



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109328230 A

(43)申请公布日 2019.02.12

(21)申请号 201780036162.2

(22)申请日 2017.04.14

(30)优先权数据

62/322,937 2016.04.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/027754 2017.04.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/181101 EN 2017.10.19

(71)申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

申请人 费城儿童医院

(72)发明人 M·C·米洛内 V·阿鲁达

S·里奇曼 B·萨梅尔森-琼斯

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.

C12N 5/0783(2006.01)

C12N 5/0781(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

权利要求书3页 说明书52页

序列表43页 附图12页

(54)发明名称

嵌合同种异体抗原受体T细胞的组合物和方法

(57)摘要

本发明包括包含对同种异体抗体特异性的至少一种嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的组合物、包含其的载体、包含在病毒颗粒中包装的CALLAR载体的组合物、和包含CALLAR的重组T细胞。本发明还包括制造表达CALLAR的基因修饰T细胞的方法,其中表达的CALLAR包括胞外结构域中的因子VIII或其片段。

1. 编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列, 其中所述分离的核酸序列包括编码同种异体抗原或其片段的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列、和编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

2. 编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列, 其中所述分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

3. 权利要求1所述的分离的核酸序列, 其中所述同种异体抗原是因子VIII或其片段。

4. 权利要求3所述的分离的核酸序列, 其中所述因子VIII或其片段包括选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

5. 权利要求3所述的分离的核酸序列, 其中所述因子VIII或其片段选自因子VIII的A2亚基或C2亚基。

6. 权利要求1或2中任一项所述的分离的核酸序列, 其中所述跨膜结构域的所述核酸序列编码CD8 α 链铰链和跨膜结构域。

7. 权利要求6所述的分离的核酸序列, 其中所述CD8 α 链铰链包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列和跨膜结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

8. 权利要求2所述的分离的核酸序列, 其中编码所述共刺激分子的胞内结构域的所述核酸序列包括编码4-1BB信号传导结构域的核酸序列。

9. 权利要求1或8中任一项所述的分离的核酸序列, 其中所述4-1BB胞内结构域包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

10. 权利要求2所述的分离的核酸序列, 其中编码所述胞内信号传导结构域的所述核酸序列包括编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

11. 权利要求1或10中任一项所述的分离的核酸序列, 其中所述CD3 ζ 信号传导结构域包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

12. 一种载体, 其包括权利要求1-11中任一项所述的分离的核酸序列。

13. 权利要求12所述的载体, 其中所述载体是慢病毒载体。

14. 权利要求12所述的载体, 其中所述载体是RNA载体。

15. 一种分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR), 其包括包含同种异体抗原或其片段的胞外结构域、跨膜结构域、4-1BB的胞内结构域、和CD3 ζ 信号传导结构域。

16. 一种分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR), 其包括包含因子VIII的A2亚基的胞外结构域、跨膜结构域、共刺激分子的胞内结构域、和胞内信号传导结构域。

17. 权利要求15所述的分离的CALLAR, 其中所述同种异体抗原是因子VIII或其片段。

18. 权利要求15所述的分离的CALLAR, 其中所述因子VIII或其片段包括选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

19. 权利要求17所述的分离的CALLAR, 其中所述因子VIII或其片段选自因子VIII的A2片段和C2片段。

20. 权利要求15或16中任一项所述的分离的CALLAR, 其中所述跨膜结构域包括CD8 α 链铰链和跨膜结构域。

21. 权利要求20所述的分离的CALLAR, 其中所述CD8 α 链铰链包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列和跨膜结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

22. 权利要求16所述的分离的CALLAR,其中所述共刺激分子的所述胞内结构域包括4-1BB胞内结构域。

23. 权利要求15或22中任一项所述的分离的CALLAR,其中所述4-1BB胞内结构域包括SEQ ID NO:10。

24. 权利要求16所述的分离的CALLAR,其中所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域。

25. 权利要求15或24中任一项所述的分离的CALLAR,其中所述CD3 ζ 信号传导结构域包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

26. 一种基因修饰细胞,其包括权利要求15-25中任一项所述的CALLAR。

27. 权利要求26所述的细胞,其中所述细胞表达所述CALLAR并对在B细胞上表达的抗体具有高亲和力。

28. 权利要求26所述的细胞,其中所述细胞表达所述CALLAR并诱导表达抗体的B细胞的杀伤。

29. 权利要求26所述的细胞,其中所述细胞表达所述CALLAR并具有对健康细胞的有限毒性。

30. 权利要求26所述的细胞,其中所述细胞选自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、 γ δ T细胞、天然杀伤细胞、单核细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞、其细胞系、和其它效应细胞。

31. 一种用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法,所述方法包括给所述对象施用有效量的包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的所述对象中与FVIII抗体相关联的所述紊乱,其中所述分离的核酸序列包括编码同种异体抗原或其片段的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列、和编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

32. 一种用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法,所述方法包括给所述对象施用有效量的包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的所述对象中与FVIII抗体相关联的所述紊乱,其中所述分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

33. 权利要求31或32中任一项所述的方法,其中所述对象是人。

34. 权利要求31或32中任一项所述的方法,其中所述修饰T细胞对因子VIII抗体具有高亲和力。

35. 权利要求34所述的方法,其中所述修饰T细胞靶向表达因子VIII抗体的B细胞。

36. 一种分离的KIR/DAP12受体复合物,其包括:

(a) 嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR),其包括因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基;接头;和KIR的片段,所述KIR包括跨膜区和胞质结构域,和

(b) DAP12。

37. 权利要求36所述的分离的KIR/DAP12受体复合物,其中所述KIR是KIRS2或KIR2DS2。

38. 权利要求36所述的分离的KIR/DAP12受体复合物,其中所述接头是短的甘氨酸-丝

氨酸接头。

39. 一种基因修饰细胞,其包括权利要求36-38中任一项所述的分离的KIR/DAP12受体复合物。

40. 一种基因修饰细胞,其包括:分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 和DAP12,其中所述CALLAR包括包含因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基的胞外结构域、接头、和KIR的片段,其中所述KIR包括跨膜区和胞质结构域。

41. 权利要求40所述的基因修饰细胞,其中所述KIR是KIRS2或KIR2DS2。

42. 权利要求40或41中任一项所述的基因修饰细胞,其中所述接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。

43. 一种用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法,所述方法包括给所述对象施用有效量的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的所述对象中与FVIII抗体相关联的所述紊乱,所述基因修饰T细胞包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列并且进一步包括编码DAP12的核酸序列,所述嵌合同种异体抗原受体包括编码因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基的核酸序列;编码接头的核酸序列;编码KIR的片段的核酸序列,所述KIR包括跨膜区和胞质结构域。

44. 权利要求43所述的方法,其中所述接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。

45. 一种用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法,所述方法包括给所述对象施用有效量的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的所述对象中与FVIII抗体相关联的所述紊乱,所述基因修饰T细胞包括嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 并进一步包括DAP12,所述嵌合同种异体抗原受体包括因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基、接头、KIR的片段,所述KIR包括跨膜区和胞质结构域。

嵌合同种异体抗原受体T细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年4月15日提交的美国临时申请序列号62/322,937的优先权,其内容通过引用以其全部被并入本文。

背景技术

[0003] 血友病A是由因子VIII (FVIII) 缺陷引起的遗传性X染色体连锁疾病并且是严重的和威胁生命的出血性障碍。除了由于颅内出血引起的每年~1%的死亡风险之外,血友病A还与频繁关节积血 (hemarthrosis) 和引起患者显著发病率的关节病相关联。使用重组人FVIII (rhFVIII) 的因子替代疗法是患有血友病A的患者的标准疗法。不幸的是,10-40%的患有血友病的患者发展对抑制FVIII功能的血浆源或重组人FVIII蛋白浓缩物的抗体。在低效价下,这些抑制性抗体的存在使增加的FVIII成为必要以克服其导致疗法成本显著增加的影响。在高效价下,这些抑制性抗体可以致使因子替代疗法无用,使得患者处于显著增加的关节积血和灾难性的颅内出血的风险下,这需要使用旁路剂 (by-pass agent)。

[0004] 当前,不存在对于消除FVIII抑制剂的FDA批准的疗法。已经评估包括环磷酰胺、IVIg、利妥昔单抗 (抗-CD20) 和血浆除去法 (plasmapheresis) 的免疫干预降低这些抑制性FVIII抗体的水平,以及尝试通过免疫耐受诱导消除它们。虽然已经在有限数目的患者中取得了成功,但是这些途径通常仅导致抑制性抗体效价的短暂降低。

[0005] 因此,需要新的策略以有效地减少抑制性抗体,该抑制性抗体代表成功的FVIII替代疗法的主要障碍。

发明内容

[0006] 本发明包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列,其中该分离的核酸序列包括编码同种异体抗原或其片段的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列和编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

[0007] 进一步包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列,其中该分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

[0008] 在一些实施方式中,同种异体抗原是因子VIII或其片段,并且因子VIII其片段选自因子VIII的A2亚基或C2亚基。在其它实施方式中,因子VIII或其片段包括选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在又另外实施方式中,其中跨膜结构域的核酸序列编码CD8 α 链铰链和跨膜结构域。在进一步实施方式中,CD8 α 链铰链包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且跨膜结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在又其它实施方式中,编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列包括编码4-1BB信号传导结构域的核酸序列。在进一步实施方式中,4-1BB胞内结构域包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在又其它实施方式中,编码胞内信号传导结构域的核酸序列包括编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。在另外实施方式中,CD3 ζ 信号传导结构域包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0009] 本发明另外地包括包含本发明的分离的核酸序列的载体,其中在某些实施方式中该载体是RNA载体,例如,慢病毒载体。

[0010] 还包括分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR),其包括包含同种异体抗原或其片段的胞外结构域、跨膜结构域、4-1BB的胞内结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0011] 在一方面,提供了分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR),其包括包含因子VIII的A2亚基的胞外结构域、跨膜结构域、共刺激分子的胞内结构域、和胞内信号传导结构域。

[0012] 还包括包含本发明的CALLAR的基因修饰细胞。在一些实施方式中,细胞表达CALLAR并对在B细胞上表达的抗体具有高亲和力。在其它实施方式中,细胞表达CALLAR并诱导表达抗体的B细胞的杀伤。在另外实施方式中,细胞表达CALLAR并具有对健康细胞的有限毒性。在其它实施方式中,细胞选自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、单核细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞、其细胞系、和其它效应细胞。

[0013] 本发明还包括用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法,该方法包括:给对象施用有效量的包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱,其中分离的核酸序列包括编码同种异体抗原或其片段的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列、和编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

[0014] 另外地,本发明包括用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法,该方法包括:给对象施用有效量的包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱,其中分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,对象是人。在其它实施方式中,修饰T细胞对因子VIII抗体具有高亲和力。在其它实施方式中,修饰T细胞靶向表达因子VIII抗体的B细胞。

[0016] 本发明还包括分离的KIR/DAP12受体复合物,其包括嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 和DAP12,所述嵌合同种异体抗原受体包括因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基;接头;和KIR的片段,KIR包括跨膜区和胞质结构域。

[0017] 在一些实施方式中,KIR是KIRS2或KIR2DS2。在其它实施方式中,接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。

[0018] 还包括包含分离的KIR/DAP12受体复合物的基因修饰细胞。

[0019] 进一步包括基因修饰细胞,其包括:分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 和DAP12,其中CALLAR包括胞外结构域,其包括因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基、接头、和KIR的片段,其中KIR包括跨膜区和胞质结构域。在一些实施方式中,KIR是KIRS2或KIR2DS2。在其它实施方式中,接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。

[0020] 还包括用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法。该方法包括给对象施用有效量的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱,所述基因修饰T细胞包括:编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列并且进一步包括编码DAP12的核酸序列,嵌合同种异体抗原受体包括编码因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基的核酸序列;编码接头的核酸序列;编码KIR的片段的核酸序列,KIR包括跨膜区和胞质结构域。

[0021] 在一些实施方式中,接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。

[0022] 进一步包括用于治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱的方法。该方法包括给对象施用有效量的基因修饰T细胞,从而治疗患有血友病的对象中与FVIII抗体相关联的紊乱,所述基因修饰T细胞包括嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)并进一步包括DAP12,嵌合同种异体抗原受体包括因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基、接头、KIR的片段,KIR包括跨膜区和胞质结构域。

附图说明

[0023] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施方式的下列详细描述。出于说明本发明的目的,在附图中示出了当前优选的实施方式。但是,应当理解,本发明不限于附图中示出的实施方式的精确布置和手段。

[0024] 图1是FVIII嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的图解。

[0025] 图2是与图1相比具有交替信号传导结构域或胞外铰链的示例性CALLAR构建体的图解。

[0026] 图左侧的设计表示嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的图解,嵌合同种异体抗原受体包括因子VIII的A2或C2亚基、跨膜结构域(CD8)、4-1BB的胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0027] 图中间的设计表示嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的图解,嵌合同种异体抗原受体包括因子VIII的A2或C2亚基、接头(短的甘氨酸-丝氨酸接头(gs))、跨膜结构域(CD8)、4-1BB的胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0028] 图右侧的设计表示基于KIR2DS2的嵌合免疫受体的图解,在该嵌合免疫受体中,因子VIII(FVIII)的A2或C2结构域利用在FVIII结构域和KIR序列之间的短的甘氨酸-丝氨酸接头被融合至KIR2DS2的跨膜和胞质结构域。该嵌合受体被表达,与DAP12衔接蛋白产生嵌合KIR/DAP12受体复合物。

[0029] 图3是图解人T细胞上A2和C2 CALLAR的表面表达的一组图。T细胞利用CD3/28珠活化24小时,然后利用4-1BB和 ζ 信号传导结构域(分别地A2bbz和C2bbz)慢病毒转导A2-CALLAR或C2-CALLAR。表达A2-或C2-CALLAR构建体(A2bbz-mCh或C2bbz-mCh)的慢病毒载体也被生成并用于转导。FMC63bbz CAR(抗-CD19 CAR)被用作对照。在转导之后第5天时根据指示利用A2或C2特异性抗体对T细胞进行染色以检测含A2和C2的CALLAR的表达。蛋白L被用于对FMC63bbz CAR染色。

[0030] 流式细胞术被用于分析原代T细胞上的基于A2和C2的CAR。用编码下列CAR的慢病毒载体上清液转导来自健康供体的新鲜分离的人T细胞:FMC63-bbz、A2-bbz和C2-bbz。A2bbz-mCh和C2bbz-mCh表示用编码双顺反子构建体的慢病毒载体转导的T细胞,用于表达作为单独蛋白质的各自CAR和mCherry。CAR表达通过流式细胞术评估。简言之,T细胞在具有10%FBS的RPMI 1640培养基中培养并利用抗-CD3/抗-CD28Dynabeads(invitrogen)刺激。刺激后24小时,用CAR慢病毒载体上清液转导T细胞。根据指示,慢病毒转导后6-8天,用生物素化蛋白L抗体然后链霉亲和素PE(BD Biosciences),抗-A2然后或山羊-抗小鼠-FITC(Jackson ImmunoResearch),或者抗-C2然后或山羊-抗小鼠-FITC(Jackson ImmunoResearch)染色T细胞。通过流式细胞术(LSR-II,BD)评估CAR表达。通过使用Flowjo

(Tree Star Inc) 进行流式细胞术分析。转导后,观察到基于A2和C2结构域的CAR在转导的T细胞的细胞表面上有效地表达。

[0031] 图4是图解通过固定的抗-A2或抗-C2抗体活化A2和C2 CALLAR-修饰T细胞的图。将用指示的CAR或CALLAR转导的T细胞平板接种 (plate) 在涂覆有OKT3 (用于多克隆T细胞活化)、抗-A2或抗-C2的微孔上。在24小时收获上清液,并且通过ELISA测量IFN- γ 。结果表明在通过抗-CD3抗体活化后所有T细胞能够产生IFN γ 。仅A2-BBz转导的T细胞响应于A2-特异性抗体产生IFN γ 。仅C2-BBz转导的T细胞响应于C2-特异性抗体产生IFN γ 。

[0032] 图5是图解抗原特异性B细胞的CALLAR模型系统的图。CD19+ Na1m6细胞被工程化以表达FV111-特异性嵌合免疫球蛋白。人外周血T细胞用A2-FV111-CALLAR (A2-CALLAR)、C2-FV111-CALLAR (C2-CALLAR)、Dsg3-CAAR或CD19-CAR (对照) 转导,或非转导的T细胞 (NTD)。在不同效应子与靶标 (E:T) 比下将T细胞与Na1m6细胞混合,该Na1m6细胞被工程化以表达对FV111的A2结构域特异性的表面免疫球蛋白。通过⁵¹Cr释放分析在16小时测量特异性细胞溶解百分比。

[0033] 图6是图解抗体特异性细胞毒性的一组图,其使用具有CD8胞外间隔区的含A2-结构域或含C2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (CALLAR)。T细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz)、具有CD8胞外间隔区的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (A2 (cd8) BBz) 或具有相同CD8间隔区的含C2-结构域的受体 (C2 (cd8) BBz)。表达19BBz的T细胞仅显示针对CD19+靶K562细胞的细胞毒性。A2 (cd8) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。C2 (cd8) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。

[0034] 图7是图解抗体-特异性细胞毒性的一组图,其使用具有 (Gly)₄-Ser胞外间隔区或接头的含A2-结构域或含C2-结构域的嵌合同种异体抗体受体。T细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz)、具有合成 (Gly)₄-Ser胞外间隔区的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (A2 (gs) BBz) 或具有相同 (Gly)₄-Ser间隔区的含C2-结构域的受体 (C2 (gs) BBz)。表达19BBz的T细胞仅显示针对CD19+靶K562细胞的细胞毒性。A2 (gs) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。C2 (gs) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。

[0035] 图8是图解抗体-特异性细胞毒性的一组图,其使用具有基于KIR/DAP12信号转导的含A2-结构域或含C2-结构域的嵌合同种异体抗体受体。T细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz)、具有KIR/DAP12信号传导的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (A2 (gs) KIRS2) 或具有相同KIR/DAP12信号传导的含C2-结构域的受体 (C2 (gs) KIRS2)。表达19BBz的T细胞仅显示针对CD19+靶K562细胞的细胞毒性。A2 (gs) KIRS2-转导的T细胞仅介导表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。C2 (gs) KIRS2-转导的T细胞仅介导表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。

[0036] 图9是图解响应于细胞表面上抗体的细胞因子产生的一组图。T细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz),具有CD8胞外间隔区 (A2 (cd8) BBz)、合成 (Gly)₄-Ser (A2 (gs) BBz) 或具有KIR/DAP12信号传导 (A2 (gs) KIRS2) 的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体,或具有相同CD8间隔区 (C2 (cd8) BBz)、合成 (Gly)₄-Ser (C2 (gs) BBz) 或具有KIR/DAP12信号传导 (C2 (gs) KIRS2) 的含C2-结构域的受体。表达19BBz的T细胞仅显示

响应于CD19+靶K562细胞或CD3/28珠的增强的IFN γ 产生。A2 (cd8) BBz、A2 (gs) BBz和A2 (gs) KIRS2T细胞显示响应于表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞或阳性对照CD3/28珠的增强的IFN γ 产生。C2 (cd8) BBz、C2 (gs) BBz和C2 (gs) KIRS2T细胞显示响应于表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞或阳性对照CD3/28珠的增强的IFN γ 产生。

具体实施方式

[0037] 本发明包括使用对同种异体抗体特异性的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的组合物和方法,其中表达的CALLAR包括胞外结构域中的因子VIII或其片段。

[0038] 定义

[0039] 除非另外指明,本文所用的所有科学技术术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。虽然类似或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料均可用于本发明的实践和/或测试中,但本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明中,在提供定义的情况下,将根据术语如何定义,来使用以下术语。

[0040] 还应当理解,本文所使用的术语仅用于描述具体实施方式的目的,并不旨在是限制性的。

[0041] 在此使用的冠词“一个”或“一种”(“a”和“an”)指的是一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)该冠词的语法对象。通过举例,“一个元件”意指一个元件或多于一个元件。

[0042] 当指可测量的值例如量、持续时间等时,本文使用的“约”意在涵盖与规定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,在一些情况下 $\pm 5\%$,在一些情况下 $\pm 1\%$,并且在一些情况下 $\pm 0.1\%$ 的偏差,因为这样的变化适于执行所公开的方法。

[0043] 本文所用的术语“抗体”是指与抗原结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或源自重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,其中抗体作为连续多肽链的部分表达,该多肽链包括例如单结构域抗体片段(sdAb)、单链抗体(scFv)和人源化抗体(哈洛(Harlow)等人,1999,在:使用抗体:实验手册(Using Antibodies:A Laboratory Manual)中,冷泉港实验室出版社,纽约;哈洛等人,1989,在:抗体:实验手册(Antibodies:A Laboratory Manual)中,冷泉港,纽约;休斯顿(Houston)等人,1988,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 85:5879-5883;伯德(Bird)等人,1988,科学(Science) 242:423-426)。

[0044] 本文使用的术语“高亲和力”是指在一个分子与靶分子的结合或相互作用或吸引中的高特异性。

[0045] 本文使用的术语“抗原”或“Ag”定义为引发免疫应答的分子。这种免疫应答可涉及抗体产生,或特异性免疫活性细胞的活化,或两者。技术人员将理解,任何大分子,包括几乎所有蛋白质或肽,可以用作抗原。此外,抗原可以源自重组或基因组DNA。因此,本领域技术人员将理解,包括编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA编码如本文所使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以编码引起所需免疫应答的多肽。此外,本领域技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以是合成生成的或

可以源自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0046] “同种异体抗原”意思是如此抗原：其仅存在于物种的一些个体（比如特定血型）中并能够通过缺乏该同种异体抗原的个体诱导同种异体抗体的产生。

[0047] 本文所用的术语“有限毒性”是指本发明的肽、多核苷酸、细胞和/或抗体表现出在体外或体内对健康细胞、非肿瘤细胞、非疾病细胞、非靶细胞或这些细胞的群体没有基本上消极的生物学效应、抗肿瘤效应或基本上消极的生理学症状。

[0048] “同种异体抗体”是指由对同种异体抗原具有特异性的B细胞产生的抗体。

[0049] 如本文所使用的，术语“自体的”意指来源于随后被重新引入个体中的同一个体的任何材料。

[0050] “同种异体的”是指源自相同物种的不同动物的移植物。

[0051] “异种的”指源自不同物种的动物的移植物。

[0052] “嵌合同种异体抗原受体”或“CALLAR”是指在T细胞或任何其他能够细胞介导细胞毒性的效应细胞类型上表达的工程化受体。CALLAR包括对同种异体抗体具有特异性的同种异体抗原或其片段。CALLAR还包括跨膜结构域、共刺激结构域和信号传导结构域。

[0053] 如本文所用，术语“保守序列修饰”旨在是指不显著影响或改变包含氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这类保守修饰包括氨基酸取代、添加以及缺失。可以通过本领域已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变将多种修饰引入本发明的抗体中。保守性氨基酸取代是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的取代。在本领域中已经限定了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下各项的氨基酸：碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸），不带电极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸），非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）， β -支链的侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）以及芳香族侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，例如，本发明的CALLAR的胞外区域内的一个或多个氨基酸残基可以被具有相似侧链或电荷的其他氨基酸残基替换，并且可以使用本文所述的功能测定来测试改变的CALLAR结合自身抗体的能力。

[0054] “共刺激配体”，如本文所用的术语，包括特异性结合T细胞上的同源共刺激分子的抗原呈递细胞（例如aAPC、树突细胞、B细胞等）上的分子，从而提供如此信号，除了由例如TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合提供的初级信号之外，该信号也介导T细胞应答，这些T细胞应答包括但不限于增殖、活化、分化等。

[0055] “共刺激分子”是指T细胞上的同源结合伴侣，其与共刺激配体特异性结合，从而介导通过T细胞的共刺激应答，如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0056] “编码”是指多核苷酸诸如基因、cDNA或mRNA中核苷酸的特异性序列用作模板合成在生物学过程中的其他多聚体和大分子的固有性质，所述多聚体和大分子具有核苷酸（即，rRNA、tRNA和mRNA）的限定序列或氨基酸的限定序列中的任一个和由其产生的生物学性质。因此，如果相应于那个基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物学系统中产生蛋白质，则基因编码蛋白质。核苷酸序列等同mRNA序列并通常提供在序列表中的编码链，和用作转

录基因或cDNA的模板的非编码链两者,都可被称为编码那个基因或cDNA的蛋白质或其他产物。

[0057] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此是简并版本并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可以包括内含子。

[0058] “有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指如本文所述有效实现特定生物学结果的化合物、制剂、材料或组合物的量。这样的结果可以包括但不限于通过本领域任何合适的手段确定的病毒感染的抑制。

[0059] 术语“效应子功能”指细胞的特化功能。

[0060] 如本文所用,“内源的”是指来自生物体、细胞、组织或系统内的或在生物体、细胞、组织或系统内产生的任何材料。

[0061] 如本文所用,术语“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统外引入或生物体、细胞、组织或系统外产生的任何材料。

[0062] 本文使用的术语“表达”定义为由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0063] “表达载体”是指包括重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括用于表达的足够的顺式作用元件;用于表达的其他元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有那些,如并入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)、反转录转座子(例如,背驮式(piggyback)、睡美人)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0064] 术语“因子VIII”指凝血蛋白,也称为抗-血友病因子。因子VIII由人中的F8基因编码并产生两个交替地剪接的转录物。因子VIII是因子IXa的辅因子,其形成将因子X转化为活化形式Xa的复合物。因子VIII是由重链(A1-A2-B亚基)和轻链(A3-C1-C2亚基)组成的非共价异源二聚体,其在复合物中作为非活跃前辅因子(procofactor)与维勒布兰德因子一起循环。

[0065] 术语“因子VIII抗体”指的是特异性地结合至FVIII凝血蛋白的抗体。FVIII抗体包括对FVIII特异性的同种异体抗体和自身抗体。

[0066] 术语“血友病”指凝血紊乱。血友病A指缺乏功能性因子VIII的个体中的隐性伴X基因紊乱。血友病B指缺乏功能性因子IX的个体中的隐性伴X基因紊乱。

[0067] 本文所用的“同源的”是指两个多聚体分子之间,例如,两个核酸分子之间,如,两个DNA分子或两个RNA分子,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子两者中的亚基位置被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子的每一个中的位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数目的直接函数;例如,如果两个序列中的位置的一半(例如,长度为十个亚基的多聚体中的五个位置)是同源的,则这两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)匹配或同源,则两个序列是90%同源的。

[0068] 本文所用的“同一性”是指两个多聚体分子之间,特别是两个氨基酸分子之间,如两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个氨基酸序列在相同位置处具有相同的残基时;例如,如果两个多肽分子的每一个中的位置被精氨酸占据,则它们在该位置是同一的。

两个氨基酸序列在比对中在相同位置具有相同残基的同一性或程度通常表示为百分比。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配或相同位置数量的直接函数；例如，如果两个序列中位置的一半（例如，长度为十个氨基酸的多聚体中的五个位置）是同一的，则这两个序列是50%同一的；如果90%的位置（例如，10个中的9个）匹配或相同的，则两个氨基酸序列是90%同一的。

[0069] 本文使用的短语“免疫有效量”、“抗-同种异体抗体有效量”或“治疗量”指待施用的本发明的组合物的量，其由研究员或医师考虑患者（对象）的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度、和病症的个体差异来确定。

[0070] 术语“胞内信号传导结构域”指转导效应子功能信号和指导细胞执行特化功能的部分蛋白质。胞内信号传导结构域包括足以转导效应子功能信号的胞内结构域的任何截短部分。

[0071] 如本文所用，“指导材料”包括可用于传达本发明的组合物和方法的有用性的出版物、记录、图表或任何其他表达媒介。本发明的试剂盒的指导材料可以，例如，附于包含本发明的核酸、肽和/或组合物的容器中，或者与包含核酸、肽和/或组合物的容器一起装运。可选地，指导材料可以与容器分开装运，目的是指导材料和化合物由接受者协同使用。

[0072] “胞内结构域”是指位于细胞内的分子的部分或区域。

[0073] “分离的”意指从天然状态改变的或移出的。例如，天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”，但是与其天然状态的共存物质部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化的形式存在，或可以存在于非天然环境比如例如宿主细胞中。

[0074] 在本发明的上下文中，使用通常出现的核酸碱基的以下缩写。“A”是指腺苷，“C”是指胞嘧啶，“G”是指鸟苷，“T”是指胸苷，并且“U”是指尿苷。

[0075] 除非另有说明，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此是简并版本并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质或RNA的短语核苷酸序列还可包括内含子，其程度使得编码蛋白质的核苷酸序列在一些形式中可包含内含子（一个或多个）。

[0076] 本文所用的“慢病毒”是指逆转录病毒科的属。慢病毒在逆转录病毒中是独特的，能够感染非分裂细胞；它们可以将大量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中，因此它们是基因递送载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。源自慢病毒的载体提供在体内实现显著水平的基因转移的手段。

[0077] 术语“可操作地连接”是指调节序列和异源核酸序列之间的功能性连接，导致后者的表达。例如，当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时，将第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子可操作地连接于编码序列。通常地，可操作连接的DNA序列是连续的，并且在必要时，在相同的阅读框中，连接两个蛋白质编码区。

[0078] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括，例如，皮下（s.c.）、静脉内（i.v.）、肌肉内（i.m.）或胸骨内注射或输注技术。

[0079] 本文使用的术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。此外，核酸是核苷酸的多聚体。因此，本文所用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是多核苷酸的常识，这些多核苷酸可以水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以水解成核苷。如本文所用，多核苷

酸包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸序列,包括但不限于:重组手段,即,使用普通克隆技术和PCRTM等,以及通过合成手段从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列。

[0080] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链,其在本领域中通常还称为,例如,肽、寡肽和寡聚体,并且是指较长链,其在本领域中通常称为蛋白质,其中有许多类型。“多肽”包括,例如,生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0081] 术语“促炎细胞因子”是指促进炎症或炎症应答的细胞因子或因子。促炎细胞因子的实例包括但不限于:趋化因子(CCL、CXCL、CX3CL、XCL)、白介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL10和IL-15)、干扰素(IFN γ)和肿瘤坏死因子(TNF α 和TNF β)。

[0082] 本文使用的术语“启动子”定义为由启动多核苷酸序列的特异性转录所需的细胞合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。

[0083] 如本文所用,术语“启动子/调节序列”意指表达与启动子/调节序列可操作地连接的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,并且在其他情况下,该序列还可以包括增强子序列和表达基因产物所需的其他调节元件。启动子/调节序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调节序列。

[0084] “组成型”启动子是当与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,使得在细胞的大多数或所有生理条件下在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0085] “诱导型”启动子是当与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,使得基本上仅当对应于启动子的诱导子存在于细胞中时在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0086] “组织特异性”启动子是当与基因编码或由基因规定的多核苷酸可操作地连接时,使得基本上仅在细胞是对应于启动子的组织类型的细胞时在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0087] “信号传导途径”是指在将信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中发挥作用的多种信号传导分子之间的生化关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞膜传递信号的分子和分子复合物。

[0088] “信号传导结构域”是指响应于活化信号而募集特异性蛋白质并与其相互作用的分子的部分或区域。

[0089] 本文所用的术语“特异性结合”意指识别并结合样品中存在的同源结合伴侣蛋白(例如,存在于T细胞上的刺激和/或共刺激分子)的抗体或配体,但是该抗体或配体基本上不识别或结合该样品中的其它分子。

[0090] 术语“对象”旨在包括可引起免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。

[0091] 如本文所用,“基本上纯化的”细胞是基本上不含其他细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经与通常和其天然存在状态相关联的其他细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞的群体是指同源的细胞群体。在其他情况下,该术语简单地指已经

与和其天然状态天然相关联的细胞分离的细胞。在一些实施方式中,细胞在体外培养。在其他实施方式中,细胞不在体外培养。

[0092] 本文所用的术语“治疗的”是指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或根除疾病状态获得治疗效果。

[0093] 如本文所用的术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代对象细胞及其后代。

[0094] “跨膜结构域”是指跨越脂双层膜的分子的部分或区域。

[0095] 如本文所用的短语“在转录控制下”或“可操作地连接”意指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和取向,以控制RNA聚合酶转录的启动和多核苷酸的表达。

[0096] “载体”是包括分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质的组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语还应解释为包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,如,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于:腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0097] 术语“刺激”意指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体结合从而介导信号传导事件而诱导的初级应答,该信号传导事件如但不限于经由TCR/CD3复合物的信号传导。刺激可介导某些分子的改变的表达,例如TGF- β 的下调,和/或细胞骨架结构的重新组织等。

[0098] 本文所用的术语“刺激分子”意指与在抗原呈递细胞上存在的同源刺激配体(cognate stimulatory ligand)特异性结合的T细胞上的分子。

[0099] 本文所用的“刺激配体”意指当存在于抗原呈递细胞(例如aAPC、树突细胞、B细胞等)上时可与T细胞上的同源结合伴侣(在本文中称为“刺激分子”)特异性结合,从而通过T细胞介导初级应答的配体,该初级应答包括但不限于:活化、免疫应答的启动、增殖等。刺激配体是本领域公知的,并且尤其涵盖装载有肽的MHC I类分子、抗CD3抗体、超级激动剂抗CD28抗体和超级激动剂抗CD2抗体。

[0100] 范围:贯穿本公开,本发明的各个方面可以以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明的范围的不灵活的限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,如从1至6的范围的描述应当被认为已经具体公开了子范围,如从1至3,从1至4,从1至5,从2至4,从2至6,从3至6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度为多少,这均适用。

[0101] 描述

[0102] 用于消除FVIII-特异性B细胞同时使得正常B-细胞免疫力完整的方法是治疗血友病的最期望的治疗途径,这是因为使用抗-CD20抗体的慢性、非特异性免疫抑制和其它非特异性免疫抑制形式与增加的严重感染风险相关联。嵌合抗原受体(CAR)技术已经被成功地研发用于治疗B-细胞恶性肿瘤。虽然B-细胞特异性CAR(比如CD19 CAR)在消除产生因子VIII(FVIII)抗体的记忆B细胞中可能是有益的,但是注定(destined to)分泌抗-FVIII同

种异体抗体的B细胞表达表面抗-FVIII抗体。在这些同种异体抗原-特异性B细胞上靶向该独特的和高度受限的标记提供治疗机会以消除产生干扰FVIII疗法的FVIII-特异性抗体的B细胞。

[0103] 嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR)

[0104] 本发明部分基于如下发现：嵌合同种异体抗原受体可以被用于靶向响应于FVIII替代治疗产生的同种异体抗体。同种异体抗体在接受重组或纯化的FVIII作为用于他们的FVIII缺陷的治疗的一些个体中产生。患有血友病的个体具有FVIII的基因缺陷。由于他们不具有FVIII——由于破坏FVIII基因的基因异常，FVIII对它们的免疫系统表现外源并且它们的细胞制造针对FVIII的抗体。本发明包括包含对同种异体抗体特异性的CALLAR的组合物、包括其的载体、包括在病毒颗粒中包装的CALLAR载体的组合物、和包括CALLAR的重组T细胞或其它效应细胞。本发明还包括制造表达CALLAR的基因修饰T细胞的方法，其中表达的CALLAR包括胞外结构域中的因子VIII或其片段。

[0105] 已经描述了用于许多同种异体抗体-介导的疾病的抗原，比如血友病中的FVIII替代治疗。本发明包括用于治疗同种异体抗体-介导的疾病的技术。具体而言，靶向最终产生自身抗体和同种异体抗体的B细胞和在它们的细胞表面上表现自身抗体和同种异体抗体的技术标记这些B细胞为用于治疗干预的疾病特异性靶标。因此，本发明包括通过使用自身抗体和同种异体抗体（例如，因子VIII）嵌合同种异体抗原受体（或CALLAR）有效地靶向和杀伤病理性B细胞的方法。在本发明的一个实施方式中，仅杀伤表达特异性抗-自身抗体和抗-同种异体抗体的B细胞，因而使得保护免受感染的有益B细胞和抗体完整。

[0106] 本发明涵盖包括核酸序列的重组DNA构建体，所述核酸序列编码包括同种异体抗原或其片段——在一方面，人因子VIII或其片段——的胞外结构域，其中同种异体抗原或其片段的序列可操作地连接至编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

[0107] 在一方面，本发明包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列，其中分离的核酸序列包括编码同种异体抗原或其片段的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列、和编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

[0108] 在另一方面，本发明包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列，其中分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

[0109] 在又另一方面，本发明包括分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR)，其包括包含同种异体抗原或其片段的胞外结构域、跨膜结构域、4-1BB的胞内结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在仍另一方面，本发明包括分离的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR)，其包括包含因子VIII的A2亚基的胞外结构域、跨膜结构域、共刺激分子的胞内结构域和胞内信号传导结构域。

[0110] 同种异体抗原部分

[0111] 在一方面，本文描述的构建体包括基因工程化的嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR)，其包括包含同种异体抗原或其片段的胞外结构域。在一个实施方式中，同种异体抗原因子VIII或其片段。在示例性实施方式中，CALLAR包括因子VIII A2或C2亚基。在另一个实施方式中，CALLAR包括选自A1、A2、A3、B、C1和C2亚基的因子VIII亚基。

[0112] 在一个实施方式中,编码CALLAR的分离的核酸序列包括编码因子VIII A2亚基的核酸序列,其包括

[0113] GATCCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGG
GACTATGCTCCCTTAGTCCCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGA
TTGGTAGGAAGTACAAAAAAGTCCGATTTATGGCATAACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCA
TGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCA
AGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTATTCAAGGAGATTACCAAAGGTG
TAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGAAGTGTAGAAAGATGG
GCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTAAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCA
GGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATAATGTCAGACAAGA
GGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATAACAACGCTTTCTCCC
CAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAAGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTT
TTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTG
ACTTCCTTTCTGTCTTCTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCC
ATTCTCAGGAGAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACCTCAGACTTT
CGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTT
ATGAAGATATT TCAGCATACT TGCTGAGTAA AAACAATGCCATTGAAC或SEQ ID NO:1。

[0114] 在另一个实施方式中,因子VIII A2亚基包括氨基酸序列,其包括

[0115] SVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR
AIQHESGILGPLLYGEVGDILLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVT
VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMRDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQ
RFLPNPAGVQLEDPEFQASNMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL
TLFPFSGETVFMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR或SEQ
ID NO:2。

[0116] 在另一个实施方式中,编码CALLAR的分离的核酸序列包括编码因子VIII C2亚基的核酸序列,其包括

[0117] GATCCAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCT
TCATCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATG
CCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGAGT
AACTACTCAGGGAGTAAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGC
CATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTTCAGGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGG
TGAAGTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCT
GAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACC或SEQ ID NO:3。

[0118] 在另一个实施方式中,因子VIII C2亚基包括氨基酸序列

[0119] NSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMK
VTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH
QIALR MEVLGCEAQDLY或SEQ ID NO:4。

[0120] 在又一个实施方式中,编码CALLAR的分离的核酸序列包括与本文描述的任何核
酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同

一性或同源性的核酸序列。在另一个实施方式中,CALLAR包括与本文描述的任何氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或同源性的氨基酸序列。

[0121] 在进一步实施方式中,本发明的CALLAR包括同种异体抗体结合结构域——其另外被称为同种异体抗原,或其片段。用于本发明的同种异体抗原的选择取决于正被靶向的抗体的类型。例如,可以选择同种异体抗原,这是因为其识别靶细胞比如B细胞上与具体疾病状态相关联的抗体,例如,血友病中的FVIII替代疗法。

[0122] 在一些情况下,有益的是同种异体抗体结合结构域衍生自CALLAR在其中将被最终使用的相同物种。例如,对于在人中的使用,可以有益的是CALLAR的同种异体抗体结合结构域包括结合同种异体抗体的同种异体抗原或其片段。因而,在一个实施方式中,同种异体抗体结合结构域部分包括结合同种异体抗体的同种异体抗原的表位。表位是被同种异体抗体特异性地识别的同种异体抗原的部分。

[0123] 接头

[0124] 在一些实施方式中,CALLAR包括短的甘氨酸-丝氨酸接头(gs)。在一些实施方式中,短的甘氨酸-丝氨酸接头是胞外接头。短的甘氨酸-丝氨酸接头可以具有0-20个重复,例如,1个重复、2个重复等,其中每个重复具有2-20氨基酸的长度。在一些实施方式中,单一短的甘氨酸-丝氨酸接头重复具有例如Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:29)的序列。甘氨酸和丝氨酸重复的其它组合可以用于甘氨酸-丝氨酸接头。

[0125] 跨膜结构域

[0126] 在一个实施方式中,CALLAR包括跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域包括铰链和跨膜结构域,比如但不限于人T细胞表面糖蛋白CD8 α 链铰链和跨膜结构域。人CD8链铰链和跨膜结构域提供嵌合同种异体抗原受体的细胞表面呈递。

[0127] 关于跨膜结构域,在各种实施方式中,CALLAR包括融合至CALLAR的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中,CALLAR包括天然与CALLAR中的结构域之一关联的跨膜结构域。在一些情况下,通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免结合相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域,以便使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。

[0128] 跨膜结构域可以源自天然来源或源自合成来源。当来源是天然的时,结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包括疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一方面,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将在合成跨膜结构域的每个末端处发现。任选地,长度为2至10个氨基酸之间的短寡肽或多肽接头可以形成CALLAR的跨膜结构域和胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。

[0129] 在一些情况下,还可以使用多种人类铰链,包括人Ig(免疫球蛋白)铰链。

[0130] 铰链和/或跨膜结构域的实例包括但不限于:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链的铰链和/或跨膜结构域、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、KIR、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、Nkp80 (KLRF1)、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、

TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (触觉的 (Tactile))、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、和/或NKG2C。

[0131] 杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 包括所有KIR, 例如, KIR2和KIR2DS2, 一种刺激性杀伤免疫球蛋白样受体。

[0132] 在一个实施方式中, 跨膜结构域的核酸序列编码CD8 α 链铰链——其包括CTAGCAC CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG TGCCGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCT或SEQ ID NO:5, 和跨膜结构域——其包括CCGGAATCTACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGTCCCTGGTCAT CACCCTGTACT或SEQ ID NO:6。

[0133] 在另一个实施方式中, 跨膜结构域的核酸序列编码CD8 α 链铰链——其包括TTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD或SEQ ID NO:7, 和跨膜结构域——其包括 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK或SEQ ID NO:8。

[0134] 在又一个实施方式中, 跨膜结构域包括CD8 α 链铰链和/或跨膜结构域。

[0135] 胞质结构域

[0136] 胞内信号传导结构域或另外地胞质结构域包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域。共刺激信号传导结构域指的是包括共刺激分子比如4-1BB的胞内信号传导结构域的CALLAR的部分。共刺激分子包括对于有效的T细胞活化需要的细胞表面分子。本发明的CALLAR的胞质结构域或另外地胞内信号传导结构域负责活化CALLAR已经置于其中的免疫细胞的正常效应子功能的至少一种。胞内信号传导结构域指的是包括胞内信号传导结构域比如CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的CALLAR的部分。

[0137] 例如, T细胞的效应子功能可以是溶细胞活性或辅助活性, 包括细胞因子的分泌。虽然可以使用整个胞内信号传导结构域, 但在许多情况下, 不必使用整个结构域。就使用胞内信号传导结构域的截短部分来说, 此类截短部分可用于代替完整结构域, 只要其转导效应子功能信号即可。

[0138] 用于本发明的CALLAR中的胞内信号传导结构域的实例包括但不限于T细胞受体 (TCR) 和共同受体——其协同作用以在抗原受体结合后开始信号传导——的胞质部分, 以及这些元件的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0139] 众所周知, 通过单独的TCR产生的信号不足以完全活化T细胞, 并且还需要次级或共刺激信号。因此, T细胞活化可以说是由两种不同类型的胞质信号传导序列介导: 通过TCR起始抗原依赖性初级活化的那些 (初级胞质信号传导序列) 和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些 (次级胞质信号传导序列)。

[0140] 初级胞质信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以包含已知作为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0141] 胞内信号传导结构域的实例包括来自一个或多个分子或受体的片段或结构域, 包括但不限于: CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、常见的FcR γ 、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12 (包含基于免疫酪氨酸的活化基序 (ITAM) 的衔接蛋白)、T细胞受体

(TCR)、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (触觉的)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、任何KIR (例如, KIR2、KIR2DS2)、本文所述的其它共刺激分子、其任何衍生物、变体或片段、具有相同功能能力的共刺激分子的任何合成序列、及其任何组合。

[0142] 在一个实施方式中, CALLAR的胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域自身或与本发明的CALLAR背景中有一种或多种期望的胞质结构域组合的CD3 ζ 信号传导结构域。例如, CALLAR的胞内信号传导结构域可以包括CD3 ζ 链部分和4-1BB的共刺激信号传导结构域。共刺激信号传导结构域是指包括共刺激分子的胞内信号传导结构域的CALLAR的部分。共刺激分子是除了淋巴细胞对抗原有效应答所需的抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。

[0143] 在另一个实施方式中, 共刺激分子的胞内信号传导结构域的核酸序列包括编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列, 其包括

[0144] GCAAGCGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCTGTGCAGACCACA CAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGTAGATTCCCCGAGGAAGAGGAAGGCGGCTGCG或SEQ ID NO:9。在另一个实施方式中, 4-1BB胞内信号传导结构域的核酸序列编码包括GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCEL或SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0145] 在另一个实施方式中, 信号传导结构域的核酸序列包括编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列, 其包括

[0146] AGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTAC AACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCG GCAAGCCCAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAG CGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCATGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACC AAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTC或SEQ ID NO:11。在另一个实施方式中, CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列编码包括下列的氨基酸序列:

[0147] VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR或SEQ ID NO:12。

[0148] 在一些实施方式中, 分离的KIR/DAP12受体复合物包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列。分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基的核酸序列; 编码接头的核酸序列; 编码KIR的跨膜结构域的核酸序列, 其中KIR包含跨膜区和胞质结构域; 和DAP12。信号传导衍生自装配有DAP12的嵌合的 (KIR-CAR或KIR-CALLAR) 以产生功能性受体复合物。在一些实施方式中, KIR是KIR2或KIR2DS2。

[0149] 在一些实施方式中, 本发明包括基因修饰细胞, 其包括分离的嵌合同种异体抗原

受体 (CALLAR) 和DAP12, 其中CALLAR包括胞外结构域, 其包括因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基、接头、和KIR的片段, 其中KIR包含跨膜区和胞质结构域。

[0150] 在一些实施方式中, 提供了用于治疗与患有血友病的对象中的FVIII抗体相关联的紊乱的方法。该方法包括给对象施用有效量的基因修饰T细胞, 从而治疗与患有血友病的对象中的FVIII抗体相关联的紊乱, 基因修饰T细胞包括: 编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列, 其中分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基或因子VIII的C2亚基的核酸序列; 编码接头的核酸序列; 编码KIR的跨膜结构域的核酸序列; 编码KIR的片段的核酸序列, 其中KIR包含跨膜区和胞质结构域; 和编码DAP12的核酸序列。

[0151] 在一些实施方式中, 分离的KIR/DAP12受体复合物的KIR是KIRS2或KIR2DS2。在一些实施方式中, 接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。在一些实施方式中, 分离的KIR/DAP12受体复合物的接头是短的甘氨酸-丝氨酸接头。

[0152] 在一些实施方式中, KIR/DAP12受体复合物包括SEQ ID NO: 21-24的序列的一种或多种。

[0153] 其它结构域

[0154] CALLAR和编码CALLAR的核酸可以进一步包括信号肽, 比如人CD8 α 链信号肽。人CD8 α 信号肽负责将受体易位至T细胞表面。在一个实施方式中, 编码CALLAR的分离的核酸序列包括编码CD8 α 链信号肽的核酸序列。在另一个实施方式中, CALLAR包括CD8 α 链信号肽。

[0155] CALLAR也可以包括肽接头。在一个实施方式中, 编码CALLAR的分离的核酸序列包括编码在编码胞外结构域和跨膜结构域的核酸序列之间的肽接头的核酸序列。

[0156] 在另一个实施方式中, CALLAR的胞内结构域可以以随机或指定顺序彼此连接。任选地, 例如, 长度在2和10个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可以形成结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体是特别适合接头。

[0157] 可以通过PCR或本领域已知的任何其它手段扩增CALLAR、载体和启动子的任何结构域和/或片段。

[0158] 包括CALLAR的载体

[0159] 包括因子VIII A2或C2亚基的胞外部分的本文描述的所有载体应当被解释为与任何因子VIII胞外部分的使用同等相容。因此, 本文描述的载体的使用通过使用A2或C2亚基示例, 但是应当被解释为关于A1、B、A3和C1亚基的使用同等公开。

[0160] 为了证明关于特异性和功能性的概念, 慢病毒载体质粒是有用的 (例如, pELPS-hFVIII-A2-BBz-T2A-mCherry、pELPS-hFVIII-C2-BBz-T2A-mCherry、pTRPE-hFVIII-A2-BBz、和pTRPE-hFVIII-C2-BBz), 其中BBz表示4-1BB CD3 ζ 。这导致在宿主T细胞中稳定的 (永久的) 表达。作为可选的途径, 编码mRNA可以被电穿孔入宿主细胞, 其将实现与病毒转导的T细胞相同的治疗效果, 但是将不是永久的, 因为mRNA将随着细胞分裂而稀释。

[0161] 在一方面, 本发明包括载体, 该载体包括编码嵌合同种异体抗原受体 (CALLAR) 的分离的核酸序列, 其中分离的核酸序列包括编码包含同种异体抗原或其片段 (比如因子VIII亚基) 的胞外结构域的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子 (比如4-1BB) 的胞内结构域的核酸序列和编码胞内信号传导结构域 (比如CD3 ζ) 的核酸序列。在一个实施方式中, 载体包括编码如本文所述的CALLAR的任何分离的核酸序列。在另一个实施方式中, 载体包括质粒载体、病毒载体、反转录转座子 (例如, 背驮式、睡美人)、定点插入载

体(例如,CRISPR、锌指核酸酶、TALEN)或自杀表达载体或本领域其它已知载体。

[0162] 本文公开的包含不同同种异体抗原及其片段的所有构建体都可以并入批准用于人细胞的任何慢病毒载体质粒、其它病毒载体或RNA。在一个实施方式中,载体是病毒载体,如慢病毒载体。在另一个实施方式中,载体是RNA载体。

[0163] CALLAR的产生可以通过测序来验证。可以使用免疫印迹、免疫组织化学、流式细胞术或本领域熟知和可获得的其它技术来验证全长CALLAR蛋白的表达。

[0164] 本发明还提供了其中插入编码本发明的CALLAR的DNA的载体。载体——包括源自逆转录病毒如慢病毒的载体,是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的增殖。慢病毒载体相对于源自致癌逆转录病毒如鼠白血病病毒的载体具有附加优点,因为它们可以转导非增殖细胞,如肝细胞。它们还具有在引入它们的对象中导致低免疫原性的附加优点。

[0165] 编码CALLAR的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CALLAR多肽或其部分的核酸与启动子可操作地连接,并将该构建体并入表达载体中来实现。载体是通常能够在哺乳动物细胞中复制,和/或还能够整合到哺乳动物的细胞基因组中的载体。典型的载体包含转录和翻译终止子、起始序列和可用于调节期望的核酸序列的表达的启动子。

[0166] 核酸可以克隆到任何数量的不同类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0167] 表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域众所周知的,并且描述于例如萨姆布鲁克(Sambrook)等人,2012,分子克隆:实验室手册(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL),第1-4卷,冷泉港实验室出版社,纽约),以及在其他病毒学和分子生物学手册中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体包含在至少一种生物体中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一个或多个选择性标记(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0168] 另外的启动子元件,例如增强子,调节转录起始的频率。通常地,这些位于起始位点上游30-110bp的区域中,但是最近已经显示许多启动子还包括起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔通常是柔性的,这样使得当元件相对于彼此反转或移动时保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加至相隔50bp。根据启动子,似乎个别元件可以协同或独立地发挥作用以活化转录。

[0169] 启动子的实例是即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。然而,也可以使用其他组成型启动子序列,包括但不限于:猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、埃-巴二氏病毒即时早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、延长因子-1 α 启动子、以及人基因启动子,如但不限于:肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被认为是本发明的部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够当这样的表达是期望的时,打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达,或当表达是不期望的时关闭表达。诱导

型启动子的实例包括但不限于：金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0170] 为了评估CALLAR多肽或其部分的表达，待引入细胞中的表达载体还可以包含选择性标记基因或报告基因或两者，以便于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达细胞。在其它方面，选择性标记可以携带在单独的DNA片段上并用于共转染程序。选择性标记和报道基因两者都可以侧接适当的调节序列以使得能够在宿主细胞中表达。有用的选择性标记包括例如，抗生素抗性基因，如neo等。

[0171] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞和用于评估调节序列的功能性。通常地，报道基因是不存在于接受者生物体或组织中或者不是由受体生物体或组织表达并且编码多肽的基因，该多肽的表达通过一些容易检测的性质例如酶活性来表现。在将DNA引入接受者细胞后的合适时间评估报告基因的表达。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌的碱性磷酸酶的基因，或绿色荧光蛋白基因（例如，佑伊-泰伊（Ui-Tei）等人，2000，欧洲生化学会联合会快报（FEBS Letters）479:79-82）。合适的表达系统是公知的，并且可以使用已知技术制备或经商业获得。通常，具有显示报道基因的最高水平表达的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区域可以连接到报道基因，并用于评估调节启动子驱动转录的能力的试剂。

[0172] 将基因引入和表达进入细胞的方法是本领域已知的。在表达载体的上下文中，可以通过本领域中的任何方法容易地将载体引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。例如，表达载体可以通过物理、化学或生物学手段转移到宿主细胞中。

[0173] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包括载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见，例如，萨姆布鲁克等人，2012，分子克隆：实验室手册，第1-4卷，冷泉港实验室出版社，纽约。

[0174] 用于将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。RNA载体包括具有RNA启动子和/或用于产生RNA转录物的其他相关结构域的载体。病毒载体，并且特别是逆转录病毒载体，已成为用于将基因插入哺乳动物，例如人细胞中最广泛使用的方法。其它病毒载体可以源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒和腺相关病毒等。参见，例如，美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0175] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统，如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送载体的示例性胶体系统是脂质体（例如，人工膜囊泡）。

[0176] 在使用非病毒递送系统的情况下，示例性递送载体是脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞（体外、离体或体内）。在另一方面，核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可以包封在脂质体的水性内部中，散布在脂质体的脂质双层内，经由与脂质体和寡核苷酸二者缔合的连接分子附接到脂质体，包封在脂质体中，与脂质体复合，分散在包含脂质的溶液中，与脂质混合，与脂质组合，作为脂质中的悬浮液包含，包含胶束或与胶束复合，或以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如，它们可以以双层结构，作为胶束或以“塌陷”结构存在。它们还可以简单地散布在溶液中，可能形成尺寸或形状不均匀的聚集体。脂质是可以是天然存在的脂质

物质或合成脂质。例如,脂质包括天然存在于胞质中的脂肪液滴以及包含长链脂族烃及其衍生物如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类。

[0177] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从西格玛(Sigma),圣路易斯,密苏里州获得;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可以从K&K实验室(普莱恩维尤,纽约)获得;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)和其他脂质可以从阿凡提极性脂质公司(伯明翰,阿拉巴马州)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可储存在约-20℃。氯仿用作唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是涵盖通过产生封闭的脂质双层或聚集体形成的多种单层和多层脂质载体的通用术语。脂质体可以表征为具有带有磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过水性介质分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发形成。脂质组分在形成闭合结构之前经历自我重排并且在脂质双层之间捕获水和溶解的溶质(高希(Ghosh)等人,1991,糖生物学(Glycobiology) 5:505-10)。然而,还涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如,脂质可以呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑脂质转染胺-核酸复合物。

[0178] 包括CALLAR的细胞

[0179] 在另一方面,本发明包括基因修饰细胞,比如辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、 γ δ T细胞、天然杀伤细胞、单核细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞、其细胞系、和其它效应细胞,其包括编码本文描述的CALLAR的核酸。在一个实施方式中,基因修饰细胞包括编码嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的分离的核酸序列,其中分离的核酸序列包括编码包括同种异体抗原或其片段(比如因子VIII亚基)的胞外结构域的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码共刺激分子(比如4-1BB)的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域(比如CD3 ζ)的核酸序列。

[0180] 在另一个实施方式中,基因修饰细胞包括CALLAR,其包括包含同种异体抗原或其片段的胞外结构域、跨膜结构域、4-1BB的胞内结构域、和CD3 ζ 信号传导结构域。在另一个实施方式中,基因修饰细胞包括CALLAR,其包括包含因子VIII的A2亚基的胞外结构域、跨膜结构域、共刺激分子的胞内结构域、和胞内信号传导结构域。

[0181] 在另一个实施方式中,细胞表达CALLAR。在该实施方式中,细胞对在B细胞上表达的同种异体抗体具有高亲和力。结果,细胞诱导表达同种异体抗体的B细胞的杀伤。

[0182] 在另一个实施方式中,基因修饰细胞是T细胞。在该实施方式中,T细胞表达本文描述的CALLAR并且T细胞对在B细胞上表达的因子VIII同种异体抗体具有高亲和力。结果,T细胞诱导表达因子VIII同种异体抗体的B细胞的杀伤。

[0183] 对于T细胞还有用的是具有针对健康细胞的有限毒性和对表达同种异体抗体的细胞的特异性。这种特异性阻止或降低脱靶毒性,脱靶毒性在对自身抗体不具有特异性的当前疗法中流行。在一个实施方式中,T细胞具有针对健康细胞的有限毒性。

[0184] 本发明包括T细胞,比如原代细胞、衍生自原代T细胞的扩展的T细胞、衍生自体外分化的干细胞的T细胞、T细胞系比如Jurkat细胞、其它T细胞来源、其组合、和其它效应细胞。

[0185] CALLAR结合至同种异体抗体和血清例如但不限于血友病的功能性能力可以在Jurkat报道细胞系中评估,其将取决于通过结合至自身抗体和同种异体抗体活化CALLAR

(响应于此,由于其中包含的NFAT-GFP报道构建体,活化的细胞发出绿色荧光)。这样的方法是针对功能结合能力的有用并可靠的定性措施。

[0186] 本文描述的CALLAR构建体与VSV-G假型HIV-1衍生的慢病毒颗粒相容,并且可以使用慢病毒转导在来自健康供体的原代人T细胞中永久地表达。杀伤效力可以在基于铬的细胞裂解测定或本领域已知的任何类似测定中确定。

[0187] 另外的靶细胞系可以通过在K562细胞的表面上表达人单克隆抗体根据需要生产。

[0188] T细胞的来源

[0189] 在扩展和基因修饰之前,从对象获得T细胞。对象的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。T细胞可以从许多来源获得,包括皮肤、外周血单核细胞、骨髓、淋巴组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些实施方式中,可以使用本领域可用的任何数量的T细胞系。在本发明的某些实施方式中,T细胞可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术,如Ficoll™分离,从对象收集的血液单位获得。在一个优选的实施方式中,来自个体的循环血液的细胞通过单采血液成分术获得。单采血液成分术产物通常包含淋巴细胞,所述淋巴细胞包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方式中,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于随后的处理步骤。在本发明的一个实施方式中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在可选实施方式中,洗涤溶液缺少钙并且可缺少镁或可缺少很多——如果不是全部的话——的二价阳离子。再次,令人惊讶地,在不存在钙的情况下的初始活化步骤导致放大的活化。如本领域普通技术人员将容易理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法实现,如通过使用半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter CytoMate或Haemonetics细胞回收器5)根据制造商的说明书进行。洗涤后,可以将细胞重悬浮在多种生物相容缓冲液中,如无Ca、无Mg的PBS,勃脉力A(PlasmaLyte A)或具有或不具有缓冲液的其它盐溶液。可选地,可以除去单采血液成分术样品的不期望的组分,并将细胞直接重悬浮在培养基中。

[0190] 在另一个实施方式中,通过裂解红细胞和耗尽单核细胞,例如,通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析从外周血淋巴细胞分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定亚群,如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、和CD45RO⁺T细胞。例如,在一个实施方式中,通过与抗CD3/抗CD28(即,3x28)缀合珠(如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T)孵育足以对所需T细胞进行阳性选择的时间段来分离T细胞。在一个实施方式中,时间段为约30分钟。在另一个实施方式中,时间段范围为30分钟至36小时或更长,以及其间的所有整数值。在另一个实施方式中,所述时间段为至少1、2、3、4、5或6小时。在又一个优选的实施方式中,该时间段为10至24小时。在一个优选的实施方式中,孵育时间段为24小时。为了从患有白血病的患者中分离T细胞,使用更长的孵育时间,如24小时,可以增加细胞产量。在与其它细胞类型相比较少T细胞的任何情况下,如来自肿瘤组织或来自免疫受损个体的分离的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中,可以使用更长的孵育时间来分离T细胞。此外,使用更长的孵育时间可以增加捕获CD8⁺ T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长时间,允许T细胞结合至CD3/CD28珠,和/或通过增加或减少珠与T细胞的比例(如本文进一步描述的),在培养初始或在该过程的其他时间点上,可优先选择或排除T细胞的亚群。另外,通过增加或降低珠或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比例,在培养初始或在其他期望的时间点

上,可优先选择或排除T细胞的亚群。技术人员将认识到,多轮选择也可以用于本发明的上下文中。在某些实施方式中,可能期望执行选择程序并在活化和扩展过程中使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞还可以经历更多轮的选择。

[0191] 通过阴性选择富集T细胞群体可以使用针对对阴性选择的细胞特有的表面标记的抗体的组合来实现。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术的细胞分选和/或选择,该方法使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标记的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过阴性选择来富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方式中,可能需要富集或阳性选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺、和FoxP3⁺的调节性T细胞。可选地,在某些实施方式中,通过抗-C25缀合的珠或其它类似的选择方法耗尽T调节细胞。

[0192] 为了通过阳性或阴性选择分离所期望的细胞群体,可以改变细胞和表面(例如,颗粒如珠)的浓度。在某些实施方式中,可能期望显著降低珠和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方式中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方式中,使用大于1亿个细胞/ml。在另一个实施方式中,使用1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5千万个细胞/ml的细胞浓度。在又另一个实施方式中,使用从7.5、8、8.5、9、9.5千万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在另外的实施方式中,可以使用1.25或1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞活化和细胞扩展。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达感兴趣靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞,或来自存在许多肿瘤细胞的样品(即,白血病血液,肿瘤组织等)的细胞。这样的细胞群体可以具有治疗价值并且希望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺ T细胞。

[0193] 在相关实施方式中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面的混合物(例如,颗粒如珠),使颗粒和细胞之间的相互作用最小化。这选择表达大量与颗粒结合的所期望抗原的细胞。例如,CD4⁺ T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀浓度下比CD8⁺ T细胞更有效地被捕获。在一个实施方式中,所用的细胞浓度为 5×10^6 个/ml。在其它实施方式中,所用的浓度可以为从约 1×10^5 个/ml至 1×10^6 个/ml,以及其间的任何整数值。

[0194] 在其它实施方式中,细胞可以在旋转器上在2°C-10°C或室温下以变化的速度孵育不同长度的时间。

[0195] 用于刺激的T细胞还可在洗涤步骤后进行冷冻。不希望受理论束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过除去细胞群体中的粒细胞和一定程度的单核细胞而提供更均匀的产物。在除去血浆和血小板的洗涤步骤后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域已知的并且在本文上下文中将是有用的,一种方法涉及使用包含20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或包含10%葡聚糖40%和5%右旋糖,20%人血清白蛋白和7.5% DMSO,或31.25%勃脉力A,31.25%右旋糖5%,0.45% NaCl,10%葡聚糖40%和5%右旋糖,20%人血清白蛋白和7.5% DMSO,或包含例如羟乙基淀粉和勃脉力A的其它合适的细胞冷冻培养基的培养基,然后将细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C,并储存在液氮储罐的气相中。可以使用受控制冷冻的其它方法,以及立即在-20°C下或在液氮中的不受控制的冷冻。

[0196] 在某些实施方式中,如本文所述解冻和洗涤冷冻保存的细胞,并使其在使用本发明的方法在活化之前在室温下静置一小时。

[0197] 在本发明的上下文中还考虑在可能需要本文所述的扩展细胞之前的时间段从对象收集血液样品或单采血液成分术产物。因此,可以在任何需要的时间点收集待扩展的细胞的来源,并分离和冷冻所期望的细胞,如T细胞,用于随后在针对任何数量的疾病或病症的T细胞治疗中,这些疾病或病症将受益于T细胞治疗,如本文所述的那些。在一个实施方式中,从通常健康的对象获取血液样品或单采血液成分术产物。在某些实施方式中,血液样品或单采血液成分术产物取自处于发展疾病的风险但是尚未发展疾病的一般健康的对象,并且分离感兴趣的细胞并冷冻用于以后使用。在某些实施方式中,T细胞可以扩展、冷冻并在以后使用。在某些实施方式中,在诊断本文所述的特定疾病以后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在另一个实施方式中,在任何数目的相关治疗形式之前,从来自对象的血液样品或单采血液成分术产物中分离细胞,这些相关治疗形式包括但不限于用以下的治疗:试剂(如那他珠单抗、依法珠单抗)、抗病毒剂、化疗、放射、免疫抑制剂(如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸和FK506)、抗体或其它免疫消除剂(如CAMPATH、抗CD3抗体、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和照射)。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素)。(Liu等人,细胞(Cell)66:807-815,1991;亨德森(Henderson)等人,免疫(Immun.)73:316-321,1991;比勒(Bierer)等人,免疫学的当前意见(Curr.Opin.Immun.)5:763-773,1993)。在进一步实施方式中,为患者分离细胞,并冷冻用于以后与骨髓或干细胞移植,使用化疗剂例如氟达拉滨、外束放射治疗(XRT)、环磷酰胺,或抗体例如OKT3或CAMPATH的T细胞去除疗法联合(例如,之前、同时或之后)使用。在另一个实施方式中,细胞被分离,然后可被冷冻用于随后用于在B-细胞去除疗法例如利妥昔单抗之后的治疗。

[0198] 在本发明的另一个实施方式中,紧随治疗后,从患者获得T细胞。在这方面,已经观察到,在患者通常将从治疗中恢复的期间,在治疗后不久进行某些癌症治疗特别是用破坏免疫系统的药物治疗后,所获得的T细胞的质量可能是最佳的或可以改进其离体扩展能力。同样,在使用本文所述的方法的离体操作之后,这些细胞可以处于增强植入和体内扩展的优选状态。因此,在本发明的上下文中,考虑在该恢复期期间收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其它细胞。此外,在某些实施方式中,动员(例如,用GM-CSF动员)和调节方案可用于在对象中产生病症,其中特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩展是有利的,特别是在治疗后的确定的时间窗期间。说明性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其它细胞。

[0199] T细胞的活化和扩展

[0200] 通常使用例如在美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开号20060121005中所述的方法活化和扩展T细胞。

[0201] 通常,本发明的T细胞通过与其上附接有试剂——该试剂刺激CD3/TCR复合物相关的信号——和配体——该配体刺激T细胞表面上的共刺激分子——的表面接触而扩展。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群体,如通过与固定在表面上的抗CD3抗体、或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过和与钙离子载体联合的蛋白激酶C活化剂(例如,苔藓抑素)

接触。对于辅助分子在T细胞表面上的共刺激,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在适于刺激T细胞增殖的条件下,使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括可以如本领域通常已知的其它方法那样使用的9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, **Besançon**, 法国) (伯格 (Berg) 等人, 移植进展 (Transplant Proc.) 30 (8) : 3975-3977, 1998; 哈能 (Haanen) 等人, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 190 (9) : 1319-1328, 1999; 加兰 (Garland) 等人, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Meth.) 227 (1-2) : 53-63, 1999)。

[0202] 在某些实施方式中,T细胞的主要刺激信号和共刺激信号可以通过不同的方案提供。例如,提供每个信号的试剂可以在溶液中或偶联到表面。当偶联到表面时,试剂可偶联到同一表面(即,以“顺式”形式)或单独的表面(即,以“反式”形式)。可选地,一种试剂可以偶联到表面和溶液中的其他试剂。在一个实施方式中,提供共刺激信号的试剂结合到细胞表面,并且提供初级活化信号的试剂在溶液中或偶联到表面上。在某些实施方式中,两种试剂可以都在溶液中。在另一个实施方式中,试剂可以处于可溶形式,并且然后交联到表面,如表达Fc受体的细胞或将结合试剂的抗体或其它结合剂。在这方面,参见例如,针对人工抗原呈递细胞(aAPC)的美国专利申请公开号20040101519和20060034810,这些人工抗原呈递细胞被考虑用于活化和扩展本发明中的T细胞。

[0203] 在一个实施方式中,将两种试剂固定在珠上,在同一珠上,即“顺式”,或单独的珠,即“反式”。举例来说,提供初级活化信号的试剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且提供共刺激信号的试剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段;和两种试剂以相等的分子的数量共同固定在同一珠上。在一个实施方式中,使用1:1比例的与用于CD4⁺ T细胞扩展和T细胞生长的珠结合的每种抗体。在本发明的某些方面,使用与珠结合的抗CD3:CD28抗体的比例,这样使得与使用1:1的比例观察到的扩展相比,观察到T细胞扩展的增加。在一个具体实施方式中,与使用1:1比例观察到的扩展相比,观察到从约1至约3倍的增加。在一个实施方式中,结合珠的CD3:CD28抗体的比例范围从100:1至1:100和其间的的所有整数值。在本发明的一方面,与抗CD3抗体相比,更多的抗CD28抗体结合到颗粒上,即,CD3:CD28的比例小于1。在本发明的某些实施方式中,结合至珠的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比例大于2:1。在一个具体实施方式中,使用1:100比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。在另一个实施方式中,使用1:75比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。在另一个实施方式中,使用1:50比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。在另一个实施方式中,使用1:30比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。在一个优选的实施方式中,使用1:10比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。在另一个实施方式中,使用1:3比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。在又一个实施方式中,使用3:1比例的与珠结合的CD3:CD28抗体。

[0204] 可以使用从1:500至500:1及其间的任何整数值的比例的颗粒与细胞来刺激T细胞或其它靶细胞。如本领域普通技术人员可以容易地理解的,颗粒与细胞的比例可以取决于相对于靶细胞的颗粒大小。例如,小尺寸珠可仅结合几个细胞,而较大珠可以结合许多细胞。在某些实施方式中,细胞与颗粒的比例范围从1:100至100:1以及其间的任何整数值,并且在另外的实施方式中,比例包括1:9至9:1以及其间的任何整数值,也可以用来刺激T细胞。导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD28偶联颗粒与T细胞的比例可以如上所述变化,然而,某些优选值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:

1:2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、和15:1,其中一个优选的比例为至少1:1的颗粒/T细胞。在一个实施方式中,使用1:1或更小的颗粒与细胞的比例。在一个具体实施方式中,优选的颗粒:细胞比例为1:5。在另外的实施方式中,颗粒与细胞的比例可以根据刺激的天数而变化。例如,在一个实施方式中,颗粒与细胞的比例在第一天为1:1至10:1,并且每天或每隔一天将另外的颗粒添加到细胞中,其后多至10天,最终比例为从1:1至1:10(基于添加当天的细胞计数)。在一个具体实施方式中,在刺激的第一天,颗粒与细胞的比例为1:1,并且在刺激的第三和第五天调整至1:5。在另一个实施方式中,在每天或每隔一天的基础上添加颗粒至在第一天最终比例为1:1,并且在刺激的第三和第五天为1:5。在另一个实施方式中,在刺激的第一天,颗粒与细胞的比例为2:1,并且在刺激的第三和第五天调整至1:10。在另一个实施方式中,在每天或每隔一天的基础上添加颗粒至在第一天最终比例为1:1,并且在刺激的第三和第五天为1:10。本领域技术人员将理解,多种其他比例可适用于本发明。特别地,比例将根据颗粒尺寸和细胞尺寸和类型而变化。

[0205] 在本发明的进一步实施方式中,细胞如T细胞与试剂包被的珠组合,随后分离珠和细胞,并且然后培养细胞。在一个可选实施方式中,在培养之前,试剂包被的珠和细胞不分离,而是一起培养。在进一步实施方式中,首先通过施加力如磁力浓缩珠和细胞,导致细胞表面标记的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0206] 举例来说,可以通过使附着有抗-CD3和抗-CD28的顺磁珠(3×28 个珠)与T细胞接触来连接细胞表面蛋白。在一个实施方式中,将细胞(例如, 10^4 至 10^9 个T细胞)和珠(例如,比例为1:1的DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T顺磁珠)在缓冲液例如PBS(不含二价阳离子如钙和镁)中组合。同样,本领域普通技术人员可以容易地理解,可以使用任何细胞浓度。例如,靶细胞在样品中可能是非常稀少的,并且仅占样品的0.01%,或整个样品(即100%)可以包括感兴趣的靶细胞。因此,任何细胞数量在本发明的上下文内。在某些实施方式中,可能期望显著降低颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用约20亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方式中,使用大于1亿个细胞/ml。在另一个实施方式中,使用1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5千万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方式中,使用从7.5、8、8.5、9、9.5千万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在另外的实施方式中,可以使用1.25或1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞活化和细胞扩展。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达感兴趣的靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞。这样的细胞群体可以具有治疗价值,并且在某些实施例中希望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺ T细胞。

[0207] 在本发明的一个实施方式中,可以将混合物培养若干小时(约3小时)至约14天或其间的任何小时整数值。在另一个实施方式中,可以将混合物培养21天。在本发明的一个实施方式中,将珠和T细胞一起培养约8天。在另一个实施方式中,将珠和T细胞一起培养2-3天。也可能需要若干个刺激周期,这样使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适合于T细胞培养的条件包括可以包含增殖和存活所必需的因子的合适培养基(例如,基本成分培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15, (龙沙公司(Lonza))),这些因子包括血清(例如,胎牛或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它

添加剂包括但不限于：表面活性剂、人血浆蛋白粉和还原剂，如N-乙酰基半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, 和X-Vivo 20, Optimizer, 具有添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素, 无血清或补充适量的血清(或血浆), 或确定的激素组, 和/或足以用于T细胞生长和扩展的一定量的细胞因子(一种或多种)。抗生素, 例如青霉素和链霉素, 仅包括在实验培养物中, 而不包括在待被输注到对象的细胞的培养物中。靶细胞保持在支持生长所需的条件下, 例如适当的温度(例如, 37°C)和大气(例如, 空气加5%CO₂)。

[0208] 已经暴露于不同刺激时间的T细胞可以表现出不同的特征。例如, 典型的血液或分离的外周血单核细胞产物具有大于细胞毒性或抑制性T细胞群体(T_C, CD8⁺)的辅助T细胞群体(T_H, CD4⁺)。通过刺激CD3和CD28受体的T细胞的离体扩展产生在约第8-9天之前主要由T_H细胞组成的T细胞群体, 而在约第8-9天后, T细胞群体包括越来越大的T_C细胞群体。因此, 根据治疗的目的, 用主要包括T_H细胞的T细胞群体输注对象可能是有利的。类似地, 如果已经分离了T_C细胞的抗原特异性亚组, 则可以有利地更大程度地扩展该亚组。

[0209] 此外, 除了CD4和CD8标记, 其它表型标记显著变化, 但在很大程度上, 在细胞扩展过程的过程中可再现地变化。因此, 这种再现性使得能够为特定目的定制活化的T细胞产物。

[0210] 疗法

[0211] 本发明还提供了用于预防、治疗和/或管理与表达因子VIII抗体的细胞(例如, 利用FVIII替代疗法治患有血友病的对象中的抗-FVIII抗体)相关联的紊乱的方法。与表达自身抗体和/或同种异体抗体的细胞相关联的紊乱的非限制性实例包括血友病及相关紊乱。在一个实施方式中, 对象是人。

[0212] 在一方面, 本发明包括用于治疗与患有血友病的对象中的FVIII抗体相关联的紊乱的方法。该方法包括给对象施用有效量的基因修饰T细胞, 从而治疗患有血友病的对象中的抗体, 所述基因修饰T细胞包括编码嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的分离的核酸序列, 其中分离的核酸序列包括编码同种异体抗原或其片段的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列、编码4-1BB的胞内信号传导结构域的核酸序列、和编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列。

[0213] 在另一方面, 本发明包括用于治疗与患有血友病的对象中的FVIII抗体相关联的紊乱的方法。该方法包括给对象施用有效量的基因修饰T细胞, 从而治疗与患有血友病的对象中的FVIII抗体相关联的紊乱, 所述基因修饰T细胞包括编码嵌合同种异体抗原受体(CALLAR)的分离的核酸序列, 其中分离的核酸序列包括编码因子VIII的A2亚基的核酸序列、编码跨膜结构域的酸序列、编码共刺激分子的胞内结构域的核酸序列、和编码胞内信号传导结构域的核酸序列。

[0214] 本发明的方法包括给需要的对象施用结合至表达自身抗体和同种异体抗体的细胞的本发明的CALLAR T细胞。在一个实施方式中, 对象经历血浆去除术或另一种临床治疗以去除或减少对象血清中的抗体。去除或减少血清抗体比如自身抗体和/或同种异体抗体的方法可以包括本领域中已知的化学方法或其它方法。治疗方法可以对自身抗体和/或同种异体抗体是特异性的或对任何抗体是一般性的。在一个实施方式中, 对象是人。与表达自身抗体或同种异体抗体的细胞相关联的疾病的非限制性实例包括利用FVIII替代疗法治

的患有血友病的对象中的FVIII抗体,等。

[0215] 在本文描述的治疗方法中,从对象分离的T细胞可以被修饰以表达适合的CALLAR、离体扩展并且然后重新注入对象。修饰T细胞识别靶细胞,比如因子VIII特异性B细胞,并且变得活化,导致同种异体免疫靶细胞的杀伤。

[0216] 为了在体外、原位或体内监控表达CALLAR的细胞,CALLAR细胞可以进一步表达可检测标记。当CALLAR结合靶标时,可检测标记被活化并表达,其可以由本领域中已知的分析比如流式细胞术来检测。

[0217] 不希望受任何具体理论的束缚,由CALLAR-修饰T细胞引发的抗-FVIII抗体免疫应答可以是主动或被动免疫应答。在又一实施方式中,修饰T细胞靶向B细胞。例如,表达靶抗体的B细胞可能易受CALLAR-重定向的T细胞的间接破坏,这些CALLAR-重定向的T细胞先前已经针对相邻的表达抗体的细胞反应。

[0218] 在一个实施方式中,本发明的完全人CALLAR-基因修饰T细胞可以被用作在哺乳动物中进行离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。在一个实施方式中,哺乳动物是人。

[0219] 关于离体免疫,在将细胞施用至哺乳动物之前,在体外可能发生以下中的一种:i)扩展细胞,ii)将编码CALLAR的核酸引入细胞,或iii)冷冻保存细胞。

[0220] 离体程序在本领域是众所周知的,并且在下文中更充分地讨论。简而言之,将细胞从哺乳动物(例如,人)分离,并且用本文公开的表达CALLAR的载体基因修饰(即,体外转导或转染)。可以将CALLAR-修饰的细胞施用至哺乳动物接受者以提供治疗益处。哺乳动物接受者可以是人,并且关于接受者,CALLAR-修饰的细胞可以是自体的。可选地,关于接受者,细胞可以是同种异体的、同基因的或异种的。

[0221] 用于离体扩展造血干细胞和祖细胞的程序的一个实例描述于通过引用并入本文的美国专利号5,199,942中,该程序可以应用于本发明的细胞。其他合适的方法是本领域已知的,因此本发明不应当被解释为限于细胞离体扩展的任何特定方法。简言之,T细胞的离体培养和扩展通常包括:(1)从外周血采集物或骨髓外植体收集来自哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2)离体扩展这样的细胞。除了在美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子以外,其他因子如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体也可用于细胞的培养和扩展。

[0222] 除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗之外,本发明还包括用于体内免疫以引发针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0223] 通常地,本文描述的细胞可用于治疗和预防在免疫受损的个体中出现的疾病。特别地,本发明的CALLAR-修饰的T细胞用于治疗与抗体的表达相关的疾病、紊乱和病症。在某些实施方式中,本发明的细胞用于治疗处于发展与抗体表达相关的疾病、紊乱和病症的风险下的患者。因此,本发明提供了用于治疗或预防与抗体——比如利用FVIII替代疗法治疗的患有血友病的对象中的FVIII抗体——的表达相关的疾病、紊乱和病症的方法,包括向有需要的对象施用治疗有效量的本发明的CALLAR-修饰T细胞。

[0224] 本发明的CALLAR-修饰的T细胞可以单独施用,或作为与稀释剂和/或与其它组分如IL-2或其它细胞因子或细胞群体组合的药物组合物施用。简言之,本发明的药物组合物可以包括与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的本文所述的靶细胞群体。这样的组合物可以包括缓冲剂,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐溶液等;碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸如甘氨酸;抗氧

化剂；螯合剂如EDTA或谷胱甘肽；佐剂（例如，氢氧化铝）；和防腐剂。在一个方面，本发明的组合物被配制用于静脉内施用。

[0225] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗（或预防）的疾病的方式施用。施用的量和频率将通过如患者的病症、患者疾病的类型和严重性等因素来确定，但是适当的剂量可以通过临床试验来确定。

[0226] 通常可以指出，包含本文所述T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量施用，在一些情况下为 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重，包括那些范围内的所有整数值。T细胞组合物也可以在这些剂量下多次施用。可以通过使用在免疫疗法中通常已知的输注技术来施用细胞（参见，例如，罗森伯格（Rosenberg）等人，新英格兰医学杂志（New Eng. J. of Med.）319:1676, 1988）。对于特定患者的最佳剂量和治疗方案可以容易地由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病指征并相应地调整治疗来确定。

[0227] 在某些实施方式中，给对象施用活化的T细胞。施用后，再次抽血或者进行单采血液成分术，并使用本文所述的方法从其中活化和扩展T细胞，并且然后再输注回患者。该过程可以每几周进行多次。在某些实施方式中，可以从10cc至400cc的血液抽取物来活化T细胞。在某些实施方式中，从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的血液抽取物来活化T细胞。不受理论束缚，使用这种多次抽血/多次再输注方案，可以选出某些T细胞群体。

[0228] 本发明的细胞的施用可以使用任何方便的手段进行，包括通过雾化吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。本文所述的组合物可以经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、淋巴结内、髓内、肌肉内、通过静脉内（i. v.）注射或腹膜内施用至患者。在一个实施方式中，将本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射施用至患者。在另一个实施方式中，将本发明的T细胞组合物通过静脉内注射施用。T细胞的组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0229] 在本发明的某些实施方式中，使用本文所述的方法或本领域已知的其它方法活化和扩展细胞，其中T细胞被扩展至治疗水平，并且与任何数量的相关治疗方式联合（例如，在之前、同时或之后）施用至患者，这些治疗方式包括但不限于用试剂的治疗如抗病毒疗法、西多福韦和白介素-2、阿糖胞苷（也称为ARA-C）或针对MS患者的那他珠单抗治疗或针对银屑病患者的依法利珠单抗治疗或针对PML患者的其它治疗。在进一步的实施方式中，本发明的T细胞可以与化疗，放射，免疫抑制剂如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506，抗体或其它免疫消除剂如CAM PATH，抗-CD3抗体或其它抗体疗法，细胞毒素，氟达拉滨，环孢菌素，FK506，雷帕霉素，霉酚酸，类固醇，FR901228，细胞因子和照射组合使用。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶（环孢菌素和FK506）或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶（雷帕霉素）。（Liu等人，细胞（Cell）66:807-815, 1991；亨德森（Henderson）等人，免疫（Immun.）73:316-321, 1991；比勒（Bierer）等人，免疫学的当前意见（Curr. Opin. Immun.）5:763-773, 1993）。在进一步的实施方式中，将本发明的细胞组合物与骨髓移植，使用化疗剂例如氟达拉滨、外束放射疗法（XRT）、环磷酰胺，或抗体例如OKT3或CAMPATH的T细胞去除疗法联合（例如，之前、同时或之后）施用至患者。在另一个实施方式中，本发明的细胞组合物在B细胞去除疗法——如与CD20反应的试剂例如利妥昔单抗——后施用。例如，在一个实施方式中，对象可以经受用高剂量化疗随后进行外周血干细胞移植的标准治疗。在某些实施方式中，在移植后，对象接受本发明的扩展的免疫细胞的输注。在

另一个实施方式中,在手术之前或之后施用扩展的细胞。

[0230] 待施用至患者的上述治疗的剂量将随被治疗病症和治疗的接受者的确切性质而变化。可以根据本领域接受的实践进行针对人施用的剂量的按比例缩放(scaling)。例如,对于成年患者,CAMPATH的剂量通常将在1至约100mg的范围内,通常每天施用持续1和30天之间的时间。优选的日剂量为每天1至10mg,但在一些情况下可以使用每天高达40mg的更大剂量(在美国专利号6,120,766中描述的)。

[0231] 实验实施例

[0232] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。提供这些实施例仅仅是为了说明的目的,并且不旨在是限制性的,除非另有说明。因此,本发明决不应被解释为限于以下实施例,而是应被解释为涵盖因为本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变化。

[0233] 无需进一步描述,据信本领域的普通技术人员可使用前述说明和以下说明性实施例完成且利用本发明的这些化合物并实施所要求保护的方法。因此,以下工作实施例具体指出了本发明的优选实施方式,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0234] 现在描述在进行本文公开的实验中使用的材料和方法。

[0235] A2和C2 CALLAR的检测。利用CD3/28珠活化T细胞24小时,然后利用4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域(分别地A2bbz和C2bbz)慢病毒转导A2-CALLAR或C2-CALLAR。也生成表达A2-或C2-CALLAR构建体的慢病毒载体并用于转导,在A2-或C2-CALLAR构建体中mCherry被融合至 ζ 结构域的c-端(分别地A2bbz-mCh或C2bbz-mCh)。FMC63bbz CAR(CD19 CAR)被用作对照。根据指示在转导后第5天时利用A2或C2特异性抗体染色T细胞以检测含A2和C2的CALLAR的表达。蛋白L被用于染色FMC63bbz CAR。

[0236] A2和C2 CALLAR的活化。在一些实施方式中,将利用指示的CAR或CALLAR转导的T细胞平板接种在利用OKT3(用于多克隆T细胞活化)、抗-A2或抗-C2涂覆的微孔上。在24小时收获上清液,并且通过ELISA测量IFN- γ 。在一些实施方式中,以改变的T细胞(效应子)与靶细胞比(E:T比)混合T细胞以在将T细胞上表达的CALLAR或CAR结合至靶细胞上表达的同源配体之后测定细胞毒性和细胞因子产生。在一些实验中,Na1m-6 B-细胞急性成淋巴细胞白血病细胞系被工程化以表达将鼠科单克隆抗体-衍生的可变结构域序列用于这些各自结构域生成的A2-特异性表面免疫球蛋白或C2-特异性表面免疫球蛋白。

[0237] 现在描述实验的结果。

[0238] 设计嵌合分子以表达衍生自人FV1111的FV1111表位,其连接至跨膜结构域和胞质信号传导结构域——其活化T细胞并触发它们的细胞毒功能。可能的设计的非限制性实例在图1和2中示意性地示出。嵌合分子被命名为CALLAR(嵌合同种异体抗原受体)以将它们与传统的嵌合抗原受体或CAR区分——使用用于受体靶向的scFv。初始CALLAR并入来自人FV1111的A2和C2结构域,这是因为大多数抑制抗体结合至这两种结构域之一中的表位。当这些CALLAR通过基因修饰(例如慢病毒载体)被引入人T细胞时,这些CALLAR-修饰T细胞被活化并杀伤B细胞和浆细胞,其表达结合至FV1111的A2或C2结构域的表面免疫球蛋白(sIg)。修饰T细胞被预期消除体内的FV1111-特异性B细胞,导致FV1111抑制性抗体的根除。当被引入具有DAP12的人T细胞时,基于KIR的CALLAR(图2,右侧)可以引起体外稳健的抗原-特异性增殖和效应子功能。在一些实施方式中,T细胞被基因修饰以包括与DAP12共表达的CALLAR,其包括通过将FV1111结构域与KIR例如KIRS2、KIR2DS2的跨膜和短的胞质结构域融合生成的嵌合

KIR。在一些实施方式中, CALLAR包括经由CD8 α -衍生的胞外铰链连接的FVIII的A2或C2结构域。在一些实施方式中, CALLAR包括经由甘氨酸-丝氨酸衍生的胞外铰链比如Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser连接的FVIII的A2或C2结构域。在一些实施方式中, 基因修饰T细胞被施用至具有FVIII抗体的对象。在本发明中有用的嵌合分子的一些部分的序列被提供为SEQ ID NO:21-28。

[0239] 分析人T细胞上的A2和C2 CALLAR的表面表达(图3)。CD3/28-活化的T细胞的慢病毒载体转导证明A2-特异性和C2-特异性CALLAR二者在T细胞的表面上表达。利用CD3/28珠活化T细胞24小时, 然后利用4-1BB和Z信号传导结构域(分别地A2bbz和C2bbz)慢病毒转导A2-CALLAR或C2-CALLAR。生成表达A2-或C2-CALLAR构建体(A2bbz-mCh或C2bbz-mCh)的慢病毒载体并用于转导。FMC63bbz CAR(抗-CD19 CAR)被用作对照。在转导后第5天时根据指示利用A2或C2特异性抗体染色T细胞以检测含A2和C2的CALLAR的表达。蛋白L被用于染色FMC63bbz CAR。流式细胞术被用于分析原代T-细胞上的基于A2和C2的CAR。来自健康供体的新鲜分离的人T细胞用编码下面的CAR的慢病毒载体上清液转导:FMC63-bbz、A2-bbz和C2-bbz。A2bbz-mCh和C2bbz-mCh表示用编码双顺反子构建体的慢病毒载体转导的T细胞, 用于表达作为单独蛋白质的各自CAR和mCherry。CAR表达通过流式细胞术评估。简言之, T细胞在具有10%FBS的RPMI 1640培养基中培养并利用抗-CD3/抗-CD28Dynabeads (invitrogen) 刺激。刺激后24小时, 用CAR慢病毒载体上清液转导T细胞。慢病毒转导后6-8天, 根据指示利用生物素化的蛋白L抗体然后链霉亲和素PE (BD Biosciences)、抗-A2然后或山羊-抗小鼠-FITC (Jackson ImmunoResearch)、或抗-C2然后或山羊-抗小鼠-FITC (Jackson ImmunoResearch) 染色T细胞。通过流式细胞术 (LSR-II, BD) 评估CAR表达。通过使用Flowjo (Tree Star Inc) 进行流式细胞术分析。转导后, 观察到基于A2和C2结构域的CAR在转导的T细胞的细胞表面上有效地表达。

[0240] 表达这些CALLAR的T细胞分泌IFN- γ , 其中A2-CALLAR响应抗-A2抗体, 并且不响应抗-C2抗体。如预期的, C2-CALLAR T细胞响应抗-C2抗体, 并且不响应抗-A2抗体。表达CD19-特异性标准CAR的对照T细胞不响应抗-A2或抗-C2。但是, 所有CALLAR或CAR T响应利用OKT3的多克隆刺激(图4)。将用指示的CAR或CALLAR转导的T细胞平板接种在涂覆有OKT3(用于多克隆T细胞活化)、抗-A2或抗-C2的微孔上。在24小时收获上清液, 并且通过ELISA测量IFN- γ 。T细胞用慢病毒载体转导, 所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR、含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体(A2-BBz)或含C2-结构域的受体(C2-BBz)。在培养7-9天之后, 将T细胞转移至预先涂覆CD3的抗体(克隆OKT3)、抗-A2 (Green Mountain Antibodies) 和抗-C2 (Green Mountain Antibodies) 的聚苯乙烯多孔板。在37°C下孵育24小时后, 收获上清液用于通过ELISA的干扰素- γ (IFN γ) 分析。结果表明在通过抗-CD3抗体的活化之后所有T细胞能够产生IFN γ 。仅A2-BBz转导的T细胞响应于A2-特异性抗体产生IFN γ 。仅C2-BBz转导的T细胞响应于C2-特异性抗体产生IFN γ 。

[0241] CD19+ Na1m6细胞被工程化以在抗原-特异性B细胞的CALLAR模型系统中表达FVIII-特异性嵌合免疫球蛋白(图5)。人外周血T细胞用A2-FVIII-CALLAR、C2-FVIII-CALLAR、Dsg3-CAAR或CD19-CAR(对照)转导, 或非转导的T细胞(NTD)。在不同效应子与靶标(E:T)比下将T细胞与Na1m6细胞混合, 该Na1m6细胞被工程化以表达对FVIII的A2结构域特异性的表面免疫球蛋白。通过51Cr释放分析在16小时测量特异性细胞溶解百分比。

[0242] 本文其它地方描述了测定这些CALLAR响应表面免疫球蛋白的能力的研究。在一些实施方式中, K562细胞可以共表达CD79a和CD79b。

[0243] T细胞用慢病毒载体转导, 所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz)、具有CD8胞外间隔区的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (A2 (cd8) BBz) 或具有相同CD8间隔区的含C2-结构域的受体 (C2 (cd8) BBz) (图6)。在培养7-9天之后, 转导的T细胞的细胞毒活性通过4小时⁵¹Cr-释放分析使用K562靶细胞和根据指示的不同的效应子与靶细胞比 (E:T比) 评估, K562靶细胞被工程化以表达CD19 (K562-CD19)、A2特异性表面免疫球蛋白 (K562-A2) 或C2-特异性表面免疫球蛋白 (K562-C2)。表达19BBz的T细胞仅显示了针对CD19+靶K562细胞的细胞毒性。A2 (cd8) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。C2 (cd8) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。

[0244] T细胞用慢病毒载体转导, 所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz)、具有合成 (Gly)₄-Ser胞外间隔区的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (A2 (gs) BBz) 或具有相同 (Gly)₄-Ser间隔区的含C2-结构域的受体 (C2 (gs) BBz) (图7)。在培养7-9天之后, 转导的T细胞的细胞毒活性通过4小时⁵¹Cr-释放分析使用K562靶细胞和根据指示的不同的效应子与靶细胞比 (E:T比) 评估, K562靶细胞被工程化以表达CD19 (K562-CD19)、A2特异性表面免疫球蛋白 (K562-A2) 或C2-特异性表面免疫球蛋白 (K562-C2)。表达19BBz的T细胞仅显示针对CD19+靶K562细胞的细胞毒性。A2 (gs) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。C2 (gs) BBz转导的T细胞仅介导表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。

[0245] T细胞用慢病毒载体转导, 所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz)、具有KIR/DAP12信号传导的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体 (A2 (gs) KIRS2) 或具有相同KIR/DAP12信号传导的含C2-结构域的受体 (C2 (gs) KIRS2) (图8)。在培养7-9天之后, 转导的T细胞的细胞毒活性通过4小时⁵¹Cr-释放分析使用K562靶细胞和根据指示的不同的效应子与靶细胞比 (E:T比) 评估, K562靶细胞被工程化以表达CD19 (K562-CD19)、A2特异性表面免疫球蛋白 (K562-A2) 或C2-特异性表面免疫球蛋白 (K562-C2)。表达19BBz的T细胞仅显示针对CD19+靶K562细胞的细胞毒性。A2 (gs) KIRS2-转导的T细胞仅介导表达抗-A2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。C2 (gs) KIRS2-转导的T细胞仅介导表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞的细胞溶解。

[0246] T细胞用慢病毒载体转导, 所述慢病毒载体编码抗-CD19 CAR (19BBz), 具有CD8胞外间隔区 (A2 (cd8) BBz)、合成 (Gly)₄-Ser (A2 (gs) BBz) 或具有KIR/DAP12信号传导 (A2 (gs) KIRS2) 的含A2-结构域的嵌合同种异体抗体受体, 或具有相同CD8间隔区 (C2 (cd8) BBz)、合成 (Gly)₄-Ser (C2 (gs) BBz) 或具有KIR/DAP12信号传导 (C2 (gs) KIRS2) 的含C2-结构域的受体 (图9)。在培养7-9天之后, 将转导的T细胞以1:1比与K562靶细胞混合, K562靶细胞被工程化以表达CD19 (K562-CD19)、A2-特异性表面免疫球蛋白 (K562-A2) 或C2-特异性表面免疫球蛋白 (K562-C2)。涂覆有抗-CD3和抗-CD28 (CD3/28珠, Dynal) 的刺激物微珠或单独培养基分别被用作另外的阳性和阴性对照。在37°C下孵育24小时之后, 收获上清液用于通过ELISA的干扰素- γ (IFN γ) 分析。表达19BBz的T细胞仅显示了响应于CD19+靶K562细胞或CD3/28珠的增强的IFN γ 产生。A2 (cd8) BBz、A2 (gs) BBz和A2 (gs) KIRS2T细胞显示了响应于表达抗-A2

表面免疫球蛋白的K562靶细胞或阳性对照CD3/28珠的增强的IFN γ 产生。C2 (cd8) BBz、C2 (gs) BBz和C2 (gs) KIRS2T细胞显示了响应于表达抗-C2表面免疫球蛋白的K562靶细胞或阳性对照CD3/28珠的增强的IFN γ 产生。

[0247] 另外研究包括检查胞外铰链结构域以测定A2和C2的最佳结构。进一步,通过抗-A2和抗-C2抗体的活化分析将测定对跨越不同表位的抗体多么宽泛的CALLAR响应。A2和C2可能具有与完整FVIII的结合配偶体比如维勒布兰德因子(vWF)、磷脂和血小板微弱相互作用的潜能。

[0248] 在一些实施方式中,该系统提供了用于操作B细胞和浆细胞以产生对血友病A中功能性同种异体酶如FVIII的耐受的稳健方法。

[0249] SEQ ID NOS:13-28

[0250] pELPS-hFVIII-A2-BBz-T2A-mCherry (SEQ ID NO:13)

[0251]

```
GATCTATGGA GTTTGGGCTG AGCTGGCTTT TTCTTGTTGGC TATTTTAAAA GGTGTCCAGT
GCGGATCCTC AGTTGCCAAG AAGCATCCTA AAAGTTGGGT ACATTACATT GCTGCTGAAG
AGGAGGACTG GGACTATGCT CCCTTAGTCC TCGCCCCCGA TGACAGAAGT TATAAAAGTC
AATATTTGAA CAATGGCCCT CAGCGGATTG GTAGGAAGTA CAAAAAAGTC CGATTTATGG
CATACACAGA TGAAACCTTT AAGACTCGTG AAGCTATTCA GCATGAATCA GGAATCTTGG
GACCTTTACT TTATGGGGAA GTTGGAGACA CACTGTTGAT TATATTTAAG AATCAAGCAA
GCAGACCATA TAACATCTAC CCTCACGGAA TCACTGATGT CCGTCCTTTG TATTCAAGGA
```


[0252]

GATTACCAAA AGGTGTAAAA CATTTGAAGG ATTTTCCAAT TCTGCCAGGA GAAATATTCA
AATATAAATG GACAGTGACT GTAGAAGATG GGCCAACTAA ATCAGATCCT CGGTGCCTGA
CCCGCTATTA CTCTAGTTTC GTTAATATGG AGAGAGATCT AGCTTCAGGA CTCATTGGCC
CTCTCCTCAT CTGCTACAAA GAATCTGTAG ATCAAAGAGG AAACCAGATA ATGTCAGACA
AGAGGAATGT CATCCTGTTT TCTGTATTTG ATGAGAACCG AAGCTGGTAC CTCACAGAGA
ATATACAACG CTTTCTCCCC AATCCAGCTG GAGTGCAGCT TGAAGATCCA GAGTTCCAAG
CCTCCAACAT CATGCACAGC ATCAATGGCT ATGTTTTTGA TAGTTTGCAG TTGTCAGTTT
GTTTGCATGA GGTGGCATA C TGGTACATTC TAAGCATTGG AGCACAGACT GACTTCCTTT
CTGTCTTCTT CTCTGGATAT ACCTTCAAAC ACAAATGGT CTATGAAGAC ACCTCACCC
TATTTCCATT CTCAGGAGAA ACTGTCTTCA TGTCGATGGA AAACCCAGGT CTATGGATTC
TGGGGTGCCA CAACTCAGAC TTTCGGAACA GAGGCATGAC CGCCTTACTG AAGGTTTCTA
GTTGTGACAA GAACACTGGT GATTATTACG AGGACAGTTA TGAAGATATT TCAGCATACT
TGCTGAGTAA AAACAATGCC ATTGAACCAA GAGCTAGCAC CACGACGCCA GCGCCGCGAC
CACCAACACC GCGGCCACC ATCGCGTCGC AGCCCCTGTC CCTGCGCCCA GAGGCGTGCC
GGCCAGCGGC GGGGGGCGCA GTGCACACGA GGGGGCTGGA CTTGCGCTGT GATTCCGGAA
TCTACATCTG GGCCCCCTG GCCGGCACCT GTGGCGTGCT GCTGCTGTCC CTGGTCATCA
CCCTGTACTG CAAGCGGGGC AGAAAGAAGC TGCTGTACAT CTTCAAGCAG CCCTTCATGC
GGCCTGTGCA GACCACACAG GAAGAGGACG GCTGTAGCTG TAGATTCCCC GAGGAAGAGG
AAGGCGGCTG CGAGCTGAGA GTGAAGTTCA GCAGAAGCGC CGACGCCCT GCCTATCAGC
AGGGCCAGAA CCAGCTGTAC AACGAGCTGA ACCTGGGCAG ACGGGAGGAA TACGACGTGC
TGGACAAGAG AAGAGGCCGG GACCCTGAGA TGGGCGGCAA GCCCAGACGG AAGAACCCCC
AGGAAGGCCT GTATAACGAA CTGCAGAAAG ACAAGATGGC CGAGGCCTAC AGCGAGATCG
GCATGAAGGG CGAGCGGAGA AGAGGCAAGG GCCATGACGG CCTGTACCAG GGCCTGAGCA
CCGCCACCAA GGACACCTAC GACGCCCTGC ACATGCAGGC CCTGCCTCCA AGAGGCAGCG
GAGAGGGCAG AGGAAGTCTT CTAACATGCG GTGACGTGGA GGAGAATCCC GGCCCTACGC
GTATGGTGAG CAAGGGCGAG GAGGATAACA TGGCCATCAT CAAGGAGTTC ATGCGCTTCA
AGGTGCACAT GGAGGGCTCC GTGAACGGCC ACGAGTTCGA GATCGAGGGC GAGGGCGAGG
GCCGCCCTA CGAGGGCACC CAGACCGCCA AGCTGAAGGT GACCAAGGGT GGCCCCCTGC
CCTTCGCTG GGACATCCTG TCCCCTCAGT TCATGTACGG CTCCAAGGCC TACGTGAAGC
ACCCGCCGA CATCCCCGAC TACTTGAAGC TGTCCTTCCC CGAGGGCTTC AAGTGGGAGC
GCGTGATGAA CTTGAGGAC GCGGCGTG TACCGTGAC CCAGGACTCC TCCCTGCAGG
ACGGCGAGTT CATCTACAAG GTGAAGCTGC GCGGCACCAA CTTCCCCTCC GACGGCCCCG
TAATGCAGAA GAAGACCATG GGCTGGGAGG CCTCCTCCGA GCGGATGTAC CCCGAGGACG
GCGCCCTGAA GGGCGAGATC AAGCAGAGGC TGAAGCTGAA GGACGGCGGC CACTACGACG
CTGAGGTCAA GACCACCTAC AAGGCCAAGA AGCCCGTGCA GCTGCCCCGC GCCTACAACG
TCAACATCAA GTTGGACATC ACCTCCCACA ACGAGGACTA CACCATCGTG GAACAGTACG
AACGCGCCGA GGGCCGCCAC TCCACCGGCG GCATGGACGA GCTGTACAAG TAGGTCGACA
ATCAACCTCT GGATTACAAA ATTTGTGAAA GATTGACTGG TATTCTTAAC TATGTTGCTC
CTTTTACGCT ATGTGGATAC GCTGCTTTAA TGCCTTTGTA TCATGCTATT GCTTCCCGTA
TGGCTTTCAT TTTCTCCTCC TTGTATAAAT CCTGGTTGCT GTCTCTTTAT GAGGAGTTGT
GGCCCGTTGT CAGGCAACGT GGCGTGGTGT GCACTGTGTT TGCTGACGCA ACCCCCACTG
GTTGGGGCAT TGCCACCACC TGTCAGCTCC TTTCCGGGAC TTTGCTTTT CCCCTCCCTA

[0253]

```
TTGCCACGGC GGAATCATC GCCGCCTGCC TTGCCCCTG CTGGACAGGG GCTCGGCTGT
TGGGCACTGA CAATTCCGTG GTGTTGTCGG GGAAGCTGAC GTCCTTTCCA TGGCTGCTCG
CCTGTGTTGC CACCTGGATT CTGCGCGGGA CGTCCTTCTG CTACGTCCCT TCGGCCCTCA
ATCCAGCGGA CCTTCCTTCC CGCGGCCTGC TGCCGGCTCT GCGGCCTCTT CCGCGTCTTC
GCCTTCGCCC TCAGACGAGT CGGATCTCCC TTTGGGCCGC CTCCCCGCCT GGAATTCGAG
CTCGGTACCT TTAAGACCAA TGACTTACAA GGCAGCTGTA GATCTTAGCC ACTTTTTAAA
AGAAAAGGGG GGAAGTGAAG GGCTAATTCA CTCCCAACGA AGACAAGATC TGCTTTTTGC
TTGTACTGGG TCTCTCTGGT TAGACCAGAT CTGAGCCTGG GAGCTCTCTG GCTAACTAGG
GAACCCACTG CTTAAGCCTC AATAAAGCTT GCCTTGAGTG CTTCAAGTAG TGTGTGCCCG
TCTGTTGTGT GACTCTGGTA ACTAGAGATC CCTCAGACCC TTTTAGTCAG TGTGAAAAT
CTCTAGCAGT AGTAGTTCAT GTCATCTTAT TATTCAGTAT TTATAACTTG CAAAGAAATG
AATATCAGAG AGTGAGAGGA ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA
TAGCATCACA AATTTACAA ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC
CAAATCATC AATGTATCTT ATCATGTCTG GCTCTAGCTA TCCCGCCCCT AACTCCGCCC
AGTTCGCCCC ATTCTCCGCC CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG
GCCGCCTCGG CCTCTGAGCT ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGGC
TTTTGCGTCG AGACGTACCC AATTCGCCCT ATAGTGAGTC GTATTACGCG CGCTCACTGG
CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACCT AATCGCCTTG
CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT
CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCGACGC GCCCTGTAGC GGCGCATTA
GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC
CCGCTCCTTT CGCTTCTTTC CCTTCCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCGGTCAAG
CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA
AAAACTTGA TTAGGGTGAT GGTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC
GCCCTTTGAC GTTGGAGTCC ACGTTCCTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA
CACTCAACCC TATCTCGGTC TATTCTTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG ATTTTCGGCCT
ATTGGTTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC GAATTTTAAC AAAATATTAA
CGTTTACAAT TTCCAGGTG GCACTTTTTC GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCCT GATAAATGCT
TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCT CCCTTATTCC
CTTTTTTGCG GCATTTTGCC TTCCTGTTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAAGTAAA
AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG
TAAGATCCTT GAGAGTTTTT GCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT
TCTGCTATGT GCGCGGTAT TATCCCGTAT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTGCGCG
CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC
GGATGGCATG ACAGTAAGAG AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC
GGCCAACTTA CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA
CATGGGGGAT CATGTAATC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC
AAACGACGAG CGTGACACCA CGATGCCTGT AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAATATT
AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA
TAAAGTTGCA GGACCACTTC TCGCTCGGC CTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA
ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG GGTCTCGCG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA
```

[0254]

```
GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA
TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT
TTACTCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT
GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG
AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT
AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTT TGCCGGATCA
AGAGCTACCA ACTCTTTTTT CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC
TGTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC
ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT
TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG
GGGTTGCTGC ACACAGCCCA GCTTGAGCG AACGACCTAC ACCGAACCTGA GATACCTACA
GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT
AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCTGGTA
TCTTTATAGT CCTGTCGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC
GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC
CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA
CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG
CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCAATACGC AAACCGCCTC TCCCCGCGCG
TTGGCCGATT CATTAATGCA GCTGGCACGA CAGGTTTCCC GACTGGAAAG CGGGCAGTGA
GCGCAACGCA ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCAGGCTT TACACTTTAT
GTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA CAGGAAACAG
CTATGACCAT GATTACGCCA AGCGCGCAAT TAACCCTCAC TAAAGGGAAC AAAAGCTGGA
GCTGCAAGCT TAATGTAGTC TTATGCAATA CTCTTGAGT CTTGCAACAT GGTAACGATG
AGTTAGCAAC ATGCCTTACA AGGAGAGAAA AAGCACCGTG CATGCCGATT GGTGGAAGTA
AGGTGGTACG ATCGTGCCTT ATTAGGAAGG CAACAGACGG GTCTGACATG GATTGGACGA
ACCACTGAAT TGCCGCATTG CAGAGATATT GTATTTAAGT GCCTAGCTCG ATACAATAAA
CGGGTCTCTC TGGTTAGACC AGATCTGAGC CTGGGAGCTC TCTGGCTAAC TAGGGAACCC
ACTGCTTAAG CCTCAATAAA GCTTGCCTTG AGTGCTTCAA GTAGTGTGTG CCCGTCTGTT
GTGTGACTCT GGTAAC TAGA GATCCCTCAG ACCCTTTTAG TCAGTGTGGA AAATCTCTAG
CAGTGGCGCC CGAACAGGGA CCTGAAAGCG AAAGGGAAAC CAGAGCTCTC TCGACGCAGG
ACTCGGCTTG CTGAAGCGCG CACGGCAAGA GGCGAGGGGC GGCGACTGGT GAGTACGCCA
AAAATTTTGA CTAGCGGAGG CTAGAAGGAG AGAGATGGGT GCGAGAGCGT CAGTATTAAG
CGGGGGAGAA TTAGATCGCG ATGGGAAAAA ATTCGGTTAA GGCCAGGGGG AAAGAAAAAA
TATAAATTAA AACATATAGT ATGGGCAAGC AGGGAGCTAG AACGATTCGC AGTTAATCCT
GGCCTGTTAG AAACATCAGA AGGCTGTAGA CAAATACTGG GACAGCTACA ACCATCCCTT
CAGACAGGAT CAGAAGAACT TAGATCATT TATAATACAG TAGCAACCCT CTATTGTGTG
CATCAAAGGA TAGAGATAAA AGACACCAAG GAAGCTTTAG ACAAGATAGA GGAAGAGCAA
AACAAAAGTA AGACCACCGC ACAGCAAGCG GCCGCTGATC TTCAGACCTG GAGGAGGAGA
TATGAGGGAC AATTGGAGAA GTGAATTATA TAAATATAAA GTAGTAAAAA TTGAACCATT
AGGAGTAGCA CCCACCAAGG CAAAGAGAAG AGTGGTGCAG AGAGAAAAAA GAGCAGTGGG
AATAGGAGCT TTGTTCTTG GGTTCCTTGG AGCAGCAGGA AGCACTATGG GCGCAGCCTC
AATGACGCTG ACGGTACAGG CCAGACAATT ATTGTCTGGT ATAGTGCAGC AGCAGAACAA
```

[0255]

```
TTTGCTGAGG GCTATTGAGG CGCAACAGCA TCTGTTGCAA CTCACAGTCT GGGGCATCAA
GCAGCTCCAG GCAAGAATCC TGGCTGTGGA AAGATACCTA AAGGATCAAC AGCTCCTGGG
GATTTGGGGT TGCTCTGGAA AACTCATTG CACCACTGCT GTGCCCTGGA ATGCTAGTTG
GAGTAATAAA TCTCTGGAAC AGATTGGAAT CACACGACCT GGATGGAGTG GGACAGAGAA
ATTAACAATT ACACAAGCTT AATACACTCC TTAATTGAAG AATCGCAAAA CCAGCAAGAA
AAGAATGAAC AAGAATTATT GGAATTAGAT AAATGGGCAA GTTTGTGGAA TTGGTTTAAC
ATAACAAATT GGCTGTGGTA TATAAAATTA TTCATAATGA TAGTAGGAGG CTTGGTAGGT
TTAAGAATAG TTTTTGCTGT ACTTTCTATA GTGAATAGAG TTAGGCAGGG ATATTCACCA
TTATCGTTTC AGACCCACCT CCCAACCCCG AGGGGACCCG ACAGGCCCGA AGGAATAGAA
GAAGAAGGTG GAGAGAGAGA CAGAGACAGA TCCATTGAT TAGTGAACGG ATCTCGACGG
TATCGATTAG ACTGTAGCCC AGGAATATGG CAGCTAGATT GTACACATTT AGAAGGAAAA
GTTATCTTGG TAGCAGTTCA TGTAGCCAGT GGATATATAG AAGCAGAAGT AATTCCAGCA
GAGACAGGGC AAGAAACAGC ATACTTCCTC TTAAAATTAG CAGGAAGATG GCCAGTAAAA
ACAGTACATA CAGACAATGG CAGCAATTTT ACCAGTACTA CAGTTAAGGC CGCCTGTTGG
TGGGCGGGGA TCAAGCAGGA ATTTGGCATT CCCTACAATC CCCAAAGTCA AGGAGTAATA
GAATCTATGA ATAAAGAATT AAAGAAAATT ATAGGACAGG TAAGAGATCA GGCTGAACAT
CTTAAGACAG CAGTACAAAT GGCAGTATTC ATCCACAATT TTAAAAGAAA AGGGGGGATT
GGGGGGTACA GTGCAGGGGA AAGAATAGTA GACATAATAG CAACAGACAT ACAAATAAAA
GAATTACAAA AACAAATTAC AAAAATTCAA AATTTTCGGG TTTATTACAG GGACAGCAGA
GATCCAGTTT GGCTGCATTG ATCACGTGAG GCTCCGGTGC CCGTCAGTGG GCAGAGCGCA
CATCGCCAC AGTCCCCGAG AAGTTGGGGG GAGGGGTCGG CAATTGAACC GGTGCCTAGA
GAAGGTGGCG CGGGGTAAAC TGGGAAAGTG ATGTCGTGTA CTGGCTCCGC CTTTTTCCCG
AGGGTGGGGG AGAACCGTAT ATAAGTGCAG TAGTCGCCGT GAACGTTCTT TTTCGCAACG
GGTTTGCCGC CAGAACACAG GTAAGTGCCG TGTGTGGTTC CCGCGGGCCT GGCCTCTTTA
CGGGTTATGG CCCTTGCGTG CCTTGAATTA CTTCCACCTG GCTGCAGTAC GTGATTCTTG
ATCCCGAGCT TCGGGTTGGA AGTGGGTGGG AGAGTTCGAG GCCTTGCGCT TAAGGAGCCC
CTTCGCCTCG TGCTTGAGTT GAGGCCTGGC CTGGGCGCTG GGGCCGCCGC GTGCGAATCT
GGTGGCACCT TCGCGCCTGT CTCGCTGCTT TCGATAAGTC TCTAGCCATT TAAAATTTTT
GATGACCTGC TGCGACGCTT TTTTCTGCTC AAGATAGTCT TGTAATGCG GGCCAAGATC
TGCACACTGG TATTTTCGTT TTTGGGGCCG CGGGCGGCGA CGGGGCCCGT GCGTCCCAGC
GCACATGTTT GCGGAGGCGG GGCTTGCAG CGCGGCCACC GAGAATCGGA CGGGGGTAGT
CTCAAGCTGG CCGGCCTGCT CTGGTGCCTG GCCTCGCGCC GCCGTGTATC GCGCGCCCT
GGGCGGCAAG GCTGGCCCGG TCGGCACCAG TTGCGTGAGC GGAAAGATGG CCGCTTCCCG
GCCCTGCTGC AGGGAGCTCA AAATGGAGGA CGCGGCGCTC GGGAGAGCGG GCGGGTGAGT
CACCCACACA AAGGAAAAGG GCCTTTCCGT CCTCAGCCGT CGCTTCATGT GACTCCACGG
AGTACCGGGC GCCGTCCAGG CACCTCGATT AGTTCTCGAG CTTTTGGAGT ACGTCGTCTT
TAGGTTGGGG GGAGGGGTTT TATGCGATGG AGTTTCCCA CACTGAGTGG GTGGAGACTG
AAGTTAGGCC AGCTTGGCAC TTGATGTAAT TCTCCTTGGA ATTTGCCCTT TTTGAGTTTG
GATCTTGTTT CATTCTCAAG CCTCAGACAG TGGTTCAAAG TTTTTTCTT CCATTTACAG
TGTCGTGATC TAGAG
```

[0256] hFVIII-A2-BBz-T2A-mCherry (SEQ ID NO:14)

[0257]

```

MEFGLSWLFL VAILKGVQCG SSVAKKHPKT WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY
LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR
PYNIPYHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE NRSWYL TENI
QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS IGAQTD FL SV
FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC
DKNTGDYIED SYEDISAYLL SKNNAIEPRA STTTPAPRPP TPAPTIASQP LSLRPEACRP
AAGGAVHTRG LDFACDSGIY IWAPLAGTCG VLLLSLVITL YCKRGRKKLL YIFKQPFMRP
VQTTQEEDGC SCRFPEEEEG GCELRVKFSR SADAPAYQQG QNQLYNELNL GRREEYDVLD
KRRGRDPENG GKPRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM KGERRRGKGH DGLYQGLSTA
TKD TYDALHM QALPPRGSGE GRGSLTCD VEENPGPTRM VSKGEEDNMA I I KEFMRFKV
HMEG SVNGHE FEIEGEGEGR PYEGTQTAKL KVTKGGLPLF AWDILSPQFM YGSKAYVKHP
ADIPDYLKLS FPEGFKWERV MNFEDGGVVT VTQDSSLQDG EFIYKVKLRG TNFPSDGPVM
QKKTMGWEAS SERMYPEDGA LKGEIKQRLK LKDG GHYDAE VKTTYKAKKP VQLPGAYNVN
IKLDITSHNE DYTIVEQYER AEGRHSTGGM DELYK

```

[0258] hFVIII-A2-BBz-T2A (SEQ ID NO:15)

[0259]

```

MEFGLSWLFL VAILKGVQCG SSVAKKHPKT WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY
LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR
PYNIPYHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE NRSWYL TENI
QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS IGAQTD FL SV
FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC
DKNTGDYIED SYEDISAYLL SKNNAIEPRA STTTPAPRPP TPAPTIASQP LSLRPEACRP
AAGGAVHTRG LDFACDSGIY IWAPLAGTCG VLLLSLVITL YCKRGRKKLL YIFKQPFMRP
VQTTQEEDGC SCRFPEEEEG GCELRVKFSR SADAPAYQQG QNQLYNELNL GRREEYDVLD
KRRGRDPENG GKPRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM KGERRRGKGH DGLYQGLSTA
TKD TYDALHM QALPPR

```

[0260] pELPS-hFVIII-C2-BBz-T2A-mCherry (SEQ ID NO:16)

[0261]

```

GATCTATGGA GTTGGGCTG AGCTGGCTTT TTCTTG TGGC TATTTTAAAA GGTGTCCAGT
GCGGATCCAA TAGTTGCAGC ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC
AGATTACTGC TTCATCCTAC TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC
GACTTCACCT CCAAGGGAGG AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAGAGT
GGCTGCAAGT GGA CTTCAG AAGACAATGA AAGTCACAGG AGTAACTACT CAGGGAGTAA
AATCTCTGCT TACCAGCATG TATGTGAAGG AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC
ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT
CCTTCACACC TGTGGTGAAC TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC
ACCCCAGAG TTGGGTGCAC CAGATTGCCG TGAGGATGGA GGTTCTGGGC TGCAGGCAC
AGGACCTCTA CGCTAGCACC ACGACGCCAG CGCCGCGACC ACCAACACCG GCGCCACCA
TCGCGTCGCA GCCCCTGTCC CTGCGCCCAG AGGCGTGCCG GCCAGCGGCG GGGGGCGCAG
TGCACACGAG GGGGCTGGAC TTCGCCTGTG ATTCGGGAAT CTACATCTGG GCCCCTCTGG

```

[0262]

```
CCGGCACCTG TGGCGTGCTG CTGCTGTCCC TGGTCATCAC CCTGTACTGC AAGCGGGGCA
GAAAGAAGCT GCTGTACATC TTCAAGCAGC CCTTCATGCG GCCTGTGCAG ACCACACAGG
AAGAGGACGG CTGTAGCTGT AGATTCCCCG AGGAAGAGGA AGGCGGCTGC GAGCTGAGAG
TGAAGTTCAG CAGAAGCGCC GACGCCCCTG CCTATCAGCA GGGCCAGAAC CAGCTGTACA
ACGAGCTGAA CCTGGGCAGA CGGGAGGAAT ACGACGTGCT GGACAAGAGA AGAGGCCGGG
ACCCTGAGAT GGGCGGCAAG CCCAGACGGA AGAACCCCCA GGAAGGCCTG TATAACGAAC
TGCAGAAAGA CAAGATGGCC GAGGCCTACA GCGAGATCGG CATGAAGGGC GAGCGGAGAA
GAGGCAAGGG CCATGACGGC CTGTACCAGG GCCTGAGCAC CGCCACCAAG GACACCTACG
ACGCCCTGCA CATGCAGGCC CTGCCTCCAA GAGGCAGCGG AGAGGGCAGA GGAAGTCTTC
TAACATGCGG TGACGTGGAG GAGAATCCCG GCCCTACGCG TATGGTGAGC AAGGGCGAGG
AGGATAACAT GGCCATCATC AAGGAGTTCA TGCGCTTCAA GGTGCACATG GAGGGCTCCG
TGAACGGCCA CGAGTTCGAG ATCGAGGGCG AGGGCGAGGG CCGCCCCTAC GAGGGCACCC
AGACCGCCAA GCTGAAGGTG ACCAAGGGTG GCCCCCTGCC CTTGCGCTGG GACATCCTGT
CCCCTCAGTT CATGTACGGC TCCAAGGCC TACGTGAAGCA CCCC GCCGAC ATCCCCGACT
ACTTGAAGCT GTCCTTCCCC GAGGGCTTCA AGTGGGAGCG CGTGATGAAC TTCGAGGACG
GCGGCGTGGT GACCGTGACC CAGGACTCCT CCCTGCAGGA CGGCGAGTTC ATCTACAAGG
TGAAGCTGCG CGGCACCAAC TTCCCCTCCG ACGGCCCCGT AATGCAGAAG AAGACCATGG
GCTGGGAGGC CTCCTCCGAG CGGATGTACC CCGAGGACGG CGCCCTGAAG GGCAGATCA
AGCAGAGGCT GAAGCTGAAG GACGGCGGCC ACTACGACGC TGAGGTCAAG ACCACCTACA
AGGCCAAGAA GCGCGTGAG CTGCCCCGGC CCTACAACGT CAACATCAAG TTGGACATCA
CCTCCCACAA CGAGGACTAC ACCATCGTGG AACAGTACGA ACGCGCCGAG GGCCGCCACT
CCACCGGCGG CATGGACGAG CTGTACAAGT AGGTGACAAA TCAACCTCTG GATTACAAAA
TTTGTGAAAG ATTGACTGGT ATTCTTAACT ATGTTGCTCC TTTTACGCTA TGTGGATACG
CTGCTTTAAT GCCTTTGTAT CATGCTATTG CTTCCCGTAT GGCTTTTCATT TTCTCCTCCT
TGTATAAATC CTGGTTGCTG TCTCTTTATG AGGAGTTGTG GCGCGTTGTC AGGCAACGTG
GCGTGGTGTG CACTGTGTTT GCTGACGCAA CCCCCACTGG TTGGGGCATT GCCACCACCT
GTCAGCTCCT TTCCGGGACT TTCGCTTTCC CCCTCCCTAT TGCCACGGCG GAACTCATCG
CCGCCTGCCT TGCCCGCTGC TGGACAGGGG CTCGGCTGTT GGGCACTGAC AATTCCGTGG
TGTTGTGCGG GAAGCTGACG TCCTTTCCAT GGCTGCTCGC CTGTGTTGCC ACCTGGATTC
TGCGCGGGAC GTCCTTCTGC TACGTCCCTT CGGCCCTCAA TCCAGCGGAC CTTCTTCCC
GCGGCCTGCT GCCGGCTCTG CGGCCTCTTC CGCGTCTTCG CCTTCGCCCT CAGACGAGTC
GGATCTCCCT TTGGGCCGCC TCCCCGCCTG GAATTCGAGC TCGGTACCTT TAAGACCAAT
GACTTACAAG GCAGCTGTAG ATCTTAGCCA CTTTTTAAAA GAAAAGGGGG GACTGGAAGG
GCTAATTAC TCCCAACGAA GACAAGATCT GCTTTTTGCT TGTACTGGGT CTCTCTGGTT
AGACCAGATC TGAGCCTGGG AGCTCTCTGG CTAAC TAGGG AACCCACTGC TTAAGCCTCA
ATAAAGCTTG CCTTGAGTGC TTCAAGTAGT GTGTGCCCGT CTGTTGTGTG ACTCTGGTAA
CTAGAGATCC CTCAGACCCT TTAGTCAGT GTGGAAAATC TCTAGCAGTA GTAGTTCATG
TCATCTTATT ATTCAGTATT TATAACTTGC AAAGAAATGA ATATCAGAGA GTGAGAGGAA
CTTGTTTATT GCAGCTTATA ATGGTTACAA ATAAAGCAAT AGCATCACAA ATTTACAAAA
TAAAGCATTT TTTTCACTGC ATTCTAGTTG TGGTTTGTCC AAAC TCATCA ATGTATCTTA
TCATGTCTGG CTCTAGCTAT CCCGCCCTA ACTCCGCCCA GTTCCGCCCA TTCTCCGCC
CATGGCTGAC TAATTTTTTT TATTTATGCA GAGGCCGAGG CCGCCTCGGC CTCTGAGCTA
```


[0263]

```
TTCCAGAAAGT AGTGAGGAGG CTTTTTTTGA GGCCTAGGCT TTTGCGTCGA GACGTACCCA
ATTCGCCCTA TAGTGAGTCG TATTACGCGC GCTCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG
ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA
GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA
ATGGCGAATG GCGCGACGCG CCCTGTAGCG GCGCATTAAG CGCGGCGGGT GTGGTGGTTA
CGCGCAGCGT GACCGCTACA CTTGCCAGCG CCCTAGCGCC CGCTCCTTTC GCTTTCTTCC
CTTCCTTTCT CGCCACGTTC GCCGGCTTTC CCCGTCAAGC TCTAAATCGG GGGCTCCCTT
TAGGGTTCCG ATTTAGTGCT TTACGGCACC TCGACCCCAA AAAACTTGAT TAGGGTGATG
GTTACGTAAG TGGGCCATCG CCCTGATAGA CGGTTTTTCG CCCTTTGACG TTGGAGTCCA
CGTTCTTTAA TAGTGGAATC TTGTTCCAAA CTGGAACAAC ACTCAACCCT ATCTCGGTCT
ATTCTTTTGA TTTATAAGGG ATTTTGCCGA TTTCGGCCTA TTGGTTAAAA AATGAGCTGA
TTTAACAAAA ATTTAACGCG AATTTTAAACA AAATATTAAC GTTTACAATT TCCCAGGTGG
CACTTTTTCG GGAAATGTGC GCGGAACCCC TATTTGTTTA TTTTCTAAA TACATTCAAA
TATGTATCCG CTCATGAGAC AATAACCCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA
GAGTATGAGT ATTCAACATT TCCGTGTCGC CTTTATTTCC TTTTTTGCGG CATTTTGCCT
TCCTGTTTTT GCTCACCCAG AAACGCTGGT GAAAGTAAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG
TGCACGAGTG GGTTACATCG AACTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTTG AGAGTTTTCG
CCCCGAAGAA CGTTTTTCAA TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTATT
ATCCCGTATT GACGCCGGGC AAGAGCAACT CGGTGCGCGC ATACACTATT CTCAGAATGA
CTTGGTTGAG TACTCACCAG TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA
ATTATGCACT GCTGCCATAA CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAC
GATCGGAGGA CCGAAGGAGC TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC ATGTAAGTGC
CCTTGATCGT TGGGAACCGG AGCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC
GATGCCTGTA GCAATGGCAA CAACGTTGCG CAACTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCT
AGCTTCCCGG CAACAATTAA TAGACTGGAT GGAGGCGGAT AAAGTTGCAG GACCACTTCT
GCGCTCGGCC CTTCCGGCTG GCTGGTTTAT TGCTGATAAA TCTGGAGCCG GTGAGCGTGG
GTCTCGCGGT ATCATTGCAG CACTGGGGCC AGATGGTAAG CCCTCCCGTA TCGTAGTTAT
CTACACGACG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG
TGCTCACTG ATTAAGCATT GGTAAGTGTG AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT
TGATTTAAAA CTTCAATTTT AATTTAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT
CATGACCAAA ATCCCTTAAC GTGAGTTTTT GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAAA
GATCAAAGGA TCTTCTTGAG ATCCTTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT TGCAAACAAA
AAAACCACCG CTACCAGCGG TGGTTTGTTC GCCGGATCAA GAGCTACCAA CTCTTTTCC
GAAGGTAAGT GGCTTCAGCA GAGCGCAGAT ACCAAATACT GTCCTTCTAG TGTAGCCGTA
GTTAGGCCAC CACTTCAAGA ACTCTGTAGC ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT
GTTACCAGTG GCTGCTGCCA GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGGTTGG ACTCAAGACG
ATAGTTACCG GATAAGGCGC AGCGGTCGGG CTGAACGGGG GGTTCGTGCA CACAGCCCAG
CTTGGAGCGA ACGACCTACA CCGAAGTGA ATACCTACAG CGTGAGCTAT GAGAAAGCGC
CACGCTTCCC GAAGGGAGAA AGGCGGACAG GTATCCGGTA AGCGGCAGGG TCGGAACAGG
AGAGCGCACG AGGGAGCTTC CAGGGGGAAA CGCCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTCGGGTT
TCGCCACCTC TGAAGTGTGC GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG
GAAAAACGCC AGCAACGCGG CCTTTTTTAC GTTCCTGGCC TTTTGCTGGC CTTTTGCTCA
```

[0264]

```
CATGTTCTTT CCTGCGTTAT CCCCTGATTC TGTGGATAAC CGTATTACCG CCTTTGAGTG
AGCTGATACC GCTCGCCGCA GCCGAACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGGAAGC
GGAAGAGCGC CCAATACGCA AACC GCCTCT CCCC GC GCGT TGGCCGATTC ATTAATGCAG
CTGGCACGAC AGGTTTCCCG ACTGGAAAGC GGGCAGTGAG CGCAACGCAA TTAATGTGAG
TTAGCTCACT CATTAGGCAC CCCAGGCTTT ACAC TTTATG CTTCCGGCTC GTATGTTGTG
TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACAC AGGAAACAGC TATGACCATG ATTACGCCAA
GCGCGCAATT AACCTCACT AAAGGGAACA AAAGCTGGAG CTGCAAGCTT AATGTAGTCT
TATGCAATAC TCTTG TAGTC TTGCAACATG GTAACGATGA GTTAGCAACA TGCCTTACAA
GGAGAGAAAA AGCACCGTGC ATGCCGATTG GTGGAAGTAA GGTGGTACGA TCGTGCCTTA
TTAGGAAGGC AACAGACGGG TCTGACATGG ATTGGACGAA CCACTGAATT GCCGCATTGC
AGAGATATTG TATTTAAGTG CCTAGCTCGA TACAATAAAC GGGTCTCTCT GGTTAGACCA
GATCTGAGCC TGGGAGCTCT CTGGCTAACT AGGGAACCCA CTGCTTAAGC CTCAATAAAG
CTTGCCTTGA GTGCTTCAAG TAGTGTGTGC CCGTCTGTTG TGTGACTCTG GTA ACTAGAG
ATCCCTCAGA CCCTTTTAGT CAGTGTGGAA AATCTCTAGC AGTGGCGCCC GAACAGGGAC
CTGAAAGCGA AAGGGAAACC AGAGCTCTCT CGACGCAGGA CTCGGCTTGC TGAAGCGCGC
ACGGCAAGAG GCGAGGGGCG GCGACTGGTG AGTACGCCAA AAATTTTGAC TAGCGGAGGC
TAGAAGGAGA GAGATGGGTG CGAGAGCGTC AGTATTAAGC GGGGGAGAAT TAGATCGCGA
TGGGAAAAAA TTCGGTTAAG GCCAGGGGGA AAGAAAAAAT ATAAATTAAA ACATATAGTA
TGGGCAAGCA GGGAGCTAGA ACGATTGCGA GTTAATCCTG GCCTGTTAGA AACATCAGAA
GGCTGTAGAC AAATACTGGG ACAGCTACAA CCATCCCTTC AGACAGGATC AGAAGAACTT
AGATCATTAT ATAATACAGT AGCAACCCTC TATTGTGTGC ATCAAAGGAT AGAGATAAAA
GACACCAAGG AAGCTTTAGA CAAGATAGAG GAAGAGCAAA ACAAAGTAA GACCACCGCA
CAGCAAGCGG CCGCTGATCT TCAGACCTGG AGGAGGAGAT ATGAGGGACA ATTGGAGAAG
TGAATTATAT AAATATAAAG TAGTAAAAAT TGAACCATTA GGAGTAGCAC CCACCAAGGC
AAAGAGAAGA GTGGTGCAGA GAGAAAAAAG AGCAGTGGGA ATAGGAGCTT TGTTCTTGGG
GTTCTTGGGA GCAGCAGGAA GCACTATGGG CGCAGCCTCA ATGACGCTGA CGGTACAGGC
CAGACAATTA TTGTCTGGTA TAGTGCAGCA GCAGAACAAT TTGCTGAGGG CTATTGAGGC
GCAACAGCAT CTGTTGCAAC TCACAGTCTG GGCATCAAG CAGCTCCAGG CAAGAATCCT
GGCTGTGGAA AGATACCTAA AGGATCAACA GCTCCTGGGG ATTTGGGGTT GCTCTGAAAA
ACTCATTTGC ACCACTGCTG TGCCTTGGA TGCTAGTTGG AGTAATAAAT CTCTGGAACA
GATTGGAATC ACACGACCTG GATGGAGTGG GACAGAGAAA TTAACAATTA CACAAGCTTA
ATACACTCCT TAATTGAAGA ATCGCAAAAC CAGCAAGAAA AGAATGAACA AGAATTATTG
GAATTAGATA AATGGGCAAG TTTGTGGAAT TGGTTTAACA TAACAATTG GCTGTGGTAT
ATAAAATTAT TCATAATGAT AGTAGGAGGC TTGGTAGGTT TAAGAATAGT TTTTGCTGTA
CTTTCTATAG TGAATAGAGT TAGGCAGGGA TATTCACCAT TATCGTTTCA GACCCACCTC
CCAACCCCGA GGGGACCCGA CAGGCCCGAA GGAATAGAAG AAGAAGGTGG AGAGAGAGAC
AGAGACAGAT CCATTCGATT AGTGAACGGA TCTCGACGGT ATCGATTAGA CTGTAGCCCA
GGAATATGGC AGCTAGATTG TACACATTTA GAAGGAAAAG TTATCTTGGT AGCAGTTCAT
GTAGCCAGTG GATATATAGA AGCAGAAGTA ATTCCAGCAG AGACAGGGCA AGAAACAGCA
TACTTCCTCT TAAAATTAGC AGGAAGATGG CCAGTAAAAA CAGTACATAC AGACAATGGC
AGCAATTTCA CCAGTACTAC AGTTAAGGCC GCCTGTTGGT GGGCGGGGAT CAAGCAGGAA
TTTGGCATTC CCTACAATCC CCAAAGTCAA GGAGTAATAG AATCTATGAA TAAAGAATTA
```

[0265]

AAGAAAATTA TAGGACAGGT AAGAGATCAG GCTGAACATC TTAAGACAGC AGTACAAATG
 GCAGTATTCA TCCACAATTT TAAAAGAAAA GGGGGGATTG GGGGGTACAG TGCAGGGGAA
 AGAATAGTAG ACATAATAGC AACAGACATA CAAACTAAAG AATTACAAAA ACAAAATTACA
 AAAATTCAAA ATTTTCGGGT TTATTACAGG GACAGCAGAG ATCCAGTTTG GCTGCATTGA
 TCACGTGAGG CTCCGGTGCC CGTCAGTGGG CAGAGCGCAC ATCGCCACACA GTCCCCGAGA
 AGTTGGGGGG AGGGGTCGGC AATTGAACCG GTGCCTAGAG AAGGTGGCGC GGGGTAAACT
 GGGAAAGTGA TGTCGTGTAC TGGCTCCGCC TTTTTCCTCGA GGGTGGGGGA GAACCGTATA
 TAAGTGCACT AGTCGCCGTG AACGTTCTTT TTCGCAACGG GTTTGCCGCC AGAACACAGG
 TAAGTGCCGT GTGTGGTTCC CGCGGGCCTG GCCTCTTTAC GGGTTATGGC CCTTGCGTGC
 CTTGAATTAC TTCCACCTGG CTGCAGTACG TGATTCTTGA TCCCGAGCTT CGGGTTGGAA
 GTGGGTGGGA GAGTTCGAGG CCTTGCGCTT AAGGAGCCCC TTCGCCTCGT GCTTGAGTTG
 AGGCCTGGCC TGGGCGCTGG GGCCGCCGCG TCGCAATCTG GTGGCACCTT CGCGCCTGTC
 TCGCTGCTTT CGATAAGTCT CTAGCCATTT AAAATTTTTG ATGACCTGCT GCGACGCTTT
 TTTTCTGGCA AGATAGTCTT GTAAATGCGG GCCAAGATCT GCACACTGGT ATTTTCGGTTT
 TTGGGGCCGC GGGCGGCGAC GGGGCCCGTG CGTCCAGCG CACATGTTCG GCGAGGCGGG
 GCCTGCGAGC GCGGCCACCG AGAATCGGAC GGGGGTAGTC TCAAGCTGGC CGGCCTGCTC
 TGGTGCCCTG CCTCGCGCCG CCGTGTATCG CCCC GCCCTG GGCGGCAAGG CTGGCCCGGT
 CGGCACCACT TGCCTGAGCG GAAAGATGGC CGCTTCCCGG CCCTGCTGCA GGGAGCTCAA
 AATGGAGGAC GCGGCGCTCG GGAGAGCGGG CGGGTGAGTC ACCCACACAA AGGAAAAGGG
 CCTTTCCGTC CTCAGCCGTC GCTTCATGTG ACTCCACGGA GTACCGGGCG CCGTCCAGGC
 ACCTCGATTA GTTCTCGAGC TTTTGGAGTA CGTCGTCTTT AGGTTGGGGG GAGGGGTTTT
 ATGCGATGGA GTTTCCCCAC ACTGAGTGGG TGGAGACTGA AGTTAGGCCA GCTTGGCACT
 TGATGTAATT CTCCTTGGA TTTGCCCTTT TTGAGTTTGG ATCTTGTTTC ATTCTCAAGC
 CTCAGACAGT GGTTCAAAGT TTTTCTTTC CATTTCAGGT GTCGTGATCT AGAG

[0266] pELPS-hFVIII-C2-BBz-T2A-mCherry (SEQ ID NO:17)

[0267]

MEFGLSWLFL VAILKGVQCG SNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF ATWSPSKARL
 HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ
 WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVNSLDPP LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD
 LYASTTTPAP RPPTPAPTIA SQPLSLRPEA CRPAAGGAVH TRGLDFACDS GIYIWAPLAG
 TCGVLLLSLV ITLYCKRGRK KLLYIFKQPF MRPVQTTQEE DGCSCRFPEE EEGGCEL RVK
 FSR SADAPAY QQGQNQLYNE LNLGRREEYD VLDKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQ
 KDKMAEAYSE IGMKGERRRG KGH DGLYQGL STATKDTYDA LHMQALPPRG SGEGRGSLLT
 CGDVEENPGP TRMVSKGEED NMAI I KEFMR FKVHMEGSVN GHEFEIEGEG EGRPYEGTQT
 AKLKVTGGP LPFAWDILSP QFMYGSKAYV KHPADIPDYL KLSFPEGFKW ERVMNFEDGG
 VVTVTQDSSL QDGEFIYKVK LRGTNFPDSDG PVMQKKTMGW EASSERMYPE DGALKGEIKQ
 RLKLKDGGHY DAEVKTTYKA KKPVLPGAY NVNIKLDITS HNEDYTIVEQ YERAEGRHST
 GGMDELYK

[0268] hFVIII-C2-BBz (SEQ ID NO:18)

[0269]

MEFGLSWLFL VAILKGVQCG SNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF ATWSPSKARL
 HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ

[0270]

WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVNSLDPP LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD
LYASTTTPAP RPPTPAPTIA SQPLSLRPEA CRPAAGGAVH TRGLDFACDS GIYIWAPLAG
TCGVLLLSLV ITLYCKRGRK KLLYIFKQPF MRPVQTTQEE DGCSCRFPPEE EEGGCELRVK
FSRSADAPAY QQGQNQLYNE LNLGRREEYD VLDKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQ
KDKMAEAYSE IGMKGERRRG KGHGGLYQGL STATKDTYDA LHMQUALPPR

[0271] pTRPE-hFVIII-A2-BBz (SEQ ID NO:19)

[0272]

GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTTC
GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT TCTGCTATGT GGCGCGGTAT
TATCCCGTAT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG CATACTAT TCTCAGAATG
ACTTGGTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG
AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACTTA CTTCTGACAA
CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGACAAA CATGGGGGAT CATGTAAGTC
GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC AAACGACGAG CGTGACACCA
CGATGCCTGT AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACCTAT AACTGGCGAA CTACTTACTC
TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC
TGCGCTCGGC CCTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG
GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA
TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA TAGACAGATC GCTGAGATAG
GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT TTAATCATAT ATACTTTAGA
TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC
TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA
AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA
AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTG TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTTC
CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTTCTTCTA GTGTAGCCGT
AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC
TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC
GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA
GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG
CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG
GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGCGGT
TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT
GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCTTGGC CTTTTGCTGG CTTTTTGCTC
ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT
GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG
CGGAAGAGCG CCAATACGCG AAACCGCCTC TCCC CGCGCG TTGGCCGATT CATTAATGCA
GCTGGCACGA CAGGTTTCCC GACTGGAAAG CGGGCAGTGA GCGCAACGCA ATTAATGTGA
GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT
GTGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA
AGCGCGCAAT TAACCTCAC TAAAGGGAAC AAAAGCTGGA GCTGCAAGCT TAATGTAGTC
TTATGCAATA CTCTTGTAGT CTTGCAACAT GGTAACGATG AGTTAGCAAC ATGCCTTACA
AGGAGAGAAA AAGCACCGTG CATGCCGATT GGTGGAAGTA AGGTGGTACG ATCGTGCTT

[0273]

ATTAGGAAGG	CAACAGACGG	GTCTGACATG	GATTGGACGA	ACCACTGAAT	TGCCGCATTG
CAGAGATATT	GTATTTAAGT	GCCTAGCTCG	ATACATAAAC	GGGTCTCTCT	GGTTAGACCA
GATCTGAGCC	TGGGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGGGAACCCA	CTGCTTAAGC	CTCAATAAAG
CTTGCCTTGA	GTGCTTCAAG	TAGTGTGTGC	CCGTCTGTTG	TGTGACTCTG	GTAAC TAGAG
ATCCCTCAGA	CCCTTTTAGT	CAGTGTGGAA	AATCTCTAGC	AGTGGCGCCC	GAACAGGGAC
TTGAAAGCGA	AAGGGAAACC	AGAGGAGCTC	TCTCGACGCA	GGACTCGGCT	TGCTGAAGCG
CGCACGGCAA	GAGGCGAGGG	GCGGCGACTG	GTGAGTACGC	CAAAAATTTT	GACTAGCGGA
GGCTAGAAGG	AGAGAGATGG	GTGCGAGAGC	GTCAGTATTA	AGCGGGGGAG	AATTAGATCG
CGATGGGAAA	AAATTCGGTT	AAGGCCAGGG	GGAAAGAAAA	AATATAAATT	AAAACATATA
GTATGGGCAA	GCAGGGAGCT	AGAACGATTC	GCAGTTAATC	CTGGCCTGTT	AGAAACATCA
GAAGGCTGTA	GACAAATACT	GGGACAGCTA	CAACCATCCC	TTCAGACAGG	ATCAGAAGAA
CTTAGATCAT	TATATAATAC	AGTAGCAACC	CTCTATTGTG	TGCATCAAAG	GATAGAGATA
AAAGACACCA	AGGAAGCTTT	AGACAAGATA	GAGGAAGAGC	AAAACAAAAG	TAAGACCACC
GCACAGCAAG	CGGCCGCTGA	TCTTCAGACC	TGGAGGAGGA	GATATGAGGG	ACAATTGGAG
AAGTGAATTA	TATAAATATA	AAGTAGTAAA	AATTGAACCA	TTAGGAGTAG	CACCCACCAA
GGCAAAGAGA	AGAGTGGTGC	AGAGAGAAAA	AAGAGCAGTG	GGAATAGGAG	CTTTGTTTCT
TGGGTTCTTG	GGAGCAGCAG	GAAGCACTAT	GGGCGCAGCG	TCAATGACGC	TGACGGTACA
GGCCAGACAA	TTATTGTCTG	GTATAGTGCA	GCAGCAGAAC	AATTTGCTGA	GGGCTATTGA
GGCGCAACAG	CATCTGTTGC	AACTCACAGT	CTGGGGCATC	AAGCAGCTCC	AGGCAAGAAT
CCTGGCTGTG	GAAAGATACC	TAAAGGATCA	ACAGCTCCTG	GGGATTTGGG	GTTGCTCTGG
AAAAC TCA TT	TGCACCACTG	CTGTGCCTTG	GAATGCTAGT	TGGAGTAATA	AATCTCTGGA
ACAGATTTGG	AATCACACGA	CCTGGATGGA	GTGGGACAGA	GAAATTAACA	ATTACACAAG
CTTAATACAC	TCCTTAATTG	AAGAATCGCA	AAACCAGCAA	GAAAAGAATG	AACAAGAATT
ATTGGAATTA	GATAAATGGG	CAAGTTTGTG	GAATTGGTTT	AACATAACAA	ATTGGCTGTG
GTATATAAAA	TTATTCATAA	TGATAGTAGG	AGGCTTGGTA	GGTTTAAGAA	TAGTTTTTGC
TGTACTTTCT	ATAGTGAATA	GAGTTAGGCA	GGGATATTCA	CCATTATCGT	TTCAGACCCA
CCTCCCAACC	CCGAGGGGAC	CCGACAGGCC	CGAAGGAATA	GAAGAAGAAG	GTGGAGAGAG
AGACAGAGAC	AGATCCATTC	GATTAGTGAA	CGGATCTCGA	CGGTATCGAT	TAGACTGTAG
CCCAGGAATA	TGGCAGCTAG	ATTGTACACA	TTTAGAAGGA	AAAGTTATCT	TGGTAGCAGT
TCATGTAGCC	AGTGGATATA	TAGAAGCAGA	AGTAATTCCA	GCAGAGACAG	GGCAAGAAAC
AGCATACTTC	CTCTTAAAAT	TAGCAGGAAG	ATGGCCAGTA	AAAACAGTAC	ATACAGACAA
TGGCAGCAAT	TTCACCAGTA	CTACAGTTAA	GGCCGCCTGT	TGGTGGGCGG	GGATCAAGCA
GGAATTTGGC	ATTCCCTACA	ATCCCCAAAG	TCAAGGAGTA	ATAGAATCTA	TGAATAAAGA
ATTAAAGAAA	ATTATAGGAC	AGGTAAGAGA	TCAGGCTGAA	CATCTTAAGA	CAGCAGTACA
AATGGCAGTA	TTCATCCACA	ATTTTAAAAG	AAAAGGGGGG	ATTGGGGGGT	ACAGTGCAGG
GGAAAGAATA	GTAGACATAA	TAGCAACAGA	CATACAAACT	AAAGAATTAC	AAAAACAAAT
TACAAAAATT	CAAAAATTTT	GGGTTTATTA	CAGGGACAGC	AGAGATCCAG	TTTGGCTGCA
TACGCGTCGT	GAGGCTCCGG	TGCCCCTCAG	TGGGCAGAGC	GCACATCGCC	CACAGTCCCC
GAGAAGTTGG	GGGGAGGGGT	CGGCAATTGA	ACCGGTGCCT	AGAGAAGGTG	GCGCGGGGTA
AACTGGGAAA	GTGATGTCGT	GTACTGGCTC	CGCCTTTTTT	CCGAGGGTGG	GGGAGAACCG
TATATAAGTG	CAGTAGTCGC	CGTGAACGTT	CTTTTTTCGCA	ACGGGTTTGC	CGCCAGAACA
CAGGTAAGTG	CCGTGTGTGG	TTCCCGCGGG	CCTGGCCTCT	TTACGGGTTA	TGGCCCTTGC

[0274]

GTGCCTTGAA	TTACTTCCAC	CTGGCTGCAG	TACGTGATTC	TTGATCCCGA	GCTTCGGGTT
GGAAGTGGGT	GGGAGAGTTC	GAGGCCTTGC	GCTTAAGGAG	CCCCTTCGCC	TCGTGCTTGA
GTTGAGGCCT	GGCCTGGGCG	CTGGGGCCGC	CGCGTGCGAA	TCTGGTGGCA	CCTTCGCGCC
TGTCTCGCTG	CTTTCGATAA	GTCTCTAGCC	ATTTAAAATT	TTTGATGACC	TGCTGCGACG
CTTTTTTTCT	GGCAAGATAG	TCTTGTAAT	GCGGGCCAAG	ATCTGCACAC	TGGTATTTTCG
GTTTTTTGGG	CCGCGGGCGG	CGACGGGGCC	CGTGCGTCCC	AGCGCACATG	TTCGGCGAGG
CGGGGCCTGC	GAGCGCGGCC	ACCGAGAATC	GGACGGGGGT	AGTCTCAAGC	TGGCCGGCCT
GCTCTGGTGC	CTGGCCTCGC	GCCGCCGTGT	ATCGCCCCGC	CCTGGGCGGC	AAGGCTGGCC
CGGTCGGCAC	CAGTTGCGTG	AGCGGAAAGA	TGGCCGCTTC	CCGGCCCTGC	TGCAGGGAGC
TCAAAATGGA	GGACGCGGCG	CTCGGGAGAG	CGGGCGGGTG	AGTCACCCAC	ACAAAGGAAA
AGGGCCTTTC	CGTCCTCAGC	CGTCGCTTCA	TGTGACTCCA	CTGAGTACCG	GGCGCCGTCC
AGGCACCTCG	ATTAGTTCTC	GTGCTTTTGG	AGTACGTCGT	CTTTAGGTTG	GGGGGAGGGG
TTTTATGCGA	TGGAGTTTCC	CCACACTGAG	TGGGTGGAGA	CTGAAGTTAG	GCCAGCTTGG
CACTTGATGT	AATTCTCCTT	GGAATTTGCC	CTTTTTGAGT	TTGGATCTTG	GTTCAATTCTC
AAGCCTCAGA	CAGTG GTTCA	AAGTTTTTTT	CTTCCATTTT	AGGTGTCGTG	AGCTAGAGCC
ACCATGGAGT	TTGGGCTGAG	CTGGCTTTTT	CTTGTGGCTA	TTTTAAAAGG	TGTCCAGTGC
GGATCCTCAG	TTGCCAAGAA	GCATCCTAAA	ACTTGGGTAC	ATTACATTGC	TGCTGAAGAG
GAGGACTGGG	ACTATGCTCC	CTTAGTCCTC	GCCCCGATG	ACAGAAGTTA	TAAAAGTCAA
TATTTGAACA	ATGGCCCTCA	GCGGATTGGT	AGGAAGTACA	AAAAAGTCCG	ATTTATGGCA
TACACAGATG	AAACCTTTAA	GACTCGTGAA	GCTATTCAGC	ATGAATCAGG	AATCTTGGGA
CCTTTACTTT	ATGGGGAAGT	TGGAGACACA	CTGTTGATTA	TATTTAAGAA	TCAAGCAAGC
AGACCATATA	ACATCTACCC	TCACGGAATC	ACTGATGTCC	GTCTTTTGTA	TTCAAGGAGA
TTACCAAAAG	GTGTAAAACA	TTTGAAGGAT	TTTCCAATTC	TGCCAGGAGA	AATATTCAAA
TATAAATGGA	CAGTGACTGT	AGAAGATGGG	CCAACTAAAT	CAGATCCTCG	GTGCCTGACC
CGCTATTACT	CTAGTTTCGT	TAATATGGAG	AGAGATCTAG	CTTCAGGACT	CATTGGCCCT
CTCCTCATCT	GCTACAAAGA	ATCTGTAGAT	CAAAGAGGAA	ACCAGATAAT	GTCAGACAAG
AGGAATGTCA	TCCTGTTTTT	TGTATTTGAT	GAGAACCGAA	GCTGGTACCT	CACAGAGAAT
ATACAACGCT	TTCTCCCCAA	TCCAGCTGGA	GTGCAGCTTG	AAGATCCAGA	GTTCCAAGCC
TCCAACATCA	TGCACAGCAT	CAATGGCTAT	GTTTTTGATA	GTTTGCAGTT	GTCAGTTTGT
TTGCATGAGG	TGGCATACTG	GTACATTCTA	AGCATTGGAG	CACAGACTGA	CTTCCTTTCT
GTCTTCTTCT	CTGGATATAC	CTTCAAACAC	AAAATGGTCT	ATGAAGACAC	ACTCACCTTA
TTCCCATTCT	CAGGAGAAAC	TGTCTTCATG	TCGATGGAAA	ACCCAGGTCT	ATGGATTCTG
GGGTGCCACA	ACTCAGACTT	TCGGAACAGA	GGCATGACCG	CCTTACTGAA	GGTTTCTAGT
TGTGACAAGA	ACACTGGTGA	TTATTACGAG	GACAGTTATG	AAGATATTTT	AGCATACTTG
CTGAGTAAAA	ACAATGCCAT	TGAACCAAGA	GCTAGCACCA	CGACGCCAGC	GCCGCGACCA
CCAACACCGG	CGCCACCAT	CGCGTCGCAG	CCCCTGTCCC	TGCGCCCAGA	GGCGTGCCGG
CCAGCGGCGG	GGGGCGCAGT	GCACACGAGG	GGGCTGGACT	TCGCCTGTGA	TTCCGGAATC
TACATCTGGG	CCCCTCTGGC	CGGCACCTGT	GGCGTGCTGC	TGCTGTCCCT	GGTCATCACC
CTGTACTGCA	AGCGGGGCAG	AAAGAAGCTG	CTGTACATCT	TCAAGCAGCC	CTTCATGCGG
CCTGTGCAGA	CCACACAGGA	AGAGGACGGC	TGTAGCTGTA	GATTCCTCGA	GGAAGAGGAA
GGCGGCTGCG	AGCTGAGAGT	GAAGTTCAGC	AGAAGCGCCG	ACGCCCTGTC	CTATCAGCAG
GGCCAGAACC	AGCTGTACAA	CGAGCTGAAC	CTGGGCAGAC	GGGAGGAATA	CGACGTGCTG

[0275]

GACAAGAGAA GAGGCCGGGA CCCTGAGATG GCGCGCAAGC CCAGACGGAA GAACCCCCAG
GAAGGCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCCTACAG CGAGATCGGC
ATGAAGGGCG AGCGGAGAAG AGGCAAGGGC CATGACGGCC TGTACCAGGG CCTGAGCACC
GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCCC TGCCTCCAAG ATGAGTCGAC
AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA CTATGTTGCT
CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT ATCATGCTAT TGCTTCCCGT
ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG
TGGCCCCGTTG TCAGGCAACG TGGCGTGGTG TGCCTGTGT TTGCTGACGC AACCCCCACT
GGTTGGGGCA TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCCGCT GCTGGACAGG GGCTCGGCTG
TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCT GGAAGCTGA CGTCCCTTCC TTGGCTGCTC
GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC
AATCCAGCGG ACCTTCCTTC CCGCGGCCTG CTGCCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGTCTT
CGCCTTCGCC CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CCTCCCCGCC TGAATTTCGA
GCTCGGTACC TTTAAGACCA ATGACTTACA AGGCAGCTGT AGATCTTAGC CACTTTTTTAA
AAGAAAAGGG GGGACTGGAA GGGCTAATTC ACTCCCAACG AAGACAAGAT CTGCTTTTTG
CTTGTACTGG GTCTCTCTGG TTAGACCAGA TCTGAGCCTG GGAGCTCTCT GGCTAACTAG
GGAACCCACT GCTTAAGCCT CAATAAAGCT TGCCTTGAGT GCTTCAAGTA GTGTGTGCCC
GTCTGTTGTG TGA CTCTGGT AACTAGAGAT CCCTCAGACC CTTTTAGTCA GTGTGAAAA
TCTCTAGCAG TAGTAGTTCA TGTCTCTTA TTATTCAGTA TTTATAACTT GCAAAGAAAT
GAATATCAGA GAGTGAGAGG AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT
CCAAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGCTCTAGCT ATCCCGCCCC TAACTCCGCC
CAGTTCCGCC CATCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA
GGCCGCCTCG GCCTCTGAGC TATTCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTTG GAGGCCTAGC
TAGGGACGTA CCAATTCGC CCTATAGTGA GTCGTATTAC GCGCGCTCAC TGGCCGTCGT
TTTACAACGT CGTGACTGGG AAAACCCTGG CGTTACCCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACA
TCCCCCTTTC GCCAGCTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC ACCGATCGCC CTTCCCAACA
GTTGCGCAGC CTGAATGGCG AATGGGACGC GCCCTGTAGC GGCGCATTAA GCGCGGCGGG
TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC CCGCTCCTTT
CGCTTTCTTC CTTCTCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCGGTCAAG CTCTAAATCG
GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCA AAAA ACTTGA
TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GCCCTTGAC
GTTGGAGTCC ACGTTCTTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA CACTCAACCC
TATCTCGGTC TATCTTTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG ATTTTCGGCCT ATTGGTTAAA
AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC GAATTTTAAC AAAATATTAA CGCTTACAAT
TTAGGTGGCA CTTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA
CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA
AAAAGGAAGA GTATGAGTAT TCAACATTTT CGTGTCGCCC TTATTCCCTT TTTTGC GGCA
TTTTGCCTTC CTGTTTTTGC TCACCCAGAA ACGCTGGTGA AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT
CAGTTGG

[0276] pTRPE-hFVIII-C2-BBz (SEQ ID NO:20)

[0277]

GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTTC
GCCCCGAAGA ACGTTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTTAAAGT TCTGCTATGT GGC GCGGTAT
TATCCCGTAT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG CATACTAT TCTCAGAATG
ACTTG GTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG
AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACCTTA CTTCTGACAA
CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA CATGGGGGAT CATGTAATC
GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC AAACGACGAG CGTGACACCA
CGATGCCTGT AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACCTATT AACTGGCGAA CTACTTACTC
TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC
TGCGCTCGGC CCTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG
GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA
TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA TAGACAGATC GCTGAGATAG
GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT TTA CTAT ATACTTTAGA
TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC
TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA
AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA
AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTTC
CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTTCTTCTA GTGTAGCCGT
AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC
TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC
GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA
GCTTGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG
CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG
GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGCGGT
TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT
GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCCCTGGC CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC
ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT
GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG
CGGAAGAGCG CCAATACGC AAACCGCCTC TCCCCGCGCG TTGGCCGATT CATTAATGCA
GCTGGCACGA CAGGTTTCCC GACTGGAAAG CGGGCAGTGA GCGCAACGCA ATTAATGTGA
GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT
GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA
AGCGCGCAAT TAACCCTCAC TAAAGGGAAC AAAAGCTGGA GCTGCAAGCT TAATGTAGTC
TTATGCAATA CTCTTGTAGT CTTGCAACAT GGTAACGATG AGTTAGCAAC ATGCCTTACA
AGGAGAGAAA AAGCACC GTG CATGCCGATT GGTGGAAGTA AGGTGGTACG ATCGTGCTT
ATTAGGAAG CAACAGACGG GTCTGACATG GATTGGACGA ACCACTGAAT TGCCGCATTG
CAGAGATATT GTATTTAAGT GCCTAGCTCG ATACATAAAC GGGTCTCTCT GGTAGACCA
GATCTGAGCC TGGGAGCTCT CTGGCTAACT AGGGAACCCA CTGCTTAAGC CTCAATAAAG
CTTGCTTGA GTGCTTCAAG TAGTGTGTGC CCGTCTGTTG TGTGACTCTG GTA ACTAGAG
ATCCCTCAGA CCCTTTTAGT CAGTGTGGAA AATCTCTAGC AGTGGCGCCC GAACAGGGAC
TTGAAAGCGA AAGGGAAACC AGAGGAGCTC TCTCGACGCA GGACTCGGCT TGCTGAAGCG

[0278]

CGCACGGCAA GAGGCGAGGG GCGGCGACTG GTGAGTACGC CAAAAATTTT GACTAGCGGA
GGCTAGAAGG AGAGAGATGG GTGCGAGAGC GTCAGTATTA AGCGGGGGAG AATTAGATCG
CGATGGGAAA AAATTCGGTT AAGGCCAGGG GGAAAGAAAA AATATAAATT AAAACATATA
GTATGGGCAA GCAGGGAGCT AGAACGATTC GCAGTTAATC CTGGCCTGTT AGAAACATCA
GAAGGCTGTA GACAAATACT GGGACAGCTA CAACCATCCC TTCAGACAGG ATCAGAAGAA
CTTAGATCAT TATATAATAC AGTAGCAACC CTCTATTGTG TGCATCAAAG GATAGAGATA
AAAGACACCA AGGAAGCTTT AGACAAGATA GAGGAAGAGC AAAACAAAAG TAAGACCACC
GCACAGCAAG CGGCCGCTGA TCTTCAGACC TGGAGGAGGA GATATGAGGG ACAATTGGAG
AAGTGAATTA TATAAATATA AAGTAGTAAA AATTGAACCA TTAGGAGTAG CACCCACCAA
GGCAAAGAGA AGAGTGGTGC AGAGAGAAAA AAGAGCAGTG GGAATAGGAG CTTTGTTCCT
TGGGTTCTTG GGAGCAGCAG GAAGCACTAT GGGCGCAGCG TCAATGACGC TGACGGTACA
GGCCAGACAA TTATTGTCTG GTATAGTGCA GCAGCAGAAC AATTGTCTGA GGGCTATTGA
GGCGCAACAG CATCTGTTGC AACTCACAGT CTGGGGCATC AAGCAGCTCC AGGCAAGAAT
CCTGGCTGTG GAAAGATACC TAAAGGATCA ACAGCTCCTG GGGATTTGGG GTTGCTCTGG
AAAACCTCATT TGCACCACTG CTGTGCCTTG GAATGCTAGT TGGAGTAATA AATCTCTGGA
ACAGATTTGG AATCACACGA CCTGGATGGA GTGGGACAGA GAAATTAACA ATTACACAAG
CTTAATACAC TCCTTAATTG AAGAATCGCA AAACCAGCAA GAAAAGAATG AACAAGAATT
ATTGGAATTA GATAAATGGG CAAGTTTGTG GAATTGGTTT AACATAACAA ATTGGCTGTG
GTATATAAAA TTATTCATAA TGATAGTAGG AGGCTTGGTA GGTTTAAGAA TAGTTTTTGC
TGTACTTTCT ATAGTGAATA GAGTTAGGCA GGGATATTCA CCATTATCGT TTCAGACCCA
CCTCCCAACC CCGAGGGGAC CCGACAGGCC CGAAGGAATA GAAGAAGAAG GTGGAGAGAG
AGACAGAGAC AGATCCATTC GATTAGTGAA CGGATCTCGA CGGTATCGAT TAGACTGTAG
CCCAGGAATA TGGCAGCTAG ATTGTACACA TTTAGAAGGA AAAGTTATCT TGGTAGCAGT
TCATGTAGCC AGTGGATATA TAGAAGCAGA AGTAATTCCA GCAGAGACAG GGCAAGAAAC
AGCATACTTC CTCTTAAAT TAGCAGGAAG ATGGCCAGTA AAAACAGTAC ATACAGACAA
TGGCAGCAAT TTCACCAGTA CTACAGTTAA GGCCGCCTGT TGGTGGGCGG GGATCAAGCA
GGAATTTGGC ATTCCCTACA ATCCCCAAAG TCAAGGAGTA ATAGAATCTA TGAATAAAGA
ATTAAAGAAA ATTATAGGAC AGGTAAGAGA TCAGGCTGAA CATCTTAAGA CAGCAGTACA
AATGGCAGTA TTCATCCACA ATTTTAAAAG AAAAGGGGGG ATTGGGGGGT ACAGTGCAGG
GGAAAGAATA GTAGACATAA TAGCAACAGA CATACAAAC AAAGAATTAC AAAAACAAAT
TACAAAAATT CAAAATTTTC GGGTTTATTA CAGGGACAGC AGAGATCCAG TTTGGCTGCA
TACGCGTCGT GAGGCTCCGG TGCCCGTCAG TGGGCAGAGC GCACATCGCC CACAGTCCCC
GAGAAGTTGG GGGGAGGGGT CGGCAATTGA ACCGGTGCCT AGAGAAGGTG GCGCGGGGTA
AACTGGGAAA GTGATGTCGT GTACTGGCTC CGCCTTTTTC CCGAGGGTGG GGGAGAACCG
TATATAAGTG CAGTAGTCGC CGTGAACGTT CTTTTTCGCA ACGGGTTTGC CGCCAGAACA
CAGGTAAGTG CCGTGTGTGG TTCCCGCGGG CCTGGCCTCT TTACGGGTTA TGGCCCTTGC
GTGCCTTGAA TTA CTCTCCAC CTGGCTGCAG TACGTGATTC TTGATCCCGA GCTTCGGGTT
GGAAGTGGGT GGGAGAGTTC GAGGCCTTGC GCTTAAGGAG CCCCTTCGCC TCGTGCTTGA
GTTGAGGCCT GGCCTGGGCG CTGGGGCCGC CGCGTGCGAA TCTGGTGGCA CCTTCGCGCC
TGTCTCGCTG CTTTCGATAA GTCTCTAGCC ATTTAAAATT TTTGATGACC TGCTGCGACG
CTTTTTTTCT GGCAAGATAG TCTTGTAAT GCGGGCCAAG ATCTGCACAC TGGTATTTTCG
GTTTTTGGG CCGCGGGCGG CGACGGGGCC CGTGCGTCCC AGCGCACATG TTCGGCGAGG

[0279]

```
CGGGGCCTGC GAGCGCGGCC ACCGAGAATC GGACGGGGGT AGTCTCAAGC TGGCCGGCCT
GCTCTGGTGC CTGGCCTCGC GCCGCCGTGT ATCGCCCCGC CCTGGGCGGC AAGGCTGGCC
CGGTCGGCAC CAGTTGCGTG AGCGGAAAGA TGGCCGCTTC CCGGCCCTGC TGCAGGGAGC
TCAAAATGGA GGACGCGGCG CTCGGGAGAG CGGGCGGGTG AGTCACCCAC ACAAAGGAAA
AGGGCCTTTC CGTCCTCAGC CGTCGCTTCA TGTGACTCCA CTGAGTACCG GGCGCCGTCC
AGGCACCTCG ATTAGTTCTC GTGCTTTTGG AGTACGTCGT CTTTAGGTTG GGGGGAGGGG
TTTTATGCGA TGGAGTTTCC CCACACTGAG TGGGTGGAGA CTGAAGTTAG GCCAGCTTGG
CACTTGATGT AATTCTCCTT GGAATTTGCC CTTTTTGAGT TTGGATCTTG GTTCATTCTC
AAGCCTCAGA CAGTGGTTCA AAGTTTTTTT CTTCCATTTT AGGTGTCGTG AGCTAGAGCC
ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTTT CTTGTGGCTA TTTTAAAAGG TGTCCAGTGC
GGATCCAATA GTTGCAGCAT GCCATTGGGA ATGGAGAGTA AAGCAATATC AGATGCACAG
ATTACTGCTT CATCCTACTT TACCAATATG TTTGCCACCT GGTCTCCTTC AAAAGCTCGA
CTTACCTCC AAGGGAGGAG TAATGCCTGG AGACCTCAGG TGAATAATCC AAAAGAGTGG
CTGCAAGTGG ACTTCCAGAA GACAATGAAA GTCACAGGAG TAACTACTCA GGGAGTAAAA
TCTCTGCTTA CCAGCATGTA TGTGAAGGAG TTCCTCATCT CCAGCAGTCA AGATGGCCAT
CAGTGGACTC TCTTTTTTCA GAATGGCAAA GTAAAGGTTT TTCAGGGAAA TCAAGACTCC
TTCACACCTG TGGTGAAGTC TCTAGACCCA CCGTTACTGA CTCGCTACCT TCGAATTCAC
CCCCAGAGTT GGGTGCACCA GATTGCCCTG AGGATGGAGG TTCTGGGCTG CGAGGCACAG
GACCTCTACG CTAGCACCAC GACGCCAGCG CCGCGACCAC CAACACCGGC GCCCACCATC
GCGTCGCAGC CCCTGTCCCT GCGCCCAGAG GCGTGCCGGC CAGCGGCGGG GGGCGCAGTG
CACACGAGGG GGCTGGACTT CGCCTGTGAT TCCGGAATCT ACATCTGGGC CCCTCTGGCC
GGCACCTGTG GCGTGCTGCT GCTGTCCCTG GTCATCACCC TGTACTGCAA GCGGGGCAGA
AAGAAGCTGC TGTACATCTT CAAGCAGCCC TTCATGCGGC CTGTGCAGAC CACACAGGAA
GAGGACGGCT GTAGCTGTAG ATTCCCCGAG GAAGAGGAAG GCGGCTGCGA GCTGAGAGTG
AAGTTCAGCA GAAGCGCCGA CGCCCCTGCC TATCAGCAGG GCCAGAACCA GCTGTACAAC
GAGCTGAACC TGGGCAGACG GGAGGAATAC GACGTGCTGG ACAAGAGAAG AGGCCGGGAC
CCTGAGATGG GCGGCAAGCC CAGACGGAAG AACCCCCAGG AAGGCCTGTA TAACGAACTG
CAGAAAGACA AGATGGCCGA GGCCTACAGC GAGATCGGCA TGAAGGGCGA GCGGAGAAGA
GGCAAGGGCC ATGACGGCCT GTACCAGGGC CTGAGCACCG CCACCAAGGA CACCTACGAC
GCCCTGCACA TGCAGGCCCT GCCTCCAAGA TGAGTCGACA ATCAACCTCT GGATTACAAA
ATTTGTGAAA GATTGACTGG TATTCTTAAC TATGTTGCTC CTTTACGCT ATGTGGATAC
GCTGCTTTAA TGCCTTTGTA TCATGCTATT GCTTCCCGTA TGGCTTTCAT TTTCTCCTCC
TTGTATAAAT CCTGGTTGCT GTCTCTTTAT GAGGAGTTGT GGCCCGTTGT CAGGCAACGT
GGCGTGGTGT GCACTGTGTT TGCTGACGCA ACCCCCACTG GTTGGGGCAT TGCCACCACC
TGTCAGCTCC TTTCCGGGAC TTTCGCTTTC CCCCTCCCTA TTGCCACGGC GGAACATCATC
GCCGCCTGCC TTGCCCCGTG CTGGACAGGG GCTCGGCTGT TGGGCACTGA CAATTCCGTG
GTGTTGTCGG GGAAGCTGAC GTCCTTTCCT TGGCTGCTCG CCTGTGTTGC CACCTGGATT
CTGCGCGGGA CGTCCTTCTG CTACGTCCCT TCGGCCCTCA ATCCAGCGGA CCTTCTTCC
CGCGGCCTGC TGCCGGCTCT GCGGCCTCTT CCGCGTCTTC GCCTTCGCCC TCAGACGAGT
CGGATCTCCC TTTGGGCCGC CTCCCCGCTT GGAATTCGAG CTCGGTACCT TTAAGACCAA
TGAATTACAA GGCAGCTGTA GATCTTAGCC ACTTTTTAAA AGAAAAGGGG GGAAGTGAAG
GGCTAATTCA CTCCAACGA AGACAAGATC TGCTTTTTGC TTGTACTGGG TCTCTCTGGT
```


[0280]

```
TAGACCAGAT CTGAGCCTGG GAGCTCTCTG GCTAACTAGG GAACCCACTG CTTAAGCCTC
AATAAAGCTT GCCTTGAGTG CTTCAAGTAG TGTGTGCCCC TCTGTTGTGT GACTCTGGTA
ACTAGAGATC CCTCAGACCC TTTTAGTCAG TGTGGAAAAT CTCTAGCAGT AGTAGTTCAT
GTCATCTTAT TATTCAGTAT TTATAACTTG CAAAGAAATG AATATCAGAG AGTGAGAGGA
ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTACAAA
ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCCTAGT GTGGTTTGTG CAACTCATC AATGTATCTT
ATCATGTCTG GCTCTAGCTA TCCCGCCCCCT AACTCCGCCC AGTTCCGCCC ATTCTCCGCC
CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCCTCGG CCTCTGAGCT
ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGCT AGGGACGTAC CCAATTCGCC
CTATAGTGAG TCGTATTACG CGCGCTCACT GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA
AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT TGCAGCACAT CCCCCTTTCG CCAGCTGGCG
TAATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA
ATGGGACGCG CCCTGTAGCG GCGCATTAAAG CGCGGCGGGT GTGGTGTTA CGCGCAGCGT
GACCGCTACA CTTGCCAGCG CCCTAGCGCC CGCTCCTTTC GCTTCTTCC CTTCTTTCT
CGCCACGTTT GCCGGCTTTC CCCGTCAAGC TCTAAATCGG GGGCTCCCTT TAGGGTTCCG
ATTTAGTGCT TTACGGCACC TCGACCCCAA AAACTTGAT TAGGGTGATG GTTCACGTAG
TGGGCCATCG CCCTGATAGA CGGTTTTTCG CCCTTTGACG TTGGAGTCCA CGTCTTTTAA
TAGTGGACTC TTGTTCCTAA CTGGAACAAC ACTCAACCCT ATCTCGGTCT ATTCTTTTGA
TTTATAAGGG ATTTTGCCGA TTTCGGCCTA TTGGTTAAAA AATGAGCTGA TTTAACAAAA
ATTTAACGCG AATTTTAAAC AAATATTAAC GCTTACAATT TAGGTGGCAC TTTTCGGGGA
AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC
ATGAGACAAT AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC TGTTTTTGCT
CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGG
```

[0281] DAP12-T2A-A2-KIRS2 (SEQ ID NO:21)

[0282]

```
ATGGGGGGAC TTGAACCCTG CAGCAGGTTT CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT
GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCG
GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC
GTGTACTTCC TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG
AAACAGCGTA TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT
GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGC
AGAGGAAGTC TTCTAACATG CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA
CCAGTGACCG CTTGCTCCTT GCCGCTGGCC TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC
TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA AGAGGAGGAC
TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCG GATGACAGAA GTTATAAAAG TCAATATTTG
AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT GGCATACACA
GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT GGGACCTTTA
CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC AAGCAGACCA
TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCCTT TGTATTCAAG GAGATTACCA
AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT CAAATATAAA
TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT GACCCGCTAT
```

[0283]

TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTGG CCCTCTCCTC
ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAAACCAGA TAATGTCAGA CAAGAGGAAT
GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA GAATATACAA
CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAAGATC CAGAGTTCCA AGCCTCCAAC
ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT TTGTTTGCAT
GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCCT TTCTGTCTTC
TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC CCTATTCCCA
TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTCGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT TCTGGGGTGC
CACAACCTAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC TAGTTGTGAC
AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA CTTGCTGAGT
AAAAACAATG CCATTGAACC AAGAGCTAGC GGTGGCGGAG GTTCTGGAGG TGGGGGTTCC
TCACCCACTG AACCAAGCTC CAAAACCGGT AACCCAGAC ACCTGCATGT TCTGATTGGG
ACCTCAGTGG TCAAAATCCC TTTCACCATC CTCCTCTTCT TTCTCCTTCA TCGCTGGTGC
TCCAACAAAA AAAATGCTGC TGTAATGGAC CAAGAGCCTG CAGGGAACAG AACAGTGAAC
AGCGAGGATT CTGATGAACA AGACCATCAG GAGGTGTCAT ACGCATAA

[0284] FVIII-A2-KIRS2 (SEQ ID NO:22)

[0285]

MALPVTALLL PLALLLHAAR PGSSVAKKHP KTWVHYIAAE EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS
QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYTDETFKTR EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA
SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL
TRYYSFVNM ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVILFSVF DENRSWYLTE
NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV CLHEVAYWYI LSIGAQTDFL
SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI LGCHNSDFRN RGMTALLKVS
SCDKNTGDYY EDSYEDISAY LLSKNNAIEP RASGGGSGG GGSSPTEPSS KTGPNRHLHV
LIGTSVVKIP FTILLFLLH RWCSNKKNA VMDQEPAGNR TVNSEDSDEQ DHQEVSYA*

[0286] DAP12-T2A-C2-KIRS2 (SEQ ID NO:23)

[0287]

ATGGGGGGAC TTGAACCCTG CAGCAGGTTT CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT
GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCG
GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC
GTGTACTTCC TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG
AAACAGCGTA TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT
GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGC
AGAGGAAGTC TTCTAACATG CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA
CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC
AATAGTTGCA GCATGCCATT GGGAATGGAG AGTAAAGCAA TATCAGATGC ACAGATTACT
GCTTCATCCT ACTTTACCAA TATGTTTGCC ACCTGGTCTC CTTCAAAAGC TCGACTTCAC
CTCCAAGGGA GGAGTAATGC CTGGAGACCT CAGGTGAATA ATCCAAAAGA GTGGCTGCAA
GTGGACTTCC AGAAGACAAT GAAAGTCACA GGAGTAACTA CTCAGGGAGT AAAATCTCTG
CTTACCAGCA TGTATGTGAA GGAGTTCCTC ATCTCCAGCA GTCAAGATGG CCATCAGTGG
ACTCTCTTTT TTCAGAATGG CAAAGTAAAG GTTTTTTCAGG GAAATCAAGA CTCCTTCACA
CCTGTGGTGA ACTCTCTAGA CCCACCGTTA CTGACTCGCT ACCTTCGAAT TCACCCCCAG

[0288]

AGTTGGGTGC ACCAGATTGC CCTGAGGATG GAGGTTCTGG GCTGCGAGGC ACAGGACCTC
TACGCTAGCG GTGGCGGAGG TTCTGGAGGT GGGGGTTCCT CACCCACTGA ACCAAGCTCC
AAAACCGGTA ACCCCAGACA CCTGCATGTT CTGATTGGGA CCTCAGTGGT CAAAATCCCT
TTCACCATCC TCCTCTTCTT TCTCCTTCAT CGCTGGTGCT CCAACAAAAA AAATGCTGCT
GTAATGGACC AAGAGCCTGC AGGGAACAGA ACAGTGAACA GCGAGGATTC TGATGAACAA
GACCATCAGG AGGTGTCATA CGCATAA

[0289] FVIII-C2-KIRS2 (SEQ ID NO:24)

[0290]

MALPVTALLL PLALLLHAAR PGSNSCSMPL GMESKAISDA QITASSYFTN MFATWSPSKA
RLHLQGRSNA WRPQVNNPKE WLQVDFQKTM KVTGVTTQGV KSLLTSMYVK EFLISSSQDG
HQWTLFFQNG KVKVFQGNQD SFTPVVNSLD PLLTRYLRI HPQSWVHQIA LRMEVLGCEA
QDLYASGGGG SGGGGSSPTE PSSKTGNPRH LHVLIQTSVV KIPFTILLFF LLHRWCSNKK
NAAVMDQEP A GNRTVNSEDS DEQDHQEVSY A*

[0291] A2-gs-BBz核苷酸序列 (SEQ ID NO:25)

[0292]

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTTCTT GTGGCTATTT TAAAAGGTGT CCAGTGCGGA
TCCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAACT TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG
GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT
TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAAC
ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT
TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA
CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA
CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT
AAATGGACAG TGAAGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
TATTACTCTA GTTTCGTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC
CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAAGTCAA AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG
AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG AACCAGAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA
CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG CAGCTTGAAG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC
AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTTG
CATGAGGTGG CATACTGGTA CATCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC
TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC
CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTTATGTCG ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG
TGCCACAAC CAGACTTTCG GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT
GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCTG ATACTTGCTG
AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGCT AGCGGTGGCG GAGGTTCTGG AGGTGGAGGT
TCCTCCGGAA TCTACATCTG GGCCCTCTG GCCGGCACCT GTGGCGTGCT GCTGCTGTCC
CTGGTCATCA CCCTGTACTG CAAGCGGGGC AGAAAGAAGC TGCTGTACAT CTTCAAGCAG
CCCTTCATGC GGCCTGTGCA GACCACACAG GAAGAGGACG GCTGTAGCTG TAGATTCCCC
GAGGAAGAGG AAGGCGGCTG CGAGCTGAGA GTGAAGTTCA GCAGAAGCGC CGACGCCCTT
GCCTATCAGC AGGGCCAGAA CCAGCTGTAC AACGAGCTGA ACCTGGGCAG ACGGGAGGAA
TACGACGTGC TGGACAAGAG AAGAGGCCGG GACCCTGAGA TGGGCGGCAA GCCCAGACGG

[0293]

AAGAACCCCC AGGAAGGCCT GTATAACGAA CTGCAGAAAG ACAAGATGGC CGAGGCCTAC
AGCGAGATCG GCATGAAGGG CGAGCGGAGA AGAGGCAAGG GCCATGACGG CCTGTACCAG
GGCCTGAGCA CCGCCACCAA GGACACCTAC GACGCCCTGC ACATGCAGGC CCTGCCTCCA
AGATGA

[0294] A2-gs-BBz氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)

[0295]

MEFGLSWLFL VAILKGVQCG SSVAKKHPKT WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY
LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
PYNIIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE NRSWYL TENI
QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS IGAQTDFLSV
FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC
DKNTGDYYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRA SGGGSGSGGG SSGIYIWAPL AGTCGVLLLS
LVITLYCKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP
AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQDKMAEAY
SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP R*

[0296] C2-gs-BBz核酸序列 (SEQ ID NO:27)

[0297]

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTTCTT GTGGCTATTT TAAAAGGTGT CCAGTGCGGA
TCCAATAGTT GCAGCATGCC ATTGGGAATG GAGAGTAAAG CAATATCAGA TGCACAGATT
ACTGCTTCAT CCTACTTTAC CAATATGTTT GCCACCTGGT CTCCTTCAA AGCTCGACTT
CACCTCCAAG GGAGGAGTAA TGCTTGAGGA CCTCAGGTGA ATAATCCAAA AGAGTGGCTG
CAAGTGGACT TCCAGAAGAC AATGAAAGTC ACAGGAGTAA CTACTCAGGG AGTAAAATCT
CTGCTTACCA GCATGTATGT GAAGGAGTTC CTCATCTCCA GCAGTCAAGA TGGCCATCAG
TGGACTCTCT TTTTTCAGAA TGGCAAAGTA AAGGTTTTTC AGGGAAATCA AGACTCCTTC
ACACCTGTGG TGAACCTCTCT AGACCCACCG TTAGTACTC GCTACCTTCG AATTCACCCC
CAGAGTTGGG TGCACCAGAT TGCCCTGAGG ATGGAGGTTC TGGGCTGCGA GGCACAGGAC
CTCTACGCTA GCGGTGGCGG AGGTCTTGGA GGTGGAGGTT CCTCCGGAAT CTACATCTGG
GCCCCTCTGG CCGGCACCTG TGGCGTGCTG CTGCTGTCCC TGGTCATCAC CCTGTACTGC
AAGCGGGGCA GAAAGAAGCT GCTGTACATC TTCAAGCAGC CCTTCATGCG GCCTGTGCAG
ACCACACAGG AAGAGGACGG CTGTAGCTGT AGATTCCCCG AGGAAGAGGA AGGCGGCTGC
GAGCTGAGAG TGAAGTTCAG CAGAAGCGCC GACGCCCTG CCTATCAGCA GGGCCAGAAC
CAGCTGTACA ACGAGCTGAA CCTGGGCAGA CGGGAGGAAT ACGACGTGCT GGACAAGAGA
AGAGGCCGGG ACCCTGAGAT GGGCGGCAAG CCCAGACGGA AGAACCCCCA GGAAGGCCTG
TATAACGAAC TGCAGAAAGA CAAGATGGCC GAGGCCTACA GCGAGATCGG CATGAAGGGC
GAGCGGAGAA GAGGCAAGGG CCATGACGGC CTGTACCAGG GCCTGAGCAC CGCCACCAAG
GACACCTACG ACGCCCTGCA CATGCAGGCC CTGCCTCCAA GATGA

[0298] C2-gs-BBz氨基酸序列 (SEQ ID NO:28)

[0299]

MEFGLSWLFL VAILKGVQCG SNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF ATWSPSKARL
HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ

[0300]

WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD
LYASGGGGSG GGGSSGIYIW APLAGTCGVL LLSLVITLYC KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC ELRVKFSRSA DAPAYQQGQN QLYNELNLGR REEYDVLDKR
RGRDPEMGGK PRRKNPQ EGL YNELQKDKMA EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK
DTYDALHMQA LPPR*

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学董事会

费城儿童医院

M.C.米洛内

V.阿鲁达

S.里奇曼

B.萨梅尔森-琼斯

<120> 嵌合同种异体抗原受体T细胞的组合物和方法

<130> 046483-7105W01 (01335)

<150> 62/322,937

<151> 2016-04-15

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1104

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子 VIII A2 亚基核酸序列

<400> 1

```

gatcctcagt tgccaagaag catcctaaaa cttgggtaca ttacattgct gctgaagagg 60
aggactggga ctatgctccc ttagtcctcg ccccgatga cagaagtat aaaagtcaat 120
atttgaacaa tggccctcag cggattggta ggaagtacaa aaaagtccga tttatggcat 180
acacagatga aacctttaag actcgtgaag ctattcagca tgaatcagga atcttgggac 240
ctttacttta tggggaagtt ggagacacac tgttgattat atttaagaat caagcaagca 300
gaccatataa catctaccct cacggaatca ctgatgtccg tcctttgtat tcaaggagat 360
taccaaaaagg tgtaaaacat ttgaaggatt ttccaattct gccaggagaa atattcaaat 420
ataaatggac agtgactgta gaagatgggc caactaaatc agatcctcgg tgcctgacct 480
gctattactc tagtttcggt aatatggaga gagatctagc ttcaggactc attggccctc 540
tcctcatctg ctacaaagaa tctgtagatc aaagaggaaa ccagataatg tcagacaaga 600
ggaatgtcat cctgttttct gtatttgatg agaaccgaag ctggtacctc acagagaata 660
tacaacgctt tctccccaat ccagctggag tgcagcttga agatccagag ttccaagcct 720
ccaacatcat gcacagcatc aatggctatg tttttgatag tttgcagttg tcagtttgtt 780
tgcattgaggt ggcatactgg tacattctaa gcattggagc acagactgac ttcttttctg 840
tcttcttctc tggatatacc ttcaaacaca aaatggtcta tgaagacaca ctcacctat 900
tccattctc aggagaaaact gtcttcatgt cgatggaaaa cccaggtcta tggattctgg 960
ggtgccacaa ctcagacttt cggaacagag gcatgaccgc cttactgaag gtttctagtt 1020
gtgacaagaa cactggtgat tattacgagg acagttatga agatatttca gcatacttgc 1080

```

tgagtaaaaa caatgccatt gaac 1104

<210> 2

<211> 368

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子 VIII A2 亚氨基酸序列

<400> 2

Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala
1				5					10					15	
Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp
			20					25					30		
Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly
		35					40					45			
Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe
	50					55					60				
Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu
65				70					75					80	
Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln
			85					90					95		
Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg
		100						105					110		
Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp
	115					120						125			
Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr
	130				135							140			
Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr
145				150					155					160	
Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
			165					170					175		
Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn
		180						185					190		
Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp
	195					200						205			
Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro
	210					215					220				
Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn
225				230					235					240	
Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser

	245	250	255
Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala			
	260	265	270
Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His			
	275	280	285
Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu			
	290	295	300
Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys			
305	310	315	320
His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val			
	325	330	335
Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu			
	340	345	350
Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg			
	355	360	365

<210> 3

<211> 483

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子 VIII C2 亚基核酸序列

<400> 3

```

gatccaatag ttgcagcatg ccattgggaa tggagagtaa agcaatatca gatgcacaga 60
ttactgcttc atcctacttt accaatatgt ttgccacctg gtctccttca aaagctcgac 120
ttcacctcca agggaggagt aatgcctgga gacctcaggt gaataatcca aaagagtggc 180
tgcaagtgga cttccagaag acaatgaaag tcacaggagt aactactcag ggagtaaaat 240
ctctgcttac cagcatgtat gtgaaggagt tcctcatctc cagcagtcaa gatggccatc 300
agtggactct cttttttcag aatggcaaag taaaggtttt tcagggaaat caagactcct 360
tcacacctgt ggtgaactct ctagaccac cgttactgac tcgctacctt cgaattcacc 420
cccagagttg ggtgcaccag attgccctga ggatggaggt tctgggctgc gaggcacagg 480
acc 483

```

<210> 4

<211> 161

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子 VIII C2 亚基氨基酸序列

<400> 4

```

Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp

```

1	5	10	15
Ala Gln Ile Thr	Ala Ser Ser Tyr	Phe Thr Asn Met	Phe Ala Thr Trp
20	25	30	
Ser Pro Ser Lys	Ala Arg Leu His	Leu Gln Gly Arg	Ser Asn Ala Trp
35	40	45	
Arg Pro Gln Val	Asn Asn Pro Lys	Glu Trp Leu Gln	Val Asp Phe Gln
50	55	60	
Lys Thr Met Lys	Val Thr Gly Val	Thr Thr Gln Gly	Val Lys Ser Leu
65	70	75	80
Leu Thr Ser Met	Tyr Val Lys Glu	Phe Leu Ile Ser	Ser Ser Gln Asp
85	90	95	
Gly His Gln Trp	Thr Leu Phe Phe	Gln Asn Gly Lys	Val Lys Val Phe
100	105	110	
Gln Gly Asn Gln	Asp Ser Phe Thr	Pro Val Val Asn	Ser Leu Asp Pro
115	120	125	
Pro Leu Leu Thr	Arg Tyr Leu Arg	Ile His Pro Gln	Ser Trp Val His
130	135	140	
Gln Ile Ala Leu	Arg Met Glu Val	Leu Gly Cys Glu	Ala Gln Asp Leu
145	150	155	160

Tyr

<210> 5

<211> 135

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 α 链铰链

<400> 5

ctagcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc 60
 ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg cacacgagg 120
 ggctggactt cgcct 135

<210> 6

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 跨膜结构域

<400> 6

ccggaatcta catctgggcc cctctggccg gcacctgtgg cgtgctgctg ctgtccctgg 60
 tcatcaccct gtact 75

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 α 链铰链

<400> 7

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 跨膜结构域

<400> 8

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys

20 25

<210> 9

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BB的胞内信号传导结构域

<400> 9

gcaagcgggg cagaaagaag ctgctgtaca ttttcaagca gcccttcattg cggcctgtgc 60

agaccacaca ggaagaggac ggctgtagct gtagattccc cgaggaagag gaaggcggct 120

gcg 123

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BB 胞内信号传导结构域

<400> 10

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro

1 5 10 15

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu

20 25 30

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 11

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 ζ 信号传导结构域

<400> 11

agctgagagt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctatcagcag ggccagaacc 60

agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagac gggaggaata cgacgtgctg gacaagagaa 120

gaggccggga ccctgagatg ggcggcaagc ccagacggaa gaacccccag gaaggcctgt 180

ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc atgaaggcg 240

agcggagaag aggcaagggc catgacggcc tgtaccaggc cctgagcacc gccaccaagg 300

acacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgcctc 336

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 ζ 信号传导结构域

<400> 12

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

1 5 10 15

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

20 25 30

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro

35 40 45

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

50 55 60

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

65 70 75 80

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

85				90				95						
Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
100				105				110						
<210> 13														
<211> 10335														
<212> DNA														
<213> 人工序列														
<220>														
<223> pELPS-hFVIII-A2-BBz-T2A-mCherry														
<400> 13														
gatctatgga	gtttgggctg	agctggcttt	ttcttgtggc	tattttaaaa	ggtgtccagt	60								
gcggatcctc	agttgccaaag	aagcatccta	aaacttgggt	acattacatt	gctgctgaag	120								
aggaggactg	ggactatgct	cccttagtcc	tcgccccga	tgacagaagt	tataaaagtc	180								
aatatttgaa	caatggccct	cagcggattg	gtaggaagta	caaaaaagtc	cgatttatgg	240								
catacacaga	tgaaaccttt	aagactcgtg	aagctattca	gcatgaatca	ggaatcttgg	300								
gacctttact	ttatggggaa	gttgagaca	cactgttgat	tatatttaag	aatcaagcaa	360								
gcagaccata	taacatctac	cctcacggaa	tcactgatgt	ccgtcctttg	tattcaagga	420								
gattaccaaa	aggtgtaaaa	catttgaagg	attttccaat	tctgccagga	gaaatattca	480								
aatataaatg	gacagtgact	gtagaagatg	ggccaactaa	atcagatcct	cggtgcctga	540								
cccgtatta	ctctagtttc	gttaatatgg	agagagatct	agcttcagga	ctcattggcc	600								
ctctcctcat	ctgctacaaa	gaatctgtag	atcaaagagg	aaaccagata	atgtcagaca	660								
agaggaatgt	catcctgttt	tctgtatttg	atgagaaccg	aagctggtac	ctcacagaga	720								
atatacaacg	ctttctcccc	aatccagctg	gagtgcagct	tgaagatcca	gagttccaag	780								
cctccaacat	catgcacagc	atcaatggct	atgtttttga	tagtttgag	ttgtcagttt	840								
gtttgcatga	ggtggcatac	tggtacattc	taagcattgg	agcacagact	gacttccttt	900								
ctgtcttctt	ctctggatat	accttcaaac	acaaaatggt	ctatgaagac	acactcaccc	960								
tattcccatt	ctcaggagaa	actgtcttca	tgtcgatgga	aaaccaggt	ctatggattc	1020								
tggggtgcca	caactcagac	tttcggaaca	gaggcatgac	cgccttactg	aaggtttcta	1080								
gttgtgacaa	gaacactggg	gattattacg	aggacagtta	tgaagatatt	tcagcatact	1140								
tgctgagtaa	aaacaatgcc	attgaaccaa	gagctagcac	cacgacgcca	gcgccgcgac	1200								
caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgtcgc	agccccgtgc	cctgcgcccc	gaggcgtgcc	1260								
ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	gattccggaa	1320								
tctacatctg	ggccccctctg	gccggcacct	gtggcgtgct	gctgctgtcc	ctgggtcatca	1380								
ccctgtactg	caagcggggc	agaaagaagc	tgctgtacat	cttcaagcag	cccttcatgc	1440								
ggcctgtgca	gaccacacag	gaagaggacg	gctgtagctg	tagattcccc	gaggaagagg	1500								
aaggcggctg	cgagctgaga	gtgaagttca	gcagaagcgc	cgacgccctt	gcctatcagc	1560								
agggccagaa	ccagctgtac	aacgagctga	acctgggcag	acgggaggaa	tacgacgtgc	1620								
tggacaagag	aagaggccgg	gaccctgaga	tgggcggcaa	gcccagacgg	aagaaccccc	1680								
aggaaggcct	gtataacgaa	ctgcagaaag	acaagatggc	cgaggcctac	agcgagatcg	1740								

gcatgaaggg cgagcggaga agaggcaagg gccatgacgg cctgtaccag ggcctgagca 1800
 ccgccaccaa ggacacctac gacgccctgc acatgcaggc cctgcctcca agaggcagcg 1860
 gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc ggccctacgc 1920
 gtatggtgag caagggcgag gaggataaca tggccatcat caaggagttc atgcgcttca 1980
 aggtgcacat ggagggctcc gtgaacggcc acgagttcga gatcgagggc gagggcgagg 2040
 gccgccccta cgagggcacc cagaccgcca agctgaaggt gaccaagggt ggccccctgc 2100
 ccttcgcctg ggacatcctg tccccctcagt tcatgtacgg ctccaaggcc tacgtgaagc 2160
 accccgccga catccccgac tacttgaagc tgtccttccc cgagggcctt aagtgggagc 2220
 gcgtgatgaa cttcgaggac ggcgggcgtg tgaccgtgac ccaggactcc tccctgcagg 2280
 acggcgagtt catctacaag gtgaagctgc gcggcaccaa cttccccctc gacggccccg 2340
 taatgcagaa gaagaccatg ggttgggagg cctcctccga gcggatgtac cccgaggacg 2400
 gcgcccctgaa gggcgagatc aagcagaggc tgaagctgaa ggacggcggc cactacgacg 2460
 ctgaggtcaa gaccacctac aaggccaaga agcccgtgca gctgcccggc gcctacaacg 2520
 tcaacatcaa gttggacatc acctcccaca acgaggacta caccatcgtg gaacagtacg 2580
 aacgcgccga gggccgccac tccaccggcg gcatggacga gctgtacaag taggtcgaca 2640
 atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc 2700
 cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgtc 2760
 tggttttcat tttctcctcc ttgtataaat cctggttget gtctctttat gaggagtgtg 2820
 ggcccgttgt caggcaacgt ggcggtgtgt gactgtgtt tgctgacgca acccccactg 2880
 gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgcttcc cccctcccta 2940
 ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggtgtg 3000
 tgggcactga caattccgtg gtgtgtcgg ggaagctgac gtcctttcca tggctgctcg 3060
 cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca 3120
 atccagcgga ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt ccgcgtcttc 3180
 gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggcccgc ctccccgcct ggaattcgag 3240
 ctcggtacct ttaagaccaa tgacttaca ggcagctgta gatcttagcc actttttaaa 3300
 agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaacga agacaagatc tgctttttgc 3360
 ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg 3420
 gaaccactg cttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg 3480
 tctgttgtgt gactctggta actagagatc ctcagacct ttttagtcag tgtggaaaat 3540
 ctctagcagt agtagttcat gtcattctat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg 3600
 aatatcagag agtgagagga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 3660
 tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttactg cattctagtt gtggtttgtc 3720
 caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg gctctagcta tcccgcctc aactccgccc 3780
 agttccgccc attctccgcc ccatggetga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag 3840
 gccgcctcgg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc 3900
 ttttgcgtcg agacgtaccc aattcgccct atagtgagtc gtattacgcg cgctcactgg 3960
 ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgcttg 4020
 cagcacatcc ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt 4080

```

cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcgacgc gccctgtagc ggcgcatata 4140
gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc 4200
ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaag 4260
ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca 4320
aaaaacttga ttagggatgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 4380
gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa 4440
cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct 4500
attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa 4560
cgttttacaat ttcccaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttggtt 4620
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gtcctatgaga caataaccct gataaatgct 4680
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 4740
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 4800
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 4860
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaggt 4920
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 4980
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 5040
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc 5100
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 5160
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 5220
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaactatt 5280
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 5340
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa 5400
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 5460
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 5520
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 5580
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 5640
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 5700
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 5760
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 5820
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc agagcgaga taccaatac 5880
tgtccttcta gttagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 5940
atacctcgct ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 6000
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 6060
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatactaca 6120
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgttcc cgaagggaga aaggcgaca ggtatccggt 6180
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 6240
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 6300
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttccctggc 6360
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 6420

```



```

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 6480
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 6540
ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 6600
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 6660
gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 6720
ctatgaccat gattacgcca agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac aaaagctgga 6780
gctgcaagct taatgtagtc ttatgcaata ctctttagt cttgcaacat ggtaacgatg 6840
agttagcaac atgccttaca aggagagaaa aagcacctg catgccgatt ggtggaagta 6900
aggtagtacg atcgtgcctt attaggaagg caacagacgg gtctgacatg gattggacga 6960
accactgaat tgccgcattg cagagatatt gtatttaagt gcctagctcg atacaataaa 7020
cgggtctctc tggtagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaaccc 7080
actgcttaag cctcaataaa gcttgcttg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt 7140
gtgtgactct ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag 7200
cagtggcgcc cgaacaggga cctgaaagcg aaagggaac cagagctctc tcgacgcagg 7260
actcggttg ctgaagcgcg cacggcaaga ggcgaggggc ggcgactggt gactacgcca 7320
aaaattttga ctagcggagg ctagaaggag agagatgggt gcgagagcgt cagtattaag 7380
cgggggagaa ttagatcgcg atgggaaaaa attcggttaa ggccaggggg aaagaaaaaa 7440
tataaattaa aacatatagt atgggcaagc aggagctag aacgattcgc agttaatcct 7500
ggcctgttag aaacatcaga aggctgtaga caaatactgg gacagctaca accatccctt 7560
cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacag tagcaaccct ctattgtgtg 7620
catcaaagga tagagataaa agacaccaag gaagctttag acaagataga ggaagagcaa 7680
aacaaaagta agaccaccgc acagcaagcg gccgctgac ttcagacctg gaggaggaga 7740
tatgagggac aattggagaa gtgaattata taaatataaa gtagtaaaaa ttgaaccatt 7800
aggagtagca cccaccaagg caaagagaag agtggtgcag agagaaaaaa gagcagtggg 7860
aataggagct ttgttccttg ggttcttggg agcagcagga agcactatgg gcgcagcctc 7920
aatgacgctg acggtacagg ccagacaatt attgtctggt atagtgcagc agcagaacaa 7980
tttctgtagg gctattgagg cgcaacagca tctgttgcaa ctcacagtct ggggcatcaa 8040
gcagctccag gcaagaatcc tggctgtgga aagataccta aaggatcaac agctcctggg 8100
gatttggggg tgctctggaa aactcatttg caccactgct gtgccttgga atgctagtgt 8160
gagtaataaa tctctggaac agattggaat cacacgacct ggatggagtg ggacagagaa 8220
attaacaatt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa 8280
aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac 8340
ataacaaatt ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttggtaggt 8400
ttaagaatag tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca 8460
ttatcgtttc agaccacct cccaaccccg aggggacccg acaggcccga aggaatagaa 8520
gaagaagggt gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atctcgacgg 8580
tatcgattag actgtagccc aggaatatgg cagctagatt gtacacattt agaaggaaaa 8640
gttatcttgg tagcagttca ttagccagt ggatatatag aagcagaagt aattccagca 8700
gagacagggc aagaaacagc atacttcctc ttaaaattag caggaagatg gccagtaaaa 8760

```

acagtacata cagacaatgg cagcaatttc accagtacta cagttaaggc cgcctgttgg 8820
 tgggcgggga tcaagcagga atttggcatt ccctacaatc cccaaagtca aggagtaata 8880
 gaatctatga ataaagaatt aaagaaaatt ataggacagg taagagatca ggctgaacat 8940
 cttaagacag cagtacaaat ggcagtattc atccacaatt ttaaaagaaa aggggggatt 9000
 ggggggtaca gtgcagggga aagaatagta gacataatag caacagacat acaaactaaa 9060
 gaattacaaa aacaaattac aaaaattcaa aattttcggg tttattacag ggacagcaga 9120
 gatccagttt ggctgcattg atcacgtgag gctccgggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca 9180
 catcgcccac agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga 9240
 gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg 9300
 aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg 9360
 ggtttgcgc cagaacacag gtaagtccg tgtgtggttc ccgcgggcct ggctctttta 9420
 cgggttatgg cccttgctg cettgaatta cttccacctg gctgcagtac gtgattcttg 9480
 atcccagact tcgggttggg agtgggtggg agagttcgag gccttgctg taaggagccc 9540
 cttcgccctg tgcttgagtt gaggcctggc ctgggcgctg gggccgccc gtgcgaatct 9600
 ggtggcacct tcgcgcctgt ctcgctgctt tcgataagtc tctagccatt taaaattttt 9660
 gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc aagatagtct tgtaaagtcg ggccaagatc 9720
 tgcacactgg tatttcggtt tttggggccg cgggcggcga cggggcccgt gcgtcccagc 9780
 gcacatgttc ggcgaggcgg ggcctgcgag cgcgccacc gagaatcgga cgggggtagt 9840
 ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg gcctcgcgcc gccgtgtatc gccccgccct 9900
 gggcggcaag gctggccccg tcggcaccag ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgcttcccg 9960
 gccctgctgc agggagctca aaatggagga cgcgcgctc gggagagcgg gcgggtgagt 10020
 caccacaca aaggaaaagg gcctttccgt cctcagccgt cgcttcatgt gactccacgg 10080
 agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt 10140
 taggttgggg ggaggggttt tatgcgatgg agtttcccca cactgagtgg gtggagactg 10200
 aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat tctccttgga atttgccctt tttgagtttg 10260
 gatcttgggt cattctcaag cctcagacag tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg 10320
 tgctgtgatc tagag 10335

<210> 14

<211> 875

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hFVIII-A2-BBz-T2A-mCherry

<400> 14

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gly Ser Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val

20 25 30

His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val

35	40	45
Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly		
50	55	60
Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr		
65	70	75
Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly		80
85	90	95
Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile		
100	105	110
Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly		
115	120	125
Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val		
130	135	140
Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr		
145	150	155
Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg		
165	170	175
Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu		
180	185	190
Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val		
195	200	205
Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu		
210	215	220
Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile		
225	230	235
Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu		
245	250	255
Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp		
260	265	270
Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile		
275	280	285
Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly		
290	295	300
Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe		
305	310	315
Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu		
325	330	335
Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr		
340	345	350

Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr
355				360				365							
Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn
370				375				380							
Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro
385				390				395				400			
Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu
405				410				415							
Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp
420				425				430							
Phe	Ala	Cys	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr
435				440				445							
Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg
450				455				460							
Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro
465				470				475				480			
Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu
485				490				495							
Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala
500				505				510							
Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu
515				520				525							
Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly
530				535				540							
Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu
545				550				555				560			
Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser
565				570				575							
Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly
580				585				590							
Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu
595				600				605							
His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser
610				615				620							
Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Met
625				630				635				640			
Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Asp	Asn	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Phe	Met
645				650				655							
Arg	Phe	Lys	Val	His	Met	Glu	Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Glu

660	665	670
Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala		
675	680	685
Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile		
690	695	700
Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro		
705	710	715
Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys		
725	730	735
Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr		
740	745	750
Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu		
755	760	765
Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr		
770	775	780
Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala		
785	790	795
Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His		
805	810	815
Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln		
820	825	830
Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His		
835	840	845
Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg		
850	855	860
His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys		
865	870	875
<210> 15		
<211> 616		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hFVIII-A2-BBz-T2A		
<400> 15		
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly		
1	5	10
Val Gln Cys Gly Ser Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val		
20	25	30
His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val		

35	40	45
Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly		
50	55	60
Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr		
65	70	75
Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly		80
85	90	95
Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile		
100	105	110
Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly		
115	120	125
Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val		
130	135	140
Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr		
145	150	155
Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg		
165	170	175
Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu		
180	185	190
Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val		
195	200	205
Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu		
210	215	220
Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile		
225	230	235
Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu		
245	250	255
Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp		
260	265	270
Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile		
275	280	285
Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly		
290	295	300
Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe		
305	310	315
Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu		
325	330	335
Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr		
340	345	350

Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr		
355	360	365
Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn		
370	375	380
Ala Ile Glu Pro Arg Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro		
385	390	395
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu		
405	410	415
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp		
420	425	430
Phe Ala Cys Asp Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
435	440	445
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg		
450	455	460
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro		
465	470	475
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu		
485	490	495
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala		
500	505	510
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu		
515	520	525
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly		
530	535	540
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
545	550	555
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
565	570	575
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly		
580	585	590
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu		
595	600	605
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
610	615	

<210> 16

<211> 9714

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pELPS-hFVIII-C2-BBz-T2A-mCherry

<400> 16

```

gatctatgga gtttgggctg agctggcctt ttcttgtggc tattttaaaa ggtgtccagt 60
gcggatccaa tagttgcagc atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac 120
agattactgc ttcacacctac ttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc 180
gacttcacct ccaaggagg agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt 240
ggctgcaagt ggacttccag aagacaatga aagtcacagg agtaactact caggagtaa 300
aatctctgct taccagcatg tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc 360
atcagtggac tctctttttt cagaatggca aagtaaagg ttttcaggga aatcaagact 420
ccttcacacc tgttgtgaac tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc 480
acccccagag ttgggtgcac cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac 540
aggacctcta cgctagcacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca 600
tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgag 660
tgcacacgag ggggctggac ttgcctgtg attccggaat ctacatctgg gcccctctgg 720
ccggcacctg tggcgtgctg ctgctgtccc tggtcacac cctgtactgc aagcggggca 780
gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc cttcatgcg gcctgtgcag accacacagg 840
aagaggacgg ctgtagctgt agattcccc aggaagagga aggcggctgc gagctgagag 900
tgaagttcag cagaagcgcc gacggccctg cctatcagca gggccagaac cagctgtaca 960
acgagctgaa cctgggcaga cgggaggaat acgacgtgct ggacaagaga agaggccggg 1020
accctgagat gggcggcaag cccagacgga agaaccacca ggaaggcctg tataacgaac 1080
tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggagaa 1140
gaggcaaggg ccatgacggc ctgtaccagg gcctgagcac cgccaccaag gacacctacg 1200
acggcctgca catgcaggcc ctgcctcaa gaggcagcgg agagggcaga ggaagtcttc 1260
taacatgcgg tgacgtggag gagaatccc gcccacgcg tatggtgagc aaggcgagg 1320
aggataacat ggccatcatc aaggagtcca tgcgcttcaa ggtgcacatg gagggctccg 1380
tgaacggcca cgagttcgag atcgaggcg agggcgaggg ccgcccctac gagggcaccc 1440
agaccgcca gctgaagggt accaagggtg gcccctgcc cttgcctgg gacatcctgt 1500
cccctcagtt catgtacggc tccaaggcct acgtgaagca ccccgccgac atccccgact 1560
acttgaagct gtccttcccc gagggcttca agtgggagcg cgtgatgaac ttcgaggacg 1620
gcggcgtggt gaccgtgacc caggactcct ccctgcagga cggcgagttc atctacaagg 1680
tgaagctgcg cggcaccaac ttcccctccg acggccccgt aatgcagaag aagaccatgg 1740
gctgggaggc ctccctccgag cggatgtacc ccgaggacgg cgccctgaag ggcgagatca 1800
agcagaggct gaagctgaag gacggcggcc actacgacgc tgaggatcaag accacctaca 1860
aggccaagaa gcccgtgcag ctgcccggcg cctacaacgt caacatcaag ttggacatca 1920
cctcccacaa cgaggactac accatcgtgg aacagtacga acgcgccgag ggccgccact 1980
ccaccggcgg catggacgag ctgtacaagt aggtcgacaa tcaacctctg gattacaaaa 2040
tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc ttttacgcta tgttgatacg 2100
ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat ggctttcatt ttctcctcct 2160
tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg gcccgttgct aggcaacgtg 2220

```


gcgtgggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt gccaccacct 2280
 gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat tgccacggcg gaactcatcg 2340
 ccgcctgcct tgcccgtgc tggacagggg ctcggtgtt gggcactgac aattccgtgg 2400
 tgttgtcggg gaagctgacg tcctttccat ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc 2460
 tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcggac cttccttccc 2520
 gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgccct cagacgagtc 2580
 ggatctccct ttgggccgcc tccccgcctg gaattcgagc tcggtacctt taagaccaat 2640
 gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg 2700
 gctaattcac tcccaacgaa gacaagatct gctttttgct tgtactgggt ctctctggtt 2760
 agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca 2820
 ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgccgt ctgttgtgtg actctggtaa 2880
 ctagagatcc ctacagacct tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagta gtagttcatg 2940
 tcactttatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga gtgagaggaa 3000
 cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcaca atttcacaaa 3060
 taaagcattt ttttactgc attctagttg tggttgtcc aaactcatca atgtatctta 3120
 tcatgtctgg ctctagctat cccgccccta actccgcca gttccgcca ttctccgcc 3180
 catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta 3240
 ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcgtcga gacgtacca 3300
 attcgcccta tagtgagtgc tattacgcgc gctcactggc cgctcgttta caacgtcgtg 3360
 actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgccctgc agcacatccc cttttcgcca 3420
 gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga 3480
 atggcgaatg gcgcgacgc ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 3540
 cgcgcagcgt gaccgtaca ctgcccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttc 3600
 cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 3660
 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgacccaa aaaacttgat tagggtgatg 3720
 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3780
 cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 3840
 attcttttga ttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3900
 tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aatattaac gtttacaatt tcccagggtg 3960
 cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa 4020
 tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 4080
 gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ctttatcc ctttttgcgg cattttgcct 4140
 tcctgttttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 4200
 tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg 4260
 cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt 4320
 atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctgagaatga 4380
 cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcactttac gatggcatga cagtaagaga 4440
 attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac 4500
 gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg 4560

```

ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 4620
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct 4680
agcttccccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 4740
gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 4800
gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat 4860
ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 4920
tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat 4980
tgattttaaaa cttcattttt aattttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct 5040
catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 5100
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa 5160
aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 5220
gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta 5280
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatect 5340
gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg 5400
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 5460
cttgagcgga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 5520
cacgcttccc gaaggagaaa aggcgacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg 5580
agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt 5640
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 5700
gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 5760
catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagt 5820
agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc 5880
ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct cccgcgcgt tggccgattc attaatgcag 5940
ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 6000
ttagctcact cattagggc cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg 6060
tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgcaa 6120
gcgcgcaatt aaccctcact aaagggaaca aaagctggag ctgcaagctt aatgtagtct 6180
tatgcaatac tctttagtc ttgcaacatg gtaacgatga gttagcaaca tgccttaca 6240
ggagagaaaa agcaccgtgc atgccgattg gtggaagtaa ggtggtacga tcgtgcctta 6300
ttaggaaggc aacagacggg tctgacatgg attggacgaa ccactgaatt gccgcattgc 6360
agagatatgt tatttaagt cctagctcga tacaataaac gggctctctt ggtagacca 6420
gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag 6480
cttgccctga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 6540
atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtggcgcgc gaacagggac 6600
ctgaaagcga aagggaacc agagctctct cgacgcagga ctcggcttgc tgaagcgcgc 6660
acggcaagag gcgaggggcg gcgactggtg agtacgcaa aaattttgac tagcggaggc 6720
tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc agtattaagc gggggagaat tagatcgca 6780
tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaa acatatagta 6840
tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga aacatcagaa 6900

```

```

ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc agaagaactt 6960
agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa 7020
gacaccaagg aagcttttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa gaccaccgca 7080
cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg aggaggagat atgagggaca attggagaag 7140
tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc 7200
aaagagaaga gtggtgcaga gagaanaaaag agcagtggga ataggagctt tgttccttgg 7260
gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg cgcagcctca atgacgctga cggtacaggc 7320
cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc 7380
gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg gggcatcaag cagctccagg caagaatcct 7440
ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctgggg atttgggggtt gctctggaaa 7500
actcatttgc accactgctg tgccttggaa tgctagttag agtaataaat ctctggaaca 7560
gattggaatc acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta 7620
atacactcct taattgaaga atcgcaaaac cagcaagaaa agaataaaca agaattattg 7680
gaattagata aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat 7740
ataaaattat tcataatgat agtaggaggc ttggtaggtt taagaatagt ttttgctgta 7800
ctttctatag tgaatagagt taggcaggga tattcaccat tatcgtttca gaccacctc 7860
ccaaccccga ggggacccga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac 7920
agagacagat ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcgattaga ctgtagccca 7980
ggaatatggc agctagattg tacacattta gaaggaaaag ttatcttggg agcagttcat 8040
gtagccagtg gatatataga agcagaagta attccagcag agacagggca agaaacagca 8100
tacttcctct taaaattagc aggaagatgg ccagtaaaaa cagtacatac agacaatggc 8160
agcaatttca ccagtactac agttaaggcc gcctgttggg gggcggggat caagcaggaa 8220
tttggcattc cctacaatcc ccaaagtcaa ggagtaatag aatctatgaa taaagaatta 8280
aagaaaatta taggacaggc aagagatcag gctgaacatc ttaagacagc agtacaatg 8340
gcagtattca tccacaattt taaaagaaaa ggggggattg gggggtacag tgcaggggaa 8400
agaatagtag acataatagc aacagacata caaactaaag aattacaaaa acaaattaca 8460
aaaattcaaa attttcgggt ttattacagg gacagcagag atccagtttg gctgcattga 8520
tcacgtgagg ctccggtgcc cgtcagtggg cagagcgcac atcgcccaca gtccccgaga 8580
agttgggggg aggggtcggc aattgaaccg gtgcctagag aaggtggcgc ggggtaaact 8640
gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc tttttccga ggggtgggga gaaccgtata 8700
taagtgcagt agtcgccgtg aacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgcc agaacacagg 8760
taagtgccgt gtgtggttcc cgcgggcctg gcctctttac gggttatggc ctttgcgtgc 8820
cttgaattac ttccacctgg ctgcagtacg tgattcttga tcccagactt cgggttggaa 8880
gtgggtggga gatttcgagg cettgcgtt aaggagcccc ttcgcctcgt gcttgagttg 8940
aggcctggcc tgggcgctgg ggccgccgcg tgcgaatctg gtggcacctt cgcgcctgtc 9000
tcgctgcttt cgataagtct ctagccattt aaaatttttg atgacctgct gcgacgtttt 9060
ttttctggca agatagtctt gtaaatgcgg gccaaatct gcacactggg atttcggttt 9120
ttggggccgc gggcggcgac ggggcccgtg cgtcccagcg cacatgttcg gcgaggcggg 9180
gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac gggggtagtc tcaagctggc cggcctgctc 9240

```

tgggtgcctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgccctg ggcggcaagg ctggcccggg 9300
 cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg ccctgctgca gggagctcaa 9360
 aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacacaa aggaaaaggg 9420
 cctttccgtc ctcagccgtc gcttcattgtg actccacgga gtaccgggcg ccgtccaggc 9480
 acctcgatta gttctcgagc ttttggagta cgtcgtcttt aggttggggg gaggggtttt 9540
 atgcgatgga gtttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca gcttggcact 9600
 tgatgtaatt ctccttgga tttgcccttt ttgagtttg atcttggttc attctcaagc 9660
 ctcagacagt ggttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgatct agag 9714

<210> 17

<211> 668

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pELPS-hFVIII-C2-BBz-T2A-mCherry

<400> 17

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5						10					15
Val	Gln	Cys	Gly	Ser	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser
				20						25					30
Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
				35						40					45
Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly
				50						55					60
Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu
65							70				75				80
Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln
				85							90				95
Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile
				100						105					110
Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly
				115						120					125
Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val
				130						135					140
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro
145						150					155				160
Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys
				165							170				175
Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro
				180							185				190

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
195	200	205
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
210	215	220
Asp Phe Ala Cys Asp Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly		
225	230	235
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys		
245	250	255
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg		
260	265	270
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro		
275	280	285
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser		
290	295	300
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu		
305	310	315
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg		
325	330	335
Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln		
340	345	350
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr		
355	360	365
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp		
370	375	380
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala		
385	390	395
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly		
405	410	415
Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Thr Arg		
420	425	430
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe		
435	440	445
Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe		
450	455	460
Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr		
465	470	475
Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp		
485	490	495
Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His		

500	505	510
Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe		
515	520	525
Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val		
530	535	540
Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys		
545	550	555
Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys		
565	570	575
Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly		
580	585	590
Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly		
595	600	605
His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val		
610	615	620
Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser		
625	630	635
His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly		
645	650	655
Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys		
660	665	
<210> 18		
<211> 409		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hFVIII-C2-BBz		
<400> 18		
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly		
1	5	10
Val Gln Cys Gly Ser Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser		
20	25	30
Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn		
35	40	45
Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly		
50	55	60
Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu		
65	70	75
Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln		
80		

				85					90					95			
Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile		
				100					105					110			
Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly		
				115					120					125			
Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val		
				130					135					140			
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro		
145						150					155				160		
Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys		
				165						170					175		
Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro		
				180						185				190			
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro		
				195						200				205			
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu		
				210										220			
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly		
225						230					235				240		
Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys		
				245							250				255		
Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg		
				260										270			
Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro		
				275										285			
Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser		
				290										300			
Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu		
305						310								320			
Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg		
				325										335			
Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln		
				340										350			
Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr		
				355										365			
Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp		
				370										380			
Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala		
385						390								400			

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

405

<210> 19

<211> 9547

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pTRPE-hFVIII-A2-BBz

<400> 19

```

gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 60
gccccgaaga acgtttttcca atgatgagca ctttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 120
tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 180
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 240
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 300
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcaaa catgggggat catgtaactc 360
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 420
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gaaactatt aactggcgaa ctacttactc 480
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 540
tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 600
ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 660
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 720
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 780
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 840
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 900
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 960
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc 1020
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt 1080
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattc 1140
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 1200
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 1260
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 1320
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 1380
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 1440
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 1500
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctggc cttttgctgg ctttttgctc 1560
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 1620
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaag 1680
cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 1740
gctggcacga caggtttccc gactggaaa ggggcagtga gcgcaacgca attaatgtga 1800

```


gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt 1860
 gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcca 1920
 agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac aaaagctgga gctgcaagct taatgtagtc 1980
 ttatgcaata ctctttagt cttgcaacat ggtaacgatg agttagcaac atgccttaca 2040
 aggagagaaa aagcaccgtg catgccgatt ggtggaagta aggtggtacg atcgtgcctt 2100
 attaggaagg caacagacgg gtctgacatg gattggacga accactgaat tgccgcattg 2160
 cagagatatt gtattttaagt gcctagctcg atacataaac gggctctctt ggttagacca 2220
 gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag 2280
 cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 2340
 atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtggcgccc gaacaggggac 2400
 ttgaaagcga aagggaacc agaggagctc tctcgacga ggactcggct tgctgaagcg 2460
 cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt gactagcgga 2520
 ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag aattagatcg 2580
 cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt aaaacatata 2640
 gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt agaaacatca 2700
 gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg atcagaagaa 2760
 cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag gatagagata 2820
 aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag taagaccacc 2880
 gcacagcaag cggccgctga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg acaattggag 2940
 aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag caccaccaa 3000
 ggcaaagaga agagtgggtg agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag ctttgttctt 3060
 tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgacgc tcaatgacgc tgacggtaca 3120
 ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgc gcagcagaac aatttgctga gggctattga 3180
 ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc aggcaagaat 3240
 cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg gttgctctgg 3300
 aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata aatctctgga 3360
 acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga gaaattaaca attacacaag 3420
 cttaatacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt 3480
 attggaatta gataaatggg caagtttgtg gaattggttt aacataacaa attggctgtg 3540
 gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttggtt ggtttaagaa tagtttttgc 3600
 tgtactttct atagtgaata gagttaggca gggatattca ccattatcgt ttcagaccca 3660
 cctcccaacc ccgaggggac ccgacaggcc cgaaggaata gaagaagaag gtggagagag 3720
 agacagagac agatccattc gattagtga cggatctcga cggtatcgat tagactgtag 3780
 cccaggaata tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagttatct tggtagcagt 3840
 tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag ggcaagaaac 3900
 agcatacttc ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac atacagacaa 3960
 tggcagcaat ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tgggtggcg ggtatcaagca 4020
 ggaatttggc attccctaca atcccaaaag tcaaggagta atagaatcta tgaataaaga 4080
 attaaagaaa attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga cagcagtaca 4140

```

aatggcagta ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attgggggggt acagtgcagg 4200
ggaaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat 4260
tacaaaaatt caaaattttc gggtttatta caggacagc agagatccag tttggctgca 4320
tacgcgtcgt gaggctccgg tgcccgtcag tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc 4380
gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga accggtgcct agagaaggtg gcgcggggta 4440
aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgcctttttc ccgagggtgg gggagaaccg 4500
tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca 4560
caggtaagtg ccgtgtgtgg ttcccgcggg cctggcctct ttacgggtta tggcccttgc 4620
gtgccttgaa ttacttccac ctggctgcag tacgtgattc ttgatcccga gcttcgggtt 4680
ggaagtgggt gggagagtgc gaggccttgc gcttaaggag ccccttcgcc tcgtgcttga 4740
gttagaggct ggctgggccc ctggggccgc cgcgtgcgaa tctggtggca ccttcgcgcc 4800
tgtctcgctg ctttcgataa gtctctagcc atttaaaatt tttgatgacc tgctgcgacg 4860
ctttttttct ggcaagatag tcttgtaaag gcgggccaag atctgcacac tggattttcg 4920
gtttttgggg ccgcgggccc cgacggggcc cgtgcgtccc agcgcacatg ttcggcgagg 4980
cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct 5040
gctctgggtg ctggcctcgc gccgccgtgt atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc 5100
cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc tgcagggagc 5160
tcaaaatgga ggacgcggcg ctccggagag cgggcgggtg agtcaccac acaaaggaaa 5220
agggcctttc cgtcctcagc cgtcgttca tgtactcca ctgagtaccg ggcgccgtcc 5280
aggcacctcg attagtctc gtgcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg 5340
ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg 5400
cacttgatgt aattctcctt ggaatttgcc ctttttgagt ttggatcttg gttcattctc 5460
aagcctcaga cagtgggtca aagttttttt cttccatttc aggtgtcgtg agctagagcc 5520
accatggagt ttgggctgag ctggcttttt cttgtggcta ttttaaagg tgtccagtgc 5580
ggatcctcag ttgccaagaa gcacccctaa acttgggtac attacattgc tgctgaagag 5640
gaggactggg actatgctcc cttagtctc gccccgatg acagaagtta taaaagtcaa 5700
tatttgaaca atggccctca gcggattggg aggaagtaca aaaaagtccg atttatggca 5760
tacacagatg aaaccttta gactcgtgaa gctattcagc atgaatcagg aatcttggga 5820
cctttacttt atggggaagt tggagacaca ctgttgatta tatttaagaa tcaagcaagc 5880
agaccatata acatctaccc tcacggaatc actgatgtcc gtcctttgta ttcaaggaga 5940
ttaccaaaaag gtgtaaaaca tttgaaggat tttccaattc tgccaggaga aatattcaaa 6000
tataaatgga cagtactgt agaagatggg ccaactaaat cagatcctcg gtgcctgacc 6060
cgctattact ctagtttcgt taatatggag agagatctag cttcaggact cattggccct 6120
ctcctcatct gctacaaaga atctgtagat caaagaggaa accagataat gtcagacaag 6180
aggaatgtca tcctgttttc tgtatttgat gagaaccgaa gctggtacct cacagagaat 6240
atacaacgct ttctcccaa tccagctgga gtgcagcttg aagatccaga gttccaagcc 6300
tccaacatca tgcacagcat caatggctat gtttttgata gtttgcagtt gtcagtttgt 6360
ttgcatgagg tggcactag gtacattcta agcattggag cacagactga cttcctttct 6420
gtcttcttct ctggatatac cttcaaacac aaaatggtct atgaagacac actcaccta 6480

```

```

ttccatttct caggagaaac tgtcttcatg tcgatggaaa acccaggtct atggattctg 6540
gggtgccaca actcagactt tcggaacaga ggcatgaccg cttactgaa ggtttctagt 6600
tgtgacaaga aacttggtga ttattacgag gacagttagt aagatatttc agcatacttg 6660
ctgagtaaaa acaatgccat tgaaccaaga gctagcacca cgacgccagc gccgcgacca 6720
ccaacaccgg cgcccacat cgctcgcag cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg 6780
ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg ggcctggact tcgcctgtga ttccggaatc 6840
tacatctggg cccctctggc cggcacctgt ggcgtgctgc tgctgtccct ggtcatcacc 6900
ctgtactgca agcggggcag aaagaagctg ctgtacatct tcaagcagcc cttcatgcgg 6960
cctgtgcaga ccacacagga agaggacggc tgtagctgta gattccccga ggaagaggaa 7020
ggcggctgcg agctgagagt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctatcagcag 7080
ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagac gggaggaata cgacgtgctg 7140
gacaagagaa gaggccggga cctgagatg ggcggcaagc ccagacggaa gaacccccag 7200
gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 7260
atgaagggcg agcggagaag aggcaaggcg catgacggcc tgtaccaggg cctgagcacc 7320
gccaccaagg acacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgcctccaag atgagtcgac 7380
aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 7440
ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 7500
atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagtgt 7560
tggcccggtg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 7620
ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt cccctccct 7680
attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgccgct gctggacagg ggctcggctg 7740
ttgggcactg acaattccgt ggtgtgtcg gggaagctga cgtcctttcc ttggctgctc 7800
gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 7860
aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt 7920
cgcttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgcc tggaattcga 7980
gctcgggtacc tttaagacca atgacttaca aggagctgt agatcttagc cactttttta 8040
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaacg aagacaagat ctgctttttg 8100
cttgtagctg gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag 8160
ggaacccact gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc 8220
gtctgttgtg tgactctggt aactagagat cctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa 8280
tctctagcag tagtagttca tgtcatctta ttattcagta ttataactt gcaaagaaat 8340
gaatatcaga gtaggagagg aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 8400
atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt 8460
ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggctctagct atcccgcccc taactccgcc 8520
cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga 8580
ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagc 8640
tagggacgta cccaattcgc cctatagtga gtcgtattac gcgcgtcac tggccgtcgt 8700
tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca 8760
tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca 8820

```

gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg 8880
 tgtgtgtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt 8940
 cgcttttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg 9000
 ggggctccct ttaggggtcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga 9060
 ttaggggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac 9120
 gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgtttcaa actggaacaa cactcaaccc 9180
 tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa 9240
 aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat 9300
 ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata 9360
 cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat aaatgcttca ataatttga 9420
 aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca 9480
 ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat 9540
 cagttgg 9547

<210> 20

<211> 8926

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pTRPE-hFVIII-C2-BBz

<400> 20

gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 60
 gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaggt tctgctatgt ggcgcggtat 120
 tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 180
 acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 240
 aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc ggccaactta cttctgacaa 300
 cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgcacaa catgggggat catgtaactc 360
 gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 420
 cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc 480
 tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 540
 tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 600
 ggtctcgcg tatcattgca gactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 660
 tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 720
 gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 780
 ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 840
 tcatgaccaa aatcccctaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 900
 agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaaa 960
 aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc 1020
 cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt 1080
 agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattc 1140

```

tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 1200
gatatgtacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 1260
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg 1320
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 1380
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 1440
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 1500
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ctttttgctc 1560
acatgttctt tcctgcgtta tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 1620
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 1680
cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 1740
gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaattgta 1800
gttagctcac tcattaggca ccccaggett tacactttat gtttcggct cgtatgttgt 1860
gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcca 1920
agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac aaaagctgga gctgcaagct taatgtagtc 1980
ttatgcaata ctctttagt cttgcaacat ggtaacgatg agtttagcaac atgccttaca 2040
aggagagaaa aagcaccgtg catgccgatt ggtggaagta agtggttacg atcgtgcctt 2100
attaggaagg caacagacgg gtctgacatg gattggacga accactgaat tgccgcattg 2160
cagagatatt gtatttaagt gcctagctcg atacataaac gggctctctt ggttagacca 2220
gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag 2280
cttgccctga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 2340
atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtggcgccc gaacagggac 2400
ttgaaagcga aagggaacc agaggagctc tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg 2460
cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt gactagcgga 2520
ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag aattagatcg 2580
cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt aaaacatata 2640
gtatgggcaa gcaggagctt agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt agaaacatca 2700
gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg atcagaagaa 2760
cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag gatagagata 2820
aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag taagaccacc 2880
gcacagcaag cggccgctga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg acaattggag 2940
aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag caccaccaa 3000
ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag ctttgttcct 3060
tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgacgcg tcaatgacgc tgacggtaca 3120
ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgcg gcagcagaac aatttgctga gggctattga 3180
ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc aggcaagaat 3240
cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg gttgctctgg 3300
aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata aatctctgga 3360
acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga gaaattaaca attacacaag 3420
cttaatacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt 3480

```

attggaatta gataaatggg caagttttgtg gaattggttt aacataacaa attggctgtg 3540
 gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttggtta ggtttaagaa tagtttttgc 3600
 tgtactttct atagtgaata gagttaggca gggatattca ccattatcgt ttcagaccca 3660
 cctcccaacc ccgagggggac ccgacaggcc cgaaggaata gaagaagaag gtggagagag 3720
 agacagagac agatccattc gattagttaa cggatctcga cggtatcgat tagactgtag 3780
 cccaggaata tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagttatct tggtagcagt 3840
 tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag ggcaagaaac 3900
 agcatacttc ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac atacagacaa 3960
 tggcagcaat ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tggtagggcg ggatcaagca 4020
 ggaatttggc attccctaca atccccaag tcaaggagta atagaatcta tgaataaaga 4080
 attaaagaaa attataggac aggtaaagaa tcaggctgaa catcttaaga cagcagtaca 4140
 aatggcagta ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg 4200
 ggaaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat 4260
 tacaaaaatt caaaattttc gggtttatta caggacagc agagatccag tttggctgca 4320
 tacgcgtcgt gaggtcccg tgcccgctcag tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc 4380
 gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga accggtgcct agagaaggtg gcgcggggta 4440
 aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgcctttttc ccgagggtgg gggagaaccg 4500
 tatataagt cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca 4560
 caggtaagt ccgtgtgtgg ttcccgcggt cctggcctct ttacgggtta tggcccttgc 4620
 gtgccttgaa ttacttccac ctggctgcag tacgtgattc ttgatcccga gcttcgggtt 4680
 ggaagtgggt gggagagttc gaggccttgc gcttaaggag ccccttcgcc tcgtgcttga 4740
 gttgaggcct ggccctgggc ctggggccgc cgcgtgcgaa tctggtggca ccttcgcgcc 4800
 tgtctcgctg ctttcgataa gtctctagcc atttaaaatt tttgatgacc tgctgcgacg 4860
 ctttttttct ggcaagatag tcttgtaaat gcgggccaaag atctgcacac tggatatttcg 4920
 gtttttgggg ccgcgggcgg cgacggggcc cgtgcgtccc agcgccatg ttcggcgagg 4980
 cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct 5040
 gctctggtgc ctggcctcgc gccgccgtgt atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc 5100
 cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc tgcaggagc 5160
 tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcaccac acaaaggaaa 5220
 agggcctttc cgtcctcagc cgtcgttca tgtactcca ctgagtaccg ggcccgctcc 5280
 aggcacctcg attagttctc gtgcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg 5340
 ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg 5400
 cacttgatgt aattctcctt ggaatttgcc ctttttgagt ttgatcttg gttcattctc 5460
 aagcctcaga cagtggttca aagttttttt cttccatttc aggtgtcgtg agctagagcc 5520
 accatggagt ttgggctgag ctggcttttt cttgtggcta ttttaaaagg tgtccagtgc 5580
 ggatccaata gttgcagcat gccattggga atggagagta aagcaatata agatgcacag 5640
 attactgctt catcctactt taccaatatg tttgccacct ggtctccttc aaaagctcga 5700
 cttcacctcc aaggaggag taatgcctgg agacctcagg tgaataatcc aaaagagtgg 5760
 ctgcaagtgg acttccagaa gacaatgaaa gtcacaggag taactactca gggagtaaaa 5820

tctctgctta ccagcatgta tgtgaaggag ttcctcatct ccagcagtca agatggccat 5880
 cagtggactc tcttttttca gaatggcaaa gtaaagggtt ttcaggga aa tcaagactcc 5940
 ttcacacctg tgggtgaactc tctagacca ccgttactga ctcgctacct tcgaattcac 6000
 cccagagtt ggggtgcacca gattgccctg aggatggagg ttctgggctg cgaggcacag 6060
 gacctctacg ctagcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc 6120
 gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg 6180
 cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat tccggaatct acatctgggc ccctctggcc 6240
 ggcacctgtg gcgtgctgct gctgtccctg gtcatcacc tgtactgcaa gcggggcaga 6300
 aagaagctgc tgtacatctt caagcagccc ttcattgcggc ctgtgcagac cacacaggaa 6360
 gaggacggct gtagctgtag attccccgag gaagaggaag gcggctgcga gctgagagtg 6420
 aagttcagca gaagcgccga cgccttgcc tatcagcagg gccagaacca gctgtacaac 6480
 gagctgaacc tgggcagacg ggaggaatac gacgtgctgg acaagagaag aggcggggac 6540
 cctgagatgg gcggcaagcc cagacggaag aacccccagg aaggcctgta taacgaactg 6600
 cagaaagaca agatggccga ggcctacagc gagatcgga tgaaggcgca gcggagaaga 6660
 ggcaagggcc atgacggcct gtaccagggc ctgagcacc ccaccaagga cacctacgac 6720
 gccctgcaca tgcaggccct gcctccaaga tgagtcgaca atcaacctct ggattacaaa 6780
 atttgtaaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc cttttacgct atgtggatac 6840
 gctgctttta tgcttttga tcatgctatt gcttcccgtg ttgctttcat tttctctcc 6900
 ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgtt ggcccgttgt caggcaacgt 6960
 ggctgtgtgt gcactgtgtt tgctgacgca accccactg gttggggcat tgccaccacc 7020
 tgtcagctcc tttccgggac tttcgctttc cccctcccta ttgccacggc ggaactcatc 7080
 gccgcctgcc ttgcccgtg ctggacagg gctcggctgt tgggactga caattccgtg 7140
 gtgttgtcgg ggaagctgac gtcctttcct tggtgctcg cctgtgttgc cacctggatt 7200
 ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcga ccttccttcc 7260
 cgcgccctgc tgccggctct gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgccc tcagacgagt 7320
 cggatctccc tttgggccgc ctccccgcct ggaattcgag ctcggtacct ttaagaccaa 7380
 tgacttacaa ggcagctgta gatcttagcc actttttaaa agaaaagggg ggactggaag 7440
 ggctaattca ctccaacga agacaagatc tgctttttgc ttgtactggg tctctctggt 7500
 tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttaaacctc 7560
 aataaagctt gccttgagt cttcaagtag tgtgtgccc tctgttgtgt gactctggta 7620
 actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt agtagttcat 7680
 gtcattctat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg aatatcagag agtgagagga 7740
 acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 7800
 ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt 7860
 atcatgtctg gctctagcta tcccgcctt aactccgccc agttccgccc attctccgccc 7920
 ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct 7980
 attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctagct agggacgtac ccaattcgcc 8040
 ctatagttag tcgtattacg cgcgctcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga 8100
 aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagcatat ccccttttcg ccagctggcg 8160

taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 8220
 atgggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgagcgt 8280
 gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc cttcctttct 8340
 cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg 8400
 atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag 8460
 tgggcatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa 8520
 tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctt attcttttga 8580
 tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga ttttaacaaa 8640
 atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt taggtggcac ttttcgggga 8700
 aatgtgcgcg gaacccttat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc 8760
 atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt 8820
 caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct 8880
 caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgg 8926

<210> 21

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DAP12-T2A-A2-KIRS2

<400> 21

atggggggac ttgaaccctg cagcaggttc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60
 ggtctccgtc ctgtccaggt ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccc 120
 ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctgggtgctga cagtgctcat tgccctggcc 180
 gtgtacttcc tgggccggct ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgacccgg 240
 aaacagcgta tcaactgagac cgagtcgcct tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
 gtctacagcg acctcaacac acagaggccg tattacaaag tcgagggcgg cggagagggc 360
 agaggaagtc ttctaactat cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatggcctta 420
 ccagtgaccg ccttgctcct gccgctggcc ttgctgctcc acgccgccag gccgggatcc 480
 tcagttgcca agaagcatcc taaaacttgg gtacattaca ttgctgctga agaggaggac 540
 tgggactatg ctcccttagt cctcgcccc gatgacagaa gttataaaag tcaatatttg 600
 aacaatggcc ctcagcggat tggtaggaag tacaaaaaag tccgatttat ggcatacaca 660
 gatgaaacct ttaagactcg tgaagctatt cagcatgaat caggaatctt gggaccttta 720
 ctttatgggg aagttggaga cacactgttg attatattta agaatcaagc aagcagacca 780
 tataacatct accctcacgg aatcaactgat gtccgtcctt tgtattcaag gagattacca 840
 aaaggtgtaa aacatttgaa ggattttcca attctgccag gagaaatatt caaatataaa 900
 tggacagtga ctgtagaaga tgggccaaact aaatcagatc ctcggtgcct gaccgcctat 960
 tactctagtt tcgttaatat ggagagagat ctagcttcag gactcattgg ccctctctc 1020
 atctgctaca aagaatctgt agatcaaaga ggaaaccaga taatgtcaga caagaggaat 1080
 gtcacctgt tttctgtatt tgatgagaac cgaagctggt acctcacaga gaatatacaa 1140

cgctttctcc ccaatccagc tggagtgcag ctggaagatc cagagttcca agcctccaac 1200
 atcatgcaca gcatcaatgg ctatgttttt gatagtttgc agttgtcagt ttgtttgcat 1260
 gaggtggcat actggtacat tctaagcatt ggagcacaga ctgacttcct ttctgtcttc 1320
 ttctctggat ataccttcaa acacaaaatg gtctatgaag acacactcac cctattccca 1380
 ttctcaggag aaactgtctt catgtcgatg gaaaaccag gtctatggat tctgggggtgc 1440
 cacaactcag actttcggaa cagaggcatg accgccttac tgaaggtttc tagttgtgac 1500
 aagaacactg gtgattatta cgaggacagt tatgaagata tttcagcata cttgctgagt 1560
 aaaaacaatg ccattgaacc aagagctagc ggtggcggag gttctggagg tgggggttcc 1620
 tcacccactg aaccaagctc caaaaccggt aaccacagac acctgcatgt tctgattggg 1680
 acctcagtgg tcaaaaatccc tttcaccatc ctctcttctt ttctccttca tcgctgggtgc 1740
 tccaacaaaa aaaatgctgc tgtaatggac caagagcctg caggaacag aacagtgaac 1800
 agcgaggatt ctgatgaaca agaccatcag gaggtgtcat acgcataa 1848

<210> 22

<211> 478

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FVIII-A2-KIRS2

<400> 22

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr
			20					25					30		
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro
		35					40					45			
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn
		50				55					60				
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met
65				70					75					80	
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu
			85					90					95		
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu
			100					105					110		
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro
			115				120						125		
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys
			130			135					140				
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe
145					150					155				160	

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp		
	165	170 175
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg		
	180	185 190
Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu		
	195	200 205
Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val		
	210	215 220
Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu		
225	230	235 240
Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp		
	245	250 255
Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val		
	260	265 270
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp		
	275	280 285
Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe		
	290	295 300
Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr		
305	310	315 320
Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro		
	325	330 335
Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly		
	340	345 350
Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp		
	355	360 365
Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys		
	370	375 380
Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
385	390	395 400
Gly Gly Ser Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg		
	405	410 415
His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr		
	420	425 430
Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn		
	435	440 445
Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser		
	450	455 460
Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala		

92

20	25	30
Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp	Ala Gln Ile Thr Ala Ser	Ser Ser Tyr Phe
35	40	45
Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp	Ser Pro Ser Lys Ala Arg	Leu His Leu
50	55	60
Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp	Arg Pro Gln Val Asn Asn	Pro Lys Glu
65	70	75
Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met Lys Val Thr	Gly Val Thr
85	90	95
Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu	Leu Thr Ser Met Tyr Val	Lys Glu Phe
100	105	110
Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp	Gly His Gln Trp Thr Leu	Phe Phe Gln
115	120	125
Asn Gly Lys Val Lys Val Phe	Gln Gly Asn Gln Asp Ser	Phe Thr Pro
130	135	140
Val Val Asn Ser Leu Asp Pro	Pro Leu Leu Thr Arg Tyr	Leu Arg Ile
145	150	155
His Pro Gln Ser Trp Val His	Gln Ile Ala Leu Arg Met	Glu Val Leu
165	170	175
Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu	Tyr Ala Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly
180	185	190
Gly Gly Gly Ser Ser Pro Thr	Glu Pro Ser Ser Lys Thr	Gly Asn Pro
195	200	205
Arg His Leu His Val Leu Ile	Gly Thr Ser Val Val Lys	Ile Pro Phe
210	215	220
Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu	Leu His Arg Trp Cys Ser	Asn Lys Lys
225	230	235
Asn Ala Ala Val Met Asp Gln	Glu Pro Ala Gly Asn Arg	Thr Val Asn
245	250	255
Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln	Asp His Gln Glu Val Ser	Tyr Ala
260	265	270

<210> 25

<211> 1746

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> A2-gs-BBz 核苷酸序列

<400> 25

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgcgga 60

tcctcagttg ccaagaagca tcctaaaact tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag 120
 gactgggact atgctccctt agtcctcgcc cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat 180
 ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac 240
 acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct attcagcatg aatcaggaat cttgggacct 300
 ttactttatg gggaagttgg agacacactg ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga 360
 ccatataaca tctaccctca cggaatcact gatgtccgct ctttgtattc aaggagatta 420
 ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt ccaattctgc caggagaaat attcaaatat 480
 aaatggacag tgactgtaga agatgggcca actaaatcag atcctcggtg cctgacctgc 540
 tattactcta gtttcgttaa tatggagaga gatctagctt caggactcat tggccctctc 600
 ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa agaggaaacc agataatgtc agacaagagg 660
 aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag aaccgaagct ggtacctcac agagaatata 720
 caacgctttc tccccaatcc agctggagtg cagcttgaag atccagagtt ccaagcctcc 780
 aacatcatgc acagcatcaa tggtatgtt tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg 840
 catgaggtgg catactggta cattctaagc attggagcac agactgactt cttttctgtc 900
 ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa atggtctatg aagacacact caccctattc 960
 ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg atggaaaacc caggtctatg gattctgggg 1020
 tgccacaact cagactttcg gaacagaggc atgaccgctt tactgaaggt ttctagtgtt 1080
 gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac agttatgaag atatttcagc atacttgctg 1140
 agtaaaaaca atgccattga accaagagct agcggtggcg gaggttcttg aggtggaggt 1200
 tcctccggaa tctacatctg ggcccctctg gccggcacct gtggcgtgct gctgctgtcc 1260
 ctgggtcatca ccctgtactg caagcggggc agaaagaagc tgctgtacat cttcaagcag 1320
 cccttcatgc ggctgtgca gaccacacag gaagaggacg gctgtagctg tagattcccc 1380
 gaggaagagg aaggcggctg cgagctgaga gtgaagttca gcagaagcgc cgacgcccct 1440
 gcctatcagc agggccagaa ccagctgtac aacgagctga acctgggcag acgggaggaa 1500
 tacgacgtgc tggacaagag aagaggccgg gaccctgaga tgggcggcaa gccagacgg 1560
 aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac 1620
 agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggaga agaggcaagg gccatgacgg cctgtaccag 1680
 ggcttgagca ccgccaccaa ggacacctac gacgcctgc acatgcaggc cctgcctcca 1740
 agatga 1746

<210> 26

<211> 581

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A2-gs-BBz 氨基酸序列

<400> 26

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Gly Ser Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val

20	25	30
His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val		
35	40	45
Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly		
50	55	60
Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr		
65	70	75
Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly		
85	90	95
Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile		
100	105	110
Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly		
115	120	125
Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val		
130	135	140
Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr		
145	150	155
Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg		
165	170	175
Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu		
180	185	190
Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val		
195	200	205
Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu		
210	215	220
Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile		
225	230	235
Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu		
245	250	255
Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp		
260	265	270
Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile		
275	280	285
Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly		
290	295	300
Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe		
305	310	315
Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu		
325	330	335

Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr		
340	345	350
Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr		
355	360	365
Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn		
370	375	380
Ala Ile Glu Pro Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
385	390	395
Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		
405	410	415
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys		
420	425	430
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		
435	440	445
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu		
450	455	460
Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		
465	470	475
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
485	490	495
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
500	505	510
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
515	520	525
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
530	535	540
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		
545	550	555
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
565	570	575
Ala Leu Pro Pro Arg		
580		

<210> 27

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C2-gs-BBz 核酸序列

<400> 27

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgcgga 60
 tccaatagtt gcagcatgcc attgggaatg gagagtaaag caatatcaga tgcacagatt 120
 actgcttcat cctactttac caatatgttt gccacctggt ctccttcaaa agctcgactt 180
 cacctccaag ggaggagtaa tgcctggaga cctcaggtga ataatccaaa agagtggctg 240
 caagtggact tccagaagac aatgaaagtc acaggagtaa ctactcaggg agtaaaatct 300
 ctgcttacca gcatgtatgt gaaggagttc ctcatctcca gcagtcaaga tggccatcag 360
 tggactctct tttttcagaa tggcaaagta aaggtttttc agggaaatca agactccttc 420
 acacctgtgg tgaactctct agaccaccg ttactgactc gctaccttcg aattcacccc 480
 cagagttagg tgcaccagat tgccctgagg atggaggttc tgggctgcga ggcacaggac 540
 ctctacgcta gcggtggcgg aggttctgga ggtggaggtt cctccggaat ctacatctgg 600
 gcccctctgg ccggcacctg tggcgtgctg ctgctgtccc tggtcacac cctgtactgc 660
 aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc cttcatgcg gcctgtgcag 720
 accacacagg aagaggacgg ctgtagctgt agattcccc aggaagagga aggcggctgc 780
 gagctgagag tgaagttcag cagaagcgcc gacgcccctg cctatcagca gggccagaac 840
 cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga cgggaggaat acgacgtgct ggacaagaga 900
 agaggccggg accctgagat gggcggcaag cccagacgga agaaccacca ggaaggcctg 960
 tataacgaac tgcagaaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc 1020
 gagcggagaa gaggcaaggg ccatgacggc ctgtaccagg gcctgagcac cgccaccaag 1080
 gacacctacg acgcccctgca catgcaggcc ctgcctcaa gatga 1125

<210> 28

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C2-gs-BBz 氨基酸序列

<400> 28

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5						10					15
Val	Gln	Cys	Gly	Ser	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser
				20						25					30
Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
				35						40					45
Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly
				50						55					60
Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu
65								70							80
Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln
				85											95
Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile

100	105	110
Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly		
115	120	125
Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val		
130	135	140
Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro		
145	150	155
Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys		
165	170	175
Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
180	185	190
Gly Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly		
195	200	205
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg		
210	215	220
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln		
225	230	235
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
245	250	255
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala		
260	265	270
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu		
275	280	285
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp		
290	295	300
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu		
305	310	315
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile		
325	330	335
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr		
340	345	350
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met		
355	360	365
Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
370		
<210> 29		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 甘氨酸-丝氨酸接头

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5



图1

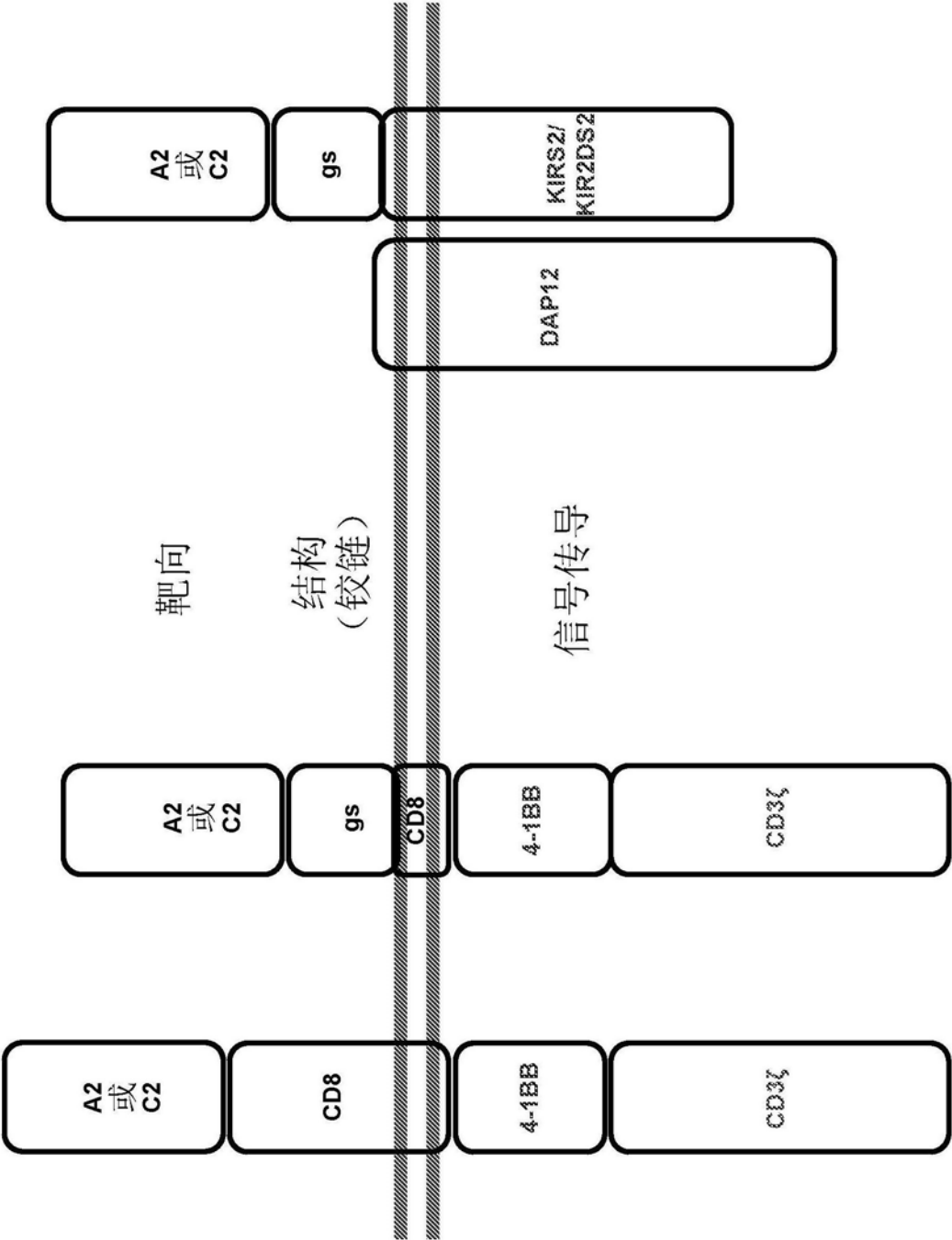


图2

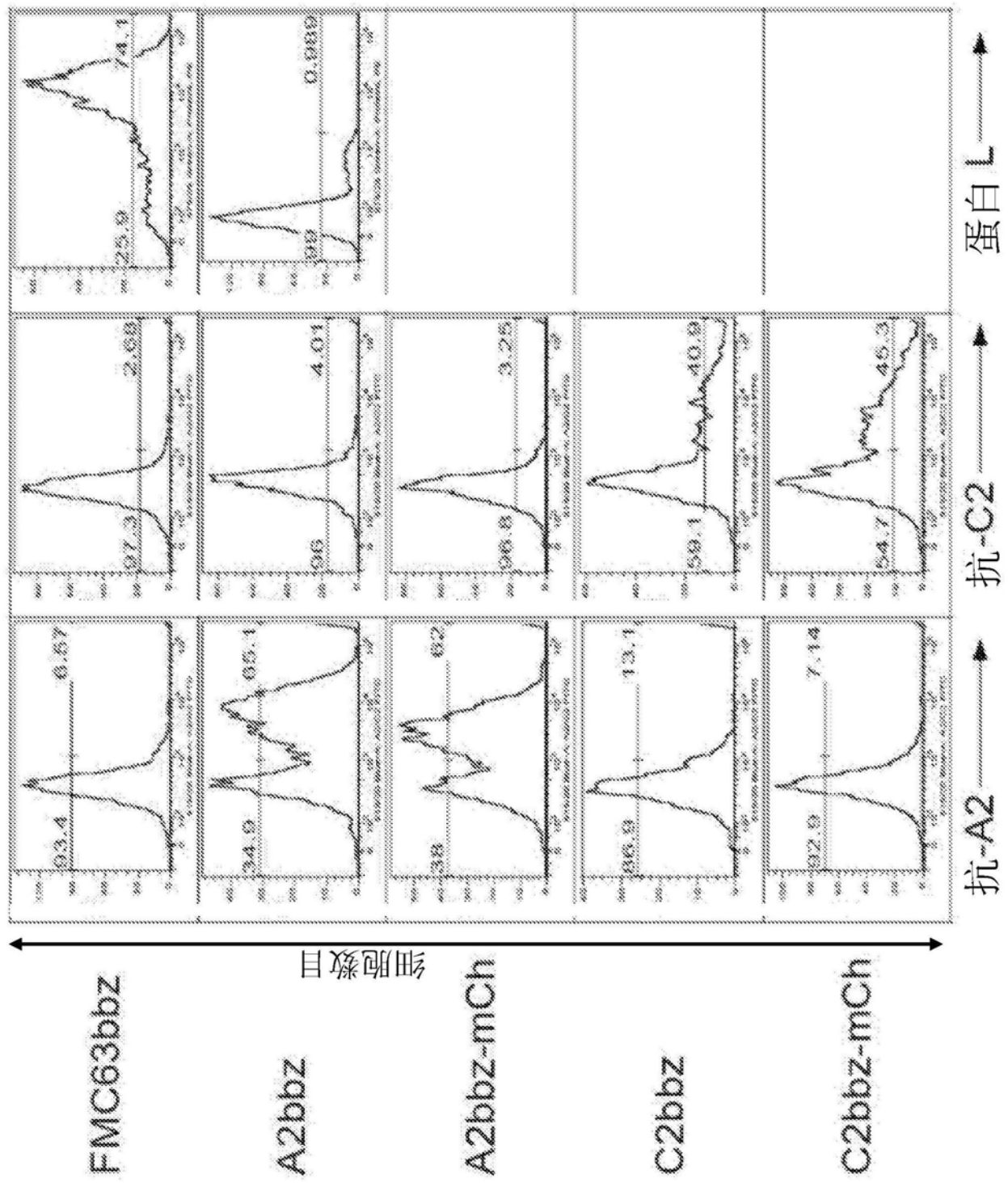


图3

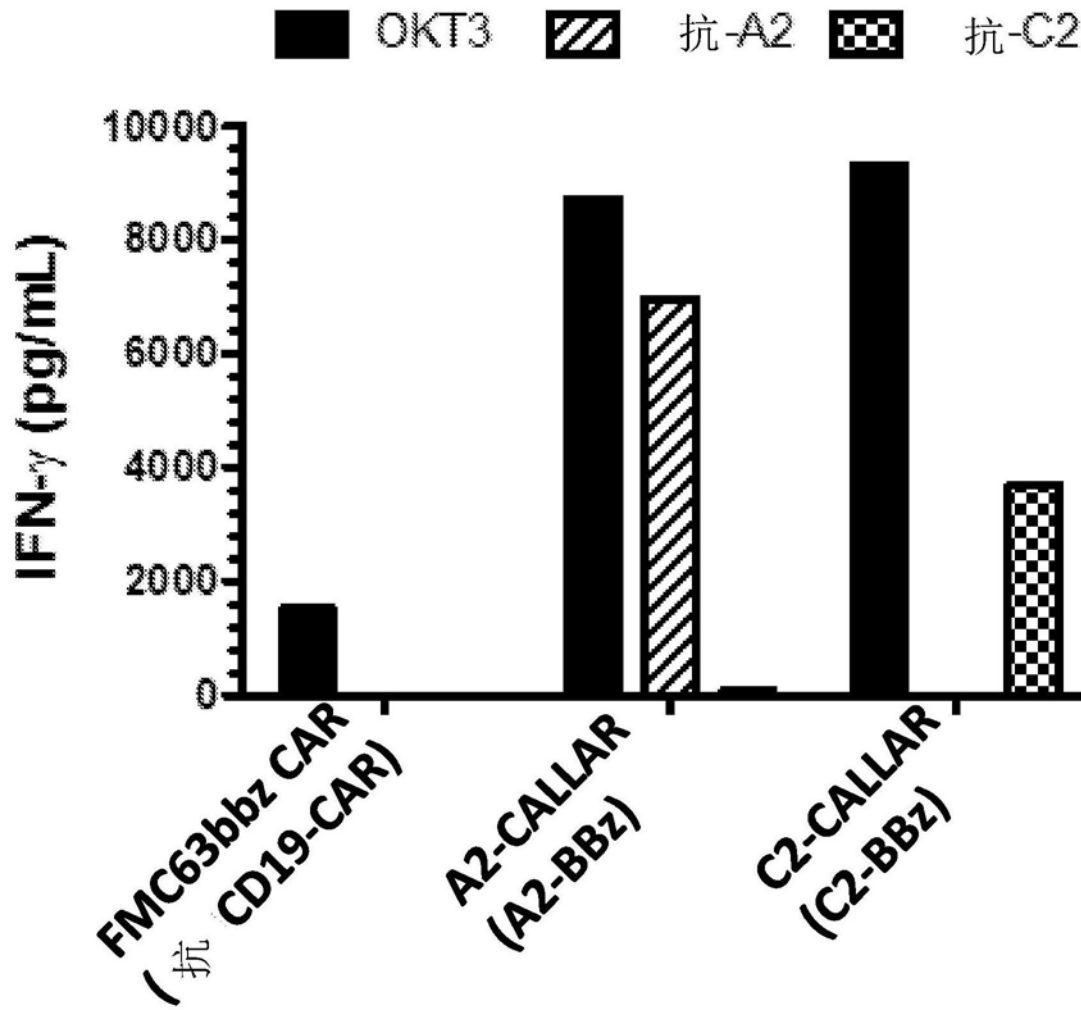


图4

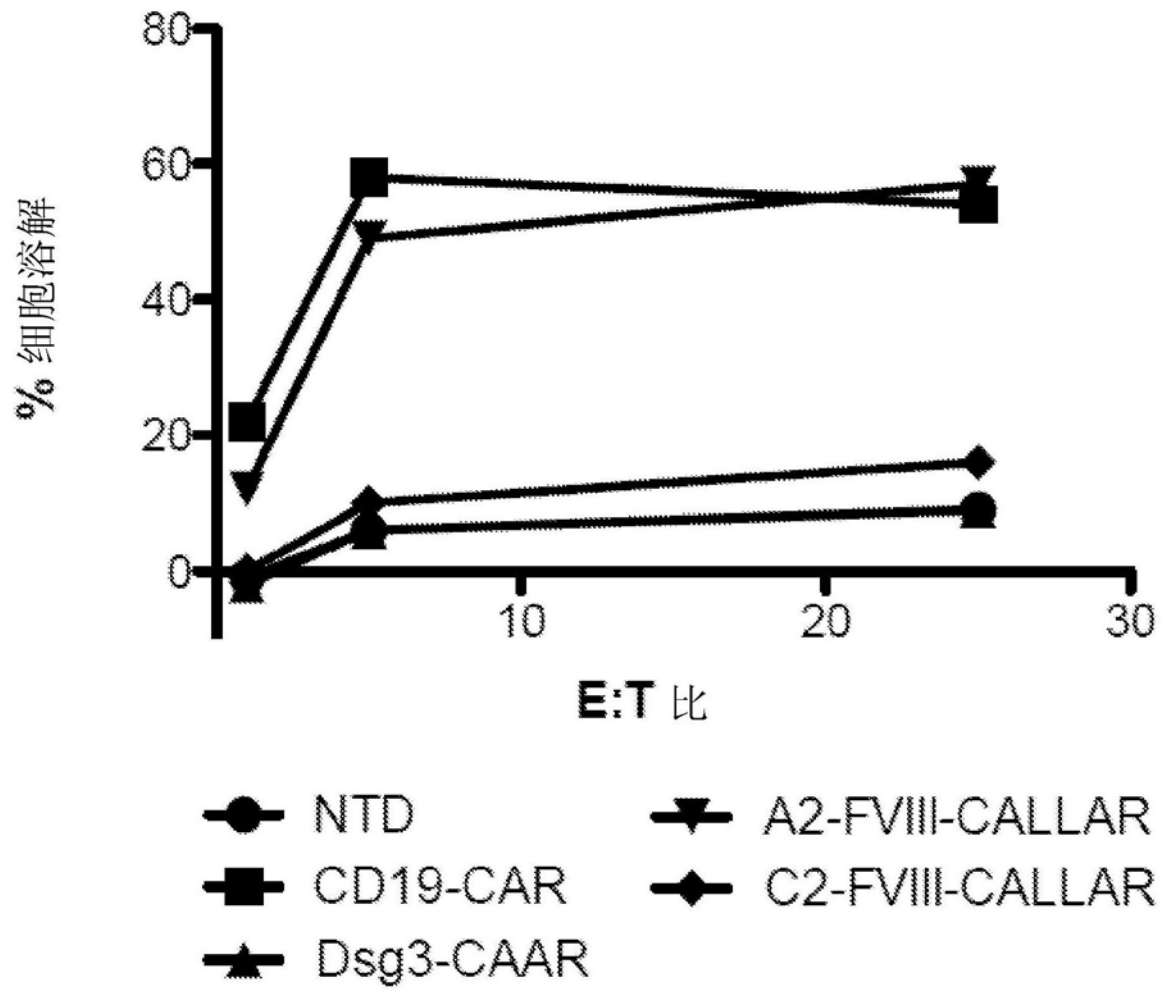


图5

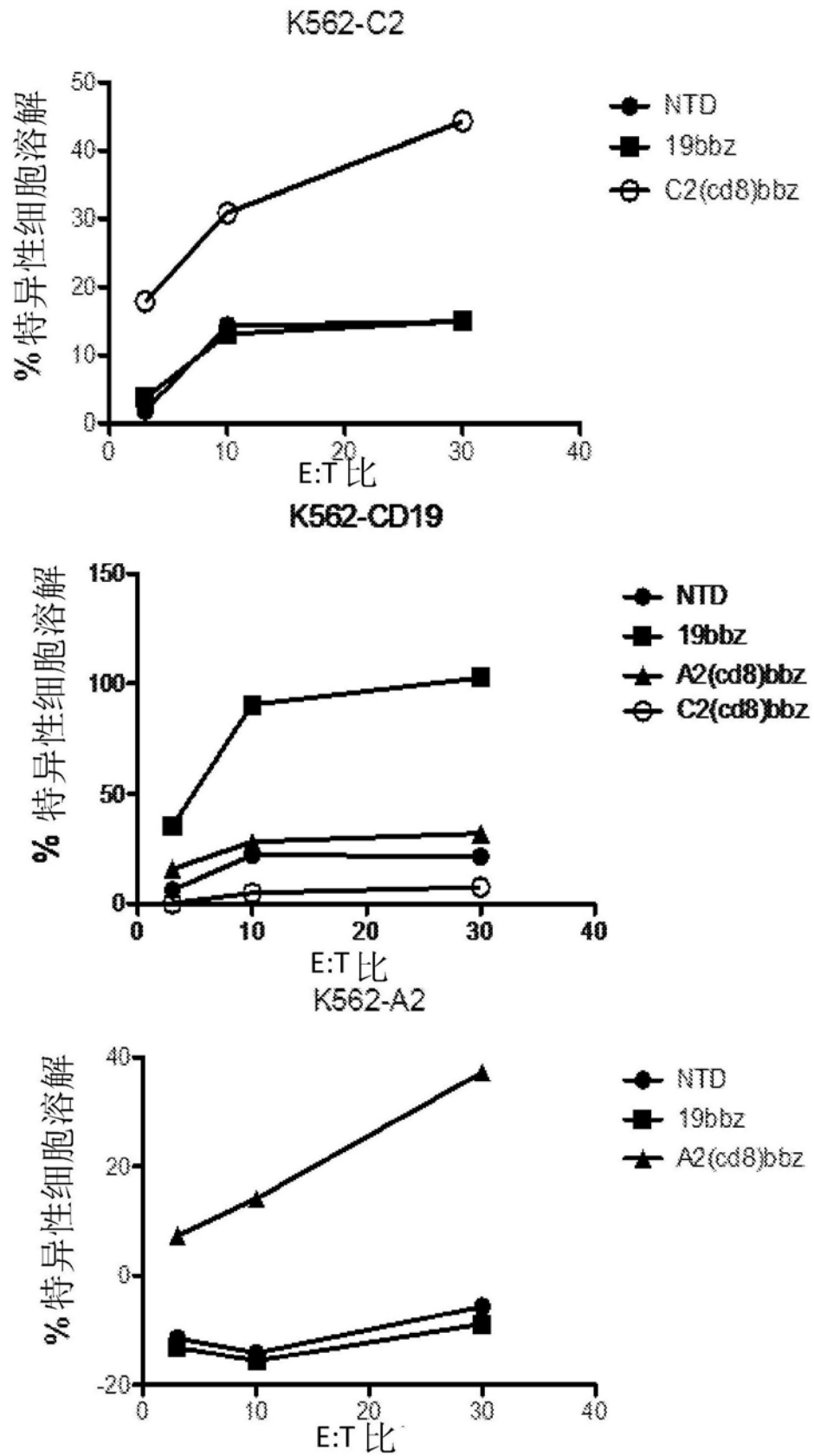


图6

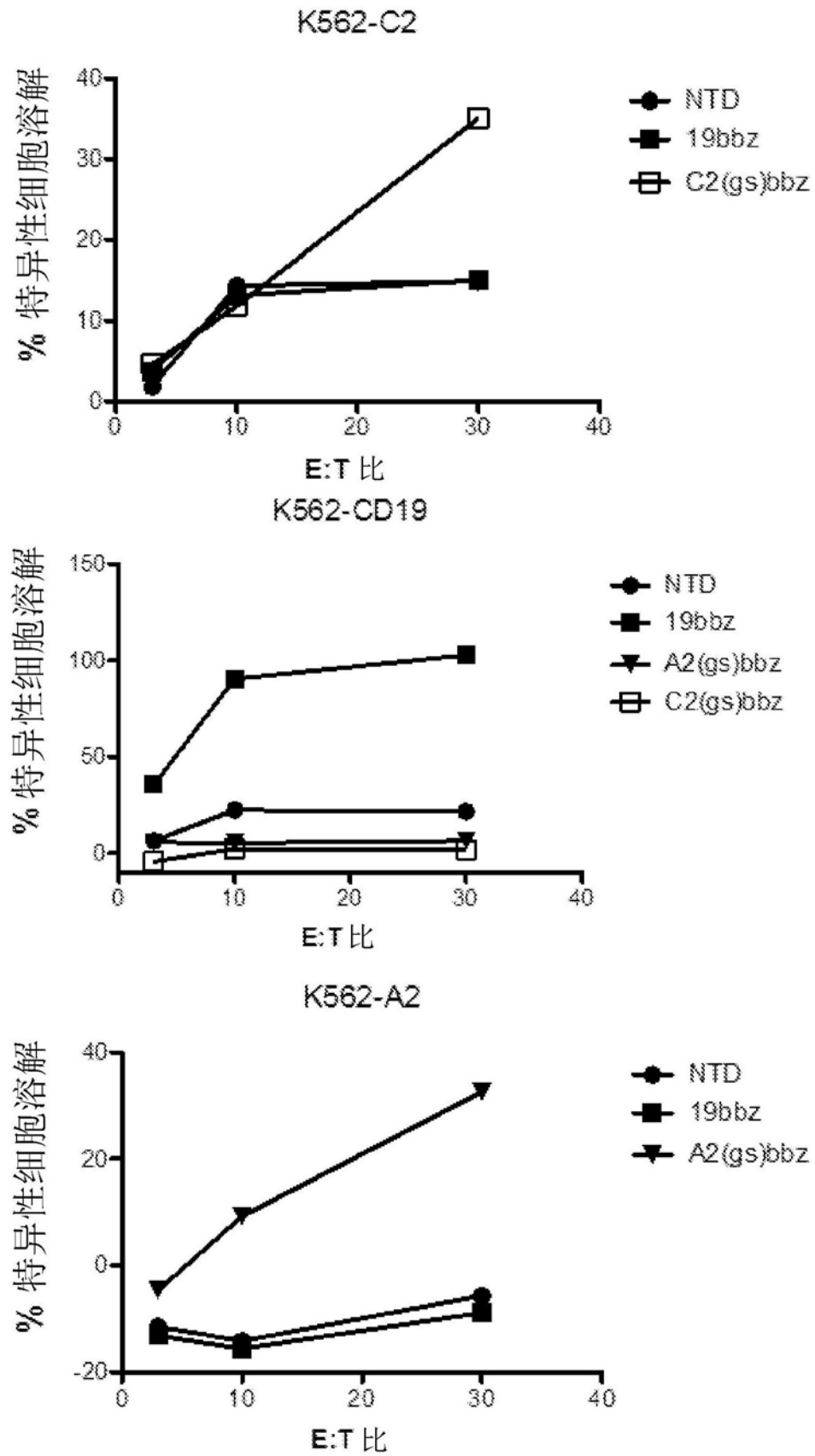


图7

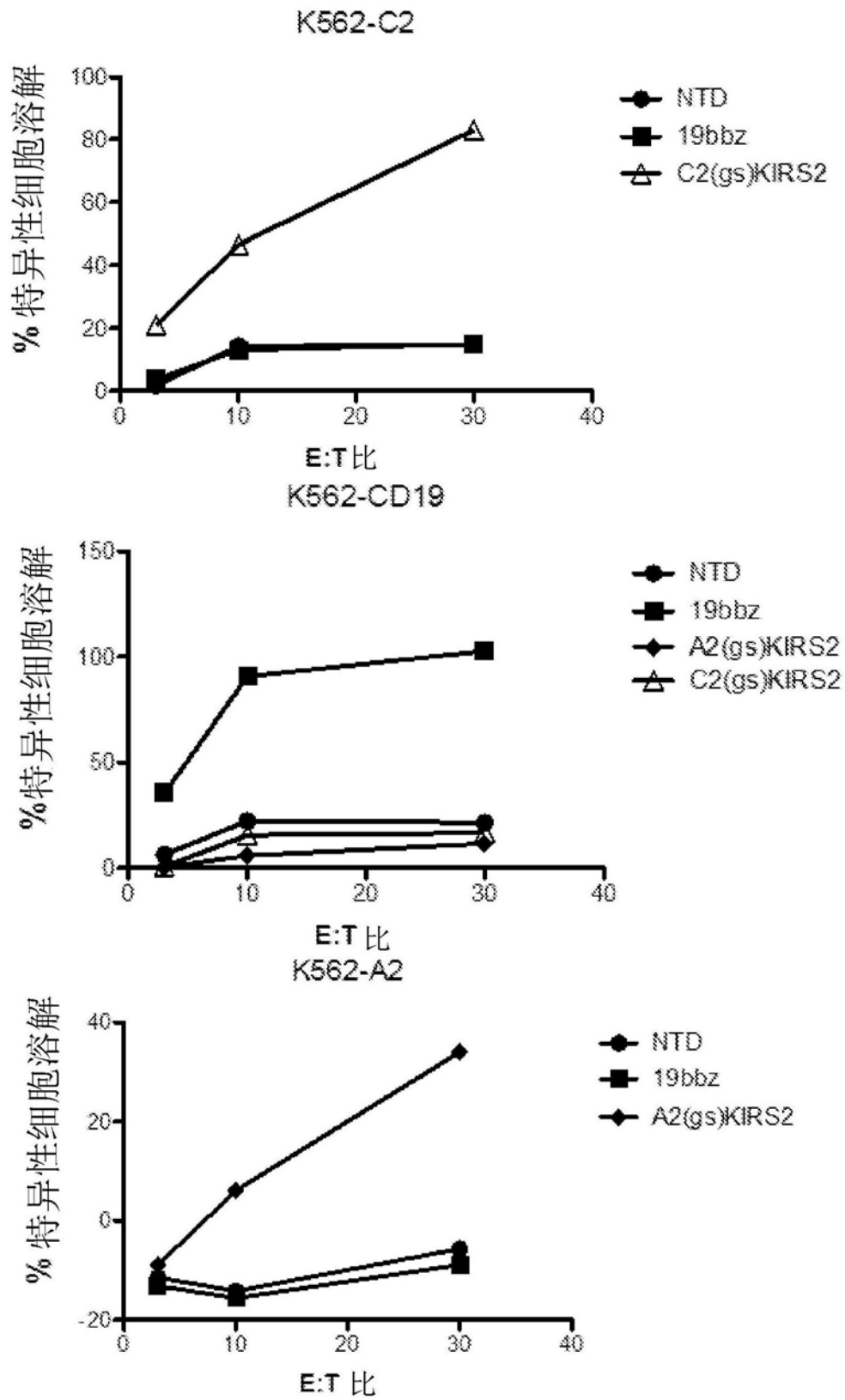


图8

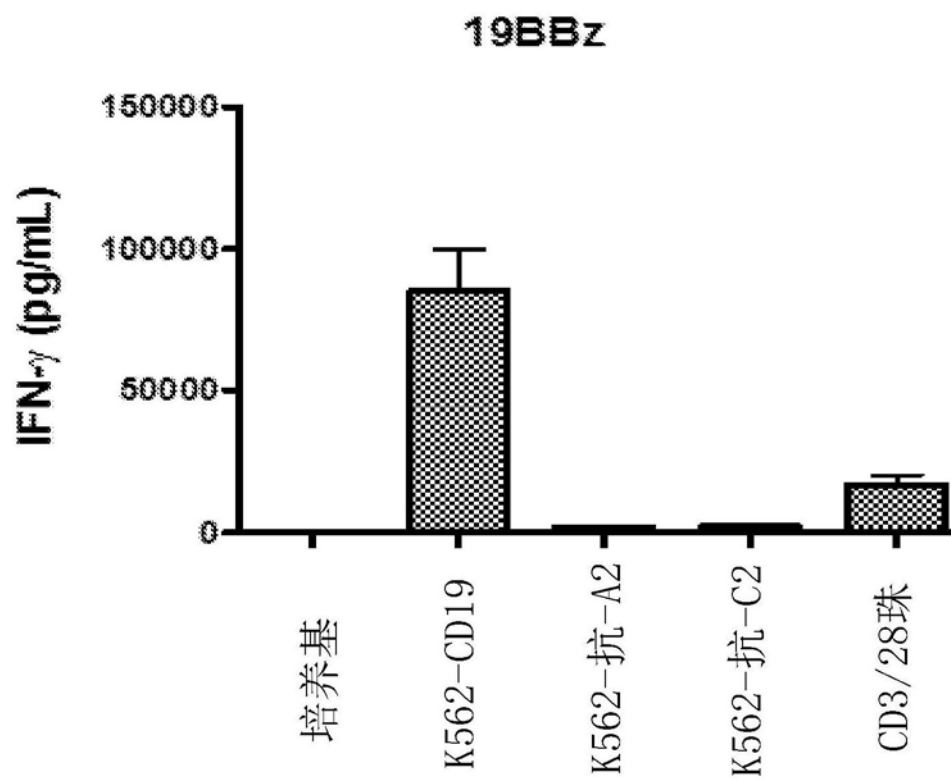


图9 (部分1/4)

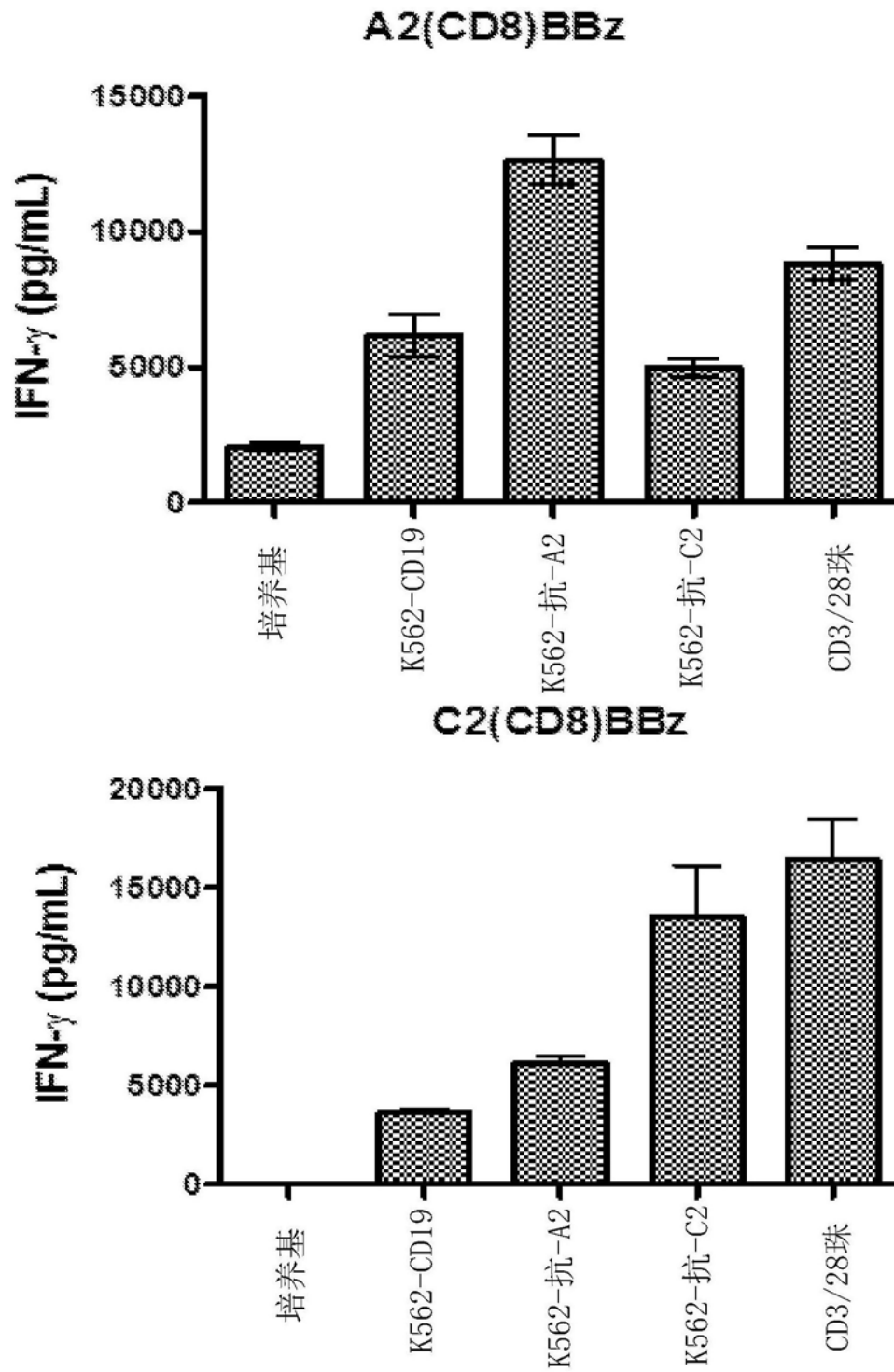


图9(部分2/4)

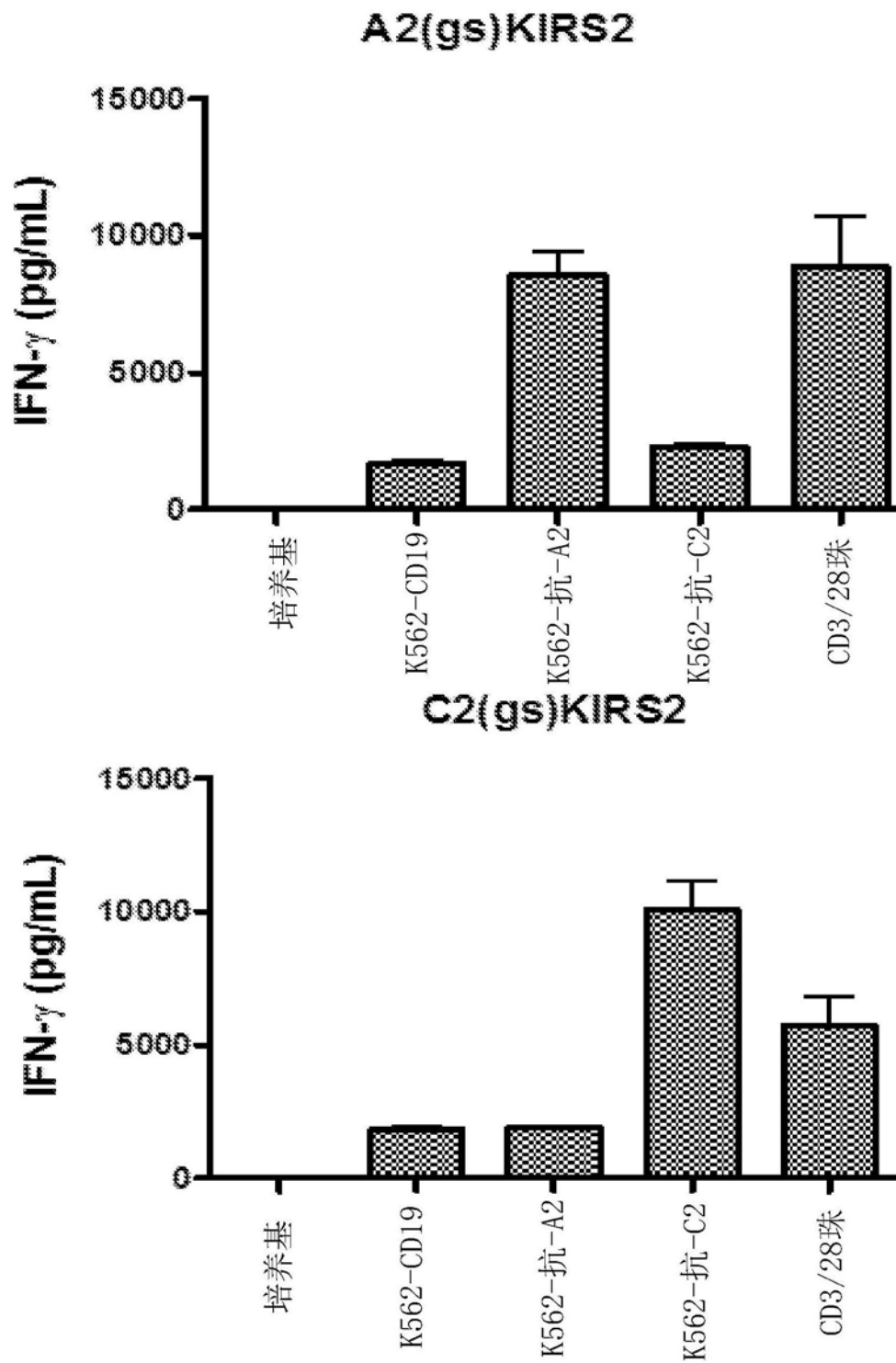


图9(部分3/4)

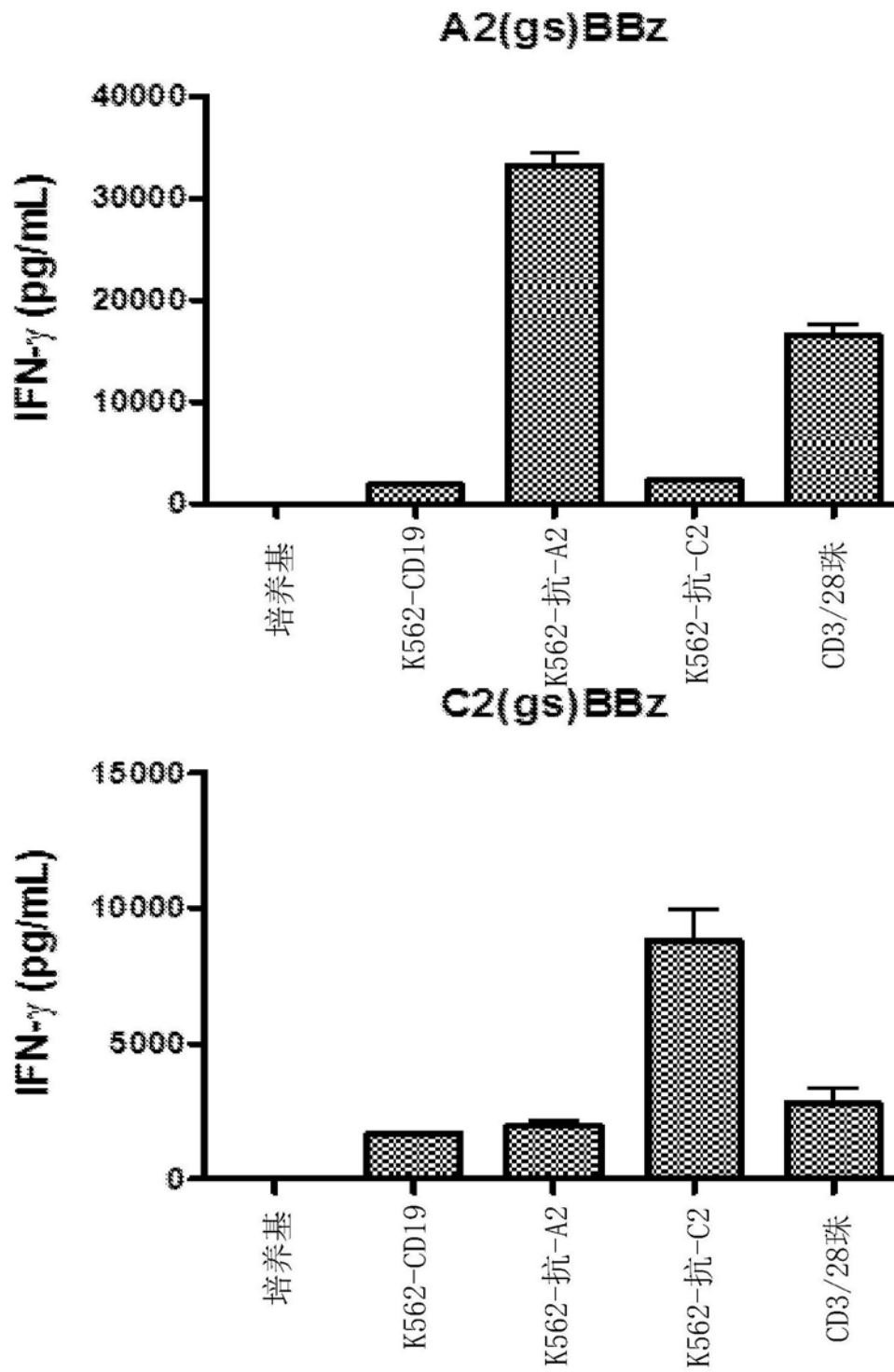


图9(部分4/4)