するＩＴＲ配列を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、配列番号１または配列番号２と少なくとも約７５％同一である、第１のＩＴＲを含む。

【０１０５】

Ａ．逆位末端反復（ＩＴＲ）

本開示のある特定の態様は、第１のＩＴＲ、例えば、５’側ＩＴＲと、第２のＩＴＲ、例えば、３’側ＩＴＲとを含む核酸分子を対象とする。典型的に、ＩＴＲは、原核生物プラスミドからの、パルボウイルス（例えば、ＡＡＶ）ＤＮＡの複製およびレスキューまたは切出しに関与する（Ｓａｍｕｌｓｋｉら、１９８３、１９８７；Ｓｅｎａｐａｔｈｙら、１９８４；ＧｏｔｔｌｉｅｂａｎｄＭｕｚｙｃｚｋａ、１９８８）。加えて、ＩＴＲは、ＡＡＶプロウイルスの組込み、およびＡＡＶ　ＤＮＡの、ビリオンへのパッケージングに要求される、最小限の配列であるとも考えられる（ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎら、１９８８；Ｓａｍｕｌｓｋｉら、１９８９）。これらのエレメントは、パルボウイルスゲノムの効率的複製に不可欠である。ＩＴＲ機能に必須である、最小限の規定的エレメントは、Ｒｅｐ結合性部位および末端分離部位＋ヘアピン形成を可能とする可変性回文配列であることが仮定される。回文ヌクレオチド領域は、通常、シス側において、ＤＮＡ複製起点、およびウイルスのためのパッケージングシグナルとして、一体に機能する。ＩＴＲ内の相補性配列は、ＤＮＡ複製時に、ヘアピン構造へとフォールディングする。一部の実施形態では、ＩＴＲは、Ｔ字形ヘアピン構造へとフォールディングする。他の実施形態では、ＩＴＲは、Ｔ字形以外のヘアピン構造、例えば、Ｕ字形ヘアピン構造へとフォールディングする。データは、ＡＡＶ　ＩＴＲのＴ字形ヘアピン構造が、ＩＴＲにより挟まれた導入遺伝子の発現を阻害しうることを示唆する。例えば、Ｚｈｏｕら（２０１７）、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ、７：５４３２を参照されたい。Ｔ字形ヘアピン構造を形成しないＩＴＲを利用することにより、この阻害形態は回避される。したがって、ある特定の態様では、ＡＡＶ以外のＩＴＲを含むポリヌクレオチドは、Ｔ字形ヘアピンを形成するＡＡＶ　ＩＴＲを含むポリヌクレオチドと比較して、導入遺伝子の発現を改善した。

【０１０６】

本明細書で使用される、「逆位末端反復」（または「ＩＴＲ」）とは、下流において、その逆相補体、すなわち、回文配列を後続させた、ヌクレオチド（初期配列）のセットを含む、一本鎖核酸配列の５’末端または３’末端に配置された、核酸部分配列を指す。初期配列と、逆相補体との間に介在するヌクレオチド配列は、ゼロを含む、任意の長さでありうる。一実施形態では、本開示に有用なＩＴＲは、１つまたはそれ以上の「回文配列」を含む。ＩＴＲは、任意の数の機能を有しうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるＩＴＲは、ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、Ｔ字形ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、Ｔ字形以外のヘアピン構造、例えば、Ｕ字形ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の生存を、長期間にわたり促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の、恒久的生存（例えば、細胞の全寿命にわたり）を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の安定性を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の保持を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の存続を促進する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、細胞核内の核酸分子の分解を阻害または阻止する。

【０１０７】
したがって、本明細書で使用される「ＩＴＲ」は、それ自身に折り返しフォールディングし、二本鎖セグメントを形成する場合がある。例えば、配列であるＧＡＴＣＸＸＸＸＧＡＴＣは、フォールディングされると、二重ヘリックスを形成するように、ＧＡＴＣの初期配列と、その相補体（３’ＣＴＡＧ５’）とを含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、初期配列と、逆相補体との間に、連続回文配列（例えば、ＧＡＴＣＧＡＴＣ）を含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、初期配列と、逆相補体との間に、中断回文配列（例えば、ＧＡＴＣＸＸＸＧＡＴＣ）を含む。一部の実施形態では、連続回文配列または中断回文配列の相補性部分は、互いと相互作用して、「ヘアピンループ」構造を形成する。一本鎖ヌクレオチド分子上の少なくとも２つの相補性配列が塩基対合して二本鎖部分を形成すると、本明細書で使用される、「ヘアピンループ」構造が生じる。一部の実施形態では、ＩＴＲの一部だけが、ヘアピンループを形成する。他の実施形態では、ＩＴＲの全体が、ヘアピンループを形成する。

【０１０８】
一部の実施形態では、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲを含む、例えば、ＩＴＲは、パルボウイルス科のメンバーに由来するＩＴＲの全部または一部を含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、合成配列を含む。一実施形態では、第１のＩＴＲまたは第２のＩＴＲは、合成配列を含む。別の実施形態では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲの各々は、合成配列を含む。一部の実施形態では、第１のＩＴＲまたは第２のＩＴＲは、自然発生配列を含む。別の実施形態では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲの各々は、自然発生配列を含む。

【０１０９】
一部の実施形態では、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの部分、例えば、切断型ＩＴＲを含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの断片を含むか、またはこれからなり、この場合、断片は、少なくとも約５ヌクレオチド、少なくとも約１０ヌクレオチド、少なくとも約１５ヌクレオチド、少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約２５ヌクレオチド、少なくとも約３０ヌクレオチド、少なくとも約３５ヌクレオチド、少なくとも約４０ヌクレオチド、少なくとも約４５ヌクレオチド、少なくとも約５０ヌクレオチド、少なくとも約５５ヌクレオチド、少なくとも約６０ヌクレオチド、少なくとも約６５ヌクレオチド、少なくとも約７０ヌクレオチド、少なくとも約７５ヌクレオチド、少なくとも約８０ヌクレオチド、少なくとも約８５ヌクレオチド、少なくとも約９０ヌクレオチド、少なくとも約９５ヌクレオチド、少なくとも約１００ヌクレオチド、少なくとも約１２５ヌクレオチド、少なくとも約１５０ヌクレオチド、少なくとも約１７５ヌクレオチド、少なくとも約２００ヌクレオチド、少なくとも約２２５ヌクレオチド、少なくとも約２５０ヌクレオチド、少なくとも約２７５ヌクレオチド、少なくとも約３００ヌクレオチド、少なくとも約３２５ヌクレオチド、少なくとも約３５０ヌクレオチド、少なくとも約３７５ヌクレオチド、少なくとも約４００ヌクレオチド、少なくとも約４２５ヌクレオチド、少なくとも約４５０ヌクレオチド、少なくとも約４７５ヌクレオチド、少なくとも約５００ヌクレオチド、少なくとも約５２５ヌクレオチド、少なくとも約５５０ヌクレオチド、少なくとも約５７５ヌクレオチド、または少なくとも約６００ヌクレオチドを含み；ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。ある特定の実施形態では、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの断片を含むか、またはこれからなり、この場合、断片は、少なくとも約１２９ヌクレオチドを含み；ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。ある特定の実施形態では、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの断片を含むか、またはこれからなり、この場合、断片は、少なくとも約１０２ヌクレオチドを含み；ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、それが由来する野生型ＩＴＲの、Ｒｅｐ結合性エレメント（ＲＢＥ）を保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、それが由来する野生型ＩＴＲのＲＢＥのうちの少なくとも１つを保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、それが由来する野生型ＩＴＲのＲＢＥまたはその機能的部分のうちの少なくとも１つを保持する。ＲＢＥの保存は、ＩＴＲの安定性および製造目的のために重要でありうる。

【０１１０】
一部の実施形態では、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの部分を含むか、またはこれからなり、この場合、断片は、自然発生ＩＴＲの長さのうちの、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％を含み；断片は、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、野生型ＨＢｏＶ１　ＩＴＲに由来する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、野生型Ｂ１９　ＩＴＲに由来する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、野生型ＧＰＶ　ＩＴＲに由来する。

【０１１１】
ある特定の実施形態では、ＩＴＲは、適正にアライメントされた場合に、相同な自然発生ＩＴＲの部分に対する、少なくとも５０％、少なくとも５１％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５４％、少なくとも５５％、少なくとも５６％、少なくとも５７％、少なくとも５８％、少なくとも５９％、少なくとも６０％、少なくとも６１％、少なくとも６２％、少なくとも６３％、少なくとも６４％、少なくとも６５％、少なくとも６６％、少なくとも６７％、少なくとも６８％、少なくとも６９％、少なくとも７０％、少なくとも７１％、少なくとも７２％、少なくとも７３％、少なくとも７４％、少なくとも７５％、少なくとも７６％、少なくとも７７％、少なくとも７８％、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むか、またはこれからなり；この場合、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。他の実施形態では、ＩＴＲは、適正にアライメントされた場合に、相同な自然発生ＩＴＲの部分に対する、少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含むか、またはこれからなり；この場合、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、適正にアライメントされた場合に、相同な自然発生ＩＴＲの部分に対する、少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含むか、またはこれからなり；この場合、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、適正にアライメントされた場合に、相同な自然発生ＩＴＲの部分に対する、少なくとも７０％の配列同一性を有する配列を含むか、またはこれからなり；この場合、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、適正にアライメントされた場合に、相同な自然発生ＩＴＲの部分に対する、少なくとも６０％の配列同一性を有する配列を含むか、またはこれからなり；この場合、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、適正にアライメントされた場合に、相同な自然発生ＩＴＲの部分に対する、少なくとも５０％の配列同一性を有する配列を含むか、またはこれからなり；この場合、ＩＴＲは、自然発生ＩＴＲの機能的特性を保持する。

【０１１２】
一部の実施形態では、ＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来するＩＴＲを含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、およびＡＡＶ１１、ならびにこれらの任意の組合せから選択されるＡＡＶゲノムのＩＴＲである。一部の実施形態では、ＩＴＲは、天然単離物、例えば、天然ヒト単離物を含む、当業者に公知である、任意のＡＡＶゲノムのＩＴＲである。特定の実施形態では、ＩＴＲは、ＡＡＶ２ゲノムのＩＴＲである。別の実

施形態では、ＩＴＲは、その５’末端および３’末端において、ＡＡＶゲノムのうちの１つまたはそれ以上に由来するＩＴＲを含むように遺伝子操作された合成配列である。

【０１１３】

一部の実施形態では、ＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来しない（すなわち、ＩＴＲは、ＡＡＶではないウイルスに由来する）。一部の実施形態では、ＩＴＲは、ＡＡＶ以外のＩＴＲである。一部の実施形態では、ＩＴＲは、ボカウイルス属、ディペンドウイルス属、エリスロウイルス属、アムドウイルス属、パルボウイルス属、デンソウイルス属、イテラウイルス属、コントラウイルス属、アベパルボウイルス属、コピパルボウイルス属、プロトパルボウイルス属、テトラパルボウイルス属、アンビデンソウイルス属、ブレビデンソウイルス属、ヘパンデンソウイルス属、ペンスチルデンソウイルス属、ならびにこれらの任意の組合せからなる群から選択されるがこれらに限定されないパルボウイルス科に由来する、ＡＡＶゲノム以外のＩＴＲである。ある特定の実施形態では、ＩＴＲは、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）に由来する。別の実施形態では、ＩＴＲは、パルボウイルスである、エリスロウイルスＢ１９（ヒトウイルス）に由来する。別の実施形態では、ＩＴＲは、マスコビーダックパルボウイルス（ＭＤＰＶ）株に由来する。ある特定の実施形態では、ＭＤＰＶ株は、弱毒化ＭＤＰＶ株、例えば、ＭＤＰＶ　ＦＺ９１－３０株である。他の実施形態では、ＭＤＰＶ株は、病原性ＭＤＰＶ株、例えば、ＭＤＰＶ　ＹＹ株である。一部の実施形態では、ＩＴＲは、ブタパルボウイルス、例えば、ブタパルボウイルスＵ４４９７８株に由来する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、マウス微小ウイルス、例えば、マウス微小ウイルスＵ３４２５６株に由来する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、イヌパルボウイルス、例えば、イヌパルボウイルスＭ１９２９６株に由来する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、ミンク腸炎ウイルス、例えば、ミンク腸炎ウイルスＤ００７６５株に由来する。一部の実施形態では、ＩＴＲは、ディペンドパルボウイルス属に由来する。一実施形態では、ディペンドパルボウイルス属は、ディペンドウイルス属ガチョウパルボウイルス（ＧＰＶ）株である。具体的な実施形態では、ＧＰＶ株は、弱毒化ＧＰＶ株、例えば、ＧＰＶ　８２－０３２１Ｖ株である。別の特異的実施形態では、ＧＰＶ株は、病原性ＧＰＶ株、例えば、ＧＰＶ　Ｂ株である。

【０１１４】

核酸分子の第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲは、同じゲノム、例えば、同じウイルスのゲノムに由来する場合もあり、異なるゲノム、例えば、２つまたはそれ以上の異なるウイルスゲノムのゲノムに由来する場合もある。ある特定の実施形態では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲは、同じＡＡＶゲノムに由来する。具体的な実施形態では、本発明の核酸分子内に存在する、２つのＩＴＲは、同じであり、特に、ＡＡＶ２　ＩＴＲでありうる。他の実施形態では、第１のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来し、第２のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来しない（例えば、ＡＡＶ以外のゲノムに由来する）。他の実施形態では、第１のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来せず（例えば、ＡＡＶ以外のゲノムに由来し）、第２のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来する。さらに他の実施形態では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲのいずれも、ＡＡＶゲノムに由来しない（例えば、ＡＡＶ以外のゲノムに由来する）。特定の一実施形態では、第１のＩＴＲと第２のＩＴＲとは、同一である。

【０１１５】

一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、ＡＡＶ以外のゲノムに由来し、第２のＩＴＲは、ＡＡＶ以外のゲノムに由来し、この場合、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲは、同じゲノムに由来する。ＡＡＶ以外のウイルスゲノムの非限定例は、ボカウイルス属、ディペンドウイルス属、エリスロウイルス属、アムドウイルス属、パルボウイルス属、デンソウイルス属、イテラウイルス属、コントラウイルス属、アベパルボウイルス属、コピパルボウイルス属、プロトパルボウイルス属、テトラパルボウイルス属、アンビデンソウイルス属、ブレビデンソウイルス属、ヘパンデンソウイルス属、およびペンスチルデンソウイルス属に由来する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、ＡＡＶ以外のゲノムに由来し、第２のＩＴＲは、ＡＡＶ以外のゲノムに由来し、この場合、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲは、異なるウイルスゲノムに由来する。

【０１１６】
一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来し、第２のＩＴＲは、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）に由来する。他の実施形態では、第２のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムに由来し、第１のＩＴＲは、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）に由来する。
【０１１７】
一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの全部または一部を含むか、またはこれからなり、第２のＩＴＲは、ＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの全部または一部を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、ＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの一部は、自然発生のＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの切断形である。一部の実施形態では、ＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの一部は、自然発生のＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの一部を含む。例えば、ＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの一部は、自然発生のＡＡＶゲノムまたはＡＡＶ以外のゲノムに由来するＩＴＲの一部を含み、少なくとも１つのＲＢＥまたはその機能的部分は、保存的である。
【０１１８】
ある特定の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、ＨＢｏＶ１に由来するＩＴＲの全部または一部を含むか、またはこれからなる。ある特定の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、ＨＢｏＶ１に由来するＩＴＲの全部または一部を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、第２のＩＴＲは、第１のＩＴＲの逆相補体である。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、第２のＩＴＲの逆相補体である。一部の実施形態では、ＨＢｏＶ１に由来する、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、ヘアピン構造を形成することが可能である。ある特定の実施形態では、ヘアピン構造は、Ｔ字形ヘアピンを含まない。
【０１１９】
一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、配列番号１または２に示されたヌクレオチド配列と少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％同一であるヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなり、この場合、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、それが由来するＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能的特性を保持する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、配列番号１または２から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％同一であるヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなり、この場合、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、ヘアピン構造を形成することが可能である。ある特定の実施形態では、ヘアピン構造は、Ｔ字形ヘアピンを含まない。
【０１２０】
一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、配列番号１のヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、配列番号２のヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号１に示されたヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、第２のＩＴＲは、配列番号２に示されたヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、第１のＩＴＲは、配列番号１に示されたヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなり、第２のＩＴＲは、配列番号２に示されたヌクレオチド配列を含むか、またはこれからなる。

【０１２１】
当業者に、本明細書で記載される、第１のＩＴＲ配列のうちのいずれかは、本明細書で記載される、第２のＩＴＲ配列のうちのいずれかとマッチされることが察知されるであろう。一部の実施形態では、本明細書で記載される、第１のＩＴＲ配列は、５’側ＩＴＲ配列である。一部の実施形態では、本明細書で記載される、第２のＩＴＲ配列は、３’側ＩＴＲ配列である。一部の実施形態では、本明細書で記載される、第２のＩＴＲ配列は、５’側ＩＴＲ配列である。一部の実施形態では、本明細書で記載される、第１のＩＴＲ配列は、３’側ＩＴＲ配列である。当業者は、遺伝子カセットの構成に関して、本明細書で記載される、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲの適切な配向性を決定することができるであろう。

【０１２２】
別の特定の実施形態では、ＩＴＲは、その５’末端および３’末端において、ＡＡＶゲノムに由来しないＩＴＲを含むように遺伝子操作された合成配列である。別の特定の実施形態では、ＩＴＲは、その５’末端および３’末端において、ＡＡＶ以外のゲノムのうちの１つまたはそれ以上に由来するＩＴＲを含むように遺伝子操作された合成配列である。本発明の核酸分子内に存在する、２つのＩＴＲは、同じＡＡＶ以外のゲノムの場合もあり、異なるＡＡＶ以外のゲノムの場合もある。特に、ＩＴＲは、同じＡＡＶ以外のゲノムに由来しうる。具体的な実施形態では、本発明の核酸分子内に存在する、２つのＩＴＲは、同じであり、特に、ＡＡＶ２　ＩＴＲでありうる。

【０１２３】
一部の実施形態では、ＩＴＲ配列は、１つまたはそれ以上の回文配列を含む。本明細書で開示されるＩＴＲの回文配列は、天然の回文配列（すなわち、天然において見出される配列）、偽回文配列などの合成配列（すなわち、天然において見出されない配列）、およびこれらの組合せまたは修飾形態を含むがこれらに限定されない。「偽回文配列」とは、二次構造を形成する、天然ＡＡＶ内の配列、またはＡＡＶ以外の回文配列に対する、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、もしくは５％未満を含む、８０％未満の核酸配列同一性を共有するか、またはこれを共有しない、不完全回文配列を含む、回文ＤＮＡ配列である。天然回文配列は、本明細書で開示される、任意のゲノムから得られるか、またはこれらに由来する。合成回文配列は、本明細書で開示される、任意のゲノムに基づきうる。

【０１２４】
回文配列は、連続配列の場合もあり、中断配列の場合もある。一部の実施形態では、中断配列であり、この場合、回文配列は、第２の配列の挿入を含む。一部の実施形態では、第２の配列は、プロモーター、エンハンサー、インテグラーゼのための組込み部位（例えば、ＣｒｅリコンビナーゼまたはＦｌｐリコンビナーゼのための部位）、遺伝子産物のためのオープンリーディングフレーム、またはこれらの組合せを含む。

【０１２５】
一部の実施形態では、ＩＴＲは、ヘアピンループ構造を形成する。一実施形態では、第１のＩＴＲは、ヘアピン構造を形成する。別の実施形態では、第２のＩＴＲは、ヘアピン構造を形成する。さらに別の実施形態では、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲのいずれも、ヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、Ｔ字形ヘアピン構造を形成しない。ある特定の実施形態では、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、Ｔ字形以外のヘアピン構造を形成する。一部の実施形態では、Ｔ字形以外のヘアピン構造は、Ｕ字形ヘアピン構造を含む。

【０１２６】
一部の実施形態では、本明細書で記載される核酸分子内のＩＴＲは、転写活性化ＩＴＲでありうる。転写活性化ＩＴＲは、少なくとも１つの転写活性エレメントの組入れにより転写活性化された、野生型ＩＴＲの全部または一部を含みうる。多様な種類の転写活性エレメントが、この文脈における使用のために適する。一部の実施形態では、転写活性エレメントは、構成的転写活性エレメントである。構成的転写活性エレメントは、持続レベル

の遺伝子転写をもたらし、導入遺伝子が、持続ベースで発現されることが所望される場合に好ましい。他の実施形態では、転写活性エレメントは、誘導的転写活性エレメントである。誘導的転写活性エレメントは、一般に、誘導因子（または誘導条件）の非存在下において、低活性を呈し、誘導因子（または誘導条件への切換え）の存在下において、上方調節される。発現が、ある特定の時点もしくはある特定の位置に限り所望されるか、または誘導剤を使用して、発現レベルを滴定することが所望される場合に、誘導的転写活性エレメントは、好ましい場合がある。転写活性エレメントはまた、組織特異的でもありうる；すなわち、ある特定の組織または細胞型だけにおいて活性を呈する。

【０１２７】

転写活性エレメントは、様々な形で、ＩＴＲへと組み込まれる。一部の実施形態では、転写活性エレメントは、ＩＴＲの任意の部分に対して５’側、またはＩＴＲの任意の部分に対して３’側に組み込まれる。他の実施形態では、転写活性化ＩＴＲの転写活性エレメントは、２つのＩＴＲ配列の間にある。転写活性エレメントが、隔てられなければならない、２つまたはそれ以上のエレメントを含む場合、これらのエレメントは、ＩＴＲの部分と交互に存在する。一部の実施形態では、ＩＴＲのヘアピン構造は、欠失し、転写エレメントの逆位リピートにより置き換えられる。この後者の配置ならば、構造内の欠失部分を模倣するヘアピンを創出するであろう。転写活性化ＩＴＲ内に、複数のタンデム転写活性エレメントが存在する場合もあり、これらは、隣接する場合もあり、隔てられる場合もある。加えて、タンパク質結合性部位（例えば、Ｒｅｐ結合性部位）も、転写活性化ＩＴＲの転写活性エレメントへと導入される。転写活性エレメントは、ＲＮＡポリメラーゼによるＤＮＡの転写の制御が、ＲＮＡを形成することを可能とする、任意の配列を含む場合があり、例えば、下記に規定される、転写活性エレメントを含みうる。

【０１２８】

転写活性化ＩＴＲは、比較的限定的なヌクレオチド配列の長さにおいて、核酸分子へと、転写活性化およびＩＴＲ機能の両方をもたらし、これは、核酸分子から運ばれ、発現される導入遺伝子の長さを効果的に最大化する。転写活性エレメントの、ＩＴＲへの組込みは、様々な形で達せられる。ＩＴＲ配列、および転写活性エレメントの配列要件の比較は、ＩＴＲ内のエレメントをコードする方式に対する洞察をもたらしうる。例えば、転写活性は、転写活性エレメントの機能的エレメントを複製するＩＴＲ配列内における、特異的変化の導入を介して、ＩＴＲへと付加される。当技術分野では、特異的部位において、特定のヌクレオチド配列を、効率的に付加し、欠失させ、かつ／または変化させる、多数の技法が存在する（例えば、ＤｅｎｇおよびＮｉｃｋｏｌｏｆｆ（１９９２）、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２００：８１～８８を参照されたい）。転写活性化ＩＴＲを創出する、別の方式は、ＩＴＲ内の所望の位置における、制限部位の導入を伴う。加えて、当技術分野で公知の方法を使用して、複数の転写活性化エレメントが、転写活性化ＩＴＲへと組み込まれる。

【０１２９】

例示を目的として述べると、転写活性化ＩＴＲは、ＴＡＴＡｂｏｘ、ＧＣｂｏｘ、ＣＣＡＡＴｂｏｘ、Ｓｐ１部位、Ｉｎｒ領域、ＣＲＥ（ｃＡＭＰ調節エレメント）部位、ＡＴＦ－１／ＣＲＥ部位、ＡＰＢβｂｏｘ、ＡＰＢαｂｏｘ、ＣＡｒＧｂｏｘ、ＣＣＡＣｂｏｘ、または当技術分野で公知の、転写に関与する、他の任意のエレメントなど、１つまたはそれ以上の転写活性エレメントの組入れにより作出される。

【０１３０】

Ｂ．治療用タンパク質

本開示のある特定の態様は、第１のＩＴＲ、第２のＩＴＲ、および標的配列をコードする遺伝子カセットを含み、標的配列は、治療用タンパク質をコードする、核酸分子を対象とする。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、１つの治療用タンパク質をコードする。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、１つを超える治療用タンパク質をコードする。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、同じ治療用タンパク質の、２つまたはそれ以上のコピーをコードする。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、同じ治療用タンパク

質の、２つまたはそれ以上の変異体をコードする。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、２つまたはそれ以上の、異なる治療用タンパク質をコードする。

【０１３１】

本開示のある特定の実施形態は、第１のＩＴＲ、第２のＩＴＲ、および治療用タンパク質をコードする遺伝子カセットを含み、治療用タンパク質は、凝固因子を含む、核酸分子を対象とする。一部の実施形態では、凝固因子は、ＦＩ、ＦＩＩ、ＦＩＩＩ、ＦＩＶ、ＦＶ、ＦＶＩ、ＦＶＩＩ、ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸ、ＦＸ、ＦＸＩ、ＦＸＩＩ、ＦＸＩＩＩ、ＶＷＦ、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロネクチン、アンチトロンビンＩＩＩ、ヘパリン補因子ＩＩ、プロテインＣ、プロテインＳ、プロテインＺ、プロテインＺ関連プロテアーゼ阻害剤（ＺＰＩ）、プラスミノーゲン、アルファ２アンチプラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤１（ＰＡＩ－１）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤２（ＰＡＩ２）、これらの任意のチモーゲン、これらの任意の活性形態、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。一実施形態では、凝固因子は、ＦＶＩＩＩまたはその変異体もしくは断片を含む。別の実施形態では、凝固因子は、ＦＩＸまたはその変異体もしくは断片を含む。別の実施形態では、凝固因子は、ＦＶＩＩまたはその変異体もしくは断片を含む。別の実施形態では、凝固因子は、ＶＷＦまたはその変異体もしくは断片を含む。

【０１３２】

一部の実施形態では、核酸分子は、第１のＩＴＲ、第２のＩＴＲ、および標的配列をコードする遺伝子カセットを含み、この場合、標的配列は、治療用タンパク質をコードし、治療用タンパク質は、第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドを含む。本明細書で使用される通り、本出願を通して、「ＦＶＩＩＩ」と略記される、「第ＶＩＩＩ因子」とは、そうでないことが指定されない限りにおいて、凝固におけるその正常の役割下にある、機能的ＦＶＩＩＩポリペプチドを意味する。したがって、「ＦＶＩＩＩ」という用語は、機能的である、変異体ポリペプチドを含む。「ＦＶＩＩＩタンパク質」は、ＦＶＩＩＩポリペプチド（またはタンパク質）またはＦＶＩＩＩと互換的に使用される。ＦＶＩＩＩ機能の例は、凝固を活性化させる能力、第ＩＸ因子の補因子として作用する能力、またはCa^{2+}およびリン酸脂質の存在下において、第ＩＸ因子と共に、テナーゼ複合体を形成し、次いで、テナーゼ複合体が、第Ｘ因子を、活性化形態であるＸａへと転換する能力を含むがこれらに限定されない。

【０１３３】

本明細書で使用される治療用タンパク質内のＦＶＩＩＩ部分は、ＦＶＩＩＩ活性を有する。ＦＶＩＩＩ活性は、当技術分野で公知である、任意の方法により測定される。多数の試験：活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）試験、発色アッセイ、ＲＯＴＥＭアッセイ、プロトロンビン時間（ＰＴ）試験（また、ＩＮＲを決定するのにも使用される）、フィブリノーゲン試験（クラウス法を介することが多い）、血小板カウント、血小板機能試験（ＰＦＡ－１００を介することが多い）、ＴＣＴ、出血時間、混合試験（患者の血漿が、正常血漿と混合された場合に、異常性が是正されるかどうか）、凝固因子アッセイ、アンチリン酸脂質抗体、Ｄ－二量体、遺伝子的試験（例えば、第Ｖ因子ライデン突然変異である、プロトロンビン突然変異Ｇ２０２１０Ａ）、希釈ラッセルヘビ毒時間（ｄＲＶＶＴ）、その他の血小板機能試験、トロンボエラストグラフィー（ＴＥＧまたはＳｏｎｏｃｌｏｔ）、トロンボエラストメトリー（ＴＥＭ（登録商標）、例えば、ＲＯＴＥＭ（登録商標））、またはユーグロブリン溶解時間（ＥＬＴ）が、凝固系の機能について評価するのに利用可能である。

【０１３４】

ａＰＴＴ試験は、「内因性」経路（また、接触活性化経路とも称される）および共通凝固経路の両方の効能を測定する、性能指標である。この試験は、一般に、市販の組換え凝固因子、例えば、ＦＶＩＩＩの凝固活性を測定するのに使用される。ａＰＴＴ試験は、外因性経路を測定する、プロトロンビン時間（ＰＴ）と共に使用される。

【０１３５】

ＲＯＴＥＭ解析は、止血の全動態：凝固時間、凝固物の形成、凝固物の安定性、および溶解についての情報をもたらす。トロンボエラストメトリーにおける、異なるパラメータは、血漿凝固系の活性、血小板機能、線維素溶解、またはこれらの相互作用に影響を及ぼす、多くの因子に依存する。このアッセイは、二次止血についての全体像をもたらしうる。

【０１３６】

発色アッセイ機構は、活性化ＦＶＩＩＩが、活性化第ＩＸ因子、リン酸脂質、およびカルシウムイオンの存在下において、第Ｘ因子の、第Ｘａ因子への転換を加速化させる、血液凝固カスケードの原理に基づく。第Ｘａ因子活性は、第Ｘａ因子に特異的な、ｐ－ニトロアニリド（ｐＮＡ）基質の加水分解により評価される。４０５ｎＭにおいて測定される、ｐ－ニトロアニリンの初期放出速度は、第Ｘａ因子活性と正比例するので、サンプル中のＦＶＩＩＩ活性とも正比例する。発色アッセイは、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｎ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ ａｎｄ Ｈｅｍｏｓｔａｔｓｉｓ（ＩＳＴＨ）の、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ａｎｄ Ｓｔａｎｄａｒｄｉｚａｔｉｏｎ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＳＳＣ）の、ＦＶＩＩＩ ａｎｄ Ｆａｃｔｏｒ ＩＸ Ｓｕｂｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより推奨されている。１９９４年以来、発色アッセイはまた、ＦＶＩＩＩ濃縮物の効力割当てのための、欧州薬局方による参照法ともなっている。

【０１３７】

一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、この場合、ヌクレオチド配列は、コドン最適化されている。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ｍＴＴＲプロモーターにより駆動される、コドン最適化ＦＶＩＩＩをコードするヌクレオチド配列と、合成イントロンとを含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、参照によりその全体において組み入れられる、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０１５８７９号において開示されているヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０１５８７９において記載されている遺伝子カセットである、「ｈＦＶＩＩＩｃｏ６ＸＴＥＮ」である。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号３２を含む。

【０１３８】

一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ＸＴＥＮ １４４ペプチドと融合された、Ｂドメイン欠失型（ＢＤＤ）コドン最適化ヒト第ＶＩＩＩ因子（ＢＤＤｃｏＦＶＩＩＩ）をコードする、コドン最適化ｃＤＮＡを含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号９として示された、ヌクレオチド配列のセットを含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号３３として示された、ヌクレオチド配列のセットを含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号１４として示された、ヌクレオチド配列のセットを含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、配列番号１４のヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号３５のヌクレオチド配列を含む。

【０１３９】

一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ｍＴＴＲプロモーターにより駆動される、コドン最適化ＦＶＩＩＩをコードするヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、Ａ１ＭＢ２エンハンサーエレメントをさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、キメライントロンまたは合成イントロンをさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）をさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子カセットは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化（ｂＧＨｐＡ）シグナルをさらに含む。

【０１４０】

一部の実施形態では、本開示は、ＦＶＩＩＩ活性を伴うポリペプチドをコードする、コドン最適化核酸分子を対象とする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、全長ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする。他の実施形態では、核酸分子は、ＦＶＩＩＩのＢドメインの全部または一部が欠失した、Ｂドメイン欠失型（ＢＤＤ）ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする。

【０１４１】
他の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、１つもしくはそれ以上のＣｐＧモチーフの除去、および／または少なくとも１つのＣｐＧモチーフのメチル化によりさらに最適化される。本明細書で使用される、「ＣｐＧモチーフ」とは、グアノシンへのリン酸結合により連結された、非メチル化シトシンを含有するジヌクレオチド配列を指す。「ＣｐＧモチーフ」という用語は、メチル化ＣｐＧジヌクレオチドおよび非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドの両方を包含する。非メチル化ＣｐＧモチーフは、細菌由来の核酸およびウイルス由来の核酸（例えば、プラスミドＤＮＡ）内では一般的であるが、脊椎動物ＤＮＡでは、抑制され、大部分がメチル化される。したがって、非メチル化ＣｐＧモチーフは、迅速な炎症応答を惹起するように、哺乳動物宿主を刺激する。Ｋｌｉｎｍａｎら（１９９６）、ＰＮＡＳ、９３：２８７９～２８８３。ＣｐＧ除去の例示的方法については、Ｙｅｗ，Ｎ．Ｓ．ら（２００２）、ＭｏｌＴｈｅｒ．、５（６）：７３１～７３８；および国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００１／０１０３０９号において記載されている。一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、少数のＣｐＧモチーフを含有するように修飾されている（すなわち、ＣｐＧ低減型またはＣｐＧ欠失型）。一実施形態では、選択されたアミノ酸のためのコドントリプレット内に配置されたＣｐＧモチーフは、ＣｐＧモチーフを欠く、同じアミノ酸のためのコドントリプレットへと変化させる。一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、自然免疫応答を低減するように最適化されている。

【０１４２】
特定の一実施形態では、核酸分子は、配列番号１０またはその断片と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、本開示の核酸分子は、シグナルペプチドまたはその断片を含むＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする。他の実施形態では、核酸分子は、シグナルペプチドを欠くＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１１のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号１０のアミノ酸１～１９を含む。

【０１４３】
一部の実施形態では、核酸分子は、第１のＩＴＲ、第２のＩＴＲ、および標的配列をコードする遺伝子カセットを含み、標的配列は、治療用タンパク質をコードし、治療用タンパク質は、増殖因子を含む。増殖因子は、当技術分野で公知である、任意の増殖因子から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、ホルモンである。他の実施形態では、増殖因子は、サイトカインである。一部の実施形態では、増殖因子は、ケモカインである。

【０１４４】
一部の実施形態では、増殖因子は、アドレノメジュリン（ＡＭ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、アンジオポエチン（Ａｎｇ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、自己分泌型運動因子である。一部の実施形態では、増殖因子は、骨形成性タンパク質（ＢＭＰ）である。一部の実施形態では、ＢＭＰは、ＢＭＰ２、ＢＭＰ４、ＢＭＰ５、およびＢＭＰ７から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、毛様体神経栄養因子ファミリーメンバーである。一部の実施形態では、毛様体神経栄養因子ファミリーメンバーは、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）、白血病阻害性因子（ＬＩＦ）、インターロイキン６（ＩＬ－６）から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、コロニー刺激因子である。一部の実施形態では、コロニー刺激因子は、マクロファージコロニー刺激因子（ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、表皮増殖因子（ＥＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、エフリンである。一部の実施形態では、エフリンは、エフリンＡ１、エフリンＡ２、エフリンＡ３、エフリンＡ

４、エフリンＡ５、エフリンＢ１、エフリンＢ２、およびエフリンＢ３から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、エリスロポエチン（ＥＰＯ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）である。一部の実施形態では、ＦＧＦは、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦ４、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６、ＦＧＦ７、ＦＧＦ８、ＦＧＦ９、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１１、ＦＧＦ１２、ＦＧＦ１３、ＦＧＦ１４、ＦＧＦ１５、ＦＧＦ１６、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ１９、ＦＧＦ２０、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２２、およびＦＧＦ２３から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、ウシ胎仔ソマトトロフィン（ＦＢＳ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、ＧＤＮＦファミリーメンバーである。一部の実施形態では、ＧＤＮＦファミリーメンバーは、グリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、ニュールツリン、ペルセフィン、およびアルテミンから選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、増殖分化因子９（ＧＤＦ９）である。一部の実施形態では、増殖因子は、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、ヘパトーマ由来増殖因子（ＨＤＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、インスリンである。一部の実施形態では、増殖因子は、インスリン様増殖因子である。一部の実施形態では、インスリン様増殖因子は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ－１）またはＩＧＦ－２である。一部の実施形態では、増殖因子は、インターロイキン（ＩＬ）である。一部の実施形態では、ＩＬは、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、およびＩＬ－７から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、角化細胞増殖因子（ＫＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、遊走刺激因子（ＭＳＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、マクロファージ刺激タンパク質（ＭＳＰ）または肝細胞増殖因子様タンパク質（ＨＧＦＬＰ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、ミオスタチン（ＧＤＦ－８）である。一部の実施形態では、増殖因子は、ニューレグリンである。一部の実施形態では、ニューレグリンは、ニューレグリン１（ＮＲＧ１）、ＮＲＧ２、ＮＲＧ３、およびＮＲＧ４から選択される。一部の実施形態では、増殖因子は、神経栄養因子である。一部の実施形態では、増殖因子は、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、神経増殖因子（ＮＧＦ）である。一部の実施形態では、ＮＧＦは、神経栄養因子３（ＮＴ－３）またはＮＴ－４である。一部の実施形態では、増殖因子は、胎盤増殖因子（ＰＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、レナラーゼ（ＲＮＬＳ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、Ｔ細胞増殖因子（ＴＣＧＦ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、トロンボポエチン（ＴＰＯ）である。一部の実施形態では、増殖因子は、形質転換増殖因子である。一部の実施形態では、形質転換増殖因子は、形質転換増殖因子アルファ（ＴＧＦ－α）またはＴＧＦ－βである。一部の実施形態では、増殖因子は、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）である。一部の実施形態では、増殖因子は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）である。

【０１４５】

Ｃ．発現制御配列

一部の実施形態では、本開示の核酸分子またはベクターは、少なくとも１つの発現制御配列をさらに含む。例えば、本開示の単離核酸分子は、少なくとも１つの発現制御配列に作動可能に連結される。発現制御配列は、例えば、プロモーター配列、またはプロモーター－エンハンサーの組合せでありうる。

【０１４６】

構成的哺乳動物プロモーターは、以下の遺伝子：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼのためのプロモーター、ベーター－アクチンプロモーター、および他の構成的プロモーターを含むがこれらに限定されない。真核細胞内で構成的に機能する、例示的なウイルスプロモーターは、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、サルウイルス（例えば、ＳＶ４０）、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ラウス肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルスの長鎖末端反復（ＬＴＲ）、および他のレトロウイルス、ならびに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターに由

来するプロモーターを含む。当業者には、他の構成的プロモーターも公知である。本開示の遺伝子発現配列に有用なプロモーターはまた、誘導的プロモーターも含む。誘導的プロモーターは、誘導剤の存在下において発現される。例えば、メタロチオネインプロモーターは、ある特定の金属イオンの存在下において、転写および翻訳を促進するように誘導される。当業者には、他の誘導的プロモーターも公知である。

【０１４７】

一実施形態では、本開示は、組織特異的プロモーターおよび／またはエンハンサーの制御下における、導入遺伝子の発現を含む。別の実施形態では、プロモーターまたは他の発現制御配列は、肝細胞における、導入遺伝子の発現を選択的に増強する。ある特定の実施形態では、プロモーターまたは他の発現制御配列は、肝細胞、類洞細胞、および／または内皮細胞における、導入遺伝子の発現を選択的に増強する。特定の一実施形態では、プロモーターまたは他の発現制御配列は、内皮細胞における、導入遺伝子の発現を選択的に増強する。ある特定の実施形態では、プロモーターまたは他の発現制御配列は、筋細胞、中枢神経系、眼、肝臓、心臓、またはこれらの任意の組合せにおける、導入遺伝子の発現を選択的に増強する。肝臓特異的プロモーターの例は、マウストランスサイレチンプロモーター（ｍＴＴＲ）、天然ヒト第ＶＩＩＩ因子プロモーター、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（ｈＡＡＴ）、ヒトアルブミン最小プロモーター、およびマウスアルブミンプロモーターを含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、ｍＴＴＲプロモーターを含む。ｍＴＴＲプロモーターについては、Ｃｏｓｔａら（１９８６）、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、６：４６９７において記載されている。ＦＶＩＩＩプロモーターについては、ＦｉｇｕｅｉｒｅｄｏおよびＢｒｏｗｎｌｅｅ、１９９５、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７０：１１８２８～１１８３８において記載されている。一部の実施形態では、プロモーターは、肝臓特異的プロモーター（例えば、α１アンチトリプシン（ＡＡＴ）プロモーター）、筋特異的プロモーター（例えば、筋クレアチニンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモーター、ミオシン重鎖アルファ（αＭＨＣ）プロモーター、ミオグロビン（ＭＢ）プロモーター、およびデスミン（ＤＥＳ）プロモーター）、合成プロモーター（例えば、ＳＰｃ５－１２プロモーター、２Ｒ５Ｓｃ５－１２プロモーター、ｄＭＣＫプロモーター、およびｔＭＣＫプロモーター）、またはこれらの任意の組合せから選択される。

【０１４８】

一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、肝臓へとターゲティングされる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子の発現は、肝細胞へとターゲティングされる。他の実施形態では、導入遺伝子の発現は、内皮細胞へとターゲティングされる。特定の一実施形態では、導入遺伝子の発現は、内因性ＦＶＩＩＩを天然において発現する任意の組織へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、中枢神経系へとターゲティングされる。ある特定の実施形態では、導入遺伝子の発現は、ニューロンへとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、求心性ニューロンへとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、遠心性ニューロンへとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、介在ニューロンへとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、グリア細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、星状細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、希突起膠細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、ミクログリアへとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、上衣細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、シュワン細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、サテライト細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、筋組織へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、平滑筋へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、心筋へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、骨格筋へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、

眼へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、光受容体細胞へとターゲティングされる。一部の実施形態では、導入遺伝子の発現は、網膜神経節細胞へとターゲティングされる。

【０１４９】

本明細書で開示される核酸分子内において有用である、他のプロモーターは、マウストランスサイレチンプロモーター（ｍＴＴＲ）、天然ヒトＦＶＩＩＩプロモーター、ヒトアルファ１アンチトリプシンプロモーター（ｈＡＡＴ）、ヒトアルブミン最小プロモーター、マウスアルブミンプロモーター、トリステトラプロリン（ＴＴＰ）プロモーター、ＣＡＳＩプロモーター、ＣＡＧプロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、α１アンチトリプシン（ＡＡＴ）プロモーター、筋クレアチニンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモーター、ミオシン重鎖アルファ（αＭＨＣ）プロモーター、ミオグロビン（ＭＢ）プロモーター、デスミン（ＤＥＳ）プロモーター、ＳＰｃ５－１２プロモーター、２Ｒ５Ｓｃ５－１２プロモーター、ｄＭＣＫプロモーター、ｔＭＣＫプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、もしくはヒトアルファ１アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）プロモーター、またはこれらの任意の組合せを含む。

【０１５０】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、トランスサイレチン（ＴＴＲ）プロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、マウストランスサイレチン（ｍＴＴＲ）プロモーターである。ｍＴＴＲプロモーターの非限定例は、参照によりその全体において本明細書に組み入れられる、米国公開第ＵＳ２０１９／００４８３６２号において開示されている、ｍＴＴＲ２０２プロモーター、ｍＴＴＲ２０２ｏｐｔプロモーター、およびｍＴＴＲ４８２プロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、肝臓特異的改変マウストランスサイレチン（ｍＴＴＲ）プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、肝臓特異的改変マウストランスサイレチン（ｍＴＴＲ）プロモーターである、ｍＴＴＲ４８２プロモーターである。ｍＴＴＲ４８２プロモーターの例については、Ｋｙｏｓｔｉｏ－Ｍｏｏｒｅら（２０１６）、Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．、３：１６００６；およびＮａｍｂｉａｒ Ｂ．ら（２０１７）、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２８（１）：２３～２８において記載されている。一部の実施形態では、プロモーターは、配列番号１６の核酸配列を含む、肝臓特異的改変マウストランスサイレチン（ｍＴＴＲ）プロモーターである。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、ヒトアルファ１アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）プロモーターである。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、配列番号３６のヌクレオチド配列を含む。

【０１５１】

治療効能を達成するように、発現レベルは、１つまたはそれ以上のエンハンサーエレメントを使用して、さらに増強される。１つまたはそれ以上のエンハンサーは、単独で施される場合もあり、１つまたはそれ以上のプロモーターエレメントと併せて施される場合もある。典型的に、発現制御配列は、複数のエンハンサーエレメント、および組織特異的プロモーターを含む。一実施形態では、エンハンサーは、α－１－マイクログロビン／ビクニンエンハンサーの、１つまたはそれ以上のコピーを含む（Ｒｏｕｅｔら（１９９２）、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６７：２０７６５～２０７７３；Ｒｏｕｅｔら（１９９５）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２３：３９５～４０４；Ｒｏｕｅｔら（１９９８）、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３３４：５７７～５８４；Ｉｌｌら（１９９７）、Ｂｌｏｏｄ Ｃｏａｇｕｌａｔｉｏｎ Ｆｉｂｒｉｎｏｌｙｓｉｓ、８：Ｓ２３～Ｓ３０）。一部の実施形態では、エンハンサーは、ＨＮＦ１、（センス）－ＨＮＦ３、（センス）－ＨＮＦ４、（アンチセンス）－ＨＮＦ１、（アンチセンス）－ＨＮＦ６、（センス）－ＥＢＰ、（アンチセンス）－ＨＮＦ４（アンチセンス）を含む、Ｅｎｈ１を伴う、ＥＢＰ、ＤＢＰ、ＨＮＦ１、ＨＮＦ３、ＨＮＦ４、ＨＮＦ６などの肝臓特異的転写因子結合性部位に由来する。

【０１５２】

一部の実施形態では、エンハンサーエレメントは、１つまたは２つの改変プロトロンビンエンハンサー（ｐＰｒＴ２）、１つまたは２つのアルファ１ミクロビクニンエンハンサー（Ａ１ＭＢ２）、改変マウスアルブミンエンハンサー（ｍＥａｌｂ）、Ｂ型肝炎ウイルスエンハンサーＩＩ（ＨＥ１１）、またはＣＲＭ８エンハンサーを含む。一部の実施形態では、Ａ１ＭＢ２エンハンサーは、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０５５９１７号において開示されているエンハンサーである。一部の実施形態では、エンハンサーエレメントは、Ａ１ＭＢ２である。一部の実施形態では、エンハンサーエレメントは、複数コピーのＡ１ＭＢ２エンハンサー配列を含む。一部の実施形態では、Ａ１ＭＢ２エンハンサーは、ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする核酸配列に対して５’側に配置される。一部の実施形態では、Ａ１ＭＢ２エンハンサーは、ｍＴＴＲプロモーターなどのプロモーター配列に対して５’側に配置される。一部の実施形態では、エンハンサーエレメントは、配列番号１５の核酸配列を含む、Ａ１ＭＢ２エンハンサーである。

【０１５３】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、イントロンまたはイントロン配列を含む。一部の実施形態では、イントロン配列は、自然発生イントロン配列である。一部の実施形態では、イントロン配列は、合成配列である。一部の実施形態では、イントロン配列は、自然発生イントロン配列に由来する。一部の実施形態では、イントロン配列は、ハイブリッド合成イントロンまたはキメライントロンである。一部の実施形態では、イントロン配列は、は、ニワトリベータ－アクチンイントロン／ウサギベータ－グロビンイントロンからなり、５つの既存のＡＴＧ配列を消失させて、偽翻訳開始を低減するように修飾されたキメライントロンである。一部の実施形態では、キメライントロンは、配列番号１７の核酸配列を含む。一部の実施形態では、イントロン配列は、ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする核酸配列に対して５’側に配置される。一部の実施形態では、キメライントロンは、ｍＴＴＲプロモーターなどのプロモーター配列に対して５’側に配置される。

【０１５４】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、転写後調節エレメントを含む。ある特定の実施形態では、転写後調節エレメントは、突然変異型ウッドチャック肝炎ウイルス調節エレメント（ＷＰＲＥ）を含む。ＷＰＲＥは、ウイルスベクターにより送達される導入遺伝子の発現を増強すると考えられる。ＷＰＲＥの例については、Ｚｕｆｆｅｒｅｙら（１９９９）、Ｊ Ｖｉｒｏｌ．、７３（４）：２８８６～２８９２；Ｌｏｅｂら（１９９９）、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、１０（１４）：２２９５～２３０５において記載されている。一部の実施形態では、ＷＰＲＥは、ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする核酸配列に対して３’側に配置される。一部の実施形態では、ＷＰＲＥは、配列番号１８の核酸配列を含む。

【０１５５】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、転写終結因子を含む。一部の実施形態では、転写終結因子は、ポリアデニル化（ポリ（Ａ））配列である。転写終結因子の非限定例は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（ＢＧＨｐＡ）、サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル（ＳＶ４０ｐＡ）、または合成ポリアデニル化シグナルに由来する転写終結因子を含む。一実施形態では、３’ＵＴＲポリ（Ａ）テールは、アクチンポリ（Ａ）部位を含む。一実施形態では、３’ＵＴＲポリ（Ａ）テールは、ヘモグロビンポリ（Ａ）部位を含む。一部の実施形態では、転写終結因子は、ＢＧＨｐＡである。ＢＧＨｐＡ転写終結因子の例については、Ｗｏｙｃｈｉｋら（１９８４）、ＰＮＡＳ、８１：３９４４～３９４８において記載されている。一部の実施形態では、転写終結因子は、ＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする核酸配列をコードする遺伝子カセットの３’末端に配置される。一部の実施形態では、転写終結因子は、配列番号１９の核酸配列を含むＢＧＨｐＡである。

【０１５６】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、１つまたはそれ以上のＤＮＡ

核ターゲティング配列（ＤＴＳ）を含む。ＤＴＳは、このような配列を含有するＤＮＡ分子の、核への移動を促進する。ある特定の実施形態では、ＤＴＳは、ＳＶ４０エンハンサー配列を含む。ある特定の実施形態では、ＤＴＳは、ｃ－Ｍｙｃエンハンサー配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、第１のＩＴＲと第２のＩＴＲとの間に配置されたＤＴＳを含む。一部の実施形態では、核酸分子は、第１のＩＴＲに対して３’側に配置され、かつ、導入遺伝子（例えば、ＦＶＩＩＩタンパク質）に対して５’側に配置されたＤＴＳを含む。一部の実施形態では、核酸分子は、導入遺伝子に対して３’側に配置され、かつ、核酸分子上の第２のＩＴＲに対して５’側に配置されたＤＴＳを含む。

【０１５７】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）阻害配列を含む。例示的ＴＬＲ９阻害配列については、例えば、Ｔｒｉｅｕら（２００６）、Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２６（６）：５２７～４４；Ａｓｈｍａｎら、Ｉｎｔ’ｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、２３（３）：２０３～１４において記載されている。

【０１５８】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、ＨＢｏＶ１の非構造タンパク質をコードする核酸配列を含む。「非構造タンパク質」とは、ＨＢｏＶ１により発現される、６つのタンパク質、すなわち、ＮＳ１、ＮＳ１－７０、ＮＳ２、ＮＳ３、ＮＳ４、およびＮＰ１のうちのいずれかを指す。非構造タンパク質は、単一のウイルスプレｍＲＮＡの、選択的スプライシングおよびポリアデニル化を介して作出されるｍＲＮＡ転写物により発現される。ＮＳ１～ＮＳ４のタンパク質は、同じオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の、異なる領域内においてコードされる。ＮＳ１は、ＨＢｏＶ１の複製起点に結合し、おそらく、ローリングヘアピンの複製時に、起点の一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）にニックを入れる。ＮＳ１は、真核細胞内におけるＨＢｏＶ１　ＩＴＲ媒介ベクターの発現において重要な役割を果たす。一実施形態では、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１を発現する発現構築物を作出した。一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、Ｓｈｅｎら（２０１５）、Ｊ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、８９（１９）：１００９７～１０１０９において記載されている非構造タンパク質をコードする。

【０１５９】

一部の実施形態では、核酸分子は、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合性部位を含む。一実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合性部位は、ｍｉＲ－１４２－３ｐに対する、ｍｉＲＮＡ結合性部位である。他の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合性部位は、Ｒｅｎｎｉｅら（２０１６）、ＲＮＡ　Ｂｉｏｌ．、１３（６）：５５４～５６０により記載されている、ｍｉＲＮＡ結合性部位である。

【０１６０】

バキュロウイルス内における、ｃｅＤＮＡの作製

バキュロウイルスは、昆虫に感染する、最も顕著なウイルスである。それらの大部分が、鱗翅目の昆虫に由来する、５００を超えるバキュロウイルス分離株が同定されている。２つの、最も一般的な分離株は、オートグラファカリフォルニカ多重核多角体病ウイルス（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ　ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒｕｓ）（ＡｃＭＮＰＶ）、およびカイコ核多角体病ウイルス（ＢｍＮＰＶ）である。発現ベクターの中で、バキュロウイルスは、それらの並外れた遺伝子カーゴ容量（最大で、数十ｋｂ、一部では、最大で、１００ｋｂと報告している）のために、傑出している。この導入遺伝子容量は、組換えＡＡＶベクター（最大で、３８ｋｂの発現カセット）の作製のために使用されている。しかし、遺伝子治療のためのウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを作製する場合、いくつかのバキュロウイルス発現ベクターは、昆虫宿主細胞への感染を要求されることが多い。バキュロウイルス発現ベクターの各々の作出は、時間がかかり、作製費用がかさむことから、大半のバキュロウイルス発現ベクター系の著明な欠点を表す。しかし、既存のバクミドツールにより達せられる、複数の導入遺伝子を収容するように、特異的にデザインされた、新たな多用途型バキュロウ

イルスシャトルベクター（バクミド）が作出された。この多用途型バクミド（「ＢＩＶＶＢａｃ」と呼ばれる）はまた、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける遺伝子治療のほか、任意の所望のタンパク質、例えば、組換えタンパク質の作製のための、ｒＡＡＶベクターの作製のためにも使用される。このバクミド発現系については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許出願第６３／０６９，０７３号において、さらに記載されている。

【０１６１】

ある特定の実施形態では、開示される核酸分子は、「ＢＩＶＶＢａｃ」組換えバクミドを含む、バキュロウイルス発現ベクター系を使用して作製される。ある特定の実施形態では、ＢＩＶＶＢａｃは、少なくとも２つの外来配列挿入部位を含む、遺伝子改変ＡｃＭＮＰＶである。少なくとも２つの外来配列挿入部位を含むバクミドを含む、バキュロウイルス発現ベクター系は、作出される必要がある、バキュロウイルス発現ベクターの総数の低減を可能とする。

【０１６２】

ある特定の実施形態では、ＢＩＶＶＢａｃは、第１の外来配列挿入部位および第２の外来配列挿入部位を含む。外来配列（例えば、異種配列、異種遺伝子）の挿入を駆動するのに、異なる機構を利用すると、第１の外来配列挿入部位と第２の外来配列挿入部位は異なりうる。外来配列の挿入は、当技術分野で公知の任意の方法により駆動される。例えば、外来配列は、転移により挿入される場合もあり、部位特異的組換えにより挿入される場合もある。外来配列の挿入時に、レポーター遺伝子が破壊されるよう、外来配列挿入部位は、レポーター遺伝子内に組み入れられるようにデザインされる。レポーター遺伝子の破壊は、外来配列がその中に挿入されたバクミドクローンを同定する一助となりうる。このような実施形態では、外来配列挿入部位が、インフレームにおいて、レポーター遺伝子と融合されるか、またはレポーター遺伝子が、インフレームにおいて、外来配列挿入部位と融合される。

【０１６３】

ある特定の実施形態では、第１の外来配列挿入部位は、転移を介して、外来配列の挿入を可能とする。ある特定の実施形態では、第１の外来配列挿入部位は、トランスポゾンの挿入のための、優先的標的部位を含む。ある特定の実施形態では、第１の外来配列挿入部位は、トランスポゾンの挿入のための、優先的標的部位である。ある特定の実施形態では、第１の外来配列挿入部位は、細菌トランスポゾンのための接合部位である、優先的標的部位である。当業者には、適切な細菌トランスポゾン、およびそれらの対応する接合部位が公知である。例えば、トランスポゾンであるＴｎ７は、細菌染色体の特異的部位（ａｔｔＴｎ７）へと、高頻度で転移するその能力について公知である。したがって、ある特定の実施形態では、第１の外来配列挿入部位は、Ｔｎ７トランスポゾン（例えば、ａｔｔＴｎ７）のための接合部位である、優先的標的部位である。一部の実施形態では、第１の外来配列挿入部位は、ｍｉｎｉ－Ｔｎ７トランスポゾン（例えば、Ｔｎ７転移因子による認識およびＴｎ７トランスポゾンの挿入のために要求される最小ＤＮＡ配列である、ｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７）のための接合部位である、優先的標的部位である。

【０１６４】

ある特定の実施形態では、第２の外来配列挿入部位は、部位特異的組換えを介して、外来配列の挿入を可能とする。ある特定の実施形態では、第２の外来配列挿入部位は、部位特異的組換えイベントを媒介することが可能な、優先的標的部位を含む。当業者には、多様な部位特異的リコンビナーゼ技術が公知である。例えば、Ｃｒｅ－ｌｏｘＰ系は、ｌｏｘＰ部位と呼ばれる、３４塩基対のＤＮＡ配列を認識することが可能である、Ｃｒｅリコンビナーゼを介する、部位特異的組換えを媒介する。したがって、第２の外来配列挿入部位は、Ｃｒｅ媒介型組換えのための、優先的標的部位である。ある特定の実施形態では、第２の外来配列挿入部位は、Ｃｒｅリコンビナーゼにより認識することが可能な、ｌｏｘＰ部位またはこれらの変異体を含む、優先的標的部位である。

【０１６５】

一部の実施形態では、組換えバクミドは、バクミドが、そのコードタンパク質の発現の低減を呈するように、変異体ＶＰ８０遺伝子を含む。例えば、本明細書では、ＶＰ８０遺伝子遺伝子座内の挿入および／または欠失に起因する、不活化ＶＰ８０遺伝子を含む、バキュロウイルスＤＮＡ骨格が開示される。一部の実施形態では、組換えバクミドは、米国特許出願第ＵＳ６３／０６９，１１５号において開示されているバクミドを含む。

【０１６６】

ある特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、単一のバキュロウイルス発現ベクターを使用して作製される。この「ＯｎｅＢＡＣ」アプローチでは、単一のバキュロウイルス発現ベクター（例えば、ＢＩＶＶＢａｃ）は、バキュロウイルス系内のｃｅＤＮＡ作製に要求される、全ての必須エレメントをコードし、潜在的に、ｃｅＤＮＡ作製のための、任意のバキュロウイルス許容性細胞株において使用される。このアプローチは、図１Ａに描示される通りである。

【０１６７】

ある特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、複数のバキュロウイルス発現ベクターを使用して作製される。この「ＴｗｏＢＡＣ」アプローチでは、ｃｅＤＮＡ作製に要求される必須エレメントは、２つの異なるバキュロウイルス（例えば、２つのＢＩＶＶＢａｃバクミド）へと挿入され、潜在的に、バキュロウイルス感染に許容性である任意の細胞株における共感染のために使用される。このアプローチは、図１Ｂに描示される通りである。

【０１６８】

ある特定の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、安定細胞株により作製される。このアプローチでは、ｃｅＤＮＡ作製に要求される必須エレメントは、バキュロウイルス系の、いずれの構成要素へも挿入される。このアプローチは、図１Ｃに描示される通りである。安定細胞株は、バキュロウイルス遺伝子プロモーター（例えば、バキュロウイルス構成的遺伝子プロモーター）の制御下における、タンパク質コード配列の安定的組込みにより作出される。ある特定の実施形態では、安定細胞株は、昆虫安定細胞株である。

【０１６９】

当技術分野では、核酸の、様々な宿主細胞株への安定的組込みのための方法が公知である。例えば、選択（例えば、選択用マーカーの使用を介する）の反復は、選択用マーカーを含有する核酸（ならびにＡＡＶのｃａｐ遺伝子およびｒｅｐ遺伝子、ならびに／またはｒＡＡＶゲノム）を組み込んだ細胞について選択するのに使用される。他の実施形態では、核酸は、プロデューサー細胞株を作出するように、細胞株へと、部位特異的に組み込まれる。当技術分野では、ＦＬＰ／ＦＲＴ（例えば、Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ，Ｓ．ら（１９９１）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５１：１３５１～１３５５を参照されたい）、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ（例えば、Ｓａｕｅｒ，Ｂ．およびＨｅｎｄｅｒｓｏｎ，Ｎ．（１９８８）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８５：５１６６～５１７０を参照されたい）、およびｐｈｉ　Ｃ３１－ａｔｔ（例えば、Ｇｒｏｔｈ，Ａ．Ｃ．ら（２０００）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９７：５９９５～６０００を参照されたい）など、いくつかの部位特異的組換え系が公知である。

【０１７０】

本開示はまた、本開示の核酸分子によりコードされるポリペプチドも提供する。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、本明細書で開示される単離核酸分子を含むベクターによりコードされる。さらに他の実施形態では、本開示のポリペプチドは、本明細書で開示される単離核酸分子を含む宿主細胞により作製される。

【０１７１】

宿主細胞

本開示はまた、本開示の核酸分子またはベクターを含む宿主細胞も提供する。本明細書で使用される、「形質転換」という用語は、広義において、レシピエント宿主細胞への、ＤＮＡの導入であって、遺伝子型を変化させ、結果として、レシピエント細胞の変化をもたらす導入を指すように使用されるものとする。

【０１７２】

「宿主細胞」とは、組換えＤＮＡ法を使用して構築され、少なくとも１つの異種遺伝子をコードするベクターにより形質転換された細胞を指す。本開示の宿主細胞は、好ましくは、哺乳動物由来であり；最も好ましくは、ヒト由来またはマウス由来である。当業者は、それらの目的に最も良く適した、特定の宿主細胞株を、優先的に決定する能力を伴うと見なされている。例示的宿主細胞株は、ＣＨＯ、ＤＧ４４、およびＤＵＸＢ１１（チャイニーズハムスター卵巣細胞株、ＤＨＦＲ欠失）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸癌）、ＣＶＩ（サル腎臓細胞株）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原を伴う、ＣＶＩ細胞の派生細胞）、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）ＢＡＬＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓細胞株）、ＳＰ２／Ｏ（マウス骨髄腫）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ８．６５３（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）、ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）、ＮＳ０、ＣＡＰ、ＢＨＫ２１、およびＨＥＫ２９３（ヒト腎臓）を含むがこれらに限定されない。特定の一実施形態では、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＢＨＫ２１細胞、ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞、ＮＳ０細胞、ＣＡＰ細胞、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、本開示の宿主細胞は、昆虫由来である。特定の一実施形態では、宿主細胞は、ＳＦ９細胞である。宿主細胞株は、典型的に、商業サービスである、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、または公刊された文献から入手可能である。

【０１７３】

本開示の核酸分子またはベクターの、宿主細胞への導入は、当業者に周知である、多様な技法により達せられる。これらは、トランスフェクション（電気泳動および電気穿孔を含む）、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープＤＮＡを伴う細胞融合、マイクロインジェクション、および無傷ウイルスによる感染を含むがこれらに限定されない。Ｒｉｄｇｗａｙ，Ａ．Ａ．Ｇ．「Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒｓ」、２４．２章、４７０～４７２頁、「Ｖｅｃｔｏｒｓ」、ＲｏｄｒｉｇｕｅｚおよびＤｅｎｈａｒｄｔ編（Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ、Ｂｏｓｔｏｎ、Ｍａｓｓ．１９８８）を参照されたい。最も好ましくは、宿主へのプラスミド導入は、電気穿孔を介する。形質転換細胞は、軽鎖および重鎖の作製に適切な条件下において増殖させ、重鎖タンパク質および／または軽鎖タンパク質の合成についてアッセイされる。例示的アッセイ法は、酵素免疫測定アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、または蛍光活性化細胞分取解析（ＦＡＣＳ）、免疫組織化学などを含む。

【０１７４】

本開示の単離核酸分子またはベクターを含む宿主細胞は、適切な増殖培地中において増殖させる。本明細書で使用される、「適切な増殖培地」という用語は、細胞の増殖に要求される栄養物質を含有する培地を意味する。細胞の増殖に要求される栄養物質は、炭素供給源、窒素供給源、必須アミノ酸、ビタミン、ミネラル、および増殖因子を含みうる。場合により、培地は、１つまたはそれ以上の選択因子を含有しうる。場合により、培地は、子ウシ血清またはウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を含有しうる。一実施形態では、培地は、実質的に、ＩｇＧを含有しない。増殖培地は、一般に、例えば、ＤＮＡ構築物上の選択用マーカーにより補完されるか、またはＤＮＡ構築物を共トランスフェクトされた、薬物選択または必須栄養物質の欠損により、ＤＮＡ構築物を含有する細胞について選択するであろう。培養された哺乳動物細胞は、一般に、市販の血清含有培地または無血清培地（例えば、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、ＤＭＥＭ／Ｆ１２）中において増殖させる。一実施形態では、培地は、ＣＤｏｐｔｉＣＨＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ．）である。別の実施形態では、培地は、ＣＤ１７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ．）である。使用される特定の細胞株に適切な培地の選択は、当業者の水準内にある。

【０１７５】

本開示の態様は、本明細書で記載される核酸分子をクローニングする方法であって、複雑な二次構造が可能な核酸分子を、適切なベクターへと挿入する工程と、結果として得られるベクターを、適切な細菌宿主株へと導入する工程とを含む方法をもたらす。当技術分

野で公知の通り、核酸の複雑な二次構造（例えば、長い回文領域）は、不安定であり、細菌宿主株内のクローニングが困難な場合がある。例えば、第１のＩＴＲおよび第２のＩＴＲ（例えば、ＡＡＶ以外のパルボウイルスＩＴＲ、例えば、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ）を含む、本開示の核酸分子は、常套的方法を使用するクローニングが困難な場合がある。長いＤＮＡ回文配列は、ＤＮＡの複製を阻害し、大腸菌、バチルス属、連鎖球菌属、ストレプトミセス属、出芽酵母、マウス、およびヒトのゲノム内において不安定である。これらの影響は、鎖内塩基対合による、ヘアピンまたは十字型構造の形成から生じる。大腸菌内では、ＤＮＡ複製の阻害は、ＳｂｃＣ突然変異体またはＳｂｃＤ突然変異体において、著明に克服される場合がある。ＳｂｃＤは、ＳｂｃＣＤ複合体のヌクレアーゼサブユニットであり、ＳｂｃＣは、ＡＴＰアーゼサブユニットである。大腸菌ＳｂｃＣＤ複合体は、長い回文配列の複製を阻止する一因となる、エクソヌクレアーゼ複合体である。ＳｂｃＣＤ複合体は、ＡＴＰ依存性二本鎖ＤＮＡエクソヌクレアーゼ活性、およびＡＴＰ非依存性一本鎖ＤＮＡエンドヌクレアーゼ活性を伴う核である。ＳｂｃＣＤは、ＤＮＡ回文配列を認識し、生じるヘアピン構造を攻撃することにより、複製フォークを崩壊させうる。

【０１７６】

ある特定の実施形態では、適切な細菌宿主株は、十字型ＤＮＡ構造を分解することが不可能である。ある特定の実施形態では、適切な細菌宿主株は、ＳｂｃＣＤ複合体内の破壊を含む。一部の実施形態では、ＳｂｃＣＤ複合体内の破壊は、ＳｂｃＣ遺伝子内および／またはＳｂｃＤ遺伝子内の遺伝子破壊を含む。ある特定の実施形態では、ＳｂｃＣＤ複合体内の破壊は、ＳｂｃＣ遺伝子内の遺伝子破壊を含む。当技術分野では、ＳｂｃＣ遺伝子内の遺伝子破壊を含む、多様な細菌宿主株が公知である。例えば、限定せずに述べると、細菌宿主株である、ＰＭＣ１０３は、遺伝子型である、ｓｂｃＣ、ｒｅｃＤ、ｍｃｒＡ、ΔｍｃｒＢＣＦを含み；細菌宿主株である、ＰＭＣ１０７は、遺伝子型である、ｒｅｃＢＣ、ｒｅｃＪ、ｓｂｃＢＣ、ｍｃｒＡ、ΔｍｃｒＢＣＦを含み；細菌宿主株である、ＳＵＲＥは、遺伝子型である、ｒｅｃＢ、ｒｅｃＪ、ｓｂｃＣ、ｍｃｒＡ、ΔｍｃｒＢＣＦ、ｕｍｕＣ、ｕｖｒＣを含む。したがって、一部の実施形態では、本明細書で記載される核酸分子をクローニングする方法は、複雑な二次構造が可能な核酸分子を、適切なベクターへと挿入する工程と、結果として得られるベクターを、宿主株である、ＰＭＣ１０３、ＰＭＣ１０７、またはＳＵＲＥへと導入する工程とを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で記載される核酸分子をクローニングする方法は、複雑な二次構造が可能な核酸分子を、適切なベクターへと挿入する工程と、結果として得られるベクターを、宿主株であるＰＭＣ１０３へと導入する工程とを含む。

【０１７７】

当技術分野では、適切なベクターが公知である。ある特定の実施形態では、本開示のクローニング法における使用に適するベクターは、低コピー量ベクターである。ある特定の実施形態では、本開示のクローニング法における使用に適するベクターは、ｐＢＲ３２２である。

【０１７８】

したがって、本開示は、核酸分子をクローニングする方法であって、複雑な二次構造が可能な核酸分子を、適切なベクターへと挿入する工程と、結果として得られるベクターを、ＳｂｃＣＤ複合体内の破壊を含む、細菌宿主株へと導入する工程とを含み、核酸分子は、第１の逆位末端反復（ＩＴＲ）、および第２のＩＴＲを含み、第１のＩＴＲおよび／または第２のＩＴＲは、配列番号１もしくは２に示されたヌクレオチド配列、またはこれらの機能的誘導体と少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または１００％同一であるヌクレオチド配列を含む方法を提供する。

【０１７９】

ＦＶＩＩＩポリペプチドの作製

本開示はまた、本開示の核酸分子によりコードされるポリペプチドも提供する。一部の

実施形態では、本開示のポリペプチドは、本明細書で開示される単離核酸分子を含むベクターによりコードされる。さらに他の実施形態では、本開示のポリペプチドは、本開示の単離核酸分子を含む宿主細胞により作製される。

【０１８０】

本開示の最適化核酸分子から、ＦＶＩＩＩタンパク質を組換えにより作製するために、様々な方法が利用可能である。所望の配列を有するポリヌクレオチドは、デノボの固相ＤＮＡ合成により作製される場合もあり、既に製造されたポリヌクレオチドの、ＰＣＲによる突然変異誘発を介して作製される場合もある。オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発は、ヌクレオチド配列内に、置換、挿入、欠失、または変更（例えば、コドンの変更）を製造するための１つの方法である。例えば、出発ＤＮＡは、所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドを、一本鎖ＤＮＡ鋳型とハイブリダイズさせることにより変更される。ハイブリダイゼーションの後、ＤＮＡポリメラーゼは、オリゴヌクレオチドプライマーを組み込む、鋳型の第２の相補鎖の全体を合成するのに使用される。一実施形態では、遺伝子操作、例えば、プライマーベースのＰＣＲ突然変異誘発は、本開示のポリヌクレオチドを作製するための、本明細書で規定される変更を組み込むのに十分である。

【０１８１】

組換えタンパク質の作製のために、ＦＶＩＩＩタンパク質をコードする、本開示の最適化ポリヌクレオチド配列は、適切な発現媒体、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメント、またはＲＮＡウイルスベクターの場合、複製および翻訳に必要なエレメントを含有するベクターへと挿入される。

【０１８２】

本開示のポリヌクレオチド配列は、ベクターへと、適正なリーディングフレーム内に挿入される。次いで、発現ベクターは、ポリペプチドを発現する適切な標的細胞にトランスフェクトされる。当技術分野で公知のトランスフェクション法は、リン酸カルシウム沈殿（Ｗｉｇｌｅｒら、１９７８、Ｃｅｌｌ、１４：７２５）、および電気穿孔（Ｎｅｕｍａｎｎら、１９８２、ＥＭＢＯ Ｊ．、１：８４１）を含むがこれらに限定されない。本明細書で記載されるＦＶＩＩＩタンパク質を、真核細胞内において発現させるのに、様々な宿主発現ベクター系が利用される。一実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞（例えば、ＨＥＫ２９３細胞、ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、Ｃｏｓ細胞、ＨｅＬａ細胞）を含む動物細胞である。本開示のポリヌクレオチド配列はまた、ＦＶＩＩＩタンパク質の分泌を可能とするシグナル配列もコードしうる。当業者は、ＦＶＩＩＩタンパク質が翻訳されるときに、シグナル配列は、細胞により切断されて、成熟タンパク質を形成することを理解するであろう。当技術分野では、多様なシグナル配列、例えば、天然第ＶＩＩ因子シグナル配列、天然第ＩＸ因子シグナル配列、およびマウスＩｇＫ軽鎖シグナル配列が公知である。代替的に、シグナル配列が組み入れられない場合、ＦＶＩＩＩタンパク質は、細胞を溶解させることにより回収される。

【０１８３】

本開示のＦＶＩＩＩタンパク質は、齧歯動物、ヤギ、ヒツジ、ブタ、またはウシなどのトランスジェニック動物において合成される。「トランスジェニック動物」という用語は、外来遺伝子を、それらのゲノムへと組み込んだ、非ヒト動物を指す。この遺伝子は、生殖細胞系列組織内に存在するため、親から、子孫へと受け渡される。外因性遺伝子は、単一細胞胚へと導入される（Ｂｒｉｎｓｔｅｒら、１９８５、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８２：４４３８）。当技術分野では、免疫グロブリン分子を産生するトランスジェニック動物を含む、トランスジェニック動物を作製する方法が公知である（Ｗａｇｎｅｒら、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７８：６３７６；ＭｃＫｎｉｇｈｔら、１９８３、Ｃｅｌｌ、３４：３３５；Ｂｒｉｎｓｔｅｒら、１９８３、Ｎａｔｕｒｅ、３０６：３３２；Ｒｉｔｃｈｉｅら、１９８４、Ｎａｔｕｒｅ、３１２：５１７；Ｂａｌｄａｓｓａｒｒｅら、２００３、Ｔｈｅｒｉｏｇｅｎｏｌｏｇｙ、５９：８３１；Ｒｏｂｌら、２００３、Ｔｈｅｒｉｏｇｅｎｏｌｏｇｙ、５９：１０７；Ｍａｌａｓｓａｇｎｅら、２００３、Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ

１０（３）：２６７）。
【０１８４】
発現ベクターは、組換え作製タンパク質の、容易な精製または同定を可能とするタグをコードしうる。例は、ハイブリッドタンパク質が作製され；ｐＧＥＸベクターが、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグを伴うタンパク質を発現させるのに使用されるように、本明細書で記載されるＦＶＩＩＩタンパク質のコード配列が、ｌａｃ　Ｚコード領域とインフレームにおいて、ベクターへとライゲーションされたベクターである、ｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒら、１９８３、ＥＭＢＯ　Ｊ．、２：１７９１）を含むがこれらに限定されない。これらのタンパク質は、通例、可溶性であり、グルタチオン－アガロースビーズへの吸着に続く、遊離グルタチオンの存在下における溶出により、細胞から、容易に精製される。ベクターは、精製の後における、タグの容易な除去のための切断部位（例えば、ＰｒｅＣｉｓｓｉｏｎ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ、Ｐｅａｐａｃｋ、Ｎ．Ｊ．））を含む。
【０１８５】
本開示の目的で、多数の発現ベクター系が援用される。これらの発現ベクターは、典型的に、宿主生物内において、エピソームとして、または宿主染色体ＤＮＡの不可分の部分として複製可能である。発現ベクターは、プロモーター（例えば、天然会合プロモーターまたは異種プロモーター）、エンハンサー、シグナル配列、スプライスシグナル、エンハンサーエレメント、および転写終結配列を含むがこれらに限定されない発現制御配列を含みうる。好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換するか、またはこれらにトランスフェクトすることが可能なベクター内の、真核プロモーター系である。発現ベクターはまた、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ＲＳＶ、ＭＭＴＶまたはＭＯＭＬＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、またはＳＶ４０ウイルスなどの動物ウイルスに由来するＤＮＡエレメントも利用しうる。他の発現ベクターは、内部にリボソーム結合性部位を伴う、ポリシストロニック系の使用を伴う。
【０１８６】
一般に、発現ベクターは、所望のＤＮＡ配列により形質転換された細胞の検出を可能とする、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性、ヒグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、またはネオマイシン耐性）（例えば、Ｉｔａｋｕｒａら、米国特許第４，７０４，３６２号を参照されたい）を含有する。ＤＮＡを、それらの染色体へと組み込んだ細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能とする、１つまたはそれ以上のマーカーを導入することにより選択される。マーカーは、栄養要求性宿主に、原栄養性をもたらす場合もあり、殺生物剤（例えば、抗生剤）耐性をもたらす場合もあり、銅などの重金属に対する耐性をもたらす場合もある。選択用マーカー遺伝子は、発現されるＤＮＡ配列へと、直接連結される場合もあり、共形質転換により、同じ細胞へと導入される場合もある。
【０１８７】
最適化ＦＶＩＩＩ配列を発現させるために有用なベクターの例は、ＮＥＯＳＰＬＡ（米国特許第６，１５９，７３０号）である。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター／エンハンサー、マウスベータグロビン主要プロモーター、ＳＶ４０複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン１およびエクソン２、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子および同リーダー配列を含有する。このベクターは、可変領域遺伝子および定常領域遺伝子の組込み時における、極めて高レベルの抗体の発現、細胞のトランスフェクションに続く、Ｇ４１８含有培地中の選択およびメトトレキサートの増幅を結果としてもたらすことが見出されている。ベクター系についてはまた、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み入れられる、米国特許第５，７３６，１３７号および同第５，６５８，５７０号においても教示されている。この系は、例えば、１日当たり細胞１個当たり＞３０ｐｇの高発現レベルをもたらす。他の例示的ベクター系も、例えば、米国特許第６，４１３，７７７号において開示さ

れている。

【０１８８】

他の実施形態では、本開示のポリペプチドは、ポリシストロニック構築物を使用して発現される。これらの発現系では、多量体結合性タンパク質の、複数のポリペプチドなど、複数の目的の遺伝子産物が、単一のポリシストロニック構築物から作製される。これらの系は、真核宿主細胞内において、比較的高レベルのポリペプチドを作製するのに、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を使用するので有利である。適合性のＩＲＥＳ配列は、これもまた、本明細書に組み入れられる、米国特許第６，１９３，９８０号において開示されている。

【０１８９】

より一般には、ポリペプチドをコードする、ベクターまたはＤＮＡ配列が製造されると、発現ベクターは、適切な宿主細胞へと導入される。すなわち、宿主細胞は、形質転換される。プラスミドの、宿主細胞への導入は、上記で論じられた通り、当業者に周知である、多様な技法により達せられる。形質転換細胞は、ＦＶＩＩＩポリペプチドの作製に適切な条件下において増殖させ、ＦＶＩＩＩポリペプチドの合成についてアッセイされる。例示的アッセイ法は、酵素免疫測定アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、または蛍光活性化細胞分取解析（ＦＡＣＳ）、免疫組織化学などを含む。

【０１９０】

組換え宿主からの、ポリペプチドの単離のための工程についての記載において、「細胞」および「細胞培養物」という用語は、そうでないことが明確に指定されない限りにおいて、ポリペプチドの供給源を表示するように、互換的に使用される。言い換えると、「細胞」からの、ポリペプチドの回収は、スピンダウンされた全細胞からの回収を意味する場合もあり、培地および懸濁細胞の両方を含有する細胞培養物を意味する場合もある。

【０１９１】

タンパク質発現のために使用される宿主細胞株は、本開示の単離核酸は、ヒト細胞内の発現のために最適化されるので、好ましくは、哺乳動物由来であり；最も好ましくは、ヒト由来またはマウス由来である。例示的宿主細胞株については、上記で記載されている。ＦＶＩＩＩ活性を伴うポリペプチドを作製する方法についての、一実施形態では、宿主細胞は、ＨＥＫ２９３細胞である。ＦＶＩＩＩ活性を伴うポリペプチドを作製する方法についての、別の実施形態では、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞である。

【０１９２】

本開示のポリペプチドをコードする遺伝子はまた、細菌または酵母または植物細胞など、非哺乳動物細胞内においても発現される。この点で、細菌など、哺乳動物以外の多様な単細胞微生物、すなわち、培養物中の増殖または発酵が可能な微生物もまた形質転換できることが察知されるであろう。形質転換を受けやすい細菌は、大腸菌またはサルモネラ属の株などの腸内細菌科；枯草菌などのバチルス科；肺炎球菌属；連鎖球菌属およびインフルエンザ菌のメンバーを含む。細菌内において発現されると、ポリペプチドは、典型的に、封入体の一部となることも、さらに察知されるであろう。ポリペプチドは、単離され、精製され、次いで、機能的分子へとアセンブルされなければならない。

【０１９３】

代替的に、本開示の最適化ヌクレオチド配列は、トランスジェニック動物のゲノムへの導入、および、後続する、トランスジェニック動物のミルク中における発現のために、導入遺伝子内に組み込まれる（例えば、Ｄｅｂｏｅｒら、ＵＳ５，７４１，９５７；Ｒｏｓｅｎ、ＵＳ５，３０４，４８９；およびＭｅａｄｅら、ＵＳ５，８４９，９９２を参照されたい）。適切な導入遺伝子は、カゼインまたはベータラクトブロブリンなどの乳腺特異的遺伝子に由来するプロモーターおよびエンハンサーと、作動可能に連結されたポリペプチドのコード配列を含む。

【０１９４】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける作製は、スケールアップが、所望のポリペプチドを大量にもたらすことを可能とする。当技術分野では、組織培養条件下において、哺乳動物細胞を培

養するための技法が公知であり、例えば、エアリフト型反応槽内、もしくは連続撹拌型反応槽内における、均質の懸濁培養物、または例えば、中空糸内、マイクロカプセル内、アガロースマイクロビーズ上、もしくはセラミックカートリッジ上に、固定化もしくは封入された細胞培養物を含む。必要であり、かつ／または所望である場合、ポリペプチドの溶液は、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的生合成の後、または本明細書で記載されるＨＩＣクロマトグラフィー工程の前もしくは後において、常套的クロマトグラフィー法例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ＤＥＡＥ－セルロースを介するクロマトグラフィー、または（免疫）アフィニティークロマトグラフィーにより精製される。場合により、下流における精製を容易とするように、アフィニティータグ配列（例えば、Ｈｉｓ（６）タグ）が、ポリペプチド配列へと接合されるか、またはポリペプチド配列内に組み入れられる場合がある。

【０１９５】

発現されると、ＦＶＩＩＩタンパク質は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、ＨＰＬＣ精製、ゲル電気泳動など（一般に、Ｓｃｏｐｅｓ、「Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ」（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎ．Ｙ．（１９８２）を参照されたい）を含む、当技術分野の標準的手順に従い精製される。少なくとも約９０～９５％の均質性を有する、実質的に純粋なタンパク質が、医薬への使用に好ましく、９８～９９％またはそれ以上の均質性が、最も好ましい。

【０１９６】

医薬組成物

本開示の単離核酸分子、核酸分子によりコードされる、ＦＶＩＩＩ活性を有するポリペプチド、ベクター、または宿主細胞を含有する組成物は、適切な、薬学的に許容される担体を含有しうる。例えば、組成物は、活性化合物の、作用部位への送達のためにデザインされる製造物への処理を容易とする賦形剤および／または補助剤を含有しうる。

【０１９７】

医薬組成物は、ボーラス注射による非経口投与（すなわち、静脈内投与、皮下投与、または筋内投与）のために製剤化される。注射用製剤は、単位剤形、例えば、アンプルまたは保存剤を添加された複数回投与用容器により提示される。組成物は、油性媒体中または水性媒体中の懸濁液、溶液、またはエマルジョンなどの形態を取り、懸濁剤、安定化剤、および／または分散剤など、製剤化剤を含有しうる。代替的に、有効成分は、適切な媒体、例えば、発熱物質非含有水による構成のための粉末形態の場合もある。

【０１９８】

非経口投与に適する製剤はまた、水溶性形態、例えば、水溶性塩形態にある活性化合物の水溶液も含む。加えて、適切な油性注射用懸濁液としての、活性化合物の懸濁液も投与される。適切な親油性溶媒または媒体は、脂肪油、例えば、ゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリドを含む。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘稠度を増大させる物質であって、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、およびデキストランを含む物質を含有しうる。場合により、懸濁液はまた、安定化剤も含有しうる。リポソームもまた、細胞または間質腔への送達のために、本開示の分子を封入するのに使用される。例示的な、薬学的に許容される担体は、生理学的に適合性である溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、水、生理食塩液、リン酸緩衝生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノールなどである。一部の実施形態では、組成物は、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを含む。他の実施形態では、組成物は、保湿剤など、薬学的に許容される物質、または有効成分の保管寿命または効能を増強する、保湿剤または乳化剤、保存剤または緩衝剤など、少量の補助物質を含む。

【０１９９】

本開示の組成物は、例えば、液体（例えば、注射用溶液および注入用溶液）剤形、分散液剤形、懸濁液剤形、半固体剤形、および固体剤形を含む、様々な形態でありうる。好ま

しい形態は、投与方式および治療適用に依存する。

【０２００】

組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高薬物濃度に適する、他の秩序構造として製剤化される。滅菌注射用溶液は、有効成分を、適切な溶媒中に、要求量において、要求に応じて、上記で列挙された成分のうちの１つまたは組合せと共に組み込むのに続き、濾過滅菌を行うことにより製造される。一般に、分散液は、有効成分を、塩基性分散媒と、上記で列挙された成分に由来する、他の要求される成分とを含有する滅菌媒体へと組み込むことにより製造される。滅菌注射用溶液を製造するための滅菌粉末の場合、好ましい製造方法は、あらかじめ滅菌濾過された溶液から、有効成分＋任意のさらなる所望の成分の粉末をもたらす、真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することにより維持される場合もあり、分散液の場合には、要求される粒子サイズを維持することにより維持される場合もあり、界面活性剤を使用することにより維持される場合もある。注射用組成物の持続吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組み入れることによりもたらすことができる。

【０２０１】

有効成分は、制御放出製剤またはデバイスにより製剤化される。このような製剤およびデバイスの例は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む。生体分解性ポリマー、生体適合性ポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸が使用される。当技術分野では、このような製剤およびデバイスを製造するための方法が公知である。例えば、「Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ」、Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ編、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９７８を参照されたい。

【０２０２】

注射用デポ製剤は、ポリラクチド－ポリグリコリドなどの生体分解性ポリマー中において、薬物のマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより作製される。薬物対ポリマー比、および援用されるポリマーの性格に応じて、薬物放出速度が制御される。他の例示的生体分解性ポリマーは、ポリオルトエステルおよびポリ無水物である。注射用デポ製剤はまた、薬物を、リポソーム内またはマイクロエマルジョン内に封入することによっても製造される。

【０２０３】

組成物へは、補助活性化合物が組み込まれる場合もある。一実施形態では、本開示のキメラタンパク質は、別の凝固因子、またはその変異体、断片、類似体、もしくは誘導体と共に製剤化される。例えば、凝固因子は、第Ｖ因子、第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、第Ｘ因子、第ＸＩ因子、第ＸＩＩ因子、第ＸＩＩＩ因子、プロトロンビン、フィブリノーゲン、フォンウィレブラント因子、もしくは組換え可溶性組織因子（ｒｓＴＦ）、または前出のうちのいずれかの活性化形態を含むがこれらに限定されない。止血剤の凝固因子はまた、抗フィブリン溶解薬、例えば、イプシロン－アミノカプロン酸、トラネキサム酸も含みうる。

【０２０４】

投与レジメンは、所望の最適の応答をもたらすように調整される。例えば、単回ボーラスが投与される場合もあり、時間経過にわたり、何回分かに分割された用量が投与される場合もあり、治療状況の緊急性により指し示される通り、用量は、これに応じて、低減される場合もあり、増大される場合もある。投与の容易さ、および投与量の均一性のために、非経口組成物を、単位剤形において製剤化することが有利である。例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」（Ｍａｃｋ Ｐｕｂ．Ｃｏ．、Ｅａｓｔｏｎ、Ｐａ．、１９８０）を参照されたい。

【０２０５】

活性化合物に加えて、液体剤形は、水、エチルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、

ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油、グリセロール、テトラヒドルフルルリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステルなどの不活性成分を含有しうる。

【０２０６】

適切な医薬担体の非限定例もまた、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」において記載されている。賦形剤の一部の例は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどを含む。組成物はまた、ｐＨ緩衝試薬および保湿剤または乳化剤も含有しうる。

【０２０７】

経口投与のために、医薬組成物は、常套的手段により製造される、錠剤またはカプセルの形態を取りうる。組成物はまた、液体、例えば、シロップまたは懸濁液としても製造される。液体は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化可食性脂肪）、乳化薬剤（レシチンまたはアカシアガム）、非水性媒体（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、または分画植物油）、および保存剤（例えば、メチル－ｐ－ヒドロキシベンゾエートもしくはプロピル－ｐ－ヒドロキシベンゾエート、またはソルビン酸）を含みうる。製剤はまた、芳香剤、着色剤、および甘味剤も含みうる。代替的に、組成物は、水または別の適切な媒体により構成するための、乾燥生成物として提供される。

【０２０８】

口腔内投与のために、組成物は、常套的プロトコールに従う、錠剤またはトローチ剤の形態を取りうる。

【０２０９】

吸入投与のために、本開示に従う使用のための化合物は、賦形剤を伴うか、またはこれを伴わない、噴霧化エアゾールの形態において、または、場合により、高圧ガス、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロメタン、二酸化炭素、または他の適切なガスによる、加圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレーの形態において送達されると好都合である。加圧エアゾールの場合、投与量単位は、計量された量を送達するバルブを装備することにより決定される。インヘラーまたは吸入器における使用のための、化合物と、ラクトースまたはデンプンなど、適切な粉末基剤とによる粉末ミックスを含有する、例えば、ゼラチンによるカプセルおよびカートリッジが製剤化される。

【０２１０】

医薬組成物はまた、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなど、常套的な座剤用基剤を含有する、座剤または停留浣腸として、直腸内投与のためにも製剤化される。

【０２１１】

一実施形態では、医薬組成物は、第ＶＩＩＩ因子活性を有するポリペプチド、第ＶＩＩＩ因子活性を有するポリペプチドをコードする最適化核酸分子、核酸分子を含むベクター、またはベクターと薬学的に許容される担体とを含む宿主細胞を含む。一部の実施形態では、組成物は、局所投与、眼内投与、非経口投与、髄腔内投与、硬膜下投与、および経口投与からなる群から選択される経路により投与される。非経口投与は、静脈内投与または皮下投与でありうる。

【０２１２】

処置法

一部の態様では、本開示は、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法であって、本明細書で開示される核酸分子、ベクター、ポリペプチド、または医薬組成物を投与する工程を含む方法を対象とする。

【０２１３】
一部の実施形態では、本開示は、出血障害を処置する方法を対象とする。一部の実施形態では、本開示は、Ａ型血友病を処置する方法を対象とする。
【０２１４】
単離核酸分子、ベクター、またはポリペプチドは、静脈内投与、皮下投与、筋内投与されるか、または任意の粘膜表面を介して、例えば、経口、舌下、口腔内、舌下、鼻腔内、直腸内、膣内、または肺内経路を介して投与されうる。凝固因子タンパク質は、キメラタンパク質の、所望の部位への徐放を可能とする、生体ポリマーによる固体支持体内に植え込まれる場合もあり、これへと連結される場合もある。
【０２１５】
一実施形態では、単離核酸分子、ベクター、またはポリペプチドの投与経路は、非経口経路である。本明細書で使用される、「非経口」という用語は、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、筋内投与、皮下投与、直腸内投与、または膣内投与を含む。一部の実施形態では、単離核酸分子、ベクター、またはポリペプチドは、静脈内投与される。これらの投与形態の全ては、本開示の範囲内にあることが、明確に想定されるが、投与のための形態は、特に、静脈内注射または動脈内注射または滴下のための注射用溶液であろう。
【０２１６】
状態の処置のための、本開示の組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者が、ヒトであるのか、動物であるのか、投与される他の医薬、および処置が、予防処置であるのか、治療処置であるのかを含む、多くの異なる因子に応じて変動する。通例、患者は、ヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む、非ヒト哺乳動物もまた、処置される場合がある。処置投与量は、安全性および効能を最適化する、当業者に公知である、規定の方法を使用して滴定される。
【０２１７】
本開示の核酸分子、ベクター、またはポリペプチドは、場合により、処置（例えば、予防的処置または治療的処置）を必要とする障害または状態の処置において効果的である、他の薬剤と組み合わせて投与される。
【０２１８】
本明細書で使用された、補助療法を伴うか、またはこれらと組み合わせた、本開示の単離核酸分子、ベクター、またはポリペプチドの投与とは、治療および開示されるポリペプチドの、逐次投与もしくは逐次適用、同時投与もしくは同時適用、併存投与もしくは併存適用、併用投与もしくは併用適用、共時投与もしくは共時適用、または並行投与もしくは並行適用を意味する。当業者は、組合せ療法レジメンの、多様な成分の投与または適用が、処置の効能を増強するようなタイミングでなされることを察知するであろう。当業者（例えば、医師）であれば、効果的な組合せ療法レジメンを、選択された補助療法、および本明細書の教示に基づき、不要な実験を伴わずに、たやすく識別することが可能であろう。
【０２１９】
本開示の単離核酸分子、ベクター、またはポリペプチドは、１つまたはそれ以上の薬剤と共に、またはこれらと組み合わせて（例えば、組合せ治療レジメンをもたらすように）使用されることも、さらに察知されるであろう。本開示のポリペプチドまたはポリヌクレオチドと組み合わされる、例示的薬剤は、処置される特定の障害のための、現行の標準治療を表す薬剤を含む。このような薬剤は、化学物質の場合もあり、天然におけるバイオ医薬品の場合もある。「バイオ医薬品」または「バイオ医薬剤」という用語とは、治療剤としての使用のために意図される、生物および／またはそれらの産物から作製される、任意の薬学的活性剤を指す。
【０２２０】
本開示のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと組み合わせて使用される薬剤の量は、対象により変動する場合もあり、当技術分野で公知の内容に従い投与される場合もある。例えば、Ｂｒｕｃｅ　Ａ　Ｃｈａｂｎｅｒら、「Ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ　Ａｇｅ

ｎｔｓ」、ＧＯＯＤＭＡＮおよびＧＩＬＭＡＮ、「ＰＨＡＲＭＡＣＯＬＯＧＩＣＡＬ ＢＡＳＩＳ ＯＦ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣＳ」、１２３３～１２８７（Ｊｏｅｌ Ｇ．Ｈａｒｄｍａｎら編、９版、１９９６）を参照されたい。別の実施形態では、標準治療と符合する、このような薬剤の量が投与される。

【０２２１】

一実施形態では、本明細書ではまた、本明細書で開示される核酸分子と、核酸分子を、それを必要とする対象へと投与するための指示書とを含むキットも開示される。本明細書の別の実施形態では、本明細書で提供される核酸分子を作製するためのバキュロウイルス系が開示される。核酸分子は、昆虫細胞内において作製される。別の実施形態では、発現構築物のためのナノ粒子送達系が提供される。発現構築物は、本明細書で開示される核酸分子を含む。

【０２２２】

遺伝子治療

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、遺伝子治療において使用される。本明細書で開示される、最適化ＦＶＩＩＩ核酸分子は、ＦＶＩＩＩの発現が要求される、任意の文脈において使用される。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号２のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号１のヌクレオチド配列を含む。

【０２２３】

例えば、体細胞の遺伝子治療は、Ａ型血友病のための可能な処置として探索されている。遺伝子治療は、ベクターの単回投与の後に、ＦＶＩＩＩの持続的な内因性産生を介して、疾患を治癒させる、その潜在的可能性のために、血友病のための、特に魅力的な処置である。Ａ型血友病は、その臨床症状が、血漿中において、微量（２００ｎｇ／ｍｌ）で循環する、単一の遺伝子産物（ＦＶＩＩＩ）の欠如に、完全に帰せられるため、遺伝子置換アプローチに十分に適する。

【０２２４】

一態様では、本明細書で記載される核酸分子は、ＡＡＶによる遺伝子治療において使用される。ＡＡＶは、多数の哺乳動物細胞に感染することが可能である。例えば、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎら（１９８５）、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、５：３２５１～３２６０；およびＧｒｉｍｍら（１９９９）、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、１０：２４４５～２４５０を参照されたい。ｒＡＡＶベクターは、細胞内における、遺伝子産物の発現を方向付ける調節配列の制御下にある、目的の遺伝子、またはその断片をコードする核酸配列を保有する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶは、担体、および投与に適する、さらなる成分と共に製剤化される。

【０２２５】

別の態様では、本明細書で記載される核酸分子は、レンチウイルスによる遺伝子治療において使用される。レンチウイルスは、ウイルスゲノムが、ＲＮＡである、ＲＮＡウイルスである。宿主細胞にレンチウイルスが感染すると、ゲノムＲＮＡが、ＤＮＡ中間体へと逆転写され、感染された細胞の染色体ＤＮＡへと、極めて効率的に組み込まれる。一部の実施形態では、レンチウイルスは、担体、および投与に適する、さらなる成分と共に製剤化される。別の態様では、本明細書で記載される核酸分子は、アデノウイルス療法において使用される。遺伝子治療のためのアデノウイルスの使用についての総説は、例えば、Ｗｏｌｄら（１９８５）、Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．、１３（６）：４２１～３３において見出される。別の態様では、本明細書で記載される核酸分子は、非ウイルス性遺伝子治療において使用される。本開示の最適化ＦＶＩＩＩタンパク質は、哺乳動物、例えば、ヒト患者のｉｎ ｖｉｖｏにおいて作製され、遺伝子治療アプローチを、出血凝固障害、関節血症、筋内出血、口内出血、出血、筋肉への出血、経口出血、外傷、外傷頭部、消化器出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸郭内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙内の出血、後腹膜腔内の出血、および腸腰筋鞘内の出血からなる群から選択される、出血疾患または出血障害の処置に使用すれば、治療的に有益であろう。一実施形態では、出血疾患

または出血障害は、血友病である。別の実施形態では、出血疾患または出血障害は、Ａ型血友病である。これは、適切な発現制御配列に作動可能に連結された、最適化ＦＶＩＩＩコード核酸の投与を伴う。ある特定の実施形態では、これらの配列は、ウイルスベクターへと組み込まれる。このような遺伝子治療に適するウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、エプスタイン－バーウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを含む。ウイルスベクターは、複製欠損ウイルスベクターでありうる。他の実施形態では、アデノウイルスベクターは、そのＥ１遺伝子またはＥ３遺伝子を欠失させている。他の実施形態では、配列は、当業者に公知である、非ウイルスベクターへも組み込まれる。

【０２２６】

別の態様では、本明細書で開示される核酸分子は、生物の遺伝情報（例えば、ゲノム）の特異的変更のために使用される。本明細書で使用される、「変更」または「遺伝情報の変更」という用語は、細胞のゲノム内の、任意の変化を指す。遺伝性障害の処置の文脈では、変更は、挿入、欠失、および／または補正を含みうるがこれらに限定されない。

【０２２７】

一部の態様では、変更はまた、遺伝子のノックイン、ノックアウト、またはノックダウンも含みうる。本明細書で使用される、「ノックイン」という用語は、ＤＮＡ配列またはその断片の、ゲノムへの付加を指す。ノックインされる、このようなＤＮＡ配列が、全遺伝子を含む場合もあり、全遺伝子または遺伝子が、遺伝子または前出の任意の部分もしくは断片と関連する調節配列を含む場合もある。例えば、突然変異体遺伝子を保有する細胞のゲノムへと、野生型タンパク質をコードするｃＤＮＡが挿入される。ノックイン戦略は、全体的にも、部分的にも、欠損遺伝子を置き換えることを必要としない。場合によって、ノックイン戦略は、既存の配列の、用意された配列による置換、例えば、突然変異体対立遺伝子の、野生型コピーによる置換をさらに伴いうる。「ノックアウト」という用語は、遺伝子または遺伝子発現の消失を指す。例えば、遺伝子は、リーディングフレームの破壊をもたらす、ヌクレオチド配列の欠失または付加によりノックアウトされる。別の例として述べると、遺伝子は、遺伝子の一部を、非関与性の配列により置き換えることによりノックアウトされる。本明細書で使用される、「ノックダウン」とは、遺伝子またはその遺伝子産物（複数可）の発現の低減を指す。遺伝子ノックダウンの結果として、タンパク質の活性または機能が弱められる場合もあり、タンパク質レベルが低減または無化される場合もある。

【０２２８】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸配列は、ゲノム編集のために使用される。ゲノム編集とは一般に、ゲノムのヌクレオチド配列を、好ましくは、精密な方式または所定の方式で修飾する工程を指す。本明細書で記載されるゲノム編集法の例は、部位指向ヌクレアーゼを使用して、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を、ゲノム内の正確な標的位置で切断し、これにより、一本鎖ＤＮＡ切断または二本鎖ＤＮＡ切断を、ゲノム内の特定の位置において創出する方法を含む。このような切断は、近年、Ｃｏｘら（２０１５）、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、２１（２）：１２１～３１において総説された通り、相同性指向修復（ＨＤＲ）および非相同末端結合（ＮＨＥＪ）など、天然の内因性細胞過程により修復される場合があり、規則的に修復されている。これら２つの主要なＤＮＡ修復工程は、代替的経路のファミリーからなる。ＮＨＥＪは、二本鎖切断から生じるＤＮＡ末端を直接接続するが、場合によって、遺伝子発現を破壊する場合もあり、増強する場合もある、ヌクレオチド配列の喪失または付加を伴う。ＨＤＲは、規定されたＤＮＡ配列を、切断点に挿入するための鋳型として、相同配列またはドナー配列を利用する。相同配列は、姉妹染色分体など、内因性ゲノム内に存在しうる。代替的に、ドナーは、ヌクレアーゼにより切断される遺伝子座との相同性が大きな領域を有するが、また、切断された標的遺伝子座へと組み込まれる欠失を含む、さらなる配列または配列変化も含有しうる、プラスミド、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド、二重鎖オリゴヌクレオチ

ド、またはウイルスなどの外因性核酸でありうる。第３の修復機構は、「代替的ＮＨＥＪ」ともまた称され、切断部位において、小規模の欠失および挿入が生じうるという点で、遺伝子結果がＮＨＥＪと同様である、マイクロ相同性媒介型末端結合（ＭＭＥＪ）でありうる。ＭＭＥＪは、より好適な、ＤＮＡ末端の接続による修復結果を駆動するように、ＤＮＡ切断部位を挟む、少数の塩基対による相同配列を使用しうるが、近年の報告は、この工程の分子機構についてさらに解明している（例えば、ＣｈｏおよびＧｒｅｅｎｂｅｒｇ（２０１５）、Ｎａｔｕｒｅ、５１８、１７４～７６を参照されたい）。一部の場合には、ＤＮＡ切断部位における潜在的なマイクロ相同性についての解析に基づき、可能性が高い修復結果を予測することが可能でありうる。

【０２２９】

これらのゲノム編集機構の各々は、所望のゲノムの変更を創出するのに使用される。ゲノム編集工程内の段階は、意図される突然変異の近傍部位としての標的遺伝子座内において、１つのＤＮＡ切断、または二本鎖切断もしくは２つの一本鎖切断としての２つのＤＮＡ切断を創出することでありうる。これは、ＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼ系など、部位指向ポリペプチドの使用を介して達成される。

【０２３０】

別の態様では、本明細書で記載される核酸分子は、ＦＶＩＩＩ　ｃｅＤＮＡの、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）媒介送達において使用される。血漿中の核酸の分解を阻み、細胞内へのオリゴヌクレオチドの取込みを容易とするのに、中性脂質、コレステロール、ＰＥＧ、ＰＥＧ化脂質など、他の脂質成分を伴う、カチオン性脂質から形成される脂質ナノ粒子と、オリゴヌクレオチドとが使用されている。このような脂質ナノ粒子は、本明細書で記載される核酸分子を、対象へと送達するのに使用される。

【０２３１】

本開示は、対象における、ＦＶＩＩＩ活性を伴うポリペプチドの発現を増大させる方法であって、本開示の単離核酸分子を、それを必要とする対象へと投与する工程を含み、ポリペプチドの発現は、配列番号６を含む参照核酸分子と比べて増大される方法を提供する。本開示はまた、対象における、ＦＶＩＩＩ活性を伴うポリペプチドの発現を増大させる方法であって、本開示のベクターを、それを必要とする対象へと投与する工程を含み、ポリペプチドの発現は、参照核酸分子を含むベクターと比べて増大される方法も提供する。

【０２３２】

本明細書で記載される、多様な態様、実施形態、および選択肢の全ては、任意の変化形および全ての変化形において組み合わされる。

【０２３３】

本明細書で言及される、全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許適用が、参照により組み入れられるように、具体的、かつ、個別に指し示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【０２３４】

実施例

前出の開示を提供したが、本明細書で提供される実施例への参照により、さらなる理解が得られる。これらの実施例は、例示だけを目的とするものであり、限定的であることは意図されない。

【実施例１】

【０２３５】

ｃｅＤＮＡ作製のためのアプローチ

バキュロウイルス昆虫細胞系では、組換えＢＥＶは、強力なプロモーター下にある、目的の遺伝子を送達し、昆虫細胞内におけるウイルスの複製に不可欠である、転写複合体をもたらす。バキュロウイルス昆虫細胞系は、安定細胞株の形態において、目的の導入遺伝子を、バキュロウイルスゲノム内および／または昆虫細胞ゲノム内に挿入する柔軟性をもたらす。バキュロウイルス昆虫細胞系の、これらの利点を利用して、スケーラビリティーの容易さに従う、広範な選択をもたらすように、ｃｅＤＮＡ作製の、３つの異なるアプロ

ーチをデザインした。
【０２３６】
１．ＯｎｅＢＡＣ
導入遺伝子発現のためのＯｎｅＢａｃアプローチの使用について探索するために、Ｔｎ７転移を介して、最適化ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットを、ＢＩＶＶＢａｃ内のポリヘドリン遺伝子座内のｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７部位に、パルボウイルスＩＴＲと共に挿入し、同じ骨格内において、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰ組換えを介して、ＩＴＲ特異的複製（Ｒｅｐ）遺伝子発現カセットを、ＥＧＴ遺伝子座内の、ＬｏｘＰ部位に挿入した。次いで、図１Ａに描示される通り、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡを作製する、Ｓｆ９細胞内の感染のために、組換えＢＥＶを作出し、使用した。下記で記載される通り、Ｒｅｐ発現レベルを制御するために、異なるプロモーターを使用して、ｃｅＤＮＡ作製のためのＯｎｅＢａｃアプローチの概念を実証した。
【０２３７】
２．ＴｗｏＢＡＣ：
導入遺伝子発現のためのＴｗｏＢａｃアプローチの使用について探索するために、Ｔｎ７転移を介して、最適化ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットを、２つの異なるＢＩＶＶＢａｃバクミド内のポリヘドリン遺伝子座内のｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７部位に、パルボウイルスＩＴＲおよびＩＴＲ特異的複製（Ｒｅｐ）遺伝子発現カセットと共に挿入した。次いで、図１Ｂに描示される通り、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡを作製する、Ｓｆ９細胞内の共感染のために、組換えＢＥＶを作出し、使用した。以下の実験で記載される通り、再現可能なｃｅＤＮＡの生産性を得るように、感染多重度（ＭＯＩ）比が異なる２つのバキュロウイルス、およびＲｅｐ発現レベルの微調整を使用して、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチと関連する難題について探索した。
【０２３８】
３．安定細胞株：
導入遺伝子発現のための安定細胞株アプローチの使用について探索するために、パルボウイルスＩＴＲを伴う、最適化ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットにより、安定細胞株を作出した。Ｔｎ７転移を介して、ＩＴＲ特異的複製（Ｒｅｐ）遺伝子発現カセットを、ＢＩＶＶＢａｃバクミド内のポリヘドリン遺伝子座内のｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７部位に挿入した。次いで、図１Ｃに描示される通り、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡを作製する、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ安定細胞株内の感染のために、組換えＲｅｐ．ＢＥＶを作出し、使用した。以下の実験で記載される通り、安定細胞株を作出する工程を早めるプロキシとして、ＧＦＰを使用する、ＦＡＣＳ細胞分取を介して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ形質転換体を富化することにより、安定細胞株アプローチと関連する難題について探索した。
【実施例２】
【０２３９】
ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ発現構築物
自律性パルボウイルスである、１型ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ１）は、野生型２型アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ２）の複製を支援するヘルパーウイルスである。ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡ作製のための、ＡＡＶならびにＡＡＶ以外のパルボウイルスＩＴＲの使用については、バキュロウイルス系において裏付けられている（例えば、米国特許出願第６３／０６９，０７３号を参照されたい）。ＨＢｏＶ１　ＩＴＲは、他のパルボウイルスＩＴＲと比較して、固有のサイズおよび形態を有する。ＨＢｏＶ１　５’側（ＲＥＨ）ＩＴＲが、１４０ｂｐの長さ（配列番号１）であり、完全な塩基対合を伴う、「Ｕ」字形ヘアピンを形成するのに対し、３’側（ＬＥＨ）ＩＴＲは、２００ｂｐの長さ（配列番号２）であり、三叉分岐点を伴うループを形成し、これは、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲを、他のパルボウイルスＩＴＲの末端領域と顕著に異なる、非対称性とする（図２Ａ）。
【０２４０】
ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの作製における使用のために、ＨｂｏＶ１　ＩＴＲについて探索した。非対称ＩＴＲは、導入遺伝子を安定化させることにより、長期間にわた

る持続的発現を増強しうることを仮定した。この仮説について検証するために、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（登録商標）（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を介して、エンハンサーエレメント（Ａ１ＭＢ２）を伴う肝臓特異的改変マウストランスサイレチン（ｍＴＴＲ）プロモーター（ｍＴＴＲ４８２）、ハイブリッド合成イントロン（キメライントロン）、ウッドチャック転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、ウシ成長ホルモンポリアデニル化（ｂＧＨｐＡ）シグナル、および隣接するヒトＨＢｏＶ１　５’側ＩＴＲ／３’側ＩＴＲの調節下にある、ＸＴＥＮ　１４４ペプチド（ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ）を含む、Ｂドメイン欠失型（ＢＤＤ）コドン最適化ヒト第ＶＩＩＩ因子（ＢＤＤｃｏＦＶＩＩＩ）を含むＤＮＡ構築物を合成して、配列番号３として示された核酸配列セットを作出した（図２Ａ）。この合成ＤＮＡを、ｐＦａｓｔＢａｃ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）ベクターへとクローニングして、ｐＦａｓｔＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ導入ベクターを作出した（図２Ｂ）。次いで、下記で記載される通り、このベクターをＢＩＶＶＢａｃ^{ＤＨ１０Ｂ}大腸菌に形質転換して、組換えＢＥＶである、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＧＰＶ．Ｒｅｐ^{Ｔｎ７}を作製した。

【実施例３】

【０２４１】

ＨＢｏＶ１　ＮＳ１（非構造）発現構築物

ＨＢｏＶ１　ＮＳ１　Ｔｎ７導入ベクター

ＨＢｏＶ１は、単一のウイルスプレｍＲＮＡの、選択的スプライシングおよびポリアデニル化を介して作出されるｍＲＮＡ転写物により、５つの非構造タンパク質、すなわち、ＮＳ１、ＮＳ２、ＮＳ３、ＮＳ４、およびＮＰ１を発現することが公知である。ＮＳ１～ＮＳ４のタンパク質は、同じオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の、異なる領域内においてコードされる。ＮＳ１は、Ｎ末端、中央部、およびＣ末端のそれぞれにおける、起点結合性／エンドヌクレアーゼドメイン（ＯＢＤ）、ヘリカーゼドメイン、および推定トランス活性化ドメイン（ＴＡＤ）からなる。ＮＳ１は、ＨＢｏＶ１の複製起点に結合し、おそらく、ローリングヘアピンの複製時に、起点の一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）にニックを入れる。

【０２４２】

真核細胞内のＩＴＲ媒介ベクター作製における、ＮＳ１の役割について探索し、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲに挟まれたＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターゲノムを、Ｓｆ９細胞から「レスキューする」ために、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１発現構築物を作出し、ＢＩＶＶＢａｃへと挿入して、Ｓｆ９細胞内において、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１を発現する組換えＢＥＶを作製した。

【０２４３】

発現ベクターを作出するために、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１のコード配列を、ＨＢｏＶ１ゲノム（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＪＱ９２３４２２）から得、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（登録商標）を介して、配列番号４として示された核酸配列セットを作出する合成の前に、Ｓｆ細胞ゲノムについてコドン最適化した。次いで、合成ＨＢｏＶ１　ＮＳ１　ＤＮＡを、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーターの制御下にある、ｐＦａｓｔＢａｃ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）ベクター（図３Ａ）へとクローニングして、ｐＦａｓｔＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１導入ベクター（図３Ｂ）を作出した。合成ＨＢｏＶ１　ＮＳ１　ＤＮＡはまた、ｐＦａｓｔＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１導入ベクター（図４Ｂ）を作出するように、ＡｃＭＮＰＶ転写因子ｈｒ５エレメントに先立たれた、最初期１（ＩＥ１）プロモーターの制御下にある、ｐＦａｓｔＢａｃ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）ベクター（図４Ａ）へともクローニングした。合成ＨＢｏＶ１　ＮＳ１　ＤＮＡはまた、ｐＦａｓｔＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１導入ベクター（図５Ｃ）を作出するように、ＯｐＭＮＰＶ最初期２（ＩＥ２）プロモーター下にある、ｐＦａｓｔＢａｃ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）ベクター（図５Ａ）へともクローニングした。次いで、これらのベクターをＢＩＶＶＢａｃ^{ＤＨ１０Ｂ}大腸菌に形質転換して、組換えＢＥＶ：それぞれ、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５

．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}、またはＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}を作製した。

【０２４４】

次いで、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクターを作出する、Ｓｆ９細胞内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＢＥＶを伴う共感染（ＴｗｏＢＡＣ）のために、これらの組換えＢＥＶを使用した。

【０２４５】

ＨＢｏＶ１ ＮＳ１ Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクター

ｃｅＤＮＡの作製のためのＯｎｅＢａｃアプローチの使用について探索するために、ＨＢｏＶ１ ＮＳ１遺伝子を、ポリヘドリン遺伝子座内のＴｎ７部位において、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットをコードする、組換えＢＩＶＶＢａｃ内のＬｏｘＰ部位に挿入した。これらの部位において、これらの遺伝子の両方を挿入するための根拠は、これもまた、回文リピートである、ＬｏｘＰ配列と共に、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮを挟む、逆位末端反復配列（ＩＴＲ）の干渉を回避することであった。

【０２４６】

加えて、上記で記載された、ＯｎｅＢＡＣ系と関連する難題に取り組むために、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ／ＮＳ１の両方をコードするＯｎｅＢＡＣ内における、ＨＢｏＶ１ ＮＳ１の発現レベルを制御するように、感染サイクル中の異なる時点およびレベルにおいて発現される、バキュロウイルス遺伝子の異なるプロモーターについて調べた。

【０２４７】

合成Ｓｆコドン最適化ＨＢｏＶ１ ＮＳ１ ＤＮＡを、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター（図３Ａ）、またはＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントが前にある最初期１プロモーター（図４Ａ）、およびない最初期１プロモーター（図５Ｂ）の制御下にある、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクター（米国特許出願第６３／０６９，０７３号において記載されている）へとクローニングして、それぞれ、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターである、ｐＣＬ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１（図３Ｃ）、ｐＣＬ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１（図４Ｃ）、およびｐＣＬ．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１（図５Ｄ）を作出した。これらの構築物は、「プラスミドＣｒｅ－ＬｏｘＰ」のための接頭辞である、「ｐＣＬ」により名指される（図３Ｃ、４Ｃ、５Ｄを参照されたい）。次いで、結果として得られるＣｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターを、ＬｏｘＰ部位において、下記で記載される通り、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲを、Ｔｎ７部位においてコードする、ＢＩＶＶＢａｃバクミド（図６Ｂ）へと挿入した。

【実施例４】

【０２４８】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲバキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットを、ＨＢｏＶ１ ＩＴＲと共にコードする組換えＢＥＶ（図２Ａ）を作出するために、まず、ＢＩＶＶＢａｃ^{ＤＨ１０Ｂ}大腸菌（米国特許出願第６３／０６９，０７３号において記載されている）を、Ｔｎ７導入ベクターである、ｐＦａｓｔＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ（図２Ｂ）により高度形質転換した。形質転換体は、カナマイシン、ゲンタマイシン、Ｘ－Ｇａｌ、およびＩＰＴＧにより選択した。ＢＩＶＶＢａｃ内の、ｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７挿入部位における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットおよびゲンタマイシン耐性遺伝子の部位特異的転移は、ＬａｃＺα（ｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７と、インフレームで融合された）を破壊し、Ｘ－Ｇａｌ媒介二重抗生剤選択時において、白色大腸菌コロニーを結果としてもたらした。組換えバクミドＤＮＡは、アルカリ溶解ミニプレップ法により、白色大腸菌コロニーから単離し、制限酵素により消化して、正確な遺伝子構造を決定した。制限酵素マッピングの結果が、各組換えバクミドについて予測された断片を示したことは、ＢＩＶＶＢａｃのポリヘドリン遺伝子座内に、ＨＢｏＶ１ ＩＴＲを伴う、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセット部位特異的転移を示唆する（図６Ａ）。さらなる確認を、導入プラスミドに対して内側お

よび外側にあるプライマーを使用して、予測挿入部位にわたる領域をＰＣＲ増幅し、結果として得られる増幅配列をシーケンシングすることにより得た（データは示さない）。

【０２４９】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲと共にコードする、正確な組換えバクミドを、マキシプレップ精製し、製造元の指示書に従い、Ｃｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）トランスフェクション試薬を使用して、Ｓｆ９細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの４～５日後、既に記載されている通りに、後代バキュロウイルスを採取し、Ｓｆ９細胞内において、プラーク精製した。Ｊａｒｖｉｓら（２０１４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、５３６：１４９～１６３。組換えＢＥＶである、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７}（図６Ｂ）の、プラーク精製された、６つのＲＦＰ＋クローンを、Ｔ２５フラスコ内の、１０％の熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を補充された、ＥＳＦ－９２１培地中に、１ｍＬ当たり０．５×１０^{6}個で播種されたＳｆ９細胞内において、Ｐ１（第１継代）まで増幅した。感染の４～５日後、全てのクローンが、各ＢＥＶクローンについて、ＲＦＰ＋細胞の数により決定される感染の進行を示したことは、ウイルスは、正常な複製が可能であり、バキュロウイルスゲノム内の、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲを伴うＦＶＩＩＩＸＴＥＮ導入遺伝子の挿入が、後代ウイルスの作製に対して有害作用を及ぼさなかったことを示唆する。最高度のＲＦＰ＋クローンを、作業ＢＥＶ原液（Ｐ２）を作製する、Ｓｆ９細胞内のさらなる増幅のために選択し、次いで、ｃｅＤＮＡベクターの作製のための、ＴｗｏＢＡＣ系内の、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１　ＢＥＶによる共感染のために使用した。

【実施例５】

【０２５０】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ＋ＨＢｏＶ１　ＮＳ１バキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）

ＢＩＶＶＢａｃが、複数の導入遺伝子を収容するのに使用されるのかどうかについて調べるために、異なるプロモーターの制御下にある、２つの導入遺伝子発現カセット：１）ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ、および２）ＨＢｏＶ１　ＮＳ１をコードする、誘導体ベクターのファミリーを作出した。これらのＢＥＶは、２つの工程において作製した。まず、上記で記載された通り、Ｔｎ７転移を介して、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲを伴う、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットを、ＢＩＶＶＢａｃ内の、ポリヘドリン遺伝子座内の、ｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７部位に挿入した。次いで、Ｃｒｅリコンビナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用する、ｉｎ　ｖｉｔｒｏＣｒｅ－ＬｏｘＰ組換えを介して、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１発現カセットを、ＥＧＴ遺伝子座内のＬｏｘＰ部位に挿入するために、結果として得られるバクミドである、ＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ（図６Ｂ）を使用した。

【０２５１】

工程では、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター（図３Ｃ）、またはＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントが前にある最初期１（ＩＥ１）プロモーター（図４Ｃ）、およびない最初期１（ＩＥ１）プロモーター（図５Ｄ）の下にある、ＨＢｏＶ１　ＮＳ１をコードするＣｒｅ－ＬｏｘＰドナーベクターを、ＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲバクミド（図６Ｂ）へと挿入した。組換え反応物をＤＨ１０Ｂ大腸菌に形質転換し、形質転換体は、カナマイシン、ゲンタマイシン、およびアンピシリンにより選択した。制限酵素マッピングにより、かつ／または導入プラスミドに対して内側および外側にあるプライマーを使用して、予測挿入部位にわたる領域をＰＣＲ増幅し（図７Ａ、７Ｂ、および７Ｄ）、結果として得られる増幅配列をシーケンシングすることにより、三重抗生剤耐性コロニーをスクリーニングした。

【０２５２】

両方の導入遺伝子カセットをコードする、正確な組換えバクミドを、マキシプレップ精製し、Ｃｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）トランスフェクション試薬を使用して、Ｓｆ９細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの４～５

日後、後代バキュロウイルスを採取し、Ｓｆ９細胞内において、プラーク精製した。各組換えＢＥＶ（ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}：図７Ｄ；ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}：図７Ｅ；およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ}：図７Ｆ）の、プラーク精製された、６つのＲＦＰ＋クローンおよびＧＦＰ＋クローンを、Ｔ２５フラスコ内の、１０％の熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を補充された、ＥＳＦ９２１培地中に、１ｍＬ当たり０．５×１０^{6}個で播種されたＳｆ９細胞内において、Ｐ１（第１継代）まで増幅した。感染の４～５日後、全てのクローンが、各組換えＢＥＶについて、ＧＦＰ＋細胞およびＲＦＰ＋細胞の数により決定される感染の進行を示したことは、ウイルスは、正常の複製が可能であり、同じバキュロウイルスゲノム内の、複数の導入遺伝子の挿入が、後代ウイルスの作製に対して有害作用を及ぼさなかったことを示唆する。Ｐ１ウイルスを、低速遠心分離により採取し、感染細胞ペレットを、免疫ブロット法によるＨＢｏＶ１　ＮＳ１の検出のために処理した。最後に、各ＢＥＶのクローンを発現する最高度のＨＢｏＶ１　ＮＳ１をさらに増幅して、作業ＢＥＶ原液（Ｐ２）を作製するのに続き、Ｓｆ９細胞内において滴定した。滴定されたＢＥＶは、下記で記載される通り、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターを作製するのに、Ｓｆ９細胞内の感染のために使用した。

【実施例６】

【０２５３】

ＯｎｅＢＡＣからの、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ ｃｅＤＮＡベクターの作製

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲおよびＨＢｏＶ１　ＮＳ１遺伝子の両方をコードするＯｎｅＢＡＣ　ＢＥＶ（図７Ｄ～７Ｆ）を、Ｓｆ９細胞内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡ作製のために調べた。１ｍＬ当たりの細胞約２．５×１０^{6}個に、感染多重度（ＭＯＩ）を、細胞１個当たり０．１、０．５、１．０、２．０、または３．０プラーク形成単位（ｐｆｕ）とする、各ＢＥＶの滴定作業原液（Ｐ２）を感染させた（図８Ａ）。細胞を、無血清ＥＳＦ－９２１培地５０ｍＬへと懸濁させ、次いで、７２～９６時間にわたり、または２８℃のシェーキングインキュベーター内の細胞生存率が、６０～７０％に達するまでインキュベートした。感染の約９６時間後、感染細胞を採取し、ペレットを、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｍａｘｉ　Ｐｒｅｐ　ＤＮＡ単離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）による、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの単離のために処理した。最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動上で解析して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡベクターの生産性を決定した。

【０２５４】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲおよびポリヘドリン駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１と共にコードする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ（ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{ＬｏｘＰ} ＢＥＶ（図８Ｂ）についてのアガロースゲル解析を、図８Ｃに示す。結果は、全ての被験用量において、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（約８．５ｋｂ）ｃｅＤＮＡのサイズに対応するＤＮＡバンドを示し、ＭＯＩの増大に応じて、生産性も増大した。

【０２５５】

この結果は、生産性の低減が、ウイルス量の増大と共に、既に観察された、ＡＡＶ２ ＩＴＲ　ＯｎｅＢＡＣにより得られた、ｃｅＤＮＡの生産性と逆であった。理論に束縛されずに述べると、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１タンパク質は、ＤＮＡ複製のための、ＨＢｏＶ１ ＩＴＲの末端分離部位において、固有の結合機構およびエンドヌクレアーゼ活性を有しうるが、これは、ＲＥＨ　ＩＴＲおよびＬＥＨ　ＩＴＲの顕著に異なる構造（図２Ａ）に起因しうる。

【０２５６】

結論として述べると、これらの実験は、Ｏｎｅ　ＢＡＣアプローチが、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲおよびＮＳ１導入遺伝子と共にコードする、単一の組換えＢ

ＥＶからのｃｅＤＮＡ作製の概念を実証することを示した。それはまた、バキュロウイルスシャトルベクター（ＢＩＶＶＢａｃ）内の、異なる遺伝子座に挿入された、複数の導入遺伝子の実現可能性および機能性、ならびにバキュロウイルス昆虫細胞系における、組換えＡＡＶベクターの作製のための、その潜在的使用も示す。

【実施例７】

【０２５７】

ＨＢｏＶ１　ＮＳ１（非構造的）バキュロウイルス発現ベクター（ＢＥＶ）

構造的に特徴づけられた、唯一のパルボウイルスＮＳ１　Ｎ末端ヌクレアーゼドメインは、ＡＡＶ２　Ｒｅｐに由来し、ＡＡＶ２　Ｒｅｐは、複製起点（Ｏｒｉ）において、連続テトラオリゴヌクレオチドリピートに結合する。しかし、このようなテトラオリゴヌクレオチドリピートは、ＡＡＶに特異的であり、ＨＢｏＶ１には存在しない。実際、ＨＢｏＶ１ゲノムのＬＥＨ（３’側ＩＴＲ）が、三叉分岐点を伴うループを形成するのに対し、ＲＥＨ（５’側ＩＴＲ）は、完全な塩基対合を伴うヘアピンであり（図２Ａ）、ＬＥＨおよびＲＥＨは、ボカウイルスにおいて保存的であり、ＡＡＶゲノムおよびパルボウイルスＢ１９（Ｂ１９Ｖ）ゲノムの末端領域と、顕著に異なる。これらの所見は、ＨＢｏＶ１における、ＮＳ１による、Ｏｒｉの認識方式が、ＡＡＶにおける認識方式と顕著に異なることを示唆する。さらに、ＡＡＶは、ヒト疾患を引き起こすことが公知ではなく、ウイルスの複製は、ヘルペスウイルスまたはアデノウイルスなどのヘルパーウイルスを要求するため、ディペンドウイルスである。ＨＢｏＶ１　ＮＳ１は、ＡＡＶ　Ｒｅｐと、わずかに１４％の配列同一性を共有する。ＨＢｏＶ１－ＮＳ１は、Ｏｒｉに対する推定結合性部位である、正に帯電した表面を含有し、パルボウイルスについて提起されている、共通のローリング－ヘアピン機構と同様に、ＨＢｏＶ　ＤＮＡの複製を直接支援することが裏付けられている。

【０２５８】

ＨＢｏＶ１－ＮＳ１は、真核細胞内におけるＩＴＲ媒介ベクター作製に不可欠であると考えられる。ＩＴＲに挟まれたＦＶＩＩＩＸＴＥＮベクターゲノムの、Ｓｆ９細胞からの潜在的「レスキュー」、またはＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＢＥＶについて探索するために、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１をコードする組換えＢＥＶを、異なるバキュロウイルスプロモーター下で作出して、Ｓｆ９細胞内の、ＮＳ１の発現レベルを最適化した。

【０２５９】

これらのＢＥＶを作出するために、ＢＩＶＶＢａｃ^{ＤＨ１０Ｂ}大腸菌（米国特許出願第６３／０６９，０７３号を参照されたい）を、Ｔｎ７導入ベクターである、ｐＦａｓｔＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１（図３Ｂ）、ｐＦａｓｔＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１（図４Ｂ）、またはｐＦａｓｔＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１（図５Ｃ）により高度形質転換した。形質転換体は、カナマイシン、ゲンタマイシン、Ｘ－Ｇａｌ、およびＩＰＴＧにより選択した。ＢＩＶＶＢａｃ内のｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７挿入部位における、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１発現カセットおよびゲンタマイシン耐性遺伝子の部位特異的転移は、ＬａｃＺα（ｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７と、インフレームで融合された）を破壊し、Ｘ－Ｇａｌ媒介二重抗生剤選択時において、白色大腸菌コロニーを結果としてもたらした。したがって、組換えバクミドＤＮＡは、アルカリ溶解ミニプレップ法により、白色大腸菌コロニーから単離し、制限酵素により消化して、正確な遺伝子構造を決定した。制限酵素マッピングの結果が、各組換えバクミドについて予測された断片を示したことは、ＢＩＶＶＢａｃのポリヘドリン遺伝子座内における、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１の部位特異的転移を示唆する（図９Ａ）。さらなる確認を、導入プラスミドに対して内側および外側にあるプライマーを使用して、予測挿入部位にわたる領域をＰＣＲ増幅し、結果として得られる増幅配列をシーケンシングすることにより得た（データは示さない）。

【０２６０】

製造元の指示書に従い、Ｃｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）トランスフェクション試薬を使用して、Ｓｆ９細胞に、Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１、ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１、またはＯｐＩＥ２－ＨＢｏＶ１－ＮＳ１をコード

することが確認された、正確な組換えバクミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの４～５日後、既に記載されている通りに、後代バキュロウイルスを採取し、Ｓｆ９細胞内において、プラーク精製した。Ｊａｒｖｉｓら（２０１４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．、５３６：１４９～１６３。各組換えＢＥＶである、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１^{Ｔｎ７}（図９Ｂ）、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＨＲ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}（図９Ｃ）、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}（図９Ｄ）の、６つのプラーク精製ＲＦＰ＋クローンを、Ｔ２５フラスコ内の、１０％の熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を補充された、ＥＳＦ－９２１培地中に、１ｍＬ当たり０．５×１０^{6}個で播種されたＳｆ９細胞内において、Ｐ１（第１継代）まで増幅した。感染の４～５日後、全てのクローンが、各ＢＥＶクローンについて、ＲＦＰ＋細胞の数により決定される感染の進行を示したことは、ウイルスは、正常の複製が可能であり、バキュロウイルスゲノム内の、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１の挿入が、後代ウイルスの作製に対して有害作用を及ぼさなかったことを示唆する。

【０２６１】

最高度のＲＦＰ＋クローンを、作業ＢＥＶ原液（Ｐ２）を作製する、Ｓｆ９細胞内のさらなる増幅のために選択した。次いで、滴定ウイルス原液を、ｃｅＤＮＡベクターの作製のための、ＴｗｏＢＡＣ系またはＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲのための安定細胞株における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＢＥＶによる共感染のために使用した。

【実施例８】

【０２６２】

ＴｗｏＢＡＣからの、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ ｃｅＤＮＡベクターの作製

導入遺伝子発現のためのＴｗｏ ＢＡＣアプローチについて探索するために、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲを、ポリヘドリン駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１ ＢＥＶと共にコードする、クローン組換えＢＥＶを、Ｓｆ９細胞内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクター作製のための、比を１：１０および１：５とする場合のＭＯＩを相違させるか、またはＭＯＩを、細胞１個当たり０．３、１．０、３．０、および５．０ｐｆｕとする場合の比を相違させる共感染について調べた（図１０Ａ）。具体的には、１ｍＬ当たりの細胞約２．０×１０^{6}個を、無血清ＥＳＦ－９２１培地５０ｍＬ中に播種し、ＭＯＩを、細胞１個当たり０．１、０．３、０．５、１．０、３．０、５．０ｐｆｕとする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７} ＢＥＶの滴定作業原液（Ｐ２）を、それぞれ、比を１：１０で一定に保つ場合のＭＯＩを、細胞１個当たり０．０１、０．０３、０．０５、０．１、０．３、０．５ｐｆｕとするか、または比を１：５で一定に保つ場合のＭＯＩを、細胞１個当たり０．０２、０．０６、０．１、０．２、０．６、１．０ｐｆｕとする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１^{Ｔｎ７} ＢＥＶと共に共感染させた。同様に、細胞はまた、ＭＯＩを、細胞１個当たり０．３、１．０、３．０、または５．０ｐｆｕで一定とする場合の比を、１：１、１：２、１：５、または１：１０としても共感染させた（図１０Ｂ）。各場合に、ウイルス接種物は除去せず、細胞を、２８℃のシェーキングインキュベーター内の細胞生存率が、６０～７０％に達するまでインキュベートした。感染の約９６時間後、感染細胞を採取し、ペレットを、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｍａｘｉ Ｐｒｅｐ ＤＮＡ単離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）による、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡベクターの単離のために処理した。最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動上で解析して、ｃｅＤＮＡの生産性を決定した。

【０２６３】

予測される通り、アガロースゲル解析は、条件が異なると、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡの生産性の程度が変動することを示した。しかし、ＭＯＩを、細胞１個当たり３．０ｐｆｕとして共感染させたＴｗｏＢＡＣは、ウイルス量比の増大と共に、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡの生産性のレベルの上昇を示し、１：１０が、他の被験条件と比較して、最高のウイルス量比であった（図１０Ｃ）。高ウイルス量は、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ ｃｅＤＮＡの生産性を改善すると考えられるが、これは、ＯｎｅＢ

ＡＣ　ＢＥＶ（実施例６を参照されたい）における観察と符合する。これは、Ｓｆ９細胞内における、ＨＢｏＶ１－ＩＴＲ依存的ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡ複製のための、高レベルのＨＢｏＶ１－ＮＳ１の要件をさらに示唆する。

【０２６４】

ＯｎｅＢＡＣまたはＴｗｏＢＡＣによる結果は、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１の複製レベルが、バキュロウイルス系におけるＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの生産性に対して著明な影響を及ぼすことを指し示す。

【０２６５】

バキュロウイルスゲノムの、異なるプロモーターを利用することにより、上記で論じられた、いくつかの異なる共感染条件について調べる代替法として、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの生産性を改善する、他の方式について探索した。バキュロウイルス遺伝子プロモーターは、感染サイクルにおける、それらの転写開始に従い、最初期プロモーター、初期プロモーター、後期プロモーター、および極後期プロモーターへと分けられる。これらの中で、名称が指し示す通り、最初期（ｉｅ）遺伝子プロモーターは、ウイルス感染の後、即時的にオンになり、感染サイクルを通して、活性を維持する。しかし、ポリヘドリンなどの後期遺伝子プロモーターまたは極後期遺伝子プロモーターは、ウイルスが、感染の後期段階に達するまで、サイレントを維持される。

【０２６６】

バキュロウイルスゲノムからのプロモーターの、この広範な選択範囲を利用するために、最初期１（ＩＥ１）プロモーターを、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１について調べた。ＩＥ１プロモーターに先立ち、Ｓｆ９細胞内の発現レベルを上昇させることが示されている、転写エンハンサーｈｒ５エレメントを組み入れた。これは、図９Ｃに描示される通り、ＡｃＭＮＰＶ転写エンハンサーｈｒ５エレメントに先立たれる、ＡｃＭＮＰＶ最初期１（ＩＥ１）プロモーターの制御下にある、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１をコードする組換えＢＥＶを作出した。

【０２６７】

図１０Ｃで得られた結果に基づき、比を１：１０で一定に保つことにより、ＭＯＩを相違させて、Ｓｆ９細胞に、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ、およびｈｒ５．ＩＥ１駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１をコードするＢＥＶを共感染させた。陽性対照として、ポリヘドリン駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１　ＢＥＶを組み入れ、これもまた、同じ実験セット内において調べた。より具体的には、１ｍＬ当たりのＳｆ９細胞約２．０×１０^{6}個に、ＭＯＩを、細胞１個当たり０．１、０．３、０．５、１．０、３．０、５．０ｐｆｕとする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Tn7}　ＢＥＶ（図１０Ｂ）の滴定作業原液（Ｐ２）を、比を１：１０で一定に保つ場合のＭＯＩを、細胞１個当たり０．０１、０．０３、０．０５、０．１、０．３、０．５ｐｆｕとする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１^{Tn7}　ＢＥＶ、またはＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｈｒ５．ＩＥ１．ＨＢｏＶ１－ＮＳ１^{Tn7}　ＢＥＶ（図１１Ｂ）と共に共感染させた。上記で記載された通りに、残りの手順を踏んだ（実施例６を参照されたい）。

【０２６８】

最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動上で解析して、ｃｅＤＮＡの生産性を決定した。ポリヘドリン駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１の共感染が、ＭＯＩの増大に伴う、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの生産性のレベルの上昇を示したことは、ｃｅＤＮＡ作製のための、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチの再現性をさらに確認する。しかし、驚くべきことに、図１０Ｃで観察される通り、ｈｒ５．ＩＥ１駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１の共感染は、検出可能なレベルのＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡをほとんど示さず、ＭＯＩの増大に伴う、生産性の明らかな上昇は見られなかった。

【０２６９】

このデータは、ＨＢｏＶ１－ＮＳ１の初期発現が、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲを伴うＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡをレスキューするのに、それほど重要ではない可能性があること

を示唆する。そうではなく、感染の後期における高発現レベルが、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲを伴うＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの効率的レスキューおよび生産性に要求される。これらの結果は、Ｓｆ９細胞内における、ＨＢｏＶ１－ＩＴＲ依存的ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡ複製のための、高レベルのＨＢｏＶ１－ＮＳ１の要件をさらに確認する。

【０２７０】

結論として述べると、これらの実験は、Ｔｗｏ　ＢＡＣアプローチが、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲおよび／またはＮＳ１導入遺伝子を伴うＦＶＩＩＩＸＴＥＮをコードする、２つ組換えＢＥＶからのｃｅＤＮＡ作製の概念を実証することを示した。これらの実験はまた、Ｓｆ９細胞内において、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの高度の生産性を達成するための、最適のＭＯＩ比および／またはプロモーター重要性も裏付ける。

【実施例９】

【０２７１】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲのための安定細胞株

昆虫細胞ゲノムは、バキュロウイルス感染の後に、治療適用のためのｃｅＤＮＡを作製するように、潜在的に改変されることを仮定した。この仮説について検証するために、転写エンハンサーｈｒ５エレメントに先立たれ、ＡｃＭＮＰＶ　ｐ１０ポリアデニル化シグナルを後続させる、ＡｃＭＮＰＶ最初期（ｉｅ１）プロモーターの制御下にある、ネオマイシン耐性マーカーをコードするプラスミド（ｐＵＣ５７．ＨＲ５．ＩＥ１．ＮｅｏＲ．Ｐ１０ＰＡＳ：配列番号７）（図１２Ａ）、または増強型緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）をコードするプラスミド（ｐＵＣ５７．ＨＲ５．ＩＥ１．ｅＧＦＰ．Ｐ１０ＰＡＳ：配列番号８）（図１２Ｂ）を、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（登録商標）（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）から合成した。

【０２７２】

改変リン酸カルシウムトランスフェクション法を使用して、Ｓｆ９細胞に、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲと共にコードするプラスミド（Ｓｆ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ）（図１２Ｃ）と共に、これらのプラスミドを、共トランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後、細胞を、蛍光顕微鏡下で視覚化して、トランスフェクション効率を決定したところ、結果が、＞８０％のＧＦＰ＋細胞を示したことは、高度のトランスフェクション効率を示唆する。トランスフェクションの７２時間後、細胞は、完全ＴＮＭＦＨ培地（１０％のＦＢＳ＋０．１％のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８を補充された、Ｇｒａｃｅ’ｓ　Ｉｎｓｅｃｔ　Ｍｅｄｉｕｍ）中に、１．０ｍｇ／ｍＬの最終濃度で懸濁させた、Ｇ４１８抗生剤（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）により選択した。選択の約１週間後、約５０％の形質転換細胞が回収されたことは、ネオマイシン耐性マーカーが、この細胞集団へと、安定的に組み込まれたことを示唆する。生存細胞を、選択培地から採取し、新鮮な完全ＴＮＭＦＨ培地をフィードし、コンフルエンス増殖まで増殖させた。コンフルエント細胞は、それらが分裂し続けるのに応じて、付着培養物として、大型培養槽へと、漸進的に拡大した。その後、ポリクローナル細胞集団を、完全ＴＮＭＦＨ培地中の１継代にわたる、振盪フラスコ内の増殖、およびＥＳＦ－９２１培地を補充された１０％のＦＢＳ中の１継代にわたる、振盪フラスコ内の増殖により、懸濁培養へと適合させた。最後に、細胞を、懸濁培養物として、振盪フラスコ内の無血清ＥＳＦ－９２１へと適合させた。これらの振盪フラスコ培養物は、４日ごとの継代を伴い、無血清ＥＳＦ－９２１培地中において、規定通りに維持し、細胞増殖をモニタリングした。

【実施例１０】

【０２７３】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの精製

バキュロウイルス昆虫細胞系では、組換えＢＥＶは、強力なプロモーター下にある、目的の遺伝子を送達し、昆虫細胞内におけるウイルスの複製に不可欠である、転写複合体をもたらす。典型的に、バキュロウイルスＤＮＡゲノムは、核内において複製され、各々が、全長ＤＮＡゲノムを含有する、数千万個の後代ウイルス粒子を産生する。バキュロウイルスゲノムＤＮＡは、シリカゲルカラムなど、プラスミドＤＮＡベースの精製法を使用し

て、ＤＮＡを、昆虫細胞から単離する間に、ｃｅＤＮＡと共に共精製されることが裏付けられている。市販のプラスミドＤＮＡキットのカラムは、一般に、ＤＮＡを、それらの分子量に基づき分離するようにデザインされていないので、典型的に、サンプル中に存在する、全ての形態のＤＮＡは、これらのカラムに結合する。さらに、高分子量ＤＮＡの結合能は、低分子量ＤＮＡと異なる場合があり、アニオン交換ベースのキットカラムは、異なるサイズのＤＮＡの結合効率に基づき最適化されていない。

【０２７４】

ｃｅＤＮＡプレップ中において観察された高分子量ＤＮＡ（＞２０ｋｂ）は、低分子量ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡ（約８．５ｋｂ）と共に共精製された、バキュロウイルスゲノムＤＮＡおよび／またはＳｆ９細胞ゲノムＤＮＡであった可能性が高い（例えば、図８Ｃ、１０Ｃ、および１１Ｃを参照されたい）ことを仮定した。

【０２７５】

既に、感染性後代ウイルスの作製に要求される、ＶＰ８０などのバキュロウイルスカプシド遺伝子をノックアウトすることにより、バキュロウイルスＤＮＡを低減する、間接的アプローチを援用した。このアプローチは、ノックアウトＢＥＶから得られたｃｅＤＮＡプレップ中の、バキュロウイルスＤＮＡの著明な低減を示した（米国特許出願第６３／０６９，１１５号を参照されたい）。このアプローチは、バキュロウイルスＤＮＡの夾雑の低減において効率的であったが、感染細胞ペレットから得られた全ＤＮＡのうちの、著明な数量（約６０％）で存在する、細胞ゲノムＤＮＡを低減することは不可能であった。

【０２７６】

したがって、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡを、望ましくないＤＮＡから分離する直接的アプローチを援用し、感染細胞ペレットに由来する全ＤＮＡプレップから、精製ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ（＞９５％の純度）を効率的に得ることを裏付けた。この新規のアプローチは、異なるタンパク質分子を、それらのサイズおよび電荷に従い分離するために広範に使用されている、製剤用電気泳動を利用する。例えば、Ｍｉｃｈｏｖ，Ｂ．（２０２０）、「Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ」、Ｂｅｒｌｉｎ、Ｂｏｓｔｏｎ：Ｄｅ　Ｇｒｕｙｔｅｒ、４０５～４２４頁を参照されたい。例えば、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｍｏｄｅｌ　４９１　ｐｒｅｐ　ｃｅｌｌまたは他のこのようなユニットは、それらのサイズに基づき、複合体分子を分離するのに使用される。

【０２７７】

ｃｅＤＮＡ精製の全ワークフローを、図１３に示すが、このワークフローにおいて、工程は、無血清昆虫細胞培養培地中のＳｆ９細胞培養物の、０．５Ｌから、１．５Ｌ、または大容量へのスケールアップにより始まる（図１３Ａ）。典型的に、１ｍＬ当たり約１．３×10^6個の播種密度で、２日間にわたるインキュベーションの後、所望される、１ｍＬ当たり約２．５×10^6個の細胞密度に達したら、細胞に、ＯｎｅＢＡＣ　ＢＥＶまたはＴｗｏＢＡＣ　ＢＥＶ（ｃｅＤＮＡ作製のために使用されるアプローチに依存する）を、最適化ＭＯＩで感染させ、細胞を、２８℃のシェーキングインキュベーター内において、生存率が、約６０～７０％に達するまでインキュベートするが、これは、典型的に、約４日間を要する（図１３Ｂ）。生存率が、約７０％に達したら、細胞を採取し、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｅｘｐｉ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｇｉｇａｐｒｅｐ精製キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）など、アニオン交換クロマトグラフィーキットカラムによる、全ＤＮＡ精製のために処理する。精製されたＤＮＡ素材のアリコートは、０．８～１．２％のアガロースゲルによる電気泳動において照合して、ＤＮＡの生産性および完全性を決定する（図１３Ｃ）。

【０２７８】

次いで、精製された素材を、製造元の指示書に従いアセンブルされ、０．５％の製剤用アガロースゲル、および０．２５％のスタッキングアガロースゲルを含有する、製剤用アガロースゲル電気泳動ユニットへとロードする。サンプルは、４℃、低電圧（約４０ボルトで一定とする）で、緩衝液再循環流量を、約５０ｍＬ／分とし、溶出緩衝液流量を、５０μＬ／分として、６～７日間にわたり泳動させて、７０～８０分後に、画分回収チャン

バー内において、各画分を回収する。連続溶出電気泳動の後において、各画分２０μＬを、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動において照合して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡの純度を決定する（図１３Ｄ）。所望の画分を組み合わせて、－２０℃において、１～２時間にわたり、３ＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ５．５および１００％のＥｔＯＨにより沈殿させる。最後に、沈殿したＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡを、高速でペレット化させ、ＴＥ緩衝液、ｐＨ８．０への再懸濁の前に、７０％のＥｔＯＨにより、１回洗浄した。精製されたＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ｃｅＤＮＡは、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動において、再度照合して、ｉｎ ｖｉｖｏ効能研究のために、動物へと注射する前に、純度および完全性を確認する（図１３Ｅ）。

【実施例１１】

【０２７９】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲの、ｉｎ ｖｉｖｏにおける効能

ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ（一本鎖ＤＮＡ）

ＩＴＲ領域内において形成されたヘアピンは、長期間にわたる、持続的な、高レベルの導入遺伝子発現を可能とすることを仮定した。ＨＢｏＶ１ ＩＴＲの機能性について、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて探索するために、コドン最適化ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、あらかじめ形成されたＨＢｏＶ１ ＩＴＲと共に含む、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウスにおいて調べた。これらのマウスは、軽度のＡ型血友病を伴う患者において、高頻度で観察される突然変異を保有する、改変ヒト凝固第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）ｃＤＮＡの発現を駆動する、マウスアルブミン（Ａｌｂ）プロモーターを伴うようにデザインされた、ヒトＦＶＩＩＩ－Ｒ５９３Ｃ導入遺伝子を含有する。これらのマウスはまた、ＦＶＩＩＩ遺伝子のノックアウトも保有し、内因性ＦＶＩＩＩタンパク質について欠損性である。これらの二重突然変異体マウスは、ヒトＦＶＩＩＩの注射に対して忍容性であり、ＦＶＩＩＩ活性を有さない。これらの二重突然変異体マウスは、ヒトＦＶＩＩＩによる処置の後に、阻害性抗体をごく微量しか産生せず、ＦＶＩＩＩ応答性であるＴ細胞またはＢ細胞を欠く。ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウスについては、Ｂｒｉｌら（２００６）、Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．、９５（２）：３４１～７においてさらに記載されている。

【０２８０】

あらかじめ形成されたＨＢｏＶ１ ＩＴＲを伴う、一本鎖ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ（ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮ）は、９５℃におけるＰｖｕＩＩ消化の二本鎖ＤＮＡ断片産物（ＦＶＩＩＩ発現カセットおよびプラスミド骨格）を変性させ、次いで、４℃で冷却して、回文ＩＴＲ配列が、フォールディングすることを可能とすることにより作出した。次いで、ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、流体尾静脈注射を介して、それぞれ、４００μｇまたは１６００μｇ／ｋｇと同等である、マウス１匹当たり１０μｇまたは４０μｇで全身注射した。血漿サンプルは、注射されたマウスから、７日間隔で、５．５ヶ月間にわたり回収した。血漿ＦＶＩＩＩ活性は、製造元の指示書に従う、Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ Ｃｏａｔｅｓｔ（登録商標）ＳＰ Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩＩ発色アッセイにより測定した。

【０２８１】

ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射された動物について、正常のパーセントに照らして正規化された、血漿ＦＶＩＩＩ活性を、図１４Ａに示す。結果は、ＨｅｍＡマウスにおいて、５．５ヶ月間の経過にわたり、用量依存的応答を示し、ＦＶＩＩＩ発現は、被験用量のいずれにおいても、生理学的レベルを超えるレベル（正常レベルの＞１０００％）であった。しかし、５６日目まで、ＦＶＩＩＩ発現の初期降下が観察され、次いで、１６８日目まで、レベルが安定化したことは、注射された動物の肝臓からの、ＨＢｏＶ１ ＩＴＲにより挟まれたｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮの持続的発現を示唆する。したがって、これらの結果は、長期間にわたる、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮの持続的発現について、ＨＢｏＶ１ ＩＴＲの機能性を、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて検証する。

【０２８２】

ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ＩＴＲ（クローズドエンドＤＮＡ）

ｃｅＤＮＡ内における、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能性について検証するために、上記で記載された通りに、感染Ｓｆ９細胞ペレットから精製されたｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、流体尾静脈注射を介して、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ＋／＋／ＨｅｍＡマウスにおいて、それぞれ、１２μｇ、４０μｇ、および８０μｇ／ｋｇと同等である、マウス１匹当たり０．３μｇ、１．０μｇ、または２．０μｇで全身注射した。注射されたマウスからの血漿サンプルは、７日間隔で回収し、ＦＶＩＩＩ活性は、上記で記載された、発色アッセイにより測定した。

【０２８３】

ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射された動物について、正常のパーセントに照らして正規化された血漿ＦＶＩＩＩ活性を、図１４Ｂに示す。本研究の結果は、ＨｅｍＡマウスにおいて、用量依存的応答を示し、注射後５６日目まで、被験最高用量において、生理学的レベルを超えるレベル（正常レベルの＞５００％）のＦＶＩＩＩ発現が観察された。興味深いことに、同様の発現レベルは、マウスに、ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮ（８０μｇ／ｋｇ）の、少なくとも２０倍用量である、１６００μｇ／ｋｇで、ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射した場合にも達成された（図１４Ａ～１４Ｂ）。このデータは、ｃｅＤＮＡが、ｓｓＤＮＡ形態と比較して、高レベルのＦＶＩＩＩ発現をもたらすことを示唆する。

【０２８４】

結論として述べると、これらのｉｎ　ｖｉｖｏ研究は、ｓｓＤＮＡ形態またはｃｅＤＮＡ形態における、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能性を検証し、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲが、バキュロウイルス昆虫細胞系において、目的の導入遺伝子をコードする、機能的ｃｅＤＮＡを作製するのに使用されることを裏付ける。

【実施例１２】

【０２８５】

ＨＢｏＶ１　ＮＳ１　ＢＥＶ内における、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓによる、ＶＰ８０のノックアウトを使用する、ｃｅＤＮＡベクター純度の改善

ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター下において発現されたＨＢｏＶ１　ＮＳ１は、実際に、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲに挟まれたＦＶＩＩＩＸＴＥＮをレスキューすることが可能であり、バキュロウイルス系における、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲによるｃｅＤＮＡ作製の概念を実証する。しかし、おそらく、高度のｃｅＤＮＡ生産性を達成するのに要求される、ＡＡＶ２　Ｒｅｐ－ＢＥＶと比較した、高ウイルス量のために、ｃｅＤＮＡプレップ中では、著明なレベルのバキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）の夾雑が観察された。これらのｃｅＤＮＡプレップ中で観察された、高分子量ＤＮＡ（＞２０ｋｂ）（図８Ｃ、図１０Ｃ）は、低分子量ｃｅＤＮＡ（約８ｋｂ）と共に共精製された、バキュロウイルスゲノムＤＮＡであった可能性が高い。

【０２８６】

ｃｅＤＮＡプレップ中の、バキュロウイルスＤＮＡの夾雑を低減するために、昆虫細胞（Ｓｆ９）内において、感染性ウイルス粒子を産生するために要求される、バキュロウイルスゲノムのうちの不可欠の遺伝子である、ＶＰ８０をノックアウトする間接的アプローチを実施した。Ａｌｔ－Ｒ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系（米国特許出願第６３／０６９，１１５号を参照されたい）を使用して、３つのＮＳ１　ＢＥＶ全て（図９Ｂ、９Ｃ、および９Ｄ）において、ＶＰ８０をノックアウトした。このアプローチは、後代ウイルス粒子の数を、潜在的に低減し、最終的に、ｃｅＤＮＡ製剤中の、バキュロウイルスＤＮＡの夾雑を低減する。

【０２８７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９は、ＡｃＭＮＰＶ　ＶＰ８０遺伝子をノックアウトする：

既に記載されている通り（例えば、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０４７２０２号を参照されたい）に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系により、ｖｐ８０遺伝子をノックアウトするように、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーター（図９Ｂ）、またはＯｐＭＮＰＶ　ＯｐＩＥ２プロモーター（図９Ｃ）下にあるＨＢｏＶ１　ＮＳ１をコードする、組換えＢＥＶを選択した。

【０２８８】
略述すると、コード配列をターゲティングする、２つのｃｒＲＮＡをデザインし、製造元の指示書に従い、Ａｌｔ－Ｒ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（商標））を使用して、機能的ｓｇＲＮＡを作出するために使用した。次いで、Ｃｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（商標））トランスフェクション試薬を使用して、Ｓｆ９細胞に、各ｓｇＲＮＡを、ＳｐＣａｓ９ヌクレアーゼ、およびバクミドＤＮＡである、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}、またはＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}と共に共トランスフェクトし、Ｔ２５フラスコ内の、無血清ＥＳＦ－９２１培地中に、１ｍＬ当たり０．５×１０^{6}個で播種した。トランスフェクションの４～５日後、細胞を、蛍光顕微鏡下において視覚化したところ、結果は、いずれのｓｇＲＮＡ標的についても、約１０％のＲＦＰ＋細胞を示した。感染細胞についての、例示的蛍光顕微鏡画像を、図１５に示す。Ｃａｓ９単独において、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶを感染させた細胞は、予測された通り、感染の進行を示した（図１５Ａ）が、これに対し、ｓｇＲＮＡ．ＶＰ８０．Ｔ１（図１５Ｂ）、またはｓｇＲＮＡ．ＶＰ８０．Ｔ２（図１５Ｃ）により処置された細胞は、個別の細胞に対する感染の制限を示したが、これは、ＶＰ８０のノックアウトに起因する可能性が高い。

【０２８９】
各ｓｇＲＮＡにより誘導されたインデルを決定するために、後代バキュロウイルスを採取し、既に記載されている通りに、補完的Ｓｆ．３９Ｋ．ＶＰ８０細胞株内において、プラーク精製した。Ｊａｒｖｉｓら（２０１４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、５３６：１４９～１６３。感染の５～６日後、１２のプラーク精製ＲＦＰ＋クローンを、Ｔ２５フラスコ内の、ＥＳＦ－９２１培地を補充された、１０％のＦＢＳ中に、１ｍＬ当たり０．５×１０^{6}個で播種された、Ｓｆ．３９Ｋ．ＶＰ８０細胞内において、Ｐ１まで増幅した。増幅されたクローンについての、蛍光顕微鏡観察が、約８０％のＲＦＰ＋細胞を示したことは、Ｓｆ．３９Ｋ．ＶＰ８０細胞株が、後代ウイルスの産生のために、トランスにおいて、ＶＰ８０機能を補完することが可能であることを示唆する。各ＢＥＶクローンを、低速遠心分離により採取し、次いで、細胞ペレットを、製造元の指示書に従う、Ｑｉａｇｅｎ’ｓ　ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（型番：６９５０６）による、全ＤＮＡの単離のために使用した。結果として得られるＤＮＡを、ＡｃＭＮＰＶ　ｖｐ８０コード配列に特異的なプライマーによる、各標的配列のＰＣＲ増幅のための鋳型として使用した。次いで、ＰＣＲ増幅配列を、ゲル精製し、Ｇｅｎｅｗｉｚシーケンシング施設を介して、直接シーケンシングした。結果として得られる配列を、各ｓｇＲＮＡにより誘導されるインデルを決定するのに、デフォルト設定を使用する、ＴＩＤＥ（ｔｒａｃｋｉｎｇ　ｏｆ　ｉｎｄｅｌｓ　ｂｙ　ｄｅｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ）プログラム（ｔｉｄｅ．ｄｅｓｋｇｅｎ．ｃｏｍ）により解析した。ＴＩＤＥ解析は、ｓｇＲＮＡ．Ｔ１により処置されたＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶクローン４内のフレームシフト突然変異が、ｖｐ８０コード配列内において、最高度（９７．１％）（１５ｂｐ）の欠失（図１６Ａ）を伴い、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７}　ＢＥＶクローン４内のフレームシフト突然変異が、ｖｐ８０コード配列内において、最高度（３７．４％）（４ｂｐ）／（２６．９％）（３ｂｐ）の欠失（図１６Ｂ）を伴い、検出可能な挿入は見られないことを示した。各クローンを、Ｐ２まで増幅して、ＢＥＶ作業原液を作出するのに続き、既に記載されている通りに、Ｓｆ．３９Ｋ．ＶＰ８０細胞内において滴定した。Ｊａｒｖｉｓら（２０１４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、５３６：１４９～１６３。次いで、ｖｐ８０ＫＯ　ＢＥＶの滴定作業原液を、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡベクターの作製のための、ＴｗｏＢＡＣ系における共感染のために使用した。

【０２９０】
ｖｐ８０ＫＯ　ＢＥＶを使用する、ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ｃｅＤＮＡの作製：

細胞約２．０×１０^{6}個を、無血清ＥＳＦ－９２１培地１００ｍＬ中に播種し、ＭＯＩを、細胞１個当たり１．０、２．０、３．０、４．０、および５．０ｐｆｕとする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１ΔＶＰ８０^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、またはＡｃＭＮＰＶ．ＯｐＩＥ２．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１ΔＶＰ８０^{Ｔｎ７} ＢＥＶの、滴定作業ＰＰ１Ｐ２原液を共感染させた。各場合に、ウイルス接種物は除去せず、細胞を、２８℃のシェーキングインキュベーター内の細胞生存率が、６０～７０％に達するまでインキュベートした。感染の約９６時間後、感染細胞を採取し、ペレットを、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｍａｘｉ Ｐｒｅｐ ＤＮＡ単離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）による、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの単離のために処理した。

【０２９１】

最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により解析して、ｃｅＤＮＡの生産性および純度を決定した。アガロースゲル解析は、ＡｃＭＮＰＶポリヘドリンプロモーターまたはＯｐＭＮＰＶ ＯｐＩＥ２プロモーターの下にあるＨＢｏＶ１ ＮＳ１を発現するｖｐ８０ＫＯ ＢＥＶ内において、高分子量（＞２０ｋｂ）バキュロウイルスＤＮＡ（ｖＤＮＡ）の夾雑が、極低度に検出可能～検出不可能であることを示した（図１６Ｃ）。これは、ｖｐ８０ＫＯアプローチが、細胞に、ＭＯＩを、細胞１個当たり２．０、３．０または４．０ｐｆｕとして共感染させた場合に、夾雑バキュロウイルスＤＮＡを低減し、同時に、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨｂｏＶ１ ｃｅＤＮＡ収量を改善することが可能であることを示唆する（図１１Ｃ、図１６Ｃ）。

【実施例１３】

【０２９２】

ＴｗｏＢＡＣ系からの、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡベクターの作製

遺伝子不安定性は、バキュロウイルス学の分野における、主要な懸案事項のうちの１つであり、とりわけ、Ｓｆ９細胞内における、組換えバキュロウイルスの、数代の継代にわたる。加えて、バキュロウイルスゲノムは、Ｓｆ９細胞内の継代にわたり、組み換えられる傾向があり、潜在的に、組換えＢＥＶ内の導入遺伝子を喪失しうる、いくつかの相同領域（ｈｒ）を含有する。逆位末端反復（ＩＴＲ）もまた、回文リピート配列であり、バキュロウイルスＤＮＡのサイズが大きいことを考慮すると、バキュロウイルスゲノム内の、異なる遺伝子座において、潜在的に組み換えられる。したがって、肝臓特異的ｍＴＴＲプロモーター下にあるＦＶＩＩＩＸＴＥＮ遺伝子を、ＨＢｏＶ１ ＷＴ ＩＴＲと共にコードする組換えＢＥＶの遺伝子安定性を決定するために、既に記載されている通りに、Ｓｆ９細胞に、ＭＯＩを、細胞１個当たり０．１ｐｆｕとして感染させることにより、ＢＥＶを、逐次的に増幅した。Ｊａｒｖｉｓら（２０１４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．、５３６：１４９～１６３。ＴｗｏＢＡＣ系を使用する、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの作製について、結果として得られる組換えＢＥＶを調べた（図１７Ａおよび図１７Ｂに描示された構築物を参照されたい）。

【０２９３】

細胞約２．０×１０^{6}個を、無血清ＥＳＦ－９２１培地１００ｍＬ中に播種し、ＭＯＩを、細胞１個当たり１．０、２．０、３．０、４．０、および５．０ｐｆｕとする、ＡｃＢＩＶＶＢａｃ．ｍＴＴＲ．ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ．ＨＢｏＶ１．ＩＴＲ^{Ｔｎ７} ＢＥＶ、およびＡｃＢＩＶＶＢａｃ．Ｐｏｌｈ．ＨＢｏＶ１．ＮＳ１^{Ｔｎ７} ＢＥＶの滴定作業原液（Ｐ３またはＰ４）を共感染させた。各場合に、ウイルス接種物は除去せず、細胞を、２８℃のシェーキングインキュベーター内の細胞生存率が、６０～７０％に達するまでインキュベートした。感染の約９６時間後、感染細胞を採取し、ペレットを、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｍａｘｉ Ｐｒｅｐ ＤＮＡ単離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）による、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ ＨＢｏＶ１ ｃｅＤＮＡの単離のために処理した。

【０２９４】

最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により解析して、ｃｅＤＮＡの生産性を決定した。図１７Ｃに示されるアガロースゲル解析が、Ｐ３またはＰ４（

およびＰ５；データは示さない）のＢＥＶに関して、ほぼ同等レベルのＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡ生産性を示したことは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲをコードする組換えＢＥＶが、Ｓｆ９細胞内における、後続する高継代数の継代において、遺伝子的に安定であることを示唆する。

【実施例１４】

【０２９５】

ＯｎｅＢＡＣ系からの、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡベクターの作製

ＨＢｏＶ１　ＯｎｅＢＡＣ系は、Ｓｆ９細胞内において、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡベクターを作製することが示されている（例えば、図８Ｃを参照されたい）。しかし、ポリクローナル組換えＢＥＶを使用して、概念実証を達成した。大スケールの作製を支援するために、ＢＥＶクローンを作出する必要がある。したがって、本研究では、ＨＢｏＶ１　ＯｎｅＢＡＣポリクローナルＢＥＶを、Ｓｆ９細胞内において、プラーク精製および増幅した（図１８Ａを参照されたい）。次いで、これらのクローンＯｎｅＢＡＣ　ＢＥＶを、Ｓｆ９細胞内における、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡベクターの作製についてスクリーニングした。

【０２９６】

組換えＨＢｏＶ１　ＯｎｅＢＡＣ　ＢＥＶのプラーク精製および増幅は、既に記載されている通りに実施した。Ｊａｒｖｉｓら（２０１４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、５３６：１４９～１６３。１０％のウシ胎仔血清を補充されたＥＳＦ－９２１培地１００ｍＬ中に、１ｍＬ当たりのＳｆ９細胞約１．０×１０^{6}個に感染させることにより、６つのプラーク精製クローンを、Ｐ２まで増幅し、４～５日間にわたり、または２８℃のシェーキングインキュベーターの細胞生存率が、６０～７０％に達するまでインキュベートした。感染の４～５日後、無細胞上清を採取し、Ｐ２作業原液として保管し、細胞ペレットを、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｍａｘｉ　Ｐｒｅｐ　ＤＮＡ単離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）による、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡの単離のために処理した。

【０２９７】

最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により解析して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡベクターの生産性を決定した。図１８Ｃは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲおよびポリヘドリン駆動型ＨＢｏＶ１－ＮＳ１と共にコードするＨＢｏＶ１　ＯｎｅＢＡＣ（図１８Ｂに描示される構築物）についてのアガロースゲル解析を示す。結果は、異なるクローンについて、ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡの生産性の程度が変動し、クローン２およびクローン４が、他の被験クローンと比較して、ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡの高度のプロデューサーであることを示した（図１８Ｃ）。この結果は、同じ原液から得られた、異なるバキュロウイルスクローンにおけるばらつきを示し、大スケールのｃｅＤＮＡ製造のために、クローン組換えＢＥＶを使用することの重要性を強調する。

【０２９８】

クローンである、ＨＢｏＶ１　ＯｎｅＢＡＣ　ＢＥＶの最適生産性を決定するために、細胞約２．０×１０^{6}個に、ＭＯＩを、細胞１個当たり０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、１．０、２．０、３．０、４．０、または５．０ｐｆｕとする、ＨＢｏＶ１　ＯｎｅＢＡＣ　ＢＥＶクローン５の滴定作業原液（Ｐ２）を感染させた。各場合に、ウイルス接種物は除去せず、細胞を、２８℃のシェーキングインキュベーター内の細胞生存率が、６０～７０％に達するまでインキュベートした。感染の約９６時間後、感染細胞を採取し、ペレットを、製造元の指示書に従う、ＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｍａｘｉ　Ｐｒｅｐ　ＤＮＡ単離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）による、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡの単離のために処理した。最終溶出画分を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により解析して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡの生産性を決定した。

【０２９９】

アガロースゲル解析は、全ての被験用量において、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡのサイズ（約８．５ｋｂ）に対応するＤＮＡバンドを示し、ＭＯＩの増大に応じて、生産性も増大した。この結果は、生産性の低減が、ウイルス量の増大と共に、観察された、ＡＡＶ２　ＩＴＲ　ＯｎｅＢＡＣにより得られた、ｃｅＤＮＡの生産性と逆であった。このＨＢｏＶ１　Ｏｎｅ　ＢＡＣアプローチは、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮを、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲおよびＮＳ１導入遺伝子と共にコードする、単一の組換えＢＥＶからのｃｅＤＮＡ作製の概念を実証する。それはまた、バキュロウイルスシャトルベクター（ＢＩＶＶＢａｃ）内の、異なる遺伝子座に挿入された、複数の導入遺伝子の実現可能性および機能性も示す。

【実施例１５】

【０３００】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｓｓＤＮＡと、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡとの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける効能の対比

ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（一本鎖ＤＮＡ）

ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ領域内において形成されるヘアピンは、長期間にわたる、持続的な導入遺伝子の発現を、高レベルにおいて駆動することを仮定した。ＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能性を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて検証するために、コドン最適化ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ（ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮ）を、あらかじめ形成されたＨＢｏＶ１　ＩＴＲと共に含む、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+/+}$／ＨｅｍＡマウスにおいて調べた。

【０３０１】

あらかじめ形成されたＨＢｏＶ１　ＩＴＲを伴うｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、９５℃におけるＰｍｌＩ消化の二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）断片産物（ＦＶＩＩＩ発現カセットおよびプラスミド骨格）を変性させ、次いで、４℃で冷却して、回文ＩＴＲ配列が、フォールディングすることを可能とすることにより作出した。結果として得られるｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により確認した。ゲル解析が、ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮについて、ｄｓＤＮＡの半分のサイズを示したことは、効率的なヘアピン形成を示唆する（図１９Ａ）。ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、流体尾静脈注射を介して、それぞれ、４００μｇまたは１６００μｇ／ｋｇと同等である、マウス１匹当たり１０μｇまたは４０μｇで全身注射した。血漿サンプルは、注射されたマウスから、７日間隔で、５．５ヶ月間にわたり回収した。血漿ＦＶＩＩＩ活性は、製造元の指示書に従う、Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ　Ｃｏａｔｅｓｔ（登録商標）ＳＰ　Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩＩ発色アッセイにより測定した。

【０３０２】

ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射された動物について、正常のパーセントに照らして正規化された、血漿ＦＶＩＩＩ活性を、図１９Ｃに示す。結果は、ＨｅｍＡマウスにおいて、５．５ヶ月間の経過にわたり、用量依存的応答を示し、ＦＶＩＩＩ発現は、高用量コホートにおいて、生理学的レベルを超えるレベル（正常レベルの＞１０００％）であった。しかし、５６日目まで、ＦＶＩＩＩ発現の初期降下が観察され、次いで、１４０日目まで、レベルが安定化したことは、肝臓からの、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲにより挟まれたｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮの持続的発現を示唆する。これらの結果は、長期間にわたる、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮの持続的発現について、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能性を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて検証する。

【０３０３】

ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ＩＴＲ（クローズドエンドＤＮＡ）

クローズドエンドＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）と、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）との間には、それぞれ、前者は二本鎖であり、後者は一本鎖であることの、大きな構造的差違が存在する。この差違は、核酸分子の発現レベルならびに安定性に影響を及ぼしうる。本研究は、ｃｅＤＮＡ形態にあるＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能性を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて示す。これについて調べるために、実施例８で記載されたＴｗｏＢａｃアプローチを使用して、ｃ

ｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮを得、感染Ｓｆ９細胞ペレットから精製し、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により、品質を決定した。アガロースゲル解析は、ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮについて、＞９０％の純度を示し、夾雑ＤＮＡは検出不可能であった（図１９Ｂ）。

【０３０４】

結果として得られるｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、流体尾静脈注射を介して、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウスにおいて、それぞれ、１２μｇ、４０μｇ、および８０μｇ／ｋｇと同等である、マウス１匹当たり０．３μｇ、１．０μｇ、または２．０μｇで全身注射した。注射されたマウスからの血漿サンプルは、７日間隔で回収し、ＦＶＩＩＩ活性は、上記で記載された、発色アッセイにより測定した。ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射された動物について、正常のパーセントに照らして正規化された、血漿ＦＶＩＩＩ活性を、図１９Ｃに示す。

【０３０５】

結果は、ＨｅｍＡマウスにおいて、用量依存的応答を示し、ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮについての被験最高用量（８０μｇ／ｋｇ）において、ＦＶＩＩＩ発現は、生理学的レベルを超えるレベル（正常レベルの＞５００％）であった。ｃｅＤＮＡについて、ＦＶＩＩＩ発現の最高レベルは、１６００μｇ／ｋｇにおけるｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮにより達成された最高レベルの２分の１であった。しかし、ｓｓＤＮＡは、これらの高レベルのＦＶＩＩＩ発現を達成するのに、はるかに高量で投与された。ｃｅＤＮＡは、投与量当たり高レベルのＦＶＩＩＩ発現をもたらすと考えられる。例えば、４００μｇ／ｋｇにおけるｓｓＤＮＡについてのＦＶＩＩＩ発現レベルと、４０μｇ／ｋｇにおけるｃｅＤＮＡについてのＦＶＩＩＩ発現レベルとは、同等であった（図１９Ｃ）。これらのｉｎ　ｖｉｖｏ研究は、ｓｓＤＮＡ形態またはｃｅＤＮＡ形態における、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲの機能性を検証し、ＨＢｏＶ１　ＩＴＲが、バキュロウイルス昆虫細胞系において、目的の導入遺伝子をコードする、機能的ｃｅＤＮＡを作製するのに使用されることを示す。

【実施例１６】

【０３０６】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１単量体ｃｅＤＮＡと、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１多量体ｃｅＤＮＡとの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける効能の対比

組換えＡＡＶゲノムは、エピソーム内に存続することが示されており、それらのエピソーム内の存在は、長期間にわたる導入遺伝子の発現と相関すると考えられる。これらのゲノムは、単量体環状化過程を介して生じ、ＡＡＶ頭尾環状ゲノムをもたらすと考えられる。しかし、時間経過にわたり、高分子量環状コンカタマーが優先され、単量体環状中間体は減衰する。さらなる詳細については、Ｄｕａｎら（１９９８）、Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．７２（１１）、８５６８～８５７７において開示されている。現在のところ、エピソーム内における、クローズドエンドＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）の存在、およびｉｎ　ｖｉｖｏにおける、単量体ｃｅＤＮＡ形態の、コンカタマーｃｅＤＮＡ形態に対する利益については、ほとんど知られていない。

【０３０７】

本研究は、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウスにおいて、流体尾静脈注射を介して、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｃｅＤＮＡ（ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮ）の両方の形態を調べることにより、ｃｅＤＮＡの単量体形態の影響を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、多量体形態と対比して決定するために実施した。

【０３０８】

ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮの単量体形態および多量体形態は、既に記載されている通り（国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０４７２１８号を参照されたい）に、ＰＡＧＥ精製により作出した。ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮのコンカタマー形態の品質を、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により決定したところ、結果は、分子種の大部分が、ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮの単量体形態または多量体形態であったことを示した（図２０Ａ）。精製された、単量体または多量体のｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／

$^{+}$／ＨｅｍＡマウスに、流体尾静脈注射を介して、４０μｇ／ｋｇで、全身注射した。血漿サンプルは、注射されたマウスから、７日間隔で、約３ヶ月間にわたり回収した。血漿ＦＶＩＩＩ活性は、製造元の指示書に従う、Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ　Ｃｏａｔｅｓｔ（登録商標）ＳＰ　Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩＩ発色アッセイにより測定した。

【０３０９】

ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射された動物について、正常のパーセントに照らして正規化された、血漿ＦＶＩＩＩ活性を、図２０Ｂに示す。結果は、３ヶ月間の経過にわたり、ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮの単量体形態または多量体形態の間において、ＦＶＩＩＩ発現レベルの有意差を示さなかった。このデータは、ｃｅＦＶＩＩＩＸＴＥＮの単量体形態および多量体形態のいずれも、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、同等の効力および安定性を有することを示唆する。

【実施例１７】

【０３１０】

ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　ｍＴＴＲ　ｓｓＤＮＡと、ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ　ＨＢｏＶ１　Ａ１ＡＴ　ｓｓＤＮＡとの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける効能の対比

上記で開示された実験において使用されるＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセットは、ｍＴＴＲプロモーターおよびエンハンサーエレメントを含有する（Ｖ２．０；図１）。このプロモーターは、マウス肝臓特異的であるが、その肝臓特異的発現は、大型動物モデルまたはヒト対象において研究されていない。したがって、本研究では、Ｖ３．０　ＦＶＩＩＩＸＴＥＮ発現カセット（配列番号３５）は、Ｖ２．０発現カセット内において、ｍＴＴＲプロモーターおよびエンハンサーエレメントを、ヒト肝臓特異的アルファ１アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）プロモーター（配列番号３６）により置き換えることにより作出した（図１）。

【０３１１】

ｍＴＴＲプロモーターの機能性を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、Ａ１ＡＴプロモーターと対比して検証するために、コドン最適化ヒトＦＶＩＩＩＸＴＥＮ（ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮ）を、あらかじめ形成されたＨＢｏＶ１　ＩＴＲと共に含む、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウスにおいて調べた（図２１Ａ）。あらかじめ形成されたＨＢｏＶ１　ＩＴＲを伴うｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、９５℃におけるＰｍｌＩ消化の二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）断片産物（ｍＴＴＲ発現カセットまたはＡ１ＡＴ　ＦＶＩＩＩ発現カセットおよびプラスミド骨格）を変性させ、次いで、４℃で冷却して、回文ＩＴＲ配列が、フォールディングすることを可能とすることにより作出した。結果として得られるｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、０．８～１．２％のアガロースゲル電気泳動により照合した。ゲル解析が、ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮについて、ｄｓＤＮＡの半分のサイズを示したことは、効率的なヘアピン形成を示唆する（図２１Ｂ）。ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮは、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウスへと、流体尾静脈注射を介して、マウス１匹当たり１０μｇで全身注射した。血漿サンプルは、注射されたマウスから、７日間隔で、５．５ヶ月間にわたり回収した。血漿ＦＶＩＩＩ活性は、製造元の指示書に従う、Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ　Ｃｏａｔｅｓｔ（登録商標）ＳＰ　Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩＩ発色アッセイにより測定した。

【０３１２】

ｓｓＦＶＩＩＩＸＴＥＮを注射された動物について、正常のパーセントに照らして正規化された、血漿ＦＶＩＩＩ活性を、図２１Ｃに示す。これらの結果が、注射後２１日目まで、同等レベルのＦＶＩＩＩ発現を示したことは、ｈＦＶＩＩＩＲ５９３Ｃ$^{+}$／$^{+}$／ＨｅｍＡマウス動物モデルにおいて、ｍＴＴＲプロモーターまたはＡ１ＡＴプロモーターにより発現されるＦＶＩＩＩＸＴＥＮレベルに、有意差が見られないことを示唆する。

【０３１３】

配列

【０３１４】

【表１－１】

表2:さらなるヌクレオチド配列およびアミノ酸配列

配列番号/記載	ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列
配列番号 1: HBoV1 5'側ITR	GTGGTTGTACAGACGCCATCTTGGAATCCAATATGTCTGCCGGCTCAGTCATGCCTGCGCTGCGCGC AGCGCGCTGCGCGCGCGCATGATCTAATCGCCGGCAGACATATTGGATTCCAAGATGGCGTCTGTAC AACCAC
配列番号 2: HBoV1 3'側ITR	TTGCTTATGCAATCGCGAAACTCTATATCTTTTAATGTGTTGTTGTTGTACATGCGCCATCTTAGTT TTATATCAGCTGGCGCCTTAGTTATATAACATGCATGTTATATAACTAAGGCGCCAGCTGATATAAA ACTAAGATGGCGCATGTACAACAACAACACATTAAAAGATATAGAGTTTCGCGATTGCATAAGCAA
配列番号 3: HBoV1-5'側ITR-mTTR482-イントロン-coBDDFVIIIXTEN(V2.0)-WPRE-bGHポリA-HBoV1-3'側ITR	GTATACCTGCAGGCTAGCCACGTGTTGTTGTTGTACATGCGCCATCTTAGTTTTATATCAGCTGGCG CCTTAGTTATATAACATGCATGTTATATAACTAAGGCGCCAGCTGATATAAAACTAAGATGGCGCAT GTACAACAACAACACATTAAAAGATATAGAGTTTCGCGATTGCAAGCTTGGCCCCAGGTTAATTTTT AAAAAGCAGTCAAAGGTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTATTGACTTTGGTTAATAA TCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCC TCTCCCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAGGTCAAAGTGGCCCTTGGC AGCATTTACTCTCTCTATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAG AAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCGATATCTACCTGCTGATCGCCCG GCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTCGGGGCAAAGGTCGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTC AACATCCTCCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACT CTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAAT AATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTA TAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGGAATTCTCAGGAG CACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCAC CGATATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTCGGGGCAAAGGT CGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCTGCACATT TCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTAT TCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGC AGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAA GCTCCTGCTAGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCC CGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGG CTGTAATTAGCGCTTGGTTTATTGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGG CTCCGGGAAGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGA GCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGC GCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAG GGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCG GGCTGCAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCT CCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGC GGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCG GCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACT TCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGC GGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCC GCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACG GGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCTTGTTCTT GCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCA AAGAATTACTCGAGGCCACCATGCAGATTGAACTGTCCACTTGCTTCTTCCTGTGCCTCCTGCGGTT TTGCTTCTCGGCCACCCGCCGGTATTACTTAGGTGCTGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCC GACCTGGGAGAACTGCCGGTGGACGCGAGATTCCCACCTAGAGTCCCGAAGTCCTTCCCATTCAACA CCTCCGTGGTCTACAAAAAGACCCTGTTCGTGGAGTTCACTGACCACCTTTTCAATATTGCCAAGCC GCGCCCCCCCTGGATGGGCCTGCTTGGTCCTACGATCCAAGCAGAGGTCTACGACACCGTGGTCATC ACACTGAAGAACATGGCCTCACACCCCGTGTCGCTGCATGCTGTGGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCT CAGAGGGTGCCGAATATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAAAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCCGGG

【表１－２】

	TGGCAGCCACACTTACGTGTGGCAAGTGCTGAAGGAAAACGGGCCTATGGCGTCGGACCCCCTATGC
	CTGACCTACTCCTACCTGTCCCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTCAACTCGGGACTGATCGGCGCCC
	TCTTGGTGTGCAGAGAAGGCAGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTGTT
	GTTTGCTGTGTTCGATGAAGGAAAGTCCTGGCACTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGCAGGATAGA
	GATGCGGCCTCGGCCAGAGCCTGGCCTAAAATGCACACCGTCAACGGATATGTGAACAGGTCGCTCC
	CTGGCCTCATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTATTGGCATGTGATCGGCATGGGTACTACTCCGGA
	AGTGCATAGTATCTTTCTGGAGGGCCATACCTTCTTGGTGCGCAACCACAGACAGGCCTCGCTGGAA
	ATCTCGCCTATCACTTTCTTGACTGCGCAGACCCTCCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGCTGTTCT
	GTCACATCAGCTCCCATCAGCATGATGGGATGGAGGCCTATGTCAAAGTGGACTCCTGCCCTGAGGA
	GCCACAGCTCCGGATGAAGAACAATGAGGAAGCGGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAA
	ATGGACGTCGTGCGATTCGATGACGACAACAGCCCGTCCTTCATCCAAATTAGATCAGTGGCGAAGA
	AGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCGCCGCTGGT
	GCTGGCGCCAGACGACAGGAGCTACAAGTCCCAGTACCTCAACAACGGGCCGCAGCGCATTGGCAGG
	AAGTACAAGAAAGTCCGCTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCCAGC
	ACGAGTCAGGCATCCTGGGACCGCTCCTTTACGGCGAAGTCGGGGATACCCTGCTCATCATTTTCAA
	GAACCAGGCATCGCGGCCCTACAACATCTACCCTCACGGGATCACAGACGTGCGCCCGCTCTACTCC
	CGCCGGCTGCCCAAGGGAGTGAAGCACCTGAAGGATTTTCCCATCCTGCCGGGAGAAATCTTCAAGT
	ACAAGTGGACCGTGACTGTGGAAGATGGCCCTACCAAGTCGGACCCTCGCTGTCTGACCCGGTACTA
	TTCCTCGTTTGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCTCGGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATCTGCTAC
	AAGGAGTCCGTGGACCAGCGCGGGAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCTG
	TCTTTGATGAAAACAGATCGTGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTTCCTGCCCAACCCAGCGGG
	AGTGCAACTGGAGGACCCGGAGTTCCAGGCCTCAAACATTATGCACTCTATCAACGGCTATGTGTTC
	GACTCGCTCCAACTGAGCGTGTGCCTGCATGAAGTGGCATACTGGTACATTCTGTCCATCGGAGCCC
	AGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGATACACCTTCAAGCATAAGATGGTGTACGAGGACAC
	TCTGACCCTCTTCCCATTTTCCGGAGAAACTGTGTTCATGTCAATGGAAAACCCGGGCTTGTGGATT
	CTGGGTTGCCATAACTCGGACTTCCGGAATAGAGGGATGACCGCCCTGCTGAAAGTGTCCAGCTGTG
	ACAAGAATACCGGCGATTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCTTATCTGCTGTCCAAGAA
	CAACGCCATTGAACCCAGGTCCTTCTCCCAAAACGGTGCACCGACCTCCGAAAGCGCCACCCCAGAG
	TCAGGACCTGGCTCGGAACCGGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGACTTCCGAGTCCGCAACCC
	CCGAGAGTGGACCCGGATCCGAACCAGCAACCTCAGGATCAGAAACCCCGGGAACTTCGGAATCCGC
	CACTCCCGAGTCGGGACCAGGCACCTCCACTGAGCCTTCCGAGGGAAGCGCCCCCGGATCCCCTGCT
	GGATCCCCTACCAGCACTGAAGAAGGCACCTCAGAATCCGCGACCCCTGAGTCCGGCCCTGGAAGCG
	AACCCGCCACCTCCGGTTCCGAAACCCCTGGGACTAGCGAGAGCGCCACTCCGGAATCGGGCCCAGG
	AAGCCCTGCCGGATCCCCGACCAGCACCGAGGAGGGAAGCCCCGCCGGGTCACCGACTTCCACTGAG
	GAGGGAGCCTCATCCCCCCCCGTGCTGAAGCGGCATCAAAGAGAGATCACCAGGACCACTCTCCAGT
	CCGATCAGGAAGAAATTGACTACGACGATACTATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACAT
	CTACGATGAGGATGAGAACCAGTCCCCTCGGAGCTTTCAGAAGAAAACCCGCCACTACTTCATCGCT
	GCCGTGGAGCGGCTGTGGGATTACGGGATGTCCAGCTCACCGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGT
	CAGGATCGGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTCGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGGTCCTTCACTCAACC
	CCTGTACCGGGGCGAACTCAACGAACACCTGGGACTGCTTGGGCCGTATATCAGGGCAGAAGTGGAA
	GATAACATCATGGTCACCTTCCGCAACCAGGCCTCCCGGCCGTACAGCTTCTACTCTTCACTGATCT
	CCTACGAGGAAGATCAGCGGCAGGGAGCCGAGCCCCGGAAGAACTTCGTCAAGCCTAACGAAACTAA
	GACCTACTTTTGGAAGGTCCAGCATCACATGGCCCCGACCAAAGACGAGTTCGACTGTAAAGCCTGG
	GCCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAGAAGGACGTGCACTCGGGACTCATTGGCCCGCTCCTTGTGT
	GCCATACTAATACCCTGAACCCTGCTCACGGTCGCCAAGTCACAGTGCAGGAGTTCGCCCTCTTCTT
	CACCATCTTCGATGAAACAAAGTCCTGGTACTTTACTGAGAACATGGAACGCAATTGCAGGGCACCC
	TGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAGGAAAACTACCGGTTTCATGCCATTAACGGCTACA
	TAATGGACACGTTGCCAGGACTGGTCATGGCCCAGGACCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTCTCCAT
	GGGCTCCAACGAAAACATTCACAGCATTCATTTTTCCGGCCATGTGTTCACCGTCCGGAAGAAGGAA
	GAGTACAAGATGGCTCTGTACAACCTCTACCCTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAAATGCTGCCTAGCA
	AGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGCCTGATCGGAGAGCATTTGCACGCCGGAATGTCCACCCTGTT
	TCTTGTGTACTCCAACAAGTGCCAGACCCCGCTGGGAATGGCCTCAGGTCATATTAGGGATTTCCAG
	ATCACTGCTTCGGGGCAGTACGGGCAGTGGGCACCTAAGTTGGCCCGGCTGCACTACTCTGGCTCCA
	TCAATGCCTGGTCCACCAAGGAACCCTTCTCCTGGATTAAGGTGGACCTCCTGGCCCCAATGATTAT
	TCACGGTATTAAGACCCAGGGTGCCCGACAGAAGTTCTCCTCACTCTACATCTCGCAATTCATCATA
	ATGTACAGCCTGGATGGGAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGAAACTCCACTGGAACGCTCATGGTGT
	TTTTCGGCAACGTGGACTCCTCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCGATCATTGCTCGGTA
	CATCCGGCTGCACCCAACTCACTACAGCATCCGGTCCACCCTGCGGATGGAACTGATGGGTTGTGAC
	CTGAACTCCTGCTCCATGCCCCTTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCGATGCACAGATCACCGCCT
	CTTCATACTTCACCAACATGTTCGCGACCTGGTCCCCGTCGAAGGCCCGCCTGCACCTCCAAGGTCG
	CTCCAATGCGTGGCGGCCTCAAGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTCCAGGTCGACTTCCAAAAGACC
	ATGAAGGTCACCGGAGTGACCACCCAGGGCGTGAAGTCCCTGCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAGT
	TCCTCATCTCCTCAAGCCAAGACGGACATCAGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAAAGTCAAAGT
	ATTCCAGGGCAACCAGGACTCCTTCACCCCTGTGGTCAACAGCCTGGACCCCCCATTGCTGACCCGC
	TACCTCCGCATCCACCCCCAAAGCTGGGTCCACCAGATCGCACTGCGCATGGAGGTCCTTGGATGCG

10

20

30

40

50

【表１－３】

	AAGCCCAAGATCTGTACTAAGCGGCCGCTCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATT GACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTAT CATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCC CACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATT GCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG ACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTG GATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGC GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCC TTTGGGCCGCCTCCCCGCTGCCTAGGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC TCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAAGACCATGGGCGCGCCAGGCCTGTCGACGCC CGGGCGGTACCGCGATCGCTCGCGACGCATAAAGTATATGTGACGTGGTTGTACAGACGCCATCTTG GAATCCAATATGTCTGCCGGCGATTAGATCATGCGCGCGCGCAGCGCGCTGCGCGCAGCGCAGGCAT GACTGAGCCGGCAGACATATTGGATTCCAAGATGGCGTCTGTACAACCACGTGCTTAAGCTGCAGAC TAGTGAGCTCGTTAAC
配列番号 4: Sf コドン最適化 HBoV1 NS1	GCGGCCGCGGATCCGCCACCATGGCATTCAATCCGCCCGTAATACGCGCATTTTCACAACCCGCCTT TACGTATGTCTTTAAGTTTCCGTACCCTCAATGGAAAGAGAAAGAGTGGCTACTGCACGCGTTGCTT GCCCACGGCACCGAGCAGTCCATGATTCAATTACGTAACTGTGCCCCACACCCGGACGAGGATATTA TCCGGGACGATCTTCTAATAAGTTTGGAAGATAGGCATTTCGGGGCGGTCCTGTGTAAAGCGGTATA CATGGCTACTACCACGTTGATGTCTCACAAGCAACGCAATATGTTCCCAAGGTGCGACATAATCGTT CAGTCAGAGTTAGGTGAAAAAAATTTACATTGTCATATTATCGTTGGAGGCGAAGGCCTATCAAAGA GAAACGCTAAGAGCTCTTGCGCTCAGTTTTACGGACTTATATTAGCAGAAATTATCCAGCGCTGTAA GAGTTTACTAGCCACCCGTCCGTTTGAGCCGGAAGAAGCGGATATATTTCATACGTTGAAGAAAGCG GAGCGCGAGGCCTGGGGTGGAGTTACTGGCGGTAACATGCAAATCTTACAATACAGGGACCGTCGGG GTGACCTGCATGCACAGACTGTTGATCCCCTCAGATTCTTCAAAAATTATTTGTTACCGAAGAACCG ATGCATAAGTAGTTACAGCAAACCTGATGTCTGTACTAGCCCTGATAACTGGTTCATTCTGGCCGAA AAAACGTACTCGCATACACTTATCAATGGATTGCCGCTTCCCGAGCACTATCGAAAAAACTATCATG CCACCCTGGATAATGAAGTTATACCTGGACCACAGACTATGGCGTATGGAGGGAGAGGCCCTTGGGA ACATTTACCCGAGGTGGGTGACCAGAGGCTTGCCGCAAGTTCCGTGAGCACTACGTATAAGCCAAAC AAGAAGGAGAAGCTAATGCTCAACCTCCTCGACAAGTGTAAGGAGTTGAATCTTCTAGTTTATGAGG ATCTTGTAGCGAACTGCCCAGAGCTGCTGCTCATGCTAGAAGGCCAACCTGGAGGTGCTCGACTCAT CGAGCAAGTACTAGGAATGCATCACATCAATGTATGCTCGAATTTCACCGCGCTAACGTACCTCTTC CATCTGCATCCGGTGACATCGCTGGATAGTGACAACAAAGCGTTACAGCTTTTACTAATTCAAGGGT ACAACCCCCTGGCAGTGGGGCATGCTCTCTGTTGTGTGTTAAACAAACAATTTGGTAAACAGAACAC AGTCTGTTTTTACGGGCCAGCATCTACTGGGAAAACAAATATGGCAAAAGCGATTGTGCAGGGAATC CGGCTATATGGCTGCGTCAACCATCTTAACAAGGGTTTTGTTTTCAATGATTGTCGACAACGCCTCG TAGTCTGGTGGGAGGAATGCCTAATGCACCAGGACTGGGTGGAGCCAGCAAAGTGTATTCTTGGCGG GACCGAATGTCGTATCGACGTCAAGCACAGAGATTCTGTCCTATTGACACAAACGCCTGTAATAATT TCGACTAATCACGACATTTACGCCGTCGTGGGAGGGAATTCGGTGTCTCACGTTCACGCTGCGCCTC TCAAAGAACGGGTTATTCAGCTGAATTTTATGAAACAACTCCCCCAAACTTTTGGTGAGATAACCGC CACAGAAATCGCTGCTCTGCTACAGTGGTGCTTTAATGAATATGACTGCACCCTGACAGGTTTCAAA CAGAAGTGGAATTTGGACAAGATACCTAACTCATTCCCGTTGGGGGTATTGTGCCCAACACATTCCC AAGATTTCACACTTCACGAAAATGGGTATTGCACGGACTGCGGGGGCTACCTTCCCCACTCCGCTGA TAATTCAATGTATACCGATCGGGCTAGCGAAACATCCACCGGCGACATAACGCCCTCCAAATGATTC GAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGGCATGCGGTACC
配列番号 5: 外側プライマー	GTGGACGTGAAAGAAACC
配列番号 6: 内側プライマー	GGTCATAGCTGTTTCCTGTG
配列番号 7: hr5.ie1.neo.p10PAS	ATTAAGCTTCCGCGTAAAACACAATCAAGTATGAGTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCT CATAACCGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATCAGTGGATGATGTCATTTG TTTTTCAAATCGAGATGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAAACTCGCTTTACGGGTAGAATTCT ACGTGTAACGCACGATCGATTGATGAGTCATTTGTTTTGCAATATGATATCATACAATATGACTCAT TTGTTTTTCAAAACCGAACTTGATTTACGGGTAGAATTCTACTTGTAAAGCACAATCAAAAAGATGA TGTCATTTGTTTTTCAAAACTGAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACGTGTAAAACACAATCAAGA

【表１－４】

	AATGATGTCATTTGTTATAAAAATAAAAGCTGATGTCATGTTTTGCACATGGCTCATAACTAAACTC GCTTTACGGGTAGAATTCTACGCGCGTCGATGTCTTTGTGATGCGCGCGACATTTTTGTAGGTTATT GATAAAATGAACGGATACGTTGCCCGACATTATCATTAAATCCTTGGCGTAGAATTTGTCGGGTCCA TTGTCCGTGTGCGCTAGCATGCCCGTAACGGACCTCGTACTTTTGGCTTCAAAGGTTTTGCGCACAG ACAAAATGTGCCACACTTGCAGCTCTGCATGTGTGCGCGTTACCACAAATCCCAACGGCGCAGTGTA CTTGTTGTATGCAAATAAATCTCGATAAAGGCGCGGCGCGCGAATGCAGCTGATCACGTACGCTCCT CGTGTTCCGTTCAAGGACGGTGTTATCGACCTCAGATTAATGTTTATCGGCCGACTGTTTTCGTATC CGCTCACCAAACGCGTTTTTGCATTAACATTGTATGTCGGCGGATGTTCTATATCTAATTTGAATAA ATAAACGATAACCGCGTTGGTTTTAGAGGGCATAATAAAAGAAATATTGTTATCGTGTTCGCCATTA GGGCAGTATAAATTGACGTTCATGTTGGATATTGTTTCAGTTGCAAGTTGACACTGGCGGCGACAAG ATCGTGAACAACCAAGTGACGCGGCCGCATTTGTAAAAAAAAAATAAATAAAAATGATCGAGCAGGA CGGCCTGCACGCTGGTTCTCCAGCTGCTTGGGTCGAGCGTCTGTTCGGTTACGACTGGGCTCAGCAG ACCATCGGTTGCTCCGACGCTGCTGTGTTCCGTCTGTCCGCTCAGGGTCGTCCCGTGCTGTTCGTCA AGACCGACCTGTCCGGTGCTCTGAACGAGCTGCAGGACGAGGCTGCTCGTCTGTCCTGGCTGGCTAC CACTGGTGTCCCTTGCGCTGCTGTCCTGGACGTGGTCACTGAGGCTGGTCGTGACTGGCTGCTGCTG GGAGAAGTGCCTGGACAGGACCTGCTGTCCAGCCACCTGGCTCCAGCTGAGAAGGTGTCCATCATGG CTGACGCTATGCGTCGTCTGCACACCCTGGACCCTGCTACCTGCCCCTTCGACCACCAAGCTAAGCA CCGTATCGAGCGTGCTCGTACCCGTATGGAAGCTGGCCTGGTGGACCAGGACGACCTGGACGAAGAA CACCAGGGACTGGCCCCTGCTGAGCTGTTCGCTCGTCTGAAGGCTCGTATGCCCGACGGCGAGGACC TGGTGGTTACTCACGGCGACGCTTGCCTGCCCAACATCATGGTCGAGAACGGTCGTTTCTCCGGTTT CATCGACTGCGGTCGTCTGGGTGTCGCTGACCGTTACCAGGATATCGCTCTGGCTACCCGTGATATC GCTGAGGAACTGGGTGGCGAGTGGGCTGACAGATTCCTGGTGCTGTACGGTATCGCTGCTCCCGACT CCCAGCGTATCGCTTTCTACCGTCTGCTGGACGAGTTCTTCTAAGCCCCTTGTAAACGCCACAATTG TGTTTGTTGCAAATAAACCCATGATTATTTGATTAAAATTGTTGTTTTCTTTGTTCATAGACAATAG TGTGTTTTGCCTAAACGGGTACC
配列番号 8: hr5.ie1.eGFP.p10PAS	ATTAAGCTTCCGCGTAAAACACAATCAAGTATGAGTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCT CATAACCGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATCAGTGGATGATGTCATTTG TTTTTCAAATCGAGATGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAAACTCGCTTTACGGGTAGAATTCT ACGTGTAACGCACGATCGATTGATGAGTCATTTGTTTTGCAATATGATATCATACAATATGACTCAT TTGTTTTTCAAAACCGAACTTGATTTACGGGTAGAATTCTACTTGTAAAGCACAATCAAAAAGATGA TGTCATTTGTTTTTCAAAACTGAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACGTGTAAAACACAATCAAGA AATGATGTCATTTGTTATAAAAATAAAAGCTGATGTCATGTTTTGCACATGGCTCATAACTAAACTC GCTTTACGGGTAGAATTCTACGCGCGTCGATGTCTTTGTGATGCGCGCGACATTTTTGTAGGTTATT GATAAAATGAACGGATACGTTGCCCGACATTATCATTAAATCCTTGGCGTAGAATTTGTCGGGTCCA TTGTCCGTGTGCGCTAGCATGCCCGTAACGGACCTCGTACTTTTGGCTTCAAAGGTTTTGCGCACAG ACAAAATGTGCCACACTTGCAGCTCTGCATGTGTGCGCGTTACCACAAATCCCAACGGCGCAGTGTA CTTGTTGTATGCAAATAAATCTCGATAAAGGCGCGGCGCGCGAATGCAGCTGATCACGTACGCTCCT CGTGTTCCGTTCAAGGACGGTGTTATCGACCTCAGATTAATGTTTATCGGCCGACTGTTTTCGTATC CGCTCACCAAACGCGTTTTTGCATTAACATTGTATGTCGGCGGATGTTCTATATCTAATTTGAATAA ATAAACGATAACCGCGTTGGTTTTAGAGGGCATAATAAAAGAAATATTGTTATCGTGTTCGCCATTA GGGCAGTATAAATTGACGTTCATGTTGGATATTGTTTCAGTTGCAAGTTGACACTGGCGGCGACAAG ATCGTGAACAACCAAGTGACGCGGCCGCATTTGTAAAAAAAAAATAAATAAAAATGGTGTCCAAGGG CGAGGAACTGTTCACCGGTGTCGTGCCCATCCTGGTCGAACTGGACGGCGACGTGAACGGTCACAAG TTCTCCGTGTCTGGCGAAGGCGAGGGCGACGCTACCTACGGAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCTACCCTGGTCACCACTCTGACCTACGGTGTCCAGTGCTT CTCCCGTTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGATTTCTTCAAGTCCGCTATGCCCGAGGGTTACGTG CAAGAGCGTACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGTGCTGAAGTGAAGTTCGAAG GCGACACCCTCGTGAACCGTATCGAGCTGAAGGGTATCGACTTCAAGGAAGATGGAAACATCCTGGG CCACAAGCTCGAGTACAACTACAACTCCCACAACGTGTACATCATGGCCGACAAGCAAAAGAACGGC ATCAAAGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGTTCCGTGCAGCTGGCTGACCACTACC AGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGTCCTGTGCTGCTGCCTGACAACCACTACCTGTCCACCCAGTC CGCTCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGTGACCACATGGTGCTGCTCGAGTTCGTGACCGCTGCT GGTATCACCCTGGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGCCCCTTGTAAACGCCACAATTGTGTTTGTT GCAAATAAACCCATGATTATTTGATTAAAATTGTTGTTTTCTTTGTTCATAGACAATAGTGTGTTTT GCCTAAACGGGTACC
配列番号 9 coBDDFVIII XTEN(V2.0)をコードす	ATGCAGATTGAACTGTCCACTTGCTTCTTCCTGTGCCTCCTGCGGTTTTGCTTCTCGGCCACCCGCC GGTATTACTTAGGTGCTGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCCGACCTGGGAGAACTGCCGGT GGACGCGAGATTCCCACCTAGAGTCCCGAAGTCCTTCCCATTCAACACCTCCGTGGTCTACAAAAAG ACCCTGTTCGTGGAGTTCACTGACCACCTTTTCAATATTGCCAAGCCGCGCCCCCCCTGGATGGGCC TGCTTGGTCCTACGATCCAAGCAGAGGTCTACGACACCGTGGTCATCACACTGAAGAACATGGCCTC ACACCCCGTGTCGCTGCATGCTGTGGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCAGAGGGTGCCGAATATGAT

【表１－５】

るヌクレオチド配列	GACCAGACCAGCCAGAGGGAAAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCCGGGTGGCAGCCACACTTACGTGT GGCAAGTGCTGAAGGAAAACGGGCCTATGGCGTCGGACCCCCTATGCCTGACCTACTCCTACCTGTC CCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTCAACTCGGGACTGATCGGCGCCCTCTTGGTGTGCAGAGAAGGC AGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTGTTGTTTGCTGTGTTCGATGAAG GAAAGTCCTGGCACTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGCAGGATAGAGATGCGGCCTCGGCCAGAGC CTGGCCTAAAATGCACACCGTCAACGGATATGTGAACAGGTCGCTCCCTGGCCTCATCGGCTGCCAC AGAAAGTCCGTGTATTGGCATGTGATCGGCATGGGTACTACTCCGGAAGTGCATAGTATCTTTCTGG AGGGCCATACCTTCTTGGTGCGCAACCACAGACAGGCCTCGCTGGAAATCTCGCCTATCACTTTCTT GACTGCGCAGACCCTCCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGCTGTTCTGTCACATCAGCTCCCATCAG CATGATGGGATGGAGGCCTATGTCAAAGTGGACTCCTGCCCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAAGA ACAATGAGGAAGCGGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGACGTCGTGCGATTCGA TGACGACAACAGCCCGTCCTTCATCCAAATTAGATCAGTGGCGAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTG CACTACATTGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCGCCGCTGGTGCTGGCGCCAGACGACAGGA GCTACAAGTCCCAGTACCTCAACAACGGGCCGCAGCGCATTGGCAGGAAGTACAAGAAAGTCCGCTT CATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCCAGCACGAGTCAGGCATCCTGGGA CCGCTCCTTTACGGCGAAGTCGGGGATACCCTGCTCATCATTTTCAAGAACCAGGCATCGCGGCCCT ACAACATCTACCCTCACGGGATCACAGACGTGCGCCCGCTCTACTCCCGCCGGCTGCCCAAGGGAGT GAAGCACCTGAAGGATTTTCCCATCCTGCCGGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACTGTG GAAGATGGCCCTACCAAGTCGGACCCTCGCTGTCTGACCCGGTACTATTCCTCGTTTGTGAACATGG AGCGCGACCTGGCCTCGGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCCGTGGACCAGCG CGGGAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCTGTCTTTGATGAAAACAGATCG TGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTTCCTGCCCAACCCAGCGGGAGTGCAACTGGAGGACCCGG AGTTCCAGGCCTCAAACATTATGCACTCTATCAACGGCTATGTGTTCGACTCGCTCCAACTGAGCGT GTGCCTGCATGAAGTGGCATACTGGTACATTCTGTCCATCGGAGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTG TTCTTCTCCGGATACACCTTCAAGCATAAGATGGTGTACGAGGACACTCTGACCCTCTTCCCATTTT CCGGAGAAACTGTGTTCATGTCAATGGAAAACCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATAACTCGGA CTTCCGGAATAGAGGGATGACCGCCCTGCTGAAAGTGTCCAGCTGTGACAAGAATACCGGCGATTAC TACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCTTATCTGCTGTCCAAGAACAACGCCATTGAACCCAGGT CCTTCTCCCAAAACGGTGCACCGACCTCCGAAAGCGCCACCCCAGAGTCAGGACCTGGCTCGGAACC GGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGACTTCCGAGTCCGCAACCCCCGAGAGTGGACCCGGATCC GAACCAGCAACCTCAGGATCAGAAACCCCGGGGAACTTCGGAATCCGCCACTCCCGAGTCGGGACCAG GCACCTCCACTGAGCCTTCCGAGGGAAGCGCCCCCGGATCCCCTGCTGGATCCCCTACCAGCACTGA AGAAGGCACCTCAGAATCCGCGACCCCTGAGTCCGGCCCTGGAAGCGAACCCGCCACCTCCGGTTCC GAAACCCCTGGGACTAGCGAGAGCGCCACTCCGGAATCGGGCCCAGGAAGCCCTGCCGGATCCCCGA CCAGCACCGAGGAGGGAAGCCCCGCCGGGTCACCGACTTCCACTGAGGAGGGAGCCTCATCCCCCCC CGTGCTGAAGCGGCATCAAAGAGAGATCACCAGGACCACTCTCCAGTCCGATCAGGAAGAAATTGAC TACGACGATACTATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGATGAGGATGAGAACC AGTCCCCTCGGAGCTTTCAGAAGAAAACCCGCCACTACTTCATCGCTGCCGTGGAGCGGCTGTGGGA TTACGGGATGTCCAGCTCACCGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCCCAGTTC AAGAAGGTCGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGGTCCTTCACTCAACCCCTGTACCGGGGCGAACTCA ACGAACACCTGGGACTGCTTGGGCCGTATATCAGGGCAGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTT CCGCAACCAGGCCTCCCGGCCGTACAGCTTCTACTCTTCACTGATCTCCTACGAGGAAGATCAGCGG CAGGGAGCCGAGCCCCGGAAGAACTTCGTCAAGCCTAACGAAACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTCC AGCATCACATGGCCCCGACCAAAGACGAGTTCGACTGTAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGA CCTGGAGAAGGACGTGCACTCGGGACTCATTGGCCCGCTCCTTGTGTGCCATACTAATACCCTGAAC CCTGCTCACGGTCGCCAAGTCACAGTGCAGGAGTTCGCCCTCTTCTTCACCATCTTCGATGAAACAA AGTCCTGGTACTTTACTGAGAACATGGAACGCAATTGCAGGGCACCCTGCAACATCCAGATGGAAGA TCCCACCTTCAAGGAAAACTACCGGTTTCATGCCATTAACGGCTACATAATGGACACGTTGCCAGGA CTGGTCATGGCCCAGGACCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTCTCCATGGGCTCCAACGAAAACATTC ACAGCATTCATTTTTCCGGCCATGTGTTCACCGTCCGGAAGAAGGAAGAGTACAAGATGGCTCTGTA CAACCTCTACCCTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAAATGCTGCCTAGCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTG GAATGCCTGATCGGAGAGCATTTGCACGCCGGAATGTCCACCCTGTTTCTTGTGTACTCCAACAAGT GCCAGACCCCGCTGGGAATGGCCTCAGGTCATATTAGGGATTTCCAGATCACTGCTTCGGGGCAGTA CGGGCAGTGGGCACCTAAGTTGGCCCGGCTGCACTACTCTGGCTCCATCAATGCCTGGTCCACCAAG GAACCCTTCTCCTGGATTAAGGTGGACCTCCTGGCCCCAATGATTATTCACGGTATTAAGACCCAGG GTGCCCGACAGAAGTTCTCCTCACTCTACATCTCGCAATTCATCATAATGTACAGCCTGGATGGGAA GAAGTGGCAGACCTACCGGGGAAACTCCACTGGAACGCTCATGGTGTTTTTCGGCAACGTGGACTCC TCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCGATCATTGCTCGGTACATCCGGCTGCACCCAACTC ACTACAGCATCCGGTCCACCCTGCGGATGGAACTGATGGGTTGTGACCTGAACTCCTGCTCCATGCC CCTTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCGATGCACAGATCACCGCCTCTTCATACTTCACCAACATG TTCGCGACCTGGTCCCCGTCGAAGGCCCGCCTGCACCTCCAAGGTCGCTCCAATGCGTGGCGGCCTC AAGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTCCAGGTCGACTTCCAAAAGACCATGAAGGTCACCGGAGTGAC CACCCAGGGCGTGAAGTCCCTGCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAGTTCCTCATCTCCTCAAGCCAA GACGGACATCAGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAAAGTCAAAGTATTCCAGGGCAACCAGGACT

【表１－６】

	CCTTCACCCCTGTGGTCAACAGCCTGGACCCCCCATTGCTGACCCGCTACCTCCGCATCCACCCCCA AAGCTGGGTCCACCAGATCGCACTGCGCATGGAGGTCCTTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACTAA
配列番号 10 coBDDFVIII XTEN(V2.0) のアミノ酸配列	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI EPRSFSQNGAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGASSPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYR GELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYF WKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSN ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVY SNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGI KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNA WRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQG NQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
配列番号 11 coBDDFVIII XTEN(V2.0) のシグナルペプチド	MQIELSTCFFLCLLRFCFS
配列番号 12 BDD 成熟ヒト FVIII のアミノ酸配列	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI EPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHY FIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRA EVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDC KAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIR DFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELM GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDF QKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
配列番号 13 BDD 成熟ヒト FVIII をコードする	ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAA GATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGT GGACGCAAGATTTCCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAG ACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTC TGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTC CCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGAT

【表１－７】

ヌクレオチド配列	GATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCT GGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTTTC TCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGG AGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTGATGAAG GGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGC CTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCAC AGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAGTGCACTCAATATTCCTCG AAGGTCACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTTCCT TACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTTCCCACCAA CATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAA ATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGA TGATGACAACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACTTGGGTA CATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCCGATGACAGAA GTTATAAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAAGTCCGATT TATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGA CCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCAT ATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTATTCAAGGAGATTACCAAAAGGTGT AAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGACTGTA GAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGG AGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAG AGGAAACCAGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGC TGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAG AGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGT TTGTTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTC TTCTTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCTATTCCCATTCT CAGGAGAAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACTCAGA CTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTAT TACGAGGACAGTTATGAAGATATTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAA GCTTCTCTCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTACTCTTCAGTC AGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATT TATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTG CAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAG TGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCC TTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGAAG ATAATATCATGGTAACTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTC TTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAA ACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGGG CTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTG CCACACTAACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTC ACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAGAAACTGCAGGGCTCCCT GCAATATCCAGATGGAAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACAT AATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCATG GGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTCATTTCAGTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAAGAGG AGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAA AGCTGGAATTTGGCGGGTGGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTT CTGGTGTACAGCAATAAGTGTCAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGA TTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATTCCGGATCAAT CAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATT CACGGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCA TGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCCACTGGAACCTTAATGGTCTT CTTTGGCAATGTGGATTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTTAACCCTCCAATTATTGCTCGATAC ATCCGTTTGCACCCAACTCATTATAGCATTCGCAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATT TAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTC ATCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGG AGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAA TGAAAGTCACAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTT CCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTT TTTCAGGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCT ACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGA GGCACAGGACCTCTAC
配列番号 14 V2.0	GGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAGGTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCT ATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCT GGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAG GTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAA

【表１－８】

発現カセット mTTR482-イントロン-coBDDFVIII XTEN(V2.0)-WPRE-bGHポリA	CATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCGATAT CTACCTGCTGATCGCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTCGGGGCAAAGGTCGGCAG TAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCTGCACATTTCGTAG AGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCT TTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTG GGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCT GCTAGGAATTCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATC CTCTGGGCCTCTCCCCACCGATATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATA CTCTGTCGGGGCAAAGGTCGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCCAGTGTACGTAGGAT CCTGTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTA TTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTC AGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGC CGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCG CCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGA CGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTATTGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTG CGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAAGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCG TGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGG TGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGG GTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCC GGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGG CAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCG GCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTG CGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGC ACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCC TTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGG CTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCC TCTGCTAACCTTGTTCTTGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGC TGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTACTCGAGGCCACCATGCAGATTGAACTGTCCACTTGCTTCTT CCTGTGCCTCCTGCGGTTTTGCTTCTCGGCCACCCGCCGGTATTACTTAGGTGCTGTGGAACTGAGC TGGGACTACATGCAGTCCGACCTGGGAGAACTGCCGGTGGACGCGAGATTCCCACCTAGAGTCCCGA AGTCCTTCCCATTCAACACCTCCGTGGTCTACAAAAAGACCCTGTTCGTGGAGTTCACTGACCACCT TTTCAATATTGCCAAGCCGCGCCCCCCCTGGATGGGCCTGCTTGGTCCTACGATCCAAGCAGAGGTC TACGACACCGTGGTCATCACACTGAAGAACATGGCCTCACACCCCGTGTCGCTGCATGCTGTGGGAG TGTCCTACTGGAAGGCCTCAGAGGGTGCCGAATATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAAAAGGAGGA TGACAAAGTGTTCCCGGGTGGCAGCCACACTTACGTGTGGCAAGTGCTGAAGGAAAACGGGCCTATG GCGTCGGACCCCCTATGCCTGACCTACTCCTACCTGTCCCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTCAACT CGGGACTGATCGGCGCCCTCTTGGTGTGCAGAGAAGGCAGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCAGACCCT GCACAAGTTCATTCTGTTGTTTGCTGTGTTCGATGAAGGAAAGTCCTGGCACTCAGAAACCAAGAAC TCGCTGATGCAGGATAGAGATGCGGCCTCGGCCAGAGCCTGGCCTAAAATGCACACCGTCAACGGAT ATGTGAACAGGTCGCTCCCTGGCCTCATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTATTGGCATGTGATCGG CATGGGTACTACTCCGGAAGTGCATAGTATCTTTCTGGAGGGCCATACCTTCTTGGTGCGCAACCAC AGACAGGCCTCGCTGGAAATCTCGCCTATCACTTTCTTGACTGCGCAGACCCTCCTTATGGACCTTG GACAGTTCCTGCTGTTCTGTCACATCAGCTCCCATCAGCATGATGGGATGGAGGCCTATGTCAAAGT GGACTCCTGCCCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAAGAACAATGAGGAAGCGGAGGATTACGACGAC GACCTGACTGACAGCGAAATGGACGTCGTGCGATTCGATGACGACAACAGCCCGTCCTTCATCCAAA TTAGATCAGTGGCGAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCCGCCGAGGAAGAGGACTG GGACTACGCGCCGCTGGTGCTGGCGCCAGACGACAGGAGCTACAAGTCCCAGTACCTCAACAACGGG CCGCAGCGCATTGGCAGGAAGTACAAGAAAGTCCGCTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGA CGAGGGAAGCCATCCAGCACGAGTCAGGCATCCTGGGACCGCTCCTTTACGGCGAAGTCGGGGATAC CCTGCTCATCATTTTCAAGAACCAGGCATCGCGGCCCTACAACATCTACCCTCACGGGATCACAGAC GTGCGCCCGCTCTACTCCCGCCGGCTGCCCAAGGGAGTGAAGCACCTGAAGGATTTTCCCATCCTGC CGGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACTGTGGAAGATGGCCCTACCAAGTCGGACCCTCG CTGTCTGACCCGGTACTATTCCTCGTTTGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCTCGGGGCTGATTGGT CCGCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCCGTGGACCAGCGCGGGAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCA ACGTGATCCTGTTCTCTGTCTTTGATGAAAACAGATCGTGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTT CCTGCCCAACCCAGCGGGAGTGCAACTGGAGGACCCGGAGTTCCAGGCCTCAAACATTATGCACTCT ATCAACGGCTATGTGTTCGACTCGCTCCAACTGAGCGTGTGCCTGCATGAAGTGGCATACTGGTACA TTCTGTCCATCGGAGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGATACACCTTCAAGCATAA GATGGTGTACGAGGACACTCTGACCCTCTTCCCATTTTCCGGAGAAACTGTGTTCATGTCAATGGAA AACCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATAACTCGGACTTCCGGAATAGAGGGATGACCGCCCTGC TGAAAGTGTCCAGCTGTGACAAGAATACCGGCGATTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGC TTATCTGCTGTCCAAGAACAACGCCATTGAACCCAGGTCCTTCTCCCAAAACGGTGCACCGACCTCC GAAAGCGCCACCCCAGAGTCAGGACCTGGCTCGGAACCGGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGA CTTCCGAGTCCGCAACCCCCGAGAGTGGACCCGGATCCGAACCAGCAACCTCAGGATCAGAAACCCC

【表１－９】

	GGGAACTTCGGAATCCGCCACTCCCGAGTCGGGACCAGGCACCTCCACTGAGCCTTCCGAGGGAAGC GCCCCCGGATCCCCTGCTGGATCCCCTACCAGCACTGAAGAAGGCACCTCAGAATCCGCGACCCCCTG AGTCCGGCCCTGGAAGCGAACCCGCCACCTCCGGTTCCGAAACCCCTGGGACTAGCGAGAGCGCCAC TCCGGAATCGGGCCCAGGAAGCCCTGCCGGATCCCCGACCAGCACCGAGGAGGGAAGCCCCGCCGGG TCACCGACTTCCACTGAGGAGGGAGCCTCATCCCCCCCCCGTGCTGAAGCGGCATCAAAGAGAGATCA CCAGGACCACTCTCCAGTCCGATCAGGAAGAAATTGACTACGACGATACTATCAGCGTGGAGATGAA GAAGGAGGACTTCGACATCTACGATGAGGATGAGAACCAGTCCCCTCGGAGCTTTCAGAAGAAAACC CGCCACTACTTCATCGCTGCCGTGGAGCGGCTGTGGGATTACGGGATGTCCAGCTCACCGCATGTGC TGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTCGTGTTCCAAGAGTTCACCGA CGGGTCCTTCACTCAACCCCTGTACCGGGGCGAACTCAACGAACACCTGGGACTGCTTGGGCCGTAT ATCAGGGCAGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGCAACCAGGCCTCCCGGCCGTACAGCT TCTACTCTTCACTGATCTCCTACGAGGAAGATCAGCGGCAGGGAGCCGAGCCCCGGAAGAACTTCGT CAAGCCTAACGAAACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTCCAGCATCACATGGCCCCGACCAAAGACGAG TTCGACTGTAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAGAAGGACGTGCACTCGGGACTCA TTGGCCCGCTCCTTGTGTGCCATACTAATACCCTGAACCCTGCTCACGGTCGCCAAGTCACAGTGCA GGAGTTCGCCCTCTTCTTCACCATCTTCGATGAAACAAAGTCCTGGTACTTTACTGAGAACATGGAA CGCAATTGCAGGGCACCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAGGAAAACTACCGGTTTC ATGCCATTAACGGCTACATAATGGACACGTTGCCAGGACTGGTCATGGCCCAGGACCAGAGAATCCG GTGGTATCTGCTCTCCATGGGCTCCAACGAAAACATTCACAGCATTCATTTTTCCGGCCATGTGTTC ACCGTCCGGAAGAAGGAAGAGTACAAGATGGCTCTGTACAACCTCTACCCTGGAGTGTTCGAGACTG TGGAAATGCTGCCTAGCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGCCTGATCGGAGAGCATTTGCACGC CGGAATGTCCACCCTGTTTCTTGTGTACTCCAACAAGTGCCAGACCCCGCTGGGAATGGCCTCAGGT CATATTAGGGATTTCCAGATCACTGCTTCGGGGCAGTACGGGCAGTGGGCACCTAAGTTGGCCCGGC TGCACTACTCTGGCTCCATCAATGCCTGGTCCACCAAGGAACCCTTCTCCTGGATTAAGGTGGACCT CCTGGCCCCAATGATTATTCACGGTATTAAGACCCAGGGTGCCCGACAGAAGTTCTCCTCACTCTAC ATCTCGCAATTCATCATAATGTACAGCCTGGATGGGAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGAAACTCCA CTGGAACGCTCATGGTGTTTTTCGGCAACGTGGACTCCTCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCC TCCGATCATTGCTCGGTACATCCGGCTGCACCCAACTCACTACAGCATCCGGTCCACCCTGCGGATG GAACTGATGGGTTGTGACCTGAACTCCTGCTCCATGCCCCTTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCG ATGCACAGATCACCGCCTCTTCATACTTCACCAACATGTTCGCGACCTGGTCCCCGTCGAAGGCCCG CCTGCACCTCCAAGGTCGCTCCAATGCGTGGCGGCCTCAAGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTCCAG GTCGACTTCCAAAAGACCATGAAGGTCACCGGAGTGACCACCCAGGGCGTGAAGTCCCTGCTGACCT CTATGTACGTTAAGGAGTTCCTCATCTCCTCAAGCCAAGACGGACATCAGTGGACCCTGTTCTTCCA AAACGGAAAAGTCAAAGTATTCCAGGGCAACCAGGACTCCTTCACCCCTGTGGTCAACAGCCTGGAC CCCCCATTGCTGACCCGCTACCTCCGCATCCACCCCCAAAGCTGGGTCCACCAGATCGCACTGCGCA TGGAGGTCCTTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACTAAGCGGCCGCTCATAATCAACCTCTGGATTA CAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCT GCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAAT CCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGT GTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTC GCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGG CTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCT CGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCA GCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCTGCCTAGGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG CCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTT CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAAGACCATGGGCGC GCCAGGCCTGTCGACGCCCGGGCGGTACCGCGATCGCTCGCGACGCATAAAG
配列番号 15 A1MB2 エンハンサー	GGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAGGTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCT ATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCT GGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAG GTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAA CATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACC
配列番号 16 mTTR プロモーター	GATATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTCGGGGCAAAGGTC GGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCTGCACATTT CGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATT CTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCA GCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAG CTCCTGCTAG

【表１－１０】

配列番号 17 キメラインイントロン	TCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTC TCCCCACCGATATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTCGGGG CAAAGGTCGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCT GCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTATTGACTTAGGT TACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGG GATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGA TCCACAAGCTCCTGCTAGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCG CGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTATTGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCT TGAGGGGCTCCGGGAAGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGC TTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGG CTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCG TCGGTCGGGCTGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTG CGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGT GCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGC GCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGC AGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAG CGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG CCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGG GGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCT TGTTCTTGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCAT TTTGGCAAAGAATTA
配列番号 18 WPRE	TCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCT TTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCA TTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCA ACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGT CAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATC ATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC GTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTC CGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCTG
配列番号 19 bGHpA	CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA AGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT CATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC ATGCTGGGGA
配列番号 20 野生型ヒト成熟 FVIII タンパク質のアミノ酸配列	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI EPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLS LSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATEL KKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSL SEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSN NSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSK NMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVE GQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQ ENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGE EENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQW SKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRV LFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKK VENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRP

【表１－１１】

	GKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNH AIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKE DFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEF ALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWY LLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGM STLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLA PMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLH LQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNG KVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
配列番号 21 B19 WT 5'側	CCAAATCAGATGCCGCCGGTCGCCGCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAAGATGGCGGACAATTACG TCATTTCCTGTGACGTCATTTCCTGTGACGTCACTTCCGGTGGGCGGGACTTCCGGAATTAGGGTTG GCTCTGGGCCAGCTTGCTTGGGGTTGCCTTGACACTAAGACAAGCGGCGCGCCGCTTGATCTTAGTG GCACGTCAACCCCAAGCGCTGGCCCAGAGCCAACCCTAATTCCGGAAGTCCCGCCCACCGGAAGTGA CGTCACAGGAAATGACGTCACAGGAAATGACGTAATTGTCCGCCATCTTGTACCGGAAGTCCCGCCT ACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTTGGTGTCTTCTTTTAAATTTT
配列番号 22 B19 WT 3'側	AAAATTTAAAAGAAGACACCAAATCAGATGCCGCCGGTCGCCGCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACA AGATGGCGGACAATTACGTCATTTCCTGTGACGTCATTTCCTGTGACGTCACTTCCGGTGGGCGGGA CTTCCGGAATTAGGGTTGGCTCTGGGCCAGCGCTTGGGGTTGACGTGCCACTAAGATCAAGCGGCGC GCCGCTTGTCTTAGTGTCAAGGCAACCCCAAGCAAGCTGGCCCAGAGCCAACCCTAATTCCGGAAGT CCCGCCCACCGGAAGTGACGTCACAGGAAATGACGTCACAGGAAATGACGTAATTGTCCGCCATCTT GTACCGGAAGTCCCGCCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTTGG
配列番号 23 5'_B19_minimal	CCAAATCAGATGCCGCCGGTCGCCGCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAGCGCGCCGCTGTACCGGA AGTCCCGCCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTTGGTGTCTTCTTTTAAATTTT
配列番号 24 3'_B19_minimal	AAAATTTAAAAGAAGACACCAAATCAGATGCCGCCGGTCGCCGCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACA GCGGCGCGCTGTACCGGAAGTCCCGCCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTTGG
配列番号 25 5'_GPV_minimal	CTCATTGGAGGGTTCGTTCGTTCGAACGTTCGTTCGCATGCGAACGAACGTTCGAACGAACGAACCC TCCAATGAGACTCAAGGACAAGAGGATATTTTGCGCGCCAGGAAGTG
配列番号 26 3'_GPV_minimal	CACTTCCTGGCGCGCAAAATATCCTCTTGTCCTTGAGTCTCATTGGAGGGTTCGTTCGTTCGAACGT TCGTTCGCATGCGAACGAACGTTCGAACGAACGAACCCTCCAATGAG
配列番号 27 5'_GPV_Δ186	CTCATTGGAGGGTTCGTTCGTTCGAACCAGCCAATCAGGGGAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCCGGTC ACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCGCATGCCTGTCTATCGCCTACCCATCCCTG TCTGAGATCAAGGGCGTGATCGTGCACAGACTGGAGAGCGTGTCCTATAATATCGGCTCTCAGGAGT GGAGCACCACAGTGCCCAGATACGTGGCCACCCAGGGCTATCTGATCTCCAACTTCGACGCATGCGA ACTACGTCACCGGATGTGCGTCACCGGAAGCATGTGACCGGAACTTGCGTCACTTCCCCCTCCCCTG ATTGGCTGGTTCGAACGAACGAACCCTCCAATGAGACTCAAGGACAAGAGGATATTTTGCGCGCCAG GAAGTG
配列番号 28 3'_GPV_Δ186	CACTTCCTGGCGCGCAAAATATCCTCTTGTCCTTGAGTCTCATTGGAGGGTTCGTTCGTTCGAACCA GCCAATCAGGGGAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCCGGTCACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGA CGTAGTTCGCATGCCTGTCTATCGCCTACCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATCGTGCACAG ACTGGAGAGCGTGTCCTATAATATCGGCTCTCAGGAGTGGAGCACCACAGTGCCCAGATACGTGGCC ACCCAGGGCTATCTGATCTCCAACTTCGACGCATGCGAACTACGTCACCGGATGTGCGTCACCGGAA

【表１－１２】

	GCATGTGACCGGAACTTGCGTCACTTCCCCCTCCCCTGATTGGCTGGTTCGAACGAACGAACCCTCC AATGAG
配列番号 29 5'_GPV_Δ 120	CTCATTGGAGGGTTCGTTCGTTCGAACCAGCCAATCAGGGGAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCCGGTC ACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCCGGTCACGTGCTTCCTGTCACGTGTTTCCG GTCGCATGCCTGTCTATCGCCTACCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATCGTGCACAGACTGG AGAGCGTGTCCTATAATATCGGCTCTCAGGAGTGGAGCACCACAGTGCCCAGATACGTGGCCACCCA GGGCTATCTGATCTCCAACTTCGACGCATGCTCACGTGACCGGAAACACGTGACAGGAAGCACGTGA CCGGAACTACGTCACCGGATGTGCGTCACCGGAAGCATGTGACCGGAACTTGCGTCACTTCCCCCTC CCCTGATTGGCTGGTTCGAACGAACGAACCCTCCAATGAGACTCAAGGACAAGAGGATATTTTGCGC GCCAGGAAGTG
配列番号 30 3'_GPV_Δ 120	CACTTCCTGGCGCGCAAAATATCCTCTTGTCCTTGAGTCTCATTGGAGGGTTCGTTCGTTCGAACCA GCCAATCAGGGGAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCCGGTCACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGA CGTAGTTCCGGTCACGTGCTTCCTGTCACGTGTTTCCGGTCACGTGAGCATGCCTGTCTATCGCCTA CCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATCGTGCACAGACTGGAGAGCGTGTCCTATAATATCGGC TCTCAGGAGTGGAGCACCACAGTGCCCAGATACGTGGCCACCCAGGGCTATCTGATCTCCAACTTCG ACGGCATGCGACCGGAAACACGTGACAGGAAGCACGTGACCGGAACTACGTCACCGGATGTGCGTCA CCGGAAGCATGTGACCGGAACTTGCGTCACTTCCCCCTCCCCTGATTGGCTGGTTCGAACGAACGAA CCCTCCAATGAG
配列番号 31 野生型ヒト FVIII の核酸配列	ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAA GATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGT GGACGCAAGATTTCCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAG ACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTC TGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTC CCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGAT GATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCT GGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTTTC TCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGG AGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTGATGAAG GGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGC CTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCAC AGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAGTGCACTCAATATTCCTCG AAGGTCACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTTCCT TACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTTCCCACCAA CATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAA ATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGA TGATGACAACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACTTGGGTA CATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCCGATGACAGAA GTTATAAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAAGTCCGATT TATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGA CCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCAT ATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTATTCAAGGAGATTACCAAAAGGTGT AAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGACTGTA GAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGG AGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAG AGGAAACCAGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGC TGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAG AGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGT TTGTTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTC TTCTTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCTATTCCCATTCT CAGGAGAAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACTCAGA CTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTAT TACGAGGACAGTTATGAAGATATTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAA GCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCCTAGCACTAGGCAAAAGCAATTTAATGCCACCACAATTCCAGA AAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTGGTTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTC TCCTCTAGTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTATCCTTATCTGATC TCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGATCCATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAG CCTGTCTGAAATGACACACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCCTGAG TCAGGCCTCCAATTAAGATTAAATGAGAAACTGGGGACAACTGCAGCAACAGAGTTGAAGAAACTTG ATTTCAAAGTTTCTAGTACATCAAATAATCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGG

【表１－１３】

	TACTGATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGATAGTCAATTAGATACC ACTCTATTTGGCAAAAAGTCATCTCCCCTTACTGAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAA ATAATGATTCAAAGTTGTTAGAATCAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAAAAAATGT ATCGTCAACAGAGAGTGGTAGGTTATTTAAAGGGAAAAGAGCTCATGGACCTGCTTTGTTGACTAAA GATAATGCCTTATTCAAAGTTAGCATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAAACTTCCAATAATTCAGCAA CTAATAGAAAGACTCACATTGATGGCCCATCATTATTAATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAA TATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAAAAGTGACACCTTTGATTCATGACAGAATGCTTATGGAC AAAAATGCTACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTCATCAAAAAACATGGAAA TGGTCCAACAGAAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCAGATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTTAA GATGCTATTCTTGCCAGAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAAGAACTCTCTGAACTCT GGGCAAGGCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAGAAAAATCTGTGGAAGGTCAGAATT TCTTGTCTGAGAAAAACAAAGTGGTAGTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGA GATGGTTTTTCCAAGCAGCAGAAACCTATTTCTTACTAACTTGGATAATTTACATGAAAATAATACA CACAATCAAGAAAAAAAAATTCAGGAAGAAATAGAAAAGAAGGAAACATTAATCCAAGAGAATGTAG TTTTGCCTCAGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTTCATGAAGAACCTTTTCTTACTGAGCAC TAGGCAAAATGTAGAAGGTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATTA AATGATTCAACAAATAGAACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAAGGGGAGGAAGAAAACT TGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCACCACAAGGATATCTCC TAATACAAGCCAGCAGAATTTTGTCACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCA CTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAACCCAGTGGTCCAAAAACA TGAAACATTTGACCCCGAGCACCCTCACACAGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTAC TCAGTCTCCCTTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGATCTCCATTA CCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTATATATCTGACCAGGGTCCTATTCCAAG ACAACTCTTCTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCA TTTCTTACAAGGAGCCAAAAAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACCTTGGAGATGACTGGTGAT CAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAGTGCCACAAATTCAGTCACATACAAGAAAGTTGAGAACA CTGTTCTCCCGAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAAAAGTTCACAT TTATCAGAAGGACCTATTCCCTACGGAAACTAGCAATGGGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGAA GGGAGCCTTCTTCAGGGAACAGAGGGAGCGATTAAGTGGAATGAAGCAAACAGACCTGGAAAAGTTC CCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAAGCTATTGGATCCTCTTGCTTG GGATAACCACTATGGTACTCAGATACCAAAAGAAGAGTGGAAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAA ACAGCTTTTAAGAAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAATCATGCAATAGCAG CAATAAATGAGGGACAAAATAAGCCCGAAATAGAAGTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAG GCTGTGCTCTCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTACTCTTCAG TCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACA TTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGC TGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAG AGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGC CCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGA AGATAATATCATGGTAACTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATT TCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCA AAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTG GGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTC TGCCACACTAACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTT TCACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAGAAACTGCAGGGCTCC CTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTAC ATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCA TGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTCATTTCAGTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAAGA GGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCC AAAGCTGGAATTTGGCGGGTGGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTT TTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTCAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCA GATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATTCCGGATCA ATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTA TTCACGGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCAT CATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCCACTGGAACCTTAATGGTC TTCTTTGGCAATGTGGATTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTTAACCCTCCAATTATTGCTCGAT ACATCCGTTTGCACCCAACTCATTATAGCATTCGCAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGA TTTAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCT TCATCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGA GGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGAC AATGAAAGTCACAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAG TTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGG TTTTTCAGGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCG CTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGC GAGGCACAGGACCTCTAC

10

20

30

40

50

【表１－１４】

配列番号 32 BDD-co6FVIII(V1.0)(XTENなし)をコードするヌクレオチド配列	GCCACTCGCCGGTACTACCTTGGAGCCGTGGAGCTTTCATGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCG AACTCCCCGTGGATGCCAGATTCCCCCCCCGCGTGCCAAAGTCCTTCCCCTTTAACACCTCCGTGGT GTACAAGAAAACCCTCTTTGTCGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATCGCCAAGCCGCGCCCACCT TGGATGGGCCTCCTGGGACCGACCATTCAAGCTGAAGTGTACGACACCGTGGTGATCACCCTGAAGA ACATGGCGTCCCACCCCGTGTCCCTGCATGCGGTCGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCCGAAGGAGC TGAGTACGACGACCAGACTAGCCAGCGGGAAAAGGAGGACGATAAAGTGTTCCCGGGCGGCTCGCAT ACTTACGTGTGGCAAGTCCTGAAGGAAAACGGACCTATGGCATCCGATCCTCTGTGCCTGACTTACT CCTACCTTTCCCATGTGGACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGTGCACTTCTCGTGTG CCGCGAAGGTTCGCTCGCTAAGGAAAAGACCCAGACCCTCCATAAGTTCATCCTTTTGTTCGCTGTG TTCGATGAAGGAAAGTCATGGCATTCCGAAACTAAGAACTCGCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCCT CAGCCCGCGCCTGGCCTAAAATGCATACAGTCAACGGATACGTGAATCGGTCACTGCCCGGGCTCAT CGGTTGTCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTCATCGGCATGGGCACTACGCCTGAAGTGCACTCC ATCTTCCTGGAAGGGCACACCTTCCTCGTGCGCAACCACCGCCAGGCCTCTCTGGAAATCTCCCCGA TTACCTTTCTGACCGCCCAGACTCTGCTCATGGACCTGGGGCAGTTCCTTCTCTTCTGCCACATCTC CAGCCATCAGCACGACGGAATGGAGGCCTACGTGAAGGTGGACTCATGCCCGGAAGAACCTCAGTTG CGGATGAAGAACAACGAGGAGGCCGAGGACTATGACGACGATTTGACTGACTCCGAGATGGACGTCG TGCGGTTCGATGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATTCGCAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAA AACCTGGGTGCACTACATCGCGGCCGAGGAAGAAGATTGGGACTACGCCCCGTTGGTGCTGGCACCC GATGACCGGTCGTACAAGTCCCAGTATCTGAACAATGGTCCGCAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGA AAGTGCGGTTCATGGCGTACACTGACGAAACGTTTAAGACCCGGGAGGCCATTCAACATGAGAGCGG CATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAGGTCGGCGATACCCTGCTCATCATCTTCAAAAACCAGGCC TCCCGGCCTTACAACATCTACCCTCACGGAATCACCGACGTGCGGCCACTCTACTCGCGGCGCCTGC CGAAGGGCGTCAAGCACCTGAAAGACTTCCCTATCCTGCCGGGCGAAATCTTCAAGTATAAGTGGAC CGTCACCGTGGAGGACGGGCCCACCAAGAGCGATCCTAGGTGTCTGACTCGGTACTACTCCAGCTTC GTGAACATGGAACGGGACCTGGCATCGGGACTCATTGGACCGCTGCTGATCTGCTACAAAGAGTCGG TGGATCAACGCGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCCGTGTTTGATGA AAACAGATCCTGGTACCTCACTGAAAACATCCAGAGGTTCCTCCCAAACCCCGCAGGAGTGCAACTG GAGGACCCTGAGTTTCAGGCCTCGAATATCATGCACTCGATTAACGGTTACGTGTTCGACTCGCTGC AGCTGAGCGTGTGCCTCCATGAAGTCGCTTACTGGTACATTCTGTCCATCGGCGCCCAGACTGACTT CCTGAGCGTGTTCTTTTCCGGTTACACCTTTAAGCACAAGATGGTGTACGAAGATACCCTGACCCTG TTCCCTTTCTCCGGCGAAACGGTGTTCATGTCGATGGAGAACCCGGGTCTGTGGATTCTGGGATGCC ACAACAGCGACTTTCGGAACCGCGGAATGACTGCCCTGCTGAAGGTGTCCTCATGCGACAAGAACAC CGGAGACTACTACGAGGACTCCTACGAGGATATCTCAGCCTACCTCCTGTCCAAGAACAACGCGATC GAGCCGCGCAGCTTCAGCCAGAACCCGCCTGTGCTGAAGAGGCACCAGCGAGAAATTACCCGGACCA CCCTCCAATCGGATCAGGAGGAAATCGACTACGACGACACCATCTCGGTGGAAATGAAGAAGGAAGA TTTCGATATCTACGACGAGGACGAAAATCAGTCCCCTCGCTCATTCCAAAAGAAAACTAGACACTAC TTTATCGCCGCGGTGGAAAGACTGTGGGACTATGGAATGTCATCCAGCCCTCACGTCCTTCGGAACC GGGCCCAGAGCGGATCGGTGCCTCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTT CACCCAGCCGCTGTACCGGGGAGAACTGAACGAACACCTGGGCCTGCTCGGTCCCTACATCCGCGCG GAAGTGGAGGATAACATCATGGTGACCTTCCGTAACCAAGCATCCAGACCTTACTCCTTCTATTCCT CCCTGATCTCATACGAGGAGGACCAGCGCCAAGGCGCCGAGCCCCGCAAGAACTTCGTCAAGCCCAA CGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGGTCCAACACCATATGGCCCCGACCAAGGATGAGTTTGACTGC AAGGCCTGGGCCTACTTCTCCGACGTGGACCTTGAGAAGGATGTCCATTCCGGCCTGATCGGGCCGC TGCTCGTGTGTCACACCAACACCCTGAACCCAGCGCATGGACGCCAGGTCACCGTCCAGGAGTTTGC TCTGTTCTTCACCATTTTTGACGAAACTAAGTCCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAGCGAAACTGT AGAGCGCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCGACTTTCAAGGAGAACTATAGATTCCACGCCATCA ACGGGTACATCATGGATACTCTGCCGGGGCTGGTCATGGCCCAGGATCAGAGGATTCGGTGGTACTT GCTGTCAATGGGATCGAACGAAAACATTCACTCCATTCACTTCTCCGGTCACGTGTTCACTGTGCGC AAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCGCTGTACAATCTGTACCCCGGGGTGTTCGAAACTGTGGAGATGC TGCCGTCCAAGGCCGGCATCTGGAGAGTGGAGTGCCTGATCGGAGAGCACCTCCACGCGGGGATGTC CACCCTCTTCCTGGTGTACTCGAATAAGTGCCAGACCCCGCTGGGCATGGCCTCGGGCCACATCAGA GACTTCCAGATCACAGCAAGCGGACAATACGGCCAATGGGCGCCGAAGCTGGCCCGCTTGCACTACT CCGGATCGATCAACGCATGGTCCACCAAGGAACCGTTCTCGTGGATTAAGGTGGACCTCCTGGCCCC TATGATTATCCACGGAATTAAGACCCAGGGCGCCAGGCAGAAGTTCTCCTCCCTGTACATCTCGCAA TTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGGAAGAAGTGGCAGACTTACAGGGGAAACTCCACCGGCACCC TGATGGTCTTTTTCGGCAACGTGGATTCCTCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCACCGATCAT AGCCAGATATATTAGGCTCCACCCCACTCACTACTCAATCCGCTCAACTCTTCGGATGGAACTCATG GGGTGCGACCTGAACTCCTGCTCCATGCCGTTGGGGATGGAATCAAAGGCTATTAGCGACGCCCAGA TCACCGCGAGCTCCTACTTCACTAACATGTTCGCCACCTGGAGCCCCTCCAAGGCCAGGCTGCACTT GCAGGGACGGTCAAATGCCTGGCGGCCGCAAGTGAACAATCCGAAGGAATGGCTTCAAGTGGATTTC CAAAAGACCATGAAAGTGACCGGAGTCACCACCCAGGGAGTGAAGTCCCTTCTGACCTCGATGTATG TGAAGGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCCAGGACGGGCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAA GGTCAAGGTGTTCCAGGGGAACCAGGACTCGTTCACACCCGTGGTGAACTCCCTGGACCCCCCACTG

【表１－１５】

	CTGACGCGGTACTTGAGGATTCATCCTCAGTCCTGGGTCCATCAGATTGCATTGCGAATGGAAGTCC TGGGCTGCGAGGCCCAGGACCTGTACTGA
配列番号 33 coBDDFVIII (V2.0)(XTE N なし)を コードする ヌクレオチ ド配列	GCCACCCGCCGGTATTACTTAGGTGCTGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCCGACCTGGGAG AACTGCCGGTGGACGCGAGATTCCCACCTAGAGTCCCGAAGTCCTTCCCATTCAACACCTCCGTGGT CTACAAAAAGACCCTGTTCGTGGAGTTCACTGACCACCTTTTCAATATTGCCAAGCCGCGCCCCCCC TGGATGGGCCTGCTTGGTCCTACGATCCAAGCAGAGGTCTACGACACCGTGGTCATCACACTGAAGA ACATGGCCTCACACCCCGTGTCGCTGCATGCTGTGGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCAGAGGGTGC CGAATATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAAAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCCGGGTGGCAGCCAC ACTTACGTGTGGCAAGTGCTGAAGGAAAACGGGCCTATGGCGTCGGACCCCCTATGCCTGACCTACT CCTACCTGTCCCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTCAACTCGGGACTGATCGGCGCCCTCTTGGTGTG CAGAGAAGGCAGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTGTTGTTTGCTGTG TTCGATGAAGGAAAGTCCTGGCACTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGCAGGATAGAGATGCGGCCT CGGCCAGAGCCTGGCCTAAAATGCACACCGTCAACGGATATGTGAACAGGTCGCTCCCTGGCCTCAT CGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTATTGGCATGTGATCGGCATGGGTACTACTCCGGAAGTGCATAGT ATCTTTCTGGAGGGCCATACCTTCTTGGTGCGCAACCACAGACAGGCCTCGCTGGAAATCTCGCCTA TCACTTTCTTGACTGCGCAGACCCTCCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGCTGTTCTGTCACATCAG CTCCCATCAGCATGATGGGATGGAGGCCTATGTCAAAGTGGACTCCTGCCCTGAGGAGCCACAGCTC CGGATGAAGAACAATGAGGAAGCGGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGACGTCG TGCGATTCGATGACGACAACAGCCCGTCCTTCATCCAAATTAGATCAGTGGCGAAGAAGCACCCCAA GACCTGGGTGCACTACATTGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCGCCGCTGGTGCTGGCGCCA GACGACAGGAGCTACAAGTCCCAGTACCTCAACAACGGGCCGCAGCGCATTGGCAGGAAGTACAAGA AAGTCCGCTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCCAGCACGAGTCAGG CATCCTGGGACCGCTCCTTTACGGCGAAGTCGGGGATACCCTGCTCATCATTTTCAAGAACCAGGCA TCGCGGCCCTACAACATCTACCCTCACGGGATCACAGACGTGCGCCCGCTCTACTCCCGCCGGCTGC CCAAGGGAGTGAAGCACCTGAAGGATTTTCCCATCCTGCCGGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGAC CGTGACTGTGGAAGATGGCCCTACCAAGTCGGACCCTCGCTGTCTGACCCGGTACTATTCCTCGTTT GTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCTCGGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCCG TGGACCAGCGCGGGAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCTGTCTTTGATGA AAACAGATCGTGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTTCCTGCCCAACCCAGCGGGAGTGCAACTG GAGGACCCGGAGTTCCAGGCCTCAAACATTATGCACTCTATCAACGGCTATGTGTTCGACTCGCTCC AACTGAGCGTGTGCCTGCATGAAGTGGCATACTGGTACATTCTGTCCATCGGAGCCCAGACCGACTT CCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGATACACCTTCAAGCATAAGATGGTGTACGAGGACACTCTGACCCTC TTCCCATTTTCCGGAGAAACTGTGTTCATGTCAATGGAAAACCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCC ATAACTCGGACTTCCGGAATAGAGGGATGACCGCCCTGCTGAAAGTGTCCAGCTGTGACAAGAATAC CGGCGATTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCTTATCTGCTGTCCAAGAACAACGCCATT GAACCCAGGTCCTTCTCCCAAAACGGTGCACCGGCCTCATCCCCCCCCCGTGCTGAAGCGGCATCAAA GAGAGATCACCAGGACCACTCTCCAGTCCGATCAGGAAGAAATTGACTACGACGATACTATCAGCGT GGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGATGAGGATGAGAACCAGTCCCCTCGGAGCTTTCAG AAGAAAACCCGCCACTACTTCATCGCTGCCGTGGAGCGGCTGTGGGATTACGGGATGTCCAGCTCAC CGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTCGTGTTCCAAGA GTTCACCGACGGGTCCTTCACTCAACCCCTGTACCGGGGCGAACTCAACGAACACCTGGGACTGCTT GGGCCGTATATCAGGGCAGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGCAACCAGGCCTCCCGGC CGTACAGCTTCTACTCTTCACTGATCTCCTACGAGGAAGATCAGCGGCAGGGAGCCGAGCCCCGGAA GAACTTCGTCAAGCCTAACGAAACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTCCAGCATCACATGGCCCCGACC AAAGACGAGTTCGACTGTAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAGAAGGACGTGCACT CGGGACTCATTGGCCCGCTCCTTGTGTGCCATACTAATACCCTGAACCCTGCTCACGGTCGCCAAGT CACAGTGCAGGAGTTCGCCCTCTTCTTCACCATCTTCGATGAAACAAAGTCCTGGTACTTTACTGAG AACATGGAACGCAATTGCAGGGCACCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAGGAAAACT ACCGGTTTCATGCCATTAACGGCTACATAATGGACACGTTGCCAGGACTGGTCATGGCCCAGGACCA GAGAATCCGGTGGTATCTGCTCTCCATGGGCTCCAACGAAAACATTCACAGCATTCATTTTTCCGGC CATGTGTTCACCGTCCGGAAGAAGGAAGAGTACAAGATGGCTCTGTACAACCTCTACCCTGGAGTGT TCGAGACTGTGGAAATGCTGCCTAGCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGCCTGATCGGAGAGCA TTTGCACGCCGGAATGTCCACCCTGTTTCTTGTGTACTCCAACAAGTGCCAGACCCCGCTGGGAATG GCCTCAGGTCATATTAGGGATTTCCAGATCACTGCTTCGGGGCAGTACGGGCAGTGGGCACCTAAGT TGGCCCGGCTGCACTACTCTGGCTCCATCAATGCCTGGTCCACCAAGGAACCCTTCTCCTGGATTAA GGTGGACCTCCTGGCCCCAATGATTATTCACGGTATTAAGACCCAGGGTGCCCGACAGAAGTTCTCC TCACTCTACATCTCGCAATTCATCATAATGTACAGCCTGGATGGGAAGAAGTGGCAGACCTACCGGG GAAACTCCACTGGAACGCTCATGGTGTTTTTCGGCAACGTGGACTCCTCCGGCATTAAGCACAACAT CTTCAACCCTCCGATCATTGCTCGGTACATCCGGCTGCACCCAACTCACTACAGCATCCGGTCCACC CTGCGGATGGAACTGATGGGTTGTGACCTGAACTCCTGCTCCATGCCCCTTGGGATGGAATCCAAGG CCATTAGCGATGCACAGATCACCGCCTCTTCATACTTCACCAACATGTTCGCGACCTGGTCCCCGTC GAAGGCCCGCCTGCACCTCCAAGGTCGCTCCAATGCGTGGCGGCCTCAAGTGAACAACCCCAAGGAG TGGCTCCAGGTCGACTTCCAAAAGACCATGAAGGTCACCGGAGTGACCACCCAGGGCGTGAAGTCCC TGCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAGTTCCTCATCTCCTCAAGCCAAGACGGACATCAGTGGACCCT

10 20 30 40 50

【表１－１６】

	GTTCTTCCAAAACGGAAAAGTCAAAGTATTCCAGGGCAACCAGGACTCCTTCACCCCTGTGGTCAAC AGCCTGGACCCCCCATTGCTGACCCGCTACCTCCGCATCCACCCCCAAAGCTGGGTCCACCAGATCG CACTGCGCATGGAGGTCCTTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACTAA
配列番号 34 V1.0 発現カセット TTP-イントロン-BDDFVIIIco6XTEN(V1.0)-WPRE-bGH ポリ A	ATGCAGATTGAGCTGTCCACTTGTTTCTTCCTGTGCCTCCTGCGCTTCTGTTTCTCCGCCACTCGCC GGTACTACCTTGGAGCCGTGGAGCTTTCATGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAACTCCCCGT GGATGCCAGATTCCCCCCCCGCGTGCCAAAGTCCTTCCCCTTTAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAA ACCCTCTTTGTCGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATCGCCAAGCCGCGCCCACCTTGGATGGGCC TCCTGGGACCGACCATTCAAGCTGAAGTGTACGACACCGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCGTC CCACCCCGTGTCCCTGCATGCGGTCGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCCGAAGGAGCTGAGTACGAC GACCAGACTAGCCAGCGGGAAAAGGAGGACGATAAAGTGTTCCCGGGCGGCTCGCATACTTACGTGT GGCAAGTCCTGAAGGAAAACGGACCTATGGCATCCGATCCTCTGTGCCTGACTTACTCCTACCTTTC CCATGTGGACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGTGCACTTCTCGTGTGCCGCGAAGGT TCGCTCGCTAAGGAAAAGACCCAGACCCTCCATAAGTTCATCCTTTTGTTCGCTGTGTTCGATGAAG GAAAGTCATGGCATTCCGAAACTAAGAACTCGCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCCTCAGCCCGCGC CTGGCCTAAAATGCATACAGTCAACGGATACGTGAATCGGTCACTGCCCGGGCTCATCGGTTGTCAC AGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTCATCGGCATGGGCACTACGCCTGAAGTGCACTCCATCTTCCTGG AAGGGCACACCTTCCTCGTGCGCAACCACCGCCAGGCCTCTCTGGAAATCTCCCCGATTACCTTTCT GACCGCCCAGACTCTGCTCATGGACCTGGGGCAGTTCCTTCTCTTCTGCCACATCTCCAGCCATCAG CACGACGGAATGGAGGCCTACGTGAAGGTGGACTCATGCCCGGAAGAACCTCAGTTGCGGATGAAGA ACAACGAGGAGGCCGAGGACTATGACGACGATTTGACTGACTCCGAGATGGACGTCGTGCGGTTCGA TGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATTCGCAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAAACCTGGGTG CACTACATCGCGGCCGAGGAAGAAGATTGGGACTACGCCCCGTTGGTGCTGGCACCCGATGACCGGT CGTACAAGTCCCAGTATCTGAACAATGGTCCGCAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGCGGTT CATGGCGTACACTGACGAAACGTTTAAGACCCGGGAGGCCATTCAACATGAGAGCGGCATTCTGGGA CCACTGCTGTACGGAGAGGTCGGCGATACCCTGCTCATCATCTTCAAAAACCAGGCCTCCCGGCCTT ACAACATCTACCCTCACGGAATCACCGACGTGCGGCCACTCTACTCGCGGCGCCTGCCGAAGGGCGT CAAGCACCTGAAAGACTTCCCTATCCTGCCGGGCGAAATCTTCAAGTATAAGTGGACCGTCACCGTG GAGGACGGGCCCACCAAGAGCGATCCTAGGTGTCTGACTCGGTACTACTCCAGCTTCGTGAACATGG AACGGGACCTGGCATCGGGACTCATTGGACCGCTGCTGATCTGCTACAAAGAGTCGGTGGATCAACG CGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCCGTGTTTGATGAAAACAGATCC TGGTACCTCACTGAAAACATCCAGAGGTTCCTCCCAAACCCCGCAGGAGTGCAACTGGAGGACCCTG AGTTTCAGGCCTCGAATATCATGCACTCGATTAACGGTTACGTGTTCGACTCGCTGCAACTGAGCGT GTGCCTCCATGAAGTCGCTTACTGGTACATTCTGTCCATCGGCGCCCAGACTGACTTCCTGAGCGTG TTCTTTTCCGGTTACACCTTTAAGCACAAGATGGTGTACGAAGATACCCTGACCCTGTTCCCTTTCT CCGGCGAAACGGTGTTCATGTCGATGGAGAACCCGGGTCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACAGCGA CTTTCGGAACCGCGGAATGACTGCCCTGCTGAAGGTGTCCTCATGCGACAAGAACACCGGAGACTAC TACGAGGACTCCTACGAGGATATCTCAGCCTACCTCCTGTCCAAGAACAACGCGATCGAGCCGCGCA GCTTCAGCCAGAACGGCGCGCCAACATCAGAGAGCGCCACCCCTGAAAGTGGTCCCGGGAGCGAGCC AGCCACATCTGGGTCGGAAACGCCAGGCACAAGTGAGTCTGCAACTCCCGAGTCCGGACCTGGCTCC GAGCCTGCCACTAGCGGCTCCGAGACTCCGGGAACTTCCGAGAGCGCTACACCAGAAAGCGGACCCG GAACCAGTACCGAACCTAGCGAGGGCTCTGCTCCGGGCAGCCCAGCCGGCTCTCCTACATCCACGGA GGAGGGCACTTCCGAATCCGCCACCCCGGAGTCAGGGCCAGGATCTGAACCCGCTACCTCAGGCAGT GAGACGCCAGGAACGAGCGAGTCCGCTACACCGGAGAGTGGGCCAGGGAGCCCTGCTGGATCTCCTA CGTCCACTGAGGAAGGGTCACCAGCGGGCTCGCCCACCAGCACTGAAGAAGGTGCCTCGAGCCCGCC TGTGCTGAAGAGGCACCAGCGAGAAATTACCCGGACCACCCTCCAATCGGATCAGGAGGAAATCGAC TACGACGACACCATCTCGGTGGAAATGAAGAAGGAAGATTTCGATATCTACGACGAGGACGAAAATC AGTCCCCTCGCTCATTCCAAAAGAAAACTAGACACTACTTTATCGCCGCGGTGGAAAGACTGTGGGA CTATGGAATGTCATCCAGCCCTCACGTCCTTCGGAACCGGGCCCAGAGCGGATCGGTGCCTCAGTTC AAGAAAGTGGTGTTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCGCTGTACCGGGGAGAACTGA ACGAACACCTGGGCCTGCTCGGTCCCTACATCCGCGCGGAAGTGGAGGATAACATCATGGTGACCTT CCGTAACCAAGCATCCAGACCTTACTCCTTCTATTCCTCCCTGATCTCATACGAGGAGGACCAGCGC CAAGGCGCCGAGCCCCGCAAGAACTTCGTCAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGGTCC AACACCATATGGCCCCGACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCCGACGTGGA CCTTGAGAAGGATGTCCATTCCGGCCTGATCGGGCCGCTGCTCGTGTGTCACACCAACACCCTGAAC CCAGCGCATGGACGCCAGGTCACCGTCCAGGAGTTTGCTCTGTTCTTCACCATTTTTGACGAAACTA AGTCCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAGCGAAACTGTAGAGCGCCCTGCAATATCCAGATGGAAGA TCCGACTTTCAAGGAGAACTATAGATTCCACGCCATCAACGGGTACATCATGGATACTCTGCCGGGG CTGGTCATGGCCCAGGATCAGAGGATTCGGTGGTACTTGCTGTCAATGGGATCGAACGAAAACATTC ACTCCATTCACTTCTCCGGTCACGTGTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCGCTGTA CAATCTGTACCCCGGGGTGTTCGAAACTGTGGAGATGCTGCCGTCCAAGGCCGGCATCTGGAGAGTG GAGTGCCTGATCGGAGAGCACCTCCACGCGGGGATGTCCACCCTCTTCCTGGTGTACTCGAATAAGT GCCAGACCCCGCTGGGCATGGCCTCGGGCCACATCAGAGACTTCCAGATCACAGCAAGCGGACAATA CGGCCAATGGGCGCCGAAGCTGGCCCGCTTGCACTACTCCGGATCGATCAACGCATGGTCCACCAAG GAACCGTTCTCGTGGATTAAGGTGGACCTCCTGGCCCCTATGATTATCCACGGAATTAAGACCCAGG

【表１－１７】

	GCGCCAGGCAGAAGTTCTCCTCCCTGTACATCTCGCAATTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGGAA GAAGTGGCAGACTTACAGGGGAAACTCCACCGGCACCCTGATGGTCTTTTTCGGCAACGTGGATTCC TCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCACCGATCATAGCCAGATATATTAGGCTCCACCCCACTC ACTACTCAATCCGCTCAACTCTTCGGATGGAACTCATGGGGTGCGACCTGAACTCCTGCTCCATGCC GTTGGGGATGGAATCAAAGGCTATTAGCGACGCCCAGATCACCGCGAGCTCCTACTTCACTAACATG TTCGCCACCTGGAGCCCCTCCAAGGCCAGGCTGCACTTGCAGGGACGGTCAAATGCCTGGCGGCCGC AAGTGAACAATCCGAAGGAATGGCTTCAAGTGGATTTCCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGAGTCAC CACCCAGGGAGTGAAGTCCCTTCTGACCTCGATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCCAG GACGGGCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAAGGTCAAGGTGTTCCAGGGGAACCAGGACT CGTTCACACCCGTGGTGAACTCCCTGGACCCCCCACTGCTGACGCGGTACTTGAGGATTCATCCTCA GTCCTGGGTCCATCAGATTGCATTGCGAATGGAAGTCCTGGGCTGCGAGGCCCAGGACCTGTACTGA
配列番号 35 V3.0 発現カセット ヒトコドン最適化 A1AT-イントロン-BDDFVIIIXTEN-WPRE-bGH ポリ A	ATCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACT CTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAA CATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAG TCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAG CACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCAC CTTCGAACTAGCCACTAGCCTGAGGCTGGTCAAAATTGAACCTCCTCCTGCTCTGAGCAGCCTGGGG GGCAGACTAAGCAGAGGGCTGTGCAGACCCACATAAAGAGCCTACTGTGTGCCAGGCACTTCACCCG AGGCACTTCACAAGCATGCTTGGGAATGAAACTTCCAACTCTTTGGGATGCAGGTGAAACAGTTCCT GGTTCAGAGAGGTGAAGCGGCCTGCCTGAGGCAGCACAGCTCTTCTTTACAGATGTGCTTCCCCACC TCTACCCTGTCTCACGGCCCCCCATGCCAGCCTGACGGTTGTGTCTGCCTCAGTCATGCTCCATTTT TCCATCGGGACCATCAAGAGGGTGTTTGTGTCTAAGGCTGACTGGGTAACTTTGGATGAGCGGTCTC TCCGCTCTGAGCCTGTTTCCTCATCTGTCAAATGGGCTCTAACCCACTCTGATCTCCCAGGGCGGCA GTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAGTAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAACA GCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGAC TCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTT CGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCA GATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTC ACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTC TCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGGAATTCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGG CAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCGATATCTACCTGCTGAT CGCCCGGCCCCTGTTCAAACATGTCCTAATACTCTGTCGGGGCAAAGGTCGGCAGTAGTTTTCCATC TTACTCAACATCCTCCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCC GATACTCTAATCTCCCGGGGCAAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAA GTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAG GGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGAGTCGCT GCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGT TTATTGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAAGGCCCTTTG TGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCG CGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGA GGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCCTGC ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGC GGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGG GCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGA GCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG TGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGC GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTC TCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG CTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCTTGTTCTTGCCTTCTTCTTTTTCCTA CAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTACTCGAGGCCA CCATGCAGATTGAACTGTCCACTTGCTTCTTCCTGTGCCTCCTGCGGTTTTGCTTCTCGGCCACCCG CCGGTATTACTTAGGTGCTGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCCGACCTGGGAGAACTGCCG GTGGACGCGAGATTCCCACCTAGAGTCCCGAAGTCCTTCCCATTCAACACCTCCGTGGTCTACAAAA AGACCCTGTTCGTGGAGTTCACTGACCACCTTTTCAATATTGCCAAGCCGCGCCCCCCCTGGATGGG CCTGCTTGGTCCTACGATCCAAGCAGAGGTCTACGACACCGTGGTCATCACACTGAAGAACATGGCC TCACACCCCGTGTCGCTGCATGCTGTGGGAGTGTCCTACTGGAAGGCCTCAGAGGGTGCCGAATATG ATGACCAGACCAGCCAGAGGGAAAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCCGGGTGGCAGCCACACTTACGT GTGGCAAGTGCTGAAGGAAAACGGGCCTATGGCGTCGGACCCCCTATGCCTGACCTACTCCTACCTG TCCCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTCAACTCGGGACTGATCGGCGCCCTCTTGGTGTGCAGAGAAG GCAGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCAGACCCTGCACAAGTTCATTCTGTTGTTTGCTGTGTTCGATGA AGGAAAGTCCTGGCACTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGCAGGATAGAGATGCGGCCTCGGCCAGA GCCTGGCCTAAAATGCACACCGTCAACGGATATGTGAACAGGTCGCTCCCTGGCCTCATCGGCTGCC

【表１－１８】

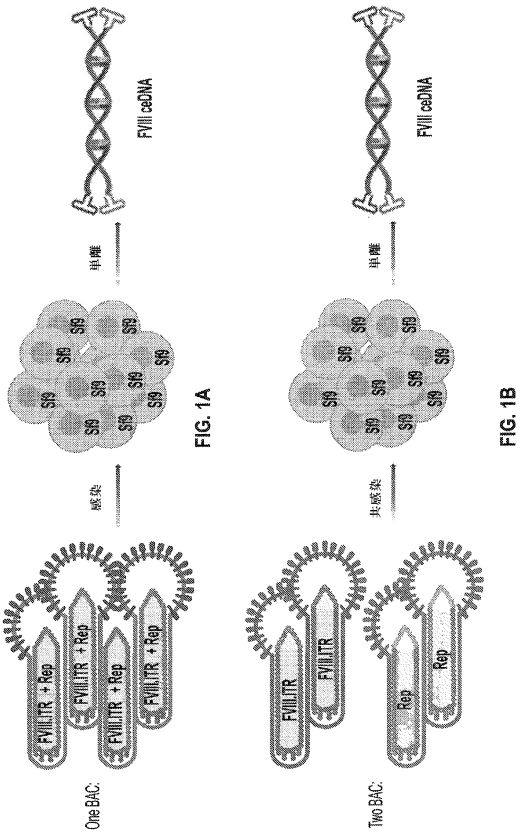
	ACAGAAAGTCCGTGTATTGGCATGTGATCGGCATGGGTACTACTCCGGAAGTGCATAGTATCTTTCT GGAGGGCCATACCTTCTTGGTGCGCAACCACAGACAGGCCTCGCTGGAAATCTCGCCTATCACTTTC TTGACTGCGCAGACCCTCCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGCTGTTCTGTCACATCAGCTCCCATC AGCATGATGGGATGGAGGCCTATGTCAAAGTGGACTCCTGCCCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAA GAACAATGAGGAAGCGGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGACGTCGTGCGATTC GATGACGACAACAGCCCGTCCTTCATCCAAATTAGATCAGTGGCGAAGAAGCACCCCAAGACCTGGG TGCACTACATTGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCGCCGCTGGTGCTGGCGCCAGACGACAG GAGCTACAAGTCCCAGTACCTCAACAACGGGCCGCAGCGCATTGGCAGGAAGTACAAGAAAGTCCGC TTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCCAGCACGAGTCAGGCATCCTGG GACCGCTCCTTTACGGCGAAGTCGGGGATACCCTGCTCATCATTTTCAAGAACCAGGCATCGCGGCC CTACAACATCTACCCTCACGGGATCACAGACGTGCGCCCGCTCTACTCCCGCCGGCTGCCCAAGGGA GTGAAGCACCTGAAGGATTTTCCCATCCTGCCGGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACTG TGGAAGATGGCCCTACCAAGTCGGACCCTCGCTGTCTGACCCGGTACTATTCCTCGTTTGTGAACAT GGAGCGCGACCTGGCCTCGGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCCGTGGACCAG CGCGGGAACCAGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCTGTCTTTGATGAAAACAGAT CGTGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTTCCTGCCCAACCCAGCGGGAGTGCAACTGGAGGACCC GGAGTTCCAGGCCTCAAACATTATGCACTCTATCAACGGCTATGTGTTCGACTCGCTCCAACTGAGC GTGTGCCTGCATGAAGTGGCATACTGGTACATTCTGTCCATCGGAGCCCAGACCGACTTCCTGTCCG TGTTCTTCTCCGGATACACCTTCAAGCATAAGATGGTGTACGAGGACACTCTGACCCTCTTCCCATT TTCCGGAGAAACTGTGTTCATGTCAATGGAAAACCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATAACTCG GACTTCCGGAATAGAGGGATGACCGCCCTGCTGAAAGTGTCCAGCTGTGACAAGAATACCGGCGATT ACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCTTATCTGCTGTCCAAGAACAACGCCATTGAACCCAG GTCCTTCTCCCAAAACGGTGCACCGACCTCCGAAAGCGCCACCCCAGAGTCAGGACCTGGCTCGGAA CCGGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGACTTCCGAGTCCGCAACCCCCGAGAGTGGACCCGGAT CCGAACCAGCAACCTCAGGATCAGAAACCCCGGGAACTTCGGAATCCGCCACTCCCGAGTCGGGACC AGGCACCTCCACTGAGCCTTCCGAGGGAAGCGCCCCCGGATCCCCTGCTGGATCCCCTACCAGCACT GAAGAAGGCACCTCAGAATCCGCGACCCCTGAGTCCGGCCCTGGAAGCGAACCCGCCACCTCCGGTT CCGAAACCCCTGGGACTAGCGAGAGCGCCACTCCGGAATCGGGCCCAGGAAGCCCTGCCGGATCCCC GACCAGCACCGAGGAGGGAAGCCCCGCCGGGTCACCGACTTCCACTGAGGAGGGAGCCTCATCCCCC CCCGTGCTGAAGCGGCATCAAAGAGAGATCACCAGGACCACTCTCCAGTCCGATCAGGAAGAAATTG ACTACGACGATACTATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGATGAGGATGAGAA CCAGTCCCCTCGGAGCTTTCAGAAGAAAACCCGCCACTACTTCATCGCTGCCGTGGAGCGGCTGTGG GATTACGGGATGTCCAGCTCACCGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCCCAGT TCAAGAAGGTCGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGGTCCTTCACTCAACCCCTGTACCGGGGCGAACT CAACGAACACCTGGGACTGCTTGGGCCGTATATCAGGGCAGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACC TTCCGCAACCAGGCCTCCCGGCCGTACAGCTTCTACTCTTCACTGATCTCCTACGAGGAAGATCAGC GGCAGGGAGCCGAGCCCCGGAAGAACTTCGTCAAGCCTAACGAAACTAAGACCTACTTTTGGAAGGT CCAGCATCACATGGCCCCGACCAAAGACGAGTTCGACTGTAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTG GACCTGGAGAAGGACGTGCACTCGGGACTCATTGGCCCGCTCCTTGTGTGCCATACTAATACCCTGA ACCCTGCTCACGGTCGCCAAGTCACAGTGCAGGAGTTCGCCCTCTTCTTCACCATCTTCGATGAAAC AAAGTCCTGGTACTTTACTGAGAACATGGAACGCAATTGCAGGGCACCCTGCAACATCCAGATGGAA GATCCCACCTTCAAGGAAAACTACCGGTTTCATGCCATTAACGGCTACATAATGGACACGTTGCCAG GACTGGTCATGGCCCAGGACCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTCTCCATGGGCTCCAACGAAAACAT TCACAGCATTCATTTTTCCGGCCATGTGTTCACCGTCCGGAAGAAGGAAGAGTACAAGATGGCTCTG TACAACCTCTACCCTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAAATGCTGCCTAGCAAGGCCGGCATTTGGAGAG TGGAATGCCTGATCGGAGAGCATTTGCACGCCGGAATGTCCACCCTGTTTCTTGTGTACTCCAACAA GTGCCAGACCCCGCTGGGAATGGCCTCAGGTCATATTAGGGATTTCCAGATCACTGCTTCGGGGCAG TACGGGCAGTGGGCACCTAAGTTGGCCCGGCTGCACTACTCTGGCTCCATCAATGCCTGGTCCACCA AGGAACCCTTCTCCTGGATTAAGGTGGACCTCCTGGCCCCAATGATTATTCACGGTATTAAGACCCA GGGTGCCCGACAGAAGTTCTCCTCACTCTACATCTCGCAATTCATCATAATGTACAGCCTGGATGGG AAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGAAACTCCACTGGAACGCTCATGGTGTTTTTCGGCAACGTGGACT CCTCCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCGATCATTGCTCGGTACATCCGGCTGCACCCAAC TCACTACAGCATCCGGTCCACCCTGCGGATGGAACTGATGGGTTGTGACCTGAACTCCTGCTCCATG CCCCTTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCGATGCACAGATCACCGCCTCTTCATACTTCACCAACA TGTTCGCGACCTGGTCCCCGTCGAAGGCCCGCCTGCACCTCCAAGGTCGCTCCAATGCGTGGCGGCC TCAAGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTCCAGGTCGACTTCCAAAAGACCATGAAGGTCACCGGAGTG ACCACCCAGGGCGTGAAGTCCCTGCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAGTTCCTCATCTCCTCAAGCC AAGACGGACATCAGTGGACCCTGTTCTTCCAAAACGGAAAAGTCAAAGTATTCCAGGGCAACCAGGA CTCCTTCACCCCTGTGGTCAACAGCCTGGACCCCCCATTGCTGACCCGCTACCTCCGCATCCACCCC CAAAGCTGGGTCCACCAGATCGCACTGCGCATGGAGGTCCTTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACT AAGCGGCCGCTCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTA TGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCG TTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGC CACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATC

【表１－１９】

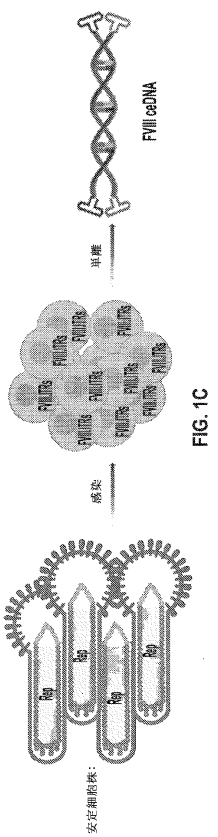
	GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTC CTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTG CGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGC TGCCTAGGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA TAGCAGGCATGCTGGGGAAGACCATGGGCGCGCCAGGCCTGTCGACGCCCGGGCGGTACCGCGATCG CTCGCGACGCATAAAG
配列番号 36 ヒトアルファ１アンチトリプシン(A1AT)プロモーター	ATCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACT CTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAA CATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAG TCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAG CACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCTCCCCAC CTTCGAACTAGCCACTAGCCTGAGGCTGGTCAAAATTGAACCTCCTCCTGCTCTGAGCAGCCTGGGG GGCAGACTAAGCAGAGGGCTGTGCAGACCCACATAAAGAGCCTACTGTGTGCCAGGCACTTCACCCG AGGCACTTCACAAGCATGCTTGGGAATGAAACTTCCAACTCTTTGGGATGCAGGTGAAACAGTTCCT GGTTCAGAGAGGTGAAGCGGCCTGCCTGAGGCAGCACAGCTCTTCTTTACAGATGTGCTTCCCCACC TCTACCCTGTCTCACGGCCCCCCATGCCAGCCTGACGGTTGTGTCTGCCTCAGTCATGCTCCATTTT TCCATCGGGACCATCAAGAGGGTGTTTGTGTCTAAGGCTGACTGGGTAACTTTGGATGAGCGGTCTC TCCGCTCTGAGCCTGTTTCCTCATCTGTCAAATGGGCTCTAACCCACTCTGATCTCCCAGGGCGGCA GTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAGTAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAACA GCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGAC TCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTT CGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCA GATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTC ACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTC TCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAG

【図面】

【図１－１】



【図１－２】



【図２】

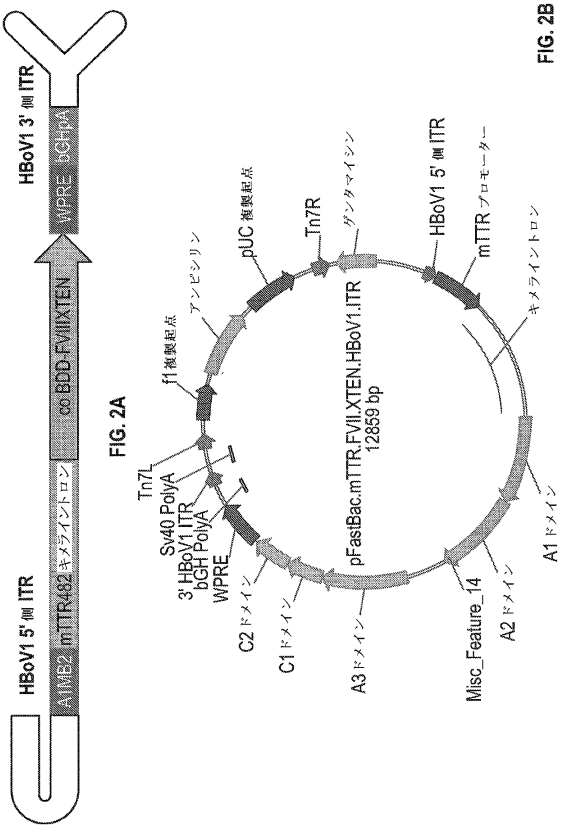


FIG. 2A

FIG. 2B

【図３】

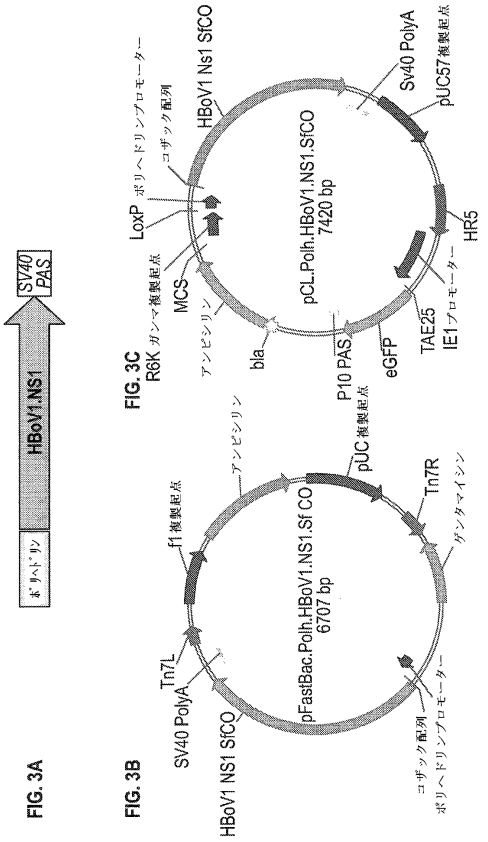


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

【図４】

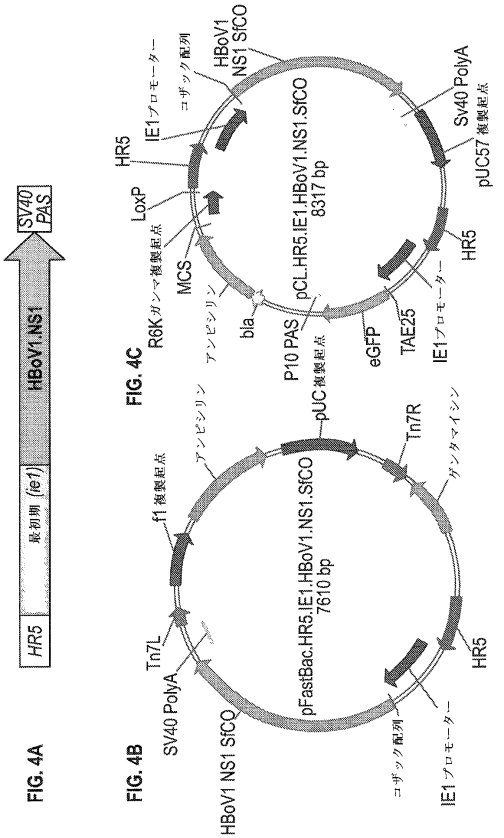


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

【図５】

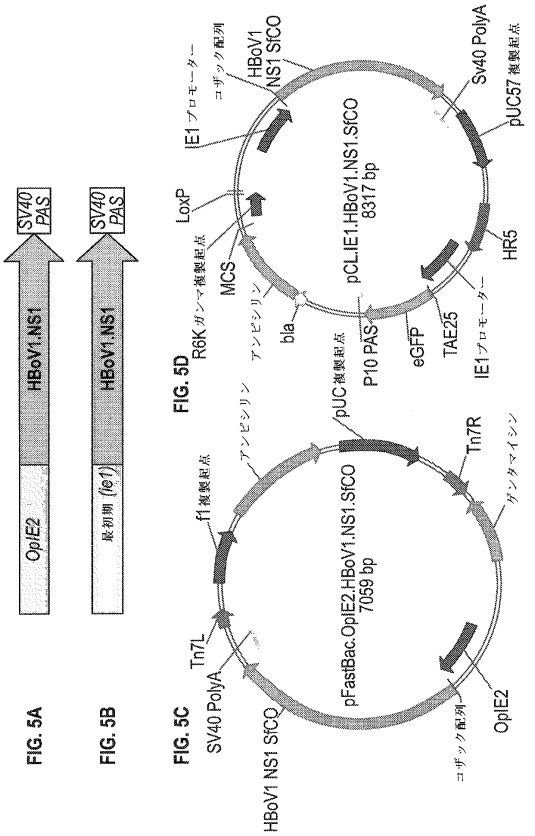


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

FIG. 5D

【図６Ａ】

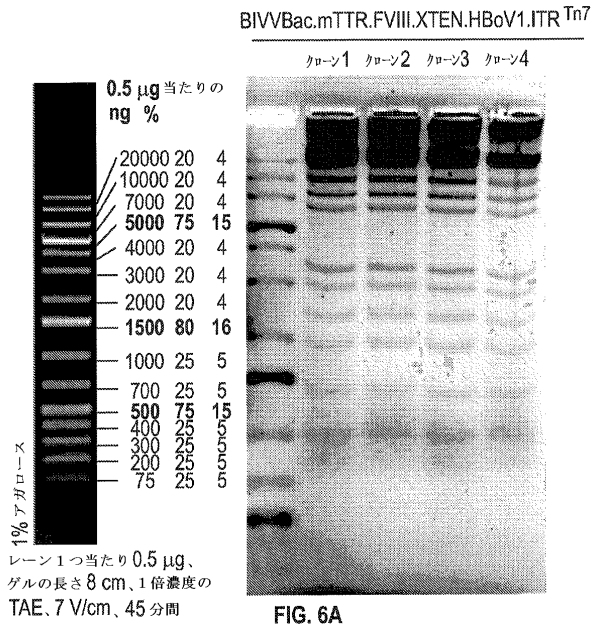


FIG. 6A

【図６Ｂ】

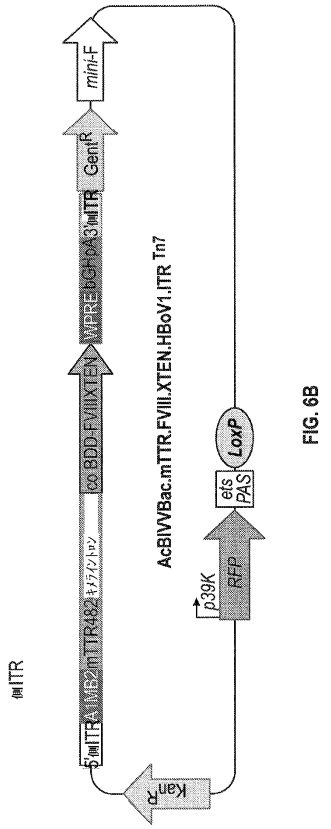


FIG. 6B

【図７Ａ】

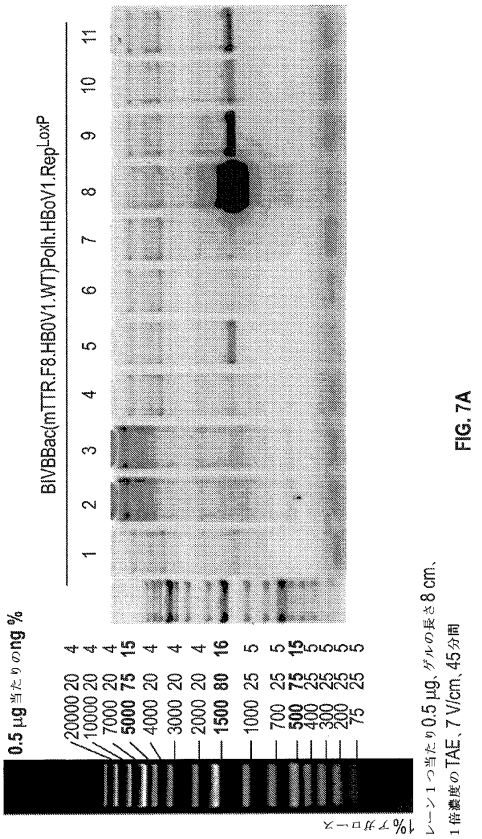


FIG. 7A

【図７Ｂ】

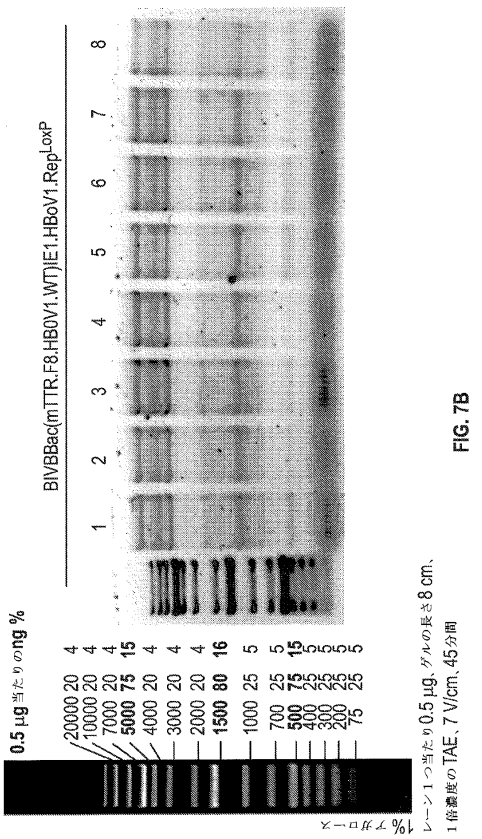


FIG. 7B

【図７Ｃ】

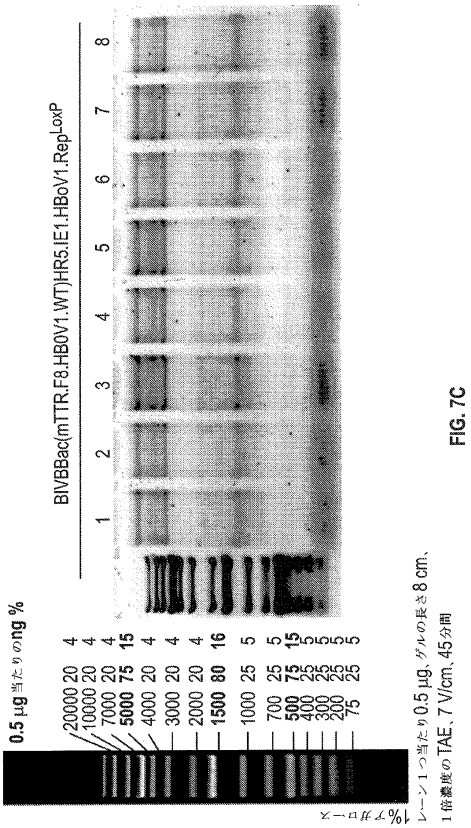


FIG. 7C

【図７Ｄ】

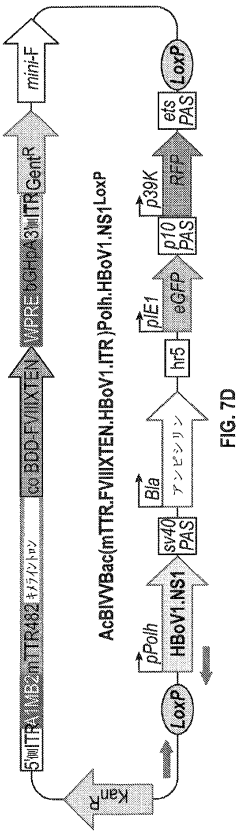


FIG. 7D

【図７Ｅ】

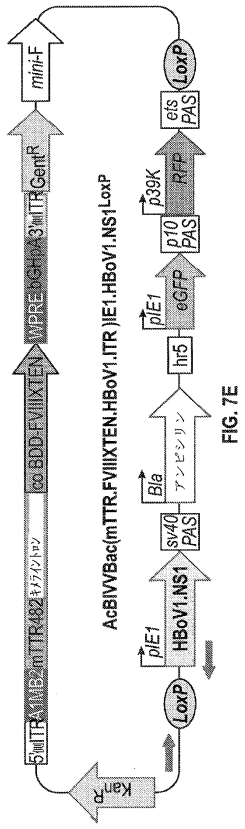


FIG. 7E

【図７Ｆ】

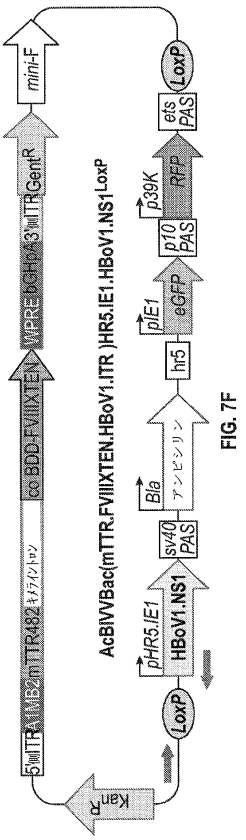


FIG. 7F

【図８Ａ】

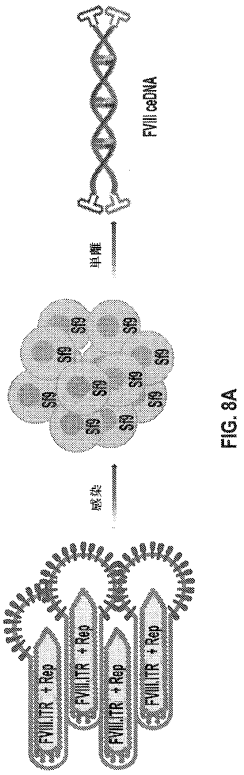


FIG. 8A

【図８Ｂ】

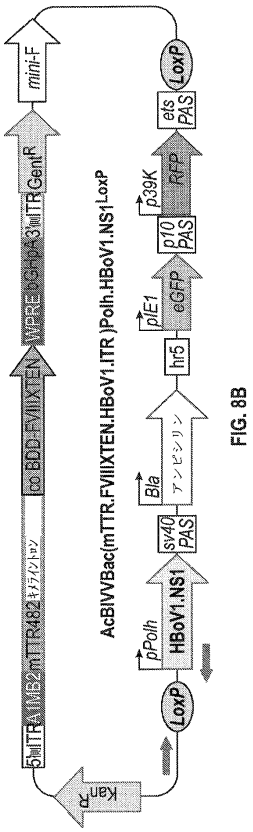


FIG. 8B

【図８Ｃ】

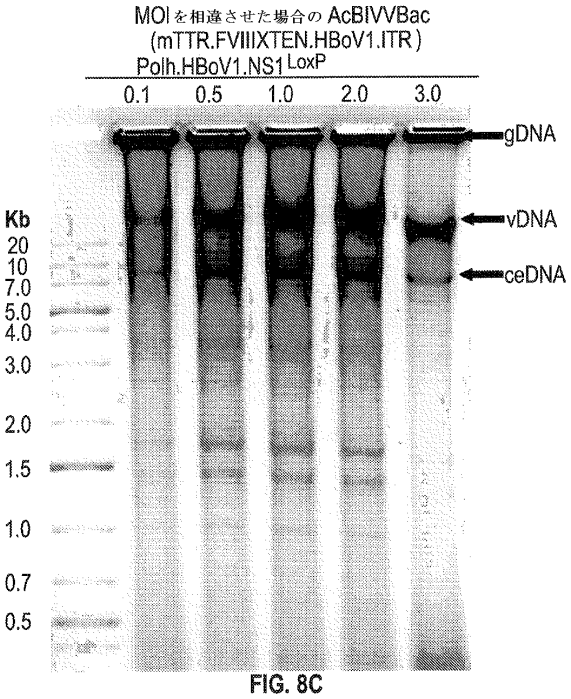


FIG. 8C

【図９－１】

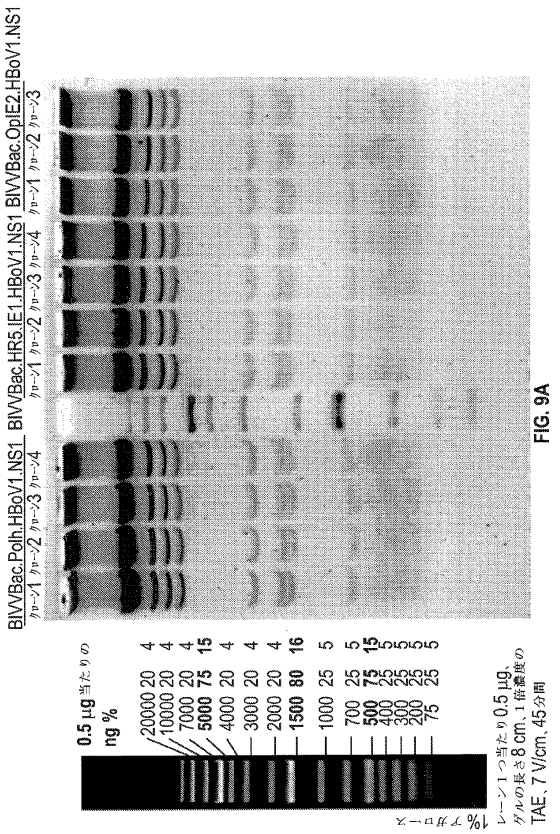


FIG. 9A

【図９－２】

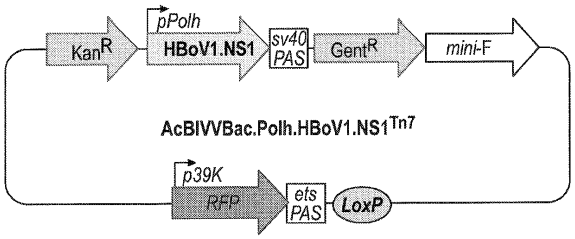


FIG. 9B

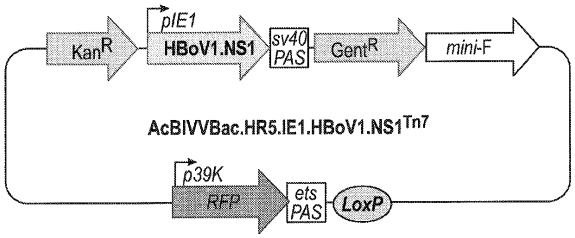


FIG. 9C

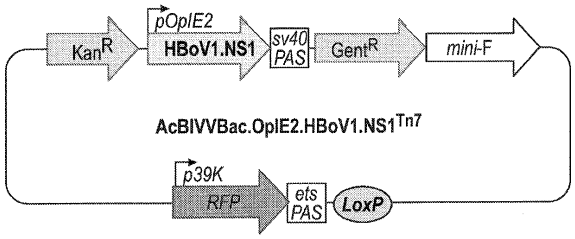


FIG. 9D

【図１０Ａ】

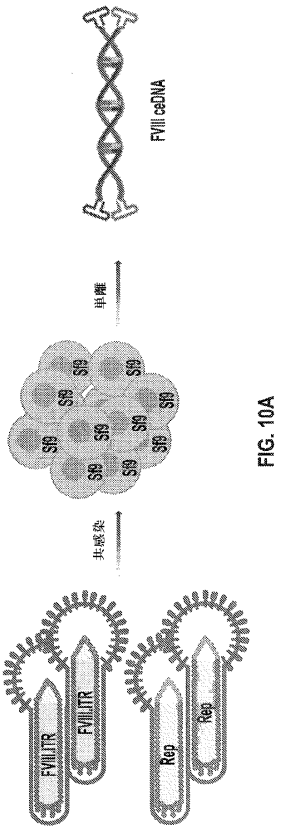


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

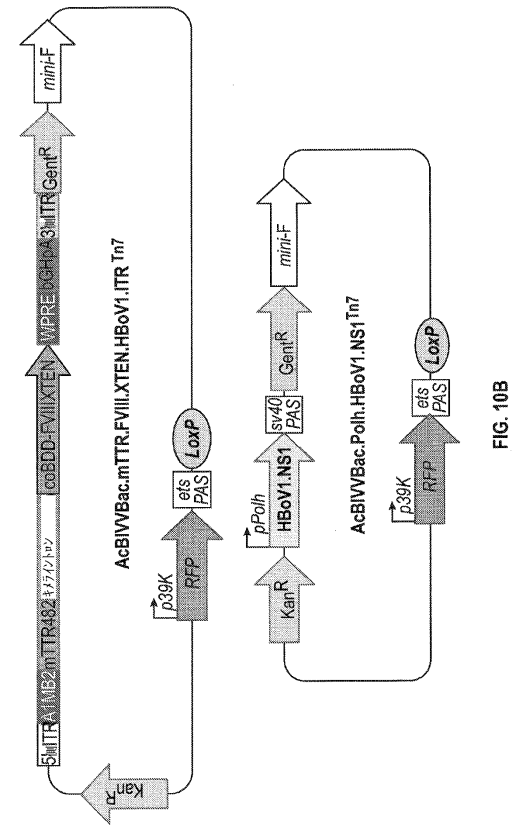


FIG. 10B

【図１０Ｃ】

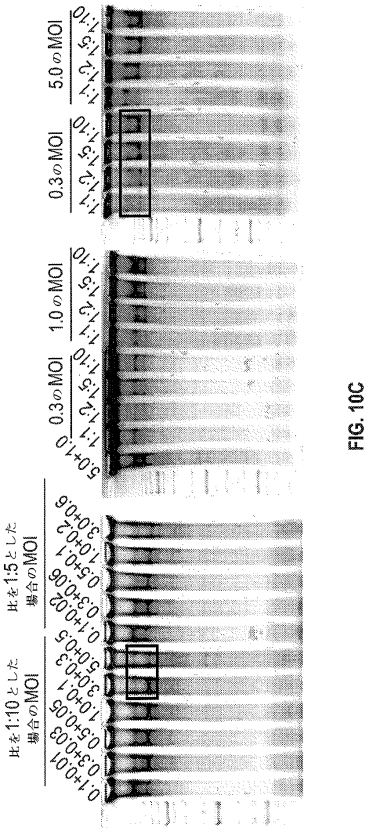


FIG. 10C

【図１１Ａ】

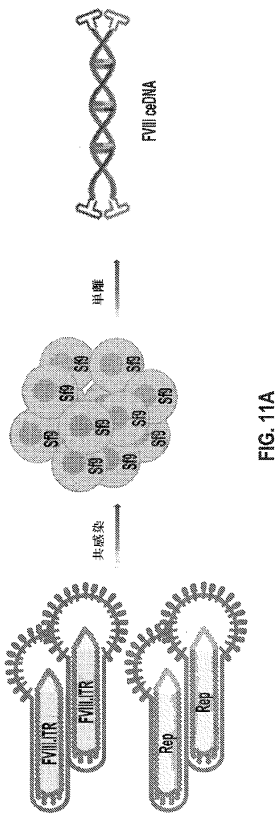


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

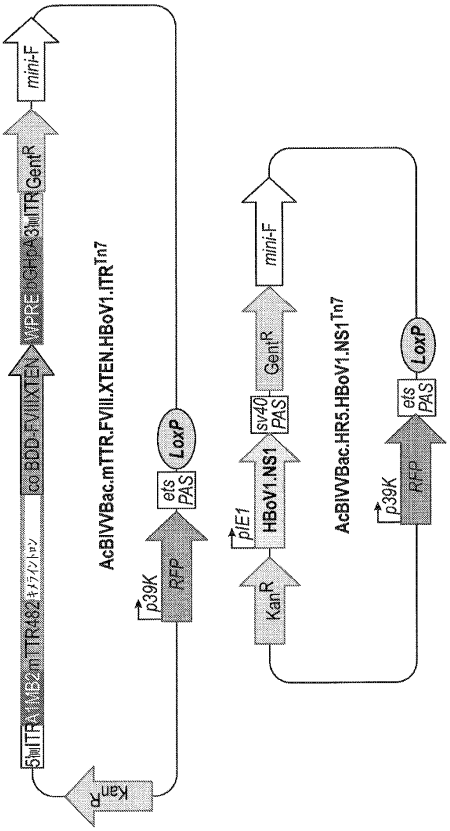


FIG. 11B

【図１１Ｃ】

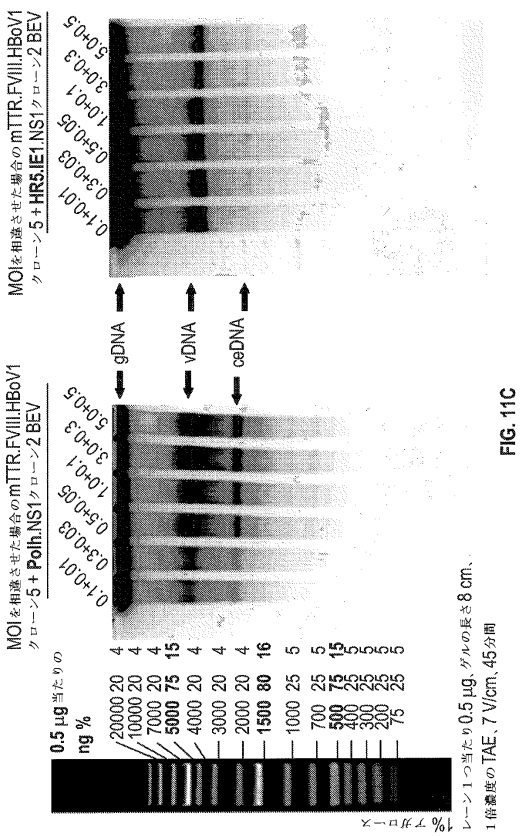


FIG. 11C

【図１２】

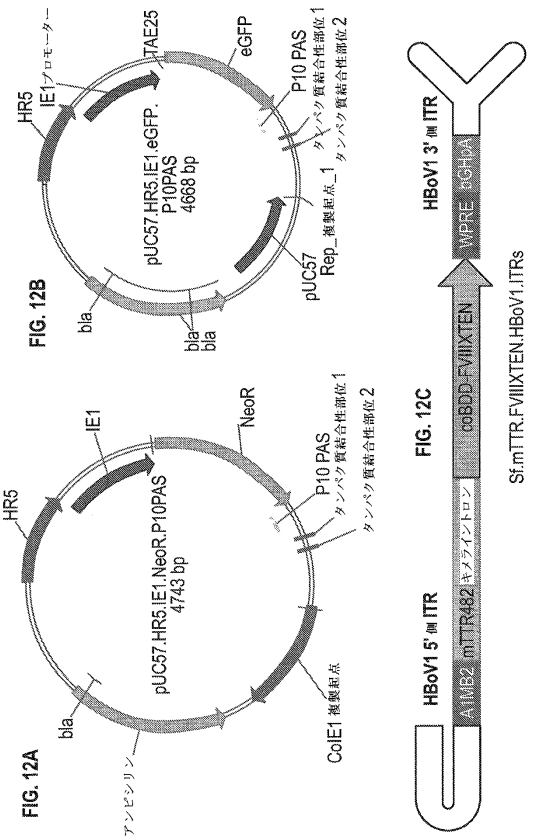
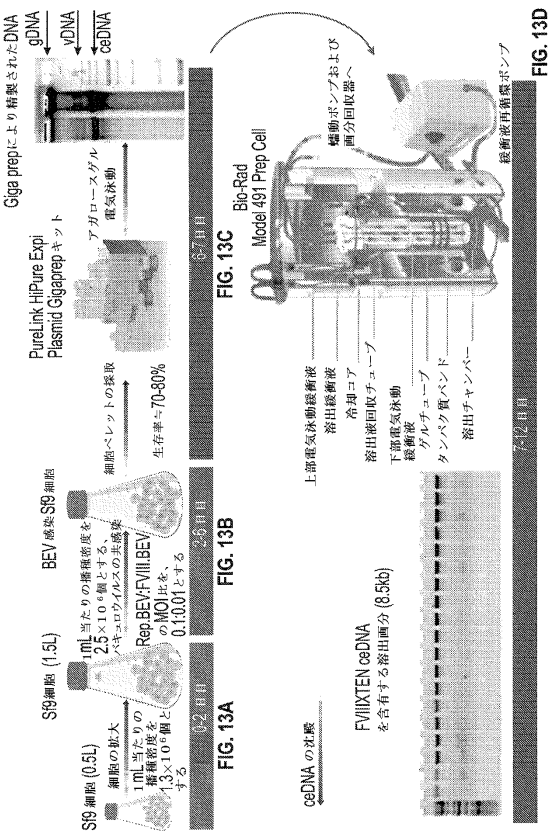


FIG. 12A

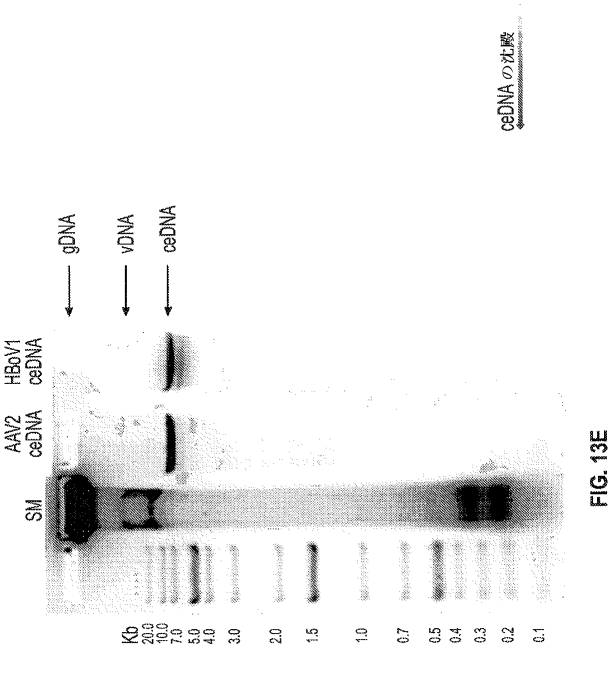
FIG. 12B

FIG. 12C

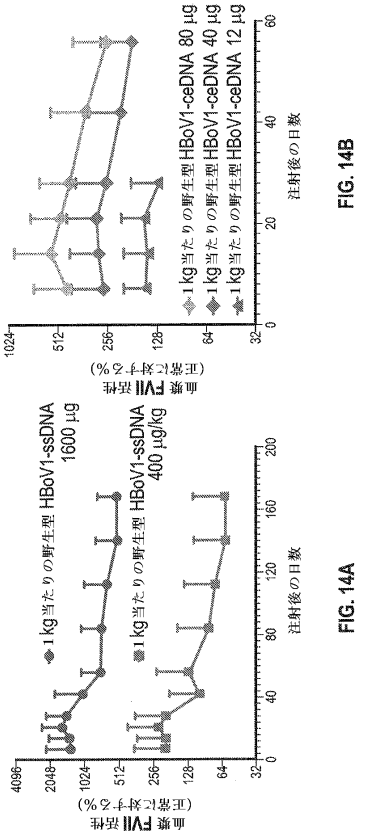
【図１３－１】



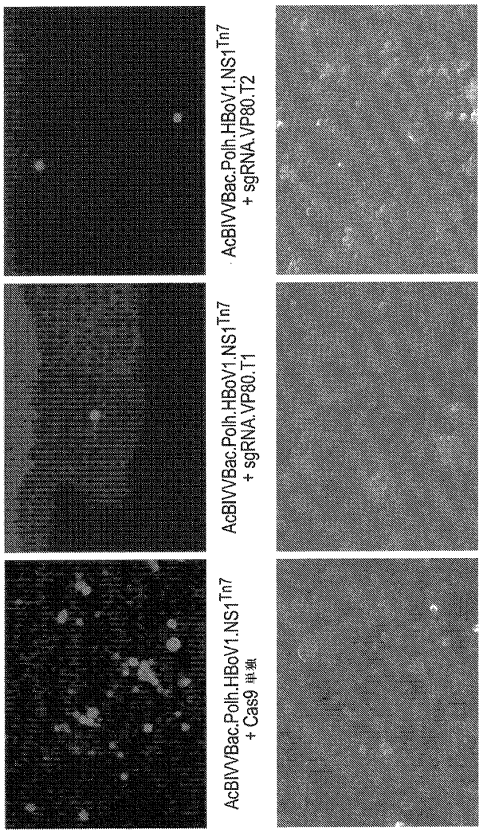
【図１３－２】



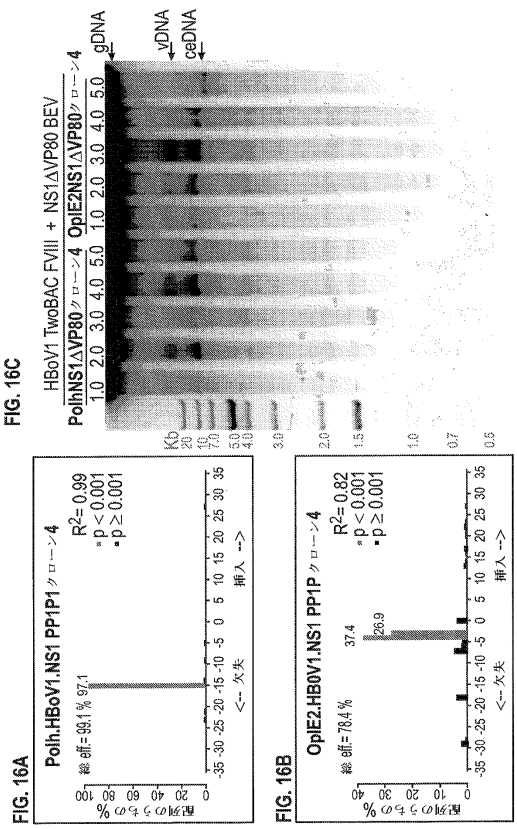
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【図１７Ａ】

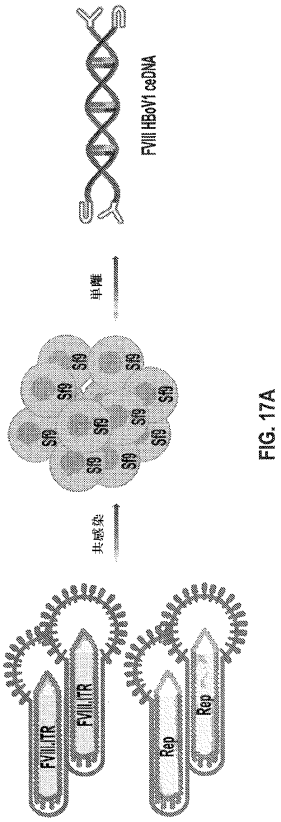


FIG. 17A

【図１７Ｂ】

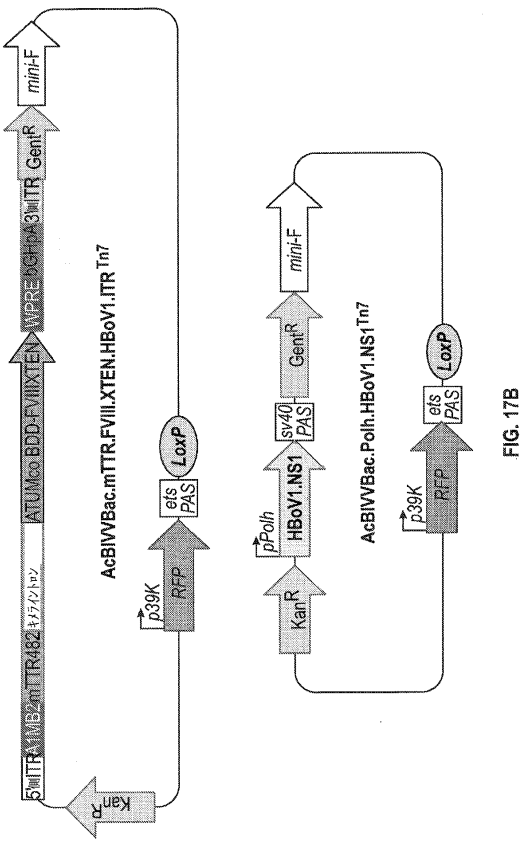


FIG. 17B

【図１７Ｃ】

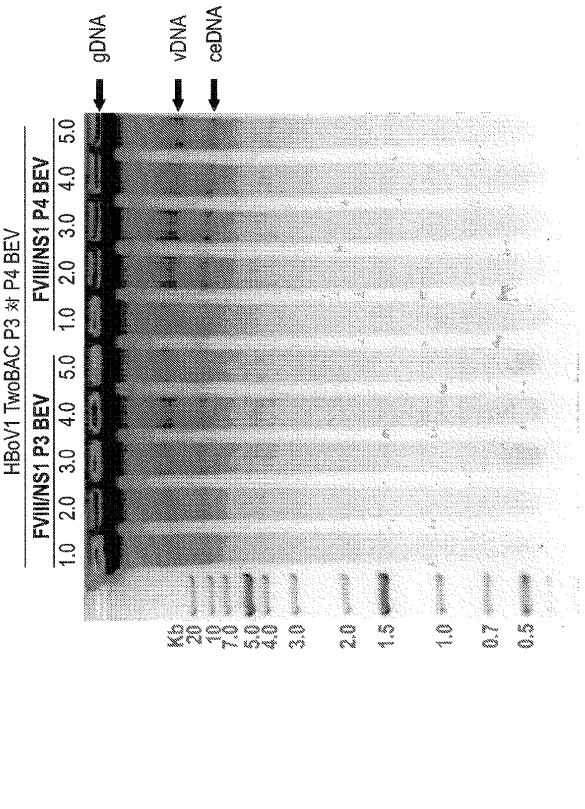
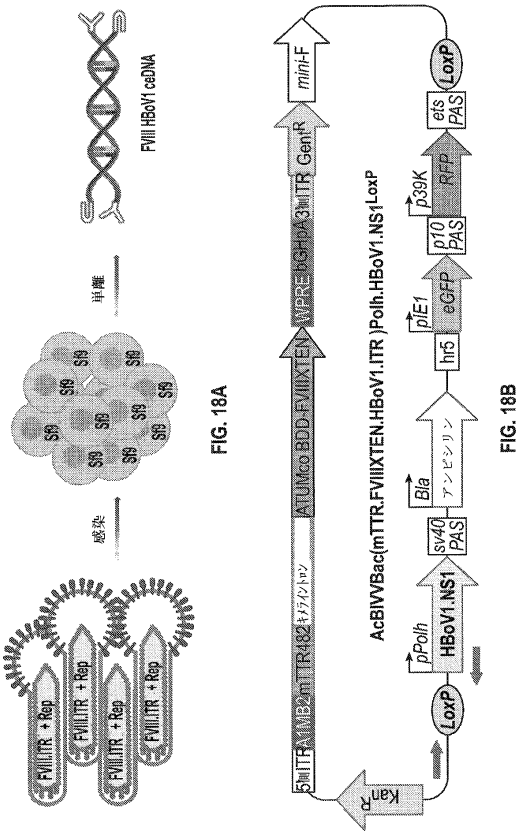
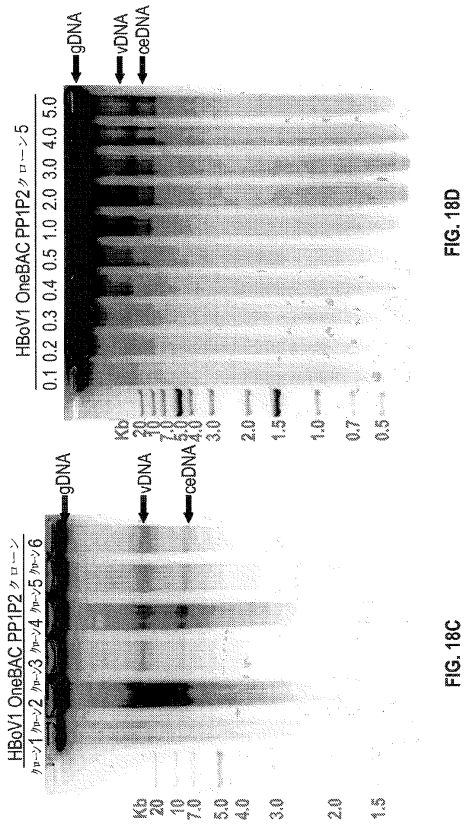


FIG. 17C

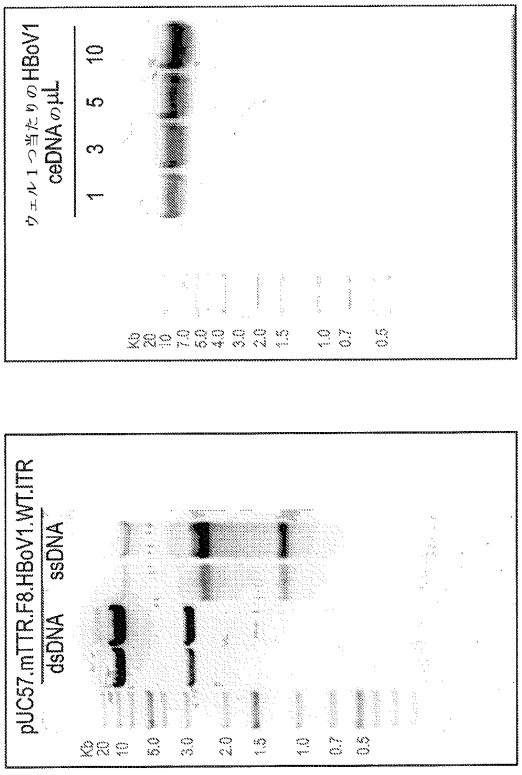
【図１８－１】



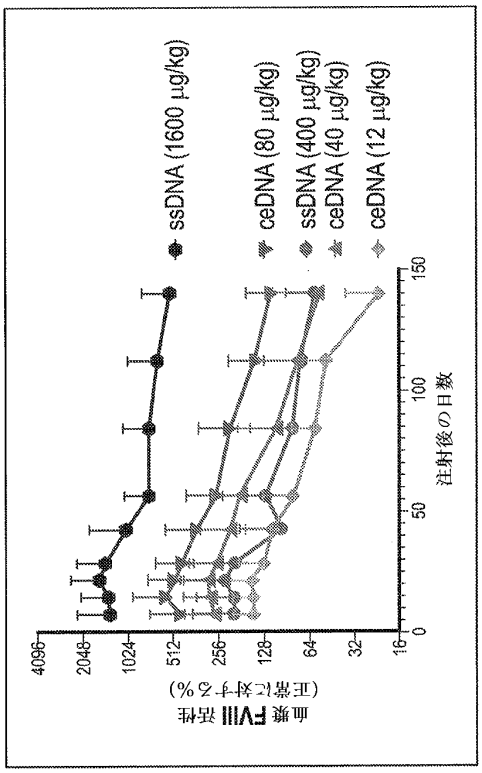
【図１８－２】



【図１９－１】



【図１９－２】



【図２０】

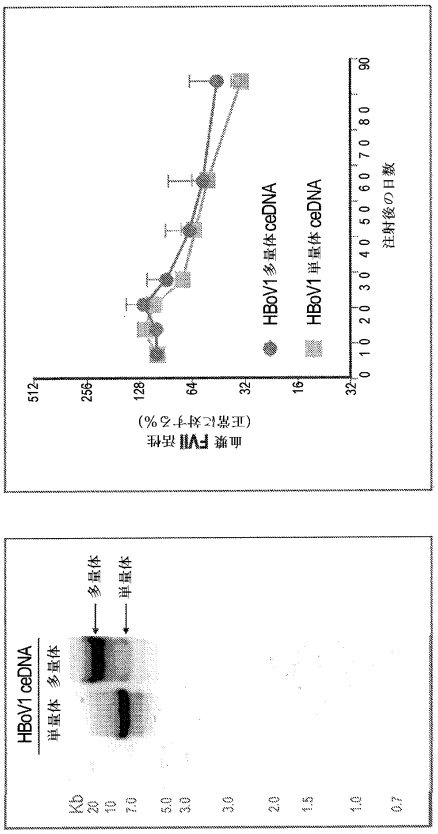


FIG. 20A

FIG. 20B

【図２１－１】

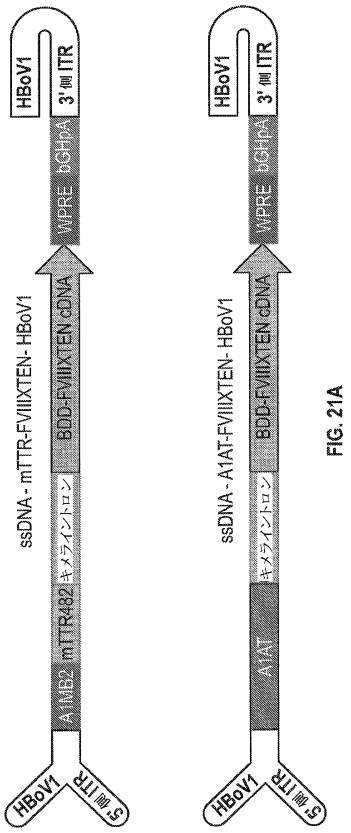


FIG. 21A

【図２１－２】

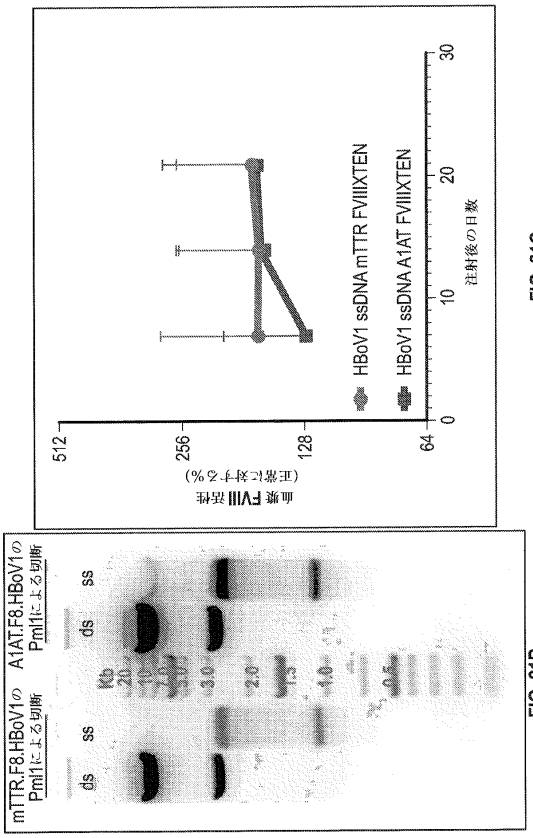


FIG. 21B

FIG. 21C

【配列表】
20245341240000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/755 C12N15/86
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

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, 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	WO 2014/168953 A1 (UNIV IOWA RES FOUND [US] ET AL.) 16 October 2014 (2014-10-16)	1-25,27, 29,30, 34,35, 40-57, 59-61
A	page 4, line 18 - page 4, line 33; figures 1, 10 page 15, line 10 - page 17, line 19 page 22, line 10 - page 25, line 15; sequence 9 page 29, line 3 - page 29, line 19 page 36, line 21 - page 36, line 33; examples 4, 5	26, 31-33, 36-39, 58,62-75
A	WO 2019/067766 A1 (SIGILON THERAPEUTICS INC [US]; SEWELL JERED A [US]) 4 April 2019 (2019-04-04) sequence 27	1-75

-/--

[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
10 November 2022	24/11/2022

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	Stoyanov, Borislav

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075280

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/225405 A1 (BIOTEST AG [DE]) 12 November 2020 (2020-11-12) sequence 30 -----	1-75

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/075280

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/075280

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014168953 A1	16-10-2014	AU 2014251099 A1	12-11-2015
		CA 2909085 A1	16-10-2014
		CA 3174963 A1	16-10-2014
		CN 105431170 A	23-03-2016
		EP 2983707 A1	17-02-2016
		HK 1217916 A1	27-01-2017
		JP 6516725 B2	22-05-2019
		JP 2016518121 A	23-06-2016
		US 2016068821 A1	10-03-2016
		US 2018282702 A1	04-10-2018
		WO 2014168953 A1	16-10-2014
		ZA 201507946 B	29-07-2020
WO 2019067766 A1	04-04-2019	AU 2018338608 A1	09-04-2020
		BR 112020006149 A2	20-10-2020
		CA 3077380 A1	04-04-2019
		CN 111372612 A	03-07-2020
		EP 3687580 A1	05-08-2020
		IL 274200 A	30-06-2020
		JP 2020534837 A	03-12-2020
		KR 20200057051 A	25-05-2020
		US 2020263196 A1	20-08-2020
		WO 2019067766 A1	04-04-2019
WO 2020225405 A1	12-11-2020	AU 2020269422 A1	30-09-2021
		CA 3132270 A1	12-11-2020
		CN 113646331 A	12-11-2021
		EP 3736286 A1	11-11-2020
		EP 3966237 A1	16-03-2022
		JP 2022531664 A	08-07-2022
		US 2022259287 A1	18-08-2022
		WO 2020225405 A1	12-11-2020

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/64 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/64	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/866(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/866	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/90 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/90	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｐ	*7/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04		
Ａ６１Ｋ	*9/08 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/08		
Ａ６１Ｋ	*9/72 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/72		
Ｃ０７Ｋ	*14/755 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/755		

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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＰＬＵＲＯＮＩＣ

(72)発明者　クリスティアン・ミュラー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１．ウォルサム．セカンド・アヴェニュー２２５．バイオベラティブ・セラピューティクス・インコーポレイテッド
(72)発明者　トンヤオ・リウ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１．ウォルサム．セカンド・アヴェニュー２２５．バイオベラティブ・セラピューティクス・インコーポレイテッド

Ｆターム（参考）　4C076　AA11 AA93 BB11 BB13 BB22 CC14
4C084　AA13 MA13 MA16 MA17 MA57 MA66 ZA531 ZA532
4C086　AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA13 MA16 MA17 MA57 MA66 NA05 NA14 ZA54
4C087　BC83 CA12 MA13 MA16 MA17 MA57 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA53
4H045　AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA66 FA72 FA74