

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-506261

(P2018-506261A)

(43) 公表日 平成30年3月8日 (2018. 3. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 4
<b>C 0 7 K 14/755 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/755	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 P 21/00 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/00 C	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 35/761 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/761	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-507431 (P2017-507431)	(71) 出願人	301040958
(86) (22) 出願日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)		ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月4日 (2017. 4. 4)		THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/045142		A
(87) 国際公開番号	W02016/025764		アメリカ合衆国、ピーエー 19104、
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016. 2. 18)		フィラデルフィア、シビック センター
(31) 優先権主張番号	62/036, 936		ブールバード 3401
(32) 優先日	平成26年8月13日 (2014. 8. 13)	(74) 代理人	100126572
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 村越 智史
		(74) 代理人	100140822
			弁理士 今村 光広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 止血疾患を治療するための変異因子 V I I I のゲノム組込及び発現のための改良された発現カセット

## (57) 【要約】

第 V I I I 因子変異体及びその使用が開示される。  
 特定の実施形態において、第 V I I I 因子変異体は、野生型の第 V I I I 因子タンパクよりも細胞によってより効率的に発現され、野生型の第 V I I I 因子タンパクよりも細胞によって増加したレベルで分泌され、野生型の第 V I I I 因子タンパクと比較して増強された活性を示し、ウイルスベクター中により効率的にゲノム組込される。

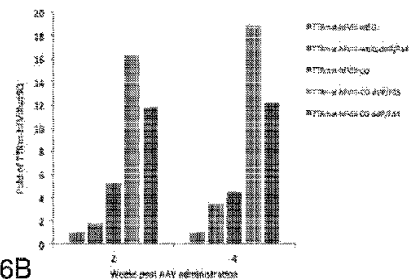


Fig. 6B

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

第 V I I I 因子 ( F V I I I ) をコードする核酸変異体であって、  
前記核酸変異体によってコードされる F V I I I は、野性型 F V I I I 発現と比較して発現が多い、核酸変異体。

**【請求項 2】**

第 V I I I 因子 ( F V I I I ) をコードする核酸変異体であって、  
前記核酸変異体によってコードされる F V I I I が B ドメイン欠損を含み、B ドメイン欠損発現を含む野性型 F V I I I と比較して発現が多い、核酸変異体。

**【請求項 3】**

前記核酸変異体は、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター中により効率的にゲノム組込される、請求項 1 又は 2 に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 4】**

前記核酸変異体によってコードされる F V I I I が、野性型 F V I I I と比較して又は B ドメイン欠損を含む野性型 F V I I I と比較してより大きな生物活性を示す、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 5】**

前記生物活性は、凝固分析、又は、F V I I I アッセイ若しくは F V I I I 欠失モデルにおける出血減少によって決定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 6】**

前記核酸変異体は、野性型 F V I I I における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A と対比して C T G に変化した 1 つ以上のロイシンコドン有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 7】**

前記核酸変異体は、野性型 F V I I I における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A ロイシンコドンから変更された 2 - 5、5 - 10、10 - 20、20 - 50、50 - 100、100 - 250、250 - 500、500 - 750 又は 750 - 850 個の C T G ロイシンコドン有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 8】**

前記核酸変異体は、野性型 F V I I I における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A ロイシンコドンから変化した 85 % 超の C T G ロイシンコドン有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 9】**

前記核酸変異体は、野性型 F V I I I における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A ロイシンコドンから変化したすべての C T G ロイシンコドン有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 10】**

前記核酸変異体は、野性型 F V I I I において A A A リジンコドンと対照として 1 つ以上の A A G リジンコドン有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 11】**

前記核酸変異体は、約 50 - 59 %、50 - 56 %、又は 50 - 53 % の G C 含有量有する、請求項 1 に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 12】**

前記核酸変異体は、野生型ヒト F V I I I 核酸又は B ドメイン欠損を含む野生型ヒト F V I I I 核酸に対して少なくとも 75 % 同一である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I 。

**【請求項 13】**

前記核酸変異体がヒト F V I I I であり、及び / 又は、前記野性型 F V I I I 又は B ドメ

10

20

30

40

50

イン欠損を含む野性型 F V I I I がヒト F V I I I である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I。

【請求項 1 4】

前記核酸変異体は配列番号 1 - 7 及び 9 のいずれかで構成される、請求項 1 に記載の変異体 F V I I I。

【請求項 1 5】

P A C E / フーリン切断部位をコードするコドンの 1 個、2 個、3 個又は 4 個すべてが欠損している、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I。

【請求項 1 6】

位置 1 6 4 5 - 1 6 4 8 から H H Q R 又は R H Q R と示されている P A C E / フーリン切断部位をコードするコドンの 1 個、2 個、3 個又は 4 個すべてが欠損している、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の変異体 F V I I I。

10

【請求項 1 7】

請求項 1 - 1 6 のいずれかの変異体 F V I I I を含む発現ベクター。

【請求項 1 8】

アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、プラスミド又はレンチウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の発現ベクター。

【請求項 1 9】

前記 A A V ベクターが、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 1 0、A A V 1 1、R h 1 0、R h 7 4 又は A A V - 2 i 8 A A V 血清型を含む、請求項 1 8 に記載の発現ベクター。

20

【請求項 2 0】

イントロン、発現制御因子、1 つ以上のアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 逆方向末端リピート ( I T R )、及び / 又は、フィラーポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 7 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 1】

前記イントロンが前記変異体 F V I I I の内部若しくは前記変異体 F V I I I に隣接しているか、又は、前記発現制御因子が前記変異体 F V I I I に作用可能に連結しているか、又は、前記 A A V I T R が前記変異体 F V I I I の 5 ' 末端若しくは 3 ' 末端に隣接しているか、又は、前記フィラーポリヌクレオチド配列が前記変異体 F V I I I の 5 ' 末端又は 3 ' 末端に隣接している、請求項 2 0 に記載の発現ベクター。

30

【請求項 2 2】

前記発現制御因子は、構成的制御因子、若しくは、調節可能制御因子、又は、組織特異的発現制御因子、若しくは、プロモーターを含む、請求項 2 0 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 3】

前記発現制御因子は、肝臓中の発現を与える因子を含む、請求項 2 0 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 4】

前記発現制御因子は T T R プロモーターか変異体 T T R プロモーターを含む、請求項 2 0 に記載の発現ベクター。

40

【請求項 2 5】

前記変異体 T T R プロモーターは配列番号 8 で構成される、請求項 2 4 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 6】

前記 I T R は、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 1 0、A A V 1 1、R h 1 0、R h 7 4、若しくは、A A V - 2 i 8 A A V 血清型又はこれらの組み合わせのいずれかの 1 つ以上の I T R を含む、請求項 2 0 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 7】

50

請求項 1 - 16 のいずれかの核酸変異体によってコードされる F V I I I を発現する宿主細胞。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体又は請求項 17 - 26 のいずれかの発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体又は請求項 17 - 26 のいずれかの発現ベクターを含むウイルスベクター。

【請求項 30】

請求項 1 - 16 のいずれかの核酸変異体又は請求項 17 - 26 のいずれかの発現ベクターを含む A A V ベクター。

10

【請求項 31】

前記 A A V ベクターが、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、R h 10、R h 74、又は、A A V - 2 i 8 V P 1、V P 2 及び / 若しくは V P 3 配列に対して 75 % 以上の配列同一性を有する V P 1、V P 2 及び / 又は V P 3 キャプシド配列を含む、請求項 30 に記載の A A V ベクター。

【請求項 32】

前記 A A V ベクターが、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、R h 10、R h 74 及び A A V - 2 i 8 A A V 血清型のいずれかから選択される V P 1、V P 2 及び / 又は V P 3 キャプシド配列を含む、請求項 30 に記載の A A V ベクター。

20

【請求項 33】

生物学的適合性を有する担体又は賦形剤中に、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体、請求項 17 ~ 26 のいずれかに記載の発現ベクター、又は、請求項 30 - 32 のいずれかのウイルス若しくは A A V ベクターを含み、空のカプシド A A V を任意に含む、医薬組成物。

【請求項 34】

リポソーム中に入れられた又はリン脂質若しくはミセルと混合された請求項 17 ~ 26 のいずれかに記載の発現ベクター又は請求項 30 - 32 のいずれかに記載のウイルス若しくは A A V ベクター、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の核酸変異体。

30

【請求項 35】

哺乳動物又は哺乳動物細胞へ核酸配列を送達又は移動する方法であって、前記哺乳動物又は哺乳動物細胞の中に請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体、請求項 17 - 26 のいずれかに記載の発現ベクター、又は、請求項 30 - 32 のいずれかのウイルス若しくは A A V ベクターを投与し又は接触させ、それによってそれによって前記核酸配列を哺乳動物又は哺乳動物細胞に送達又は移動するステップを含む方法。

【請求項 36】

前記哺乳動物細胞が培養液中に又は被検体中に存在する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

第 V I I I 因子を必要とする哺乳動物を治療する方法であって、  
 ( a ) 請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体、請求項 17 ~ 26 のいずれかに記載の発現ベクター又は請求項 30 - 32 のいずれかのウイルス若しくは A A V ベクターを提供するステップと、  
 ( b ) 請求項 1 - 16 のいずれかに記載の核酸変異体、請求項 17 - 26 のいずれかに記載の発現ベクター、あるいは哺乳動物に対する請求項 30 - 32 のいずれかに記載のウイルス若しくは A A V ベクターの所定量を投与するステップを含み、  
 前記第 V I I I 因子が哺乳動物中で発現される、方法。

40

【請求項 38】

前記第 V I I I 因子は、哺乳動物に対して有益な又は治療的な効果を有するレベルで発現

50

される、請求項 35 又は 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記第 V I I I 因子は、前記哺乳動物の細胞、組織又は器官において発現される、請求項 35 又は 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記細胞が分泌細胞を含む、請求項 35 または 37 に記載の方法。

【請求項 41】

前記細胞が内分泌細胞又は内皮細胞を含む。請求項 35 又は 37 に記載の方法

【請求項 42】

前記細胞が肝細胞、シヌソイドの内皮細胞、巨核球、血小板細胞又は造血幹細胞を含む、請求項 35 又は 37 に記載の方法。 10

【請求項 43】

前記哺乳動物の組織又は器官が肝臓を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 44】

前記哺乳動物は、不十分な量の第 V I I I 因子タンパクを生産するか、又は、不完全若しくは異常な第 V I I I 因子タンパクを生産する、請求項 35 又は 37 に記載の方法。

【請求項 45】

前記哺乳動物には血友病 A を有する、請求項 35 又は 37 に記載の方法。

【請求項 46】

必要性のある患者に止血関連疾患の治療のための方法であって、  
生物学的に許容できる担体中の治療上有効な量の請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体、請求項 17 ~ 26 のいずれかに記載の発現ベクター、又は、請求項 30 ~ 32 のいずれかに記載のウイルス若しくは A A V ベクターの患者に対する投与を含む、方法。 20

【請求項 47】

前記哺乳動物又は患者が、血友病 A、フォン・ヴィレブランド病及び出血関連トラウマ、外傷、血栓症、血小板減少症、卒中、凝血異常、汎発性血管内凝固症候群 ( D I C )、並びに、過剰抗凝固療法疾患からなる群から選択される疾患を有する、請求項 35、37 又は 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の核酸変異体、請求項 17 ~ 26 のいずれかに記載の発現ベクター、請求項 30 ~ 32 のいずれかに記載のウイルス若しくは A A V ベクターは、前記哺乳動物又は患者に対して、静脈内に、動脈内に、筋肉内に、皮下に、腔内に、又は、挿管若しくはテーテルによって届けられる、請求項 35 ~ 47 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 49】

前記哺乳動物又は患者がヒトである、請求項 33 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

前記哺乳動物又は患者が、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 - R h 10 又は A A V - R h 74 の血清型に対して血清反応陽性又は血清反応陰性である、請求項 35 ~ 47 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 51】

前記哺乳動物又は前記患者に対して空のカプシド A A V を投与するステップをさらに含む、請求項 35 ~ 47 のいずれかに記載の方法。

【請求項 52】

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 - R h 10 及び / 又は A A V - R h 74 の血清型の空のカプシドを前記哺乳動物又は患者に対して投与するステップをさらに含む、請求項 35 ~ 47 のいずれかに記載の方法。

【請求項 53】

F V I I I タンパクを生産する方法であって、  
必要とされるときに細胞中で請求項 1 - 16 のいずれかに記載の変異体 F V I I I 又は請求項 17 の発現ベクターを発現させるステップと、  
細胞によって生産された前記 F V I I I タンパクを回収するステップを含む、方法。

【請求項 54】

前記細胞によって生産された F V I I I タンパクを精製又は単離するステップをさらに含む、請求項 53 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2014年8月13日に提出された米国仮特許出願第62/036,936号に対する優先権を主張する。全本、表、配列表及び図面を含む先の出願の全内容は参照により本明細書に組み込まれている。

【0002】

本発明は、組み換え凝固因子生産の分野、及び、異常止血に関連した医学的疾患の治療に関する。より詳しくは、本発明は、本発明の第 V I I I 因子変異体配列をより効率的にパッケージする、改善された発現カセットを提供する。改善された変異体は、野生型の第 V I I I 因子タンパクを超える増強された活性を示す。

イントロダクション

【0003】

本発明が関係する最先端技術について記述するために、いくつかの刊行物及び特許文献が明細書の全体にわたって引用される。これらの引用のそれぞれは、あたかもすべてが記載されているように参照によって本明細書に組み込まれている。

【0004】

血友病は、世界的に5000人の男性に1人存在するX連鎖出血性疾患である。ちょうど平年値の1%以上の凝固因子レベルを増加させることを目指した療法は、重篤な疾病表現型の本質的な改良に関係する。血友病 B ( H B ) のための A A V を介在した遺伝子導入の最近の治験は、第 I X 因子 ( F I X ) の治療的レベルの継続した長期発現を示したが、A A V キャプシドに対する抗 A A V 免疫反応によって A A V ベクター用量が限定的であることを実証した。これらのデータは血友病 B に関連するが、すべての血友病の80%は F V I I I 欠失、血友病 A ( H A ) が原因である。

【0005】

この疾病のための現行の治療は、第 V I I I 因子タンパクの頻繁な注入を必要とするタンパク置換療法である。患者がもはやそのような頻繁なタンパク治療を必要としないように、第 V I I I 因子発現の継続的な治療レベルを達成する即時の必要性が存在する。確かに、連続的な第 V I I I 因子発現は出血症状を防ぎ、タンパクに対する免疫寛容が確立されることを確かにするかもしれない。

【0006】

要約すると、血友病 A のための遺伝子治療は3つの別個の難問を提示する。  
(1) ヒト F V I I I ( h F V I I I ) の固有特性は、同様のサイズの他のタンパクと比較して発現することが困難である。  
(2) F V I I I c D N A の大きいサイズ及び配列特異的効果が A A V 生産を妨げる再配列と関連している。  
(3) 重篤な ( F V I I I < 1 % ) 血友病 A 患者の 25 ~ 30 % において生じる、タンパク療法に呼応した抗 F V I I I 抗体 ( 阻害薬 ) 生成の高い速度。

【0007】

本発明は血友病 A を有する患者の必要性のある患者における治療に役立つ改善された第 V I I I 因子変異体を提供する。

【0008】

10

20

30

40

50

本発明に従って、野生型のF V I I Iをコードする野生型の核酸とは異なるコドンに最適化された第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体が提供される。そのようなコドンが最適化されたF V I I Iをコードする核酸変異体は、Bドメインがない(例えば図1参照)F V I I Iタンパク(例えば、ヒトF V I I Iタンパク)のように、任意にBドメインなしで、F V I I Iタンパクをコードする。そのようなコドンが最適化されたF V I I Iをコードする核酸変異体は、発現増加を示し、細胞中に移された場合、特別のコドンに最適化された配列(C O / C O 3)に対して4~5倍であり(例えば、図6B参照)、F V I I Iタンパク分泌の増大及び従って活性の増大(例えば図7参照)に結びつく。また、そのようなコドンが最適化されたF V I I Iをコードする核酸変異体は、異なるA A Vベクターの血清型中により効率的にパッケージされ、A A V血清型を超えてA A Vベクターの生産増大に結びつく(例えば、表3-5参照)。

10

#### 【0009】

驚いたことに、これらの特徴は、野生型のF V I I Iをコードする野生型の核酸の発現又はBドメインのない野性型F V I I Iの発現と比較して劇的にF V I I I発現を増加させ、また、A A Vベクター中へのゲノム組込効率を増大し、より高いベクター生産量に結びつく。コドン最適化されたF V I I Iコード配列は、A A Vゲノム組込後に、野性型F V I I I及び他のコドン最適化されたh F V I I I導入遺伝子について観察されるF V I I I導入遺伝子の完全性に影響を与える再配列事象の減少を示すことができる(例えば、C O / C O 3はC O 1及びC O 2よりも優れている)。さらに、P A C Eフーリン切断部位において単一のアミノ酸変更又は小さな欠損(1~4個のアミノ酸)を有するコドン最適化されていない及びコドン最適化されたF V I I I変異体は、インビボにおいて分泌を増大し、また、F V I I Iタンパクの非活性度を増大することができる(非コドン最適化されたものは図3B、コドン最適化されたものは図6B)。Bドメインを有する若しくは有しない及び/又は変異したP A C Eフーリン開裂認識部位を有する若しくは該認識部位がないF V I I Iをコードする核酸変異体は、F V I I Iの発現を増加させることができ、A A Vベクターの生産を増加させることができ、また、より高いレベルのF V I I Iの血中濃度及びより少ないF V I I Iで止血達成により、遺伝子導入の関係において効果増強を提供し、それによって有益な治療結果のために必要な有効量を減らすことができる。

20

#### 【0010】

ある実施形態において、野性型F V I I I発現と比較した場合、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体は、より大きな発現を示す。別の実施形態では、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体は、Bドメイン欠損を含み、Bドメイン欠損発現を含む野性型F V I I Iと比較した場合、より大きな発現を示す。さらなる実施形態において、F V I I Iをコードする核酸変異体は、アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターのようなウイルスベクター中により効率的にゲノム組込される。

30

#### 【0011】

さらに別の実施例において、前記核酸変異体によってコードされるF V I I Iは、野性型F V I I Iと比較した場合又はBドメイン欠損を含む野性型F V I I Iと比較した場合(例えば、凝固分析又はF V I I Iアッセイ若しくはF V I I I欠失モデルにおける出血減少により決定したとき)、より大きい生物活性を示す。

40

#### 【0012】

さらに別の実施形態において、コドンが最適化されたF V I I Iコード核酸変異体は、変異体F V I I I又はF V I I Iタンパクと呼ばれる、変化したP A C Eフーリン開裂認識部位を有するF V I I Iタンパクをコードする。変化したP A C Eフーリン開裂認識部位を有するF V I I Iタンパクをコードするそのようなコドンが最適化されたF V I I I核酸変異体は、分泌及び血液凝固活性(例えば、図2、図6及び図7参照)の増加を示す。特別な態様において、F V I I Iをコードする核酸変異体は、F V I I IのP A C E / フーリン切断部位をコードするコドンの1個、2個、3個又は4個すべてが置換又は削除されている。そのような態様において、そのようなF V I I I核酸変異体によってコードされる変異体F V I I Iタンパクは、F V I I IのP A C E / フーリン切断部位の1個、

50

2 個、3 個又は 4 個すべてが置換又は削除されている。さらなる特別な態様において、位置 1 6 4 5 ~ 1 6 4 8 から H H Q R 又は R H Q R として記載されている P A C E / フーリン切断部位をコードするコドンの 1 個、2 個、3 個又は 4 個すべてが、F V I I I をコードする核酸変異体において削除されている。

【0013】

さらなる態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、野性型 F V I I I をコードする核酸における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A と比較して、C T G に変化した 1 つ以上のロイシンコドン有する。さらなる態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、野性型 F V I I I をコードする核酸における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A のロイシンコドンから変更された 2 - 5 個、5 - 10 個、10 - 20 個、20 - 50 個、50 - 100 個、100 - 250 個、250 - 500 個、500 - 750 個又は 750 - 850 個の C T G ロイシンコドン有する。またさらなる態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、野性型 F V I I I をコードする核酸において、T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A のロイシンコドンから変更された 85 % を超える C T G ロイシンコドン有する。またさらなる態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、野性型 F V I I I をコードする核酸における T T A、T T G、C T T、C T C 又は C T A のロイシンコドンから変更されたすべての C T G ロイシンコドン有する。特別な態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、約 50 - 59 %、50 - 56 %、又は 50 - 53 % の G C 含有量を有する。他の態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、野性型 F V I I I をコードする核酸における A A A リジンコドンと比較して、1 つ以上の A A G リジンコドン有する。

10

20

【0014】

またさらなる実施形態において、核酸変異体をコードする F V I I I は、野生型ヒト F V I I I 核酸又は B ドメイン欠損を含む野生型ヒト F V I I I 核酸に対して少なくとも 75 % 同一である。さらなる特別な態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は、野生型ヒト F V I I I 核酸又は B ドメイン欠損を含む野生型ヒト F V I I I 核酸に対して約 75 - 85 % 同一（例えば、約 75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 % 又は 85 % 同一）である。

【0015】

特別な態様において、F V I I I をコードする核酸変異体は配列番号 1 - 7 及び 9 のいずれかに記載されている。

30

【0016】

いくつかの実施形態において、F V I I I をコードする核酸変異体は人間等の哺乳類のものである。人間型を含むそのような哺乳類 F V I I I をコードする核酸変異体は、野性型 F V I I I 又は B ドメイン欠損を含む野性型 F V I I I をベースとしていてもよい。

【0017】

本発明に従ってさらに提供されるのは、本明細書に開示されている F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクターである。特定の実施形態において、発現ベクターはアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、プラスミド又はレンチウイルスベクターを含む。特別な態様において、A A V ベクターは、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、R h 10、R h 74 又は A A V - 2 i 8 の A A V 血清型を含む。

40

【0018】

発現ベクターはさらなる成分又は因子を含んでもよい。特定の実施形態において、A A V ベクター等の発現ベクターは、イントロン、発現制御因子、1 つ以上の A A V 逆方向末端反復 (I T R) (例えば、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、R h 10、R h 74 か、A A V - 2 i 8 の A A V 血清型、又は、これらの組み合わせのいずれか)、及び / 又は、フィラーポリヌクレオチド配列をさらに含む。特別な態様において、イントロンが

50



F V I I I をコードする核酸変異体の内部に存在するか若しくは F V I I I をコードする核酸変異体に隣接しているか、及び / 又は、発現制御因子が F V I I I をコードする核酸変異体に作用可能に連結しているか、及び / 又は、A A V I T R が F V I I I をコードする核酸変異体の 5' 末端又は 3' 末端に隣接しているか、及び / 又は、フィラーポリヌクレオチド配列が F V I I I をコードする核酸変異体の 5' 末端又は 3' 末端に隣接している。

【 0 0 1 9 】

特別な態様において、発現制御因子は、構成的な若しくは調節可能な制御因子、又は、組織特異的な発現制御因子、又は、プロモーターを含む。さらなる特別な態様において、発現制御因子は、肝臓における発現を与える因子を含む。さらなる特別な態様において、発現制御因子は、配列番号 8 等の、T T R プロモーター又は変異体 T T R プロモーターを含む。

10

【 0 0 2 0 】

本発明に従ってさらに提供されるのは、本明細書に開示されている核酸変異体によってコードされる F V I I I を発現する宿主細胞である。特定の実施形態において、宿主細胞は、F V I I I をコードする核酸変異体又は F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクターを含む。特別な態様において、そのような宿主細胞は、核酸変異体によってコードされる F V I I I タンパクを生産し、生産される F V I I I タンパクが回収される。細胞によって生産されるそのような F V I I I タンパクは、任意に分離及び / 又は精製されて、本明細書に開示されている被検体に投与することができる。

20

【 0 0 2 1 】

本発明に従ってさらに提供されるのは、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルスベクターである。特定の実施形態において、ウイルスベクターは A A V ベクターを含む。特別な態様において、A A V ベクターは、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、R h 10、R h 74、又は、A A V - 2 i 8 V P 1、V P 2 及び / 若しくは V P 3 配列に対して 75 % 以上の配列同一性（例えば、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.1 %、99.2 %、99.3 %、99.4 %、99.5 %、99.6 %、99.7 %、99.8 % 等）を有する V P 1、V P 2 又は V P 3 キャプシド配列を含む。さらなる特別な態様において、A A V ベクターは、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、R h 10、R h 74 及び A A V - 2 i 8 の A A V 血清型のいずれかから選択される V P 1、V P 2 及び / 又は V P 3 キャプシド配列を含む。

30

【 0 0 2 2 】

本発明に従ってさらに提供されるのは、本明細書に記載されている F V I I I をコードする核酸変異体を含む組成物である。特定の実施形態において、医薬組成物は、生物学的適合性を有する担体又は賦形剤の中に、発現ベクター又はウイルス又は A A V ベクターを含む。そのような医薬組成物は、任意に空のカプシド A A V を含む（例えば、F V I I I をコードする核酸変異体を含むベクターゲノムがない）。さらなる特別な実施形態において、F V I I I をコードする核酸変異体、発現ベクター又はウイルス又は A A V ベクターは、リポソーム中に入っているか、又は、リン脂質又はミセルと混合されている。

40

【 0 0 2 3 】

本発明に従ってさらに提供されるのは、哺乳動物又は哺乳動物細胞へ F V I I I をコードする核酸変異体を送達又は移動する方法である。ある実施形態において、1つの方法は、F V I I I をコードする核酸変異体、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルス若しくは A A V ベクターを哺乳動物又は哺乳動物の細胞に投与又は接触させるステップを含み、それによって哺乳動物又は哺乳動物の細胞へ核酸配列を送達又は移動する。そのような方法は、培養中の哺乳動物細胞又は被検体（例えば患者）の中に F V I I I をコードする核酸変異体を導入

50

する。

【 0 0 2 4 】

本発明の方法は、第 V I I I 因子を必要とするヒト等の哺乳類被検体（例えば患者）を治療するステップをさらに含む（ここでいうヒトは不十分な量の第 V I I I 因子タンパク又は不完全な若しくは異常な第 V I I I 因子タンパクを生産する）。1つの実施形態において、第 V I I I 因子を必要とする哺乳動物を治療する方法は：F V I I I をコードする核酸変異体、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルス若しくは A A V のベクターを提供するステップと；F V I I I をコードする核酸変異体によってコードされる第 V I I I 因子が哺乳類の被検体中で発現されるように、F V I I I をコードする核酸変異体、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルス若しくは A A V のベクターの一定量を哺乳類被検体に投与するステップを含む。

10

【 0 0 2 5 】

別の実施形態において、必要のある患者（例えば、その患者は不十分な量の第 V I I I 因子タンパク、又は不完全な若しくは異常な第 V I I I 因子タンパクを生産する）における止血関連疾患の治療のための方法は、生物学的に許容可能な担体中の治療上有効な量の、F V I I I をコードする核酸変異体、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルス若しくは A A V のベクターを患者に投与するステップを含む。

20

【 0 0 2 6 】

本発明の方法の特別な態様において、第 V I I I 因子が哺乳動物に対して有益な又は治療的な効果を有するレベルで発現されるか、及び / 又は、第 V I I I 因子が哺乳動物の細胞、組織又は器官において発現される。そのような態様は、肝臓等の組織又は器官の中への F V I I I をコードする核酸変異体の導入を含む。そのような態様は、F V I I I をコードする核酸変異体の分泌細胞中への導入を含む。そのような態様は、内分泌細胞又は内皮細胞の中への F V I I I をコードする核酸変異体の導入を含む。そのような態様は、肝細胞、シヌソイド内皮細胞、巨核球、血小板細胞又は造血幹細胞の中への F V I I I をコードする核酸変異体の導入をさらに含む。

【 0 0 2 7 】

F V I I I をコードする核酸変異体、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルス若しくは A A V のベクターを投与（例えば、送達）するための候補被検体（例えば患者）及び哺乳動物（例えばヒト）には、血友病 A、フォン・ヴィレブランド病及び外傷関連出血、損傷、血栓症、血小板減少症、脳卒中、凝血異常、汎発性血管内凝固症候群（D I C）、又は、過剰抗凝固療法疾患を有する又はそのリスクがあるものが含まれる。

30

【 0 0 2 8 】

F V I I I をコードする核酸変異体、F V I I I をコードする核酸変異体を含む発現ベクター、又は、F V I I I をコードする核酸変異体を含むウイルス若しくは A A V のベクターを投与（例えば送達）するための候補被検体（例えば患者）及び哺乳動物（例えばヒト）には、A A V 抗体に対して血清反応陰性のもの又は A A V 抗体を発達させる若しくはそのリスクのあるものが含まれる。そのような被検体（例えば患者）及び哺乳動物（例えばヒト）は、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 - R h 10 又は A A V - R h 7 4 の血清型に対して血清反応陰性又は血清反応陽性であってもよい。

40

【 0 0 2 9 】

したがって、本発明の方法は、哺乳動物又は患者に対して空のカプシド A A V を投与するステップをさらに含む。特定の実施形態において、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 - R h 10 及び / 又は A A V - R h 7 4 の血清型の空のカプシドは、哺乳動物又は患者にさらに投与される。

50

## 【0030】

本発明による投与（例えば送達）の方法は、エキスピボ又はインピボの接触又は送達のあらゆる様式を含む。特定の実施形態において、投与（例えば送達）は、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、窩内、挿管、又は、カテーテル経由である。

## 【0031】

本発明は、変異体の投与を評価して変異体の免疫原性を監視するために、ヒトFVIIに対して耐性のある小さいモデル動物モデル及び大きい動物モデルにおいて、改善されたFVII変異体をテストするための方法を提供する。HBイヌモデルは、ヒトFIX遺伝子治療のために必要な有効量を予測するのに優れている。さらに、このモデルの使用は、そのような変異体に対する免疫反応を発達させる傾向がある抗hFVII抗体産生応答の証拠がなくても、hFVII-BDDを用いたタンパク置換療法を現在受けているヒトの評価を可能にする環境を提供する。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0032】

【図1】図1は、第VII因子のタンパク分解的開裂を示す。FVIIは、3つのAドメイン（A1、A2及びA3）、2つのCドメイン（C1及びC2）、及び、FVII機能には重要でない遺伝子のエクソン14によってコードされる巨大なBドメインからなるドメイン構造を有する。FVIIは、因子IXaによって触媒される反応において、因子Xの因子Xaへの活性化において補因子として機能する。FVIIは、フォンビルブラント因子（vWF）によって循環中に安定化されるFVII重鎖とFVII軽鎖で構成されるヘテロダイマーとして分泌される。トロンビン開裂時に、FVIIは活性化されたヘテロ三量体を形成する。

20

## 【0033】

【図2】図2はコドン最適化された第VII因子のAAV送達後の第VII因子の発現を示す。コドン最適化されたヒト因子VII遺伝子（CO）は、アデノ随伴ウイルスベクター血清型8に入れて血友病A/CD4ノックアウトマウスに届けられた。1×10<sup>11</sup>ベクター・ゲノム（vg）/1匹のhFVII-SQ（野性型第VII因子cDNA）、TTR-hFVII-SQ-CO、TTRmut-hFVII-SQ-CO又はTTRmut-hFVII-SQ-CO-deLP/Fがマウスに届けられた。循環中の第VII因子タンパクレベルを決定するために、ベクター投与後2週、4週、8週及び12週に回収した血漿に対してELISAを行った。

30

## 【0034】

【図3A】図3Aは非コドン最適化AAV-hFVII構築物を示している。AAV-hFVIIベクターは、野性型Bドメインが削除された（BDD）ヒト因子VIIcDNAを有する。エンハンサー/プロモーター因子は、ヒトapolタンパクExxC-1遺伝子座の肝臓制御領域の短縮バージョンを有する、最小の肝臓制御領域-ヒト-1抗トリプシンエンハンサー/プロモーター（HCR-hAAT）である（Nathwaniら、2006年、Sabatinoら、2011）。65塩基対のSV40イントロン及び134塩基対のSV40ポリアデニル化も含まれている。これらの構築物の間に於けるただ1つの違いは、1つが野性型hFVII-BDDを利用し（トップ構築物）、他のものがPACEフーリン欠損変異体を有する野性型hFVII-BDDを利用する（ボトム構築物）ということである。すべての5つのP/Fの欠損変異体（表1）がこの発現カセットの中に導入された。

40

## 【0035】

【図3B】図3BはhFVII PACEフーリン欠損変異体のAAV8送達後のFVII発現を示す。AAV（5×10<sup>11</sup>ベクターゲノム/マウス）が血友病A/CD4ノックアウト（免疫不全）マウスに届けられた。AAV投与後12週を通した血漿中hFVII発現（抗原及び活性）をフォローした。\* = p < 0.05

## 【0036】

【図4A】図4Aは、ヒト野生型構築物及びコドン最適化FVII導入遺伝子構築物を

50

示す。TTRプロモーターは、コドン最適化されたFVIIIIを発現させる。SQ、接合にS743及びQ1638を有するBドメイン欠失型；ITR、AAVベクター中への組換え遺伝子のゲノム組込のために必要な逆方向末端反復配列である。

【0037】

【図4B】図4Bは、hFVIIIIのコドン最適化がより高い発現レベルに結びつくことを示す。AAVベクター投与後4週及び8週のCO1 FVIIII、CO2 FVIIII及び野生型FVIIII AAVによって届けられるFVIIII発現及び活性レベルの比較である。

【0038】

【図4C】図4Cは、hFVIIIIのコドン最適化がより高い発現レベルに結びつくことを示す。AAVベクター投与後4週及び8週のCO1 FVIIII、CO3/CO FVIIII、及び、野生型のFVIIII AAVによって届けられるFVIIII発現及び活性レベルの比較である。

10

【0039】

【図5A】図5AはCO3のAAV送達後のFVIIII発現を示す。TTRプロモーター及びFVIIII-CO3を有するTTR変異体(TTRm)プロモーターの比較。PACEフーリン欠損デルタ4を有するTTR変異体プロモーター(delp/F)がCO3中に導入された。

【0040】

【図5B】図5Bは、TTR変異体プロモーターがAAV送達後にFVIIII-CO3の発現が増加する結果となったことを示すデータを示す。

20

【0041】

【図6A】図6AはヒトFVIIII導入遺伝子構築を示す。遺伝子組換構成物は、変更されたトランスチレチン・プロモータ(TTRm)、合成イントロン(Intron)及びポリアデニル化シグナル(Poly A)を利用する。因子VIIII組換え遺伝子は、野性型のBドメインが削除されたヒト因子VIIII cDNA(WT FVIIII)、又は、Bドメインが削除されたコドン最適化ヒト因子VIIII cDNA(CO FVIIII)である。PACEフーリン欠損変異体デルタ3又はデルタ4はhFVIIII導入遺伝子中に導入された。デルタ3、PACEフーリン開裂認識部位の3つの残基(アミノ酸1645-1647)の欠損。デルタ4、PACEフーリン開裂認識部位の4つの残基(アミノ酸1645-1648)の欠損。SQ、接合においてS743とQ1638を有するBドメイン欠失型；ITR、AAVベクター中への導入遺伝子のゲノム組込のために必要な逆方向末端反復配列。

30

【0042】

【図6B】図6Bは、野性型FVIIII構成物及びコドン最適化FVIIII構成物のAAV送達後の第VIIII因子発現を示す。hFVIIII抗原量は、ヒトFVIIII特異的ELISA(Affinity Biologicals)によって測定された。コアテスト分析(Coatest Assay)によって測定したFVIIII活性は、FVIIII抗原量と相関していた。これらのデータは、2週及び4週の時点でTTRmut-hFVIIII-wtSQと比較した倍数差として示されている。

40

【0043】

【図7】図7は、野性型hFVIIII構成物及びコドン最適化されたhFVIIII構成物のAAV送達後のマウスのインビボにおける止血チャレンジを示す。ベクター投与(1x10<sup>11</sup>ベクターゲノム/マウス)後6週で、AAV-hFVIIII構築で治療されたマウスを、テイル・クリップ・アッセイ(Ivanicuiら、Nature Biotech 2011, 29(11):1028-1033)を使用して試験した。マウスはイソフルランで麻酔され、その尻尾は37に予熱され、その後に3mmの直径で尻尾を切断した。血液は37の14mlの食塩水に10分間回収された。全失血(μl)は、赤血球溶血後の575nmでの吸光度測定によって総ヘモグロビンを測定することによって測定された。AAV-hFVIIII構成物で治療された血友病Aマウスの失血は、治療

50

していない血友病 A マウス及び野性型マウスからの失血と比較された。

#### 【発明の概要】

##### 【0044】

以前の報告は、イヌの F V I I I ( c F V I I I ) の A A V 肝臓遺伝子治療が、投薬を受けていない血友病 A のイヌにおける F V I I I の治療レベルの長期的な発現に帰着することを示した ( S a b a t i n o ら、M o l T h e r 19、442 - 449、2011 )。また、この戦略は、先在する無効化する c F V I I I 抗体を有する血友病 A イヌにおいて c F V I I I に対する阻害因子を根絶した ( F i n n , J . D . ら、B l o o d 116、5842 - 5848、2010 )。これらのデータは、A A V - F V I I I が疾病表現型を著しく改善し、F V I I I 阻害因子を除去することができることを実証する。興味深いことには、c F V I I I はヒト F V I I I ( h F V I I I ) より本質的に安定しており、生物活性が増大する結果となる ( S a b a t i n o , D . E ら、B l o o d 114、4562 - 4565、2009 )。したがって、c F V I I I の A A V 容量は、h F V I I I の治療容量を予測しない。これは、両方の種において同様の生物活性を有し、人間における治療的 A A V 用量を予測した第 I X 因子と対照的である。顕著に、血友病イヌモデルは、血友病 B のための肝臓及び筋肉の試みにおける導入遺伝子に対する効能及び免疫反応の両方の優れた予測因子であった。

10

##### 【0045】

c F V I I I の機能を高めるための生化学基盤を理解するために、我々は、h F V I I I を含む他のすべての種と比較して、c F V I I I において独特である、F V I I I 中の P A C E フーリン開裂認識部位を同定した。h F V I I I におけるこの部位での単一のアミノ酸変更の導入は、h F V I I I により高い安定性及びより高い生物活性を与える ( S i n e r , J . I . ら、B l o o d 121、4396 - 4403、2013年)。

20

##### 【0046】

本明細書に開示されているのは、野生型の F V I I I をコードする核酸とは異なる、ヒト F V I I I をコードする核酸変異体である。ヒト F V I I I をコードする核酸変異体は、細胞及び / 又は動物において増加したレベルで発現され、次にはインビボにおいて増加した F V I I I タンパクレベルを提供することができる。さらに本明細書に開示されているのは、異なる血清型を通して A A V によってより効率的にゲノム組込することができるヒト F V I I I をコードする核酸変異体である。さらに本明細書に開示されているのは、インビトロ及び / 又はインビボにおいてより高い安定性及び / 又は生物活性を有するヒト F V I I I タンパク変異体をコードする核酸変異体である。

30

##### 【0047】

またさらに本明細書に開示されているのは、血友病 A の動物モデルにおけるヒト F V I I I のいくつかの変異体の A A V 送達の効能及び安全性を示すデータである。特に、例えば、細胞内プロテアーゼ開裂認識部位中の欠損を有する又は有しないヒト F V I I I をコードするコドン最適化された核酸は下記の 1 つ以上を示す。

- 1) 細胞及び / 又は動物における発現増加
- 2) 活性増大 (例えば、増加した凝固によって反映される)
- 3) 安定性の増大

40

- 4) 現在用いられている B ドメインに関する免疫原性の明白な増加なしで、在来の h F V I I I より低い A A V 用量で治療効果を達成する、F V I I I を削除した、構築する。

##### 【0048】

用語「ポリヌクレオチド」及び用語「核酸」は、オリゴヌクレオチド、デオキシリボ核酸 ( D N A ) 及びリボ核酸 ( R N A ) を含む、核酸のすべての形態を表すために本明細書において交換可能に使用されている。ポリヌクレオチドは、ゲノム D N A 、c D N A 及びアンチセンス D N A 、並びに、結合された又は結合されていない m R N A 、r R N A 、t R N A 、及び、阻害的 D N A 又は R N A ( R N A i 、例えば、小さい又は短いヘアピン ( s h ) R N A 、マイクロ R N A ( m i R N A ) 、小さい又は短い干渉 ( s i ) R N A 、トランススプライシング R N A 、アンチセンス R N A ) を含む。ポリヌクレオチドは、天然

50

のポリヌクレオチド、合成のポリヌクレオチド、意図的に修飾された又は変更されたポリヌクレオチド（例えば、変異体核酸）を含む。ポリヌクレオチドは、単鎖、二重鎖又は三重鎖、線状又は環状であってもよく、任意の長さであってもよい。ポリヌクレオチドについて議論する際に、特定のポリヌクレオチドの配列又は構造は、5'末端から3'末端の方向で配列を与える慣例に従って本明細書に記載されることができる。

#### 【0049】

本明細書で使用されているように、用語「修飾する」(modify)又は「変異体」(variant)並びにこれらの文法的変形は、核酸、ポリペプチド又はそれらの部分配列が参照配列から逸脱していることを意味する。したがって、修飾された配列及び変異体配列は、参照配列と実質的に同じ、より大きい、又は、より少ない発現、活性又は機能を有していてもよいが、少なくとも参照配列の部分的な活性又は機能を保持していてもよい。修飾又は変異体の特別な例は、FV I I Iをコードするコドン最適化された核酸配列である。

10

#### 【0050】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」変異体は、野生型のものと比較して遺伝子が組み替えられた配列を指す。配列は、コードされるタンパク配列を変更せずに遺伝子組み換えられていてもよい。あるいは、配列は、変異体タンパクをコードするように遺伝子組み換えられていてもよい。核酸又はポリヌクレオチドの変異体は、野生型タンパク配列等の参照配列に対して少なくとも部分的な配列同一性を保持するタンパクをコードするようにコドン修飾された組み合わせ配列、及び、変異体タンパクをコードするようにコドン修飾された組み合わせ配列を指すことができる。例えば、そのような核酸変異体のいくつかのコドンは、それによってコードされるタンパク(FV I I I)のアミノ酸を変更せずに、変更されるであろう。また、核酸変異体のいくつかのコドンは変更され、次にはそれによってコードされるタンパク(FV I I I)のアミノ酸を変更するであろう。

20

#### 【0051】

用語「変異体因子V I I I (FV I I I)」は、未修飾の野生型FV I I I又はFV I I I - B D Dと比較した場合にコードされるタンパクの発現が増加するように遺伝子的に変更されたFV I I Iを指す。そのような変異体は、「V I I I因子(FV I I I)をコードする核酸変異体」と呼ぶことができる。T T R m u t - h F V I I I - S Q - C O d e l P / F発現カセットは、野生型h F V I I Iを作動させるH C R / h A A Tプロモーターと比較して、少なくとも30倍の増加を達成した(図2)。そのようなFV I I I修飾の特別な例は、非コドン最適化野生型FV I I I又はFV I I I - B D Dと比較して、増加した発現を示し、かつ、A A Vベクター中へのゲノム組込効率を増加させた変異体をコードするコドン最適化FV I I Iであり、コードされるFV I I Iタンパクにアミノ酸変更を結果的にもたらず核酸への修飾なしでそのようにする。発現を比較する場合、変異体FV I I IタンパクがBドメインを保持していれば、それを野生型のFV I I I発現と比較することが適切であり、また、変異体FV I I IタンパクがBドメイン欠損を有していれば、さらにBドメイン欠損を有する野生型FV I I Iの発現と比較するのが適切である。

30

#### 【0052】

「変異体因子V I I I (FV I I I)」は、修飾されたタンパクが野生型FV I I Iと比較して変化したアミノ酸を有し、かつ、そのタンパクが野生型のFV I I Iと比較して活性及び/又は安定の増加を示すように、修飾されたFV I I Iタンパクを意味する場合がある。そのような特別なFV I I Iタンパク修飾の例は、本明細書において変異体FV I I Iタンパクと呼ばれている、FV I I Iタンパク中のP A C Eフーリン開裂認識部位変異、欠損又は置換に結びつく遺伝子修飾である。活性及び/又は安定を比較する場合、変異体FV I I IタンパクがBドメインを保持していれば、それを野生型FV I I Iと比較することが適切であり、また、変異体FV I I IタンパクがBドメイン欠損を有していれば、それをBドメイン欠損を有する野生型FV I I Iと比較するのが適切である。

40

#### 【0053】

50

本明細書に記載されているヌクレオチド配列は、GenBankから容易に入手可能である。ヒトFVIIについて、アセプションNo.: NG-011403.1を参照されたい。イヌFVIIについて、アセプションNo.: NM-001003212-1を参照されたい。FVII-BDD、hFVII-BDD、cFVII-BDD等は、Bドメインを欠くFVII変異体を指す(例えば、図1参照)。

#### 【0054】

「核酸」配列又は「ポリヌクレオチド」配列によってコードされる「ポリペプチド」、「タンパク」及び「ペプチド」は、天然の野生型タンパクと同様な完全長の生来の(FVII)配列と、機能的な部分配列、修飾された形態又は配列変異体であって、その配列、修飾された形態又は変異体が生来の完全長のタンパクのある程度の機能性を保持しているものとを含む。例えば、FVIIタンパクは、本明細書に開示されているBドメイン欠損を有して、凝固機能を保持することができる。本発明の方法及び使用において、前記核酸配列によってコードされるそのようなポリペプチド、タンパク及びペプチドは、不完全である内因性タンパクと同一であるか、又は、それらの発現が治療される哺乳動物において不十分であるか若しくは不足していてもよいが、そのようである必要はない。

10

#### 【0055】

修飾の非制限的な例は、1個以上(例えば、1-3、3-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-40、40-50、50-100、100-150、150-200、200-250の、250-500、500-750又は750-850個以上のヌクレオチド又は残基)のヌクレオチド又はアミノ酸の置換を含む。核酸修飾の一例は、例えば、CTGではないロイシンコドンにCTGに修飾すること、又は、AAGではないリジンコドンにAAGに修飾することを目的としたコドン最適化である。核酸コドン最適化修飾の他の例は、GC含有量を増加させることである。特別な態様において、ヒトFVIIタンパクをコードする変異体核酸配列は、ヒト因子FVIIをコードする生来の配列より1~5%多いGC含有量(例えば、1%、2%、3%、4%又は5%より多くのGC含有量)を有するか;又は、ヒト因子FVIIをコードする生来の(野生型)配列より5-10%多いGC含有量(例えば、5%、6%、7%、8%、9%又は10%多いGC含有量)を有するか;又は、ヒト因子FVIIをコードする生来の(野生型)配列より10-15%多いGC含有量(例えば、10%、11%、12%、13%、14%又は15%多いGC含有量)を有する。

20

30

#### 【0056】

アミノ酸修飾の一例は、保存アミノ酸置換、又は、参照配列(例えば、FVII)の欠損(例えば、部分配列若しくはフラグメント、又は、PACE/フーリン切断部位の欠損)である。特定の実施形態において、修飾された配列又は変異体配列は、修飾されていない配列の機能又は活性の少なくとも一部を保持する。

#### 【0057】

FVII核酸の他の哺乳類形態および本明細書に開示されているFVIIタンパクを含む、タンパクをコードする核酸のすべての哺乳類形態及び非哺乳類形態は、公知であるか否かに拘わらず、明示的に含まれている。従って、本発明は、非哺乳動物、ヒト以外の哺乳動物、及び、ヒトに由来する遺伝子及びタンパクであって、本明細書に記載されているFVII(例えば、ヒト)遺伝子及びタンパクと実質的に同様の態様で機能する遺伝子及びタンパクを含む。

40

#### 【0058】

用語「ベクター」は、核酸の挿入又は合体によって操作することができる小さな担体核酸分子、プラスミド、ウイルス(例えば、AAVベクター)又は他の媒介体を指す。そのようなベクターは、ポリヌクレオチドを細胞中に導入/移動し、細胞中に挿入されたポリヌクレオチドを転写又は翻訳するための、遺伝子操作(つまり「クローニングベクター」)に使用することができる。「発現ベクター」は、宿主細胞における発現に必要とされる必須制御領域を有する遺伝子又は核酸配列を含む特殊なベクターである。ベクター核酸配列は、一般に、少なくとも、細胞中での増殖のための複製開始点と、任意に、異種起源の

50

ポリヌクレオチド配列、発現制御因子（例えばプロモーター、エンハンサー）、イントロン、ITR(s)、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質耐性）、ポリアデニル化シグナル等の付加因子とを含む。

【0059】

ウイルスベクターは、ウイルスゲノムを含む1つ以上の核酸因子に由来するか又は該核酸因子をベースとする。特定のウイルスベクターは、レンチウイルス、偽型レンチウイルス、及び、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター等のパーボウイルスベクターを含む。さらに提供されるのは、変異体FVIIIPポリペプチドをコードする核酸配列を含むベクターである。

【0060】

用語「組み換え体」は、例えば、レンチウイルス又はパーボウイルス（例えば、AAV)ベクター等の組み換え型ウイルスのように、ベクターの修飾語として、並びに、組み換え型のポリヌクレオチド及びポリペプチドのように、配列の修飾語として、自然界では通常生じない態様で構成が操作されていること（つまり、遺伝子操作されたこと）を意味する。AAVベクター等の組換えベクターの特別な例は、野生型ウイルス（例えば、AAV)のゲノム中に通常は存在しないポリヌクレオチドがウイルスゲノム中に挿入されたものである。組み換え型ポリヌクレオチドの一例は、FVIIITタンパクをコードする核酸（例えば、遺伝子）がベクター中にクローンされたものであり、5'及び3'、並びに/又は、遺伝子がウイルス（例えばAAV)ゲノム中で通常関連しているイントロン領域の有無に拘わらない。用語「組み換え型」は、本明細書中において常にウイルス及びAAVベクター等のベクター並びにポリヌクレオチド等の配列に関して使用されるものではないが、ポリヌクレオチドを含む組み換え型形態は、いかなるそのような省略に拘わらず明示的に含まれる。

【0061】

組み換え型のウイルス「ベクター」又は「AAVベクター」は、ウイルス（例えばAAV)から野生型ゲノムを取り除くために分子法を使用すること、及び、FVIIITをコードする核酸変異体配列等の非生来核酸で置換することによって、AAV等のウイルスの野生型ゲノムに由来する。AAVについては、典型的には、AAVゲノムの逆方向末端反復(ITR)配列の1つ又は両方が、AAVベクター中に保持されている。ウイルス（例えばAAV)ゲノムの核酸と比較して、ウイルスゲノムのすべて又は一部が、FVIIITをコードする核酸変異体配列等のような非生来の配列で置換されているので、「組み換え型」のウイルスベクター（例えばAAV)は、ウイルス（例えばAAV)のゲノムとは区別される。従って、非生来の配列の組込は、ウイルスベクター（例えばAAV)を「組み換え型」のベクターとして定義される。AAVの場合には「rAAVベクター」と称することができる。

【0062】

組み換え型ベクター（例えば、レンチウイルス、パーボウイルス、AAV)配列は、ゲノム組込されてもよく、その後のエキスピボ、インピトロ又はインピボにおける細胞の感染(トランスダクション)のための「粒子」と本明細書中において呼ばれる。組み換え型ベクター配列がカプシドで包まれ又はAAV粒子中にゲノム組込される場合、その粒子を「rAAV」と称してもよい。そのような粒子は、ベクターゲノムをキャプシドで包み又は包装するタンパクを含む。特別な例には、ウイルスエンベロープタンパクが含まれ、AAVの場合、カプシドタンパクが含まれる。

【0063】

ベクター「ゲノム」は、究極的にはゲノム組込されて又はキャプシドに包まれてウイルス（例えばAAV)粒子を形成する組み換え型プラスミド配列の一部を指す。組み換え型のベクターを構築又は製造するために組み換え型のプラスミドが使用される場合、ベクターゲノムは、組み換え型のプラスミドのベクターゲノム配列に相当しない「プラスミド」の一部を含まない。組み換え型プラスミドのこの非ベクターゲノム部分は、「プラスミドバックボーン」とも呼ばれ、増殖及び組み替えウイルス生産に必要とされるが、それ自体

10

20

30

40

50



がウイルス（例えば A A V）粒子中にゲノム組込又はキャプシド包装されないプロセスである、プラスミドのクローニング及び増幅にとって重要である。従って、ベクター「ゲノム」は、ウイルス（例えば A A V）によってゲノム組込される又はキャプシドに包まれる核酸を指す。

【 0 0 6 4 】

「導入遺伝子」は、細胞又は生命体の中へ導入された又は意図されている核酸を便宜的に表すために本明細書中で使用されている。導入遺伝子は、ポリペプチド又はタンパク（例えば、第 V I I I 因子）をコードする遺伝子等のような、あらゆる核酸を含む。

【 0 0 6 5 】

遺伝子組み換えがある細胞では、遺伝子組み換えは、細胞の A A V、「トランスダクション」又は「トランスフェクション」のようなベクター経由で導入された / 移動された。用語「形質導入する」及び用語「トランスフェクトする」は、細胞又は宿主生物中に核酸のような分子を導入することを指す。導入遺伝子は、受容細胞のゲノム核酸に統合されてもよいし、統合されなくてもよい。導入された核酸が受容細胞又は生命体の核酸（ゲノム D N A）中に統合された場合、導入された核酸は、その細胞又は生命体中に安定的に保持され、子孫細胞若しくは生命体にさらに継承されるか又はその受容細胞若しくは生命体の子孫となる細胞若しくは生命体に遺伝される。最後に、導入された核酸は、受容細胞又は宿主生物において染色体外に又は単に一時的に存在してもよい。

【 0 0 6 6 】

「形質導入された細胞」は導入遺伝子が導入された細胞である。従って、「形質導入された」細胞（例えば、哺乳動物中の、細胞又は組織又は器官細胞等）は、細胞中への外因性分子（例えば、核酸（例えば、導入遺伝子））の組み込み後の細胞における遺伝的変更を意味する。従って、「形質導入された」細胞は、外因性の核酸が導入された細胞又はその子孫細胞である。その細胞を増殖させて、導入されたタンパクを発現させ又は核酸を転写させることができる。遺伝子治療の用途及び方法については、形質導入細胞が被検体中に存在していてもよい。

【 0 0 6 7 】

「発現制御因子」は、作用可能に連結された核酸の発現に影響を与える核酸配列を指す。プロモーター及びエンハンサー等の本明細書に記載されている発現制御因子を含む制御因子、並びに、A A Vベクターを含むベクター配列は、1つ以上の「発現制御因子」を含んでいてもよい。典型的には、そのような因子は適切な異種起源のポリヌクレオチド転写及び適切な翻訳を促進するために含まれている（例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンのスプライシングシグナル、m R N A のインフレーム翻訳を可能にする遺伝子の正確なリーディングフレームのメンテナンス、及び、停止コドン等）。そのような因子は、典型的にはシスで作用し、「シス作用」因子と呼ばれるが、トランスで作用することもできる。

【 0 0 6 8 】

発現制御は、転写、翻訳、スプライシング、メッセージ安定性等のレベルで達成することができる。典型的には、転写を調整する発現制御因子は、転写される核酸の 5' 末端の近く（つまり「上流に」）に並置される。発現制御因子は、転写配列の 3' 末端に（つまり、「下流である」）又は転写物（例えば、イントロン中）中に位置していてもよい。発現制御因子は、転写配列に隣接していてもよいし、又は、転写配列から距離（例えば、そのポリヌクレオチドから 1 ~ 10 個、10 ~ 25 個、25 ~ 50 個、50 ~ 100 個、100 ~ 500 個、又は、それより多いヌクレオチド）があってもよく、相当な距離があってもよい。しかし、A A Vベクター等の特定のベクターの長さ制約のために、発現制御因子は転写される核酸から典型的には 1 ~ 1000 個の範囲内のヌクレオチド内に存在するであろう。

【 0 0 6 9 】

機能的に、作用可能に連結した核酸の発現は、その因子が核酸の転写および適切に転写物の翻訳を調整するように、その因子（例えば、プロモーター）によって少なくとも部分

10

20

30

40

50

的に制御可能である。発現制御因子の具体例は、プロモーターであり、通常は転写配列（例えば、核酸変異体をコードする第V I I I因子）（F V I I I）の5'に位置する。プロモーターは、典型的には、プロモーターが存在しない場合に発現される量と比較して、作用可能に連結した核酸からの発現量を増加させる。

#### 【0070】

本明細書で使用されているように、「エンハンサー」は、異種起源のポリヌクレオチドに隣接して位置する配列を指すことができる。エンハンサー因子は、典型的にはプロモーター因子の上流に位置するが、そうでなくても機能し、配列（例えば、第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体）の下流又は当該配列中に位置していてもよい。従って、エンハンサーは、第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体の上流又は下流の100塩基対、200塩基対又は300以上の塩基対の位置に存在していてもよい。エンハンサー因子は、典型的には、プロモーター因子によって与えられる発現を超えて、作用可能に連結した核酸の発現量を増加させる。

10

#### 【0071】

発現構築物は、特定の細胞種又は組織種において発現させるように機能する制御因子を含んでいてもよい。発現制御因子（例えば、プロモーター）は、本明細書中において「組織特異的発現制御因子／プロモーター」と称され、特定の組織種又は細胞種において活性なものを含む。組織特異的発現制御因子は、典型的には、特定の細胞又は組織（例えば肝臓）において活性である。発現制御因子は、転写活性化因子タンパク、又は、特定の細胞種、組織種若しくは器官種に対してユニークである転写の他のレギュレータによって認識されるので、典型的には特定の細胞、組織又は器官において活性である。そのような制御因子は、当業界者に公知である（例えば、S a m b r o o kら、（1989）及びA u s u b e lら（1992）参照）。

20

#### 【0072】

本発明の発現構築物中への組織特異的制御因子の組み込みは、変異体F V I I I又はその機能性フラグメントの発現のための少なくとも部分的な組織指向性を与える。肝臓において活性なプロモーターの例は、特に、T T Rプロモーター、ヒトアルファ1抗トリプシン（h A A T）プロモーター；アルブミン、M i y a t a k eら、J . V i r o l . , 71:5124-32（1997）；B型肝炎ウイルス・コア・プロモーター、S a n d i gら、G e n e T h e r . 3:1002-9（1996）；アルファフェトプロテイン（A F P）、A r b u t h n o tら、H u m . G e n e . T h e r . , 7:1503-14（1996）である。肝臓において活性なエンハンサーの一例は、アポリポタンパクE（a p o E）H C R - 1及びH C R - 2（A l l a nら、J . B i o l . C h e m , 272:29113-19（1997））である。

30

#### 【0073】

発現制御因子は、さらに多くの異なる細胞種においてポリヌクレオチドを発現させることができる、どこにでも存在する又は広域に存在するプロモーター／エンハンサーを含む。そのような因子は、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス（C M V）即時初期プロモーター／エンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター／エンハンサー配列及び、様々な哺乳動物細胞種において活性なその他のウイルスのプロモーター／エンハンサー、又は、天然には存在しない合成因子（例えば、B o s h a r tら、C e l l , 41:521-530（1985）参照）、S V 40プロモーター、ジヒドロ葉還元酵素プロモーター、細胞質 - アクチンプロモーター、及び、ホスフォグリセロールキナーゼ（P G K）プロモーターを含む。

40

#### 【0074】

発現制御因子は、制御可能な態様で発現を与えることもできる。すなわち、シグナル又は刺激は、作用可能に連結した異種起源のポリヌクレオチドの発現を増加又は減少させる。シグナル又は刺激に応答して作用可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を増加させる制御因子は、「誘導可能因子」（つまり、シグナルによって誘導される）とも呼ばれる。特別な例は、限定されるものではないが、ホルモン（例えばステロイド）誘導プロモ-

50

ターを含む。典型的には、そのような因子によって与えられる増加又は減少は、存在するシグナル又は刺激の量に比例する。シグナル又は刺激の量が多いほど、発現の増加又は減少が大きい。特別な非限定的な例は、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン（MT）プロモーター；ステロイドホルモン誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター；T7ポリメラーゼ・プロモーター・システム（WO 98/10088）；テトラサイクリン抑制性システム（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551（1992））；テトラサイクリン誘導系（Gossenら、Science, 268:1766-1769（1995）参照；Harveyら、Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518（1998）参照）；RU486誘導系（Wangら、Nat. Biotech., 15:239-243（1997）及びWangら、, Gene Ther., 4:432-441（1997））；及び、ラパマイシン誘導系（Magariら、J. Clin. Invest., 100:2865-2872（1997）；Riveraら、Nat. Medicine, 2:1028-1032（1996））を含む。この文脈において有用なその他の調節可能な制御因子は、特定の生理的状態（例えば、温度、急性期、発達）によって制御されるものである。

#### 【0075】

発現制御因子は、異種起源のポリヌクレオチドのための天然の因子をさらに含む。異種起源のポリヌクレオチドの発現が天然の発現を模倣することが望まれる場合、天然の制御因子（例えば、プロモーター）を使用してもよい。異種起源のポリヌクレオチドの発現が一時的に若しくは発展的に、又は、組織特異性態様で若しくは特定の転写刺激に応じて制御されることになる場合、天然の因子を使用してもよい。イントロン、ポリアデニル化部位又はコザック（Kozak）コンセンサス配列のような他の天然の発現制御因子を使用することもできる。

#### 【0076】

「作用可能に連結した」との用語は、コーディング配列の発現に必須な制御配列が、当該コーディング配列の発現を達成するように当該コーディング配列に対して適切な位置に置かれることを意味する。この同じ定義は、発現ベクター中のコーディング配列及び転写制御因子（例えば、プロモーター因子、エンハンサー因子及びターミナル因子）の配置に時々適用される。この定義は、ハイブリッド核酸分子が生成される場合の第1の核酸配列及び第2の核酸分子の核酸配列の配置にも時々適用される。

#### 【0077】

核酸と作用可能に連結した発現制御因子の例において、その関係は、制御因子が核酸の発現を調整する状態である。より詳しくは、例えば、作用可能に連結した2つのDNA塩基配列は、2つのDNA塩基配列の少なくとも1つが他方の配列に対して生理的影響を及ぼすことができる関係で2つのDNAが（シス又はトランスで）配置されることを意味する。

#### 【0078】

従って、ベクターのためのさらなる因子は、限定されるものではないが、発現制御（例えば、プロモーター/エンハンサー）因子、転写終結シグナル又は停止コドン、5'又は3'の非翻訳領域（例えば、ポリアデニル化（poly A）配列）であって、AAV ITR配列又はイントロンの1つ以上のコピー等の配列に隣接する因子を含む。

#### 【0079】

さらなる因子は、例えば、ゲノム組込を改善し、核酸コンタミの存在を低減させるためのフィラーポリヌクレオチド配列又はスタッパーポリヌクレオチド配列を含む。AAVベクターは、典型的には、おおよそ約4 kbから約5.2 kb又はわずかに大きい範囲のサイズを有するDNA挿入物を受け入れる。従って、短い配列に関しては、その長さをウイルスゲノム配列の正常な大きさの近く又はその正常な大きさに調節するためのスタッパー又はフィラーの組み込みは、ウイルス粒子中へのAAVベクターゲノム組込のために許容可能である。いくつかの実施形態において、フィラー/スタッパー核酸配列は、核

酸の翻訳されていない（非タンパクコード）セグメントである。4.7 kb未満の核酸配列に関して、フィラーポリヌクレオチド配列又はスタッファーポリヌクレオチド配列は、その配列と結合した（例えば、ベクターに挿入された）場合、約3.0 - 5.5 kb、約4.0 - 5.0 kb、又は、約4.3 - 4.8 kbの全体長さを有する。

#### 【0080】

イントロンは、ウイルス粒子中にAAVベクターゲノムを組み込むための長さを達成するために、フィラーポリヌクレオチド配列又はスタッファーポリヌクレオチド配列として機能することもできる。フィラーポリヌクレオチド配列又はスタッファーポリヌクレオチドとして機能するイントロン及びイントロンのフラグメントは、発現を増強することもできる。

10

#### 【0081】

「止血関連疾患」というフレーズは、血友病A等の出血性疾患、阻害抗体を有する血友病A患者、凝固因子VII、VII、IX及びX、XI、V、XII、IIの欠失、フォンビルブラント因子、合併したFV/FVII欠失、ビタミンKエポキシド還元酵素C1欠失、 $\alpha$ -カルボキシラーゼ欠失；外傷、損傷、血栓症、血小板減少症、脳卒中、凝血異常、汎発性血管内凝固症候群（DIC）と関連する出血；ヘパリン、低分子ヘパリン、五糖類、ワルファリン、小分子抗血栓症（つまり、FXa阻害因子）に関連した過剰血液凝固阻止、；及び、ベルナルスリエ症候群、グランツマン血小板無力症及びストレージプール欠乏等の血小板障害を指す。

20

#### 【0082】

用語「分離された」は、成分の修飾語として使用された場合、その成分が人の手によって作られたものであるか、又は、その成分の天然のインビボ環境から完全に又は少なくとも部分的に分離されていることを意味する。一般に、分離された成分は、例えば、1つ以上のタンパク、核酸、脂質、炭水化物、細胞膜等のような通常はその成分に自然に伴う1つ以上の物質が実質的に存在しない。

#### 【0083】

本発明の核酸に関して、用語「分離された」は、由来する生命体の天然のゲノム（ゲノムDNA）において（5'から3'方向において）すぐ隣に隣接している1つ以上の配列から分離された核酸分子を表す。例えば、「分離された核酸」は、プラスミド若しくはウイルスベクター等のベクター中に挿入された又は原核生物若しくは真核生物のDNA中に統合されたDNA又はcDNAの分子を含んでいてもよい。

30

#### 【0084】

本発明のRNA分子に関して、用語「分離された」は、上記で定義されているように、分離されたDNA分子によってコードされたRNA分子を主として表す。あるいは、この用語は、「実質的に純粋な」形態（用語「実質的に純粋な」は以下で定義されている）で存在する程度に天然状態（つまり、細胞中又は組織中で）において結びついているであろうRNA分子から十分に分離されたRNA分子を表すこともできる。

#### 【0085】

タンパクに関して、用語「分離されたタンパク」又は用語「分離及び精製されたタンパク」が本明細書において時々使用されている。この用語は、分離された核酸分子の発現によって生産されたタンパクを主として表す。あるいは、この用語は、「実質的に純粋な」形態で存在する程度に、天然状態で結びついている他のタンパクから十分に分離されたタンパクを表すこともできる。

40

#### 【0086】

用語「分離された」は、人の手によって生産された組み合わせ（例えば、組み換え型のベクター（例えば、rAAV）配列）、又は、ベクターゲノムと医薬製剤を組み込んだ又はキャプシド化されたウイルス粒子）を除外するものではない。「分離された」という用語は、ハイブリッド/キメラ、マルチマー/オリゴマー、修飾（例えば、リン酸化、グリコシレーション、脂質付加）若しくは誘導された形式、又は、人の手によって作られた宿主細胞において発現された形態等のような、その成分の代替的な物理的形態を除外するもの

50

ではない。

【 0 0 8 7 】

「実質的に純粋な」という用語は、対象化合物（例えば、核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク等）を少なくとも 50 ～ 60 重量% 含む調合物を表す。この調合物は、少なくとも 75 重量% 又は約 90 重量% ～ 99 重量% の対象化合物を含んでいてもよい。純度は、対象化合物に対して適切な方法（例えば、クロマトグラフ法、アガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC 解析等）によって測定される。

【 0 0 8 8 】

「から本質的になる」というフレーズは、特定のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に言及する場合、与えられる配列番号の特性を有する配列を意味する。例えば、アミノ酸配列に関して使用された時、このフレーズは、配列それ自体、及び、その配列の基本的特性及び新規な特性に影響しない分子修飾を含む。

10

【 0 0 8 9 】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用されているように、プライマー及びプローブを表し、3個以上のように、2個以上リボ-又はデオキシリボヌクレオチドから構成された核酸分子として定義される。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは、様々な要因、及び、オリゴヌクレオチドが使用される特定の用途に依存するであろう。

【 0 0 9 0 】

「プローブ」という用語は、本明細書で使用されているようにオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド又は核酸であって、RNA 又は DNA のいずれであってもよく、精製された制限酵素消化において自然に生じるものであるか又は合成的に生産されるものであるかに拘わらず、そのプローブに対して相補的な配列を有する核酸とアニールすることができる又は特異的にハイブリダイズすることができるものを表す。プローブは単鎖であってもよいし、二本鎖であってもよい。プローブの正確な長さは、温度、プローブの源、及び、使用の方法を含む多くの要因に依存するであろう。例えば、診断的適用については、ターゲット配列の複雑さに応じて、より少ないヌクレオチドを含んでいてもよいが、オリゴヌクレオチドプローブは、典型的には 15 ～ 25 個又はそれより多いヌクレオチドを含む。

20

【 0 0 9 1 】

本明細書のプローブは、特定のターゲット核酸配列の異なる鎖に対して「実質的に」相補的であるように選択されている。これは、プローブが、「特異的にハイブリダイズすることができる」又は所定の組み合わせ条件下で各ターゲット鎖とアニールすることができる程度に十分に相補的でなければならないことを意味する。従って、プローブ配列は、ターゲットの正確な相補的配列を反映するものである必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片は、プローブの 5' 末端又は 3' 末端に結合してもよく、そのプローブ配列の残りの部分がターゲット鎖に対して相補的であってもよい。あるいは、プローブ配列がターゲット核酸の配列に対して特異的にアニールするのに十分な相補性を有していれば、非相補的塩基又はより長い配列をプローブ中に散在させてもよい。

30

【 0 0 9 2 】

「特異的にハイブリダイズする」という用語は、当業界において一般に使用される所定の条件下でそのようなハイブリダイゼーションを可能にするのに十分に相補的な配列の 2 つの 1 本鎖核酸分子の間の関係を表す（場合によっては「実質的に相補的である」と称される）。特に、この用語は、本発明の一本鎖 DNA 又は一本鎖 RNA の分子内に含まれている実質的に相補的な配列とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを表し、非相補的配列の 1 本鎖核酸とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの本質的に除外するものである。

40

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用されているように、「プライマー」という用語は、RNA 又は DNA のいずれかであり、一本鎖又は二本鎖であり、生物系に由来する、制限酵素消化によって生成された又は合成的に生産されたオリゴヌクレオチドであり、適切な環境に置かれた場合にテンプレート依存の核酸合成の開始因子として機能することができるオリゴヌクレオチ

50

ドを表す。適切な核酸テンプレート、核酸の適切なヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、適切な補因子、並びに、適温及びpH等の条件が与えられる場合、プライマーは、プライマー伸長生成物を作成するためのポリメラーゼ又は同様な活性の作用により、ヌクレオチドの追加によってその3'末端において延長することができる。

【0094】

プライマーは、適用の特定の条件及び要件に応じて、長さが変わってもよい。例えば、診断的適用では、オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、15～25個又はそれ以上のヌクレオチド長さである。プライマーは、所望の伸張生成物の合成を準備するため、すなわち、ポリメラーゼ又は類似酵素による合成の開始における使用のための適切な並置におけるプライマーの3'ヒドロキシル部分を提供するのに十分な態様で所望のテンプレート鎖とアニールすることができるために、所望のテンプレートに対して十分に相補的でなければならない。プライマー配列が所望のテンプレートの正確な相補体を表すことは必要ではない。例えば、非相補的ヌクレオチド配列は、相補的プライマーの5'末端に対して他の方法で付着してもよい。あるいは、プライマー配列が、伸張生成物の合成のためにテンプレート・プライマー複合体を機能的に提供するように、所望のテンプレート鎖の配列との十分な相補性を有していれば、非相補的塩基はオリゴヌクレオチドプライマー配列内に散在していてもよい。

10

【0095】

「同一性」、「同族性」という用語及びこれらの文法的変形は、参照された2つ以上の構成要素が、「並べた」配列である場合に、同じであることを意味する。従って、例として、2つのポリペプチド配列が同一である場合、この2つのポリペプチド配列は、少なくとも言及されている領域又は部分内では、同じアミノ酸配列を有する。2つのポリヌクレオチド配列が同一である場合、その2つのポリヌクレオチド配列は、少なくとも言及されている領域又は部分内では、同じポリヌクレオチド配列を有する。同一性は、配列の定義されたエリア（領域又はドメイン）の全体にわたるものであってもよい。同一性の「エリア」又は「領域」は、同じである2つ以上の言及された構成要素の一部分を表す。従って、2つのタンパク又は核酸配列が、1つ以上の配列エリア又は領域にわたって同一である場合、それらの2つのタンパク又は核酸配列は、その領域内で同一性を共有する。「並べた」配列は、複数のポリヌクレオチド又はタンパク（アミノ酸）配列を表し、参照配列と比較して、欠損している又は追加された塩基又はアミノ酸（ギャップ）のための訂正をし

20

30

【0096】

同一性は、全長又は配列の一部にわたって延在していてもよい。特別な態様において、パーセント同一性を共有する配列の長さは、2個、3個、4個、5個又はそれ以上の隣接する核酸又はアミノ酸（例えば、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個の隣接する核酸又はアミノ酸）である。さらなる特別な態様において、同一性を共有する配列の長さは、21個又はそれ以上の隣接する核酸又はアミノ酸（例えば、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個の隣接する核酸又はアミノ酸）である。さらなる特別な態様においては、同一性を共有する配列の長さは、41個又はそれ以上の隣接する核酸又はアミノ酸（例えば、42個、43個、44個、45個、45個、47個、48個、49個、50個の隣接する核酸又はアミノ酸）である。またさらなる特別な態様において、同一性を共有する配列の長さは、50個又はそれ以上の隣接する核酸又はアミノ酸（例えば、50～55個、55～60個、60～65個、65～70個、70～75個、75～80個、80～85個、85～90個、90～95個、95～100個、100～110個の隣接する核酸又はアミノ酸）である。

40

【0097】

本明細書に記載されているように、第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体は、野生型F V I I Iをコードする核酸とは異なる（例えば、非野生型）が、野生型

50

F V I I I をコードする核酸と配列同一性を示すであろう。C O 1、C O 2 及び C O / C O 3 と表示されている、コドンが最適化された F V I I I コード核酸変異体において、ヌクレオチド配列レベルでは、コドン最適化された F V I I I コード核酸変異体は、典型的には、野生型 F V I I I コード核酸に対して、少なくとも約 70 % 同一であり、より典型的には約 75 % 同一であり、さらに典型的には約 80 % ~ 85 % 同一である。従って、例えば、コドン最適化された F V I I I コード核酸変異体は、野生型 F V I I I をコードする遺伝子に対して、又は、互いに対して（つまり、本明細書に開示されている C O 1 対 C O 2、C O 1 対 C O 3、C O 2 対 C O 3 等）75 % ~ 85 % 同一性を有していてもよい。

#### 【0098】

アミノ酸配列レベルでは、変異体 F V I I I タンパク等の変異体は、約少なくとも 70 % 同一であり、より典型的には約 80 % 同一であり、さらに典型的には約 90 % 以上同一である。他の実施形態において、変異体 F V I I I タンパク等の変異体は、参照配列（例えば、B ドメインを有する又は有しない野生型 F V I I I タンパク）に対して、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又はそれ以上の同一性を有する。

#### 【0099】

同一性を決定するために、変異体 F V I I I（F V I I I をコードする核酸変異体又は F V I I I タンパク）が B ドメインを保持する場合、野生型の F V I I I と同一性を比較することが適切である。変異体 F V I I I（F V I I I をコードする核酸変異体又は F V I I I タンパク）が B ドメイン欠損を有する場合、B ドメイン欠損を有する野生型 F V I I I と同一性を比較することが適切である。

#### 【0100】

「相同性」又は「相同」という用語は、2 つ以上の言及されている構成要素が所定の領域又は部位にわたって少なくとも部分的に同一性を共有することを意味する。相同性又は同一性の「エリア、領域又はドメイン」は、2 つ以上の言及されている構成要素が相同性を共有しているか又は同一であることを意味する。従って、2 つの配列が 1 つ以上の配列領域にわたって同一である場合、それら 2 つの配列はこれらの領域において同一性を共有する。「本質的な相同性」は、参照分子又は相同性を共有している当該参照分子の適切な / 対応する領域若しくは部分の構造又は機能（例えば、生物学的な機能又は活性）の 1 つ以上の少なくとも部分的な構造又は機能を有し又は有すると予測される程度において、その分子が構造的に又は機能的に保存されていることを意味する。

#### 【0101】

2 つの配列間の同一性（相同性）又は「パーセント同一性」の範囲は、コンピュータプログラム及び / 又は数学アルゴリズムを使用して確認することができる。この発明の目的のために、核酸配列の比較は、マディソン、ウィスコンシンの Genetics Computer Group から利用可能である、GCG ウィスコンシン・パッケージ・バージョン 9.1 を使用して行われる。便宜のために、配列同一性を比較するために、そのプログラムによって指定されているデフォルトパラメータ（gap creation penalty = 1、gap extension penalty = 4）を使用することが本明細書において意図されている。あるいは、核酸配列及びアミノ酸配列の同一性及び類似性のレベルを決定するために、デフォルトパラメータと共にギャップのある配列を使用して、National Center for Biotechnology Information によって提供される Blastn 2.0 プログラム（ncbi.nlm.nih.gov/blast/ のウェブサイトで見つけることができる； Altschul ら、1990, J Mol Biol 215: 403 - 410）を使用してもよい。ポリペプチド配列比較のために、BLASTP アルゴリズムは、典型的には、PAM100、PAM250、BLOSUM62 又は BLOSUM50 等のスコアリングマトリックスと組み合わせて使用される FASTA（例えば、FASTA2 と FASTA3）及び SSEARCH 配列比較プログラムも同一性の程度を定量するために使用される（Pearson ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 244

10

20

30

40

50

4 ( 1 9 8 8 ) ; P e a r s o n , M e t h o d s M o l B i o l . 1 3 2 : 1 8 5 ( 2 0 0 0 ) ; 及び、S m i t h ら、J . M o l . B i o l . 1 4 7 : 1 9 5 ( 1 9 8 1 ) ) 。ドローネーをベースとした位相写像を使用した、タンパク構造類似性を定量するためのプログラムも開発されている ( B o s t i c k ら、B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n . 3 0 4 : 3 2 0 ( 2 0 0 3 ) ) 。

#### 【 0 1 0 2 】

本発明の第 V I I I 因子 ( F V I I I ) をコードする核酸変異体を含む、核酸分子、発現ベクター ( 例えば、ベクターゲノム ) 、プラスミドは、組み換え D N A 技術を使用することによって調製されてもよい。ヌクレオチド配列情報が入手可能であることは、様々な手段による本発明の分離された核酸分子の調製を可能にする。例えば、第 V I I I 因子 ( F V I I I ) をコードする核酸変異体は、細胞発現又はインビトロ翻訳並びに化学合成技術を通じて、様々な標準的クローニング組み換え D N A 技術を使用して作ることができる。ポリヌクレオチドの純度は、シーケンシング、ゲル電気泳動等によって測定することができる。例えば、核酸は、ハイブリダイゼーション又はコンピュータベースのデータベース・スクリーニング技術を使用して分離することができる。そのような技術は、( 1 ) 相同性ヌクレオチド配列を検知するプローブを用いたゲノム D N A 又は c D N A ライブラリーのハイブリダイゼーション、( 2 ) 例えば、発現ライブラリーを使用した、共有された構造的特徴を有するポリペプチドを検知する抗体スクリーニング、( 3 ) 対象核酸配列に対してアニールすることができるプライマーを使用したゲノム D N A 又は c D N A に対するポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 、( 4 ) 関連配列用の配列データベースのコンピュータ調査、( 5 ) サブトラクション核酸図書館の差異のスクリーニングを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【 0 1 0 3 】

本発明の核酸は、任意の都合のよいクローニングベクター中に D N A として維持されてもよい。1 つの実施形態では、クローンは、適切な大腸菌宿主細胞中で増殖する p B l u e s c r i p t ( S t r a t a g e n e 、ラ・ホーヤ、カリフォルニア) 等のプラスミド・クローニング/発現ベクター中に維持される。あるいは、核酸は、哺乳動物細胞中の発現に適したベクター中に維持されてもよい。翻訳後修飾が凝固機能に影響する場合、核酸分子は哺乳動物細胞中で発現されてもよい。

#### 【 0 1 0 4 】

本発明の第 V I I I 因子 ( F V I I I ) をコードする核酸変異体は、c D N A 、ゲノム D N A 、R N A 及びそのフラグメントを含み、一本鎖又は二本鎖であってもよい。従って、この発明は、本発明の核酸の少なくとも 1 つの配列とハイブリダイズすることができる配列を有するオリゴヌクレオチド ( D N A 又は R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖 ) を提供する。そのようなオリゴヌクレオチドは、F V I I I 発現を検知するためのプローブとして有用である。

#### 【 0 1 0 5 】

P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する又は有しない F V I I I ポリペプチド変異体を任意にコードする、B ドメインが削除された本発明のコドン最適化 F V I I I コード核酸変異体、又は、ここに記載されているいずれかの機能性フラグメントは、既知の方法に従って様々な方法で調製されてもよい。このタンパクは適切なソース ( 例えば、形質転換されたバクテリア若しくは動物、又は、遺伝子操作された F V I I I を発現する培養細胞又は培養組織 ) から免疫親和性精製によって精製されてもよい。

#### 【 0 1 0 6 】

P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する又は有しない F V I I I ポリペプチド変異体を任意にコードする本発明の F V I I I コード変異体核酸分子、又は、ここに記載されているいずれかの機能性フラグメントの利用は、当業界で公知のインビトロ発現方法を用いて F V I I I の生産を可能にする。例えば、c D N A 又は遺伝子は、インビトロ転写用の p S P 6 4 又は p S P 6 5 等の適切なインビトロ転写ベクター中にクローンされてもよく、その後、コムギ麦芽又はウサギ網状赤血球抽出液等のような適



切な無細胞翻訳系における無細胞翻訳を行ってもよい。インビトロの転写系及び翻訳系は、例えば、Promega Biotech (Madison、ウィスコンシン又はBRL、Rockville、メリーランド)から市販により入手可能である。

【0107】

あるいは、一実施形態によれば、適切な原核生物発現系又は真核生物発現系における発現によって大量のF V I I Iが生産されてもよい。例えば、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体の一部分又はすべては、例えば、大腸菌等の細菌細胞、又は、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、CHO細胞若しくはHeLa細胞等の哺乳動物細胞株における発現に適したプラスミドベクター中に挿入されてもよい。あるいは、一実施形態において、F V I I Iを含む、標識された融合タンパクを生成することができる。そのような標識されたF V I I I融合タンパクは、DNA分子の一部分又はすべてによってコードされ、正確なコドンリーディングフレームにおいて、大腸菌のような細菌細胞、又は、酵母細胞及び哺乳動物細胞を含むがそれらに限定されない真核細胞における発現に適したプラスミドベクター中に挿入される所望のポリペプチドタグの一部分又はすべてをコードするヌクレオチド配列に連結される。

10

【0108】

本明細書に記載されているようなベクターは、宿主細胞中でのコードされるタンパクの発現を可能にするような態様で配置された、宿主細胞におけるDNAの発現に必要な制御因子を含む。発現のために必要なそのような制御因子は、本明細書に記載されている及び当業者に知られているプロモーター配列、エンハンサー配列及び転写開始配列を含むが、それらに限定されるものではない。

20

【0109】

組み換え型の原核生物系又は真核細胞系における遺伝子発現によって生産される本明細書に開示されている変異体F V I I Iタンパクを任意にコードする第V I I I因子(F V I I I)コード核酸変異体は、当業界で知られている方法によって精製されてもよい。一実施形態において、市販の発現/分泌システムを使用することができる。それによって組換え型タンパクが発現され、その後、宿主細胞から分泌されて、容易に周囲媒質から精製することができる。発現/分泌ベクターが使用されない場合、代替的アプローチは、組換え型タンパクに対して特異的に結合する抗体との免疫学的相互作用によるもの等のようなアフィニティ分離、又は、N末端又はC末端に6~8個のヒスチジン残基のタグを付けられた組換え型タンパクを分離するためのニッケルカラムによって組換え型タンパクを精製することを含む。代替タグは、FLAGエピトープ、GST又は赤血球凝集素エピトープで構成されてもよい。そのような方法は当業者に一般的に使用されている。

30

【0110】

前記方法によって調製されたF V I I Iタンパクは、標準的手順によって分析されてもよい。例えば、そのようなタンパクは既知の方法によって変化した凝固性について評価されてもよい。

【0111】

本明細書に開示されているように、本発明に従ってポリペプチドを生産する便利な方法は、発現系において核酸を使用することによって、そのポリペプチドをコードする核酸を発現することである。発明の方法のための実用的な様々な発現系は当業者に周知である。

40

【0112】

従って、本発明は、(開示されているような)ポリペプチドを作る方法も提供し、その方法は、そのポリペプチドをコードする核酸からの発現を含む(一般的には核酸)。これは、ポリペプチドの生産を生じさせるか又は可能にする適切な条件下で、そのようなベクターを含む宿主細胞を培養することによって都合よく達成することができる。ポリペプチドはインビトロ系で生産されてもよい。

【0113】

本発明の方法及び使用は、分裂細胞及び/又は非分裂細胞を含む宿主細胞中に核酸を届ける(導入すること)(形質導入すること)を含む。本発明の核酸、組換え型ベクター(

50

例えば、r A A V)、方法、使用及び医薬製剤は、治療法として、必要性のある被検体に対してタンパクを届ける、投与する、又は、提供する方法においてさらに有用である。このように、核酸が複写され、タンパクが被検体においてインビボで生産されてもよい。被検体はタンパク欠失を有しているので、又は、被検体におけるタンパクの生産が治療法として又はそうでなくてもある程度の治療効果を与えるかもしれないので、被検体はタンパクから利益を得るか又はタンパクを必要としてもよい。

#### 【0114】

レンチウイルス又はパーボウイルスベクター（例えばA A V）配列を含むベクター、組み替えウイルス粒子、方法及び使用は、F V I I Iの欠失又は異常に関連する1つ以上の症状を治療又は改善する生物学的作用を有する第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体を送達するために使用されてもよい。組み換え型のレンチウイルス又はパーボウイルスベクター（例えばA A V）配列、プラスミド、組み替えウイルス粒子、方法及び使用は、F V I I Iの欠失又は異常を含む又はそれによる様々な病状に対する治療を提供するために使用されてもよい。

10

#### 【0115】

本発明の核酸、ベクター、組換えベクター（例えばr A A V）及び組み替えウイルス粒子方法並びに使用は、遺伝子疾患（例えばF V I I I欠失）の治療を可能にする。欠乏状態疾患に関しては、置換療法のために正常遺伝子を罹患組織中に持っていくために、及び、アンチセンス変異を使用してその病気の動物モデルを作成するために、遺伝子導入を使用することができる。アンバランスな病状に関しては、モデル系中で病状を作るために、及び、その後その病状を打ち消すために、遺伝子移入を使用することができるかもしれない。欠損症を治療するための核酸配列の部位特異的な組込の使用が可能である。

20

#### 【0116】

特定の実施形態において、第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I Iをコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I Iタンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントは、例えば、血液凝固カスケードを調整する治療薬及び/又は予防薬（タンパク又は核酸）として、又は、遺伝子中の導入遺伝子として使用されてもよい。例えば、第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体は、野生型F V I I Iと同様の凝固活性を有していてもよいし、又は、変異体F V I I Iタンパク（例えば、P A C E / フーリン切断部位変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）等のように、野生型F V I I I又は機能性フラグメントと比較して変化した凝固活性を有していてもよい。細胞をベースとした戦略は、血友病A患者において第V I I I因子（F V I I I）コード核酸変異体又はF V I I Iタンパク変異体の連続的な発現を可能にする。本明細書に開示されているように、F V I I I分子の特定の修飾（核酸及びタンパク）は、核酸レベルでの発現増加、ウイルス（例えばA A V）ベクターによるゲノム組込効率の向上、タンパクレベルでの凝固活性及び安定性の向上に帰着し、それによって止血を有効に改善する。

30

#### 【0117】

第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I Iをコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I Iタンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントは、本発明に従って様々な目的に使用されてもよい。一実施形態において、血液凝固を調整するための核酸伝達手段（つまり、発現ベクター）が提供される。前記発現ベクターは、本明細書に記載されているような、第V I I I因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I Iをコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I Iタンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、い

40

50

れかの機能性フラグメントを含む。患者に対するF V I I Iをコードする発現ベクターの投与は、凝固カスケードを変更するように機能するF V I I Iタンパクの発現に帰着する。本発明に従って、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体は、本明細書に記載されているF V I I Iポリペプチド(例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパク)又は機能性フラグメントであって、その発現が止血を向上させるものをコードしてもよい。ある実施形態において、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体は、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有するF V I I Iタンパク等のF V I I Iポリペプチド変異体又はその機能性フラグメントをコードする。

#### 【0118】

本発明のさらなる実施形態において、組成物及び方法は、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体(例えば、F V I I Iをコードするコドン最適化変異体)、変異体第V I I Iタンパクをコードする核酸変異体(例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体)、又は、いずれかの機能性フラグメントを含むウイルスベクターを投与するために提供される。一実施形態において、第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体(例えば、F V I I Iをコードするコドン最適化変異体)、変異体第V I I Iタンパクをコードする核酸変異体(例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体)、又は、いずれかの機能性フラグメントを含む発現ベクターは、ウイルスベクターである。

#### 【0119】

第V I I I因子(F V I I I)をコードする核酸変異体(例えば、F V I I Iをコードするコドン最適化変異体)、変異体第V I I Iタンパクをコードする核酸変異体(例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I Iタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体)、又は、いずれかの機能性フラグメントを含む発現ベクターは、単独で投与されてもよいし、又は、止血を調整するのに有用な他の分子と組み合わせて投与されてもよい。本発明によれば、発現ベクター又は治療薬の組み合わせは、患者に対して単独で投与されてもよいし、又は、薬学的に許容可能な若しくは生物学的適合性である組成で投与されてもよい。

#### 【0120】

A A V血清型及びその変異体を含むレンチウイルス及びパーボウイルスベクター等のウイルスベクターは、エキスピボ、インピトロ及びインピボにおいて細胞中に核酸を送達するための手段を提供し、タンパクをコードし、細胞がコードされるタンパクを発現する。A A Vは、核酸/遺伝物質が細胞中に安定して維持されるように、細胞中に浸透して核酸/遺伝物質を導入することができるので、A A Vは、遺伝子治療ベクターとして有用なウイルスである。さらに、例えば、これらのウイルスは特定部位中に核酸/遺伝物質を導入することができる。A A Vはヒトにおける病原性の疾病に関係していないので、A A Vベクターは、A A V病理発生又は疾病を本質的に生じさせずに、ヒト患者に異種起源のポリヌクレオチド配列(例えば治療用タンパク及び治療薬)を送達することができる。

#### 【0121】

本発明において使用することができるウイルスベクターは、多数の血清型のアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクター及びハイブリッド/キメラのA A Vベクター(例えば、A A V - 1乃至A A V - 12及びその他)、レンチウイルスベクター及びシュードタイプレンチウイルスベクター[例えば、エボラウイルス、水疱性口内炎ウイルス(V S V)、及び、ネコ免疫不全ウイルス(F I V)]、単純疱疹ウイルスベクター、アデノウイルスベクター(組織特異的プロモーター/エンハンサーの有無に拘わらない)、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、非ウイルスベクター、並びに、その他のものを含むが、これらに制限されるものではない。

#### 【0122】

A A V及びレンチウイルス粒子は、有効な遺伝子送達のための媒体として、利益を与え

10

20

30

40

50

るために使用されてもよい。そのようなウイルス粒子は、分裂細胞及び非分裂細胞に対する指向性を含むそのような応用のための多くの望ましい特徴を有する。これらのベクターを用いた初期の臨床経験は継続的な毒性を示さず、また、免疫反応は最小又は非検出であった。AAVは、受容体依存性エンドサイトーシスによって又はトランスサイトーシスによってインビボ又はインビトロにおいて広範な様々の細胞種に感染することが知られている。これらのベクターシステムは、網膜上皮、肝臓、骨格筋、気道、脳、関節及び造血幹細胞をターゲットとして、ヒトにおいてテストされた。非ウイルスベクター、例えば、プラスミドDNA又は小環をベースとしたものは、FVIIIIをコードするような大きい遺伝子のための好適な遺伝子移入ベクターである。

#### 【0123】

例えば、所望の遺伝子の複数のコピーを提供することができ、従って、その遺伝子のより多くの生成物を提供することができるベクターを導入することが望ましい場合もある。改良されたAAV、レンチウイルスベクター及びこれらのベクターを生産する方法は、Wright J. F. (Hum Gene Ther 20:698-706, 2009)、フィラデルフィアの小児科病院で臨床のグレードベクターの生産に使用された技術を含む多くの参考文献、特許及び特許出願に詳細に記載されている。レンチウイルスベクターはCHOPで生産されることもできる。他のベクターは、NHLBI Gene Therapy Resource Program (GTRP) - Lentivirus Vector Production Core Laboratoryによる、レンチウイルスベクター生産コア研究所を通して入手可能である。

#### 【0124】

従って、本発明の様々な実施形態において、ベクターは、アデノウイルスベクター等のレンチウイルスベクター又はパーボウイルスベクターを含む。特定の実施形態において、組換え型のベクターはパルボウイルスベクターである。パーボウイルスは一本鎖DNAゲノムを有する小さいウイルスである。「アデノ随伴ウイルス」(AAV)はパーボウイルスファミリーに入っている

#### 【0125】

従って、本発明は、第VIIII因子(FVIIII)をコードする核酸変異体(例えば、FVIIIIをコードするコドン最適化変異体)、変異体第VIIIIタンパクをコードする核酸変異体(例えば、PACE/フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体)、又は、いずれかの機能性フラグメントを含むウイルスベクターを提供する。例えば、組み換え型のAAVベクターは、第VIIII因子(FVIIII)をコードするコドン最適化された核酸変異体(例えば、FVIIIIをコードするコドン最適化された変異体)等のような、所望のタンパクをコードする核酸(例えば、第VIIII因子)を含んでいてもよく、そのコードされるFVIIIIタンパクは、任意にBドメイン欠損、変異体第VIIIIタンパクをコードする核酸変異体(例えば、コドンは、PACE/フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIIIタンパクをコードするコドン最適化された核酸変異体)又はいずれかの機能性フラグメントを有する。従って、被検体(例えば、哺乳動物)に対するベクター送達又は投与は、FVIIII(例えば、FVIIIIをコードするコドン最適化された核酸変異体を介して)、変異体第VIIIIタンパクをコードする核酸変異体(例えば、PACE/フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIIIタンパクをコードするコドン最適化された核酸変異体)、又は、いずれかの機能性フラグメントを、哺乳動物(例えばヒト)等の被検体に対して提供する。

#### 【0126】

ベクターの直接送達又は身体への注入を後に伴うヒト細胞のエキスピボトランスダクションは、FVIIII発現をもたらし、それによって止血に有益な治療効果を及ぼす。本明細書に記載されている第VIIII因子の文脈では、そのような投与は凝固促進活性を増強する。

#### 【0127】

10

20

30

40

50

A A Vベクター及びレンチウイルスベクターは、典型的には、病理発生に関連したウイルス遺伝子を含んでいない。そのようなベクターは、典型的には、例えば *rep* 遺伝子及び/又は *cap* 遺伝子のような野性型 A A V 遺伝子の 1 つ以上が全体又は一部において削除されているが、A A Vベクター粒子中への組換えベクターの救助、複製及びゲノム組込のために必要である場合には、少なくとも 1 つの機能を有する隣接した I T R 配列を保持している。例えば、ベクターの必須部分（例えば、I T R 因子及び L T R 因子）だけが、それぞれ含まれている。従って、A A Vベクターゲノムは、複製及びゲノム組込（例えば、機能的な I T R 配列）のためにシスで必要とされる配列を含むだろう。

#### 【0128】

組み換え型の A A Vベクター並びにその方法及び用途はあらゆるウイルス株又は血清型を含む。非限定的な例として、組み換え型の A A Vベクターは、例えば、A A V - 1、A A V - 10、A A V - 11、A A V - 12、A A V - rh74、A A V - rh10 又は A A V - 2i8 等の任意の A A Vゲノムをベースとしていてもよい。そのようなベクターは、同じ株又は同じ血清型（又はサブグループ又は変異体）をベースとしたものであってもよいし、又は、互いに異なってもよい。非限定的な例として、1 つの血清型ゲノムをベースとした組み換え型の A A Vベクターは、そのベクターを包むカプシドタンパクの 1 つ以上と同一であってもよい。さらに、組み換え型の A A Vベクターゲノムは、そのベクターを包む A A Vカプシドタンパクの 1 つ以上とは異なる A A V（例えば、A A V2）血清型ゲノムをベースとしたものであってもよい。例えば、A A Vベクターゲノムは、A A V2 をベースとしたものであってもよく、それに対して、3 つのカプシドタンパクの少なくとも 1 つは、例えば、A A V1、A A V3、A A V4、A A V5、A A V6、A A V7、A A V8、A A V9、A A V10、A A V11、A A V12、Rh10、Rh74 若しくは A A V - 2i8 又はこれらの変異体であってもよい。

#### 【0129】

特定の実施形態において、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターは、A A V1、A A V2、A A V3、A A V4、A A V5、A A V6、A A V7、A A V8、A A V9、A A V10、A A V11、A A V12、Rh10、Rh74 及び A A V - 2i8、並びに、W O2013/158879（国際出願 P C T / U S2013/037170）及び W O2015/013313（国際出願 P C T / U S2014/047670）に記載されているようなそれらの変異体（例えば、アミノ酸挿入、付加及び置換等のキャプシド変異体）を含む。A A V変異体は、A A V1、A A V2、A A V3、A A V4、A A V5、A A V6、A A V7、A A V8、A A V9、A A V10、A A V11、A A V12、Rh10、Rh74 及び A A V - 2i8 の変異体を含む。従って、第 V I I I 因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I I をコードするコドン最適化された変異体）を含む（キャプシド化された又は包まれた）A A Vベクター及び A A V変異体（例えば、キャプシド変異体）、変異体第 V I I I タンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体 F V I I I タンパクをコードするコドン最適化された核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントが提供される。

#### 【0130】

A A V 及び A A V 変異体（例えば、キャプシド変異体）の血清型（例えば、V P1、V P2 及び/又は V P3 配列）は、例えば、A A V1 - A A V12、Rh74、又は、Rh10 を含む他の A A V 血清型とは異なってもよいし（例えば、A A V1 - A A V12、Rh74 又は Rh10 の血清型のいずれかの V P1、V P2 及び/又は V P3 配列とは異なってもよいし）、又は、異なっていなくてもよい。

#### 【0131】

本明細書で使用されているように、「血清型」という用語は、他の A A V 血清型とは血清学的に異なるキャプシドを有する A A V を表すために使用される区別である。血清学的な特殊性は、他の A A V と比較して、1 つの A A V に対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定される。そのような交差反応性の差は、通常、カプシドタンパク配列 / 抗原

10

20

30

40

50

の決定要因における差による（例えば、A A V血清型のV P 1、V P 2及び／又はV P 3の配列差による）。キャプシド変異体を含むA A V変異体が対照A A V又は他のA A V血清型とは血清学的に区別できない可能性に拘わらず、それらのA A V変異体は、対照A A V血清型又は他のA A V血清型と比較して少なくとも1つのヌクレオチド又はアミノ酸残基が異なっている。

#### 【0132】

従来の定義では、血清型は、中和活性についてすべての既存の血清型及び特徴づけられた血清型に対して特異的な血清に対して対象のウイルスをテストし、対象のウイルスを中和する抗体が見つからなかったことを意味する。多数の分離された天然のウイルスが発見され及び／又は多数のキャプシド変異体が生成されているので、既存の血清型のいずれかとの血清学的相違が存在する場合もあれば、存在しない場合もある。従って、新しいウイルス（例えば、A A V）が血清学的相違を有していない場合、この新しいウイルス（例えば、A A V）は対応する血清型のサブグループ又は変異体であろう。多くの場合、キャプシド配列修飾を有する変異ウイルスが血清型の従来の定義に従って別の血清型を有しているかどうか判断するために、その変異ウイルスに対して中和活性に関する血清学的検査試験を行わなければならない。従って、便宜のために及び反復を避けるために、「血清型」という用語は、血清学的に区別されるウイルス（例えばA A V）及び血清学的に区別できないウイルス（例えばA A V）であって、与えられた血清型のサブグループ又は変異体の範囲内であるウイルスの両方を広く表す。

10

#### 【0133】

従って、A A Vベクターは、特定の血清型に対して特徴的な遺伝子／タンパクの配列と同一の遺伝子／タンパクの配列を含む。本明細書で使用されているように、「A A V 1と関係するA A Vベクター」は、A A V 1を含む1つ以上のポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して本質的な配列同一性を有する1つ以上のA A Vタンパク（例えば、V P 1配列、V P 2配列及び／又はV P 3配列）を表す。同様に、「A A V 8と関係するA A Vベクター」は、A A V 8を含む1つ以上のポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して本質的な配列同一性を有する1つ以上のA A Vタンパク（例えば、V P 1配列、V P 2配列及び／又はV P 3配列）を表す。「A A V - R h 7 4と関係するA A Vベクター」は、A A V - R h 7 4を含む1つ以上のポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して本質的な配列同一性を有する1つ以上のA A Vタンパク（例えば、V P 1配列、V P 2配列及び／又はV P 3配列）を表す。例えば、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、R h 10、R h 7 4又はA A V - 2 i 8等の他の血清型に関連したそのようなA A Vベクターは、従って、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、R h 10、R h 7 4及びA A V - 2 i 8から区別される1つ以上の配列を有していてもよいが、1つ以上の遺伝子及び／又はタンパクに対する本質的な配列同一性を示し、及び／又は、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、R h 10、R h 7 4又はA A V - 2 i 8（例えば、細胞／組織指向性等）の1つ以上の機能的特徴を有していてもよい。例となる非制限的なA A V変異体は、V P 1、V P 2及び／又はV P 3のいずれかのキャプシド変異体を含む。

20

30

40

#### 【0134】

様々な例示的な実施形態において、参照血清型と関連するA A Vベクターは、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、R h 10、R h 7 4又はA A V - 2 i 8（例えば、V P 1配列、V P 2配列及び／又はV P 3配列等）の1つ以上に対して、少なくとも80%以上（例えば、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等）の同一な配列を含んでいるか又は当該配列からなるポリヌクレオチド、ポリペプチド又は部分配列を有する。

50

## 【0135】

本発明の組成物、方法及び使用は、AAV配列（ポリペプチドとヌクレオチド）及びその部分配列であって、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10又はAAV-2i8等の参照AAV血清型に対して100%未満の配列同一性を示すが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74若しくはAAV-2i8、遺伝子又はタンパク等の既知のAAV遺伝子又はタンパクとは区別され、かつ、同一でないものを含む。一実施形態において、AAVポリペプチド又はその部分配列は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74又はAAV-2i8（例えば、VP1、VP2及び/又はVP3）等の任意の参照AAV配列又はその部分配列に対して、少なくとも75%以上、例えば、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%等、又は、最大100%同一である配列を含んでいる又は当該配列からなる。特別な態様において、AAV変異体は、1個、2個、3個、4個、5個、5～10個、10～15個、15～20個、又は、それ以上のアミノ酸置換を有する。

10

## 【0136】

AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、AAV-2i8、若しくは、変異体、関連するハイブリッド配列、及び、キメラ配列を含む組み換え型のAAVベクターは、機能を有する1つ以上のAAV ITR配列に隣接する1つ以上の核酸配列（導入遺伝子）を含むように、当業者に知られている組み換え技術を使用して構築することができる。

20

## 【0137】

本発明の一実施形態において、PACEフーリン開裂認識部位の変異、欠損又は置換を有するヒトFVII変異体等のようなFVIIポリペプチド変異体は、生物学的適合性を有する担体中への注入を介して、例えば静脈内注射によって、患者に投与されてもよい。本発明のPACEフーリン開裂認識部位の変異、欠損又は置換を有するヒトFVII変異体等のようなFVIIポリペプチド変異体は、分子の安定性を高めるために、任意に、リポソーム中に入れられてもよいし、又は、他のリン脂質又はミセルと混合されてもよい。PACE/フーリン切断部位の変異、欠損又は置換を有するFVIIタンパク又は機能性フラグメントは、単独で投与されてもよいし、又は、止血を調整することがわかっている他の薬剤（例えば、V因子、因子Va又はそれらの誘導体）と組み合わせて投与されてもよい。

30

## 【0138】

PACEフーリン開裂認識部位の変異、欠損又は置換を有するヒトFVII変異体等のようなFVIIポリペプチド変異体を送達するための適切な組成は、患者の病状及び血流動態的状态を含むが、それらに限定されない様々な生理的変数の考察に基づいて医師によって決定されてもよい。異なる適用及び投与経路のために適切な様々な組成は、当業界において周知であり、以下に記載される。

40

## 【0139】

PACE/フーリン切断部位の変異、欠損又は置換を有するFVII変異体等のような精製されたFVIIタンパク又は機能性フラグメントを含む薬剤は、生理的に可能なマトリクスを含み、医薬品製剤として調剤されてもよい。この薬剤は、実質的に知られている先行技術方法を使用して調剤することができ、NaCl、CaCl<sub>2</sub>等の塩を含むバッファー、並びに、グリシン及び/又はリジン等のアミノ酸と、6～8のpH領域で混合されてもよい。必要とされるまで、FVII変異体を含む精製された製剤は、完成した溶液の形態、又は、凍結乾燥若しくは急速冷凍された形態で格納することができる。

50

## 【0140】

製剤は凍結乾燥された形態で格納されてもよく、適切な再構成溶液を使用して視覚的に透明な溶液中に溶解される。あるいは、本発明による製剤は、液状製剤として又は急速凍された液体としても利用可能にすることができる。本発明による製剤は、任意に特別に安定であり得る、つまり、投与又は送達の前に長時間にわたって溶解された形態に耐えることができる。

## 【0141】

本発明による製剤は、F V I I I 活性が一成分の製剤の形態で、又は、F V I I I 活性が他の成分と組み合わされた複数成分製剤の形態の医薬品製剤として利用可能にすることができる。精製されたタンパクを医薬品製剤に加工する前に、精製されたタンパクは、従来の品質管理を受けて、症状の治療形態に作られる。特に、組み換え体の製造において、精製された製剤は、E P O 7 1 4 9 8 7 に記載されているように、細胞核酸、及び、発現ベクターに由来する核酸が無いことについて試験される。

10

## 【0142】

薬剤タンパク製剤は、数日間にわたって1日1回の注入又は最大3回/1日として、30~100 IU/kg (1 IUは100ナノグラム/mlである)の量で使用されてもよい。患者は、出血があれば病院で発病時に直ちに治療されてもよい。あるいは、患者は、8~12時間ごとに塊状注入を受けてもよく、あるいは、十分な改善が観察される場合には変異体F V I I I の1日1回の注入を受けてもよい。

20

## 【0143】

本発明は、第V I I I 因子(F V I I I)をコードする核酸変異体(例えば、F V I I I をコードするコドン最適化変異体)、変異体第V I I I タンパクをコードする核酸変異体(例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I I タンパクをコードするコドン最適化核酸変異体)、又は、いずれかの機能性フラグメントを含む組成物であって、以下の属性の1つ以上を有するものを提供する。

30

- 1) 細胞によって又は動物において発現増加を示す。
- 2) 細胞によって分泌の増加を示す。
- 3) 活性の増大を示す。例えば、凝固の向上によって反映される。
- 4) 安定性の向上を示す。
- 5) A A V ベクターによるゲノム組込の向上を示す。

## 【0144】

従って、本発明の核酸、ベクター、組換えベクター(例えばr A A V)及び組み替えウイルス粒子、並びに、他の組成物、作用物質、医薬品、生物製剤(タンパク)は、医薬組成物に組み込まれてもよい。そのような医薬組成物は、他のものと比較してインビボ又はエキスピボで被検体に対する投与及び送達に有用である。

## 【0145】

特定の実施形態において、医薬組成物は、さらに、薬学的に許容できる担体又は賦形剤を含む。そのような賦形剤は、それ自体がその組成物を受け取る個体に対して有害な免疫反応を誘導せず、かつ、過剰な毒性がなく投与することができるあらゆる製剤を含む。

40

## 【0146】

本明細書で使用されているように、「薬学的に許容できる」という用語及び「生理的に許容できる」という用語は、生物学的に許容できる処方(ガス状、液体、固体、又は、それらの混合物)であって、1つ以上の投与経路(インビボの送達又は接触)に適しているものを意味する。「薬学的に許容できる」、「生理的に許容できる」組成物は、生物学的に望ましくない又は他の点で望ましくないものではない材料である。例えば、その材料は、望ましくない生物学的作用を本質的に生じさせずに、被検体に投与することができる。従って、そのような医薬組成物は、例えば、核酸、ベクター、ウイルス粒子又はタンパクを被検体に投与するために使用されてもよい。

## 【0147】

薬学的に許容できる賦形剤は、水、食塩水、グリセロール、糖及びエタノール等の液体

50



を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等の鉱酸塩、及び、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等の有機酸の塩のような薬学的に許容できる塩がそこに含まれていてもよい。さらに、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤等の補助剤は、そのような賦形剤中に存在してもよい。

#### 【0148】

医薬組成物は、塩として提供されてもよく、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を含むがこれらに限定されない多数の酸を用いて作ることができる。塩は、対応する遊離した塩基形態よりも、水性又はプロトン性溶媒においてより溶解する傾向がある。他の場合では、製剤は、凍結乾燥されたパウダーであってもよく、1～50mMヒスチジン、0.1%～2%スクロース、及び、2～7%マンニトールのいずれか又はすべてを含んでいてもよく、pH4.5～5.5の領域では使用に先立ってバッファーと混合される。

10

#### 【0149】

医薬組成物は、薬剤投与又はインビボの接触若しくは送達に適合する溶剤（水性又は非水性）、溶液（水性又は非水性）、エマルジョン（例えば、水中油又は油中水）、懸濁液、シロップ、エリキシル、分散媒体及び懸濁媒体、コーティング剤、等張性の吸収促進剤又は吸収遅延剤を含む。水性及び非水性の溶媒、溶液及び懸濁液は、懸濁化剤と増粘剤を含んでいてもよい。そのような薬学的に許容できる担体は、錠剤（コーティングされている又はコーティングされていない）、カプセル剤（堅い又は柔らかい）、マイクロビーズ、パウダー、果粒剤及び結晶を含む。補足的な活性化合物（例えば、保存剤、抗菌性、抗ウイルス性及び抗真菌剤）が組成物中に組み込まれてもよい。

20

#### 【0150】

医薬組成物は、本明細書に記載されている又は当業者に知られているように、特別な投与経路又は送達に適するように調剤されてもよい。従って、医薬組成物は、様々なルートによる投与に適した担体、希釈剤又は賦形剤を含む。

#### 【0151】

非経口投与に適した組成物は、活性化合物の水性・非水性の溶液、懸濁液又はエマルジョンを含み、その製剤は、典型的に無菌であり、また、意図されるレシipientの血液と等張であってもよい。非制限的な例は、水、緩衝食塩水、ハanks溶液、リンゲル液、デキストロース、フルクトース、エタノール、動物、植物油又は合成油を含む。水性の吸入懸濁液は、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストラン等のような懸濁液の粘性を増加させる物質を含んでいてもよい。

30

#### 【0152】

さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油脂注入懸濁液として調製されてもよい。適切な親油性の溶剤又は媒体は、ゴマ油等の脂肪油、オレイン酸エチル又はトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル、又は、リボソームを含む。また、懸濁液は、任意に、高度に濃縮された溶液の調製を可能にする適切な安定剤又は化合物の溶解度を増加させる薬剤を含んでいてもよい。

#### 【0153】

助溶剤及び補助薬が製剤に加えられてもよい。助溶剤の非制限的な例は、例えば、イソプロピルアルコール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、グリコールエーテル等のグリコール；グリセロール；ポリオキシエチレンアルコール、及び、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルのように、水酸基又は他の極性基を含む。補助薬は、例えば、ダイズレクチン及びオレイン酸等の界面活性剤；トリオレイン酸ソルビタン等のソルビタンエステル；及び、ポリビニルピロリドンを含む。

40

#### 【0154】

医薬組成物が調製された後に、医薬組成物は適切な包装容器中に配置されて、治療のためにラベルされてもよい。F V I I Iを含むベクター又はポリペプチドの投与のための、そのようなラベルは、量、頻度、及び、投与の方法を含むであろう。

50

## 【0155】

本発明の医薬組成物、並びに、当該組成物、方法及び使用のための適切な送達システムは、

当業界で知られている（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20版、Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18版、Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12版、Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Toklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11版、Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; 及び、Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Julian, ed., Oxford, N.Y., 253 - 315頁を参照されたい）。

10

## 【0156】

本発明は、第VII因子(FVII)をコードする核酸変異体（例えば、FVIIをコードするコドン最適化変異体）、変異体第VIIタンパクをコードする核酸変異体（例えば、PACE / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントを細胞又は動物のいずれかに導入する方法を提供する。特別な一実施形態において、本発明は、止血を調整する方法を提供する。一実施形態において、1つの方法は、第VII因子(FVII)をコードする核酸変異体（例えば、FVIIをコードするコドン最適化変異体）、変異体第VIIタンパクをコードする核酸変異体（例えば、PACE / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントを含む核酸送達手段（例えば、AAVベクター）と、前記FVIIポリペプチドが個体（哺乳動物等の患者又は被検体）中で発現される条件下での、前記個体の接触又は投与を含む。別の一実施形態において、1つの方法は、第VII因子(FVII)をコードする核酸変異体（例えば、FVIIをコードするコドン最適化変異体）、変異体第VIIタンパクをコードする核酸変異体（例えば、PACE / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントを含む核酸送達手段（例えば、AAVベクター）を、前記FVIIポリペプチドが個体（哺乳動物等の患者又は被検体）中で発現される条件下で、前記個体の細胞に供給することを含む。

20

30

## 【0157】

先の記載から、第VII因子(FVII)をコードする核酸変異体（例えば、FVIIをコードするコドン最適化変異体）、変異体第VIIタンパクをコードする核酸変異体（例えば、PACE / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントが、不足した、不十分な又は異常な血液凝固に関する疾患の治療において使用できることが理解される。

40

## 【0158】

必要性のある被検体に対して十分な又は有効な量で、第VII因子(FVII)をコードする核酸変異体（例えば、FVIIをコードするコドン最適化変異体）、変異体第VIIタンパクをコードする核酸変異体（例えば、PACE / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントを含む組成物を投与することができ、ま

50

た、本発明の方法及び使用を提供することができる。「有効な量」又は「十分な量」は、1回投与又は複数回投与において、単独で又は組み合わせで、1つ以上の他の組成物（薬品等の治療剤）、治療、プロトコル又は治療投与剤を用いて、被検体における、任意の継続的な時間（長期又は短期）の検知できるレスポンス、被検体に期待される若しくは望まれる結果、又は、任意の持続時間（例えば、数分、数時間、数日、数ヶ月、数年、又は、治癒した）にわたる任意の測定できる若しくは検知できる程度の利益を被検体に提供する量を表す。

#### 【0159】

用量は、治療の対象とする疾病のタイプ、発病、進行、重症度、頻度、期間、又は、見込み、望まれる臨床的終了点、以前の治療及び同時の治療、被検体の健康状態、年齢、性別、人種又は免疫適格性、並びに、当業者によって評価される他の要因に応じて変化し得る。治療若しくは療法のあらゆる副作用、合併症又は他のリスク因子、並びに、被検体の状態によって示唆されるように、用量、数、頻度又は期間は、釣り合うように増加又は低減されてもよい。当業者は、治療的利益又は予防的利点を与えるのに十分な量を提供するのに必要な用量及びタイミングに影響を及ぼす可能性がある要因を理解するであろう。

10

#### 【0160】

治療効果を達成する用量、例えば、ベクターゲノム/体重1キログラム当たりの用量（ $\text{vg/kg}$ ）は、投与経路、治療効果を達成するために必要とされる異種起源のポリヌクレオチド発現のレベル、治療される特定の疾患、ウイルスベクターに対する任意の宿主免疫反応、異種起源のポリヌクレオチド若しくは発現産物（タンパク）に対する宿主免疫反応、並びに、発現されるタンパクの安定性を含むが、これらに限定されないいくつかの要因によって変化するであろう。当業者は、前述の要因及びその他の要因に基づいて、特定の疾病又は疾患を有する患者を治療するための $rAAV$ /ベクターゲノム用量範囲を決定することができる。一般に、用量は、治療効果を達成するために、被検体の重量1キログラム当たりのベクターゲノム（ $\text{vg/kg}$ ）で、少なくとも $1 \times 10^8$ 、又は、例えば、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 若しくは $1 \times 10^{14}$ 又はそれ以上に及ぶであろう。マウスにおける $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ の範囲の $AAV$ 用量、及び、イヌにおける $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の $AAV$ 用量が有効であった。

20

#### 【0161】

例として血友病Bを使うと、概して言えば、治療効果を達成するためには、正常な個体で見られる因子濃度の1%超の血液凝固因子濃度が、重傷の疾病表現型を中程度のものに变化させるために必要であると信じられている。重傷の表現型は、関節損傷及び生命に危険のある出血が特徴である。中程度の疾病表現型を穏やかなものに変えるためには、平均5%を超える血液凝固因子濃縮が必要であると信じられている。そのような血友病の被検体の治療に関して、典型的な用量は、所望の治療効果を達成するためには、被検体の重量1キログラム当たり（ $\text{vg/kg}$ ）で少なくとも $1 \times 10^{10}$ ベクターゲノム（ $\text{vg}$ ）であり、又は、被検体の重量の $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11} \text{vg/kg}$ であり、又は、被検体の重量あたり $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12} \text{vg/kg}$ であり、又は、被検体の重量あたり $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13} \text{vg/kg}$ である。

30

#### 【0162】

病気の進行又は悪化を減少、低減、抑制、制限又は制御することが満足な結果ではあるが、治療のための（例えば、緩和する又は治療的利益若しくは改善を与える）ための「有効な量」又は「十分な量」の用量は、典型的には、その病気の1つの、複数の又はすべての不利益な症状、結果、若しくは、合併症、例えば、その病気により引き起こされる又はその病気に関連した1つ以上の不利益な症状、疾患、病気、病状、又は、合併症に対して、測定可能な程度まで、反応を提供するのに有効である。

40

#### 【0163】

有効な量又は十分な量は、単一の投与で提供されてもよいが、単一の投与で提供する必要はなく、複数の投与を必要としてもよく、また、単独で、又は、他の組成物（例えば、医薬品）、治療、プロトコル又は治療計画と組み合わされて投与されてもよいが、そのよ

50

うに投与される必要はない。例えば、被検体の必要性、治療する疾病又は（もしあれば）治療の副作用のタイプ、状態及び重症度によって示唆されるように、用量は、釣り合うように増やしてもよい。さらに、与えられた被検体に有効又は十分であると考えるために、そのような用量より多い及びそのような用量を越えたさらなる用量、量若しくは期間が含まれていてもよく、又は、さらなる組成（例えば、医薬品又は薬剤）、治療、プロトコル又は治療計画が含まれていてもよいので、第2の組成（例えば、別の薬剤又は作用物質）、治療、プロトコル又は治療計画を伴わない一回の又は複数回の投与で与えられる場合でも、有効な量又は十分な量が有効又は十分である必要はない。また、有効であると考えられる量は、凝固障害（例えば血友病A）の治療のための組み換え型の凝固因子タンパク（例えばFVIIII）の投与等のような、別の治療、治療計画又はプロトコルの使用の低減をもたらす量を含む。

10

#### 【0164】

従って、本発明の方法及び使用は、特に、他の化合物、作用物質、薬、治療計画、治療プロトコル、プロセス又は治療法の必要性が低減される方法及び使用を含む。例えば、血液凝固疾病については、被検体中の不十分な又は不完全な（異常又は変異体の）内因性凝固因子を補完するための組み換え型の凝固因子タンパクの投与が、与えられた被検体において頻繁がより少なく若しくはより少ない用量となるか又は無くなれば、本発明の方法又は使用は治療的利益を有する。従って、本発明に従って、他の治療又は療法の必要性又は使用を低減する方法及び使用が提供される。

20

#### 【0165】

有効な量又は十分な量は、治療されるすべてのあらゆる被検体において有効である必要はなく、与えられるグループ又は集団において治療される被検体の大多数において有効である必要もない。有効な量又は十分な量は、グループ又は一般人口ではなく、特定の被検体において有効な又は十分な量を意味する。そのような方法には典型的であるが、与えられる治療の方法又は使用に対して、いくつかの被検体はより大きな反応を示し、いくつかの被検体はより小さい反応を示し、いくつかの被検体は反応を示さない。

30

#### 【0166】

「緩和する」という用語は、被検体の疾病又はその症状における検出可能な若しくは測定可能な改善又は潜在的な細胞応答を意味する。検出可能な又は測定可能な改善は、病気の発生、頻度、重症度、進行、期間、若しくは、その病気によって引き起こされる合併症若しくはその病気に関連した合併症における主観的若しくは客観的な減少、縮小、抑制、抑制、限定又は制御、その病気の症状、根本的な原因若しくは結果における改善、又は、その病気の好転を含む。例えば、HemAについては、有効な量は、被検体における急性の出血症状の頻度又は重症度を低下させる量、例えば、又は、凝固分析によって測定されるような凝固時間を低減する量になるであろう。

40

#### 【0167】

従って、本発明の医薬組成物は、意図した治療目的を達成する有効な量で有効成分が含まれている組成物を含む。本発明において提供される技術及びガイダンスを使用して、熟練した医師の能力の範囲内で治療の有効量の決定することが適切である。

#### 【0168】

治療用量は、他の要因のなかでも、被験者の年齢及び全身状態、異常な血液凝固表現型の重症度、並びに、第VIIII因子（FVIIII）をコードする核酸変異体（例えば、FVIIIIをコードするコドン最適化変異体）、変異体第VIIIIタンパクをコードする核酸変異体（例えば、PACE/フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体FVIIIIタンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメントの発現レベルを制御する制御配列の強さに依存するであろう。従って、ヒトにおける治療の有効量は、ベクターをベースとしたFVIIII治療に対する個々の患者の反応に基づいて医師によって決定される比較的広い範囲になるであろう。

#### 【0169】

医薬組成物等のような組成物は、インビボの遺伝子をベースとした治療法若しくは細胞

50

をベースとした治療法によって、又は、患者の細胞若しくはドナーの細胞のエキスピボ修飾によって、F V I I I 導入遺伝子の連続的な発現の誘導によって生物学的に活性なタンパク（第V I I I 因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I I をコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I I タンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I I タンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメント）の生産を可能にするように被検体に送達されてもよい。特別な実施形態において、レシピエントが治療的有効量のF V I I I ポリペプチドを生産することを可能にするのに十分な遺伝物質を含む医薬組成物は、当該レシピエントの止血に影響を及ぼすことができる。あるいは、本明細書に開示されているように、細胞内プロテアーゼ開裂認識部位（P A C E / フーリン）における1つ以上の変異、欠損又は置換を有するF V I I I 等の有効量の変異因子V I I I ポリペプチドは、必要性のある患者に直接注入されてもよい。

10

**【0170】**

組成物は、単独で投与されてもよいし、又は、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース及び水を含むがこれらに限定されない任意の無菌の生物学的適合性を有する医薬品担体に入れて投与することができる安定化化合物等のような少なくとも1つの他の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。組成物は、患者に単独で投与されてもよいし、又は、止血に影響を及ぼす他の薬剤（例えば、共因子）と組み合わせて投与されてもよい。

**【0171】**

変異体因子V I I I ポリペプチドは、単独で又は他の薬剤と組み合わされて、投与若しくは接触させてもよいし、又は、本明細書に記載されている適切な生物学的担体に入れて患者に直接注入してもよい。第V I I I 因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I I をコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I I タンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I I タンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメント等のようなF V I I I をコードする変異体核酸配列を含む本発明の発現ベクターは、予防的に及び／又は治療的に有効なレベルのF V I I I ポリペプチドを達成し、任意に一定期間維持するために、様々な手段によって患者に投与されてもよい。当業者は、特定の患者の治療的処置のために本発明のF V I I I をコードする発現ベクターを使用するための特別なプロトコルを容易に決定できるであろう。

20

30

**【0172】**

アデノウイルスベクターの生成及び患者への投与のプロトコルは、米国特許第5,998,205;6,228,646;6,093,699;6,100,242;及び、国際特許出願W O 9 4 / 1 7 8 1 0 及びW O 9 4 / 2 3 7 4 4（これらは参照によって全体が本明細書に組み込まれている）に記載されている。特に、例えば、A A V ベクターは、第V I I I 因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I I をコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I I タンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I I タンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメント等のような核酸変異体によってコードされる第V I I I 因子（F V I I I）を、必要性のある患者に届けるために使用される。

40

**【0173】**

本発明のA A V ベクターにより運ばれる第V I I I 因子（F V I I I）をコードする核酸変異体（例えば、F V I I I をコードするコドン最適化変異体）、変異体第V I I I タンパクをコードする核酸変異体（例えば、P A C E / フーリン切断部位の変異、欠損若しくは置換を有する変異体F V I I I タンパクをコードするコドン最適化核酸変異体）、又は、いずれかの機能性フラグメント等のような、核酸変異体によってコードされる第V I I I 因子（F V I I I）は、あらゆる公知の手段によって患者に投与することができる。

**【0174】**

本発明の方法及び用途は、全身的、局部的、若しくは、局所的、又は、例えば、注射又

50

は注入によって等の任意の経路による送達及び投与を含む。対流強化送達 ( c o n v e c t i o n - e n h a n c e d d e l i v e r y ) 等のような他の送達方法が構想されるが、インビボでの医薬組成物の送達は、一般に、従来の注射器を使用した注射によって実行されてもよい (例えば米国特許 5,720,720 参照)。例えば、組成物は、皮下、表皮、皮内、鞘内、眼窩内、粘膜内、腹腔内、静脈内、胸膜腔内、動脈内、経口、肝内、門脈内、又は筋肉内に届けられてもよい。投与の他の形式は、経口投与、経肺投与、坐剤、及び、経皮的塗布を含む。血液凝固因子異常を有する患者の治療を専門とする臨床医は、患者の病状及び治療の目的 (例えば、血液凝固の強化又は減少) を含むがこれらに限定されない多くの基準に基づいて、F V I I I 核酸配列を含むアデノウイルス随伴ベクターを投与するための最適ルートを決定的にすることができる。

10

#### 【0175】

本発明の方法及び使用は、望まれる治療的な、有益な、付加的な、相乗効果的な、補足的な活性又は効力を有するあらゆる化合物、作用物質、薬剤、治療、又は、他の治療計画若しくはプロトコルと組み合わせることができる。典型的な組み合わせの組成物及び治療は、生物製剤 (タンパク)、作用物質、及び、医薬品等の第2の活性成分を含む。そのような生物製剤 (タンパク)、作用物質、医薬品、治療及び療法は、例えば、HemA等の血液凝固疾病のために被検体を治療する治療方法等のような、本発明のあるいは他の方法又は使用に先立って、当該方法又は使用と実質的に同時に、又は、当該方法又は使用の後で、投与又は実行されてもよい。

20

#### 【0176】

化合物、作用物質、薬剤、治療又は他の治療計画若しくはプロトコルは、組み合わせの組成物として投与することもできるし、又は、核酸、ベクター、組換え型ベクター (例えば rAAV) 又は組み替え型ウイルス粒子の送達又は投与と同時に、又は、シリーズで若しくは連続して (先に又は後で) 等のように、別々に投与することもできる。従って、本発明は、本明細書に記載されている又は当業者に公知であるあらゆる化合物、作用物質、薬剤、治療規制、治療プロトコル、プロセス、治療法又は組成物との組み合わせで、本発明の方法及び使用を提供する。化合物、作用物質、薬剤、治療計画、治療プロトコル、プロセス、治療法又は組成物は、被検体に対する本発明の核酸、ベクター、組換え型ベクター (例えば rAAV) 又は組み替え型ウイルス粒子の投与に先立って、これらと実質的に同時に、又は、これらの後で、投与又は実行することができる。

30

#### 【0177】

本発明はヒト及び獣医学の応用を含む動物において有用である。従って、適切な被検体は、ヒト及びヒト以外の哺乳動物等のような哺乳動物を含む。「被検体」という用語は、動物を表し、典型的には、ヒト、ヒト以外の霊長類 (類人猿、テナガザル、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、マカク)、家畜家禽 (イヌ及びネコ)、家畜、(ニワトリ及びアヒル等の飼鳥類、馬、雌牛、ヤギ、羊、ブタ)、及び、実験動物 (マウス、ラット、ラビット、モルモット) 等の哺乳動物を表す。ヒト被検体は、胎児、新生児、幼児、若年者及び成人の被検体を含む。被検体は、家畜病モデル、例えば、HemA 及び当業者に知られている他のもの等のようなマウス、及び、血液凝固疾病の他の動物モデルを含む。

40

#### 【0178】

本発明による治療に適切な被検体は、機能遺伝子生成物 (例えば F V I I I タンパク) の不十分な量を有する若しくは生産するリスクがあるもの又は当該機能遺伝子生成物が欠損しているもの、又は、異常な、部分的に機能する、若しくは、機能しない遺伝子産物 (例えば F V I I I タンパク) を生産するものであって、疾病に至り得るものを含む。また、本発明による治療に適切な被検体は、病気に結びつく異常な、不完全な (変異体の) 遺伝子産物 (タンパク) を有する又は生産するリスクのあるものであって、その異常な又は不完全な (変異体の) 遺伝子産物 (タンパク) の量、発現又は機能の減少がその病気の治療、又は、その病気の1つ以上の症状の低減若しくは緩和に結びつくものを含む。従って、ターゲット被検体は、血友病患者 (例えば血友病 A) 等のような、異常な、不十分な血液凝固因子を生産している被検体、又は、血液凝固因子が欠損している被検体を含む。

50

## 【0179】

本発明による治療に適切な被検体は、AAVに対する抗体を有する又は生産するリスクがあるものを含む。AAVベクターは、いくつかの技術を使用してそのような被検体に投与又は送達することができる。例えば、空のカプシドAAV（つまり、FV III 核酸が無いAAV）は、被検体のAAV抗体に結合させるために送達することができ、それによってFV III 核酸を運ぶAAVベクターが被検体の細胞を形質転換できるようにする。投与する空のカプシドAAVの量は、特定の被検体において生産されるAAV抗体の量に基づいて調整することができる。空のカプシドは、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9）、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74又はAAV-2i8等のような、任意のAAV血清型であってもよい。

10

## 【0180】

代替的に又は付加的に、AAVベクターは、直接の筋肉内注射（例えば、筋肉の1つ以上の遅筋線維）によって送達することができる。別の選択肢では、肝動脈経路で肝臓にAAVベクターを届けるために、大腿動脈へ導入されたカテーテルを使用することができる。肝臓にAAVベクターを直接送達するために、内視鏡的逆行性胆道膵管造影（ERCP）等のような非外科手段を使用することもでき、それによって血流及びAAV抗体を避けることができる。抗AAV抗体を発達させた又はすでに有している被検体中にAAVベクターを送達するための入り口として、顎下腺管等のような他の管状系を使用することができる。

20

## 【0181】

被検体に対する投与又はインビボ送達は、病気によって引き起こされる又は病気に伴う不利な症状、病状、合併症等の発展に先立って行うこともできる。例えば、選抜（例えば、遺伝的）は、本発明の組成物、方法及び用途のための候補として被検体を識別するために使用することができる。従って、そのような被検体は、機能する遺伝子生成物（例えばFV III タンパク）の不十分な量又は欠失が陽性であるとして選抜されたもの、又は、異常な、部分的に機能する若しくは機能を持たない遺伝子産物（例えばFV III タンパク）を生産するものを含む。

## 【0182】

本明細書に開示されている本発明の方法及び使用による被験者に対する投与又はインビボ送達は、被験者が治療の対象とされる病気を有するものとして確認された後、病気の1つ以上の症状を有する後、又は、病気の1つ以上の症状を有していなくても、本明細書に記載されているように選抜されて陽性であると識別された後で、1～2、2～4、4～12、12～24又は24～72時間以内に実行することができる。もちろん、本発明の方法及び使用は、被験者が対象となる病気を有しているものとして確認された後、病気の1つ以上の症状を有する後、又は、本明細書に記載されているように選抜されて陽性であると識別された後で、1～7日、7～14日、14～21日、21～48日若しくはそれ以上の日後に、数ヶ月後に、又は、数年後に実行されてもよい。

30

## 【0183】

本明細書で使用されているように、「ユニット投薬形態」という用語は、治療される被検体のための単一量として適した物理的に分離した単位を表す。各単位は、任意に薬剤担体（賦形剤、希釈剤、媒体又は充填剤）を伴って、1又はそれ以上の用量で投与された場合に、所望の効果（例えば、予防的効果又は治療的効果）を生じさせると計算される所定の量を含む。単位用量形態は、例えば、アンプル及びバイアル中に存在していてもよい。単位用量形態は、液状組成物を含んでいてもよいし、又は、フリーズドライ又は凍結乾燥された状態の組成物を含んでいてもよく、例えば、インビボでの投与又は送達に先立って無菌の液状担体が加えられてもよい。個別の単位量形態は、複数用量キット又は包装容器中に含まれてもよい。組み換え型のベクター（例えばrAAV）配列、組み換え型のウイルス粒子、及び、それらの医薬組成物は、投与のしやすさ及び容量の均一性のために、単一の単位用量又は複数の単位用量でパッケージされてもよい。

40

50

## 【 0 1 8 4 】

本発明はゲノム組込材料及び1つ以上の成分を有するキットを提供する。キットは、典型的には、成分の説明又は成分のインビトロ、インビボ、エスクビボでの使用説明書を含むラベル又はパッケージング挿入物を含む。キットは、例えば、核酸、組換え型のベクター、ウイルス（例えばAAV）ベクター又はウイルス粒子等のそのような成分の集合物と、任意に、他の化合物、作用物質、薬剤又は組成物等のような第2の活性成分を含んでいてもよい。

## 【 0 1 8 5 】

キットは、当該キットの1つ以上の成分を収容する物理構造を表す。パッケージング材は、その成分を無菌的に維持することができ、そのような目的のために一般的に使用される材料からなるものであってもよい（例えば、紙、波形のファイバー、ガラス、プラスチック、箔、アンプル、バイアル、チューブ等）。

10

## 【 0 1 8 6 】

ラベル又は挿入物は、1つ以上の成分、用量、（作用機序、薬物動態学及び薬動力学を含む）有効成分の臨床薬理学を特定する情報を含んでいてもよい。ラベル又は挿入物は、製造業者、ロット番号、製造業者の居所及び日付、使用期限を特定する情報を含んでいてもよい。ラベル又は挿入物は、製造業者、ロット番号、製造業者の居所及び日付、使用期限を特定する情報を含んでいてもよい。ラベル又は挿入物は、キットの成分を使用することができる疾病に関する情報を含んでいてもよい。ラベル又は挿入物は、方法、使用、又は、治療プロトコル若しくは治療規制の1つ以上においてキット成分を使用するための、臨床医又は被検体のための指示書を含んでいてもよい。指示書は、用量、頻度又は期間、及び、本明細書に記載されている、用途、治療プロトコル、又は、予防計画若しくは治療計画のいずれかを実行するための指示を含んでいてもよい。

20

## 【 0 1 8 7 】

ラベル又は挿入物は、予防的利益又は治療的利益等のような、成分が提供することができるあらゆる利益に関する情報を含んでいてもよい。ラベル又は挿入物は、特定の組成物を使用することが適切でない状況に関する被検体又は臨床医に対する警告等のような、潜在的な不都合な副作用、合併症又は反応に関する情報を含んでいてもよい。被検体が、組成物と適合しない可能性がある1つ以上の他の薬物を有し、将来的に有し、若しくは、現在摂取している場合、又は、被検体が、組成物と適合しない他の治療プロトコル又は治療計画を有し、将来的に受け、若しくは、現在受けている場合、副作用又は合併症がさらに生じる可能性があり、従って、指示書は、そのような不適合性に関する情報を含んでいてもよい。

30

## 【 0 1 8 8 】

ラベル又は挿入物は、「印刷物」、例えば、紙、厚紙であって、成分、キット若しくはパッケージ材料（例えば、箱）と分離した若しくは添付された、又は、キット成分を含むアンプル、チューブ若しくはバイアルに添付されたものを含む。ラベル又は挿入物は、バーコード付きのプリントされたラベル、ディスク、CD - 若しくはDVD - ROM / RAM、DVD等の光ディスク、MP3、磁気テープ、又は、RAM、ROM等の電氣的記憶媒体、又は、磁気 / 光記憶媒体、FLASHメディア又はメモリ型カード等のハイブリッド、等のコンピュータ読取り可能なメディアをさらに含んでいてもよい

40

## 【 0 1 8 9 】

別段の定めがない限り、本明細書で使用されている技術的用語及び科学用語のすべては、この発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似又は等価の方法及び材料を本発明の実行又は試験において使用することができるが、適切な方法及び材料は本明細書に記載されている。

## 【 0 1 9 0 】

本明細書で引用されているすべての特許、特許出願、刊行物及び他の参考文献、GenBank引用並びにATCC引用は、参照することによってそれらの全体が組み込まれて

50



いる。抵触する場合には、定義を含む明細書が支配する。

【0191】

本発明の生体分子に関する様々な用語が上記並びに明細書及び特許請求の範囲の全体にわたって使用されている。

【0192】

本明細書に開示されているすべての特徴はあらゆる組み合わせで組み合わせられてもよい。本明細書に開示されている各特徴は、同じ、等価、又は、類似の目的を果たす代替的特徴に置換されてもよい。従って、明示的に別段の記載が無い限り、開示されている特徴（例えば、核酸変異体、ベクター、プラスミド、組換え型のベクター（例えば rAAV）配列又は組み替え型のウイルス粒子）は、等価な又は同様の特徴の属の例である。

10

【0193】

本明細書で使用されているように、明示的に別段の定めがない限り、「1つの」(a)及び「その」(the)という単数形は、複数の指示物を含む。従って、例えば、「核酸」(a nucleic acid)への言及は複数のそのような核酸を含む。「ベクター」(a vector)への言及は複数のそのようなベクターを含む。「ウイルス」(a virus)又は「粒子」(a particle)への言及は複数のそのようなウイルス/粒子を含む。

【0194】

本明細書で使用されているように、明示的に別段の定めがない限り、数値又は数値範囲は、すべてそのような範囲内の整数と、範囲内の値又は整数の一部を含む。従って、説明のために、80%又はそれ以上の同一性への言及は、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%等、並びに、81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%等、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%等を含む。

20

【0195】

「より多い(より大きな)」又は「より少ない」を伴う整数への言及は、参照値より大きい任意の数又は参照値より小さい任意の数をそれぞれ含む。例えば、従って、「100より小さい」への言及は、99、98、97等、数1(1)に至る途中の数を含む。また、「10より小さい」は、9、8、7等、数1(1)に至る途中の数を含む。

【0196】

本明細書で使用されているように、明示的に別段の定めがない限り、すべての数値又は範囲は、そのような範囲内の値及び整数の一部、並びに、そのような範囲内の整数の一部を含む。従って、説明のために、1-10のような数値範囲への言及は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等、及び、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等を含む。従って、1-50の範囲への言及は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等、最大で50まで、かつ、50を含み、また、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等を含む。

30

【0197】

シリーズの範囲への言及は、そのシリーズ中の異なる範囲の境界の値を組み合わせた範囲を含む。従って、シリーズの範囲への言及を説明するために、例えば、1-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-75、75-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-750、750-850は、1-20、1-30、1-40、1-50、1-60、10-30、10-40、10-50、10-60、10-70、10-80、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、50-75、50-100、50-150、50-200、50-250、100-200、100-250、100-300、100-350、100-400、100-500、150-250、150-300、150-350、150-400、150-450、150-500等の範囲を含む。

40

50

## 【0198】

本発明は、多数の実施形態及び態様について記載するために、ここに断定的な言葉を使用して一般的に開示されている。また、本発明は、物質又は材料、方法ステップ及び条件、プロトコル又は手続等の特定の主題が、全部又は一部分において除外された実施形態を特に含んでいる。例えば、本発明のある実施形態又は態様において、材料及び／又は方法ステップが除外されている。従って、本発明が含まないものという観点では、たとえ本発明が本明細書中に一般に表現されていなくても、本発明において明示的に除外されていない態様はそれにも拘わらず本明細書に開示されている。

## 【0199】

本発明の多くの実施形態が記載されている。しかし、当業者は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱せずに、様々な使用法及び状況に本発明を適応させるために、本発明に様々な変更及び修飾を加えることができる。従って、以下の実施例は、説明するように意図されており、いかなる態様においても特許請求の範囲に記載された発明の範囲を限定するものではない。

## 実施例 1

## 【0200】

血友病 A (HA) は、凝固カスケードの重要成分である第 VIII 因子 (FVIII) の欠損を特徴とする X 連鎖性出血疾患である (Kazazian, H. H. ら、Hemophilia A: Deficiency of coagulation factor VIII in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (編集者 Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D.) 4367-4392 (McCraw-Hill、ニューヨーク、2001))。FVIII 遺伝子は、186 kb に及ぶ 26 のエクソンを含んでおり、巨大な前駆体分子 (2332 個のアミノ酸) として合成される (図 1) (Kaufman, R. J. ら、The biology and genetics of factor VIII deficiency in hemophilia A. in Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice (編集者 Colman, R. W., Hirsch, J., Mander, V. J., Clowes, A. W. & George, J. N.) (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998))。

## 【0201】

罹患者は、一般的に、関節、筋肉、致命的になり得る頭蓋内出血及び腹腔内出血を発症する。正常な血清 FVIII レベルは、100 - 200 ナノグラム / ml であるが、少量の循環する FVIII (~1 - 2 ナノグラム / ml) は重症患者の臨床経過に対して実質的效果を有するのに充分である。血友病 A 患者のための現行の治療は、組み換え型の FVIII 又は血清から抽出された FVIII を使用したタンパク置換療法である。しかしながら、これらの製品は、全世界において血友病 A 集団の ~20% にのみ利用可能である。この療法の主な合併症は、重症の血友病 A を有する患者の 25 ~ 30% で生じる FVIII に中和抗体 (阻害因子) の発症である。阻害因子が FVIII タンパク療法を無効にするので、止血を達成するためにバイパス剤 (FVIIa) が使用される。しかし、これらの製品は非常に高価な選択肢である。

## 【0202】

ここに開示されるのは、血友病を治療するための遺伝子治療方法における使用のための遺伝子構成物である。さらに、これらの第 VIII 因子 (FVIII) 遺伝子構築物はインビトロにおいてタンパク発現系のセッティングにおいて有用であり得る。各遺伝子構成物は、任意に、1 つ又はそれ以上の発現制御 (例えば、プロモーター) 因子、第 VIII 因子遺伝子、及び、イントロン、ITR、停止コドン、ポリ A シグナル等のような遺伝子発現に必要な他の制御性の特徴を含んでいてもよい。

## 実施例 2

## 【0203】

## 第VII因子DNA塩基配列のコドン最適化

## 【0204】

DNA塩基配列のコドン最適化が遺伝子治療のセッティングにおいて第VII因子発現を改善することができる旨が以前に説明されている(Wardら、2011、Blood 117(3):798-807)。DNA塩基配列のコドン最適化は、各DNAコドンがタンパク合成においてタンパク鎖中の特定のアミノ酸残基をコードする3つのヌクレオチドの連続物であるという事実に基づく。64個の異なるコドンが存在するが、20個のみのアミノ酸が存在し、従って、同じアミノ酸をコードすることができる多数のコドンが存在する。翻訳プロセスの最適化のための選択プロセスを反映する異なる種類の間で観察されるコドン使用頻度のバイアスが存在する。重要なことに、DNA塩基配列はコドン最適化において修飾されるが、タンパク配列が野性型配列と同一である。

10

## 【0205】

コドン最適化は、Bドメインが削除された第VII因子(hFVII-SQ)cDNA配列に対して行われた。第VII因子cDNAのコドン最適化された4つの異なるバージョンが発現分析において評価された。驚いたことに、DNA塩基配列のいくつかは、より高いレベルの第VII因子を発現した。

## 【0206】

その配列の1つは、より高いレベルの第VII因子を発現しただけでなく、ユニークな特徴を有していた(配列番号:1)。他のコドン最適化された配列又は野性型配列よりも良く、この配列はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター中にゲノム組込することができる。すなわち、第VII因子遺伝子は、その制御因子と共に、AAVウイルスキャプシド中にその配列をゲノム組込するのに必要なシグナルを提供する逆方向末端反復(ITR)に隣接している。データは、ITR間のDNA塩基配列のサイズが、最適なゲノム組込効率のために通常のウイルスゲノムのサイズ(4.7kb)に似ているに違いないことを示唆する。第VII因子の場合、我々は、長さ5.0kbの遺伝子配列はまだゲノム組込されることができるよう考えられるが、それは完全な遺伝子として効率的に組み込まれない可能性がある。

20

## 【0207】

特定の遺伝子をゲノム組込する能力に寄与する他の要因はそのDNA塩基配列自体である。いくつかのDNA塩基配列は再配列する傾向があり又は帯電に基づいた折りたたみ構造を有していることもあり、ウイルスキャプシド中にゲノム組込される能力に影響する。すなわち、サイズだけでなく、DNA塩基配列も導入遺伝子構成物のゲノム組込能力に影響すると考えられる。我々の研究において、我々は、高いレベルの第VII因子を発現する(例えば、図2、図4A及び図6A参照)だけでなく、AAVベクター中により効率的にゲノム組込される自然界に存在しない新しい第VII因子DNA塩基配列を確認した。この改善されたゲノム組込の特徴は、血清型に拘わらずにより高い収量のベクター(表3~5)を生成し、ヒト遺伝子治療で使用する厳格な品質管理基準を満たす均一なAAVベクターの生産を可能にするであろう。

30

40

## 【0208】

さらに発現レベルを改善するために、トランスチレチン(TTR)又は変異体TTRプロモーター(下記説明参照)、及び、アミノ酸位置1645-1648(TTRmut-hFVII-SQ-CO-deLP/F)(FVII変異体の下記説明参照)からPACEフリーン開裂認識部位を削除した第VII因子の変異体を用いて、コドン最適化されたヒトFVIIcDNA構築物を生成した。これらのFVII導入遺伝子構成物は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター中に組み込み、血友病A/CD4ノックアウトマウスに届けられた。FVII発現のレベルは、野性型hFVII-SQの発現よりも下記のように高かった。TTR-hFVII-SQ-COは5倍高く、TTRmut-hFVII-SQ-COは16倍高く、また、TTRmut-hFVII-SQ

50

- C O - d e l P / F は 3 3 倍高かった。

### 実施例 3

【 0 2 0 9 】

#### 第 V I I I 因子の変異体

【 0 2 1 0 】

修飾は第 V I I I 因子のタンパク配列中に導入された。コドン最適化された D N A 塩基配列中へのその修飾の導入は P A C E フーリン開裂認識部位を変更した。この部位の修飾はタンパクの安定性及び生物学的活性を向上する。P A C E フーリン開裂認識部位のコドン最適化された第 V I I I 因子中に導入されたアミノ酸修飾は表 1 に示されている。

10

【 0 2 1 1 】

アミノ酸位置 1 6 4 5 - 1 6 4 8 における P A C E フーリン ( P / F ) 開裂認識部位の欠損変異体は、野性型 B ドメイン削除因子 V I I I ( h F V I I I ) 遺伝子中に導入された。各変異体を発現する安定なベビーハムスター腎臓 ( B H K ) 細胞株を作成し、分析のために組み換え型タンパクを精製した。

【 0 2 1 2 】

c F V I I I ( イヌの第 V I I I 因子 ) ; h F V I I I - R H ( アミノ酸位置 1 6 4 5 におけるアルギニン ( R ) からヒスチジン ( H ) への単一のアミノ酸置換を有し、c F V I I I 配列と同じ P / F サイトを生成する変異体 ) ; デルタ 1 6 4 5、残基 R 1 6 4 5 の欠損、デルタ 2、残基 R 1 6 4 5 及び残基 H 1 6 4 6 の欠損 ; デルタ 3、残基 R 1 6 4 5、残基 H 1 6 4 6 及び残基 Q 1 6 4 7 の欠損 ; デルタ 4、残基 R 1 6 4 5、残基 H 1 6 4 6、残基 Q 1 6 4 7 及び残基 R 1 6 4 8 の欠損 ; 及び、デルタ 1 6 4 8、残基 R 1 6 4 8 の欠損。

20

P A C E フーリン認識部位のヒューマンファクター V I I I 変異体

【 表 1 】

FVIII 変異体	PACE フーリン認識部位におけるアミノ酸						
	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648
hFVIII	V	L	K	R	H	Q	R
hFVIII-RH	V	L	K	H	H	Q	R
Δ4: hFVIII-1645-1648 削除	V	L	K	-	-	-	-
Δ1645: hFVIII-1645 削除	V	L	K	-	H	Q	R
Δ2: hFVIII-1645-1646 削除	V	L	K	-	-	Q	R
Δ3: hFVIII-1645-1647 削除	V	L	K	-	-	-	R
Δ1648: hFVIII-1648 削除	V	L	K	R	H	Q	-

30

【 0 2 1 3 】

組み換え型の変異体タンパクを精製し、凝固促進能を明らかにするために、インビトロ及びインビボの両方における異なる分析で比較した。インビトロにおいては、P / F 変異体が野性型 h F V I I I より高い生物活性を有しており、デルタ 3 が最も高い生物活性を有し、デルタ 4 変異体及びデルタ 2 変異体がその後に続いた。

【 0 2 1 4 】

インビボにおいては、これらの変異体 h F V I I I タンパクのすべてを血友病 A マウスに注入し、テール・クリップ・チャレンジ・アッセイにより、損傷後の失血を測定した。デルタ 3 変異体及びデルタ 4 変異体は、このチャレンジモデルにおいて失血を低減する能力が向上したことを示した。

40

50

## 【0215】

P/F欠損変異体の5つすべてを、野性型第V I I I因子遺伝子(図3A)を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター発現カセット中に導入した。AAV-hFV I I Iを血友病A/CD4KOマウス( $5 \times 10^{11}$ vg/マウス)に届け、抗原及び活性によってFV I I Iの発現を測定した(図3B)。デルタ3の発現レベルは野性型FV I I I-BDDより4倍高かった。その一方で、デルタ4及びデルタ1645はそれぞれ2倍と3倍高かった。デルタ2及びデルタ1648は野性型FV I I Iと同程度であった。これらの結果は、デルタ3PACEフリー欠損変異体及びデルタ4PACEフリー欠損変異体の改善されたコドン最適化FV I I I構築物中への導入を支持している。

10

## 実施例4

## 【0216】

## TTRプロモーター

## 【0217】

これらの研究で利用した改良されたプロモーター因子は、第V I I I因子発現を改善する4個のヌクレオチド変更を有するトランスチレチン(TTR)プロモーターである。このプロモーターの評価は、元々は、「Costa and Grayson 1991、Nucleic Acids Research 19(15):4139-4145」に記載されている。これらのインビトロにおける研究は、4個のヌクレオチドの修飾が、肝細胞核因子(HNF)転写因子の親和性を、DNA塩基配列中のその結合部位に対して増加させることを示唆した。従って、新規な合成プロモーターにおいて、我々は、TTRプロモーター配列のヌクレオチド67において始まる、自然界に存在することが知られていないその4個のヌクレオチド変更を導入した。それはTAmGTGTAGからTATTGACTTAGに修飾された(配列番号:8)。

20

## 実施例5

## 【0218】

野性型導入遺伝子とコドン最適化(CO)された導入遺伝子の比較

## 【0219】

向上したFV I I I発現に対する各FV I I I配列又は配列変異体の寄与を示すために、AAV遺伝子組み換え構成物を作成した。これらの構成物は、図2に記載されている構成物と同じ制御因子を含むが、それらのFV I I I配列は異なる。上記の研究に基づいて、最も優れたパフォーマンスを有するPACEフリー欠損変異体(デルタ3及びデルタ4)を、これらのhFV I I I導入遺伝子中に導入した。また、これらのFV I I I導入遺伝子のすべては、Bドメインが削除された(BDD)形態である。この研究のAAVベクターはすべてCCMTのResearch Vector Coreで生産され、そのすべてを定量的PCR及び銀染色法によって一緒に力価測定した。

30

表2Aは、野生型hFV I I Iとコドン最適化された3つの変異体(CO1、CO2及びCO3と表される)との間のhFV I I I配列同一性を示す。

【表 2 A】

*hFVIII 4374* ヌクレオチド

配列 1	配列 2	% 同一性	# NT 同一性	# NT 相違
野生型	CO3	77.34%	3386	992
野生型	CO1	77.14%	3374	1000
野生型	CO2	75.74%	3315	1062
CO3	CO1	82.20%	3597	779
CO3	CO2	81.91%	3590	793

10

表 2 B は、コドン最適化された各 *hFVIII* 変異体 (CO1、CO2 及び CO3 と表される) のヌクレオチド頻度を示す。

【表 2 B】

20

	野生型 <i>hFVIII</i>	CO3	CO2	CO1
ヌクレオチド頻度	頻度 %	頻度 %	頻度 %	頻度 %
<b>A</b>	<b>A: 1,266 28.9%</b>	<b>A: 1,145 26.2%</b>	<b>A: 1,072 24.5%</b>	<b>A: 1,063 24.3%</b>
<b>C</b>	<b>C: 970 22.2%</b>	<b>C: 1,108 25.3%</b>	<b>C: 1,197 27.4%</b>	<b>C: 1,371 31.3%</b>
<b>G</b>	<b>G: 964 22.0%</b>	<b>G: 1,133 25.9%</b>	<b>G: 1,149 26.3%</b>	<b>G: 1,191 27.2%</b>
<b>T</b>	<b>T: 1,174 26.8%</b>	<b>T: 988 22.6%</b>	<b>T: 956 21.9%</b>	<b>T: 749 17.1%</b>
<b>GC</b>	<b>GC: 1,934 44.2%</b>	<b>GC: 2,241 51.2%</b>	<b>GC: 2,346 53.6%</b>	<b>GC: 2,562 58.6%</b>

30

40

## 【0220】

この研究では、5つのヒト *FVIII* 導入遺伝子は以下のとおりであった。

- (1) 野生型ヒト *FVIII* - BDD (*hFVIIIwtSQ*) ;
- (2) *PACE* フーリン認識配列中の4つの残基の欠損を有する野生型ヒト *FVIII* - BDD (*hFVIIIwtSQ* デルタ4)
- (3) コドンに最適化 (CO) された *hFVIII* - BDD (*hFVIIIICO*)
- (4) *PACE* フーリン認識部位の3つの残基の欠損を有するコドン最適化された (*hFVIIIICO* デルタ3)
- (5) *PACE* フーリン認識部位の4つの残基の欠損を有するコドン最適化された *hFVIII* (*hFVIIIICO* デルタ4) (図6)

50

## 【0221】

このデータは、野性型 F V I I I 構成物が、異なるプロモーター (H C R - h A A T) を使用し、野性型 F V I I I 構成物が、コドン最適化された (C O) 構築物と同じ発現力セットに入っておらず、各 F V I I I 導入遺伝子の個々の寄与を示すことが困難であった図 2 中のデータの改良である。さらに、野性型 h F V I I I (図 4) との関係で P A C E フーリン欠損の寄与を示すために、この部位で 4 個のアミノ酸残基を削除した P A C E / フーリン変異体を有する野性型 F V I I I (h F V I I I w t S Q デルタ 4) を含めた。

## 【0222】

記載されているように、A A V - h F V I I I は血友病 A / C D 4 K O マウスに届けられた ( $1 \times 10^{11}$  v g / マウス)。しかしながら、A A V 変異体をベースとして開発された異なる A A V 血清型は、R h 7 4 V V と示す。以前のデータは A A V 血清型 8 (A A V 8) を用いて作成した。

10

## 【0223】

h F V I I I 発現は、抗原レベル (E L I S A) 及び活性 (C o a t e s t a s s a y)

によって測定された。R h 7 4 V V については、ベクター投与後 4 週の h F V I I I 発現のレベルは、(h F V I I I w t S Q) については  $9.4 + 1.5$  n g / m l (正常な F V I I I レベルの 6.3%) であり、(h F V I I I w t S Q デルタ 4) については  $32.4 + 13.0$  n g / m l (21.6%) であり、 $42.2 + 7.1$  n g / m l (28.1%) (h F V I I I C O)、( $177.8 + 8.5$  n g / m l (118.5%)) (h F V I I I C O デルタ 3)、及び、 $114.3 + 60.2$  n g / m l (76.2%) (h F V I I I C O デルタ 4) であった (図 6)。

20

## 【0224】

ベクター投与後 6 週に、野性型 A A V 及びコドン最適化された h F V I I I 構築物の送達後にマウスをインビボにおける止血チャレンジによって分析した。結果 (図 7) は、コドン最適化 (C O) された F V I I I は、P / F 欠損があってもなくても、失血の減少によって反映されるように、血友病 A マウスにおける凝固活性が野性型マウスに匹敵することを示す。

## 【0225】

A A V 変異体 (R h 7 4 V V) を用いて得られた F V I I I タンパク発現のレベルが A A V 8 を用いた F V I I I レベルより低いので、このデータは、野性型 F V I I I 構成物と比較した倍数差を使用して示されている。重要なことに総体的結論は同じである。デルタ 4 P / F の変異体の導入を用いた発現のレベルは、野性型配列単独と比較して約 2 - 4 倍高い。C O 導入遺伝子は、野性型 h F V I I I より 5 倍高い発現に帰着する (h F V I I I - w t S Q)。コドン最適化された h F V I I I (h F V I I I - C O) 中への P / F 欠損変異体の導入は、C O 導入遺伝子単独よりも、3 ~ 4 倍高い (デルタ 3) 発現又は 2 ~ 3 倍高い (デルタ 4) 発現となる。従って、h F V I I I C O デルタ 3 構築物は h F V I I I w t S Q より 16 ~ 19 倍優れており、P / F 欠損変異体単体又はコドン最適化単体のいずれよりも実質的に高い。

30

## 【0226】

著しく、P / F 欠損変異体の寄与は、野性型配列及びコドン最適化された h F V I I I 配列の両方と一致している (図 4)。更に、この寄与は別の発現力セットを使用しても観察された (図 3)。すなわち、野性型 D N A 塩基配列又はコドン最適化された D N A 塩基配列の中にあるかどうかに関わらず、デルタ 3 P / F 変異体は 3 ~ 4 倍高い発現レベルとなり、デルタ 4 は 2 ~ 3 倍高い発現レベルとなる。いかなる特定の理論によって拘束されることを意図しないが、組み合わせされた相乗効果は、コドン最適化 (R N A 配列の向上した翻訳) 及び P A C E フーリン変異体 (タンパクの向上した分泌及びより高い生物活性) の原因となる異なるメカニズムによるものと考えられる。

40

## 【0227】

開示されている (図 2) ように、T T R m プロモーターは T T R プロモーター単独と比較

50

して発現が2倍増加する。この調査には含まれていないが、他の調査に基づいた合理的推測は、最適化された構成物であるTTRm-hFVIIICodelta3がTTR-hFVIIIIwtSQより30～40倍優れていることを示す。

#### 実施例6

##### 【0228】

コドン最適化された構成物及びコドン最適化されていない構成物のベクター生産

##### 【0229】

ヒト因子VIIII調製のためのアデノ随伴ウイルスの(AAV)ベクター生産が表3-5に示されている。野生型ヒトFVIIII-SQ(hFVIIII)(3個の調製物、Prep1-Prep3と示す)、及び、コドン最適化されたヒトFVIIII(hFVIIII-CO、CO3とも称される)(CO3の5個の別個の調製物、Prep1-Prep5と示す)のための1本のローラーボトル当たりのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターゲノムが示されている。同じ生産プロトコル及び精製スキームを使用してすべてのFVIIII-CO3調製を行った。4.60×10<sup>12</sup>vg/ローラーボトル(3個のベクター調製物)のAAV8-hFVIIII-SQの平均生産量と比較して、AAV8-hFVIIII-SQ-COの平均生産量は2.77×10<sup>12</sup>vg/ローラーボトル(13個のベクター調製物)であった。CO FVIIII配列を用いたこの生産量は野生型FVIIII配列と比較して2倍高い。

ヒト因子VIIII調製のためのAAV-8ベクター生産

##### 【表3】

hFVIII 導入遺伝子	AAVベクター	ベクターゲノム/ ローラーボトル
hFIX	AAV8-hFIX-19	1.00 x 10 <sup>13</sup>
野生型	AAV8-hFVIII-Prep 1	2.20 x 10 <sup>12</sup>
	AAV8-hFVIII-Prep 2	3.66 x 10 <sup>12</sup>
	AAV8-hFVIII-Prep 3	2.46 x 10 <sup>12</sup>
	AAV8-hFVIII-CO-Prep 1	4.54 x 10 <sup>12</sup>
コドン 最適化された	AAV8-hFVIII-CO-Prep 2	3.62 x 10 <sup>12</sup>
	AAV8-hFVIII-CO-Prep 3	4.71 x 10 <sup>12</sup>
	AAV8-hFVIII-CO-Prep 4	5.00 x 10 <sup>12</sup>
	AAV8-hFVIII-CO-Prep 5	4.30 x 10 <sup>12</sup>

##### 【0230】

FVIIIIの全ベクター調製物の平均産出量が標準偏差と共に表4及び表5に示されている。再び、異なるベクターコアによって生産されるAAV調製物はより低い生産量を有することが観察されているが、異なる血清型(Rh74VV)における野生型ベクター及びCOベクターの両方の比較は、一貫して生産量が2倍高いことを示す。これは、FVIIIIベクター調製の生産量がベクターコア及びAAV血清型に依存しないことを実証している。

ヒト因子VIIII調製のためのAAV-8ベクター生産量、標準偏差



【表 4】

hFVIII 導入遺伝子	AAVベクター	調製物の数	平均ベクターゲノム/ ローラボトル
hFIX	AAV8-hFIX-19		$1.00 \times 10^{13}$
野生型	AAV8-hFVIII	3	$2.67 \times 10^{12} \pm 9.29 \times 10^{11}$
コドン 最適化 された	AAV8-hFVIII-CO	13	$4.60 \times 10^{12} \pm 6.85 \times 10^{11}$

10

ヒト因子V I I I 調製物のための R h 7 4 V V A A V ベクター生産量、標準偏差

【表 5】

hFVIII 導入遺伝子	AAV ベクター	調製物の数	平均ベクターゲノム ／ローラボトル
野生型	Rh74 <sub>VV</sub> -hFVIII	7	$9.58 \times 10^{11} \pm 5.07 \times 10^{11}$
コドン最適 化された	Rh74 <sub>VV</sub> -hFVIII-CO	5	$2.39 \times 10^{12} \pm 6.85 \times 10^{11}$

20

コドン最適化された因子V I I I c D N A、a k a C O / C O 3 ( 配列番号 : 1 )

A T G C A G A T T G A G C T G T C A A C T T G C T T T T T C C T G T G C C T G C  
 T G A G A T T T T G T T T T T C C G C T A C T A G A A G A T A C T A C C T G G G  
 G G C T G T G G A A C T G T C T T G G G A T T A C A T G C A G A G T G A C C T G  
 G G A G A G C T G C C A G T G G A C G C A C G A T T T C C A C C T A G A G T C C  
 C T A A A T C A T T C C C C T T C A A C A C C A G C G T G G T C T A T A A G A A  
 A A C A C T G T T C G T G G A G T T T A C T G A T C A C C T G T T C A A C A T C  
 G C T A A G C C T C G G C C A C C C T G G A T G G G A C T G C T G G G A C C A A  
 C A A T C C A G G C A G A G G T G T A C G A C A C C G T G G T C A T T A C A C T  
 G A A A A A C A T G G C C T C A C A C C C C G T G A G C C T G C A T G C T G T G  
 G G C G T C A G C T A C T G G A A G G C T T C C G A A G G G G C A G A G T A T G  
 A C G A T C A G A C T T C C C A G A G A G A A A A G A G G A C G A T A A G G T  
 G T T T C C T G G C G G G T C T C A T A C C T A T G T G T G G C A G G T C C T G  
 A A A G A G A A T G G C C C C A T G G C T T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
 C C T A C T C T T A T C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A T C T  
 G A A C A G C G G A C T G A T C G G A G C A C T G C T G G T G T G T A G G G A A  
 G G G A G C C T G G C T A A G G A G A A A A C C C A G A C A C T G C A T A A G T  
 T C A T T C T G C T G T T C G C C G T G T T T G A C G A A G G A A A A T C A T G  
 G C A C A G C G A G A C A A A G A A T A G T C T G A T G C A G G A C C G G G A T  
 G C C G C T T C A G C C A G A G C T T G G C C C A A A A T G C A C A C T G T G A  
 A C G G C T A C G T C A A T C G C T C A C T G C C T G G A C T G A T C G G C T G  
 C C A C C G A A A G A G C G T G T A T T G G C A T G T C A T C G G A A T G G G C  
 A C C A C A C C T G A A G T G C A C T C C A T T T T C C T G G A G G G G C A T A  
 C C T T T C T G G T C C G C A A C C A C C G A C A G G C C T C C C T G G A G A T

30

40

50

CTCTCCAATTACCTTCTCTGACAGCTCAGACTCTGCTGATG  
GATCTGGGACAGTTTCTCTGCTGTTTTTGCCACATCAGCTCCC  
ACCAGCATGATGGCATGGAGGCCCTACGTGAAAGTGGACAG  
CTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAG  
GAAGCTGAAGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGA  
TGGATGTGGTCCGATTTCGATGACGATAACAGCCCCCTCCTT  
TATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAAGAAACACCCCTAAGACA  
TGGGTCCATTACATCGCAGCCGAGGAAGAGGACTGGGATT  
ATGCACCACTGGTGTGCTGGCACCAAGACGATCGATCCTACAA  
ATCTCAGTATCTGAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGA 10  
AAGTACAAGAAAGTGAGGTTTCATGGCTTATACCGATGAAA  
CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGAT  
TCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAAAGTGGGGGACACCCCTG  
CTGATCATTTTTTAAGAAACCAGGCCACGAGGCCCTTACAAATA  
TCTATCCACATGGAATTACAGATGTGCGCCCTCTGTACAG  
CCGGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAAACACCTGAAGGACTTC  
CCAATCCTGCCCCGGGGAAATTTTTTAAGTATAAATGGACTG  
TCACCGTCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGACCCCTAGGTG  
CCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTTCTGTGAATATGGAAAGG  
GATCTGGCCAGCGGACTGATCGGCCCCACTGCTGATTTGT 20  
ACAAAGAGAGCGGTGATCAGAGAGGGCAACCAGATCATGTC  
CGACAAGAGGAATGTGATTCTGTTCAGTGTCTTTGACGAA  
AACCGGTTCATGGTATCTGACCGAGAAACATCCAGAGATTCC  
TGCCTAATCCAGCCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTT  
TCAGGCCTTCTAACATCATGCAATAGTATTAATGGCTACGTG  
TTCGACAGTCTGCAGCTGTCAGTGTGTCTGCACGAGGTCG  
CTTACTGGTATATCCTGAGCATTTGGAGCACAGACAGATTT  
CCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACCTTTTAAGCATAAA  
ATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTCTCCCTTTCAGCG  
GCGAAACCGTGTTTATGTCCATGGAGAAATCCCGGGCTGTG 30  
GATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGG  
ATGACTGCCCTGCTGAAGAGTGTCAAGCTGTGACAAAGAAACA  
CCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGC  
ATATCTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCT  
TTTAGTCAGAATCCTCCAGTGCTGAAGAGGGCACCAAGCGCG  
AGATCACCCGCACTACCCCTGCAGAGTGATCAGGAAGAGAT  
CGACTACGACGATACAAATTTCTGTGGAAATGAAGAAAGAG  
GACTTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAAACCAGAGTCCCTC  
GATCATTTCCAGAAAGAAACCCCGGCATTACTTTATTGCTGC  
AGTGGAGCGCCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCTCT 40  
CACGTGCTGCGAAATCGGGGCCAGTCAAGGGAGCGTCCCA  
AGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGATC  
CTTTACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCAC  
CTGGGGCTGCTGGGACCCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGG  
ATAACATTATGGTCACTTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCC  
TTACAGTTTTTTATTCAAGCCCTGATCTCTTACGAAGAGGAC  
CAGAGGCGAGGGAGCAGAAACCAAGAAACCTTCTGTGAAGC  
CTAATGAGACCAAAACATACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCA  
TATGGCCCCAACAAAGACGAATTTCGATTGCAAGGCATGG  
GCCATTTTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAAGGACGTCCACA 50

GTGGCCTGATCGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAACAAC  
CCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGGA  
TTCGCCCTGTTCCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCT  
GGTACTTTCACCGAAACATGGAGCGAAATTGCCGGGGCTCC  
ATGTAATATTTCAGATGGAAGACCCACATTTCAAGGAGAAC  
TACCGCTTTTCATGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTC  
TGCCCGGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGTG  
GTACCTGCTGAGCATGGGGTCCAAACGAGAAATATCCACTCA  
ATTCATTTTCAGCGGACACGCTGTTTACTGTCCGGAAGAAAG  
AAGAGTATAAAAATGGCCCTGTACAAACCTGTATCCC GGCGT  
GTTTCGAAACCGTTCGAGATGCTGCCTAGCAAGGCAGGGATC  
TGGAGAGTGGAAATGCCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCG  
GAATGTCTACCCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTCA  
GACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATCCGGGGATTTTC  
CAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGGCCAGTGGGCCCCCTA  
AGCTGGCTAGACTGCACCTATTCCGGGGTCTATCAACGCTTG  
GTCCACAAAAAGAGCCCTTTCTCTTTGGATTAAAGGTGGACCTG  
CTGGCACCAATGATCATTTTCATGGCATCAAAACTCAGGGGG  
CCAGGCAGAAAGTTCTCTCTCTCTGTACATCTCACAGTTTAT  
CATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATAC  
CGCGGC AATAGCACAGGGGACTCTGATGGTGTCTTTGGCA  
ACGTGGACAGTTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCC  
CCCTATCATTTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCCAACCCAT  
TATTCTATTTCGAAGTACACTGCGGGATGGAACTGATGGGGT  
GCGATCTGAACAGTTGTTC AATGCCCCCTGGGAATGGAGTCT  
CAAGGC AATCTCTGACGCC CAGATTACCGCTAGCTCCTAC  
TTCACTAATATGTTTGTCTACCTGGAGCCCTCCAAAGCAC  
GACTGCATCTGCAGGGGACGAAGCAACGCATGGCGACCAACA  
GGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTTCGATTTTTCAG  
AAAACTATGAAGGTGACCGGAGTCACAACTCAGGGCGGTGA  
AAAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTC AAGGAGTTCTCTGAT  
CTCTAGTTTCACAGGACGGGCCAC CAGTGGACACTGTTCTTT  
CAGAACGGAAAGGTGAAGGTCTTCCAGGGCAATCAGGATT  
CCTTTTACACCTGTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCT  
GACTCGCTACCTGCGAATCCACCCACAGTCTCTGGGTGCAT  
CAGATTGCACTGAGAAATGGAAGTCTCTGGGCTGCGAGGGCC  
AGGACCTGTATTGA

10

20

30

コドン最適化されたVII cDNA、aka CO/CO3、R1645Hを有する  
変異体（配列番号：2）

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTTGCTTTTTTCTGTGCCCTGC  
TGAGATTTTGT TTTTCCGCTACTAGAAAGATACTACCTGGG  
GGCTGTGGAACCTGTCTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTG  
GGAGAGCTGCCAGTGGACGCGACGATTTCCACCTAGAGTCC  
CTAAATCATTTCCCTTCAACAC CAGCGTGGTCTATAAGAA  
AACACTGTTCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTC AACATC  
GCTAAGCCTCGGGCCACCCCTGGATGGGACTGCTGGGACCAA  
CAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCAATTACACT  
GAAAAACATGGCCCTCACACCCCGTGAGCCTGCATGCTGTG  
GGCGTCA GCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCGAGAGTATG  
ACGATCAGACTTCC CAGAGAGAAAGAGGACGATAAGGT

40

50

G T T T C C T G G C G G G T C T C A T A C C T A T G T G T G G C A G G T C C T G  
A A A G A G A A T G G C C C C A T G G C T T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
C C T A C T C T T A T C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A T C T  
G A A C A G C G G A C T G A T C G G A G C A C T G C T G G T G T G T A G G G A A  
G G G A G C C T G G C T A A G G A G A A A A C C C A G A C A C T G C A T A A G T  
T C A T T C T G C T G T T C G C C G T G T T T G A C G A A G G A A A A T C A T G  
G C A C A G C G A G A C A A A G A A T A G T C T G A T G C A G G A C C G G G A T  
G C C G C T T C A G C C A G A G C T T G G C C C A A A A T G C A C A C T G T G A  
A C G G C T A C G T C A A T C G C T C A C T G C C T G G A C T G A T C G G C T G  
C C A C C G A A A G A G C G T G T A T T G G C A T G T C A T C G G A A T G G G C 10  
A C C A C A C C T G A A G T G C A C T C C A T T T T C C T G G A G G G G C A T A  
C C T T T C T G G T C C G C A A C C A C C G A C A G G C C T C C C T G G A G A T  
C T C T C C A A T T A C C T T C C T G A C A G C T C A G A C T C T G C T G A T G  
G A T C T G G G A C A G T T C C T G C T G T T T T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A T G A T G G C A T G G A G G C C T A C G T G A A A G T G G A C A G  
C T G T C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G G A T G A A G A A C A A T G A G  
G A A G C T G A A G A C T A T G A C G A T G A C C T G A C C G A C T C C G A G A  
T G G A T G T G G T C C G A T T C G A T G A C G A T A A C A G C C C C T C C T T  
T A T C C A G A T T A G A T C T G T G G C C A A G A A A C A C C C T A A G A C A  
T G G G T C C A T T A C A T C G C A G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T 20  
A T G C A C C A C T G G T G C T G G C A C C A G A C G A T C G A T C C T A C A A  
A T C T C A G T A T C T G A A C A A T G G A C C A C A G C G G A T T G G C A G A  
A A G T A C A A G A A A G T G A G G T T C A T G G C T T A T A C C G A T G A A A  
C C T T C A A G A C T C G C G A A G C A A T C C A G C A C G A G A G C G G G A T  
T C T G G G A C C A C T G C T G T A C G G A G A A G T G G G G G A C A C C C T G  
C T G A T C A T T T T T A A G A A C C A G G C C A G C A G G C C T T A C A A T A  
T C T A T C C A C A T G G A A T T A C A G A T G T G C G C C C T C T G T A C A G  
C C G G A G A C T G C C A A A G G G C G T C A A A C A C C T G A A G G A C T T C  
C C A A T C C T G C C C G G G G A A A T T T T T A A G T A T A A A T G G A C T G  
T C A C C G T C G A G G A T G G C C C C A C T A A G A G C G A C C C T A G G T G 30  
C C T G A C C C G C T A C T A T T C T A G T T T C G T G A A T A T G G A A A G G  
G A T C T G G C C A G C G G A C T G A T C G G C C C A C T G C T G A T T T G T T  
A C A A A G A G A G C G T G G A T C A G A G A G G C A A C C A G A T C A T G T C  
C G A C A A G A G G A A T G T G A T T C T G T T C A G T G T C T T T G A C G A A  
A A C C G G T C A T G G T A T C T G A C C G A G A A C A T C C A G A G A T T C C  
T G C C T A A T C C A G C C G G A G T G C A G C T G G A A G A T C C T G A G T T  
T C A G G C T T C T A A C A T C A T G C A T A G T A T T A A T G G C T A C G T G  
T T C G A C A G T C T G C A G C T G T C A G T G T G T C T G C A C G A G G T C G  
C T T A C T G G T A T A T C C T G A G C A T T G G A G C A C A G A C A G A T T T  
C C T G A G C G T G T T C T T T T C C G G C T A C A C T T T T A A G C A T A A A 40  
A T G G T G T A T G A G G A C A C A C T G A C T C T G T T C C C C T T C A G C G  
G C G A A A C C G T G T T T A T G T C C A T G G A G A A T C C C G G G C T G T G  
G A T C C T G G G A T G C C A C A A C A G C G A T T T C A G G A A T C G C G G G  
A T G A C T G C C C T G C T G A A A G T G T C A A G C T G T G A C A A G A A C A  
C C G G A G A C T A C T A T G A A G A T T C A T A C G A G G A C A T C A G C G C  
A T A T C T G C T G T C C A A A A C A A T G C C A T T G A A C C C A G G T C T  
T T T A G T C A G A A T C C T C C A G T G C T G A A G C A C C A C C A G C G C G  
A G A T C A C C C G C A C T A C C C T G C A G A G T G A T C A G G A A G A G A T  
C G A C T A C G A C G A T A C A A T T T C T G T G G A A A T G A A G A A A G A G  
G A C T T C G A T A T C T A T G A C G A A G A T G A G A A C C A G A G T C C T C 50

GATCATTCCAGAAAGAAAACCCGGGCATTACTTTATTGCTGC  
AGTGGAGCGCCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCCCT  
CACGTGCTGCGAAATCGGGCCCCAGTCAAGGGAGCGTCCCA  
AGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGGATC  
CTTTACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGGCAC  
CTGGGGGCTGCTGGGACCCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGG  
ATAACATTATGGTCACTTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCC  
TTACAGTTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGAC  
CAGAGGCAGGGAGCAGAAACCAACGA AAAA ACTTCTGTGAAGC  
CTAATGAGACCAAAAACATACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCA  
TATGGCCCCCAACAAAAGACGAATTTCGATTGCAAGGCATGG  
GCCTATTTTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAAGGACGTCCACA  
GTGGCCCTGATCGGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAACAC  
CCTGAATCCCGCACACGGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGGAA  
TTCGCCCTGTCTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCT  
GGTACTTCACCGAAAAACATGGAGCGAAATTGCCGGGGCTCC  
ATGTAATATTTCAGATGGAAGACCCCCACATTTCAAGGAGAAC  
TACCGCTTTTCATGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTC  
TGCCCGGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGTG  
GTACCTGTGTGAGCATGGGGTCCAACGAGAAATATCCACTCA  
ATTCATTTTCAGCGGACACCGTGTTTACTGTCCCGGAAGAAAG  
AAGAGTATAAAAATGGCCCCGTGTACAACCTGTATCCCGGCGT  
GTTTCGAAACCGTTCGAGATGCTGCCCTAGCAAGGCAGGGATC  
TGGAGAGTGGAAATGCCCTGATTGGGGAGCACCTGTGATGCCG  
GAATGTCTACCCCTGTCTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTCA  
GACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATCCGGGGATTTTC  
CAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGGCCAGTGGGGCCCCCTA  
AGCTGGGCTAGACTGCACTATTCCGGGTCTATCAACGCTTTG  
GTCCACAAAAAGAGCCCTTTCTCTTTGGATTAAAGGTGGACCTG  
CTGGCACCAATGATCATTTTCATGGCATCAAAACTCAGGGGG  
CCAGGCAGAAAGTTCTCTCTCTGTACATCTCACAGTTTTAT  
CATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATAC  
CGCGGCAATAGCACAGGGGACTCTGATGGTGTCTTTTGGCA  
ACGTGGACAGTTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCC  
CCCTATCATTTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCCAACCCAT  
TATTCTATTTCGAAGTACACTGCGGATGGAACTGATGGGGT  
GCGATCTGAACAGTTGTTCGAATGCCCCCTGGGAATGGAGTC  
CAAGGCATCTCTGTACGCCCAAGATTACCGCTAGCTCCTAC  
TTCACTAATAATGTTTTGCTACCTGGAGCCCCCTCCAAGCAC  
GACTGCATCTGCAGGGGACGAAGCACAACGCATGGCGACCA  
GGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTTCGATTTTTCAG  
AAAACTATGAAGGTGACCGGAGTCAACAACCTCAGGGCGTGA  
AAAGTCTGTGTGACCTCAATGTACGTCAAGGAGTTCTCTGAT  
CTCTAGTTTCACAGGACGGGCCACCAAGTGGACACTGTCTTT  
CAGAACGGAAAGGTGAAGTCTTCCAGGGCAATCAGGATT  
CCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCT  
GACTCGCTACCTGCGAATCCACCCACAGTCCCTGGGTGCAT  
CAGATTGCACCTGAGAAATGGAAAGTCCCTGGGCTGCGAGGCC  
AGGACCTGTATTGA

10

20

30

40

50

コドン最適化された因子 cDNA、a k a C O / C O 3、アミノ酸 1 6 4 5 - 1 6 4 8  
が削除された変異体 i、デルタ 4 (配列番号: 3)

A T G C A G A T T T G A G C T G T C A A C T T T G C T T T T T C C T G T G C C T G C  
T G A G A T T T T T G T T T T T C C G C T A C T A G A A G A T A C T A C C T G G G  
G G C T G T G G A A C T G T C T T G G G A T T A C A T G C A G A G T G A C C T G  
G G A G A G C T G C C A G T G G A C G C A C G A T T T C C A C C T A G A G T C C  
C T A A A T C A T T C C C C T T C A A C A C C A G C G T G G T C T A T A A G A A  
A A C A C T G T T C G T G G A G T T T A C T G A T C A C C T G T T C A A C A T C  
G C T A A G C C T C G G C C A C C C T G G A T G G G A C T G C T G G G A C C A A  
C A A T C C A G G C A G A G G T G T A C G A C A C C G T G G T C A T T A C A C T 10  
G A A A A A C A T G G C C T C A C A C C C C G T G A G C C T G C A T G C T G T G  
G G C G T C A G C T A C T G G A A G G C T T C C G A A G G G G C A G A G T A T G  
A C G A T C A G A C T T C C C A G A G A G A A A A G A G G A C G A T A A G G T  
G T T T C C T G G C G G G T C T C A T A C C T A T G T G T G G C A G G T C C T G  
A A A G A G A A T G G C C C C A T G G C T T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
C C T A C T C T T A T C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A T C T  
G A A C A G C G G A C T G A T C G G A G C A C T G C T G G T G T G T A G G G A A  
G G G A G C C T G G C T A A G G A G A A A A C C C A G A C A C T G C A T A A G T  
T C A T T C T G C T G T T C G C C G T G T T T G A C G A A G G A A A A T C A T G  
G C A C A G C G A G A C A A A G A A T A G T C T G A T G C A G G A C C G G G A T 20  
G C C G C T T C A G C C A G A G C T T G G C C C A A A A T G C A C A C T G T G A  
A C G G C T A C G T C A A T C G C T C A C T G C C T G G A C T G A T C G G C T G  
C C A C C G A A A G A G C G T G T A T T G G C A T G T C A T C G G A A T G G G C  
A C C A C A C C T G A A G T G C A C T C C A T T T T C C T G G A G G G G C A T A  
C C T T T C T G G T C C G C A A C C A C C G A C A G G C C T C C C T G G A G A T  
C T C T C C A A T T A C C T T C C T G A C A G C T C A G A C T C T G C T G A T G  
G A T C T G G G A C A G T T C C T G C T G T T T T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A T G A T G G C A T G G A G G C C T A C G T G A A A G T G G A C A G  
C T G T C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G G A T G A A G A A C A A T G A G  
G A A G C T G A A G A C T A T G A C G A T G A C C T G A C C G A C T C C G A G A 30  
T G G A T G T G G T C C G A T T C G A T G A C G A T A A C A G C C C C T C C T T  
T A T C C A G A T T A G A T C T G T G G C C A A G A A A C A C C C T A A G A C A  
T G G G T C C A T T A C A T C G C A G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T  
A T G C A C C A C T G G T G C T G G C A C C A G A C G A T C G A T C C T A C A A  
A T C T C A G T A T C T G A A C A A T G G A C C A C A G C G G A T T G G C A G A  
A A G T A C A A G A A A G T G A G G T T C A T G G C T T A T A C C G A T G A A A  
C C T T C A A G A C T C G C G A A G C A A T C C A G C A C G A G A G C G G G A T  
T C T G G G A C C A C T G C T G T A C G G A G A A G T G G G G G A C A C C C T G  
C T G A T C A T T T T T A A G A A C C A G G C C A G C A G G C C T T A C A A T A 40  
T C T A T C C A C A T G G A A T T A C A G A T G T G C G C C C T C T G T A C A G  
C C G G A G A C T G C C A A A G G G C G T C A A A C A C C T G A A G G A C T T C  
C C A A T C C T G C C C G G G G A A A T T T T T A A G T A T A A A T G G A C T G  
T C A C C G T C G A G G A T G G C C C C A C T A A G A G C G A C C C T A G G T G  
C C T G A C C C G C T A C T A T T C T A G T T T C G T G A A T A T G G A A A G G  
G A T C T G G C C A G C G G A C T G A T C G G C C C A C T G C T G A T T T G T T  
A C A A A G A G A G C G T G G A T C A G A G A G G C A A C C A G A T C A T G T C  
C G A C A A G A G G A A T G T G A T T C T G T T C A G T G T C T T T G A C G A A  
A A C C G G T C A T G G T A T C T G A C C G A G A A C A T C C A G A G A T T C C  
T G C C T A A T C C A G C C G G A G T G C A G C T G G A A G A T C C T G A G T T 50  
T C A G G C T T C T A A C A T C A T G C A T A G T A T T A A T G G C T A C G T G

TTCGACAGTCTG CAGCTGT CAGTGTGTCTG CACGAGGTCG  
CTTACTGGTATATCCTGAGCATTGGAGCACAGACAGATTT  
CCTGAGCGTGTTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAAGCATAAA  
ATGGTGATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTTCAGCG  
GCGAAACCGTGTTTATGTCCATGGAGAAATCCCGGGCTGTG  
GATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTCAGGAATCGCGGG  
ATGACTGCCCTGCTGAAGAAGTGTCAAGCTGTGACAAGAAC  
CCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGC  
ATATCTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCT  
TTTAGTCAGAATCCTCCAGTGCTGAAGGAGATCACCCGCA  
CTACCCCTGCAGAGTGATCAGGAAGAGATCGACTACGACGA  
TACAATTTCTGTGGAATGAAGAAAGAGGACTTTCGATATC  
TATGACGAAGATGAGAACCCAGAGTCCCTCGATCATTCAGA  
AGAAAAACCCGGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCCT  
GTGGGATTATGGCATGTCCCTCTAGTCCCTCACGTGCTGCGA  
AATCGGGCCCCAGTCAAGGGAGCGTCCCAACAGTTTCAAGAAAG  
TGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGATCCTTTACTCAGCC  
ACTGTACCGGGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTG  
GGACCCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTTATGG  
TCACCTTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCTTACAGTTTTTTA  
TTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGA  
GCAGAACCCACGA AAAA AACTTCGTGAAGCCTAATGAGACCA  
AAACATACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCAAC  
AAAAAGACGAATTCGATTGCAAGGCATGGGCCCTATTTTTTCT  
GACGTGGATCTGGAGAAAGGACGTCCACAGTGGCCTGATCG  
GGCCACTGCTGGTGTCATCTAACACCCTGAATCCCGC  
ACACGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGGAATTGCCCCGTGTTCT  
TTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGGTACTTTCACCG  
AAAAACATGGAGCGAAATTGCGGGGCTCCATGTAAATATTC  
GATGGAAGACCCCAACATTCAAGGAGAACTACCGCTTTTCAT  
GCCATCAATGGGTATATTTATGGATACTCTGCCCGGACTGG  
TCATGGCTCAGGACCAGAGAAATCAGGTGGTACCTGCTGAG  
CATGGGGTCCAAACGAGAAATATCCACTCAATTTTCAGC  
GGACACGTGTTTACTGTCCGGGAAGAAAGAGAGTATAAAA  
TGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGGCCTGTTTCGA AACCGT  
CGAGATGCTGCCCTAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGGAA  
TGCCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGGAATGTCTACCC  
TGTTTTCTGGTGTAAGTAATAAGTGTCAAGACACCCCTGGG  
GATGGCTTCCGGACATATCCGGGGATTTCAGATTACCGCA  
TCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTTAAGCTGGCTAGAC  
TGCACTATTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGA  
GCCTTTCTCTTGGATTAAAGGTGGACCTGCTGGCACCAATG  
ATCATTTCATGGCATCAAAAACCTCAGGGGGGCCAGGCAGAAAGT  
TCTCCTCTCTGTACATCTCACAGTTTTATCATCATGTACAG  
CCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGGCAATAGC  
ACAGGGGACTCTGATGGTGTTCTTTGGCAACGTGGACAGTT  
CAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCCCCCTATCATTTGC  
TAGATACATCAGGCTGCACCCCAACCCATTATTCTATTTCGA  
AGTACACTGCGGATGGAACCTGATGGGGTGCGATCTGAACA  
GTTGTTCAATGCCCCCTGGGAATGGAGTCCAAAGGC AATCTC

T G A C G C C C A G A T T A C C G C T A G C T C C T A C T T C A C T A A T A T G  
T T T G C T A C C T G G A G C C C C T C C A A A G C A C G A C T G C A T C T G C  
A G G G A C G A A G C A A C G C A T G G C G A C C A C A G G T G A A C A A T C C  
C A A G G A G T G G C T G C A G G T C G A T T T T C A G A A A A C T A T G A A G  
G T G A C C G G A G T C A C A A C T C A G G G C G T G A A A A G T C T G C T G A  
C C T C A A T G T A C G T C A A G G A G T T C C T G A T C T C T A G T T C A C A  
G G A C G G C C A C C A G T G G A C A C T G T T C T T T C A G A A C G G A A A G  
G T G A A A G T C T T C C A G G G C A A T C A G G A T T C C T T T A C A C C T G  
T G G T C A A C T C T C T G G A C C C A C C C C T G C T G A C T C G C T A C C T  
G C G A A T C C A C C C A C A G T C C T G G G T G C A T C A G A T T G C A C T G  
A G A A T G G A A G T C C T G G G C T G C G A G G C C C A G G A C C T G T A T T  
G A

10

コドン最適化された因子VIIII cDNA、aka CO/CO3、アミノ酸1645  
が削除された変異体、デルタ1645 (配列番号：4)

A T G C A G A T T G A G C T G T C A A C T T G C T T T T T C C T G T G C C T G C  
T G A G A T T T T G T T T T T C C G C T A C T A G A A G A T A C T A C C T G G G  
G G C T G T G G A A C T G T C T T G G G A T T A C A T G C A G A G T G A C C T G  
G G A G A G C T G C C A G T G G A C G C A C G A T T T C C A C C T A G A G T C C  
C T A A A T C A T T C C C C T T C A A C A C C A G C G T G G T C T A T A A G A A  
A A C A C T G T T C G T G G A G T T T A C T G A T C A C C T G T T C A A C A T C  
G C T A A G C C T C G G C C A C C C T G G A T G G G A C T G C T G G G A C C A A  
C A A T C C A G G C A G A G G T G T A C G A C A C C G T G G T C A T T A C A C T  
G A A A A A C A T G G C C T C A C A C C C C G T G A G C C T G C A T G C T G T G  
G G C G T C A G C T A C T G G A A G G C T T C C G A A G G G G C A G A G T A T G  
A C G A T C A G A C T T C C C A G A G A G A A A A A G A G G A C G A T A A G G T  
G T T T C C T G G C G G G T C T C A T A C C T A T G T G T G G C A G G T C C T G  
A A A G A G A A T G G C C C C A T G G C T T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
C C T A C T C T T A T C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A T C T  
G A A C A G C G G A C T G A T C G G A G C A C T G C T G G T G T G T A G G G A A  
G G G A G C C T G G C T A A G G A G A A A A C C C A G A C A C T G C A T A A G T  
T C A T T C T G C T G T T C G C C G T G T T T G A C G A A G G A A A A T C A T G  
G C A C A G C G A G A C A A A G A A T A G T C T G A T G C A G G A C C G G G A T  
G C C G C T T C A G C C A G A G C T T G G C C C A A A A T G C A C A C T G T G A  
A C G G C T A C G T C A A T C G C T C A C T G C C T G G A C T G A T C G G C T G  
C C A C C G A A A G A G C G T G T A T T G G C A T G T C A T C G G A A T G G G C  
A C C A C A C C T G A A G T G C A C T C C A T T T T C C T G G A G G G G C A T A  
C C T T T C T G G T C C G C A A C C A C C G A C A G G C C T C C C T G G A G A T  
C T C T C C A A T T A C C T T C C T G A C A G C T C A G A C T C T G C T G A T G  
G A T C T G G G A C A G T T C C T G C T G T T T T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A T G A T G G C A T G G A G G C C T A C G T G A A A G T G G A C A G  
C T G T C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G G A T G A A G A A C A A T G A G  
G A A G C T G A A G A C T A T G A C G A T G A C C T G A C C G A C T C C G A G A  
T G G A T G T G G T C C G A T T C G A T G A C G A T A A C A G C C C C T C C T T  
T A T C C A G A T T A G A T C T G T G G C C A A G A A A C A C C C T A A G A C A  
T G G G T C C A T T A C A T C G C A G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T  
A T G C A C C A C T G G T G C T G G C A C C A G A C G A T C G A T C C T A C A A  
A T C T C A G T A T C T G A A C A A T G G A C C A C A G C G G A T T G G C A G A  
A A G T A C A A G A A A G T G A G G T T C A T G G C T T A T A C C G A T G A A A  
C C T T C A A G A C T C G C G A A G C A A T C C A G C A C G A G A G C G G G A T  
T C T G G G A C C A C T G C T G T A C G G A G A A G T G G G G G A C A C C C T G

20

30

40

50



CTGATCATTTTAAAGAAACCAGGCCAGCAGGCCCTTACAATA  
TCTATCCACATGGAATTACAGATGTGCGCCCTCTGTACAG  
CCGGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTC  
CCAATCCTGCCCGGGGAATTTTAAAGTATAAATGGACTG  
TCACCGTCTGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGACCCCTAGGTG  
CCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTTCGTGAATATGGAAAGG  
GATCTGGCCAGCGGACTGATCGGCCCACTGCTGATTTGT  
ACAAAGAGAGCGGTGGATCAGAGAGGCCAACCCAGATCATGTC  
CGACAAGAGGAATGTGATTCTGTTCAGTGTCTTTGACGAA  
AACCGGTTCATGGTATCTGACCGAGAAACATCCAGAGATTCC  
TGCCTAATCCAGCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTT  
TCAGGCTTCTAACATCATGCTAGTATTAAATGGCTACGTG  
TTCGACAGTCTGCAGCTGTCTAGTGTGTCTGCACGAGGTG  
CTTACTGGTATATCCTGAGCATTTGGAGCACAGACAGATTT  
CCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAAGCATAAA  
ATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTTCAGCG  
GCGAAACCGTGTATTATGTCCATGGAGAATCCCGGGCTGTG  
GATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGG  
ATGACTGCCCTGTGTAAGGTGTCAAGCTGTGACAAGAAC  
CCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGC  
ATATCTGTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCT  
TTTAGTCAGAATCCTCCAGTGTGTAAGCACCCAGCGCGAGA  
TCACCCGCACTACCTGTGAGAGTGATCAGGAAGAGATCGA  
CTACGACGATACAATTTCTGTGGAAATGAAGAAAGAGGGAC  
TTCGATATCTATGACGAAGATGAGAAACCAGAGTCTCTGAT  
CATTCAGAAAGAAACCCGGCATTTACTTTATTGCTGCAGT  
GGAGCGCCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCTCTCAC  
GTGCTGCGAAATCGGGGCCAGTCAAGGGAGCGTCCCACAGT  
TCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGATCCTT  
TACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCACCTG  
GGGCTGTGTGGGACCCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATA  
ACATTTATGGTCACTTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCCTTA  
CAGTTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCCAG  
AGGCAGGGAGCAGAAACCACGAAAAAACTTCGTGAAGCCTA  
ATGAGACCAAAACATACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCATAT  
GGCCCCAACAAAAGACGAATTCGATTGCAAGGCATGGGCC  
TATTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAAGGACGTCCACAGTG  
GCCTGATCGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAACACCCCT  
GAATCCCGCACACGGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGGAATTC  
GCCCTGTCTTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGT  
ACTTCACCGAAAAACATGGAGCGAAAAATTGCCGGGGCTCCATG  
TAATATTTCAGATGGAAGACCCCACTTCAAGGAGAACTAC  
CGCTTTTCATGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTCTGC  
CCGGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAAATCAGGTGGTA  
CCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAAATATCCACTCAATT  
CATTTTCAGCGGACACGTGTTTACTGTCCGGAAAGAAAGAG  
AGTATAAAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGGCGTGT  
CGAAACCGTCTGAGATGCTGCCTAGCAAGGCAGGGATCTGG  
AGAGTGGAAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAA  
TGTCTACCCCTGTCTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTACAGC

ACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATCCGGGATTTTCCAG  
ATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTTAAGC  
TGGCTAGACTGCACCTATTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTC  
CACAAAAGAGCCCTTTCTCTTGGATTAAAGGTGGACCTGCTG  
GCACCAATGATCATTTCATGGCATCAAAAACCTCAGGGGGCCA  
GGCAGAAAGTTCTCTCTCTCTGTACATCTCACAGTTTATCAT  
CATGTACAGCCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGC  
GGCAATAGCACAGGGACTCTGATGGTGTCTTTGGCAACG  
TGGACAGTTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCCCCC  
TATCATTTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCCAACCCATTAT  
TCTATTTGGAAGTACACTGCGGATGGAACCTGATGGGGTGCG  
ATCTGAACAGTTTGTTC AATGCCCTGGGAATGGAGTCCAA  
GGCAATCTCTGACGCCCAGATTACCGCTAGCTCCTACTTC  
ACTAATATGTTTTGCTACCTGGAGCCCCCTCCAAGCACGAC  
TGCATCTGACAGGGACGAAGCACAACGCATGGCGACCAACAGGT  
GAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTCGATTTTTCAGAAA  
ACTATGAAGGTGACCGGAGTCAACAACCTCAGGGCGTGAAAA  
GTCTGTGCTGACCTCAATGTACGTCAAGGAGTTCTCTGATCTC  
TAGTTTCACAGGACGGCCACCAAGTGGACACTGTCTTTTCAG  
AACGGGAAGAGGTGAAAGTCTTCCAGGGCAATCAGGATTCTCT  
TTACACCTGTGTGCTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGAC  
TCGCTACCTGCGAATCCACCCACAGTCTTGGGTGCATCAG  
ATTGCACCTGAGAAATGGAAGTCTTGGGCTGCGAGGCCCCAGG  
ACCTGTATTGA

10

20

コドン最適化された因子VII cDNA、aka CO/CO3、アミノ酸1645  
及び1646が削除された変異体、デルタ2（配列番号：5）

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTTGCTTTTTCCTGTG CCTGC  
TGAGATTTTGT TTTTCCGCTACTAGAAAGATACTACCTGGG  
GGCTGTGGAACCTGTCTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTG  
GGAGAGCTGCCAGTGGACGCAACGATTTCCACCTAGAGTCC  
CTAAATCATTTCCCCCTTCAACACCAAGCGTGGTCTATAAGAA  
AACACTGTTCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTC AACATC  
GCTAAGCCCTCGGCCACCCCTGGATGGGACTGCTGGGGACCAA  
CAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCAATTACACT  
GAAAAACATGGCCCTCACACCCCGTGAGCCCTGCATGCTGTG  
GGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATG  
ACGATCAGACTTCCCAAGAGAAAGAGAGGACGATAAGGT  
GTTTCTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGTCTCTG  
AAAGAGAAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCCTCTGTGCTCTGA  
CCTACTCTTTATCTGTGAGTCAAGTGGACCTGGTCAAGGATCT  
GAACAGCGGACTGATCGGAGCAGCTGGTGTGTAGGGAA  
GGGAGCCTGGCTAAGGAGAAACCCAGACACTGCATAAGT  
TCATTTCTGCTGTTCGCCGTGTTTGTACGAAGGAAATCATG  
GCACAGCGAGACAAAAGAAATAGTCTGATGCAGGACCGGGAT  
GCCGCTTTCAGCCAGAGCTTGGCCCAA AATGCACACTGTGA  
ACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCCTGGACTGATCGGCTG  
CCACCGAAAGAGCGGTGTATTGGCATGTCTCGGAATGGGC  
ACCACACCTGAAGTGCACCTCCATTTTCTCTGGAGGGGCATA  
CCTTTCTGCTCCGCAACCCACCGACAGGCCTCCCTGGAGAT  
CTCTCCAATTACCTTCTCTGACAGCTCAGACTCTGCTGATG

30

40

50

G A T C T G G G A C A G T T C C T G C T G T T T T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A T G A T G G C A T G G A G G C C T A C G T G A A A G T G G A C A G  
C T G T C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G G A T G A A G A A C A A T G A G  
G A A G C T G A A G A C T A T G A C G A T G A C C T G A C C G A C T C C G A G A  
T G G A T G T G G T C C G A T T C G A T G A C G A T A A C A G C C C C T C C T T  
T A T C C A G A T T A G A T C T G T G G C C A A G A A A C A C C C T A A G A C A  
T G G G T C C A T T A C A T C G C A G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T  
A T G C A C C A C T G G T G C T G G C A C C A G A C G A T C G A T C C T A C A A  
A T C T C A G T A T C T G A A C A A T G G A C C A C A G C G G A T T G G C A G A  
A A G T A C A A G A A A G T G A G G T T C A T G G C T T A T A C C G A T G A A A  
C C T T C A A G A C T C G C G A A G C A A T C C A G C A C G A G A G C G G G A T  
T C T G G G A C C A C T G C T G T A C G G A G A A G T G G G G G A C A C C C T G  
C T G A T C A T T T T T A A G A A C C A G G C C A G C A G G C C T T A C A A T A  
T C T A T C C A C A T G G A A T T A C A G A T G T G C G C C C T C T G T A C A G  
C C G G A G A C T G C C A A A G G G C G T C A A A C A C C T G A A G G A C T T C  
C C A A T C C T G C C C G G G G A A A T T T T T A A G T A T A A A T G G A C T G  
T C A C C G T C G A G G A T G G C C C C A C T A A G A G C G A C C C T A G G T G  
C C T G A C C C G C T A C T A T T C T A G T T T C G T G A A T A T G G A A A G G  
G A T C T G G C C A G C G G A C T G A T C G G C C C A C T G C T G A T T T T G T T  
A C A A A G A G A G C G T G G A T C A G A G A G G C A A C C A G A T C A T G T C  
C G A C A A G A G G A A T G T G A T T C T G T T C A G T G T C T T T G A C G A A  
A A C C G G T C A T G G T A T C T G A C C G A G A A C A T C C A G A G A T T C C  
T G C C T A A T C C A G C C G G A G T G C A G C T G G A A G A T C C T G A G T T  
T C A G G C T T C T A A C A T C A T G C A T A G T A T T A A T G G C T A C G T G  
T T C G A C A G T C T G C A G C T G T C A G T G T G T C T G C A C G A G G T C G  
C T T A C T G G T A T A T C C T G A G C A T T G G A G C A C A G A C A G A T T T  
C C T G A G C G T G T T C T T T T C C G G C T A C A C T T T T A A G C A T A A A  
A T G G T G T A T G A G G A C A C A C T G A C T C T G T T C C C C T T C A G C G  
G C G A A A C C G T G T T T A T G T C C A T G G A G A A T C C C G G G C T G T G  
G A T C C T G G G A T G C C A C A A C A G C G A T T T C A G G A A T C G C G G G  
A T G A C T G C C C T G C T G A A A G T G T C A A G C T G T G A C A A G A A C A  
C C G G A G A C T A C T A T G A A G A T T C A T A C G A G G A C A T C A G C G C  
A T A T C T G C T G T C C A A A A C A A T G C C A T T G A A C C C A G G T C T  
T T T A G T C A G A A T C C T C C A G T G C T G A A G C A G C G C G A G A T C A  
C C C G C A C T A C C C T G C A G A G T G A T C A G G A A G A G A T C G A C T A  
C G A C G A T A C A A T T T C T G T G G A A A T G A A G A A A G A G G A C T T C  
G A T A T C T A T G A C G A A G A T G A G A A C C A G A G T C C T C G A T C A T  
T C C A G A A G A A A A C C C G G C A T T A C T T T A T T G C T G C A G T G G A  
G C G C C T G T G G G A T T A T G G C A T G T C C T C T A G T C C T C A C G T G  
C T G C G A A A T C G G G C C C A G T C A G G G A G C G T C C C A C A G T T C A  
A G A A A G T G G T C T T C C A G G A G T T T A C A G A C G G A T C C T T T A C  
T C A G C C A C T G T A C C G G G G C G A A C T G A A C G A G C A C C T G G G G  
C T G C T G G G A C C C T A T A T C A G A G C T G A A G T G G A G G A T A A C A  
T T A T G G T C A C C T T C A G A A A T C A G G C A T C T A G G C C T T A C A G  
T T T T T A T T C A A G C C T G A T C T C T T A C G A A G A G G A C C A G A G G  
C A G G G A G C A G A A C C A C G A A A A A A C T T C G T G A A G C C T A A T G  
A G A C C A A A A C A T A C T T T T G G A A G G T G C A G C A C C A T A T G G C  
C C C A A C A A A A G A C G A A T T C G A T T G C A A G G C A T G G G C C T A T  
T T T T C T G A C G T G G A T C T G G A G A A G G A C G T C C A C A G T G G C C  
T G A T C G G G C C A C T G C T G G T G T G T C A T A C T A A C A C C C T G A A

T C C C G C A C A C G G C A G G C A G G T C A C T G T C C A G G A A T T C G C C  
 C T G T T C T T T A C C A T C T T T G A T G A G A C A A A A G C T G G T A C T  
 T C A C C G A A A A C A T G G A G C G A A A T T G C C G G G C T C C A T G T A A  
 T A T T C A G A T G G A A G A C C C C A C A T T C A A G G A G A A C T A C C G C  
 T T T C A T G C C A T C A A T G G G T A T A T T A T G G A T A C T C T G C C C G  
 G A C T G G T C A T G G C T C A G G A C C A G A G A A T C A G G T G G T A C C T  
 G C T G A G C A T G G G G T C C A A C G A G A A T A T C C A C T C A A T T C A T  
 T T C A G C G G A C A C G T G T T T A C T G T C C G G A A G A A A G A A G A G T  
 A T A A A A T G G C C C T G T A C A A C C T G T A T C C C G G C G T G T T C G A  
 A A C C G T C G A G A T G C T G C C T A G C A A G G C A G G G A T C T G G A G A  
 G T G G A A T G C C T G A T T G G G G A G C A C C T G C A T G C C G G A A T G T  
 C T A C C C T G T T T C T G G T G T A C A G T A A T A A G T G T C A G A C A C C  
 C C T G G G G A T G G C T T C C G G A C A T A T C C G G G A T T T C C A G A T T  
 A C C G C A T C T G G A C A G T A C G G C C A G T G G G C C C C T A A G C T G G  
 C T A G A C T G C A C T A T T C C G G G T C T A T C A A C G C T T G G T C C A C  
 A A A A G A G C C T T T C T C T T G G A T T A A G G T G G A C C T G C T G G C A  
 C C A A T G A T C A T T C A T G G C A T C A A A A C T C A G G G G G C C A G G C  
 A G A A G T T C T C C T C T C T G T A C A T C T C A C A G T T T A T C A T C A T  
 G T A C A G C C T G G A T G G C A A G A A A T G G C A G A C A T A C C G C G G C  
 A A T A G C A C A G G G A C T C T G A T G G T G T T C T T T G G C A A C G T G G  
 A C A G T T C A G G G A T C A A G C A C A A C A T T T T C A A T C C C C C T A T  
 C A T T G C T A G A T A C A T C A G G C T G C A C C C A A C C C A T T A T T C T  
 A T T C G A A G T A C A C T G C G G A T G G A A C T G A T G G G G T G C G A T C  
 T G A A C A G T T G T T C A A T G C C C C T G G G A A T G G A G T C C A A G G C  
 A A T C T C T G A C G C C C A G A T T A C C G C T A G C T C C T A C T T C A C T  
 A A T A T G T T T G C T A C C T G G A G C C C C T C C A A A G C A C G A C T G C  
 A T C T G C A G G G A C G A A G C A A C G C A T G G C G A C C A C A G G T G A A  
 C A A T C C C A A G G A G T G G C T G C A G G T C G A T T T T C A G A A A A C T  
 A T G A A G G T G A C C G G A G T C A C A A C T C A G G G C G T G A A A A G T C  
 T G C T G A C C T C A A T G T A C G T C A A G G A G T T C C T G A T C T C T A G  
 T T C A C A G G A C G G C C A C C A G T G G A C A C T G T T C T T T C A G A A C  
 G G A A A G G T G A A A G T C T T C C A G G G C A A T C A G G A T T C C T T T A  
 C A C C T G T G G T C A A C T C T C T G G A C C C A C C C C T G C T G A C T C G  
 C T A C C T G C G A A T C C A C C C A C A G T C C T G G G T G C A T C A G A T T  
 G C A C T G A G A A T G G A A G T C C T G G G C T G C G A G G C C C A G G A C C  
 T G T A T T G A

コドン最適化された因子VIIII cDNA、aka CO/CO3、アミノ酸1645  
- 1647が削除された、デルタ3（配列番号：6）

A T G C A G A T T G A G C T G T C A A C T T G C T T T T T C C T G T G C C T G C  
 T G A G A T T T T G T T T T T C C G C T A C T A G A A G A T A C T A C C T G G G  
 G G C T G T G G A A C T G T C T T G G G A T T A C A T G C A G A G T G A C C T G  
 G G A G A G C T G C C A G T G G A C G C A C G A T T T C C A C C T A G A G T C C  
 C T A A A T C A T T C C C C T T C A A C A C C A G C G T G G T C T A T A A G A A  
 A A C A C T G T T C G T G G A G T T T A C T G A T C A C C T G T T C A A C A T C  
 G C T A A G C C T C G G C C A C C C T G G A T G G G A C T G C T G G G A C C A A  
 C A A T C C A G G C A G A G G T G T A C G A C A C C G T G G T C A T T A C A C T  
 G A A A A A C A T G G C C T C A C A C C C C G T G A G C C T G C A T G C T G T G  
 G G C G T C A G C T A C T G G A A G G C T T C C G A A G G G G C A G A G T A T G  
 A C G A T C A G A C T T C C C A G A G A G A A A A A G A G G A C G A T A A G G T

G T T T C C T G G C G G G T C T C A T A C C T A T G T G T G G C A G G T C C T G  
A A A G A G A A T G G C C C C A T G G C T T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
C C T A C T C T T A T C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A T C T  
G A A C A G C G G A C T G A T C G G A G C A C T G C T G G T G T G T A G G G A A  
G G G A G C C T G G C T A A G G A G A A A A C C C A G A C A C T G C A T A A G T  
T C A T T C T G C T G T T C G C C G T G T T T G A C G A A G G A A A A T C A T G  
G C A C A G C G A G A C A A A G A A T A G T C T G A T G C A G G A C C G G G A T  
G C C G C T T C A G C C A G A G C T T G G C C C A A A A T G C A C A C T G T G A  
A C G G C T A C G T C A A T C G C T C A C T G C C T G G A C T G A T C G G C T G  
C C A C C G A A A G A G C G T G T A T T G G C A T G T C A T C G G A A T G G G C 10  
A C C A C A C C T G A A G T G C A C T C C A T T T T C C T G G A G G G G C A T A  
C C T T T C T G G T C C G C A A C C A C C G A C A G G C C T C C C T G G A G A T  
C T C T C C A A T T A C C T T C C T G A C A G C T C A G A C T C T G C T G A T G  
G A T C T G G G A C A G T T C C T G C T G T T T T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A T G A T G G C A T G G A G G C C T A C G T G A A A G T G G A C A G  
C T G T C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G G A T G A A G A A C A A T G A G  
G A A G C T G A A G A C T A T G A C G A T G A C C T G A C C G A C T C C G A G A  
T G G A T G T G G T C C G A T T C G A T G A C G A T A A C A G C C C C T C C T T  
T A T C C A G A T T A G A T C T G T G G C C A A G A A A C A C C C T A A G A C A  
T G G G T C C A T T A C A T C G C A G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T 20  
A T G C A C C A C T G G T G C T G G C A C C A G A C G A T C G A T C C T A C A A  
A T C T C A G T A T C T G A A C A A T G G A C C A C A G C G G A T T G G C A G A  
A A G T A C A A G A A A G T G A G G T T C A T G G C T T A T A C C G A T G A A A  
C C T T C A A G A C T C G C G A A G C A A T C C A G C A C G A G A G C G G G A T  
T C T G G G A C C A C T G C T G T A C G G A G A A G T G G G G G A C A C C C T G  
C T G A T C A T T T T T A A G A A C C A G G C C A G C A G G C C T T A C A A T A  
T C T A T C C A C A T G G A A T T A C A G A T G T G C G C C C T C T G T A C A G  
C C G G A G A C T G C C A A A G G G C G T C A A A C A C C T G A A G G A C T T C  
C C A A T C C T G C C C G G G G A A A T T T T T A A G T A T A A A T G G A C T G  
T C A C C G T C G A G G A T G G C C C C A C T A A G A G C G A C C C T A G G T G 30  
C C T G A C C C G C T A C T A T T C T A G T T T C G T G A A T A T G G A A A G G  
G A T C T G G C C A G C G G A C T G A T C G G C C C A C T G C T G A T T T G T T  
A C A A A G A G A G C G T G G A T C A G A G A G G C A A C C A G A T C A T G T C  
C G A C A A G A G G A A T G T G A T T C T G T T C A G T G T C T T T G A C G A A  
A A C C G G T C A T G G T A T C T G A C C G A G A A C A T C C A G A G A T T C C  
T G C C T A A T C C A G C C G G A G T G C A G C T G G A A G A T C C T G A G T T  
T C A G G C T T C T A A C A T C A T G C A T A G T A T T A A T G G C T A C G T G  
T T C G A C A G T C T G C A G C T G T C A G T G T G T C T G C A C G A G G T C G  
C T T A C T G G T A T A T C C T G A G C A T T G G A G C A C A G A C A G A T T T  
C C T G A G C G T G T T C T T T T C C G G C T A C A C T T T T A A G C A T A A A 40  
A T G G T G T A T G A G G A C A C A C T G A C T C T G T T C C C C T T C A G C G  
G C G A A A C C G T G T T T A T G T C C A T G G A G A A T C C C G G G C T G T G  
G A T C C T G G G A T G C C A C A A C A G C G A T T T C A G G A A T C G C G G G  
A T G A C T G C C C T G C T G A A A G T G T C A A G C T G T G A C A A G A A C A  
C C G G A G A C T A C T A T G A A G A T T C A T A C G A G G A C A T C A G C G C  
A T A T C T G C T G T C C A A A A C A A T G C C A T T G A A C C C A G G T C T  
T T T A G T C A G A A T C C T C C A G T G C T G A A G C G C G A G A T C A C C C  
G C A C T A C C C T G C A G A G T G A T C A G G A A G A G A T C G A C T A C G A  
C G A T A C A A T T T C T G T G G A A A T G A A G A A A G A G G A C T T C G A T  
A T C T A T G A C G A A G A T G A G A A C C A G A G T C C T C G A T C A T T C C 50

AGAAAGAAACCCGGGCATTACTTTATTGCTGCGAGTGGAGCG  
CCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCTCTCACGTGCTG  
CGAAATCGGGCCCCAGTCCAGGGAGCGTCCCCACAGTTCAAGA  
AAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGATCCTTTACTCA  
GCCACTGTACCGGGGCGAACTGAAACGAGCACCTGGGGGCTG  
CTGGGACCCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTA  
TGGTCACTTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCCTTACAGTTT  
TTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCGAG  
GGAGCAGAACCCACGA AAAA AACTTCGTGAAGCCTAATGAGA  
CCAAAACATACTTTTGGAAAGGTGCGAGCACCATATGGCCCC  
AACAAAAGACGAATTTCGATTGCAAGGCATGGGGCCTATTTT  
TCTGACGTGGATCTGGAGAAAGGACGTCCACAGTGGCCTGA  
TCGGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAACACCCTGAATCC  
CGCACACGGCGAGGCGAGGTCACTGTCCAGGAATTTCGCCCTG  
TTCTTTTACCATCTTTTGATGAGACAAAAAGCTGGTACTTCA  
CCGAAAACATGGAGCGAAATTGCGGGGCTCCATGTAATAT  
TCAGATGGAAGACCCCCACATTTCAAGGAGAACTACCGCTTT  
CATGCCATCAATGGGTATATTTATGGATACTCTGCCCGGAC  
TGGTCAATGGCTCAGGACCAGAGAAATCAGGTGGTACCTGCT  
GAGCATGGGGTCCAAACGAGAAATATCCACTCAATTTCATTTC  
AGCGGACACGTGTTTACTGTCCGGAAGAAAGAGAGTATA  
AAATGGCCCCGTGTACAACCTGTATCCCGGCGTGTTTCGAAAC  
CGTCGAGATGCTGCCCTAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTG  
GAATGCTGTATTGGGGAGCACCTGCGATGCCGGGAATGTCTA  
CCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGAGACACCCCT  
GGGGATGGCTTCCCGGACATATCCGGGATTTTCCAGATTACC  
GCATCTGGACAGTACGGGCCAGTGGGGCCCCCTAAGCTGGCTA  
GACTGCACTATTCCGGGTCTATCAACGCTTTGGTCCACAAA  
AGAGCCTTTCTCTTTGGATTAAAGGTGGACCTGCTGGCACCA  
ATGATCATTTCAATGGCATCAAAAACCTCAGGGGGGCCAGGCAGA  
AGTTCTCTCTCTCTGTACATCTCACAGTTTATCATCATGTA  
CAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGGCAAT  
AGCACAGGGGACTCTGATGGTGTCTTTGGCAACGTGGACA  
GTTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCCCCCTATCAT  
TGCTAGATACATCAGGCTGCAACCCCAACCCATTATTCTATT  
CGAAGTACACTGCGGATGGAACTGATGGGGTGC GATCTGA  
ACAGTTGTTCAATGCCCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAAT  
CTCTGACGCCCCAGATTACCGCTAGCTCCTACTTCACTAAT  
ATGTTTGTCTACCTGGAGCCCCCTCCAAGCACGACTGCATC  
TGCAAGGGACGAAGCACAACGCATGGCGACCCACAGGTGAACAA  
TCCCAAGGAGTGGCTGCGAGGTGCGATTTTTCAGAAAACATAG  
AAGGTGACCGGAGTCAACAACCTCAGGGCGGTGAAAAGTCTGC  
TGACCTCAATGTACGTCAAGGAGTTCTCTGATCTCTAGTTTC  
ACAGGACGGGCCACCCAGTGGACACTGTCTTTTCAGAAACGGA  
AAGGTGAAAAGTCTTCCAGGGCAATCAGGATTCTTTTACAC  
CTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACTCGCTA  
CCTGCGAATCCACCCACAGTCCCTGGGTGCGATCAGATTGCA  
CTGAGAAATGGAAGTCTCTGGGCTGCGAGGGCCCCAGGACCTGT  
ATTGA

コドン最適化されたFVII cDNA、akacO/CO3、アミノ酸1648が

削除された変異体、デルタ1648 (配列番号：7)

A T G C A G A T T T G A G C T G T C A A C T T T G C T T T T T C C T G T G C C T G C  
T G A G A T T T T T G T T T T T C C G C T A C T A G A A G A T A C T A C C T G G G  
G G C T G T G G A A C T G T C T T G G G A T T A C A T G C A G A G T G A C C T G  
G G A G A G C T G C C A G T G G A C G C A C G A T T T C C A C C T A G A G T C C  
C T A A A T C A T T C C C C T T C A A C A C C A G C G T G G T C T A T A A G A A  
A A C A C T G T T C G T G G A G T T T A C T G A T C A C C T G T T C A A C A T C  
G C T A A G C C T C G G C C A C C C T G G A T G G G A C T G C T G G G A C C A A  
C A A T C C A G G C A G A G G T G T A C G A C A C C G T G G T C A T T A C A C T  
G A A A A A C A T G G C C T C A C A C C C C G T G A G C C T G C A T G C T G T G 10  
G G C G T C A G C T A C T G G A A G G C T T C C G A A G G G G C A G A G T A T G  
A C G A T C A G A C T T C C C A G A G A G A A A A G A G G A C G A T A A G G T  
G T T T C C T G G C G G G T C T C A T A C C T A T G T G T G G C A G G T C C T G  
A A A G A G A A T G G C C C C A T G G C T T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
C C T A C T C T T A T C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A T C T  
G A A C A G C G G A C T G A T C G G A G C A C T G C T G G T G T G T A G G G A A  
G G G A G C C T G G C T A A G G A G A A A A C C C A G A C A C T G C A T A A G T  
T C A T T C T G C T G T T C G C C G T G T T T G A C G A A G G A A A A T C A T G  
G C A C A G C G A G A C A A A G A A T A G T C T G A T G C A G G A C C G G G A T 20  
G C C G C T T C A G C C A G A G C T T G G C C C A A A A T G C A C A C T G T G A  
A C G G C T A C G T C A A T C G C T C A C T G C C T G G A C T G A T C G G C T G  
C C A C C G A A A G A G C G T G T A T T G G C A T G T C A T C G G A A T G G G C  
A C C A C A C C T G A A G T G C A C T C C A T T T T C C T G G A G G G G C A T A  
C C T T T T C T G G T C C G C A A C C A C C G A C A G G C C T C C C T G G A G A T  
C T C T C C A A T T A C C T T C C T G A C A G C T C A G A C T C T G C T G A T G  
G A T C T G G G A C A G T T C C T G C T G T T T T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A T G A T G G C A T G G A G G C C T A C G T G A A A G T G G A C A G  
C T G T C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G G A T G A A G A A C A A T G A G  
G A A G C T G A A G A C T A T G A C G A T G A C C T G A C C G A C T C C G A G A 30  
T G G A T G T G G T C C G A T T C G A T G A C G A T A A C A G C C C C T C C T T  
T A T C C A G A T T A G A T C T G T G G C C A A G A A A C A C C C T A A G A C A  
T G G G T C C A T T A C A T C G C A G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T  
A T G C A C C A C T G G T G C T G G C A C C A G A C G A T C G A T C C T A C A A  
A T C T C A G T A T C T G A A C A A T G G A C C A C A G C G G A T T G G C A G A  
A A G T A C A A G A A A G T G A G G T T C A T G G C T T A T A C C G A T G A A A  
C C T T C A A G A C T C G C G A A G C A A T C C A G C A C G A G A G C G G G A T  
T C T G G G A C C A C T G C T G T A C G G A G A A G T G G G G G A C A C C C T G  
C T G A T C A T T T T T T A A G A A C C A G G C C A G C A G G C C T T A C A A T A 40  
T C T A T C C A C A T G G A A T T A C A G A T G T G C G C C C T C T G T A C A G  
C C G G A G A C T G C C A A A G G G C G T C A A A C A C C T G A A G G A C T T C  
C C A A T C C T G C C C G G G G A A A T T T T T A A G T A T A A A T G G A C T G  
T C A C C G T C G A G G A T G G C C C C A C T A A G A G C G A C C C T A G G T G  
C C T G A C C C G C T A C T A T T C T A G T T T C G T G A A T A T G G A A A G G  
G A T C T G G C C A G C G G A C T G A T C G G C C C A C T G C T G A T T T G T T  
A C A A A G A G A G C G T G G A T C A G A G A G G C A A C C A G A T C A T G T C  
C G A C A A G A G G A A T G T G A T T C T G T T C A G T G T C T T T G A C G A A  
A A C C G G T C A T G G T A T C T G A C C G A G A A C A T C C A G A G A T T C C  
T G C C T A A T C C A G C C G G A G T G C A G C T G G A A G A T C C T G A G T T  
T C A G G C T T C T A A C A T C A T G C A T A G T A T T A A T G G C T A C G T G 50  
T T C G A C A G T C T G C A G C T G T C A G T G T G T C T G C A C G A G G T C G

CTTACTGGTATATCCTGAGCATTTGGAGCACAGACAGATTT  
CCTGAGCGTGTTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAAGCATAAA  
ATGGTGATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCCCTTCAGCG  
GCGAAACCGTGTTTATGTCCATGGAGAATCCCGGGGCTGTG  
GATCCTGGGATGCCACAAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGG  
ATGACTGCCCTGCTGAAAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACAA  
CCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGGACATCAGCGC  
ATATCTGCTGTGCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCT  
TTTAGTCAGAATCCTCCAGTGTCTGAAGAGGGCACCAAGGAGA  
TCACCCCGCACTACCCCTGCAGAGTGTATCAGGAAGAGATCGA  
CTACGACGATACAATTTCTGTGGAAATGAAGAAAAGAGGGAC  
TTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAAGAGTCCCTCGAT  
CATTCCAGAAAGAAAACCCGGGCATTACTTTATTGCTGCAGT  
GGAGCGCCTGTGGGATTATGGGCATGTCCCTCTAGTCCCTCAC  
GTGCTGCGAAATCGGGGCCAGTTCAGGGAGCGTCCCAACAGT  
TCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGATCCTT  
TACTCAGCCACTGTACC GGGGCGAACTGAACGAGCACCTG  
GGGCTGCTGGGACCCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGGATA  
ACATTTATGGTCAACCTTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCCTTA  
CAGTTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGGACCAG  
AGGCAGGGAGCGAGAACCAACGA AAAA ACTTCTGTGAAGCCTA  
ATGAGACC AAAACATACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCATAT  
GGCCCCAACAAAAGACGAATTCGATTGCAAGGCATGGGGCC  
TATTTTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAAGGACGTCCACAGTG  
GCCTGATCGGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAACACCCCT  
GAATCCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGGAATTCT  
GCCCTGTCTCTTTACCATCTTTTGATGAGACAAAAAGCTGGT  
ACTTCAACCGAA AACATGGAGCGGA AATTGCCGGGGCTCCATG  
TAATATTTCAGATGGAAAGACCCCACTTCAAGGAGAACTAC  
CGCTTTTCATGCCATCAATGGGTATATTTATGGATACTCTGC  
CCGGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAAATCAGGTGGTA  
CCTGCTGAGCATGGGGGTCCAACGAGAAATATCCACTCAATT  
CATTTTCAGCGGGACACGTGTTTACTGTCCGGGAAGAAAGAA  
AGTATAAAAATGGCCCTGTACAAACCTGTATCCCGGCGTGT  
CGAAACCGTTCGAGATGCTGCCTAGCAAGGCAGGGATCTGG  
AGAGTGGAAATGCCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAA  
TGTCTACCCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTTCAGAC  
ACCCCTGGGGATGGCTTCCGGGACATATCCGGGGATTTCCAG  
ATTACCGCATCTGGACAGTACGGGCCAGTGGGGCCCCCTAAGC  
TGGCTAGACTGCACCTATTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCT  
CACAAAAGAGCCCTTTCTCTTTGGATTAAAGGTGGACCTGCTG  
GCACCAATGATCATTTCAATGGCATCAAAAACCTCAGGGGGCCA  
GGCAGAAAGTTCTCTCTCTCTGTACATCTCACAGTTTTATCAT  
CATGTACAGCCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGC  
GGCAATAGCACAGGGGACTCTGTATGGTGTCTTTGGCAACG  
TGGACAGTTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCCCCC  
TATCATTTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCCAACCCATTAT  
TCTATTTCAAGTACACTGCGGATGGAACTGATGGGGGTGCG  
ATCTGAACAGTTGTTC AATGCCCCCTGGGAATGGAGTCCAA  
GGCAATCTCTGACGCCCAAGATTACCGCTAGCTCCTACTTC



A C T A A T A T G T T T G C T A C C T G G A G C C C C T C C A A A G C A C G A C  
 T G C A T C T G C A G G G A C G A A G C A A C G C A T G G C G A C C A C A G G T  
 G A A C A A T C C C A A G G A G T G G C T G C A G G T C G A T T T T C A G A A A  
 A C T A T G A A G G T G A C C G G A G T C A C A A C T C A G G G C G T G A A A A  
 G T C T G C T G A C C T C A A T G T A C G T C A A G G A G T T C C T G A T C T C  
 T A G T T C A C A G G A C G G C C A C C A G T G G A C A C T G T T C T T T C A G  
 A A C G G A A A G G T G A A A G T C T T C C A G G G C A A T C A G G A T T C C T  
 T T A C A C C T G T G G T C A A C T C T C T G G A C C C A C C C C T G C T G A C  
 T C G C T A C C T G C G A A T C C A C C C A C A G T C C T G G G T G C A T C A G  
 A T T G C A C T G A G A A T G G A A G T C C T G G G C T G C G A G G C C C A G G  
 A C C T G T A T T G A

10

4 個のヌクレオチド変異を有する TTR プロモーター (TTRm)、配列番号：8

G T C T G T C T G C A C A T T T T C G T A G A G C G A G T G T T C C G A T A C T C  
 T A A T C T C C C T A G G C A A G G T T C A T A T T G A C T T A G G T T A C T T  
 A T T C T C C T T T T G T T G A C T A A G T C A A T A A T C A G A A T C A G C A  
 G G T T T G G A G T C A G C T T G G C A G G G A T C A G C A G C C T G G G T T G  
 G A A G G A G G G G G T A T A A A A G C C C C T T C A C C A G G A G A A G C C G  
 T C A C A C A G A T C C A C A A G C T C C T

【0231】

20

4 個のヌクレオチド変異を有する TTR プロモーター、合成イントロン、コドン最適化された因子 V I I I cDNA 及びポリアデニル化 (ポリA) シグナル配列を含む完全長の因子 V I I I 構築物の DNA 塩基配列が提供される (配列番号：9)。また、配列番号 9 において強調されているのは、4 個のアミノ酸の P A C E / フーリン切断部位をコードするコドンであり、ここでは 1 個、2 個、3 個又は 4 個のアミノ酸すべてが任意に削除される。

4 つのヌクレオチド変異を有する TTR プロモーター (TTRm)、合成イントロン、コドン最適化された因子 V I I I cDNA (P A C E / フーリンがカギ括弧内に示される)、ポリAを含む全長構築物 (配列番号：9)

G T C T G T C T G C A C A T T T T C G T A G A G C G A G T G T T C C G A T A C T C  
 T A A T C T C C C T A G G C A A G G T T C A T A T T g a c t T A G G T T A C T T  
 A T T C T C C T T T T G T T G A C T A A G T C A A T A A T C A G A A T C A G C A  
 G G T T T G G A G T C A G C T T G G C A G G G A T C A G C A G C C T G G G T T G  
 G A A G G A G G G G G T A T A A A A G C C C C T T C A C C A G G A G A A G C C G  
 T C A C A C A G A T C C A C A A G C T C C T G C T A G C A G G T A A G T G C C G  
 T G T G T G G T T C C C G C G G G C C T G G C C T C T T T A C G G G T T A T G G  
 C C C T T G C G T G C C T T G A A T T A C T G A C A C T G A C A T C C A C T T T  
 T T C T T T T T C T C C A C A G G T T T A A A C G C C A C C A T G C A G A T T G  
 A G C T G T C A A C T T G C T T T T T C C T G T G C C T G C T G A G A T T T T G  
 T T T T T C C G C T A C T A G A A G A T A C T A C C T G G G G G C T G T G G A A  
 C T G T C T T G G G A T T A C A T G C A G A G T G A C C T G G G A G A G C T G C  
 C A G T G G A C G C A C G A T T T C C A C C T A G A G T C C C T A A A T C A T T  
 C C C C T T C A A C A C C A G C G T G G T C T A T A A G A A A A C A C T G T T C  
 G T G G A G T T T A C T G A T C A C C T G T T C A A C A T C G C T A A G C C T C  
 G G C C A C C C T G G A T G G G A C T G C T G G G A C C A A C A A T C C A G G C  
 A G A G G T G T A C G A C A C C G T G G T C A T T A C A C T G A A A A A C A T G  
 G C C T C A C A C C C C G T G A G C C T G C A T G C T G T G G G C G T C A G C T  
 A C T G G A A G G C T T C C G A A G G G G C A G A G T A T G A C G A T C A G A C  
 T T C C C A G A G A G A A A A A G A G G A C G A T A A G G T G T T T C C T G G C

30

40

50

GGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGTCCTTGAAAGAGGAATG  
GCCCCATGGCTTCCGACCCCTCTGTGCCTGACCTACTCTTA  
TCTGAGTCAACGTGGACCTGGTCAAGGATCTGAACAGCGGA  
CTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGG  
CTAAGGAGAAACCCAGACACTGTCATAAGTTTCATTTCTGCT  
GTTTCGCCGTGTTTGTACGAAGGAATAATCATGGCACAGCGAG  
ACAAAGGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTTCAG  
CCAGAGCTTGGGCCCAAATGCAACACTGTGAACGGCTACGT  
CAATCGCTCACTGCCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAG  
AGCGTGTATTGGCATGTTCATCGGAATGGGCACCCACACCTG  
AAGTGCACCTCCATTTTCTCTGGAGGGGCAACCTTTCTGGT  
CCGCAACCCACCGACAGGCCCTCCCTGGAGATCTCTCCAATT  
ACCTTCTCTGACAGCTCAGACTCTGCTGATGGATCTGGGAC  
AGTTTCTCTGCTGTTTGTGCCACATCAGCTCCCAACCAAGCATGA  
TGGCATGGAGGCCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAG  
GAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAAGCTGAAG  
ACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGT  
CCGATTCGATGACGATAACAGCCCCCTCCTTTATCCAGATT  
AGATCTGTGGCCAAAGAAACACCCCTAAGACATGGGTCCATT  
ACATCGCAGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTATGCACCACT  
GGTGTGGCACCCAGACGATCGATCCTACAAATCTCAGTAT  
CTGAACAATGGACCCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGA  
AAGTGAGGTTTCATGGCTTATACCGATGAAACCTTCAAGAC  
TCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGATTCTGGGGACCA  
CTGCTGTACGGAGAAAGTGGGGGACACCCCTGCTGATCATTT  
TTAAGAAACCAGGCCAGCAGGCCCTTACAAATATCTATCCACA  
TGGAAATTACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGGAGACTG  
CCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAATCCTGC  
CCGGGGGAATTTTTTAAGTATAAATGGACTGTCAACCGTCTGA  
GGATGGCCCCACTAAGAGCGACCCCTAGGTGCCCTGACCCGC  
TACTATTCTAGTTTTCGTGAATATGGAAAGGGATCTGGCCA  
GCGGACTGATCGGGCCCACTGCTGATTTGTTACAAAGAGAG  
CGTGGATCAGAGAGGCAACCCAGATCATGTCCGACAAAGAGG  
AATGTGATTCTGTTCAGTGTCTTTGACGAATAACCGGTCTAT  
GGTATCTGACCGAGAAACATCCAGAGATTCTCTGCCTAATCC  
AGCCGGAGTGCAGCTGGAAAGATCCTGAGTTTTCAGGCTTCT  
AACATCATGCATAGTATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCT  
TGCAGCTGTCTAGTGTGTCTGCACGAGGTCTGCTTACTGGTA  
TATCCTGAGCATTTGGAGCACAGACAGATTTCTCTGAGCGTG  
TTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAAGCATAAATGGTGTATG  
AGGACACACTGACTCTGTTTCCCTTTCAGCGGCGAAACCGT  
GTTTATGTCCATGGAGAAATCCCGGGCTGTGGATCCTGGGA  
TGCCACAACAGCGATTTCAGGAATCGCGGGGATGACTGCC  
TGCTGAAAGTGTCAAGCTGTGACAAGAAACACCGGAGACTA  
CTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGCATATCTGCTG  
TCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTATGTCAGA  
ATCCTCCAGTGTCTGAAG「AGGCACCAAGCGC」GAGATCACCC  
CGCACTACCCCTGCAGAGTGTATCAGGAAGAGATCGACTACG  
ACGATACAATTTCTGTGGAAATGAAGAAAGAGGACTTCGA  
TATCTATGACGAAGATGAGAACCAAGAGTCTCTGATCATTC

C A G A A G A A A A C C C G G C A T T A C T T T A T T G C T G C A G T G G A G C  
G C C T G T G G G A T T A T G G C A T G T C C T C T A G T C C T C A C G T G C T  
G C G A A A T C G G G C C C A G T C A G G G A G C G T C C C A C A G T T C A A G  
A A A G T G G T C T T C C A G G A G T T T A C A G A C G G A T C C T T T A C T C  
A G C C A C T G T A C C G G G G C G A A C T G A A C G A G C A C C T G G G G C T  
G C T G G G A C C C T A T A T C A G A G C T G A A G T G G A G G A T A A C A T T  
A T G G T C A C C T T C A G A A A T C A G G C A T C T A G G C C T T A C A G T T  
T T T A T T C A A G C C T G A T C T C T T A C G A A G A G G A C C A G A G G C A  
G G G A G C A G A A C C A C G A A A A A A C T T C G T G A A G C C T A A T G A G  
A C C A A A A C A T A C T T T T G G A A G G T G C A G C A C C A T A T G G C C C  
C A A C A A A A G A C G A A T T C G A T T G C A A G G C A T G G G C C T A T T T  
T T C T G A C G T G G A T C T G G A G A A G G A C G T C C A C A G T G G C C T G  
A T C G G G C C A C T G C T G G T G T G T C A T A C T A A C A C C C T G A A T C  
C C G C A C A C G G C A G G C A G G T C A C T G T C C A G G A A T T C G C C C T  
G T T C T T T A C C A T C T T T G A T G A G A C A A A A A G C T G G T A C T T C  
A C C G A A A A C A T G G A G C G A A A T T G C C G G G C T C C A T G T A A T A  
T T C A G A T G G A A G A C C C C A C A T T C A A G G A G A A C T A C C G C T T  
T C A T G C C A T C A A T G G G T A T A T T A T G G A T A C T C T G C C C G G A  
C T G G T C A T G G C T C A G G A C C A G A G A A T C A G G T G G T A C C T G C  
T G A G C A T G G G G T C C A A C G A G A A T A T C C A C T C A A T T C A T T T  
C A G C G G A C A C G T G T T T A C T G T C C G G A A G A A A G A A G A G T A T  
A A A A T G G C C C T G T A C A A C C T G T A T C C C G G C G T G T T C G A A A  
C C G T C G A G A T G C T G C C T A G C A A G G C A G G G A T C T G G A G A G T  
G G A A T G C C T G A T T G G G G A G C A C C T G C A T G C C G G A A T G T C T  
A C C C T G T T T C T G G T G T A C A G T A A T A A G T G T C A G A C A C C C C  
T G G G G A T G G C T T C C G G A C A T A T C C G G G A T T T C C A G A T T A C  
C G C A T C T G G A C A G T A C G G C C A G T G G G C C C C T A A G C T G G C T  
A G A C T G C A C T A T T C C G G G T C T A T C A A C G C T T G G T C C A C A A  
A A G A G C C T T T C T C T T G G A T T A A G G T G G A C C T G C T G G C A C C  
A A T G A T C A T T C A T G G C A T C A A A A C T C A G G G G G C C A G G C A G  
A A G T T C T C C T C T C T G T A C A T C T C A C A G T T T A T C A T C A T G T  
A C A G C C T G G A T G G C A A G A A A T G G C A G A C A T A C C G C G G C A A  
T A G C A C A G G G A C T C T G A T G G T G T T C T T T G G C A A C G T G G A C  
A G T T C A G G G A T C A A G C A C A A C A T T T T C A A T C C C C C T A T C A  
T T G C T A G A T A C A T C A G G C T G C A C C C A A C C C A T T A T T C T A T  
T C G A A G T A C A C T G C G G A T G G A A C T G A T G G G G T G C G A T C T G  
A A C A G T T G T T C A A T G C C C C T G G G A A T G G A G T C C A A G G C A A  
T C T C T G A C G C C C A G A T T A C C G C T A G C T C C T A C T T C A C T A A  
T A T G T T T G C T A C C T G G A G C C C C T C C A A A G C A C G A C T G C A T  
C T G C A G G G A C G A A G C A A C G C A T G G C G A C C A C A G G T G A A C A  
A T C C C A A G G A G T G G C T G C A G G T C G A T T T T C A G A A A A C T A T  
G A A G G T G A C C G G A G T C A C A A C T C A G G G C G T G A A A A G T C T G  
C T G A C C T C A A T G T A C G T C A A G G A G T T C C T G A T C T C T A G T T  
C A C A G G A C G G C C A C C A G T G G A C A C T G T T C T T T C A G A A C G G  
A A A G G T G A A A G T C T T C C A G G G C A A T C A G G A T T C C T T T A C A  
C C T G T G G T C A A C T C T C T G G A C C C A C C C C T G C T G A C T C G C T  
A C C T G C G A A T C C A C C C A C A G T C C T G G G T G C A T C A G A T T G C  
A C T G A G A A T G G A A G T C C T G G G C T G C G A G G C C C A G G A C C T G  
T A T T G A G C G G C C G C A A T A A A A G A T C A G A G C T C T A G A G A T C  
T G T G T G T T G G T T T T T T G T G T

10

20

30

40

50

コドン最適化された因子V I I I cDNA、a k a C O 1 (配列番号：10)

A T G C A G A T C G A G C T G T C T A C C T G C T T C T T C C T G T G C C T G C  
T G C G G T T C T G C T T C A G C G C C A C C A G A C G G T A C T A T C T G G G  
C G C C G T G G A A C T G A G C T G G G A C T A C A T G C A G A G C G A C C T G  
G G C G A G C T G C C C G T G G A T G C C A G A T T C C C T C C A A G A G T G C  
C C A A G A G C T T C C C C T T C A A C A C C T C C G T G G T G T A C A A G A A  
A A C C C T G T T C G T G G A A T T C A C C G A C C A C C T G T T C A A T A T C  
G C C A A G C C C A G A C C C C C C T G G A T G G G C C T G C T G G G A C C T A  
C A A T T C A G G C C G A G G T G T A C G A C A C C G T C G T G A T C A C C C T 10  
G A A G A A C A T G G C C A G C C A C C C C G T G T C T C T G C A T G C C G T G  
G G A G T G T C C T A C T G G A A G G C C T C T G A G G G C G C C G A G T A C G  
A C G A T C A G A C C A G C C A G C G C G A G A A A G A G G A C G A C A A G G T  
G T T C C C T G G C G G C A G C C A C A C C T A C G T G T G G C A G G T G C T G  
A A A G A A A A C G G C C C C A T G G C C T C C G A C C C T C T G T G C C T G A  
C A T A C A G C T A C C T G A G C C A C G T G G A C C T C G T G A A G G A C C T  
G A A C A G C G G C C T G A T C G G A G C C C T G C T C G T G T G T A G A G A G  
G G C A G C C T G G C C A A A G A G A A A A C C C A G A C C C T G C A C A A G T  
T C A T C C T G C T G T T C G C C G T G T T C G A C G A G G G C A A G A G C T G  
G C A C A G C G A G A C A A A G A A C A G C C T G A T G C A G G A C C G G G A C 20  
G C C G C C T C T G C T A G A G C C T G G C C C A A A A T G C A C A C C G T G A  
A C G G C T A C G T G A A C A G A A G C C T G C C C G G A C T G A T C G G C T G  
C C A C C G G A A G T C T G T G T A C T G G C A C G T G A T C G G C A T G G G C  
A C C A C C C C T G A G G T G C A C A G C A T C T T T C T G G A A G G A C A C A  
C C T T T C T C G T G C G G A A C C A C C G G C A G G C C A G C C T G G A A A T  
C A G C C C T A T C A C C T T C C T G A C C G C C C A G A C A C T G C T G A T G  
G A C C T G G G C C A G T T T C T G C T G T T C T G C C A C A T C A G C T C C C  
A C C A G C A C G A C G G C A T G G A A G C C T A C G T G A A G G T G G A C A G  
C T G C C C C G A G G A A C C C C A G C T G C G G A T G A A G A A C A A C G A G  
G A A G C C G A G G A C T A C G A C G A C G A C C T G A C C G A C A G C G A G A 30  
T G G A C G T G G T G C G C T T C G A C G A C G A T A A C A G C C C C A G C T T  
C A T C C A G A T C A G A A G C G T G G C C A A G A A A G C A C C C C A A G A C C  
T G G G T G C A C T A T A T C G C C G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A T T  
A C G C C C C T C T G G T G C T G G C C C C C G A C G A C A G A A G C T A C A A  
G A G C C A G T A C C T G A A C A A T G G C C C C C A G C G G A T C G G C C G G  
A A G T A T A A G A A A G T G C G G T T C A T G G C C T A C A C C G A C G A G A  
C A T T C A A G A C C A G A G A G G C C A T C C A G C A C G A G A G C G G C A T  
C C T G G G C C C T C T G C T G T A T G G C G A A G T G G G C G A C A C C C T G  
C T G A T C A T C T T C A A G A A C C A G G C C A G C A G A C C C T A C A A C A  
T C T A C C C T C A C G G C A T C A C C G A C G T G C G G C C C C T G T A C T C 40  
T A G A A G G C T G C C C A A G G G C G T G A A A C A C C T G A A G G A C T T C  
C C C A T C C T G C C C G G C G A G A T C T T C A A G T A C A A G T G G A C C G  
T G A C C G T G G A A G A T G G C C C C A C C A A G A G C G A C C C C A G A T G  
C C T G A C A C G G T A C T A C A G C A G C T T C G T G A A C A T G G A A C G G  
G A C C T G G C C T C C G G C C T G A T T G G C C C A C T G C T G A T C T G C T  
A C A A A G A A A G C G T G G A C C A G C G G G G C A A C C A G A T C A T G A G  
C G A C A A G C G G A A C G T G A T C C T G T T T A G C G T G T T C G A T G A G  
A A C C G G T C C T G G T A T C T G A C C G A G A A T A T C C A G C G G T T C C  
T G C C C A A C C C T G C C G G C G T G C A G C T G G A A G A T C C T G A G T T 50  
C C A G G C C T C C A A C A T C A T G C A C T C C A T C A A T G G C T A T G T G

TTCGACAGCCTG CAGCTGAGCGTG TGCCTG CACGAGGTGG  
CCTACTGGTACATCCTGAGCATCGGGGCC CAGACCGACTT  
CCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGCTACACCTTCAAGCACAAAG  
ATGGTGTA C GAGGATACCCCTGACCCCTGTTCCCTTTAGCG  
GCGAAACCGTGTTTCATGAGCATGGAA AACC CCGGCCTGTG  
GATCCTGGGCTG CCAACAAGCGAGCTTCCGGGAACAGAGGC  
ATGACC G C C C T G C T G A A G G T G T C C A G C T G C G A C A A G A A C A  
CCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGC  
CTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGGCC CAGAAAGC  
TTCAGCCAGAAAC C C C C C C G T G C T G A A G C G G C A C C A G A G A G  
AGATCACCCGGACCAACCCTG CAGTCCGACCAAGGAAGAGAT  
CGATTACGACGACACCATCAGCGTGGA AATGAAGAAAGAA  
GATTTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAAACCAGAGCCCCC  
GGTCCCTTTTCAGAA A A A G A C C C G G C A C T A C T T C A T T G C C G C  
TGTGGAACGGCTGTGGGACTACGGGCATGAGCAGCAGCCCT  
CACGTGCTGAGAAACAGGGGCC CAGAGCGGCAGCGTGCCCC  
AGTTCAAGAAAGTG GTGTTC CAGGAATTCACAGACGGCAG  
CTTCACCCAGCCTCTGTACC GCGGGCGAGCTGAATGAGCAC  
CTGGGACTGCTGGG C C C C T A T A T C A G A G C C G A A G T G G A A G  
ATAACATCATGGTCA CCTTCCGGGAATCAGGCCCTCCCGGCC  
CTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGGAC  
CAGAGACAGGGCGCTGAGCCCCGGGAAGAACTTCGTGAAGC  
CCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCA  
CATGGCCCCCTACAAAGGACGAGTTTCGACTGC AAGGCCCTGG  
GCCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAA AAGGACGTGC ACT  
CTGGGCTGATCGGCC C C C C T G C T C G T G T G C C A C A C C A A C A C  
CCTGAATCCCGCCCCACGGCAGACAAGTGACAGTG CAGGAA  
TTCGCCCTGTTCCTTCA C C A T C T T C G A C G A A A C A A A G A G C T  
GGTACTTTCACCGAA A A C A T G G A A A G A A A C T G C C G G G C T C C  
CTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCA CCTTCA AAGAGAA C  
TACC GGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACAC  
TGCCCCGGCCCTCGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATCCGGGTG  
GTATCTGCTGTCCATGGGCTCCCAACGAGAAACATCCACAGC  
ATCCACTTTCAGCGGGCCACGTGTTCACCGGTGCGGGA A A A A A G  
AAGAGTACAA A A TGGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGT  
GTTTCGAGACAGTGGA AATGCTGCCCCAGCAAGGCCGGCATC  
TGGCGGGGTGGA AATGTCTGATCGGGCGAGCATCTGCACGCTG  
GGATGAGCACACTGTTTCTGGTGTA CAGCAACAAGTGCCA  
GACACCTCTGGG C A T G G C C T C T G G C C A C A T C C G G G A C T T T  
CAGATCACAGCCAGCGGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCA  
AACTGGGCCAGACTGC ACTACAGCGGCAGCATCAACGCCCTG  
GTCCACCA A A G A G C C C T T C A G C T G G A T C A A G G T G G A C C T G  
CTGGCTCCCATGATCATCCACGGGAATCAAGACC CAGGGCG  
CCAGACAGAAAGTTTCAGCAGCCCTGTACATCAGCCAGTTTCA  
CATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAAGTGGCAGACCTAC  
CGGGGGCAATAGCACCCGGCACCCCTGATGGTGTTCTTTCGGCA  
ACGTGGACTCCAGCGGGCATTAAGCACACAACATCTTCAACCC  
CCCCATCATTTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCC CACCCAC  
TACAGCATCCGGTCCACCCCTGAGAAATGGA ACTGATGGGCT  
GCGACCTGA A C T C C T G C A G C A T G C C C C T G G G G A T G G A A A G

C A A G G C C A T C T C C G A C G C C C A G A T C A C C G C C T C C A G C T A C  
T T C A C C A A C A T G T T C G C C A C C T G G T C C C C A T C C A A G G C C C  
G G C T G C A T C T G C A G G G C A G A A G C A A T G C T T G G A G G C C C C A  
A G T G A A C A A C C C C C A A A G A A T G G C T G C A G G T G G A C T T C C A G  
A A A A C C A T G A A A G T G A C C G G C G T G A C C A C C C A G G G C G T G A  
A G T C T C T G C T G A C C T C T A T G T A C G T G A A A G A G T T C C T G A T  
C T C C A G C A G C C A G G A C G G C C A C C A G T G G A C C C T G T T T T T C  
C A G A A C G G C A A A G T G A A A G T G T T T C A G G G G A A C C A G G A C T  
C C T T C A C C C C C G T C G T G A A T A G C C T G G A C C C T C C A C T G C T  
G A C C A G A T A C C T G C G G A T C C A C C C T C A G A G T T G G G T G C A C  
C A G A T T G C T C T G C G G A T G G A A G T G C T G G G A T G C G A G G C C C  
A G G A C C T G T A C T G A

10

コドン最適化された因子VIIII cDNA、aka CO2 (配列番号: 11)

A T G C A G A T C G A G C T G T C T A C C T G C T T C T T C C T G T G C C T G C  
T G C G G T T C T G C T T T A G C G C T A C T A G A C G C T A C T A C C T G G G  
C G C C G T G G A A C T G A G C T G G G A C T A T A T G C A G T C A G A C C T G  
G G C G A G C T G C C C G T G G A C G C T A G A T T C C C A C C T A G A G T G C  
C T A A G A G C T T C C C C T T T A A C A C C T C C G T G G T C T A T A A G A A  
A A C C C T G T T C G T C G A G T T C A C C G A T C A C C T G T T T A A T A T C  
G C T A A G C C T A G A C C C C C C T G G A T G G G C C T G C T G G G C C C T A  
C T A T T C A G G C C G A G G T C T A C G A C A C C G T C G T G A T C A C C C T  
G A A G A A T A T G G C T A G T C A C C C C G T C A G C C T G C A C G C C G T G  
G G C G T C A G C T A C T G G A A G G C T A G C G A G G G C G C C G A G T A C G  
A C G A T C A G A C T A G T C A G C G C G A G A A A G A G G A C G A C A A A G T  
C T T T C C T G G C G G C T C T C A C A C C T A C G T G T G G C A G G T C C T G  
A A A G A A A A C G G C C C T A T G G C T A G C G A C C C C C T G T G C C T G A  
C C T A T A G C T A C C T G A G T C A C G T G G A C C T G G T C A A G G A C C T  
G A A T A G C G G C C T G A T C G G C G C C C T G C T C G T G T G T A G A G A G  
G G C T C A C T G G C T A A A G A G A A A A C T C A G A C C C T G C A C A A G T  
T T A T C C T G C T G T T C G C C G T G T T C G A C G A G G G C A A G A G C T G  
G C A C T C A G A G A C T A A G A A T A G C C T G A T G C A G G A T A G G G A C  
G C C G C T A G C G C T A G A G C C T G G C C T A A G A T G C A C A C C G T G A  
A C G G C T A C G T G A A C A G A T C A C T G C C C G G A C T G A T C G G C T G  
T C A C C G G A A G T C C G T C T A C T G G C A C G T G A T C G G A A T G G G C  
A C T A C C C C C G A G G T G C A C T C T A T C T T T C T G G A A G G C C A C A  
C C T T C C T C G T C A G A A A T C A C C G G C A G G C T A G C C T C G A G A T  
T A G C C C T A T C A C C T T C C T G A C C G C T C A G A C A C T G C T G A T G  
G A C C T G G G C C A G T T C C T G C T G T T T T G T C A C A T T A G C T C T C  
A C C A G C A C G A C G G G A T G G A A G C C T A C G T G A A A G T G G A T A G  
C T G C C C C G A G G A A C C T C A G C T G A G A A T G A A G A A C A A C G A G  
G A A G C C G A G G A T T A C G A C G A C G A C C T G A C C G A T A G C G A G A  
T G G A C G T C G T C A G A T T C G A C G A C G A T A A C T C A C C T A G C T T  
T A T T C A G A T T A G A T C A G T G G C T A A G A A G C A C C C T A A G A C C  
T G G G T G C A C T A T A T C G C C G C C G A G G A A G A G G A C T G G G A C T  
A C G C C C C T C T G G T G C T G G C C C C G A C G A T A G A A G C T A T A A  
G T C T C A G T A C C T G A A C A A C G G C C C T C A G C G G A T C G G C C G G  
A A G T A T A A G A A A G T G C G G T T T A T G G C C T A C A C C G A C G A A A  
C C T T C A A G A C T A G A G A G G C T A T T C A G C A C G A G T C A G G G A T  
C C T G G G C C C C C T G C T C T A C G G C G A A G T G G G C G A C A C C C T G  
C T G A T T A T C T T T A A G A A T C A G G C T A G T A G G C C C T A T A A T A

20

30

40

50

TCTACCCCCACGGAATCACCGACGTGCGGCCCTCTACTC  
TAGACGGCTGCCTAAGGGCGTGAAAGCACCTGAAGGACTTC  
CCTATTCTGCCCCGGCGAGATCTTTAAGTACAAGTGGACCG  
TGACCGGTCGAGGACGGGCCCTACTAAGTCCGACCCCTCGGGTG  
CCTGACTAGGTACTACTCTAGCTTTCGTGAATATGGAACGG  
GACCTGGCTAGCGGGA CTGATTGGGCCCTCTGCTGATCTGCT  
ACAAAGAATCAGTGGATCAGCGGGGGCAATCAGATTATGAG  
CGATAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGTGTGTTTGAACGAG  
AATAGGTCCTGGTATCTGACCGAGAAATATCCAGCGGGTTCC  
TGCCTAACCCCTGCCGGCGGTGCAGCTGGAAGATCCCAGATT  
TCAGGCTAGCAATATTATGCACCTCTATTAAACGGATACGTG  
TTCGATAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAGGTGG  
CCTACTGGTATATCCTGTCTATCGGGCGCTCAGACCCGACTT  
CCTGAGCGTGTTCCTTTAGCGGGCTACACCTTTAAGCACAAAG  
ATGGTCTACGAGGATACCCCTGACCCCTGTTCCTTTAGCG  
GCGAAACCGTGTTCATGTCTATGGA AAAACCCCGGCCCTGTG  
GATCCTGGGGTGTCAACAATAGCGACTTTAGGAATAGAGGA  
ATGACCGGCCCTGCTGAAAGTGTCTAGCTGCGATAAGAAACA  
CCGGCGACTATTACGAGGACTCTTACGAGGATATTAGCGC  
CTACCTGCTGTCTAAGAAACAACGCTATCGAGCCTAGAAAGC  
TTCAGTCAAGAACCCCCCGGTGCTGAAGCGGCCACCAGAGAG  
AGATCACTAGAACTACCCCTGCAGAGCGACCCAGGAAGAGAT  
CGACTACGACGACACTATTAGCGTTCGAGATGAAGAAAGAG  
GATTTTCGATATCTACGACGAGGACGAGAAACCAGTCACTTA  
GATCCTTCCAGAAAGAA AACTAGGCACCTACTTTATTGCCGC  
CGTCGAGCGGGCTGTGGGACTACGGAATGAGTTCTAGCCCT  
CACGTGCTGAGAAATAGGGCTCAGTCAAGGCTCAGTGCCCTC  
AGTTCAAGAAAGTGGTGTTC CAGGAATTCAACCGACGGCAG  
CTTCACTCAGCCCCCTCTATAGGGGCGAGCTGAACGAGCAC  
CTGGGACTGCTGGGACCTTATATTAGAGCCGAAAGTCGAGG  
ACAAATATTATGGTCACTTTTAGGAACCAGGCCCTCTAGGCC  
CTACAGCTTCTACTCTAGCCCTGATCAGCTACGAGGAAAGAT  
CAGCGGCAGGGGGGCCGAACCTAGAAAGAACTTCTGTGAAGC  
CTAACGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAAGCACCA  
CATGGCCCCCTACTAAGGACGAGTTTCGACTGTAAAGCCTGG  
GCCTACTTTAGCGACGTGGACCTCGAGAAAGGACGTGCACT  
CAGGGCTGATCGGACCTCTGCTCGTCTGTCACTAAACAC  
CCTGAACCCCGCTCACGGCCCGGCAGGTCAACAGTGCAGGAA  
TTCGCCCTGTTCCTTCACTATCTTTCGACGAAACTAAGAGCT  
GGTACTTTCACAGAGAAATATGGAAGAAACTGTAGGGCCCC  
CTGTAATATTCAAGATGGAAGATCCTACCTTTAAAGAGAAC  
TATAGGTTTTCACGCTATTAAACGGCTATATTATGGACACCC  
TGCCCCGGCCCTCGGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATTAGGTG  
GTATCTGCTGTCTATGGGCTCTAACGAGAAATATTCACTCT  
ATTCACCTTTAGCGGCCACGTGTTCACCGTCCGGAAGAAAG  
AAGAGTATAAGATGGCCCTCTATAACCTCTACCCCGGCCGT  
GTTTCGAGACAGTGGAAATGCTGCCCTAGTAAAGCCGGGAATC  
TGGCGGGGTCGAGTGTCTGATCGGGCGAGCACCTCCACGCCG  
GAATGAGCACCCCTGTTCCTGGTCTACTCTAAACAAGTGTCA  
GACCCCTCTGGGAATGGCTAGCGGCCACATTAGAGACTTT

C A G A T C A C C G C T A G C G G A C A G T A C G G C C A G T G G G C C C C T A  
 A G C T G G C T A G A C T G C A C T A T A G C G G A T C T A T C A A C G C C T G  
 G T C T A C C A A A G A G C C C T T T A G C T G G A T T A A G G T G G A C C T G  
 C T G G C C C C T A T G A T T A T T C A C G G G A T T A A G A C T C A G G G C G  
 C T A G G C A G A A G T T T A G T A G C C T C T A T A T T A G T C A G T T T A T  
 C A T T A T G T A T A G C C T G G A C G G C A A G A A G T G G C A G A C C T A T  
 A G A G G C A A T A G C A C C G G C A C C C T G A T G G T G T T C T T C G G C A  
 A C G T G G A C T C T A G C G G G A T C A A G C A C A A T A T C T T T A A C C C  
 C C C T A T T A T C G C T A G A T A T A T T A G G C T G C A C C C T A C T C A C  
 T A C T C T A T T A G G T C T A C C C T G A G G A T G G A A C T G A T G G G C T 10  
 G C G A T C T G A A T A G C T G C T C T A T G C C C C T G G G G A T G G A A T C  
 T A A G G C T A T T A G C G A C G C T C A G A T C A C A G C C T C T A G C T A C  
 T T C A C T A A T A T G T T C G C T A C C T G G T C C C C T A G C A A G G C C C  
 G G C T G C A C C T C C A G G G C A G A T C T A A C G C T T G G C G G C C T C A  
 G G T C A A C A A C C C T A A A G A G T G G C T G C A G G T C G A C T T T C A G  
 A A A A C T A T G A A G G T C A C C G G C G T G A C C A C T C A G G G C G T G A  
 A A T C A C T G C T G A C C T C T A T G T A C G T G A A A G A G T T C C T G A T  
 T A G C T C T A G C C A G G A C G G C C A C C A G T G G A C C C T G T T C T T T  
 C A G A A C G G C A A A G T G A A A G T G T T T C A G G G C A A T C A G G A T A  
 G C T T C A C C C C C G T G G T C A A T A G C C T G G A T C C C C C A C T G C T 20  
 G A C T A G A T A C C T G A G A A T T C A C C C T C A G T C T T G G G T G C A C  
 C A G A T C G C C C T G A G A A T G G A A G T C C T G G G C T G T G A A G C T C  
 A G G A C C T C T A C T A A

使用されているいくつかの定義 / 略語

S Q 及び B D D : B ドメイン欠損を有する F V I I I

T T R m : T A m G T G T A G から T A T T G A C T T A G への、4 つの変位を有する T T R プロモーター

C O 及び C O 3 : 配列番号 1 に記載されている、コドン最適化された F V I I I 核酸変異体 30

C O 1 : 配列番号 10 に記載されている、コドン最適化された F V I I I 核酸変異体

C O 2 : 配列番号 11 に記載されている、コドン最適化された F V I I I 核酸変異体

表 3 ~ 表 5 の P r e p 表示は C O / C O 3 の 5 つの別個のベクター調製物を表す。

h F V I I I - R H : ヒト F V I I I の位置 1645 において A r g が H i s に置換

デルタ 4 : F V I I I のアミノ酸 1645 ~ 1648 の欠損

デルタ 1645 : F V I I I のアミノ酸 1645 ~ 1647 の欠損

デルタ 2 : F V I I I のアミノ酸 1645 及び 1646 の欠損

デルタ 3 : F V I I I のアミノ酸 1645 ~ 1647 の欠損

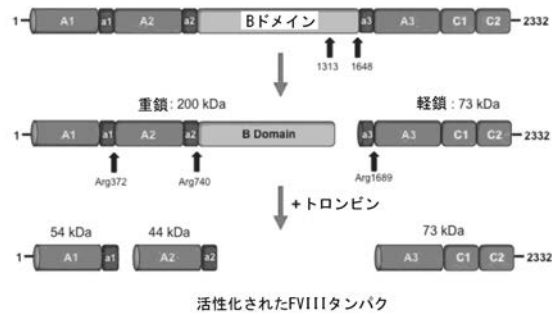
デルタ 1648 : F V I I I のアミノ酸 1648 の欠損

【 0 2 3 2 】 40

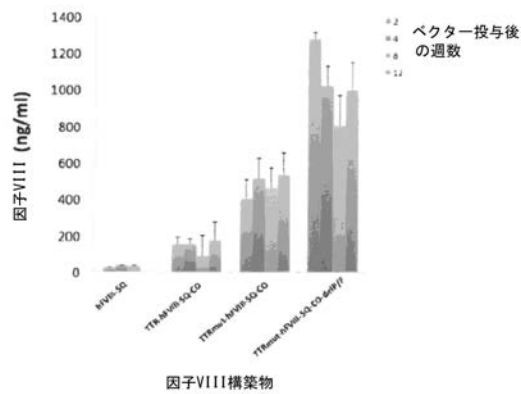
上記において本発明の実施形態の特定のものが説明されて特に例示されているが、本発明がそのような実施形態に限定されることは意図されていない。以下の特許請求の範囲に記載されているように、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、様々な修飾をすることができる。



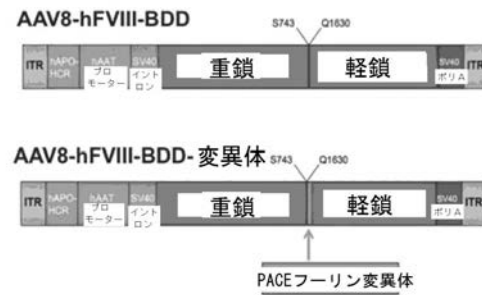
【図 1】



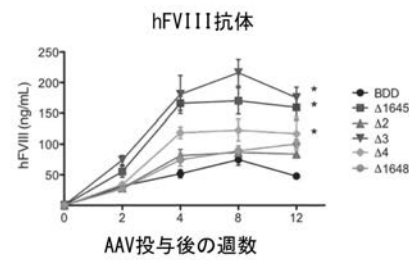
【図 2】



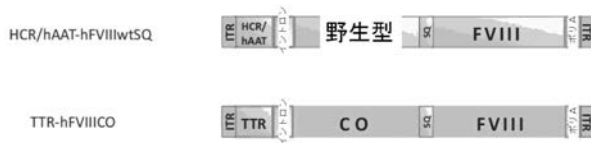
【図 3 A】



【図 3 B】

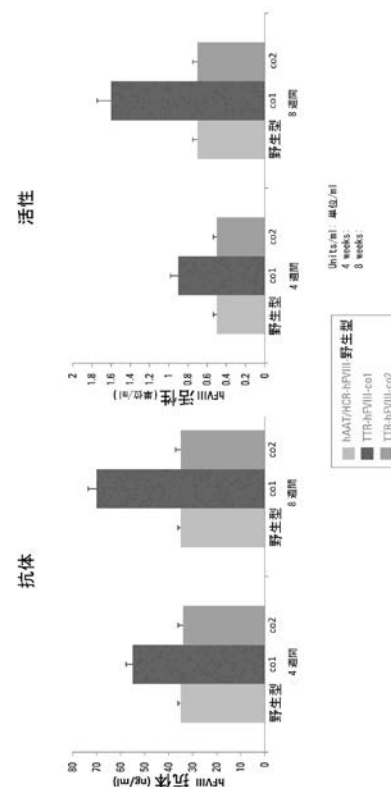


【図 4 A】

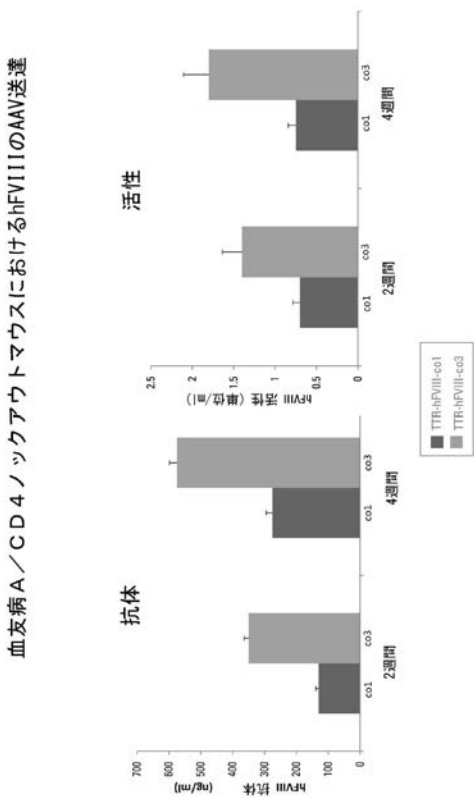


【図 4 B】

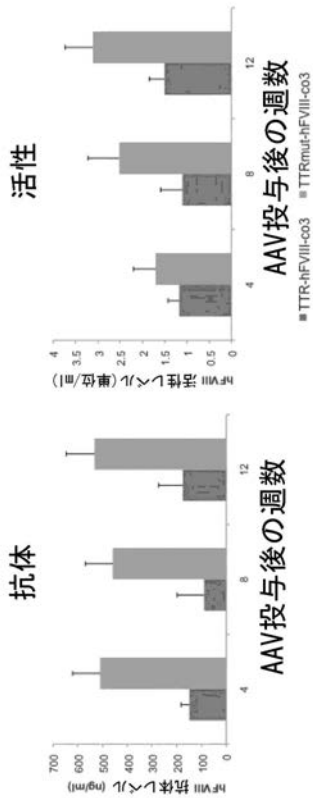
血友病A/CD4ノックアウトマウスにおけるhFVIIIのAAV送達



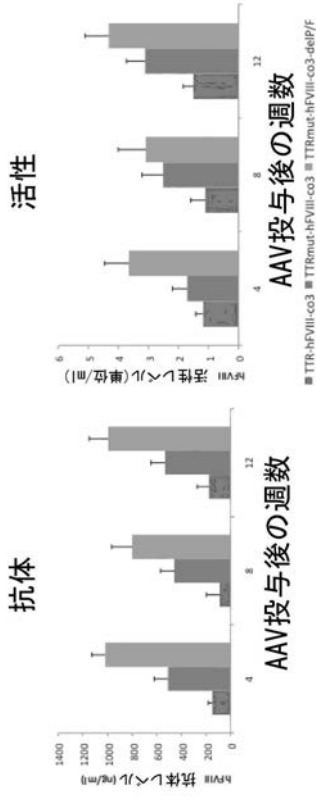
【 図 4 C 】



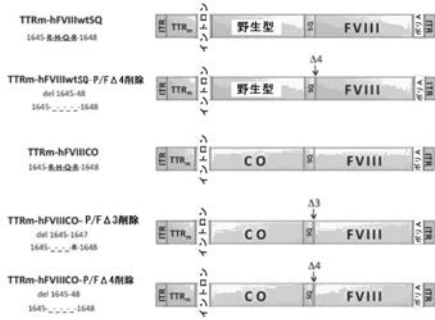
【 図 5 B 】



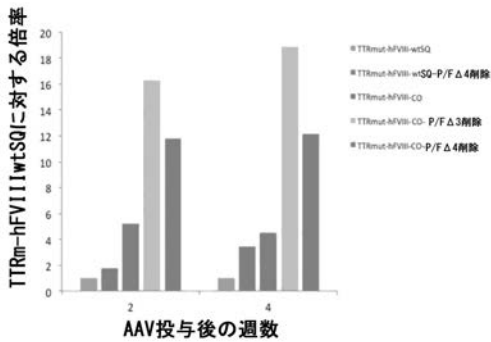
【 図 5 A 】



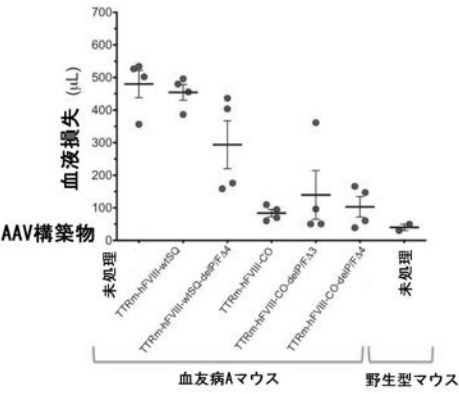
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 7 】



【 配 列 表 】

2018506261000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US15/45142

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/37; C07K 14/755; C12N 15/00 (2016.01) CPC - C07K 14/755; A61K 38/37, 38/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 38/37; C07K 14/755; C12N 15/00 (2016.01) CPC: C07K 14/755; A61K 38/37, 38/00; USPC: 514/14.1, 13.7, 13.5, 1.1; 435/320.1 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) PatSeer; Google; Google Scholar; EBSCO; Entrez PubMed; Science Direct; 'Factor VIII,' 'FVIII,' variant, 'wild-type,' 'GC content,' 'B rinmain,' 'AAV vector'		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A A Y Y — A	AU 2013/202564 A1 (CSL BEHRING GMBH) May 2, 2013; abstract; page 1, lines 10-18; page 8, lines 13-14; page 11, lines 5-10; page 11, lines 16-17; page 20, lines 26-33; page 33, lines 18-32; page 39, lines 6-26 US 2012/0028900 A1 (KAUFMAN, RJ et al.) February 2, 2012; paragraphs [0014], [0016], [0154] US 2012/0308641 A1 (ARRUDA, V et al.) December 6, 2012; abstract; paragraphs [0006], [0060], [0062], [0065], [0078] US 2010/0284971 A1 (SAMULSKI, RJ) November 11, 2010; paragraphs [0072], [0075], [0112], [0152]; SEQ ID NO: 10	1 — 2, 3/1, 3/2, 11 — 14 — 2 — 3/2 — 3/1, 3/2 — 11 — 14
<input 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 "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 21 January 2016 (21.01.2016)		Date of mailing of the international search report <b>09 FEB 2016</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/45142

**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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.: 4-10, 12, 13, 15-54  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-\*\*\*Please See Supplemental Page-\*\*\*

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

-\*\*\*Please See Supplemental Page-\*\*\*

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/45142

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 13ter.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 13ter.1(a)).  
☒ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US15/45142

\*\*\*Continued from Box III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-3, 11 and 14 are directed toward a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant, wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant exhibits greater expression when compared to wild type FVIII expression.

The Factor VIII encoding nucleic acid variant will be searched to the extent that it encompasses SEQ ID NO: 1 (adeno-associated virus DNA sequence). It is believed that Claims 1-3, 11 and 14 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (adeno-associated virus DNA sequence). Additional Factor VIII encoding nucleic acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 2 (Adeno-associated virus DNA sequence).

Groups I+ share the technical features including: a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant, wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant exhibits greater expression when compared to wild type FVIII expression; and a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant, wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant comprises a B domain deletion and exhibits greater expression when compared to wild type FVIII comprising a B domain deletion expression.

However, these shared technical features are previously disclosed by AU 2013202564 A1 (CSL BEHRING GMBH) (hereinafter 'CSL Behring').

CSL Behring discloses a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant (polynucleotides encoding a modified Factor VIII (a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant); page 11, lines 16-17), wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant exhibits greater expression (wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant exhibits greater expression; page 1, lines 17-18; page 19, lines 25-28); and a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant (polynucleotides encoding a modified Factor VIII (a Factor VIII (FVIII) encoding nucleic acid variant); page 11, lines 16-17), wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant comprises a B domain deletion (wherein the FVIII encoded by said nucleic acid variant comprises a B domain deletion; page 2, lines 24-27; page 39, lines 6-8) and exhibits greater expression (page 1, lines 17-18; page 19, lines 25-28); wherein the variant encoded has prolonged half-life compared to the wild-type protein (page 1, lines 10-16), as well as wherein the variant is secreted into fermentation medium at a higher yield than the wild-type FVIII (page 11, lines 12-14). CSL Behring does not disclose a comparison to a wild type FVIII expression; and a comparison to wild type FVIII comprising a B domain deletion expression. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of CSL Behring, for including wherein the increased expression of the variant or B domain deleted variant is relative to the wild-type, since both the increased secreted yield and half-life were disclosed to be relative to the wild-type sequence (page 1, lines 10-16), and at least an enhanced half-life relative to the wild-type would have resulted in the increased expression, as previously disclosed by CSL Behring, when compared to the wild-type sequence.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the CSL Behring reference, unity of invention is lacking.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 35/76 (2015.01)</b>		A 6 1 K 35/76	
<b>A 6 1 P 7/04 (2006.01)</b>		A 6 1 P 7/04	
<b>A 6 1 P 17/02 (2006.01)</b>		A 6 1 P 17/02	
<b>A 6 1 P 7/02 (2006.01)</b>		A 6 1 P 7/02	
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>		A 6 1 P 9/00	
<b>C 0 7 K 14/745 (2006.01)</b>		C 0 7 K 14/745	
<b>A 6 1 K 38/37 (2006.01)</b>		A 6 1 K 38/37	

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

(72)発明者 サバティーノ, デニス  
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 0 8 3 , ハーバートタウン, エルランディロ・ロード 2 8

(72)発明者 ハイ, キャサリン エー.  
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 0 6 6 メリオン ステーション グリーンウェイ レーン 2 0 1

(72)発明者 エルキャビー, ライロン  
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 0 9 6 ワインウッド, 2 0 0 エヌ ワインウッド・アヴェニュー エー 5 0 6 号

F ターム(参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01  
4C084 AA13 MA16 MA22 MA23 MA35 MA37 MA41 MA52 MA55 NA05  
ZA36 ZA39 ZA51 ZA53 ZA54 ZA89  
4C087 AA01 AA02 CA12 MA16 MA22 MA23 MA35 MA37 MA41 MA52  
MA55 NA05 ZA36 ZA39 ZA51 ZA53 ZA54 ZA89  
4H045 AA10 AA30 CA40 DA66 EA20 FA74