

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-515356

(P2025-515356A)

(43)公表日 令和7年5月14日(2025.5.14)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z 4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全27頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-563591(P2024-563591)	(71)出願人	516261966 ジョイント・ストック・カンパニー “バイオキャド”
(86)(22)出願日	令和5年4月18日(2023.4.18)		
(85)翻訳文提出日	令和6年12月27日(2024.12.27)		
(86)国際出願番号	PCT/RU2023/050093		ロシア国 1 9 8 5 1 5 サンクト・ペテルブルク, フン . テル . グ . ポセロク . ストレルナ, ウーリツァ . ズヴァジ, デリエヴニャ 3 8 , ストラニスタ 1 , ポニシーニャ 8 9
(87)国際公開番号	WO2023/211315	(74)代理人	100118902 弁理士 山本 修
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)		
(31)優先権主張番号	2022111695	(74)代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(32)優先日	令和4年4月28日(2022.4.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	ロシア(RU)	(74)代理人	100196508 弁理士 松尾 淳一
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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)	(74)代理人	100107386

最終頁に続く

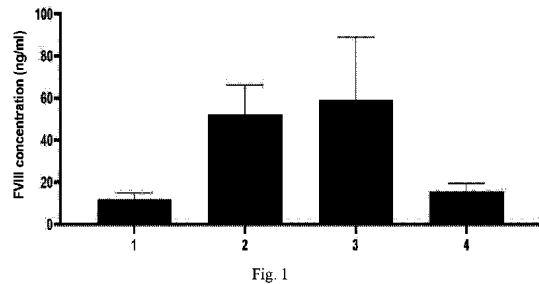
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする単離された核酸

(57)【要約】

本出願は、遺伝学、遺伝子療法、および分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、F V I I I - B D D ( Bドメイン欠失型凝固第V I I I 因子)および異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする核酸、それに基づく発現カセットおよびベクター、F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質を生成させるための宿主細胞、ならびにさらに上記ベクターの様々な使用に関する。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 7、配列番号 8 または配列番号 9 から選択されるアミノ酸配列を含む、F V I I I - B D D ( B ドメイン欠失型凝固第 V I I I 因子 ) および異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする単離された核酸。

## 【請求項 2】

F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドに基づく前記融合タンパク質が配列番号 7 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された核酸。

## 【請求項 3】

F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドに基づく前記融合タンパク質が配列番号 8 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された核酸。 10

## 【請求項 4】

F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドに基づく前記融合タンパク質が配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された核酸。

## 【請求項 5】

配列番号 1 1 のヌクレオチド配列である、請求項 2 に記載の単離された核酸。

## 【請求項 6】

配列番号 1 2 のヌクレオチド配列である、請求項 3 に記載の単離された核酸。

## 【請求項 7】

配列番号 1 3 のヌクレオチド配列である、請求項 4 に記載の単離された核酸。 20

## 【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸を含む発現カセット。

## 【請求項 9】

5' 末端から 3' 末端の方向で以下のエレメント：

左側 ( 第 1 ) I T R ( 逆位末端反復 ) ；

プロモーター；

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸；

ポリアデニル化シグナル；

右側 ( 第 2 ) I T R

を含む、請求項 8 に記載の発現カセット。 30

## 【請求項 10】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸または請求項 8 もしくは 9 に記載の発現カセットを含む発現ベクター。

## 【請求項 11】

組み換えアデノ随伴ウイルス ( A A V ) である、請求項 10 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 12】

前記 A A V が、以下の A A V 血清型：A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V 14、A A V 15、A A V 16、r A A V . r h 8、r A A V . r h 10、r A A V . r h 20、r A A V . r h 39、r A A V . R h 74、r A A V . R H M 4 - 1、A A V . h u 37、r A A V . A n c 80、r A A V . A n c 80 L 65、r A A V . 7 m 8、r A A V . P H P . B、r A A V 2 . 5、r A A V 2 t Y F、r A A V 3 B、r A A V . L K 03、A A V . H S C 1、A A V . H S C 2、A A V . H S C 3、A A V . H S C 4、A A V . H S C 5、A A V . H S C 6、A A V . H S C 7、A A V . H S C 8、A A V . H S C 9、A A V . H S C 10、A A V . H S C 11、A A V . H S C 12、A A V . H S C 13、A A V . H S C 14、A A V . H S C 15 または A A V . H S C 16 を含む群から選択される、請求項 11 に記載の発現ベクター。 40

## 【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸を含む、F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質を生成させるための、または請求項 11 もしくは 50

12に記載の発現ベクターを生成させるための宿主細胞。

【請求項14】

1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて、請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたはカセットを含む、標的細胞へとFVIIIBDD遺伝子を送達するための医薬組成物。

【請求項15】

標的細胞へとFVIIIBDD遺伝子を送達するための、請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の組成物の使用。

【請求項16】

血友病Aを有しかつ/またはFVIIIBDD遺伝子の機能的コピーを有しない対象へとFVIIIBDDタンパク質を提供するための、請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の組成物の使用。

10

【請求項17】

FVIIIBDDタンパク質の提供を必要とする対象の細胞へと治療有効量の請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の組成物を投与するステップを含む、血友病Aを有する対象へと前記FVIIIBDDタンパク質を提供するための方法。

【請求項18】

対象の細胞へと請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の組成物を投与するステップを含む、血友病Aを有する対象の標的細胞へとFVIIIBDD遺伝子を送達する方法。

20

【請求項19】

血友病Aを有する対象において血友病Aを治療するための、請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の組成物の使用。

【請求項20】

血友病Aを有する対象へと治療有効量の請求項10から12のいずれか一項に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の組成物を投与するステップを含む、対象において血友病Aを治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本出願は、遺伝学、遺伝子療法、および分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、FVIIIBDD（Bドメイン欠失型凝固第VIIII因子）および異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする核酸、それに基づく発現カセットおよびベクター、FVIIIBDDおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質を生成させるための宿主細胞、ならびにさらに上記ベクターの様々な使用に関する。

【背景技術】

【0002】

血友病は、二次止血に関与するタンパク質のうちの1つの欠陥を引き起こす、X連鎖劣性遺伝障害である。血友病A、または古典的血友病は、血友病の最も一般的な異形であり；5000名の新生男性のうちの1名で起こり（WFH2019年次グローバル調査レポート、<https://www.wfh.org/en/our-work-research-data/annual-global-survey>）、凝固第VIIII因子タンパク質の欠陥により引き起こされる。ロシア血友病学会に従えば、ロシア国内には血友病Aを有する6,500名超の患者がいる（WFH2019年次グローバル調査レポート）。

40

【0003】

凝固第VIIII因子（FVIIII）は、肝類洞上皮細胞から主に血中に分泌される280kDaタンパク質である（Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knockou

50

t mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIIIBlood. 2014年6月12日; 123(24): 3706~13頁. doi: 10.1182/blood-2014-02-555151. Epub 2014年4月4日. PMID: 24705491およびEverett LA, Cleuren AC, Khoriaty RN, Ginsburg D. Murine coagulation factor VII is synthesized in endothelial cells/Blood. 2014年6月12日; 123(24): 3697~705頁. doi: 10.1182/blood-2014-02-554501. Epub 2014年4月9日. PMID: 24719406)。活性化型FVIIは、非共有的金属依存的相互作用を介して互いに結合した重鎖(A1、A2、Bドメイン)および軽鎖(A3、C1、C3ドメイン)からなるヘテロ二量体として生物体内を循環する。FVIIプロセシングの結果として、A1~A3、C1、C2ドメインのみが、タンパク質の活性化型として存在する。この事実は、全長FVIIに対してその活性において劣っていないBドメイン欠失型組み換えFVII(FVII-BDD)の生成に寄与した(Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VII/Blood. 1993年6月1日; 81(11): 2925~35頁. PMID: 8499631)。主にプロテアーゼに属する血液凝固カスケードの他のタンパク質とは異なり、FVIIは糖タンパク質である。しかしながら、FVIIは、最終的に架橋型フィブリン形成をもたらす最終的共通系凝固経路の最初のメンバーである活性化型凝固第X因子(FXa)の生成に対して必要であるテンナーゼ複合体の形成において極めて重要な役割を果たす。

#### 【0004】

FVII遺伝子のイントロン1またはイントロン22の逆位は、重症血友病Aの症例のうちの半分超の原因である(Habart D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty-four novel mutations detected in factor VII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions/J Thromb Haemost. 2003年4月; 1(4): 773~81頁. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00149.x. PMID: 1287141)。他の症例では、FVII配列における異常は、アンチセンス突然変異、リーディングフレームシフト、スプライシング部位突然変異、欠失および挿入をはじめとする様々な突然変異に関連付けられる。

#### 【0005】

血友病Aにおける出血傾向は、規定されたFVII活性と相関し、軽症(0.05~0.40 IU/mL)、中等症(0.01~0.05 IU/mL)または重症(<0.01 IU/mL)として分類される。軽症血友病を有する患者は、典型的には、医療介入または外傷に関連してのみ異常な出血を経験する。対照的に、中等症血友病を有する患者は、比較的軽微な外傷に対する長時間の出血反応を示し、かつ重症疾患を有する患者は、多くの場合に自然発生的な出血を有する。重症血友病Aは、自然発生的な関節血症、軟組織血腫、後腹膜出血、脳内出血および遅発性術後出血を伴って現れる。時間と共に、再発性関節血症および軟組織血腫からの合併症が、重症関節症、関節拘縮、および偽腫瘍を生じ、これが慢性疾患につながる場合がある。血友病Aの軽症、中等症および重症異形を有する患者の割合は、正確には知られていないが、近年の疫学研究は、血友病Aを有する患者のうちの約60%が重症異形を有することが報告された(WFH 2019年次グローバル調査レポート)。

#### 【0006】

現在までに、組み換えFV IIIの注入の形態での生涯にわたる補充療法が、血友病Aを有する患者に対する標準治療である(WFH 2019年次グローバル調査レポート)。血友病の療法において達成された成功にもかかわらず、このアプローチは、深刻な課題を有する。血友病Aの予防的補充療法は、重症異形の疾患を有する患者の生涯を通じた3日間毎の組み換えFV IIIの静脈内注入を含む。そのような治療アプローチは、非常に高額であり、関節血症に主に関連付けられる合併症がないことを保証しない。一部の場合には、患者は、阻害抗体をつくる。血友病Aの阻害性異形は、重症疾患を有する患者においてより典型的に観察され、疾患の治療および予防に対する代替的アプローチの使用を必要とする(Eckhardt CL, van der Bom JG, van der Naald M, Peters M, Kamphuisen PW, Fijnvandraat K. Surgery and inhibitor development in haemophilia A: a systematic review / J Thromb Haemost. 2011年10月; 9(10): 1948~58頁. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04467.x. PMID: 21838755)。

10

#### 【0007】

FV III遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)に基づくウイルス(発現)ベクターを用いる血友病Aの遺伝子療法は、一連の前臨床および臨床研究において優れた結果を示してきた(Bunting S, Zhang L, Xie L, Bullens S, Mahimkar R, Fong S, Sandza K, Harmon D, Yates B, Handyside B, Sihn CR, Galicia N, Tsuruda L, O'Neill CA, Bagri A, Colosi P, Long S, Vehar G, Carter B. Gene Therapy with BMN 270 Results in Therapeutic Levels of FV III in Mice and Primates and Normalization of Bleeding in Hemophilic Mice / Mol Ther. 2018年2月7日; 26(2): 496~509頁. doi: 10.1016/j.mthe.2017.12.009. Epub 2017年12月14日. PMID: 29292164およびPeyvandi F, Garagiola I. Clinical advances in gene therapy updates on clinical trials of gene therapy in haemophilia / Haemophilia. 2019年9月; 25(5): 738~746頁. doi: 10.1111/hae.13816. Epub 2019年7月8日. PMID: 31282050)。血友病の治療に対する従来のアプローチとは異なり、AAVを用いる遺伝子療法は、患者に対する治療剤の単回投与後の数年間にわたって十分なレベルで外因性FV IIIの発現レベルを維持することを可能にする(Long BR, Vernon P, Kuranda K, Hardet R, Mitchell N, Hayes GM, Wong WY, Lau K, Li M, Hock MB, Zoog SJ, Vettermann C, Mingozzi F, Schweighardt B. Early Phase Clinical Immunogenicity of Valoctocogene Roxaparvovec, an AAV5-Mediated Gene Therapy for Haemophilia A / Mol Ther. 2021年2月3日; 29(2): 597~610頁. doi: 10.1016/j.mthe.2020.12.008. Epub 2020年12月10日. PMID: 33309883)。

20

30

40

#### 【0008】

現在までに、血友病Aの治療に関して世界中で登録されている遺伝子療法製品はない。したがって、血友病Aの治療のための遺伝子療法製品を開発することおよび血友病Aの治療のための遺伝子療法製品の有効性を改善するであろう解決策に対する必要性がある。

#### 【発明の概要】

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明の著者らは、

1) 配列番号7のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D DおよびF I Xシグナルペプチド(S P - F I X)に基づく融合タンパク質または

2) 配列番号8のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよび免疫グロブリンG鎖シグナルペプチド(S P - I g G K)に基づく融合タンパク質または

3) 配列番号9のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよびラクトアルブミンシグナルペプチド(S P - ラクトアルブミン)に基づく融合タンパク質

をコードする核酸の使用が、天然に存在するF V I I Iシグナルペプチド(野生型)を含むF V I I I - B D Dタンパク質をコードする核酸の使用と比較した場合、F V I I I - B D Dタンパク質生成および活性のレベルの増大を引き起こすことを、驚くべきことに見出した。

10

定義および一般的方法

本明細書中で別途定義されない限り、本発明との関連で用いられるすべての技術用語および科学用語は、当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

## 【0010】

さらに、文脈によりそうでないことが要求されない限り、単数形の用語は複数形の用語を含むものとし、かつ複数形の用語は単数形の用語を含むものとする。典型的には、細胞培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、分析化学、有機合成化学、医化学および薬化学の現行の分類および方法、ならびに本明細書中に記載されるタンパク質および核酸のハイブリダイゼーションおよび化学は、当業者により周知され、かつ当技術分野において広く用いられる。酵素反応および精製法は、当技術分野で一般的である通りに、または本明細書中に記載される通りに、製造業者のガイドラインに従って行われる。

20

## 【0011】

用語「天然に存在する」、「生来型」、または「野生型」は、人工的に生成されるものとは区別できるものとして自然界において見出すことができる対象物を説明するために用いられる。例えば、自然界の供給源から単離することができかつ実験室において人物により意図的に改変されていない、ウイルス中を含む生物中に存在するタンパク質またはヌクレオチド配列は、天然に存在する。

30

## 【0012】

本説明および後続の特許請求の範囲において用いられる場合、文脈によりそうでないことが指示されない限り、単語「含む」(includeおよびcomprise)、または「includes」、「including」、「comprises」、もしくは「comprising」などのそれらの変形は、明記される整数または整数の群の包含を暗示するが、いずれかの他の整数または整数の群の除外を暗示しないことが理解されるであろう。

タンパク質(ペプチド)

本説明中で用いる場合、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は相互に交換可能に用いられ、かつペプチド結合により共有結合しているアミノ酸残基からなる化合物を意味する。ポリペプチドとしては、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

40

核酸分子

本説明中で相互に交換可能に用いられる用語「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」とは、核酸の断片または領域を決定し、非天然ヌクレオチドを含むかまたは含まず、かつ二本鎖DNAもしくはRNA、一本鎖DNAもしくはRNA、または前記DNAの転写生成物のいずれかである、修飾型であるかまたはそうでない、ヌクレオチドの正確な配列を意味する。

## 【0013】

50

本説明中で用いる場合、ポリヌクレオチドは、非限定的な例として、組み換え手段、すなわち、通常のクローニング技術およびPCRなどを用いる組み換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングをはじめとする当技術分野で利用可能ないずれかの手段により、および合成手段により取得されるすべての核酸配列を、非限定的な例として含む。

【0014】

本発明がその天然の染色体環境中、すなわち、天然状態でのヌクレオチド配列に関しないこともまた、ここで含まれるべきである。本発明の配列は、単離および/または精製されており、すなわち、直接的または例えばコピー化により間接的にサンプル採取され、それらの環境が少なくとも部分的に改変されている。つまり、例えば、宿主細胞を用いる組み換え遺伝学により取得されるかまたは化学合成により取得される単離された核酸もまた、ここで言及されるべきである。

10

【0015】

別途示されない限り、ヌクレオチド配列との用語は、その相補体を包含する。つまり、特定の配列を有する核酸は、その相補配列を有するその相補鎖を包含するものとして理解されるべきである。

ベクター

本明細書中で用いる場合、用語「ベクター」とは、連結された別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を意味する。さらに、本明細書中で用語「ベクター」は、核酸を輸送することが可能な組み換えウイルス粒子を意味する。

20

【0016】

本説明中で用いる場合、用語「発現」は、そのプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳として定義される。

使用

「遺伝子療法」は、欠陥突然変異体対立遺伝子が機能的対立遺伝子により置き換えられる、疾患、典型的には遺伝性疾患を治療するための対象細胞および/または組織への遺伝子の挿入である。

【0017】

「治療する」、「治療」および「療法」とは、生物学的障害および/またはその付随する症状のうちの少なくとも1つを軽減または撤回する方法を意味する。

30

用語「対象」、「患者」、「個体」などは、本説明中で相互に交換可能に用いられ、本説明中に記載される方法に適しているいずれかの動物を意味する。特定の非限定的な態様では、対象、患者または個体はヒトである。前記対象は、いずれかの年齢の男性または女性であり得る。

【0018】

「治療有効量」または「有効量」とは、治療対象の疾患の症状のうちの1つまたは複数をおある程度まで軽減するであろう、投与対象の治療剤の量を意味する。

発明の詳細な説明

核酸

一側面では、本発明は、配列番号7、配列番号8または配列番号9から選択されるアミノ酸配列を含む、FV I I I - B D D (Bドメイン欠失型凝固第V I I I因子)および異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする単離された核酸に関する。

40

【0019】

「単離された」核酸分子は、少なくとも1種の核酸分子不純物から特定および分離されるものである。単離された核酸分子は、天然条件下で見出される形態またはセットとは異なる。つまり、単離された核酸分子は、天然条件下で細胞中に存在する核酸分子とは異なる。

【0020】

シグナルペプチドは、標的細胞小器官への細胞内の目的のタンパク質の輸送を提供するか、または細胞間空間への目的のタンパク質の分泌を促進する。

50

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号5のアミノ酸配列を有するF V I I I - B D Dおよび配列番号2のアミノ酸配列を有するF I Xシグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。

【0021】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号5のアミノ酸配列を有するF V I I I - B D Dおよび配列番号3のアミノ酸配列を有する免疫グロブリンG鎖シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。

【0022】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号5のアミノ酸配列を有するF V I I I - B D Dおよび配列番号4のアミノ酸配列を有するラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。 10

【0023】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号7のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。配列番号7のアミノ酸配列を有する所与の融合タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列を有するF V I I I - B D Dおよび配列番号2のアミノ酸配列を有するF I Xシグナルペプチドを含む。

【0024】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号8のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。配列番号8のアミノ酸配列を有する所与の融合タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列を有するF V I I I - B D Dおよび配列番号3のアミノ酸配列を有する免疫グロブリンG鎖シグナルペプチドを含む。 20

【0025】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号9のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。配列番号9のアミノ酸配列を有する所与の融合タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列を有するF V I I I - B D Dおよび配列番号4のアミノ酸配列を有するラクトアルブミンシグナルペプチドを含む。

【0026】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号11のヌクレオチド配列である。所与の核酸は、配列番号7のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D DおよびF I Xシグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。 30

【0027】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号12のヌクレオチド配列である。所与の核酸は、配列番号8のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよび免疫グロブリンG鎖シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。

【0028】

一部の態様では、単離された核酸は、配列番号13のヌクレオチド配列である。所与の核酸は、配列番号9のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D Dおよびラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする。 40

発現カセット、発現ベクター、

一側面では、本発明は、F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする上記核酸を含む発現カセットに関する。

【0029】

本明細書中で用いる場合、用語「～を発現するカセット」または「発現カセット」とは、特に、適切な設定において、その配列が前記発現カセット中に含まれる目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を生起することが可能であるDNA断片を意味する。宿主細胞へと導入された場合、発現カセットは、とりわけ、細胞機構に目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをRNAへと転写させることが可能であり、R 50

N A は、典型的には続いてさらにプロセシングされて、最終的には目的のポリペプチドへと翻訳される。発現カセットは、発現ベクター中に含まれることができる。

【 0 0 3 0 】

本発明の発現カセットは、エレメントとしてプロモーターを含む。本明細書中で用いる場合、用語「プロモーター」とは、特に、プロモーターが作動可能に連結されるポリヌクレオチドの転写を促進する DNA エレメントを意味する。プロモーターは、プロモーター/エンハンサーエレメントの一部をさらに形成することができる。「プロモーター」エレメントと「エンハンサー」エレメントとの間の物理的境界は常に明確ではなく、用語「プロモーター」とは、典型的には、RNA ポリメラーゼおよび/またはいずれかの関連する因子が結合し、転写が開始される核酸分子上の部位を意味する。エンハンサーは、時間的ならびに空間的にプロモーター活性を増強する。多数のプロモーターが、広範囲の細胞タイプにおいて転写活性であることが当技術分野で公知である。プロモーターは、構成的に機能するものおよび誘導または抑制解除により調節されるものの 2 つのクラスへと分けることができる。両方のクラスが、タンパク質発現に対して好適である。真核細胞における、特に哺乳動物細胞におけるポリペプチドの高レベル生成のために用いられるプロモーターは、強力であり、かつ好ましくは広範囲の細胞タイプにおいて活性であるべきである。多数の細胞タイプにおける発現を駆動することが可能である強力な構成的プロモーターが当技術分野で周知であり、したがって、本明細書中でそれらを詳細に説明する必要はない。

10

【 0 0 3 1 】

本発明の一態様に従えば、H L P プロモーターが、本発明の発現カセットにおいて用いられる。

20

一部の態様では、発現カセットは、5' 末端から 3' 末端の方向で以下のエレメントを含む：

左側（第 1）I T R（逆位末端反復）；

プロモーター；

F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする上記核酸のうちのいずれか 1 つ；

ポリアデニル化シグナル；

右側（第 2）I T R。

30

【 0 0 3 2 】

発現カセットの上記構造エレメントは、互いに作動可能に連結される。

本明細書中で用いる場合、用語「作動可能に連結される」とは、機能的関係でのポリヌクレオチド（またはポリペプチド）エレメントの連結を意味する。別の核酸配列との機能的関係条件で存在する場合に、核酸は「作動可能に連結」されている。例えば、コード配列の転写に影響を及ぼす場合に、転写調節配列はコード配列へと作動可能に連結されている。用語「作動可能に連結される」とは、連結される対象である DNA 配列同士が典型的には連続的であり、2 つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合にも連続的であり、かつリーディングフレーム中に存在することを意味する。

【 0 0 3 3 】

一部の態様では、発現カセットは、配列番号 1 4 のヌクレオチド配列を有する左側（第 1）I T R を含む。

40

一部の態様では、発現カセットは、配列番号 1 5 のヌクレオチド配列を有する H L P プロモーターを含む。

【 0 0 3 4 】

一部の態様では、発現カセットは、配列番号 1 6 のヌクレオチド配列を有するポリアデニル化シグナルを含む。

一部の態様では、発現カセットは、配列番号 1 7 のヌクレオチド配列を有する右側（第 2）I T R を含む。

【 0 0 3 5 】

50

一部の態様では、発現カセットは、5'末端から3'末端の方向で以下のエレメントを含む：

配列番号14のヌクレオチド配列を有する左側(第1)ITR(逆位末端反復)；

配列番号15のヌクレオチド配列を有するプロモーター；

FV I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする上記核酸のうちのいずれか1つ；

配列番号16のヌクレオチド配列を有するポリアデニル化シグナル；

配列番号17のヌクレオチド配列を有する右側(第2)ITR。

【0036】

一側面では、本発明は、FV I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする上記核酸のうちのいずれか1つ、または上記発現カセットのうちのいずれか1つを含む発現ベクターに関する。 10

【0037】

本発明の一部の態様では、ベクターは、プラスミド、すなわち、中に追加のDNAセグメントを挿入することができる、DNAの環状二本鎖小片である。

本発明の一部の態様では、ベクターは、追加のDNAセグメントをウイルスゲノム中に挿入することができる、ウイルス(発現)ベクターである。

【0038】

本発明の一部の態様では、ベクターは、ベクターが導入される宿主細胞における自律的複製が可能である(例えば、細菌の複製起点部位を有する細菌ベクターおよびエピソームベクター)。本発明のさらなる態様では、ベクター(例えば、非エピソームベクター)は、宿主細胞の導入に際して宿主細胞のゲノムへとインテグレートされることができ、それにより、宿主遺伝子と共に複製される。さらに、一部のベクターは、ベクターが作動可能に連結される遺伝子の発現に向かわせることが可能である。そのようなベクターは、本明細書中で「組み換え発現ベクター」(または簡潔に「発現ベクター」と称される。 20

【0039】

発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、植物ウイルス、例えば、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、コスミド、YAC、EBVなどが挙げられる。ベクター内の転写および翻訳制御配列がDNAの転写および翻訳を調節するそれらの意図される機能を果たすように、DNA分子をベクター中へと挿入することができる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞と適合性であるように選択することができる。DNA分子は、標準的方法(例えば、相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション)により、発現ベクター中へと導入することができる。 30

【0040】

一部の態様では、発現ベクターは、組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV)である。

一部の態様では、AAVは、以下のAAV血清型をはじめとする群より選択される：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、rAAV.rh8、rAAV.rh10、rAAV.rh20、rAAV.rh39、rAAV.Rh74、rAAV.RHM4-1、AAV.hu37、rAAV.Anc80、rAAV.Anc80L65、rAAV.7m8、rAAV.PHP.B、rAAV2.5、rAAV2tYF、rAAV3B、rAAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15またはAAV.HSC16。 40

【0041】

本発明の一部の態様では、ベクターまたはカセットは、発現制御配列を含むことができる。本説明中で用いる場合、用語「発現制御配列」とは、挿入されるコード配列の発現お 50

よびプロセッシングを達成するために必要であるポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列の選択をはじめとする発現ベクターまたはカセットの設計は、形質転換される宿主細胞のタイプの選択、タンパク質の発現の要求レベルなどの因子に依存し得ることが、当業者により理解されるであろう。発現制御配列としては、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター配列およびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的RNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を強化する配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）；タンパク質安定性を強化する配列；ならびに、所望の場合、タンパク質分泌を強化する配列が挙げられる。そのような制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なり；原核生物では、そのような制御配列は、一般的にプロモーター、リボソーム結合性部位、および転写終結配列を含み；真核生物では、そのような制御配列は、典型的にはプロモーターおよび転写終結配列を含む。哺乳動物における発現宿主細胞に対する好ましい発現制御配列としては、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター/エンハンサーなど)、シミアンウイルス40(SV40)(SV40プロモーター/エンハンサーなど)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、ポリオーマウイルスに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーならびにTTTプロモーター、生来型免疫グロブリンプロモーター、アクチンプロモーター、およびHLP(ハイブリッド肝臓特異的プロモーター)などの強力な哺乳動物プロモーターなどの、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を確実にするウイルスエレメントが挙げられる。発現制御配列は、その存在が発現およびプロセッシングに対して重要である少なくともすべての構成要素を包含する。

10

20

#### 【0042】

上記の遺伝子および発現制御配列に加えて、本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列(例えば、複製起点)および選択マーカー遺伝子などの追加の配列を担持することができる。選択マーカー遺伝子は、中にベクターまたはカセットが導入された宿主細胞の選択を促進する。

#### 【0043】

本発明の一態様では、発現ベクターは、目的の1つもしくは複数のポリヌクレオチド配列、目的の遺伝子、またはパルボウイルス配列もしくは逆位末端反復(ITR)配列に隣接する導入遺伝子を含むベクターに関する。

30

#### 【0044】

本発明のカセットまたはベクターのいずれも、アデノ随伴ウイルスの非構造タンパク質(Rep)および構造タンパク質(Cap)をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を含まない。

#### 宿主細胞

一側面では、本発明は、FVIIII-BDDおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする上記核酸のうちのいずれか1つを含む、FVIIII-BDDおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質を生成させるための、または上記発現ベクターのうちのいずれか1つを生成させるための宿主細胞に関する。

#### 【0045】

本明細書中で用いる場合、用語「宿主細胞」とは、本発明に従う組み換え発現ベクターまたはカセットが導入された細胞を意味する。本発明は、例えば、本発明に従う上記ベクターを含むことができる宿主細胞に関する。「宿主細胞」とは、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫も同様に意味する。突然変異または環境的影響のいずれかに起因する改変が後続世代において起こり得るので、そのような子孫は、実際には親細胞とは同一でない場合があるが；しかしながら、そのような細胞は、それでも本明細書中で用いる場合の用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

40

#### 【0046】

本発明に従う発現ベクターまたはカセットは、哺乳動物細胞、植物細胞、細菌または酵母宿主細胞のトランスフェクションのために用いることができる。トランスフェクション

50

は、宿主細胞へとポリヌクレオチドを導入するいずれかの公知の技術により行うことができる。哺乳動物細胞への異種ポリヌクレオチドの導入のための方法は、当技術分野で周知であり、かつデキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性ポリマー-核酸複合体トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、リボソーム中へのポリヌクレオチドのカプセル封入、および核へのDNAの直接的顕微注入が挙げられる。加えて、核酸分子は、ウイルス（発現）ベクターにより哺乳動物細胞へと導入することができる。

【0047】

形質転換に対する宿主として用いられる哺乳動物細胞株は当技術分野で周知であり、かつ入手可能な複数の不死化細胞株が挙げられる。これらとしては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、FreeStyle293細胞（Invitrogen社）、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、HepG2）、A549細胞、SK-HEP1、HUH7、Hep-RGおよび多数の他の細胞株が挙げられる。細胞株は、細胞株が高発現レベルを有し、かつ生成対象のタンパク質の必要な特徴を提供することを決定することにより選択される。用いることができる他の細胞株は、Sf9またはSf21細胞などの昆虫細胞株である。本発明の組み換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞へと導入される場合、融合タンパク質は、宿主細胞において融合タンパク質を発現するか、または、より好ましくは、宿主細胞が培養される培養培地中へと融合タンパク質を分泌するために十分である期間にわたって宿主細胞を培養することにより生成される。融合タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いて培養培地から単離することができる。植物宿主細胞としては、例えば、タバコ属（Nicotiana）、シロイヌナズナ属（Arabidopsis）、ウキクサ（duckweed）、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモなどが挙げられる。細菌宿主細胞としては、エシェリキア属（Escherichia）およびストレプトマイセス属（Streptomyces）細菌種が挙げられる。酵母宿主細胞としては、シゾサッカロマイセス・ボンベ（Schizosaccharomyces pombe）、サッカロマイセス・セレビスエ（Saccharomyces cerevisiae）およびピキア・パストリス（Pichia pastoris）が挙げられる。

【0048】

上記宿主細胞は、ヒト胚を用いて生成される宿主細胞を意味しない。

上記宿主細胞は、ヒト生殖系列細胞の遺伝的完全性を改変することにより生成される宿主細胞を意味しない。

医薬組成物

一側面では、本発明は、上記発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか1つを含む、標的細胞へとFVIIIBDD遺伝子を送達するための医薬組成物に関する。

【0049】

一部の態様では、標的細胞へとFVIIIBDD遺伝子を送達するための医薬組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせた上記発現ベクターまたはカセットのうちのいずれか1つを含む。

【0050】

上記組成物中の活性物質は、有効量で、例えば、生物学的有効量で存在する。

「医薬組成物」とは、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか1つおよび薬学的に許容されかつ薬理的に適合性である賦形剤、充填剤、溶媒、希釈剤、担体、助剤、分配剤、または送達剤からなる群より選択される成分のうちの少なくとも1つを含む組成物を意味する。

【0051】

本発明の医薬組成物およびその調製方法は、当業者には疑いなく明らかであろう。医薬組成物は、好ましくは、GMP（適正製造規範）要件に従って製造されるべきである。

医薬組成物の一部の態様では、医薬組成物は、バッファー組成物、等張化剤（浸透圧調

10

20

30

40

50

節物質または浸透剤)、安定化剤および/または可溶化剤を含むことができる。

【0052】

「薬学的に許容される」とは、生物学的または他の負の副作用を有しない物質を意味し、例えば、物質は、いかなる望ましくない生物学的作用も引き起こすことなく対象へと投与することができる。つまり、そのような医薬組成物は、例えば、細胞のエクスピトランスフェクションにおいてまたは対象への直接的な本発明の上記発現ベクターのうちのいずれか1つのインピボ投与において用いることができる。

【0053】

用語「賦形剤」は、本発明の上記成分以外のいずれかの成分を説明するために本明細書中で用いられる。これらは、必要な物理化学特性を薬物製品に与えるために、医薬生産/製造において用いられる、無機的または有機的性質の物質である。

10

【0054】

本発明に従う医薬組成物は、安定な組成物である。

活性薬剤が、保存温度、例えば、2~8での明記される保存寿命中にその物理的安定性および/または化学的安定性および/または生物学的活性を保持する場合に、医薬組成物は「安定」である。好ましくは、活性薬剤は、物理的および化学的安定性の両方、ならびに生物学的活性を保持する。保存期間は、加速または自然劣化条件での安定性試験の結果に基づいて調整される。

【0055】

一部の態様では、医薬組成物は、静脈内投与用の溶液である。

20

一部の態様では、医薬組成物は、静脈内投与用の溶液の調製のための濃縮物である。

使用

一側面では、本発明は、標的細胞へとFV III - B D D遺伝子を送達するための上記発現カセットもしくはベクターまたは上記組成物のうちのいずれか1つの使用に関する。

【0056】

一側面では、本発明は、血友病Aを有しかつ/またはFV III遺伝子の機能的コピーを有しない対象へとFV III - B D Dタンパク質を提供するための上記発現カセットもしくはベクターまたは上記組成物のうちのいずれか1つの使用に関する。

【0057】

FV III遺伝子の機能的コピーの欠如とは、FV III遺伝子の機能の喪失または欠陥を生じる、ゲノム中のFV III遺伝子の全コピーにおける不活性化突然変異または欠失を意味する。

30

【0058】

一側面では、本発明は、FV III - B D Dタンパク質の提供を必要とする対象の細胞へと治療有効量の上記発現ベクターまたは上記組成物のうちのいずれか1つを導入するステップを含む、血友病Aを有する対象へとFV III - B D Dタンパク質を提供するための方法に関する。

【0059】

一側面では、本発明は、対象の細胞へと上記発現ベクターまたは上記組成物のうちのいずれか1つを導入するステップを含む、血友病Aを有する対象の標的細胞へとFV III - B D D遺伝子を送達する方法に関する。

40

【0060】

標的細胞へとFV III - B D D遺伝子を送達する必要がある対象またはFV III - B D Dタンパク質を提供される必要がある対象とは、血友病Aを有する対象、または凝固第FV III因子の欠陥を有する対象、またはFV III遺伝子の機能における喪失もしくは欠陥をもたらすFV III遺伝子中の不活性化突然変異もしくは欠失を有する対象を意味する。

【0061】

一側面では、本発明は、血友病Aを有する対象において血友病Aを治療するための上記発現ベクターまたは上記組成物のうちのいずれか1つの使用に関する。

50

一側面では、本発明は、血友病 A を有する対象へと治療有効量の上記発現ベクターまたは上記組成物のうちのいずれか 1 つを投与するステップを含む、対象において血友病 A を治療するための方法に関する。

【0062】

一部の態様では、血友病 A は、重症血友病 A (1%未満の第 V I I I 因子活性) または中等症血友病 A (1~5%の第 V I I I 因子活性) である。

例示的な投与様式としては、局所塗布、鼻内、吸入、経粘膜、経皮、腸内 (例えば、経口、直腸)、非経口 (例えば、静脈内、皮下、皮内、筋肉) 投与、ならびに直接的な組織もしくは器官内注入が挙げられる。

【0063】

使用の一部の態様では、上記発現ベクターまたは上記組成物のうちのいずれか 1 つは、静脈内輸液として対象に投与される。

上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つは、有効量で生物へと投与される。上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つは、好ましくは、生物学的有効量で生物へと投与される。発現ベクターの「生物学的有効」量は、細胞形質導入および細胞における核酸配列の発現を引き起こすために十分である量である。発現ベクターがインピボで細胞へと投与される場合、発現ベクターの「生物学的有効」量は、標的細胞の形質導入および標的細胞における核酸配列の発現を引き起こすために十分である量である。

【0064】

本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つの投与量は、特定のベクターの投与様式に依存し、かつ慣用の様式で決定することができる。

本発明に従う上記発現カセットまたはベクターのうちのいずれか 1 つを投与するための細胞は、限定するものではないが、上皮細胞 (例えば、皮膚、呼吸器および腸上皮細胞)、肝細胞、筋肉細胞、膵臓細胞 (島細胞を含む)、肝細胞、脾臓細胞、線維芽細胞、内皮細胞などをはじめとする、いずれかのタイプの細胞であり得る。

【0065】

本発明に従う上記発現カセットまたはベクターのうちのいずれか 1 つは、ヒト生殖系列細胞の遺伝的完全性を改変するために用いられない。

使用の一部の態様では、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つ、ならびにそれに基づく製品は、単剤療法として用いられる。

【0066】

使用の一部の態様では、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つ、ならびにそれに基づく製品は、凝固因子濃縮物、デスマプレシンおよび/または線維素溶解阻害剤を用いる補充療法と組み合わせて用いられる。

【0067】

使用の一部の態様では、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つ、ならびにそれに基づく製品は、モノクローナル抗体 (例えば、エミシズマブ) と組み合わせて用いられる。

【0068】

使用の一部の態様では、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つ、ならびにそれに基づく治療剤は、RNA 干渉治療剤 (例えば、フィツシラン) と組み合わせて用いられる。

【0069】

使用の一部の態様では、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つ、ならびにそれに基づく製品は、対象へと 1 回投与される。

使用の一部の態様では、本発明に従う上記発現ベクターのうちのいずれか 1 つ、ならびにそれに基づく製品は、対象へと繰り返し投与される。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図 1】図 1 は、野生型 F V I I I シグナルペプチドを含む F V I I I - B D D をコード

10

20

30

40

50

する核酸と比較した場合の、F V I I I - B D D ( Bドメイン欠失型凝固第V I I I因子 ) および異種シグナルペプチドのうちの1つに基づく融合タンパク質をコードする核酸を用いるトランスフェクション後の、培養液中へのF V I I I - B D Dタンパク質生成のレベルの増大を示すグラフである。1は、配列番号6のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよび天然に存在するF V I I Iシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。2は、配列番号7のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D DおよびF I Xシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。3は、配列番号9のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよびラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。4は、配列番号8のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよび免疫グロブリンG鎖シグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - I g G K - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。

10

【図2】図2は、野生型F V I I Iシグナルペプチドを含むF V I I I - B D Dをコードする核酸と比較した場合の、F V I I I - B D D ( Bドメイン欠失型凝固第V I I I因子 ) および異種シグナルペプチドのうちの1つに基づく融合タンパク質をコードする核酸を用いるトランスフェクション後の、培養液中のF V I I I - B D Dタンパク質活性のレベルの増大を示すグラフである。1は、配列番号6のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよび天然に存在するF V I I Iシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D D活性レベルである。2は、配列番号7のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D DおよびF I Xシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D D活性レベルである。3は、配列番号9のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよびラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D D活性レベルである。4は、配列番号8のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよび免疫グロブリンG鎖シグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - I g G K - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いる細胞トランスフェクション後のF V I I I - B D D活性レベルである。

20

30

【図3】図3は、野生型F V I I Iシグナルペプチドを含むF V I I I - B D Dをコードする核酸を含むr A A V発現ベクターと比較した場合の、F V I I I - B D Dおよび異種シグナルペプチドのうちの1つに基づく融合タンパク質をコードする核酸を含むr A A V発現ベクターの形態での核酸をインピット口で送達する場合のF V I I I - B D Dタンパク質生成のレベルの増大を示すグラフである。1は、配列番号6のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよび天然に存在するF V I I Iシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる細胞形質導入後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。2は、配列番号7のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D DおよびF I Xシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる細胞形質導入後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。3は、配列番号9のアミノ酸配列を有する、ヒトF V I I I - B D Dおよびラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる細胞形質導入後のF V I I I - B D Dタンパク質レベルである。

40

【図4】図4は、野生型F V I I Iシグナルペプチドを含むF V I I I - B D Dをコード

50

する核酸を含む r A A V 発現ベクターと比較した場合の、F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドのうちの 1 つに基づく融合タンパク質をコードする核酸を含む r A A V 発現ベクターの形態での核酸をインビトロで送達する場合の F V I I I - B D D タンパク質活性のレベルの増大を示すグラフである。1 は、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する、ヒト F V I I I - B D D および天然に存在する F V I I I シグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる細胞形質導入後の F V I I I - B D D 活性レベルである。2 は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D D および F I X シグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる細胞形質導入後の F V I I I - B D D 活性レベルである。3 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、ヒト F V I I I - B D D およびラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる細胞形質導入後の F V I I I - B D D 活性レベルである。

10

【図 5】図 5 は、r A A V 発現ベクターの形態で、B 6 . 1 2 9 S - F 8 t m 1 S m o c ( H e m A ) マウスに対してインビボで F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドのうちの 1 つに基づく融合タンパク質をコードする核酸を送達する場合の、F V I I I - B D D タンパク質のレベルの増大を示すグラフである。1 は、A A V を含まない対照溶液 ( 陰性対照 ) を注入した後の動物の血漿中での F V I I I - B D D タンパク質レベルである。2 は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する、F V I I I - B D D および F I X シグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを注入した後の動物の血漿中での F V I I I - B D D タンパク質レベルである。3 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、ヒト F V I I I - B D D およびラクトアルブミンシグナルペプチドに基づく融合タンパク質 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を含む発現ベクターを注入した後の動物の血漿中での F V I I I - B D D タンパク質レベルである。

20

【発明を実施するための形態】

【0071】

【実施例】

【0072】

30

以下の実施例は、本発明のより良い理解のために提供される。これらの実施例は、例示のみの目的のためのものであり、いかなる様式でも本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0073】

本明細書中で引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、参照により本明細書中に組み入れられる。上述の発明は理解の明確性の目的のために例示および実施例によって幾分か詳細に説明されてきたが、添付の態様の精神または範囲から逸脱することなく、それに対してある程度の変更および改変を行うことができることが、本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかになるであろう。

材料および一般的方法

40

組み換え DNA 技術

Sambrook, J. ら、Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press 社、Cold Spring Harbor、New York、1989 に記載される通りに、DNA を操作するために標準的な方法を用いた。分子生物学の試薬は、製造業者のプロトコールに従って用いた。簡潔には、プラスミドが細胞集団において失われないように選択的抗生物質圧の下で生育された大腸菌 ( E . c o l i ) 細胞において、さらなる操作のためにプラスミド DNA を生成させた。本発明者らは、市販のキットを用いて細胞からプラスミド DNA を単離し、濃度を測定し、かつ制限エンドヌクレアーゼ処理または PCR 増幅によるクローニングのためにこれを用いた。リガーゼを用いて

50

DNA断片を互いにライゲーションし、クローンの選択およびさらなる生成のために細菌細胞へと形質転換した。すべての得られた遺伝子構築物を、制限パターンおよび完全サンガーシーケンシングにより確認した。

#### 遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントを、化学合成により製造したオリゴヌクレオチドから調製した。固有制限部位が隣接した300～1000bp長の遺伝子断片を、互いに重複するオリゴヌクレオチドの再生により収集し、それに続いて境界プライマーからのPCR増幅を行った。結果として、所望のものを含む断片の混合物が生成された。中間ベクターへと制限部位において断片をクローニングし、その後、サブクローニングした断片のDNA配列を、DNA配列決定により確認した。

10

#### DNA配列決定

DNA配列を、サンガーシーケンシングにより決定した。DNAおよびタンパク質配列を分析し、配列データを、配列作成、マッピング、解析、注釈付けおよび図示のために、SnapGene Viewer 4.2以上において処理した。

#### 細胞培養物の培養

実験は、以下の細胞株を用いた：HEK293（ヒト胎児腎臓クローン293）、HUH7（ヒト肝細胞癌細胞株）およびHepG2（ヒト肝細胞癌細胞株）。AAVを生成させるために用いた懸濁化HEK293細胞を、FBSおよび抗生物質を含まない完全培養培地において37℃および5%CO<sub>2</sub>での標準的条件下で培養した。AAV生成物の有効性を試験するために用いた接着HUH7およびHepG2細胞を、10%FBS、抗生物質/抗真菌剤を添加した完全DMEM培地において37℃および5%CO<sub>2</sub>での標準的条件下で培養した。HUH7およびHepG2細胞を、80～90%コンフルエンスに達した時点で継代培養した。細胞単層を分散するために、TrypLE Select 酵素（10×）を用いた。トリパンブルー染色および自動Countess IIカウンターを用いるディスポーザブル細胞計数チャンバーを用いて、細胞生存率を評価した。

20

#### 細胞培養物のトランスフェクション

トランスフェクション後に融合タンパク質の新規変異体の機能性を評価するために、本発明者らは、hFVII-BDD導入遺伝子の様々な変異体を発現させるための発現カセットを含むプラスミドを用いた。HepG2細胞株を、10,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で12ウェルプレートのウェル中へと事前播種した。1日間後、同じコピー数を有するプラスミドを、Lipofectamine 3000を用いて複合体へと導入した。トランスフェクション後の7日目に、培養液中のFVII-BDDタンパク質のレベルおよび活性を、ELISAおよび発色アッセイにより決定した。培養液中のFVII-BDDタンパク質のレベルおよび活性の評価を含む研究を、6回の独立した実験において行った。無傷のHepG2細胞を、陰性対照として用いた。

30

#### AAVに基づく発現ベクターのアセンブリおよび精製

FVII-BDD遺伝子のコドン最適化型変異体を含むAAV発現ベクターをアセンブリさせるために、本発明者らは、以下の通りの3種類のプラスミドを用いてトランスフェクトしたHEK293プロデューサー細胞を用いた：

- 1) hFVII-BDD導入遺伝子の様々な変異体を発現させるためのAAV発現カセットを含むプラスミド；
- 2) AAV6血清型Cap遺伝子およびAAV2血清型Rep遺伝子を発現させるためのプラスミド。選択的リーディングフレームを用いて、各遺伝子は、数種類のタンパク質産物をコードする；
- 3) AAVカプシドのアセンブリおよびパッケージングに必要なアデノウイルスAd2遺伝子を発現させるためのプラスミド。

40

#### 【0074】

72時間後、細胞を溶解させ、粒子を精製し、ろ過、クロマトグラフィーおよび超遠心分離法を用いて濃縮した。粒子の力価を、プライマーおよび組み換えウイルスゲノムの領域に対して特異的であったサンプルを用いる定量的PCRにより決定し、1mL当たりの

50

ウイルスゲノムのコピー数として表した。

#### 細胞培養物の形質導入

H U H 7 細胞株を、 $10,000$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で 12 ウェルプレート of ウェル中へと事前播種した。細胞が接着基材に付着した後、A A V 調製物を  $500,000$  v g / 細胞の M O I で導入した。形質導入後の 7 日目に、培養液中の F V I I I - B D D タンパク質のレベルおよび活性を、E L I S A および発色アッセイにより決定した。培養液中の F V I I I - B D D タンパク質のレベルおよび活性の評価を含む研究を、6 回の独立した実験において行った。無傷の細胞を、陰性対照として用いた。

#### E L I S A による凝固因子 V I I I - B D D タンパク質の量の決定

H e p G 2 細胞株トランスフェクションおよび H U H 7 細胞株形質導入後の培養液中、ならびに標的候補を用いる動物 ( マウス ) の注入後の血漿中の血液凝固因子 V I I I - B D D タンパク質の含有量を、非競合的固相酵素免疫アッセイ ( E L I S A ) のサンドイッチ法により評価した。簡潔には、希釈バッファー中に希釈したサンプルを、凝固因子 V I I I - B D D に対して特異的な一次抗体を用いて感作した 96 ウェルプレートウェルへと導入した。同じプレートに、較正曲線をプロットするための標準、対照をロードした。プレートを  $37$  の温度で 1 時間インキュベートした。ビオチン化抗体、ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲートの溶液および T M B の導入に先立って、洗浄バッファーを用いてプレートウェルを洗浄した。因子 V I I I - B D D に対して特異的なビオチン化検出抗体を含有する溶液を導入し、プレートを  $37$  の温度で 30 分間インキュベートした。続いて、ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート溶液を得られた複合体に添加し、プレートを  $37$  の温度で 30 分間インキュベートした。酵素反応を可視化するために、T M B 溶液を導入した。必要な程度の染色強度が達成されたら、停止溶液をすべてのウェルに添加し、反応を停止させた。続いて、プレートウェル中の溶液の光学密度を測定した。試験サンプル中の凝固因子 V I I I - B D D の濃度を、サンプルの予備的希釈を考慮して、較正曲線により決定した。

#### E L I S A による凝固因子 V I I I - B D D タンパク質の活性レベルの決定

標的候補を用いる H e p G 2 細胞のトランスフェクションおよび H U H 7 細胞の形質導入後の培養液中の凝固第 V I I I 因子タンパク質の活性を、発色アッセイにより評価した。アッセイは、カルシウムイオン、リン脂質および第 I X a 因子の存在下では、第 X 因子が活性化型 X a へと変換し、第 V I I I 因子が反応における補因子として機能し、かつ第 X 因子活性化の速度は第 V I I I 因子のレベルと直線的に関連するという事実に基づく。簡潔には、希釈バッファー中に希釈した培養液サンプル、較正曲線をプロットするための標準および対照を、96 ウェルプレートのウェルへと導入した。プレートを  $37$  の温度で 3 分間インキュベートした。第 I X a 因子、第 X 因子、トロンピン、C a C l<sub>2</sub> およびリン脂質を含む因子試薬溶液を、プレートのすべてのウェルへと導入した。プレートを  $37$  の温度で 4 分間インキュベートした。発色基質 S - 2765 + I - 2581 の溶液を、プレートのすべてのウェルへと導入した。プレートを  $37$  の温度で 7 分間インキュベートした。必要な程度の染色強度が達成されたら、酢酸の 20% 溶液をすべてのウェルに添加し、反応を停止させた。続いて、プレートウェル中の溶液の光学密度を測定した。試験サンプル中の凝固第 V I I I 因子の活性を、サンプルの予備的希釈を考慮して、較正曲線により決定した。

#### 実験動物に対するインビボ研究

F V I I I に欠陥がある B 6 . 129 S - F 8 t m 1 S m o c ( H e m A ) マウス ( 雄性、6 ~ 8 週齢 ) を実験に対して用いた。尾静脈への単回静脈内注入を用いて、生成物を動物に投与した。A A V を含まないバッファー溶液を、動物の陰性対照群へと投与した。血漿サンプル採取を、生成物の投与前の注入の日、続いて発現ベクターの導入後の 14 日目および 56 日目に行った。

#### 統計学的データ解析

結果は平均値  $\pm$  標準偏差 ( S D ) を示し、一元配置分散分析 ( A N O V A ) およびそれに続くダネットの多重ペアワイズ比較を用いて実験結果を比較し、統計学的に有意である

ことが決定された。

【0075】

実施例 1

タンパク質 F V I I I - B D D ( B ドメイン欠失型凝固第 V I I I 因子 ) の分泌のレベルを増大させるために、配列番号 2 ( S P - F I X ) または配列番号 3 ( S P - I g G K ) または配列番号 4 ( S P - ラクトアルブミン ) に規定されるアミノ酸配列に対応するシグナルペプチドによって野生型 F V I I I シグナルペプチドの配列を置換することにより、配列番号 6 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) の配列を改変し、配列番号 7 ( S P - F I X - F V I I I - B D D )、配列番号 8 ( S P - I g G K - F V I I I - B D D ) および配列番号 9 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) のアミノ酸配列

10

に対応する融合タンパク質の生成をもたらした。

【0076】

配列番号 7、配列番号 8 または配列番号 9 から選択されるアミノ酸配列を含む、F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドのうちの 1 つに基づく融合タンパク質をコードする得られた核酸を、配列番号 14 の配列に対応する左側 ( 第 1 ) I T R ( 逆位末端反復 )、H L P プロモーター ( 配列番号 15 )、目的の遺伝子、ポリアデニル化シグナル ( 配列番号 16 )、右側 ( 第 2 ) I T R ( 配列番号 17 ) からなる発現カセット中でのインビトロ細胞トランスフェクションの間に試験し、目的の遺伝子は配列番号 10 ~ 13 の配列のうちの 1 つである。対照として、本発明者らは、配列番号 10 の配列に対応する天然に存在する F V I I I - B D D シグナルペプチドを含むヒト F V I I I - B D D タンパク質

20

( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) をコードする核酸を用いた。

【0077】

配列番号 6 の天然に存在するペプチドを含む F V I I I - B D D タンパク質 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) をコードする配列番号 10 の核酸の使用と比較した場合に、配列番号 7 ~ 9 の配列を有する、F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドのうちの 1 つに基づく融合タンパク質をコードする配列番号 11 ~ 13 のすべての核酸の使用により、F V I I I - B D D タンパク質の生成 ( 図 1 ) および活性 ( 図 2 ) レベルの増大をもたらされた。さらに、配列番号 10 の核酸 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) の使用と比較した場合に、トランスフェクション後に生じた培養液中の F V I I I - B D D タンパク質生成のレベルにおける驚くほどの増大が、4.3 倍の増大を伴う配列番号 11 の配列 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) により、1.3 倍の増大を伴う配列番号 12 の配列 ( S P - I g G K - F V I I I - B D D ) により、および 4.9 倍の増大を伴う配列番号 13 の配列 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) により示された。本発明者らは、トランスフェクション後に生じた培養液中の F V I I I - B D D 活性における類似の結果を観察した：配列番号 10 の核酸 ( S P - F V I I I - F V I I I - B D D ) と比較した場合に、配列番号 11 ( S P - F I X - F V I I I - B D D ) ( 8.6 倍増大 )、配列番号 12 ( S P - I g G K - F V I I I - B D D ) ( 1.9 倍増大 ) および配列番号 13 ( S P - ラクトアルブミン - F V I I I - B D D ) ( 7.2 倍増大 ) の核酸に対して、驚くほどの増大が観察された。F V I I I - B D D タンパク質生成結果と活性結果との間で観察された対応は、配列番号 2 ( S P - F I X )、または配列番号 3

30

( S P - I g G K )、または配列番号 4 ( S P - ラクトアルブミン ) のアミノ酸配列に対応するシグナルペプチドによる天然に存在する F V I I I - B D D シグナルペプチドの置換が、F V I I I - B D D タンパク質生成および活性における著しい増大をもたらし、かつ F V I I I - B D D タンパク質機能性に影響しないことを示す。

40

【0078】

つまり、配列番号 7、配列番号 8 または配列番号 9 から選択されるアミノ酸配列を含む、F V I I I - B D D および異種シグナルペプチドのうちの 1 つに基づく融合タンパク質をコードする得られた核酸は、宿主細胞におけるインビトロでの F V I I I - B D D タンパク質発現を引き起こすことが可能であり、かつ血友病 A の療法のためのプロドューサー細胞における組み換え F V I I I - B D D タンパク質の生成に関して高い可能性を有する

50

## 【0079】

## 実施例2

本発明者らは、配列番号7~9から選択されるアミノ酸配列を含む、FV IIII-BDDおよび異種シグナルペプチドに基づく融合タンパク質をコードする配列番号11~13の核酸を含むrAAV発現ベクターを作製した。前記発現ベクターを、HUH7細胞をインビトロで形質導入することにより確認した。対照として、本発明者らは、配列番号6の配列に対応する、天然に存在するFV IIIIシグナルペプチドを含むヒトFV IIII-BDDタンパク質(SP-FV IIII-FV IIII-BDD)をコードする配列番号10の核酸を含むrAAV発現ベクターを用いた。

10

## 【0080】

配列番号10の核酸を含む発現ベクター(SP-FV IIII-FV IIII-BDD)の使用と比較した場合に、配列番号11~13の核酸を含む発現ベクターの使用により、FV IIII-BDDタンパク質生成(図3)および活性(図4)レベルの増大がもたらされた。さらに、配列番号10の核酸(SP-FV IIII-FV IIII-BDD)を含む発現ベクターの使用と比較した場合に、形質導入後に生じた培養液中のFV IIII-BDDタンパク質生成のレベルにおける驚くほどの増大が、2.7倍の増大を伴う配列番号11の配列(SP-FIX-FV IIII-BDD)を含む発現ベクター、2.4倍の増大を伴う配列番号13の配列(SP-ラクトアルブミン-FV IIII-BDD)を含む発現ベクターにより示された。本発明者らは、形質導入後に生じた培養液中のFV IIII-BDD活性における類似の結果を観察した。本発明者らは、配列番号10の核酸(SP-FV IIII-FV IIII-BDD)を含む発現ベクターと比較した場合に、配列番号11(SP-FIX-FV IIII-BDD)(3.9倍増大)および配列番号13(SP-ラクトアルブミン-FV IIII-BDD)(3.5倍増大)の核酸を含む発現ベクターに対して、驚くほどの増大を観察した。結果は、HepG2細胞をトランスフェクトすることにより生じたデータと合致する。

20

## 【0081】

つまり、配列番号7、配列番号8または配列番号9から選択されるアミノ酸配列を含む、FV IIII-BDDおよび異種シグナルペプチドのうちの1つに基づく融合タンパク質をコードする開発されたrAAV発現ベクターは、インビトロでのFV IIII-BDDタンパク質発現を引き起こすことが可能である。

30

## 【0082】

## 実施例3

配列番号7または配列番号9から選択されるアミノ酸配列を含む、FV IIII-BDDおよび異種シグナルペプチドのうちの1つに基づく融合タンパク質をコードする配列番号11または配列番号13から選択される核酸を含むrAAV発現ベクターのインビボ研究を行うために、本発明者らは、FV IIIIに欠陥があるB6.129S-F8tm1Smoc(Hema)実験マウスを用いた。研究で用いたrAAV生成物の用量は、 $6 \times 10^{13}$ vg/kgであった。AAVを含まない対照溶液を、陰性対照として用いた。生成物を、尾静脈への単回静脈内流体力学投与を用いて動物へと投与した。血漿サンプル採取を、生成物の投与前の注入の日、続いて生成物の導入後の14日目および56日目に行った。血漿サンプル中の凝固因子V IIII-BDDタンパク質のレベルを、上記の通りにELISAにより決定した。

40

## 【0083】

インビボ研究(図5)は、配列番号11または配列番号13から選択される核酸を含む両方のrAAV発現ベクターの使用が、14日目および56日目での動物の血漿中の因子V IIII-BDDのレベルにおける著しい増大を示したことを示した(図5)。配列番号11の核酸を含む発現ベクターを用いた場合、本発明者らは、注入後のそれぞれ14日目および56日目に動物の血漿中の296および504ng/mLでのFV IIII-BDD発現を観察した。配列番号13の核酸を含む発現ベクターを用いた場合、本発明者らは、

50

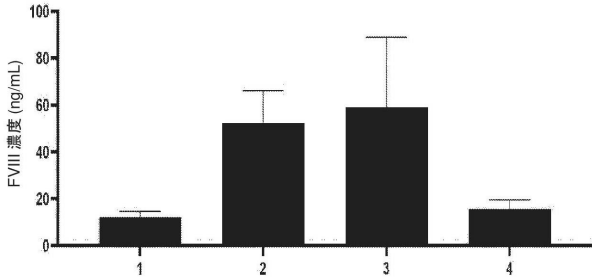
注入後のそれぞれ14日目および56日目に動物の血漿中の270および381 ng/mLでのFVII-BDD発現を観察した。

【0084】

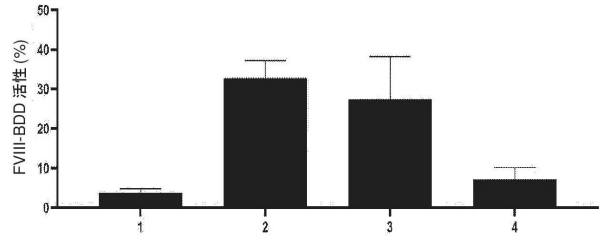
つまり、配列番号7または配列番号9から選択されるアミノ酸配列を含む、FVII-BDDおよび異種シグナルペプチドのうちの1つに基づく融合タンパク質をコードする配列番号11または配列番号13から選択される核酸を含む開発されたrAAV発現ベクターは、インビボでのFVII-BDDタンパク質発現を引き起こすことが可能であり、かつ血友病Aの遺伝子療法に関して高い可能性を有する。

【図面】

【図1】



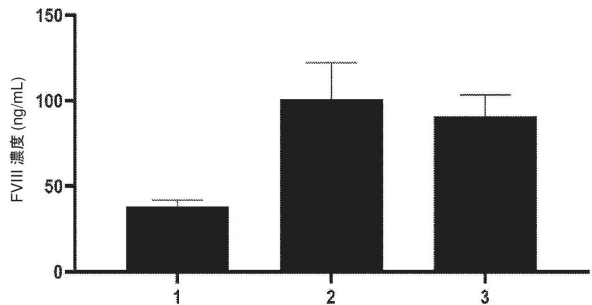
【図2】



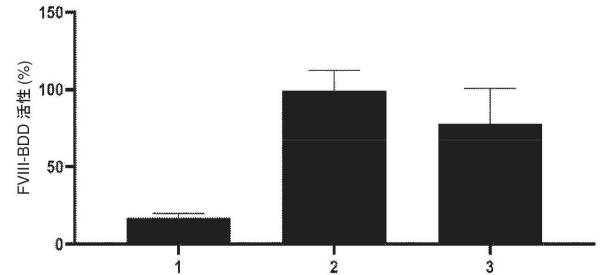
10

20

【図3】



【図4】

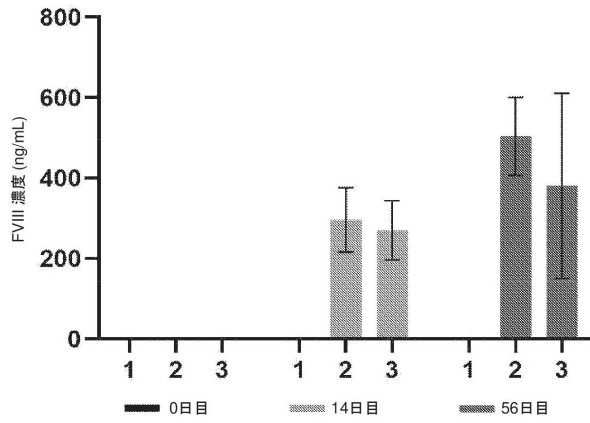


30

40

50

【 図 5 】



10

【 配列表 】

2025515356000001.xml

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.  PCT/RU 2023/050093
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  (see extra sheet)  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)  C12N; C07K; A61K; A61P		
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)  E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, PubMed, USPTO, ScienceDirect		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/084276 A2 (FREELINE THERAPEUTICS LIMITED) 06.05.2021, claims 3, 5, 26, 44, 55, p.3 lines 6-10, p.6 lines 1-5, p.14 lines 31-33, p.16 line 8, p.18 lines 6-7, p.101 lines 21-24, p.108 lines 29-32, c.109 lines 16-18, p.113 lines 19-24, p.122 lines 25-32, p.125, lines 4-6, p.127 lines 23-25, p.130 lines 20-22, p.138 lines 2-3, fig.1	1-20
Y	WO 2021/045541 A1 (OSONG MEDICAL INNOVATION FOUNDATION et al.) 11.03.2021, claim 16, [0008], [207], [208]	1-20
Y	WO 2017/136358 A1 (BIOVERATIV THERAPEUTICS INC.) 10.08.2017, [0008], [0369]	1-20
Y	DATA BANK UniProt: P00740 FA9_HUMAN. [online] 23.03.2010, [retrieved on 31.07.2023] Retrieved from URL: < <a href="https://rest.uniprot.org/unisave/P00740?format=txt&amp;versions=161">https://rest.uniprot.org/unisave/P00740?format=txt&amp;versions=161</a> > amino acids 1-28 P00740 FA9_HUMAN	1-20
Y	DATA BANK UniProt: P01658 KV3A6_MOUSE. [online] 10.08.2010, [retrieved on 31.07.2023] Retrieved from URL: < <a href="https://rest.uniprot.org/unisave/P01658?format=txt&amp;versions=64">https://rest.uniprot.org/unisave/P01658?format=txt&amp;versions=64</a> > amino acids 1-20 P01658 KV3A6_MOUSE	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier document 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  31 July 2023 (31.07.2023)	Date of mailing of the international search report  17 August 2023 (17.08.2023)	
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, 125993, Russian Federation Phone No: +7(499)240-60-15, Fax +7(495)531-63-18	Authorized officer  E. Maximovych  Telephone No. 8-499 (240-25-91)	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2023/050093

C (Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 10137168 B2 (CATALANT PHARMA SOLUTIONS LLC) 27.11.2018, [0010]	1-20
A	WO 2011/069164 A2 (BIOGEN IDEC MA INC) 09.06.2011, claims 80, 90, 93, 96, 97, [0011], [0041], [0043], [0096]	1-20
A	RU 2647769 C2 (ZAKRYTOE AKTSIONERNOE OBSHCHESTVO "BIOKAD") 19.03.2018, p.20 lines 9-13, 43-48	1-20
A	BO WEN et al. Signal peptide replacements enhance expression and secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins. ACTA BIOCHIM BIOPHYS SIN. 2011, v.43, n.2, pp.96-102, Abstract, p.97 Table 1, p.101 left column	1-20
A	STEVEN W. PIPE et al. Hemophilia A gene therapy: current and next-generation approaches. EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY. 06.01.2022, v.22, n.9, pp.1099-1015, Abstract, p.1101, Chapter 1.6. «Hemophilia A - current and future treatment options», p.1101-1102, Chapter 2.1. «Gene therapy overview», Tables 1, 2	1-20

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Classification of subject matter

International application No.

PCT/RU 2023/050093

*C12N 15/62* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C07K 14/755* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 35/76* (2015.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01)

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/RU 2023/050093

**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 filed or furnished:
  - a.  forming part of the international application as filed:
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.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:

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	38/37 (2006.01)	A 6 1 K	38/37
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62

,MC,ME,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,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 泉谷 玲子

- (72)発明者 ペレベルキナ, マリヤ・パブロブナ  
ロシア国 1 9 8 3 2 8 サンクトペテルブルク, ウル・マルシャラ・ザクハロバ, デー . 1 6 , コ  
ルプ . 1 , カーベ ー 6 7
- (72)発明者 ブラソバ, エレナ・ベニアモノブナ  
ロシア国 1 8 6 7 9 1 レスブ . カレリヤ, ゲー・ソルタバラ, ウル・クイビシェバ, デー . 1  
, カーベ ー 3
- (72)発明者 フォミナ, アナスタシーア・ブラディミロブナ  
ロシア国 4 3 2 0 4 2 ゲー . ウルヤノブスク, ウル . スタンコストロイテリー, デー . 1 2 , カ  
ーベ ー 3 2
- (72)発明者 ゲルショビッチ, パベル・ミクハリオビッチ  
ロシア国 1 9 8 3 2 8 サンクトペテルブルク, ペテルゴフスコエ・ショッセ, デー . 4 5 , カ  
ーベ ー 6 2 7
- (72)発明者 マルコバ, ビタリーア・アレクサンドロブナ  
ロシア国 1 9 6 1 2 8 サンクトペテルブルク, ノボイズマイロブスキー, ペーアール - カーテ  
ー, デー . 1 4 アー, カーベ ー 2 1
- (72)発明者 モロゾフ, ドミトリー・パレンチノビッチ  
ロシア国 1 9 0 0 0 0 サンクトペテルブルク, アドミラルテイスキー アール - エヌ, ウル・ボ  
クタムツカヤ, デー . 2 0 , カーベ ー 3

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24  
CA44  
4C076 AA95 BB13 CC14 CC41 EE59  
4C084 AA02 AA03 AA13 BA02 BA08 BA22 BA23 BA41 BA44 CA53  
DC15 MA66 NA05 NA13 ZA531  
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 CA16 CA44 MA66 NA05 NA13  
ZA53