(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-544499
(P2024-544499A)
(43)公表日　令和6年12月3日(2024.12.3)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/755	*(2006.01)*	C07K	14/755	ZNA	4C084
C12N 15/12	*(2006.01)*	C12N	15/12		4C087
C12N 15/864	*(2006.01)*	C12N	15/864	100Z	4H045
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	
A61P 7/04	*(2006.01)*	A61P	7/04		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全28頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-526888(P2024-526888)
(86)(22)出願日　令和4年2月11日(2022.2.11)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月21日(2024.5.21)
(86)国際出願番号　PCT/CN2022/075976
(87)国際公開番号　WO2023/092864
(87)国際公開日　令和5年6月1日(2023.6.1)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2021/133004
(32)優先日　令和3年11月25日(2021.11.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(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　524166927
四川至善唯新生物科技有限公司
ＳＩＣＨＵＡＮ ＲＥＡＬ＆ＢＥＳＴ ＢＩＯＴＥＣＨ ＣＯ．， ＬＴＤ．
中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼
１０／Ｆ， Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｄ２， Ｎｏ． １８， Ｓｅｃｔｉｏｎ ２ Ｓｈｕａｎｇｌｉｕ Ｂｉｏｃｉｔｙ Ｒｏａｄ （Ｍ）， Ｃｈｅｎｇｄｕ Ｔｉａｎｆｕ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏ－Ｔｏｗｎ， Ｃｈｅｎｇｄｕ， Ｓｉｃｈｕａｎ， Ｃｈｉｎａ
(74)代理人　110002077
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　遺伝子工学的改変により得られた、分泌能と凝固活性を向上させた組換えヒト第ＶＩＩＩ因子

(57)【要約】
本発明は、ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＦＶＩＩＩ）のＡ１ドメインに少なくとも２つの置換アミノ酸を含む、遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドに関する。本発明はまた、遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする核酸断片、このような核酸断片を含む発現ベクター又はｒＡＡＶベクター、及び遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドを用いて血友病Ａ型患者を治療する方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＦＶＩＩＩ）のＡ１ドメインに少なくとも２つの置換アミノ酸を含む、遺伝子操作ヒト第ＶＩＩＩ因子ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項２】
置換アミノ酸が、Ａ１ドメインにＬ５０及びＬ１５２を含む、請求項１に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項３】
置換アミノ酸が、Ａ１ドメインにＬ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む、請求項１又は２に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項４】
置換アミノ酸が、Ａ１ドメインにＤ２０、Ｇ２２、Ｉ６１、Ｄ１１５、Ｆ１２９、Ｇ１３２、Ｑ１３９及びＬ１５９からなる群から選択されるアミノ酸置換のうちの１つ又は複数をさらに含む、請求項２又は３に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項５】
Ｄ２０、Ｇ２２、Ｉ６１、Ｄ１１５、Ｆ１２９、Ｇ１３２、Ｑ１３９及びＬ１５９のアミノ酸置換が、それぞれＤ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｉ６１Ｔ、Ｄ１１５Ｅ、Ｆ１２９Ｉ、Ｇ１３２Ｄ、Ｑ１３９Ｅ及びＬ１５９Ｆである、請求項４に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項６】
置換アミノ酸が、Ｄ２０Ｓ、Ｌ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項７】
置換アミノ酸が、Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｌ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項８】
配列番号３、配列番号４、配列番号５、又は配列番号６のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチド。
【請求項９】
請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする、単離された核酸断片。
【請求項１０】
プロモーターに作動可能に連結された請求項９に記載の核酸断片を含む、発現ベクター。
【請求項１１】
プロモーターに作動可能に連結された請求項９に記載の核酸断片を含む、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクター。
【請求項１２】
請求項１０に記載の発現ベクター又は請求項１１に記載のｒＡＡＶベクターを含む、医薬組成物。
【請求項１３】
請求項１２に記載の医薬組成物の有効量を患者に投与することを含む、血友病Ａ型患者を治療するための方法。
【発明の詳細な説明】
【関連出願の相互参照】
【０００１】
本願は、２０２１年１１月２５日に提出されたＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＣＮ２０２１／１３３００４の特許出願の優先権を主張しており、その内容は引用によりすべて本明細書に組み込まれている。
【背景技術】

【０００２】
ヒト第ＶＩＩＩ因子は、Ｘ染色体上に位置するＦ８遺伝子によってコードされるタンパク質であり、２３５１個のアミノ酸から構成される。Ｆ８遺伝子の欠陥により、それがコードするＦＶＩＩＩタンパク質が欠失又は不足してしまう。血友病Ａ型（ＨＡ：Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ａ）は、ＦＶＩＩＩタンパク質の欠如によって引き起こされる遺伝性出血疾患であり、欠陥のあるＦＶＩＩＩの産生、ＦＶＩＩＩ分泌の不足又は欠失による凝固活性の欠失、又は阻害剤によるＦＶＩＩＩへの部分的又は完全な阻害によって引き起こされる凝固活性の不足を含む。ＦＶＩＩＩが欠如しているため、血友病Ａ型患者の血液は正常に凝固して出血を抑えることができない。

【０００３】
ＨＡを治療する一般的な方法は補充療法である。濃縮された第ＶＩＩＩ因子は、ＨＡ患者の静脈にゆっくりと点滴又は注射される。これらの輸液は、患者の体内で欠失している、又は低下しているＦＶＩＩＩを補充するのに寄与する。しかし、この補充療法は、注射による第ＶＩＩＩ因子の阻害剤、又は後天性の第ＶＩＩＩ因子の阻害剤を生成し、それらがこの補充療法の失敗につながる可能性がある。

【発明の概要】

【０００４】
本発明は、遺伝子操作ヒト第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、ＦＶＩＩＩタンパク質をコードする核酸、及びＦＶＩＩＩタンパク質を発現するベクター、ＦＶＩＩＩを含有する医薬組成物、並びに該薬物の使用方法を提供し、それによって、血友病Ａ型の治療などの本分野の需要を満たす。

【０００５】
第１に、本発明は、ｈＦＶＩＩＩのＡ１ドメインに少なくとも２つの置換アミノ酸を含む、遺伝子操作ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＦＶＩＩＩ）ポリペプチドを提供する。

【０００６】
いくつかの実施形態では、前記置換アミノ酸はＡ１ドメインのＬ５０及びＬ１５２部位を含む。

【０００７】
いくつかの実施形態では、前記置換アミノ酸はＡ１ドメインのＬ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む。

【０００８】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ａ１ドメインの Ｄ２０、Ｇ２２、Ｉ６１、Ｄ１１５、Ｆ１２９、Ｇ１３２、Ｑ１３９及びＬ１５９からなる群から選択されるアミノ酸置換のうちの１つ又は複数をさらに含む。

【０００９】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ａ１ドメインＤ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｉ６１Ｔ、Ａ１１５Ｅ、Ｆ１２９Ｉ、Ｇ１３２Ｄ、Ｑ１３９Ｅ、及びＬ１５９Ｆの１つ又は複数をさらに含む。

【００１０】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ａ１ドメインの Ｄ２０Ｓ、Ｌ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む。

【００１１】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ａ１ドメインの Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｌ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む。

【００１２】
いくつかの実施形態では、遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドは、配列番号３、配列番号４、配列番号５、又は配列番号６のアミノ酸配列を含む。

【００１３】
第２に、本発明は、本明細書に開示された遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする単離された核酸断片を提供する。

【００１４】
第３に、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された本明細書に開示された核酸断片を含む発現ベクターを提供する。
【００１５】
第４に、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された本明細書に開示された核酸断片を含む組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターを提供する。
【００１６】
第５に、本明細書に開示された発現ベクター又は本明細書に開示されたｒＡＡＶベクターを含む医薬組成物を提供する。
【００１７】
第６に、本発明は、血友病Ａ型を治療するための方法を提供する。該方法は、本明細書に開示された医薬組成物の有効量を患者に投与することを含む。
【００１８】
本発明の上記の情報、特徴、及び利点は、以下の説明及び添付の特許請求の範囲においてよりよく説明される。
【図面の簡単な説明】
【００１９】
本発明の革新点は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特徴及び利点は、本発明の原理を利用した例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、及び図面の内容を参照することによって、よりよく理解され得る。
【００２０】
【図１】ヒト野生型ＦＶＩＩＩ及びＦＶＩＩＩ－ＳＱの模式図である。
【００２１】
【図２】図２Ａ～２Ｃは、ヘテロ接合型ＦＶＩＩＩの凝固時間の結果を示す。図２Ａは、ｈＨＣとｍＨＣの活性の比較であり、図２Ｂは、ｈＨＣとｄＨＣの活性の比較であり、図２Ｃは、ｈＨＣとｍａＨＣの活性の比較である。
【００２２】
【図３】図３Ａは、ヒトと巨大コウモリのＦＶＩＩＩのＡ１ドメインとＡ２ドメインを組み合わせてペアリングすることで、ハイブリッドＦＶＩＩＩ、Ｍ１Ｈ２、及びＨ１Ｍ２を構築することを示す。図３Ｂは、様々なＦＶＩＩＩタンパク質の凝固時間を示す。
【００２３】
【図４】重鎖中のＡ１ドメインをＤ１とＤ２の領域、Ａ２ドメインをＤ３とＤ４の領域に細分化できることを示す。
【００２４】
【図５】図５Ａは、巨大コウモリＦＶＩＩＩのＤ１又はＤ４ドメインがヒトの対応する構造に置換されてハイブリッド巨大コウモリＦＶＩＩＩｓ：ｈＤ１及びｈＤ４を構築することを示す。図５Ｂは、様々なＦＶＩＩＩタンパク質の凝固時間を示す。
【００２５】
【図６】図６Ａは、ヒト第ＶＩＩＩ因子のＤ１～Ｄ４領域が、巨大コウモリＦＶＩＩＩの対応物の領域に置換されて、ハイブリッドヒト第ＶＩＩＩ因子ｓ：ｍＤ１ｍＤ３、ｍＤ２、ｍＤ３、及びｍＤ４を構築することを示す図である。図６Ｂは、様々なＦＶＩＩＩタンパク質の凝固時間を示す。
【００２６】
【図７】ヒトと巨大コウモリＦＶＩＩＩのＤ１領域の配列のアライメントを示す。
【００２７】
【図８】図８Ａは、ＥＬＩＳＡの結果であり、Ｖ５１Ｌ、Ｔ６２Ｉ、Ｅ１１６Ｄ、Ｉ１３０Ｆ、Ｄ１３３Ｇ、Ｅ１４０Ｑ、Ｐ１５３Ｌ、及びＦ１６０Ｌの８つのアミノ酸の突然変異がＦＶＩＩＩタンパク質の発現レベルの低下をもたらすことを示す。図８Ｂは、ａＰＴＴの結果であり、Ｖ５１Ｌ、Ｔ６２Ｉ、Ｅ１１６Ｄ、Ｉ１３０Ｆ、Ｄ１３３Ｇ、Ｅ１４０Ｑ、Ｐ１５３Ｌ、及びＦ１６０Ｌの８つのアミノ酸の突然変異が凝固活性の低下をもたら

すことを示す。
【００２８】
【図９】様々な突然変異体ＦＶＩＩＩの凝固活性を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
本発明の特定の特徴は、上記の要約書及び詳細な説明の部分、並びに以下の特許請求の範囲において言及されている。なお、本明細書における本発明の開示は、そのような特定の特徴のすべての可能な組み合わせを含む。例えば、特定の特徴が、本発明の特定の態様又は実施形態、又は特定の特許請求の範囲の文脈で開示されている場合、この特徴は、本発明の他の態様及び実施形態と組み合わせて、及び／又は発明の他の態様及び実施形態の状況で、ならびに本発明の一般的に、使用することができる。
【００３０】
血友病Ａ型の治療のための補充療法では、注射または獲得されたＦＶＩＩＩの阻害剤が生成され、これは補充療法の失敗につながる可能性がある。
【００３１】
血友病Ａ型の治療のためのもう１つの方法は、ｒＡＡＶベクターに基づく遺伝子療法である。ｒＡＡＶベクターは、目的遺伝子をインビボで長期間にわたって安定に発現させ、治療目的を達成することができる。Ｆ８のコード領域長は７０３５ｂｐであり、Ａ１、Ａ２、Ｂ、Ａ３、Ｃ１、Ｃ２の６つのドメインに分かれている（図１、下図）。ｒＡＡＶベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）の外殻に効率的にパッケージングされ得るように、１つの治療用遺伝子の発現カセットと２つのＩＴＲを含むｒＡＡＶベクターのサイズは約５ｋｂである。
【００３２】
ＡＡＶパッケージング能力の制限により、全長のＦ８コード領域を完全にＡＡＶにパッケージングすることはできない。この問題を解決するためには、Ｆ８遺伝子のコード領域を短くする必要がある。これまでの研究により、ＦＶＩＩＩのＢ　ｄｏｍａｉｎドメイン（９０８　ａａ）は、ＦＶＩＩＩの凝固活性を維持しながらＳＱドメイン（１４　ａａ）に置換され得ることが示された。このような遺伝子操作ＦＶＩＩＩは、ＦＶＩＩＩ－ＳＱと呼ばれ、Ａ１、Ａ２、ＳＱ、Ａ３、Ｃ１、及びＣ２の６つのドメインに分けられる。Ａ１、Ａ２及びＳＱドメインはＦＶＩＩＩ－ＳＱの重鎖を構成し、Ａ３、Ｃ１及びＣ２はＦＶＩＩＩ－ＳＱの軽鎖を構成する。ＦＶＩＩＩ－ＳＱをコードするヌクレオチドは４３７１ｂｐ（図１、上図）であり、したがって、ＡＡＶに完全にパッケージングされ得る。
【００３３】
しかし、短くされたＦＶＩＩＩの発現エレメントが約５ｋｂであっても、血友病Ａ型のｒＡＡＶ遺伝子治療における重要な制限要素の一つは、ＦＶＩＩＩの非効率な分泌であり、それはおそらくＦＶＩＩＩの小胞体におけるゆっくりとした折り畳み過程によるものである。これを補うには、十分な活性ＦＶＩＩＩが産生されるように大量のｒＡＡＶベクターを血友病Ａ型患者の体内に注射する必要がある。大量に注射されたｒＡＡＶベクターは患者に免疫反応などの副作用を引き起こす可能性がある。
【００３４】
ＦＶＩＩＩが分泌タンパク質であるため、ウイルスベクターの必要量を許容可能なレベルまで減らすために、ＦＶＩＩＩのアミノ酸を改変することにより、ｒＡＡＶベクターが産生するＦＶＩＩＩの分泌活性を高めることが１つの戦略である。ＦＶＩＩＩが多く分泌されるほど、ＦＶＩＩＩの凝固活性が高くなる。研究により、ブタＦＶＩＩＩの分泌能がヒト第ＶＩＩＩ因子に比べて１０～１００倍高く、ブタＦＶＩＩＩの重鎖がＦＶＩＩＩの分泌能を高めるのに有利であることがわかった（Identification of Porcine Coagulation Factor VIII Domains Responsible for High Level Expression via Enhanced Secretion. JBC, 279, 6546-6552）。したがって、本願の発明者らは、ヒト第ＶＩＩＩ因子の重鎖をｒＡＡＶ遺伝子治療のためにその分泌能を増強するように改変することができるという理論を提案したが、そのような理論には拘束されない。

【００３５】
第１に、本発明は、ｈＦＶＩＩＩのＡ１ドメインに少なくとも２つの置換アミノ酸を含む、遺伝子操作ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＦＶＩＩＩ）ポリペプチドを提供する。
【００３６】
本明細書で使用される場合、「遺伝子操作」とは、遺伝物質の操作や化学合成、その他の方法により、タンパク質をその野生型の状態から別の状態に変化させる改変をいう。遺伝子操作ＦＶＩＩＩは、文脈に応じて、突然変異体ＦＶＩＩＩ、ヘテロ接合型ＦＶＩＩＩ、又はＦＶＩＩＩ突然変異体と呼ばれてもよい。
【００３７】
本明細書で使用される場合、「置換」又は「置き換え」とは、アミノ酸の置き換え、すなわち、ＤＮＡ配列中の点突然変異によりタンパク質中の１つのアミノ酸が他のアミノ酸に変化することを意味する。「置換アミノ酸」とは、既存のアミノ酸に取って代わった新しいアミノ酸のことである。
【００３８】
本明細書で使用する場合、「ドメイン」とは、構造に関連するドメインの内部アミノ酸配列が同一であり、トロンビンのタンパク質分解部位によって定義されることを特徴とする連続したアミノ酸配列を意味する。図１（下図）は、Ａ１、Ａ２、Ｂ、Ａ３、Ｃ１、及びＣ２ドメインを含むヒト野生型ＦＶＩＩＩを示す。
【００３９】
ヒト第ＶＩＩＩ因子のＡ１ドメインは、Ａ１ドメインのうち分泌能を増強する役割を担うより小さな領域のアミノ酸配列を決定するために、Ｄ１領域とＤ２領域に細分化されている。
【００４０】
ヒトＤ１領域のアミノ酸配列は、配列番号１において以下のように規定されている。
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTD
HLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGA
EYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDL
NSGLIGALLVCREGSLAKE
【００４１】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ａ１ドメインのＬ５０及びＬ１５２を含む。ここで、Ｌ５０は、配列番号１の５０番目のロイシン（Ｌ）が他の不特定のアミノ酸に置換されていることを意味し、また、Ｌ１５２は、配列番号１の１５２番目のロイシン（Ｌ）が他の不特定のアミノ酸に置換されていることを意味する。
【００４２】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ａ１ドメインのＬ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む。ここで、Ｌ５０Ｖは、配列番号１の５０番目のロイシン（Ｌ）がバリン（Ｖ）に置換されていることを意味し、Ｌ１５２Ｐは、配列番号１の１５２番目のロイシン（Ｌ）がプロリン（Ｐ）に置換されていることを意味する。
【００４３】
いくつかの実施形態では、Ａ１ドメインのＤ２０、Ｇ２２、Ｉ６１、Ａ１１５、Ｆ１２９、Ｇ１３２、Ｑ１３９及びＬ１５９の１つ又は複数のアミノ酸は置換されている。
【００４４】
いくつかの実施形態では、Ｄ２０、Ｇ２２、Ｉ６１、Ｄ１１５、Ｆ１２９、Ｇ１３２、Ｑ１３９及びＬ１５９のアミノ酸置換は、それぞれＤ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｉ６１Ｔ、Ｄ１１５Ｅ、Ｆ１２９Ｉ、Ｇ１３２Ｄ、Ｑ１３９Ｅ及びＬ１５９Ｆである。
【００４５】
いくつかの実施形態では、置換アミノ酸は、Ｄ２０Ｓ、Ｌ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐを含む。
【００４６】
いくつかの実施形態では、前記置換アミノ酸は、Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｌ５０Ｖ及びＬ

１５２Ｐを含む。

【００４７】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドは、配列番号３、配列番号４、配列番号５又は配列番号６のアミノ酸配列を含む。

【００４８】

配列番号３：

ATRRYYLGAVELSWDYMQSSLLELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTVFVEFTDH
LFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAE
YDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPPCLTYSYLSHVDLVKDL
NSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA
RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNH
RQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLR

【００４９】

配列番号４：

ATRRYYLGAVELSWDYMQSSLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTVFVEFTD
HLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGA
EYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPPCLTYSYLSHVDLVKDL
NSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA
RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNH
RQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLR

【００５０】

配列番号５：

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSSLLELPVDARFPPRVPKSF
PFNTSVVYKKTVFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH
PVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS
DPPCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKS
WHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMG
TTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDG
MEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVA
KKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMA
YTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR
RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG
LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLE
DPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK
MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGD
YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISV
EMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGS
VPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPY
SFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS
DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENME
RNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNEN
IHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAG
MSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK
EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTL
MVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGM
ESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK
TMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP
VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

【００５１】

配列番号６：

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSSLGELPVDARFPPRVPKSF
PFNTSVVYKKTVFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH
PVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS
DPPCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKS
WHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMG
TTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDG
MEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVA
KKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMA
YTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR
RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG
LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLE
DPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK
MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGD
YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISV
EMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGS
VPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPY
SFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS
DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENME
RNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNEN
IHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAG
MSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK
EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTL
MVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGM
ESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK
TMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP
VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

【００５２】

第２に、本発明は、本明細書に開示された遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドをコードする単離された核酸断片を提供する。単離された核酸断片は、本明細書に記載のＦＶＩＩＩ突然変異体をコードするすべての可能な核酸配列を含む。すべての可能な核酸配列は、コドン縮退の原理を考慮するが、これに限定されるものではない。

【００５３】

第３に、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された本明細書に開示された核酸断片を含む発現ベクターを提供する。

【００５４】

「作動可能に連結される」という用語は、コード配列の発現に必要な調節配列が、コード配列の発現を可能にするためにＤＮＡ分子内の適切な位置に配置されることを意味する。

【００５５】

第４に、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された本明細書に開示された核酸断片を含む組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターを提供する。

【００５６】

ヒトアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は非病原性ウイルスであり、ヘルパーウイルス（通常はアデノウイルス又はヘルペスウイルス）と共感染した細胞でのみ効率的に複製する。当該ウイルスは、宿主の範囲が広く、さまざまな種の多くの細胞タイプに効果的に感染させることができる。しかし、ＡＡＶとヒト又は動物の疾患との関連性があることを示す研究はまだ存在しない。

【００５７】

ＡＡＶは、ヘパリン硫酸プロテオグリカン受容体を介して細胞に結合する。いったん付着すると、ＡＡＶが細胞に入る過程は受容体、すなわち線維芽細胞成長因子受容体やαｖ

β５インテグリン分子に依存する。感染した細胞には、ＡＡＶが一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）の形で入り、さらに二本鎖転写鋳型に変換される。ＡＡＶとヘルパーウイルスに感染した細胞は、細胞が分裂する前に、ＡＡＶそのものではなくヘルパーウイルスによって誘導されるＡＡＶの複製を行う。ヘルパーウイルスがコードするタンパク質又はＲＮＡ転写物は転写調節剤であり、ＤＮＡ複製に関与し、又は細胞環境を変化させ、それによりウイルスの効率的な生産を保証する。

【００５８】

組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターは、通常、ウイルスのコード配列を目的遺伝子に置き換える。これらのベクターは、インビトロ及びインビボのいくつかの異なる部位において、効率的な発現及び遺伝子標的性を有することが証明されている。研究により、ＡＡＶは、呼吸器、中枢神経系、骨格筋、肝臓や眼の研究において安全であり、安定して持続的に発現できることが示された。ｒＡＡＶ製剤の力価と純度の向上に伴い、ｒＡＡＶ媒介の形質導入効率も向上している。

【００５９】

ＡＡＶゲノムの逆末端反復配列（ＩＴＲ）は、ｒＡＡＶベクターの合成に必要な唯一のシス要素である。２つのＩＴＲｓ配列に目的遺伝子及び発現要素群を付加して、サイズが約５ｋｂのｓｓＤＮＡベクターゲノムを作り、そしてＡＡＶ　ｒｅｐとｃａｐ遺伝子とヘルパーウイルスの存在下でＡＡＶ顆粒にパッケージングし、成熟したｒＡＡＶの生産と精製の方法と技術を持っている。

【００６０】

ｒＡＡＶベクターにおいて、本明細書に記載の遺伝子操作ＦＶＩＩＩをコードする核酸断片は５ｋｂ未満であり、この断片は２つのＩＴＲｓを含む発現フレームに挿入されて、ＡＡＶベクターの効率的なパッケージングを可能にする。

【００６１】

発現ベクター又はｒＡＡＶベクターにおいて、本明細書に開示された遺伝子操作第ＶＩＩＩ因子をコードする核酸配列は、プロモーターに作動可能に連結されている。該プロモーターは、構成型プロモーター、誘導型プロモーター、肝臓特異的プロモーター、肝細胞特異的プロモーター、又は合成プロモーターであってもよいが、これらに限定されない。

【００６２】

構成型プロモーターは、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、チミジンキナーゼ（ＴＫ）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、サルウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、マウス乳腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、アデノウイルスＥ１Ａプロモーター、サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）プロモーター、哺乳類のハウスキーピング遺伝子プロモーター、β－アクチンプロモーターであってもよいが、これらに限定されない。

【００６３】

誘導型プロモーターは、シトクロムＰ４５０遺伝子プロモーター、ヒートショックプロテイン遺伝子プロモーター、メタロチオネイン遺伝子プロモーター、ホルモン誘導性遺伝子プロモーター、エストロゲン遺伝子プロモーター、又はテトラサイクリン応答性ｔｅｔＶＰ１６プロモーターであってもよいが、これらに限定されない。

【００６４】

肝臓特異的プロモーターは、アルブミンプロモーター、α－１－アンチトリプシンプロモーター、又はＢ型肝炎ウイルスコアタンパク質プロモーターであってもよいが、これらに限定されない。

【００６５】

合成プロモーターは、既知のプロモーターの領域、調節要素、転写因子結合点、増強要素、阻害要素などを含むことができる。例えば、合成プロモーターは、天然プロモーターと転写因子由来のエンハンサーとの組み合わせであってもよい。目的核酸、タンパク質又はポリペプチドの発現レベルを向上させる目的を達成するために、目的宿主細胞での発現に適したいずれかのプロモーターを用いることができる。

【００６６】
第５に、本発明は、本明細書に開示された発現ベクター又は本明細書に開示されたｒＡＡＶベクターを含む医薬組成物を提供する。
【００６７】
「医薬組成物」という用語は、本明細書に開示された発現ベクター又は本明細書に開示されたｒＡＡＶベクターと、希釈剤又は担体などの他の化学成分との混合物を意味する。医薬組成物は、生体組織を標的化するのに有利である。医薬組成物は、一般に、特定の意図された投与経路に従って調整される。医薬組成物は、ヒト及び／又は獣医用に適している。
【００６８】
本明細書に記載の医薬組成物は、ヒト患者に、それ自体で、又は併用療法の場合のように他の有効成分と混合された医薬組成物中で、又は担体、希釈剤、賦形剤、若しくはそれらの組み合わせと混合された医薬組成物中で投与され得る。正しい処方は、選択された投与経路に依存する。
【００６９】
第６に、本発明は、血友病Ａ型患者を治療するための方法を提供する。該方法は、本発明に開示された医薬組成物の有効量を患者に投与することを含む。
【００７０】
「有効量」又は「治療的な有効量」という用語は、所望の被験者に注射されたときに期待される活性が得られることを確保するべきである、ｒＡＡＶベクターを含む組成物のような組成物の量を意味する。「治療的に有効」という用語は、本開示の方法によって治療される疾患の発現を緩和し、その進行を阻止し、その症状の少なくとも１つを緩和又は軽減するのに十分であることを意味する。
【００７１】
当業者であれば認識できるように、障害が完全に根絶又は予防されていなくても、その障害又はその症状及び／又は影響が被験者において部分的に改善又は緩和された場合には、治療的に「有効」であるとも認めることができる。血友病Ａ型患者を治療するための方法の有効性を判断するための様々な指標が当業者に既知である。
【００７２】
本明細書に記載されるように、「治療（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」、「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」、「治療的（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）」、又は「療法（ｔｈｅｒａｐｙ）」という用語は、必ずしも疾患又は病症を完全に治癒又は除去することを意味しない。疾患又は病症がどの程度緩和された場合でも、治療及び／又は療法とみなされ得る。さらに、治療は、患者の全体的な幸福感を向上又は悪化させる可能性のある行動を含み得る。
【００７３】
他の活性剤、防腐剤、緩衝剤、塩、薬学的に許容される担体、又は他の薬学的に許容される成分などの他の成分は、所望の組成物に含まれ得る。
【００７４】
本明細書で使用される場合、「溶媒」とは、化合物を細胞又は組織に導入するのに有利な化合物を意味する。例えば、限定されない限り、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、エタノール（ＥｔＯＨ）又はＰＥＧ４００は、有機化合物が被験者の細胞又は組織に吸収されるのに有利な一般的な溶媒である。
【００７５】
定義
別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、当業者が一般に理解する意味と同じものである。ここに記載される用語の１つに複数の定義がある場合は、特に明記されていない限り、本節の定義に準ずる。
【００７６】
本明細書で使用される用語は、特定の状況を説明するためにのみ使用されるものであり、限定的であることを意味するものではない。本明細書で使用される場合、単数形「１つ

（ａ）」、「一（ａｎ）」及び「該（ｔｈｅ）」は、文脈で明示的に指摘されない限り、複数形も含む。さらに、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「有する（ｈａｓ）」などの用語が詳細な説明及び／又は特許請求の範囲で使用される場合、これらの用語は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」に類似する用語が包括的であることを示すことを目的としている。

【００７７】

本明細書で使用される場合、「個人」、「患者」、又は「被験者」という用語は、交換して使用され得る。これらの用語は、医療従事者（例えば、医師、認定看護師、認定准看護師、医師助手、看護師、ホスピスワーカー）のアイデンティティ（継続的又は断続的など）によって変化することを要求又は限定するものではない。

【００７８】

単離された：１つの「単離された」生物成分（例えば、核酸分子、タンパク質、ウイルス又は細胞）が生物の細胞又は組織中の他の生物成分から単離又は精製されたか、生物自体が自然中に存在し、例えば、他の染色体及び染色体外のＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、細胞などである。「単離された」核酸分子及びタンパク質には、標準的な精製方法で精製されたものが含まれる。この用語には、宿主細胞内での組換え発現によって調製された核酸分子及びタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子及びタンパク質も含まれる。

【００７９】

組換え：組換え核酸分子は、天然には存在しない配列を有する核酸分子であり、例えば、１つ又は複数の核酸の置換、欠失又は挿入を含み、及び／又は本来単離している配列の２つの断片を人工的に組み合わせることにより作製された配列を有する。このような人工的組み合わせは、化学合成によって、あるいはより一般的には、例えば遺伝子工学的手法によって、単離された核酸断片を人工的に操作
することによって行うことができる。

【００８０】

「プロモーター領域」又は「プロモーター」という用語は、核酸（例えば、遺伝子）の転写を誘導／開始するＤＮＡ領域を意味する。プロモーターは、転写開始部位近傍の必要な核酸配列を含む。通常、プロモーターは、これらが転写する遺伝子の近くに位置する。プロモーターはまた、転写開始点から数千塩基対も離れた位置にあり得る遠位エンハンサー又はサプレッサー要素を含むことを選択できる。組織特異的プロモーターとは、主に単一タイプの組織や細胞において転写を誘導／開始するプロモーターのことである。例えば、肝臓特異的プロモーターとは、肝臓組織で転写を指示／開始する効果が他の組織型よりもはるかに高いプロモーターを指す。

【００８１】

エンハンサー：プロモーターの活性を増加させることにより転写効率を増加させる核酸配列である。

【００８２】

「ベクター」という用語は、ＤＮＡ配列が宿主細胞に挿入され、そこで複製され得る小さなベクターＤＮＡ分子を意味する。「発現ベクター」は、目的とする遺伝子又は核酸配列を含み、宿主細胞での発現に必要な調節要素を有する特別なベクターである。

【００８３】

「作動可能に連結される」という用語は、コード配列の発現に必要な調節配列が、コード配列の発現を実現するためにＤＮＡ分子内の適切な位置に配置されていることを意味する。この定義は、発現ベクターにおけるコード配列及び転写制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー及びターミネータ要素など）の配列にも適用される場合もある。この定義は、第１及び第２核酸分子によって生成される混合核酸分子配列の配列にも適用される場合もある。

【００８４】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」という用語は、一般に、塩基－糖－リン酸塩が

組み合わされた分子を指す。ヌクレオチドは合成ヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチドは合成されたヌクレオチド類似体を含み得る。ヌクレオチドは、核酸配列（例えば、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）及びリボ核酸（ＲＮＡ））の単量体単位であってもよい。ヌクレオチドという用語は、アデノシン三リン酸（ＡＴＰ）、ウリジン三リン酸（ＵＴＰ）、シチジン三リン酸（ＣＴＰ）、グアノシン三リン酸（ＧＴＰ）、及びｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＩＴＰ、ｄＵＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ又はその誘導体のようなデオキシヌクレオシド三リン酸を含むことができる。このような誘導体は、［αＳ］ｄＡＴＰ、７－ｄｅａｚａ－ｄＧＴＰ及び７－ｄｅａｚａ－ｄＡＴＰ、ならびにヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチド誘導体を含むことができる。ここで使用されるヌクレオチドという用語は、ジデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄｄＮＴＰｓ）及びその誘導体を指してもよい。ジデオキシヌクレオシド三リン酸は、ｄｄＡＴＰ、ｄｄＣＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＩＴＰ及びｄｄＴＴＰを含むことができるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、非標識なものであってもよいし、関連技術により検出可能なタグをヌクレオチドに付加したものであってもよいし、量子ドットで標識したものであってもよい。検出可能なタグには放射性同位元素、蛍光タグ、化学発光タグ、生物発光タグ、酵素タグが含まれる。ヌクレオチドの蛍光タグは、フルオレセイン、５－カルボキシルフルオレセイン（ＦＡＭ）、２，７－ジメトキシ－４，５－ジクロロ－６－カルボキシルフルオレセイン（ＪＯＥ）、ローダミン、６－カルボキシルローダミン（Ｒ６Ｇ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－６－カルボキシルローダミン（ＴＡＭＲＡ）、６－カルボキシル－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、４－（４’ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸（ＤＡＢＣＹＬ）、カスケードブルー、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアン化物、及び５－（２’－アミノエチル）アミノナフタレン－１－スルホン酸（ＥＤＡＮＳ）を含むことができるが、これらに限定されない。蛍光で標識されたヌクレオチドの具体例としては、［Ｒ６Ｇ］ ｄＵＴＰ、［ＴＡＭＲＡ］ ｄＵＴＰ、［Ｒ１１０］ ｄＣＴＰ、［Ｒ６Ｇ］ ｄＣＴＰ、［ＴＡＭＲＡ］ ｄＣＴＰ、［ＪＯＥ］ ｄｄＡＴＰ、［Ｒ６Ｇ］ ｄｄＡＴＰ、［ＦＡＭ］ ｄｄＣＴＰ、［Ｒ１１０］ ｄｄＣＴＰ、［ＴＡＭＲＡ］ ｄｄＧＴＰ、［ＲＯＸ］ ｄｄＴＴＰ、［ｄＲ６Ｇ］ ｄｄＡＴＰ、［ｄＲ１１０］ ｄｄＣＴＰ、［ｄＴＡＭＲＡ］ ｄｄＧＴＰ和［ｄＲＯＸ］ ｄｄＴＴＰ（Perkin Elmer, Foster City, Calif）；ＦｌｕｏｒｏＬｉｎｋ ＤｅｏｘｙＮｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、ＦｌｕｏｒｏＬｉｎｋ Ｃｙ３－ｄＣＴＰ、ＦｌｕｏｒｏＬｉｎｋ Ｃｙ５－ｄＣＴＰ、ＦｌｕｏｒｏＬｉｎｋ Ｆｌｕｏｒ Ｘ－ｄＣＴＰ、ＦｌｕｏｒｏＬｉｎｋ Ｃｙ３－ｄＵＴＰ及びＦｌｕｏｒｏＬｉｎｋ Ｃｙ５－ｄＵＴＰ（Amersham, Arlington Heights, Ill）；フルオレセイン－１５－ｄＡＴＰ、フルオレセイン－１２－ｄＵＴＰ、テトラメチルローダミン－６－ｄＵＴＰ、ＩＲ７７０－９－ｄＡＴＰ、フルオレセイン－１２－ｄｄＵＴＰ、フルオレセイン－１２－ＵＴＰ和フルオレセイン－１５－２’－ｄＡＴＰ（Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.）を含んでもよい。染色体で標識されたヌクレオチドには、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ－１４－ＵＴＰ、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ－４－ＵＴＰ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＭＲ－１４－ＵＴＰ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＭＲ－１４－ｄＵＴＰ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＲ－１４－ＵＴＰ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＲ－１４－ｄＵＴＰ、Ｃａｓｃａｄｅ Ｂｌｕｅ－７－ＵＴＰ、Ｃａｓｃａｄｅ Ｂｌｕｅ－７－ｄＵＴＰ、フルオレセイン－１２－ＵＴＰ、フルオレセイン－１２－ｄＵＴＰ、Ｏｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ ４８８－５－ｄＵＴＰ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｇｒｅｅｎ－５－ＵＴＰ、 Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｇｒｅｅｎ－５－ｄＵＴＰ、ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｒｈｏｄａｍｉｎｅ－６－ＵＴＰ、ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｒｈｏｄａｍｉｎｅ－６－ｄＵＴＰ、Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ－５－ＵＴＰ、Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ－５－ｄＵＴＰ及びＴｅｘａｓ Ｒｅｄ－１２－ｄＵＴＰ（Molecular Probes, Eugene, Oreg）が含まれる。ヌクレオチドはまた、化学修飾によって標識又は注釈されてもよい。化学修飾されたモノヌクレオチドはビオチン－ｄＮＴＰであってもよい。非制限的なビオチン化ｄＮＴＰｓのいくつかの例には、ビオチン－ｄＡＴＰ（例えば、ビオチン－Ｎ６－ｄｄＡＴＰ及びビオチン－１４－ｄＡＴＰ）、ビオチン－ｄＣＴＰ（例えば、ビオチン－１１－ｄＣＴＰ及びビオチン－１４－ｄＣＴＰ）、及びビオチン－ｄＵＴＰ（例えば、ビオ

チン－１１－ｄＵＴＰ、ビオチン－１６－ｄＵＴＰ及びビオチン－２０－ｄＵＴＰ）が含まれ得る。

【００８５】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、交換して使用されてもよく、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド類似体を含むヌクレオチドの異なる重合形態を意味し、形態には、一本鎖、二本鎖、または多本鎖の形態が含まれる。ポリヌクレオチドは、外因性又は内因性であってもよい。ポリヌクレオチドは、細胞外に存在することができ、遺伝子又はその断片であってもよく、ＤＮＡ又はＲＮＡであってもよく、任意の３次元構造を有し、既知又は未知の機能を有してもよい。ポリヌクレオチドは、１つ又は複数の類似体（例えば、骨格、糖、又は核塩基を改変したもの）を含むことができ、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリマーの集合の前又は後に行うことができる。いくつかの非限定的な類似体の例としては、５-ブロモウラシル、ペプチド核酸、異種核酸、モルホリン、ロックド核酸、エチレングリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コルジセピン、７-デアザGTP、蛍光剤（例えば、糖に結合したローダミンまたはフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基類似体、ＣｐＧアイランド、メチル-７-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チウリジン、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、キニーネ、及びバイオシンが含まれる。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子又は遺伝子断片のコード領域又は非コード領域、連鎖解析によって定義される部位（ｌｏｃｕｓ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、短干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、小分子ＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡｓ）、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離ＤＮＡ、任意の配列の単離ＲＮＡ、無細胞ポリヌクレオチド（無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）及び無細胞ＲＮＡ（ｃｆＲＮＡ））、核酸プローブ及びプライマーが含まれる。非ヌクレオチド成分はヌクレオチド配列に埋め込まれている。

【００８６】

本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、コードＲＮＡの転写に関与する核酸（例えば、ゲノムＤＮＡ及びｃＤＮＡ）及びそれに対応するヌクレオチド配列を指す。本明細書で言及されるゲノムＤＮＡの用語は、コード領域、非コード領域、及び調節要素、並びに５’末端及び３’末端を含む。いくつかの使用では、この用語は、転写配列、５’及び３’非翻訳領域（５’－ＵＴＲ及び３’－ＵＴＲ）、エクソン、並びにイントロンを含む。いくつかの遺伝子において、転写領域は、ポリペプチドをコードする「オープンリーディングフレーム」を含む。この用語のいくつかの使用形態では、「遺伝子」は、ポリペプチドをコードするために必要なコード配列（例えば、「オープンリーディングフレーム」又は「コード領域」）のみを含む。場合によっては、リボソームＲＮＡ遺伝子（ｒＲＮＡ）やトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）遺伝子などの遺伝子は、ポリペプチドをコードしない。場合によっては、「遺伝子」という用語は、転写配列だけでなく、上流及び下流の調節領域、エンハンサー及びプロモーターを含む非転写領域も含む。遺伝子とは、「内因性遺伝子」又は生体自体のゲノム中に存在する遺伝子を指すことも、「外因性遺伝子」又は生物自体に存在しない遺伝子を指すこともできる。外因性遺伝子は、通常、宿主生物に存在しない遺伝子を指すが、遺伝子形質導入により宿主生物に導入され得る。外因性遺伝子は、生物のゲノムに存在しない遺伝子、又は生体で発生する核酸配列又はポリペプチド配列の変化を意味することもでき、突然変異、挿入及び／又は欠失（例えば、非野生配列）を含む。

【００８７】

ｃＤＮＡ（相補的ＤＮＡ）：ｃＤＮＡとは、実験室の細胞から抽出したメッセンジャーＲＮＡを逆転写実験に供して得たＤＮＡを指す。ｃＤＮＡはまた、対応するＲＮＡ分子中の翻訳制御を担当する非翻訳領域（ＵＴＲｓ）を含むことができる。

【００８８】

５’及び／又は３’：核酸分子（例えば、ＤＮＡやＲＮＡ）の方向が「５’末端」と「３’末端」に分かれている。モノヌクレオチドは、３’末端水酸基と隣接するペントース環の５’末端リン酸残基とのエステル化反応によりホスホジエステル結合を形成し、それによりポリヌクレオチドとなる。したがって、線状ポリヌクレオチドの５’末端リン酸基が、モノヌクレオチドのペントース環の３’末端酸素に連結していない場合、５’末端と呼ばれる。ポリヌクレオチドの３’末端酸素が、他のモノヌクレオチドのペントース環の５’リン酸基に連結していない場合、３’末端と呼ばれる。ポリヌクレオチド中のペントース環の５’リン酸基は隣接する３’酸素に連結されているが、内部の個々の核酸も５’末端と３’末端に分かれる。

【００８９】

線状又は環状核酸分子において、単離された内部基は「上流」（５’末端）又は「下流」（３’末端）と呼ばれる。ＤＮＡの場合、この用語は、転写がＤＮＡ鎖の５’末端から３’末端の方向に沿って行われることを示す。関連遺伝子の転写を指示するプロモーター及びエンハンサー要素は、通常、コード領域の５’末端又は上流に位置する。しかし、エンハンサー要素は、プロモーター要素及びコード領域の３’端に位置していても、その機能を発揮することができる。転写ターミネータ及びポリアデニル化（ＰｏｌｙＡ）シグナルは、コード領域の３’末端又は下流にある。

【００９０】

転写因子（ＴＦ：Ｔｒａｎｓ　ｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ）：特定のＤＮＡ配列に結合し、ＤＮＡからＲＮＡへの遺伝情報の転移（又は転写）を調節するタンパク質である。ＴＦｓは、ＲＮＡポリメラーゼ（ＤＮＡからＲＮＡへの遺伝情報の転写を行う酵素）による特定の遺伝子のリクルートを増強（活性化剤として）又は阻害（阻害剤として）することにより、単独で又は他のタンパク質と複合体となってこの機能を実行する。ＴＦが結合する特定のＤＮＡ配列は、反応要素（ＲＥ：Ｒｅｓｐｏｎｓｅ　Ｅｌｅｍｅｎｔ）又は調節要素と呼ばれる。他の用語には、シス要素及びシス作用の転写調節要素が含まれる。

【００９１】

本明細書で使用される「対応する」核酸若しくはアミノ酸又はいずれか１つの配列とは、ＦＶＩＩＩ又はその断片中に存在し、２つのヌクレオチド又はアミノ酸の数が完全には同一ではないに関わらず、その構造及び／又は機能が他の種のＦＶＩＩＩ分子中の１つの部位と同一である部位を指す。

【００９２】

対照：対照とは、反応調査又は実験結果の比較基準として用いられる個体又はサンプル群をいう。対照群が参照対象となる場合もある。

【００９３】

本明細書で使用されるヒト又は動物のＦＶＩＩＩの「サブユニット」は、ＦＶＩＩＩタンパク質の重鎖及び軽鎖を指す。ＦＶＩＩＩの重鎖は３つのドメイン、すなわちＡ１、Ａ２、及びＢを含み、ＦＶＩＩＩの軽鎖は、同じく３つのドメイン、すなわちＡ３、Ｃ１、及びＣ２を含む。

【００９４】

本明細書で使用される「ＦＶＩＩＩ欠損症」は、欠陥のあるＦＶＩＩＩの産生、ＦＶＩＩＩの欠損又は不産生、又は阻害剤によるＦＶＩＩＩの一部又は全部の阻害による凝固活性の欠失を含む。血友病Ａ型は、Ｘ染色体上の連鎖遺伝子の欠陥と、それがコードするＦＶＩＩＩタンパク質の欠失又は不足により凝固機能障害が発生する疾患である。

【００９５】

本明細書で使用される場合、「希釈剤」とは、医薬組成物中の、薬効がないが、薬学的に必要又は理想的である可能性のある構成成分を意味する。例えば、希釈剤は、薬物の質量が小さすぎるか、又は製造及び／又は投与が不可能である場合に、有効な薬物の体積を増加させるために使用され得る。希釈剤は、注射、摂取又は吸入によって投与される薬物を溶解するための液体であってもよい。本分野で一般的な希釈剤の形態は、ヒトの血液成

分を模したリン酸緩衝液を含むがこれに限定されない緩衝水溶液である。
【００９６】
本明細書で使用される場合、「賦形剤」とは、組成物の体積、一貫性、安定性、結合能、潤滑性、崩壊能等（ただし、これらに限定されない）を保証するために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。「希釈剤」は賦形剤の一種である。
【００９７】
本明細書で使用される「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」及び「治療（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」という用語は、有効な治療及び／又は有効な予防を含むがこれらに限定されない、有効な又は予期される結果を得る方法を指す。例えば、治療は、本明細書に開示されたシステム又は細胞集団を対象とすることを含むことができる。治療的有効とは、１つ又は複数の疾患、状態又は症状に対する治療的な改善又は影響を指し得る。有効な予防のために、医薬組成物は、特定の疾患、状態又は症状に罹患する可能性がある被験者、又は、疾患、状態又は症状がまだ現れていない可能性があるが、１つ又は複数の疾患の生理学的症状に罹患している被験者に使用することができる。
【００９８】
治療される症状が変化すると「治療効果」が現れ、変化はポジティブかネガティブかもしれない。例えば、「陽性効果」は、被験者の活性化されたＴ細胞の数を増加させる場合があり、別の例では、「陰性効果」は、被験者の体内の腫瘍の数又は大きさの低減に対応する場合がある。治療中の「変化」とは、障害に少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２５％、５０％、７５％、又は１００％の変化があることを指し得る。この変化は、個人の治療中に障害の重症度の改善の程度、又は治療を受けた個体群と受けなかった個体群における障害の重症度の改善の程度の差に基づくものであり得る。同様に、本開示の方法は、被験者に「治療的に有効」な効果をもたらす細胞の量を測定することができる。「治療的に有効」という用語の定義は、「治療効果がある」ということである。
【００９９】
以下の例示的説明は、本発明を如何にして製造するか如何にして使用するかに関する完全な表示及び記載を当業者に提供するためのものであって、本発明者らによる発明の範囲を限定するためのものではなく、また、以下の実験が全て又は唯一に行われる実験であることを示すためのものではない。本明細書では、使用する数値（例えば、数、温度）の正確性を確保するよう努めているが、ある程度の実験誤差や偏差を考慮すべきである。特に明記されていない限り、重量とは、物体の重量、分子量とは、重量平均分子量、温度とは、摂氏度、圧力とは、大気圧又は大気圧付近を意味する。
【実施例】
【０１００】
方法及び材料
プラスミドの構築
ＦＶＩＩＩ重鎖突然変異体を含むプラスミドを製造するために、プラスミドｐＡＡＶ－ＣＢ－ＦＶＩＩＩ－ＳＱをベクターとして用いる。このプラスミドは、サイトメガロウイルスエンハンサーとヒトβアクチンプロモーターからなるＣＢプロモーターと、ヒト第ＶＩＩＩ因子－ＳＱをコードするＦＶＩＩＩ遺伝子とを含有し、ＰＣＲ増幅により重鎖突然変異部位に挿入され、ヒト及び巨大コウモリのＦＶＩＩＩ遺伝子を鋳型とし、▲ちん▼科生物技術公司によりプライマーを合成する。ベクターと目的遺伝子断片をＮｏｔ　Ｉ－ＨＦとＫｐｎ　Ｉ－ＨＦ（ＮＥＢ）制限酵素で酵素切断した後、Ｅ．Ｚ．Ｎ．Ａ．ゲル抽出キット（Ｏｍｅｇａ　Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈ）で精製し、酵素切断による粘性末端を用いてベクターと目的遺伝子を連結して、種々の重鎖突然変異体を有するプラスミドを作製した。
【０１０１】
組織培養及びトランスフェクション
１０％ウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ）、１００μｇペニシリン／ｍＬ、１００　Ｕストレプトマイシン／ｍＬを含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ改良Ｅａｇｌｅ’ｓ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏ

ｇｅｎ）でＨＥＫ２９３細胞を培養した。トランスフェクションのために、０．７５μｇのＦＶＩＩＩプラスミドと２．２５μＬのＰｏｌｙＪｅｔ（ＳｉｇｎａＧｅｎラボ）を混合し、メーカーの説明書の操作に従って１２ウェルプレートの各ウェルに添加した。トランスフェクション後６時間になると、２％熱不活化ウシ胎児血清を含むＨａｍ’ｓ　Ｆ１２培地（Ｃｏ　ｒｎｉｎｇ）に培地を交換した。培地交換２４時間後、上清培地を採取し、ａＰＴＴ（Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｐａｒｔｉａｌ　Ｔｈｒｏｍｂｏｐｌａｓｔｉｎ　Ｔｉｍｅ、活性化部分トロンボプラスチン時間）及びＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ　Ｌｉｎｋｅｄ　Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ　Ａｓｓａｙ、酵素結合免疫吸着アッセイ）を用いて測定した。

【０１０２】

ａＰＴＴ

インビトロ試験において、標準品をＲｅｆａｃｔｏ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）とし、培地で１Ｕ／ｍＬ（２００　ｎｇ／ｍＬ）から１／２半分で１／５１２に希釈し、検出サンプルは、トランスフェクションされた哺乳動物細胞から採取された上清培地を１３，０００ｒｐｍで１分間遠心分離して得られたものである。ＳＴＡ－ＰＴＴ試薬、ＦＶＩＩＩ欠失血漿、及びサンプル（又は希釈した標準品）を５０μＬずつＳＴＡＧＯ血液凝固カップ中で混合し、３７℃で１７０秒インキュベートした後、凝固時間の記録を開始し、同時に２５　ｍＭの$CaCl_2$を５０μＬ添加し測定し、検量線によりＦＶＩＩＩの活性を求めた。

【０１０３】

ＥＬＩＳＡ

Ｒｅｆａｃｔｏを標準品とし、培地で１Ｕ／ｍＬ（２００ｎｇ／ｍＬ）から１／２半分で１／５１２に希釈した。上記のように、プラスミドトランスフェクション後の上清培地をサンプルとした。マウス血漿サンプルをＨＥＰＥＳ緩衝液中にて１：１０の希釈比率で希釈した。捕捉抗体（ＰＡＨ－ＦＶＩＩＩ－Ｓ，７．１ｍｇ／ｍＬ，１：２０００）を被覆液（０．１Ｍ炭酸水素ナトリウムと炭酸塩、ｐＨ９．６）で希釈し、その後９６ウェルプレートに被覆し、４℃で一晩インキュベートし、３％のＢＳＡブロック液でブロックし、ブロック液をＰＢＳＴ緩衝液（１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、２．５ｍＭ　ＫＣｌ、８ｍＭ　Na_2HPO_4、２ｍＭ　KH_2PO_4、及び０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０、ｐＨ　８．４）で希釈し、室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳＴ緩衝液で３回洗浄した後、１００　μＬの標準品とサンプルを加え、室温で１時間インキュベートし、ＰＢＳＴ緩衝液で３回洗浄し、検出抗体（ＧＭＡ－８０２１－ＨＲＰ、１：２００）を加え、室温で１時間インキュベートし、ＰＢＳＴ緩衝液で３回洗浄し、１×ＳｕｒｅＢｌｕｅ　ＴＭＢ　１成分Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅペルオキシダーゼ基質を用いて発色し、発色が室温で１～１０分間行われると、０．５Ｍ　H_2SO_4を加えて終了した。分光光度計を用いて４５０ｎｍと６３０ｎｍでそれぞれＯＤ値を測定し、検量線からＦＶＩＩＩのタンパク質含量を計算した。

【０１０４】

実施例１：巨大コウモリのＦＶＩＩＩ重鎖Ａ１ドメインにおける分泌能増強構造の決定

研究により、ブタＦＶＩＩＩの分泌能がヒト第ＶＩＩＩ因子より１０～１００倍高く、ブタＦＶＩＩＩの重鎖が分泌能の向上に有利であることが報告されている（Identification of Porcine Coagulation Factor VIII Domains Responsible for High Level Expression via Enhanced Secretion. JBC, 279, 6546-6552）。本発明者らは、他の動物のＦＶＩＩＩも分泌を増強する能力を有する可能性があると仮定し、分泌能を増強する重鎖領域を決定する実験を考案した。

【０１０５】

そのために、種々の動物のＦ８遺伝子ヌクレオチド配列を配列した。サル、巨大コウモリ、イルカのＦＶＩＩＩｓを選んだのは、サルが陸上でジャンプし、巨大コウモリが空を飛び、イルカが水中を泳いでいるからである。これらの動物のＦＶＩＩＩ重鎖配列とヒトのＦＶＩＩＩ軽鎖配列とをヘテロ接合してハイブリッドＦＶＩＩＩ分子を形成し、その後

、これらのハイブリッドＦＶＩＩＩ分子を含むプラスミドをそれぞれ細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後２４時間になると、上清培地を採取してａＰＴＴ検査を行って、ＦＶＩＩＩ分子の凝固活性を測定した。

【０１０６】

ａＰＴＴの結果を図２Ａ～２Ｃに示す。ｍＨＣは、巨大コウモリＦＶＩＩＩの重鎖とヒト第ＶＩＩＩ因子の軽鎖からなるヘテロ接合型ＦＶＩＩＩであり、ｄＨＣは、イルカＦＶＩＩＩの重鎖とヒト第ＶＩＩＩ因子の軽鎖からなるヘテロ接合型ＦＶＩＩＩである。図２Ａ～２Ｃでは、ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＨＣ、ＦＶＩＩＩ－ＳＱを指す）が対照とされ、図２Ａは、ｈＨＣとｍＨＣの活性の比較であり、図２Ｂは、ｈＨＣとｄＨＣの活性の比較であり、図２Ｃは、ｈＨＣとｍａＨＣの活性の比較である。

【０１０７】

図２Ａ～２Ｃに示すように、巨大コウモリＦＶＩＩＩ重鎖とヒト第ＶＩＩＩ因子軽鎖を含むヘテロ接合型ＦＶＩＩＩ（ｍＨＣ）は、凝血時間が最も短く、このことから、その分泌レベルが最も高く、凝血活性が最も高いことを示す。ｍＨＣがヒト第ＶＩＩＩ因子と異なる点は、ｍＨＣに巨大コウモリＦＶＩＩＩの重鎖が含まれていることである。この結果は、巨大コウモリＦＶＩＩＩの重鎖がヘテロ接合型ｍＨＣ　ＦＶＩＩＩの分泌能を高めるのに有利であることを示す。

【０１０８】

次に、より多くのヘテロ接合型ＦＶＩＩＩ分子－Ｍ１Ｈ２とＨ１Ｍ２を構築するために、ヒトと巨大コウモリのＦＶＩＩＩのＡ１とＡ２ドメインをそれぞれ置き換えた。Ｍ１Ｈ２は、巨大コウモリ重鎖（ｍＨＣ）のＡ１ドメインとヒト重鎖（ｈＨＣ）のＡ２ドメインを含み、Ｈ１Ｍ２は、ｈＨＣのＡ１ドメインとｍＨＣのＡ２ドメインを含む（図３Ａ）。

【０１０９】

図３Ｂに示すように、Ｍ１Ｈ２は、ヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＨＣ）に比べて凝固時間が短く、このことから、その分泌レベルが高く、凝固活性が高いことを示す。このデータは、ｍＨＣのＡ１ドメインをｈＨＣのＡ１ドメインに置き換えることで、凝固活性が向上することを示唆している。

【０１１０】

実施例２：Ａ１ドメインにおける分泌能増強の低い領域の決定

Ａ１ドメインをさらに細分化するために、Ｐｈｙｍｏｌソフトウェアを用いてＦＶＩＩＩの重鎖構造を予測した。この予測によれば、重鎖のＡ１ドメインはＤ１とＤ２に、Ａ２ドメインはＤ３とＤ４に細分化され、それにより重鎖の分泌増強に有利な領域をさらに特定しやすくする（図４）。

【０１１１】

ネガティブ選択戦略とポジティブ選択戦略の両方が使用される。ネガティブ選択戦略では、巨大コウモリＦＶＩＩＩのＤ１又はＤ４ドメインをヒト第ＶＩＩＩ因子のＤ１又はＤ４ドメインに置き換え、ヘテロ接合型巨大コウモリＦＶＩＩＩ：ｈＤ１とｈＤ４を構築した（図５Ａ）。図５Ａに示すように、ｈＤ１は、ヒト第ＶＩＩＩ因子重鎖（ｈＨＣ）のＤ１領域と巨大コウモリＦＶＩＩＩ重鎖のＤ２～Ｄ４領域とを含み、ｈＤ４は、ヒト第ＶＩＩＩ因子重鎖（ｈＨＣ）のＤ４領域と巨大コウモリＦＶＩＩＩ重鎖のＤ１～Ｄ３領域を含む。すべてのＦＶＩＩＩ突然変異体は同じ軽鎖と他の必要な調節要素を含み、同じドメイン又は発現要素は図に示されていない。ヒトのＦＶＩＩＩは低い分泌活性を持つため、ヘテロ接合型巨大コウモリのＦＶＩＩＩ突然変異体の分泌効率が低下する。実際には、図５Ｂに示すように、ｈＤ１はヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＨＣ）に比べて凝固時間が長い。この結果は、ヒト第ＶＩＩＩ因子のＤ１ドメインが巨大コウモリＦＶＩＩＩの分泌活性を低下させる可能性があり、それが逆に血液凝固活性を低下させることを示唆している。したがって、Ｄ１ドメインは　ＦＶＩＩＩの分泌に重要である可能性がある。

【０１１２】

ポジティブ選択戦略では、ヘテロ接合型ヒト第ＶＩＩＩ因子突然変異体ｍＤ１ｍＤ３、ｍＤ２、ｍＤ３、及びｍＤ４を構築するために、ヒト第ＶＩＩＩ因子のＤ１～Ｄ４領域を

巨大コウモリＦＶＩＩＩの対応する領域に置き換えた（図６Ａ）。巨大コウモリＦＶＩＩＩはより高い分泌活性を持つため、この突然変異はヘテロ接合型ヒト第ＶＩＩＩ因子ｓの分泌効率を高める。図６Ｂに示すように、すべてのハイブリッドヒト第ＶＩＩＩ因子突然変異体の凝固時間はヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＨＣ）よりも短く、中でもｍＤ１ｍＤ３の凝固時間が最も短い。この結果は、Ｄ１ドメインがＦＶＩＩＩ分泌の重要な領域である可能性を示唆している。

【０１１３】

ネガティブ選択とポジティブ選択実験の結果は、巨大コウモリＤ１領域が、巨大コウモリＦＶＩＩＩＩ分泌能を高める重要なドメインである可能性がある。

【０１１４】

実施例３：Ｄ１ドメインにおける分泌増強を担うアミノ酸の決定

ヒトＤ１（配列番号１）と巨大コウモリＤ１（配列番号２、その配列は以下を参照）の領域のアライメントを行ったところ、両者には２３個のアミノ酸の差があることを発見した（図７、アスタリスクで表記）。なお、巨大コウモリＤ１領域がヒトＤ１領域よりもアミノ酸が１個多いこと（図７、ヒト配列の「－」はアミノ酸が１個欠失していることを表す）ことに注意されたい。以下では、多様な突然変異部位を有する巨大コウモリＦＶＩＩＩ及びヒト第ＶＩＩＩ因子突然変異体を構築する。ヒト第ＶＩＩＩ因子突然変異体中のアミノ酸の位置は配列番号１を参照し、巨大コウモリＦＶＩＩＩ突然変異体中のアミノ酸の位置は配列番号２を参照する。

【０１１５】

配列番号２のアミノ酸配列は以下のとおりである。

ATRRYYLGAVELSWDYMQSELLSELHMDTRFPPEVPRSFPFNTSVIYKKTVFVEFTD
HLFNTAKPRPPWMGLLGPTIRAEVSDTVVITLKNMASHAVSLHAVGVSYWKASEGA
QYEDQTSQREKEDDKVIPGDSHTYVWEVLKENGPMASDPPCLTYSYFSHVDLVKDL
NAGLIGTLLVCREGSLAKE

【０１１６】

ＦＶＩＩＩタンパク質の分泌に影響するアミノ酸を決定するために、巨大コウモリＤ１の２３個の異なるアミノ酸のうち８個をそれぞれヒトＤ１の対応するアミノ酸に置き換え、対応するＦＶＩＩＩ突然変異体：Ｖ５１Ｌ、Ｔ６２Ｉ、Ｅ１１６Ｄ、Ｉ１３０Ｆ、Ｄ１３３Ｇ、Ｅ１４０Ｑ、Ｐ１５３Ｌ、及びＦ１６０Ｌを得た。Ｖ５１Ｌは、巨大コウモリＦＶＩＩＩ突然変異体の配列番号２の５１番目のアミノ酸ＶがＬに突然変異したものを指し（図７参照）、その他の突然変異体の定義は同様である。図８Ａは、ＥＬＩＳＡの結果であり、この結果は、８つのアミノ酸をそれぞれ含む突然変異体、すなわち、Ｖ５１Ｌ、Ｔ６２Ｉ、Ｅ１１６Ｄ、Ｉ１３０Ｆ、Ｄ１３３Ｇ、Ｅ１４０Ｑ、Ｐ１５３Ｌ、及びＦ１６０Ｌが、ＦＶＩＩＩタンパク質の発現レベルを低下させることを示す（図８Ａ）。図８Ｂは、ａＰＴＴの結果であり、この結果は、８つのアミノ酸をそれぞれ含む突然変異体、すなわち、Ｖ５１Ｌ、Ｔ６２Ｉ、Ｅ１１６Ｄ、Ｉ１３０Ｆ、Ｄ１３３Ｇ、Ｅ１４０Ｑ、Ｐ１５３Ｌ、及びＦ１６０Ｌ突然変異体の凝固活性が低下することを示す（図８Ｂ）。これらのデータは、これら８つのアミノ酸が巨大コウモリＦＶＩＩＩの分泌能を増強するのに重要な役割を果たしていることを示しており、ヒト第ＶＩＩＩ因子における対応する８つのアミノ酸の突然変異がヒト第ＶＩＩＩ因子の分泌能を高める可能性がある。巨大コウモリＦＶＩＩＩのＤ１領域はヒト第ＶＩＩＩ因子よりアミノ酸が１個多いため（図７参照）、ヒト第ＶＩＩＩ因子突然変異体のＬ５０Ｖ、Ｉ６１Ｔ、Ｄ１１５Ｅ、Ｆ１２９Ｉ、Ｇ１３２Ｄ、Ｑ１３９Ｅ、Ｌ１５２Ｐ及びＬ１５９Ｆは、ヒト第ＶＩＩＩ因子の分泌を増加させる可能性がある。

【０１１７】

なお、２つのアミノ酸突然変異であるＶ５１ＬとＰ１５３Ｌの突然変異体を含むことにより、巨大コウモリのＦＶＩＩＩの分泌を最大限に低下させることができた（図８Ａ～８Ｂ）ことに注意されたい。ヒト第ＶＩＩＩ因子において、Ｌ５０Ｖ及びＬ１５２Ｐの突然変異は、ヒト第ＶＩＩＩ因子の分泌及び凝固活性を増加させる２つの重要なアミノ酸の突

然変異である可能性がある。

【０１１８】

実施例４：分泌活性増強に寄与する他のアミノ酸の決定

巨大コウモリのＤ１領域の２０番目から２３番目のアミノ酸の位置において、巨大コウモリＦＶＩＩＩのアミノ酸配列はＥＬＬＳであり（図７）、ヒト第ＶＩＩＩ因子配列の対応するアミノ酸配列はＤＬＧである（図７）。ＦＶＩＩＩは分泌性タンパク質であるため、細胞の合成部位から放出されて小胞体を通過しなければならない。Ｄ１は小胞体のＢｉｐ領域と相互作用しているのではないかと推測されている。ＦＶＩＩＩが細胞から輸送されるとＡＴＰが消費されることが研究により明らかになった。細胞内のＡＴＰの貯蔵量が限られているため、ＡＴＰの消費が少ないタンパク質はより多く細胞外に運び出され、より多くの分泌タンパク質を産生することができる。タンパク質の親和性と疎水性を解析し、ヒト第ＶＩＩＩ因子におけるＤＬＧ配列をＳＬＧ（Ｄ２０Ｓ）又はＳＬＬ（Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ）に突然変異させた。これらはヒトのＦＶＩＩＩ突然変異体であるため、アミノ酸の位置は配列番号１の配列に基づいている。例えば、ここでのＧ２２Ｌとは、突然変異体ＦＶＩＩＩの２２番目のアミノ酸ＧがＬに突然変異したことを指す（配列番号１参照）。

【０１１９】

ヒト第ＶＩＩＩ因子のＤ１領域の突然変異体はＳＬＬ（Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ）、ＳＬＧ（Ｄ２０Ｓ）あるいはその両方がそれぞれ他のアミノ酸突然変異と結合したものを含み、種々のＦＶＩＩＩ突然変異体は表１のようである。

ヒト第ＶＩＩＩ因子の突然変異体	突然変異アミノ酸	突然変異アミノ酸の数
pAAV-CB-FVIII-SLG-3MU-SQ	D20S; L50V; I61T; L152P	4
pAAV-CB-FVIII-SLG-2MU-L152-SQ	D20S; L50V; I61T	3
pAAV-CB-FVIII-SLL-3MU-SQ	D20S; G22L; L50V; I61T; L152P	5
pAAV-CB-FVIII-SLL-2MU-L152-SQ	D20S; G22L; L50V; I61T	4
pAAV-CB-FVIII-SLG-2MU-SQ	D20S; L50V; L152P	3
pAAV-CB-FVIII-SLL-2MU-SQ	D20S; G22L; L50V; L152P	4

表１は、ＤＬＧ配列突然変異を含む各種ＦＶＩＩＩ突然変異体である。ヒトＤ１領域のＤＬＧ配列をＳＬＬ（Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ）又はＳＬＧ（Ｄ２０Ｓ）に突然変異させるか、又はそれぞれ他のアミノ酸突然変異と結合して、３～５個の突然変異アミノ酸を有する種々のＦＶＩＩＩ突然変異体を形成する。

【０１２０】

ＦＶＩＩＩ突然変異体とヒト第ＶＩＩＩ因子（ｈＦＶＩＩＩ－ＳＱ）の凝固活性を比較

するために、ａＰＴＴ実験を行った。図９に示すように、すべてのヒト第ＶＩＩＩ因子突然変異体はｈＦＶＩＩＩ－ＳＱよりも凝固活性が高かった。これらの結果は、これらの突然変異したアミノ酸の様々な組み合わせがヒト第ＶＩＩＩ因子の分泌を上昇させることを示唆している。

【０１２１】

以上のように、ヒト第ＶＩＩＩ因子には、Ｄ２０Ｓ、Ｇ２２Ｌ、Ｌ５０Ｖ、Ｉ６１Ｔ、Ｄ１１５Ｅ、Ｆ１２９Ｉ、Ｇ１３２Ｄ、Ｑ１３９Ｅ、Ｌ１５２Ｐ、及びＬ１５９Ｆの１０個の突然変異があり、これらの部位はヒト第ＶＩＩＩ因子の分泌能と活性を増強する重要な突然変異部位と決定された。

【０１２２】

実施例５：本明細書に開示された遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドを含む組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターの生産

３Ｌバイオリアクターにおいて０．８×１０^{6}個の細胞／ｍＬの密度で２９３懸濁細胞を接種した。３つのプラスミド（ｐＡＡＶ－ｈＦＶＩＩＩ、ｐＡｄ－ｈｅｌｐｅｒ、ｐＲｅｐ／Ｃａｐ）を１：１：１の割合で混合し、その後ＰＥＩと１：２の割合で混合した（１ｕｇプラスミド：２μＬ　ＰＥＩ）。混合物を室温で１５分間インキュベートした後、バイオリアクターに添加した。トランスフェクション後７２時間になると、１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含む溶解緩衝液で細胞を溶解した。その後、バイオリアクターに５０Ｕ／ｍＬＢｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼと１ｍＭ　ＭｇＣｌ$_{2}$を添加し、３７℃で３時間インキュベートし、パッケージングしていない細胞、ウイルス、プラスミドのＤＮＡとＲＮＡを消化した。消化後の細胞溶解液を遠心分離し濾過濃縮した後、ｒＡＡＶベクターをＡＡＶＸアフィニティーカラムで精製し、さらにアニオンカラムで精製した。緩衝液交換後、ｒＡＡＶを無菌ろ過し－８０℃で保存した。

【０１２３】

実施例６：本明細書に開示された遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドを含む医薬組成物の製造

例５で精製されたｒＡＡＶベクターを、他の活性剤、防腐剤、緩衝剤、塩、薬学的に許容される担体又は他の薬学的に許容される成分と混合して、血友病Ａ型患者を治療するための薬学的組成物を製造する。

【０１２４】

実施例７：本明細書に開示された遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドを含む医薬組成物による血友病Ａ型患者の治療

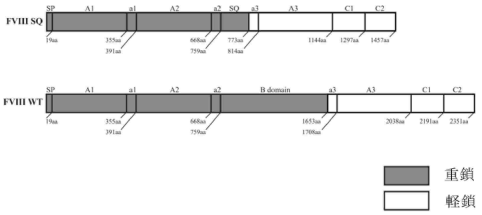
血友病Ａ型患者を募集し、第１相臨床試験を実施した。試験を行うための遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドの投与量は０．５×１０^{12}Ｖｇ／Ｋｇ～６×１０^{13}Ｖｇ／Ｋｇである。

【０１２５】

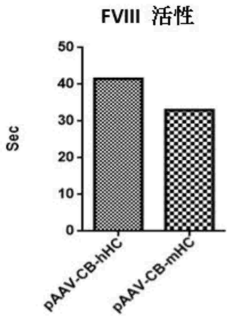
本明細書に開示された遺伝子操作ｈＦＶＩＩＩポリペプチドを発現するｒＡＡＶベクターを含む医薬組成物を血友病Ａ型患者に静脈内投与した。患者に薬物を注射した後、ＦＶＩＩＩの発現レベルを追跡し検出するために、４年間のフォローアップを行った。第１チェックポイントを初回注射後７日目とし、その後６カ月間、１～２週間ごとに検出を行い、その後の間隔は１～３カ月とした。初回投与から１年後、患者のＦＶＩＩＩ発現量は正常レベルの２％を上回った。

【図面】

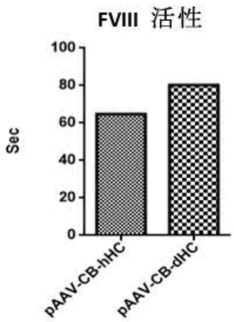
【図１】



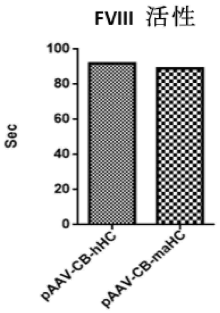
【図２Ａ】



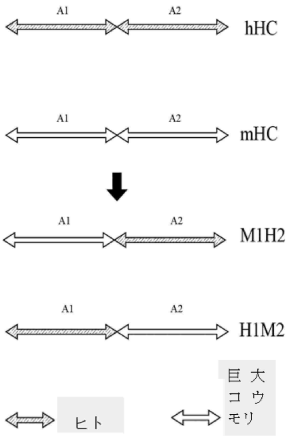
【図２Ｂ】



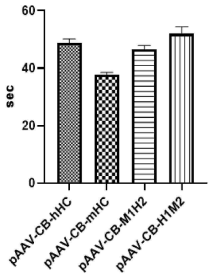
【図２Ｃ】



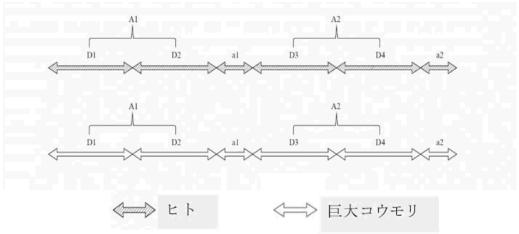
【図３Ａ】



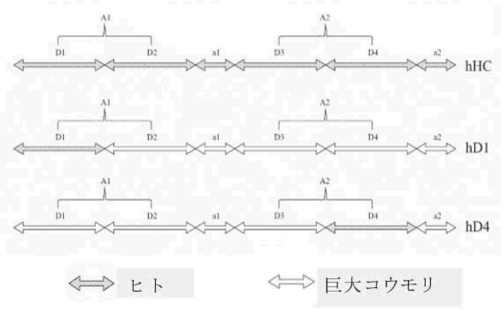
【図３Ｂ】



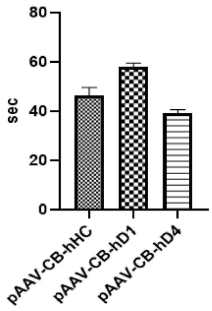
【図４】



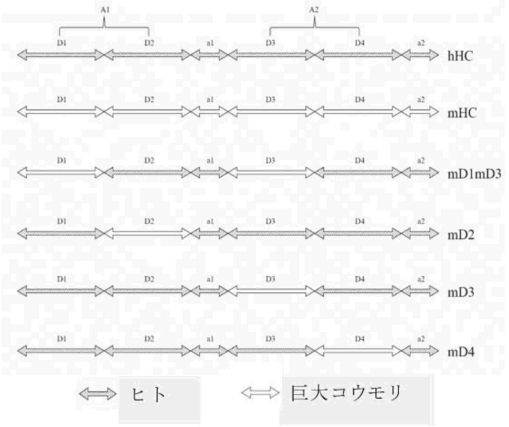
【図５Ａ】



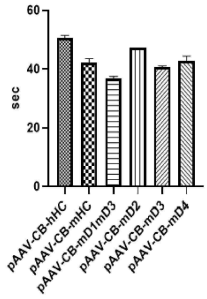
【図５Ｂ】



【図６Ａ】



【図６Ｂ】



【図７】

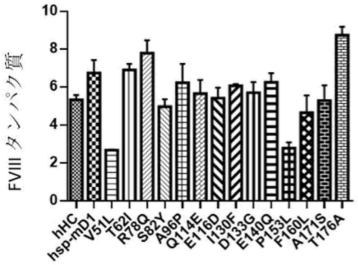
```
ヒト        ATRRYYLGAVELSWDYMQSD-LGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLF   59
巨大コウモリ  ATRRYYLGAVELSWDYMQSELLSELHMDTRFPPEVPRSFPFNTSVIYKKTVFVEFTDHLF   60
                        ** *  ** *   * *       *   *

ヒト        NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTS   119
巨大コウモリ  NTAKPRPPWMGLLGPTIRAEVSDTVVITLKNMASHAVSLHAVGVSYWKASEGAQYEDQTS   120
             *           *   *           *                 * *

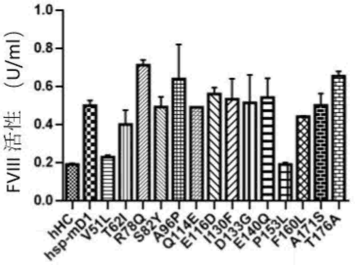
ヒト        QREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVC   179
巨大コウモリ  QREKEDDKVIPGDSHTYVWEVLKENGPMASDPPCLTYSYFSHVDLVKDLNAGLIGTLLVC   180
                 *  *     *           *       *       *    *

ヒト        REGSLAKE   187
巨大コウモリ  REGSLAKE   188
```

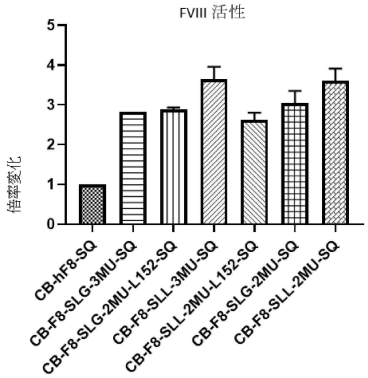
【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【図９】



【配列表】

2024544499000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/075976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/755(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61K 38/37(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, C12N, A61K

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

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

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, WANFANG, ISI Web of Science, BAIDU and searched terms: human factor VIII, hFVIII, FVIII-SQ, mutation, substitute, substitution, secretion, coagulation, L50, L152, D20, G22, megabat heavy chain, mHC, hemophilia A, HA, rAAV and the like; GenBank, EMBL, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 1-6.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015023894 A1 (BIOGEN IDEC INC) 19 February 2015 (2015-02-19) see claims 1-149	1-13
A	WO 2013123457 A1 (BIOGEN IDEC INC) 22 August 2013 (2013-08-22) see claims 1-110, Figure 1A-1G	1-13
A	WO 2008129422 A1 (LFB BIOTECHNOLOGIES et al.) 30 October 2008 (2008-10-30) see the abstract, Examples 1-10, claims 1-40	1-13
A	EP 1502921 A1 (ZLB BEHRING GMBH) 02 February 2005 (2005-02-02) see claims 1-11	1-13
A	WO 2017222330 A1 (MOGAM INST BIOMEDICAL RES) 28 December 2017 (2017-12-28) see the abstract, Figures 1-8	1-13

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"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
06 June 2022	**19 August 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **National Intellectual Property Administration, PRC** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing** **100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer **MA,Zhenlian** Telephone No. **62412131**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/075976

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. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/075976

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] PCT Rule 39.1(iv) - Method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.

[2] The search of claim 13 is restricted to the subject matter "Use of the pharmaceutical composition of claim 12 in the manufacture of a medicament for treating a hemophilia A patient ".

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/075976

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2015023894	A1	19 February 2015	US	2016311885	A1	27 October 2016
				EP	3033098	A1	22 June 2016
WO	2013123457	A1	22 August 2013	HR	P20190454	T1	03 May 2019
				CA	2864126	A1	22 August 2013
				TW	201811823	A	01 April 2018
				BR	112014019901	A2	04 July 2017
				TW	201348254	A	01 December 2013
				AU	2013204636	A1	29 August 2013
				NZ	628014	A	30 September 2016
				KR	20140134291	A	21 November 2014
				EP	2822577	A1	14 January 2015
				HK	1204997	A1	11 December 2015
				JP	2015509365	A	30 March 2015
				EA	201491388	A1	30 January 2015
				SI	2822577	T1	31 July 2019
				HU	E043537	T2	28 August 2019
				DK	2822577	T3	01 April 2019
				US	2020048327	A1	13 February 2020
				LT	2822577	T	25 March 2019
				EP	3549953	A1	09 October 2019
				KR	20190094480	A	13 August 2019
				US	2016355568	A1	08 December 2016
WO	2008129422	A1	30 October 2008	CN	101970481	A	09 February 2011
				US	2010197578	A1	05 August 2010
				EP	1985631	A1	29 October 2008
				PL	2150561	T3	30 March 2012
				DK	2150561	T3	19 December 2011
				IN	6739DELNP2009	A	18 June 2010
				AT	530575	T	15 November 2011
				KR	20100017142	A	16 February 2010
				BR	PI0810592	A2	21 October 2014
				AR	066132	A1	22 July 2009
				TW	200914608	A	01 April 2009
				ES	2376022	T3	08 March 2012
				EP	2150561	A1	10 February 2010
				AU	2008240663	A1	30 October 2008
				CA	2684834	A1	30 October 2008
				JP	2010524453	A	22 July 2010
EP	1502921	A1	02 February 2005	None			
WO	2017222330	A1	28 December 2017	JP	2021118696	A	12 August 2021
				JP	2019527541	A	03 October 2019
				CN	109689683	A	26 April 2019
				KR	20190018013	A	20 February 2019
				EP	3476860	A1	01 May 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/37*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/37	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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．ＴＷＥＥＮ

園田・小林弁理士法人

(72)発明者　董▲びあお▼

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

(72)発明者　張波

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

(72)発明者　叶静▲や▼

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

(72)発明者　肖琳

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

(72)発明者　鄭趙悦

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

(72)発明者　楊荔

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

(72)発明者　劉瑜

中華人民共和国四川省成都市双流区生物城中路二段１８号成都天府国際生物城孵化園Ｄ２－１０楼

Ｆターム（参考）　4C084　AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 DC15 MA16
MA66 NA06 ZA53
4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 MA16 MA66 NA06 ZA53
4H045　AA10 AA30 BA09 CA40 DA66 EA24 FA74