



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I791433 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：106112302

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 13 日

(51)Int. Cl. : C12N7/01 (2006.01)

C12N15/861 (2006.01)

A61K35/761 (2015.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2016/04/15 美國

62/323,336

2016/05/04 美國

62/331,807

2016/12/01 美國

62/428,866

(71)申請人：賓州大學委員會(美國) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (US)

美國

(72)發明人：王 利利 WANG, LILI (US)；威爾森 詹姆士 M WILSON, JAMES M. (US)；史德尼 珍妮艾格妮絲 SIDRANE, JENNY AGNES (US)

(74)代理人：王彥評；賴碧宏

(56)參考文獻：

US 8129510B2

WO 2014/064277A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：25 共 142 頁

(54)名稱

治療 A 型血友病之基因治療

(57)摘要

提供有用於治療 A 型血友病之組成物及療法。該組成物包括重組腺相關病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)，該重組腺相關病毒具驅動人類因子 VIII 表現之轉甲狀腺素蛋白增強子及啟動子。

Compositions and regimens useful in treating hemophilia A are provided. The compositions include recombinant adeno-associated virus (rAAV) with a transthyretin enhancer and promoter driving expression of a human Factor VIII.

I791433

發明摘要

※ 申請案號：106112302

※ 申請日：106/04/13

※IPC 分類：*C12N 7/01* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61P 7/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

治療 A 型血友病之基因治療

GENE THERAPY FOR TREATING HEMOPHILIA A

【中文】

提供有用於治療 A 型血友病之組成物及療法。該組成物包括重組腺相關病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)，該重組腺相關病毒具驅動人類因子 VIII 表現之轉甲狀腺素蛋白增強子及啟動子。

【英文】

Compositions and regimens useful in treating hemophilia A are provided. The compositions include recombinant adeno-associated virus (rAAV) with a transthyretin enhancer and promoter driving expression of a human Factor VIII.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

治療 A 型血友病之基因治療

GENE THERAPY FOR TREATING HEMOPHILIA A

【技術領域】

【0001】本案主張於 2016 年 4 月 15 日申請之 US 臨時專利申請案第 62/323,336 號、2016 年 5 月 4 日申請之 US 臨時專利申請案第 62/331,807 號、及 2016 年 12 月 1 日申請之 US 臨時專利申請案第 62/428,866 號優先權。此等申請案以參考文獻完整併入本文。

1.前言

【0002】本申請案係關於有用於治療 A 型血友病之基因治療的具體實施例。

【先前技術】

2.背景

【0003】A 型血友病(HA 或 HemA)為最常見的遺傳性出血性疾病。依據美國疾病控制及預防中心，於 5,000 個新生兒中約有 1 例發生 A 型血友病。於美國有約 20,000 人患有 A 型血友病。A 型血友病如同 B 型血友病常見，為 B 型血友病的四倍，一半以上的 A 型血友病患者具有血友病的嚴重型式。HA 係由 VIII 因子(FVIII)缺乏引起，且非常適合於基因替代方法，主要係因為 FVIII 量的適度增加(>正常值的 1%)可以改善嚴重的出血表型。腺相關病毒(Adeno-associated viral(AAV))載體目前顯示出對

基因治療應用的最大指望，因為它們的優異安全性及從諸如肝臟的有絲分裂後組織中引導長期轉基因表現的能力。

【0004】然而，由於人 FVIII(「hFVIII」)的不同分子和生物化學性質，AAV 載體於 HA 基因治療的使用帶來新的挑戰。與其它大小相似的蛋白質相比，hFVIII 的表現係效能非常差的。FVIII 分子的生物工程造成 FVIII 表現之改善。例如，輔助因子活性所不需要的 hFVIII B 結構域(domain)已被刪除(BDD)，並由短的 14 個胺基酸連結物(FVIII SQ)代替，導致 mRNA 量較全長野生型 FVIII 增加 17 倍，且分泌的蛋白質增加 30%。參見 Ward, Natalie J., et al. "Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression." *Blood* 117.3(2011): 798-807 及 U.S.專利 No 9,393,323，亦公開為 WO 2011/005968。重組 FVIII-BDD-SQ 於臨床上使用作為替換重組 FVIII 產品(Refacto, Wyeth Pharma; Xyntha, Pfizer)。

【0005】用於 HA 基因治療的 AAV 媒介的基因轉移之另一障礙是 FVIII 編碼序列的大小，其在 7.0kb，遠遠超過 AAV 載體的正常包裝(packaging)能力。已經報導了大表現匣至 AAV 載體中的包裝，但此為高度不一致的方法，導致具有降低感染性之載體顆粒的低產量且需要可能誘發肝損傷的高劑量。參見例如 Sarkar, R., W. Xiao, and H. H. Kazazian. "A single adeno-associated virus(AAV)-murine factor VIII vector partially corrects

the hemophilia A phenotype." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1.2(2003): 220-226 及 McIntosh, Jenny, et al. "Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant." *Blood* 121.17(2013): 3335-3344。

【0006】如此，於 HA 治療需要更有效的 AAV.FVIII 載體。

【發明內容】

3.摘述

【0007】本文描述之具體實施例係關於遞送正常人類 FVIII 至需要其之受試者用的 AAV 基因治療載體，於靜脈內投予此載體後造成長期，也許 10 年以上之出血性缺陷之臨床上有意義的校正。受試者患者族群為具有中度至重度 A 型血友病的患者。預期的載體劑量意旨在遞送約 3-10%或 5%的 FVIII 血液量。AAV 載體治療之目標係嚴重 A 型血友病患者至中度或輕度 A 型血友病之轉換，如此使此種需要進行預防療程的患者得以緩解。

【0008】本文描述之基因治療產物為目前可用於嚴重 A 型血友病的處理之預防方法提供了多個重要的優點。首先，研究產品的前臨床結果與其達成正常量的 10%或更多的因子 VIII 的循環量的潛力是一致的，該量於目標患者群體中為起改造作用的量。第二，該產品應導致有效而一致的因子 VIII 血液量，避免目前以外源因子的投予所見的波谷量。第三，藉由僅需要一個單一投予，於

一段長時間，也許十年或更長時間，可減少頻繁的靜脈投予的要求。

【0009】此申請案提供複製缺陷腺相關病毒(AAV)遞送人類因子 VIII(human Factor VIII(hFVIII 或 hF8))基因至診斷有 A 型血友病的病患(人類受試者)肝臟細胞之用途。用於遞送此 hFVIII 基因(「rAAV.hFVIII」)之此重組 AAV 載體(rAAV)應具有對於肝臟的向性(tropism)(例如，帶有 AAVhu.37 或 AAVrh.10 衣殼的 rAAV)，且此 hFVIII 轉基因應受肝臟特異性表現控制組件(liver-specific expression control elements)控制。於一具體實施例中，此表現控制組件包括下列一或多個：轉甲狀腺素蛋白(transthyretin, enTTR)增強子；轉甲狀腺素蛋白(TTR)啟動子；及 polyA 訊號。於另一具體實施例，此表現控制組件包括下列一或多個：縮短的 $\alpha 1$ -微球蛋白 / 比庫蛋白前驅物($\alpha 1$ -microglobulin/bikunin precursor, ABPS)增強子，及 enTTR；轉甲狀腺素蛋白(TTR)啟動子；及 polyA 訊號。於一具體實施例中，此表現控制組件包括下列一或多個：轉甲狀腺素蛋白增強子(enTTR)； $\alpha 1$ 抗-胰蛋白酶(A1AT)啟動子；及 polyA 訊號。於另一具體實施例中，此表現控制組件包括下列一或多個：ABPS 增強子、及 enTTR；A1AT 啟動子；及 polyA 訊號。本文中進一步說明此等組件。

【0010】於一具體實施例中，此 hFVIII 基因編碼因子 VIII 之 B-結構域經刪除的(BDD)型，其中 B-結構域經短的胺基酸連結物(FVIII-BDD-SQ，本文中亦稱為 hFVIII)

替換。於一具體實施例中，此 FVIII-BDD-SQ 蛋白質序列示於 SEQ ID NO: 3。於一具體實施例中，此 FVIII-BDD-SQ 編碼序列示於 SEQ ID NO: 1。此 hFVIII 之編碼序列，於一具體實施例中，密碼子被最佳化以於人類中表現。對天然的 hFVIII 編碼序列 (SEQ ID NO: 1)，此種序列可分享少於 80% 之一致性。於一具體實施例中，此 hFVIII 編碼序列示於 SEQ ID NO: 2。

【0011】於另一態樣，本文提供者為一適於投予至 A 型血友病患者之水性懸浮液，其包括本文所述之 rAAV。於一些具體實施例中，此懸浮液包括一水性懸浮液體及 rAAV/mL 之約 1×10^{12} 至約 1×10^{14} 個基因體拷貝數 (GC)。此懸浮液，於一具體實施例中，係適合用於靜脈注射。於其它具體實施例中，此懸浮液進一步包括界面活性劑、防腐劑及/或緩衝液溶解於此水性懸浮液體。

【0012】於另一具體實施例中，本文所提供者為一種以如本文所述之 rAAV 治療具有 A 型血友病之患者之方法。於一具體實施例中，約 1×10^{11} 至約 3×10^{13} 個基因體拷貝數 (GC) 之 rAAV/患者體重 kg 於水性懸浮液中被遞送至患者。

【0013】治療之目標係經由基於 rAAV 的肝指向基因治療作為可行的途徑以功能性地替代患者缺陷的 hFVIII，以治療該疾病並改善對目前療法的反應。本申請案中描述的具體實施例部分地基於允許有效劑量之安全遞送的治療組成物及方法的開發；及改善製造方法以符合於人類受試者中有效投劑的純化生產要求。

【圖式簡單說明】**4.圖式簡單說明****【 0014】**

圖 1 為 pAAV.E03.P3.hF8co-SQ.PA75 順式質體之示意圖。

圖 2 為 pAAV.E12.P3.hF8co-SQ.PA75 順式質體之示意圖。

圖 3 為 pAAV.E03.P2.hF8co-SQ.PA75 順式質體之示意圖。

圖 4 為 pAAV.E12.P2.hF8co-SQ.PA75 順式質體之示意圖。

圖 5 顯示於 FVIII KO 小鼠中抗體產生之前，hFVIII 活性的變化。以 10^{10} GC 之來自 42 增強子/啓動子組合之一者的 AAVrh10 載體表現 hFVIIIco-SQ 經 IV 投予 FVIII KO 小鼠。此增強子排列(表示為 E01-E14，表 1)之每一者與 TBG-S1(來自各集團的左側區)、A1AT(中間區)及 TTR(右側區)啓動子組合。hFVIII 活性(A)及抗-hFVIII IgG 力價(B)分別以 COATEST 試驗及抗-hFVIII IgG ELISA 決定。載體投予後第 2 週於分離的小鼠血漿進行試驗。對於顯示的活性，小鼠以平均值 $\pm$ SEM 個別繪製(n=10 隻/組)。

圖 6 顯示於 FVIII KO 小鼠中 IV 投予載體後 8 週，hFVIII 活性及抗-hFVIII 抗體力價。FVIII KO 小鼠以 IV 投予 10^{10} GC 之由 42 增強子/啓動子組合之一者的表現 hFVIIIco-SQ 之 AAVrh10 載體。此增強子排列(表示為

E01-E14，表 1)之每一者與 TBG-S1(來自各集團的左側區)、A1AT(中間區)及 TTR(右側區)啟動子組合。hFVIII 活性(A)及抗-hFVIII IgG 力價(B)分別以 COATEST 試驗及抗-hFVIII IgG ELISA 決定。載體投予後第 8 週於分離的小鼠血漿進行試驗。對於顯示的活性，小鼠以平均值 $\pm$ SEM 個別繪製(n=10 隻/組)。

圖 7 顯示於 FVIII KO 小鼠中 IV 投予 42 增強子/啟動子組合載體一段時間後之 hFVIII 活性。FVIII KO 小鼠以 IV 投予 10^{10} GC 之由 42 增強子/啟動子組合之一者的表現 hFVIIIco-SQ 之 AAVrh10 載體。此增強子排列(表示為 E01-E14，表 1)之每一者與 TBG-S1(來自各集團的左側區)、A1AT(中間區)及 TTR(右側區)啟動子組合。hFVIII 活性於載體投予後於小鼠分離的血漿以 COATEST 試驗雙週測定。小鼠以平均值 $\pm$ SEM 個別繪製(n=10 隻/組)。

圖 8 顯示於 FVIII KO 小鼠中 IV 投予 42 增強子/啟動子組合載體一段時間後之抗-hFVIII 抗體力價。FVIII KO 小鼠以 IV 投予 10^{10} GC 之由 42 增強子/啟動子組合之一者的表現 hFVIIIco-SQ 之 AAVrh10 載體。此增強子排列(表示為 E01-E14，表 1)之每一者與 TBG-S1(來自各集團的左側區)、A1AT(中間區)及 TTR(右側區)啟動子組合。抗-hFVIII IgG 力價藉由抗-hFVIII IgG ELISA 於分離的小鼠血漿雙週測定。小鼠被個別繪製(n=10 隻/組)。

圖 9 提供 hFVIII 活性與抗-hFVIII 抗體力價以多種載體衣殼於 IV 投予 E06.TTR.hFVIIIco-SQ 基因體之比較。FVIII KO 小鼠以 IV 投予 10^{10} GC 之來自 E06.TTR

表現 hFVIIIco-SQ 的 AAVrh10、AAV8、AAV9、AAVhu37、或 AAVrh64R1 載體。雙週收集血漿並分別以 COATEST 試驗及抗-hFVIII IgG ELISA 測定 hFVIII 活性(A)及抗-hFVIII IgG 力價(B)。對於顯示的活性，小鼠以平均值 $\pm$ SEM 個別繪製(n=10 隻/組)。

圖 10 提供於試驗的非人靈長類動物(NHP)研究中 hFVIII 的表現。(A)以 3×10^{12} GC/kg IV 投予 AAVrh10.ABP2.TBG-S1.hFVIIIco-SQ 至兩隻雄性恒河獼猴(Rhesus macaques)。(B)以 3×10^{12} GC/kg IV 投予 AAVhu37.ABP2.TBG-S1.hFVIIIco-SQ 至兩隻雄性食蟹獼猴(cynomolgus macaques)。獼猴每週或雙週採血以評估 hFVIII 表現及抗 hFVIII 轉基因的抗體的存在。hFVIII 表現於血漿以 ELISA(實線)測定且結果表示為平均值 $\pm$ SEM。抗-hFVIII IgG 力價亦於血漿中以 ELISA(虛線)測定。

圖 11 提供 hFVIII 於食蟹獼猴之表現。IV 投予 1.2×10^{13} GC/kg 之 AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、或 AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75 之一者至五隻雄性恒河獼猴。獼猴雙週採血以 ELISA 於血漿評估 hFVIII 表現且結果表示為平均值 $\pm$ SEM。

圖 12 顯示食蟹獼猴中抗-hFVIII 抗體之產生。以 1.2×10^{13} GC/kg 之 AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVhu37.E03.

TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、或 AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75 之一者 IV 投予至五隻雄性恒河獼猴。獼猴雙週採血以評估抗 hFVIII 轉基因抗體之存在。抗-hFVIII IgG 力價以 ELISA 於血漿評估。統計分析示於圖 14。

圖 13 提供一種製造的圖解。

圖 14 提供圖 12 所示的抗-FVIII 抗體之生產的時間事件分析。使用 Log-rank(Mantel-Cox)試驗，於 AAVrh.10 及 AAVhu.37 之間可見統計學上顯著的差異。

圖 15 顯示藉由 AAVrh10、AAV8、AAV3B 及 AAV5 載體(第一載體注射)之 rhCG 表現量的比較。

圖 16A-16D 顯示於不同時間點之肝臟中 rhCG 載體 DNA 複製數(AAVrh10，圖 16A；AAV8，圖 16B；AAV3B，圖 16C；AAV5，圖 16D)。

圖 17A-17B 顯示以表現 rhAFP 之 AAV3B(圖 17A)或 AAV5(圖 17B)載體(第二載體注射)再投予後之 rhAFP 量。

圖 18A-18B 顯示肝臟中 rhAFP 載體基因體拷貝數(圖 18A，AAV3B.TBG.rhAFP；圖 18B，AAV5.TBG.rhAFP)。

圖 19 顯示獼猴中差別的 AAV Nab 反應。

圖 20A-20B 提供如 6.3.8 節所述之於 IV 注射表現 hFVIIIco 之 AAVrh10 增強子/啓動子載體，於小鼠之肝臟中肝臟載體 GC(圖 20A)或 RNA 轉錄量(圖 20B)。

圖 21 提供如 6.3.8 節所述之 IV 注射表現 hFVIIIco 之 AAVrh10 增強子/啓動子載體之小鼠的肌肉(右腓腸肌)、右睪丸、胰臟、右腎臟、脾臟、右肺臟及心臟中 hFVIII RNA 轉錄量。

圖 22 爲一圖表顯示以 3×10^{12} GC/kg 單一靜脈內注射 AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 後於食蟹獼猴(35 個月)中長期安定表現之人類 FVIII。

圖 23 爲一圖表顯示圖 22 之獼猴中肝臟酵素量 (ALT, U/mL, 正方形; AST, U/mL, 圓形)。

圖 24 爲一圖表顯示對 AAVhu.37 衣殼反應之中和抗體 (Nab)。

圖 25 爲 hFVIIIco 序列 (SEQ ID NO: 2) 相對於 hFVIII 天然的 (SEQ ID NO: 1) 序列之比對。

【實施方式】

5. 詳細說明

【0015】本申請案所述之具體實施例係關於複製缺陷腺相關病毒(AAV)遞送人類因子 VIII(hFVIII)基因至診斷爲 A 型血友病(HA)病患肝臟細胞(人類受試者)之用途。用於遞送該 hFVIII 基因之重組 AAV 載體(rAAV)(「rAAV.hFVIII」)應具有對肝臟的向性(例如, 帶有 AAVhu.37 或 AAVrh.10 衣殼之 rAAV), 且該 hFVIII 轉基因應受肝臟特異性表現控制組件所控制。於一具體實施例中, 該表現控制組件包括下列一或多個: 轉甲狀腺素蛋白(TTR)增強子; 轉甲狀腺素蛋白(TTR)啟動子; 及 polyA 訊號。於本文中進一步描述此種組件。

【0016】如本文所使用, 「AAVhu.37 衣殼」係指具有 GenBank 編號: AAS99285, SEQ ID NO: 17 之胺基酸序列之 hu.37, 其藉由引用被併入本文。允許來自此編碼序列的一些變異, 其可以包括與 AAS99285 及 US

2015/0315612 中所引用的胺基酸序列具有約 99%同一性的序列(其藉由引用被併入)(即，自該引述序列少於約 1%的變異)。因此，生產此衣殼之方法、編碼序列、及生產 rAAV 病毒載體之方法已被描述。參見例如，Gao 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(10), 6081-6086(2003) 及 US 2015/0315612。

【0017】如本文所使用，「AAVrh10 衣殼」係指具有 GenBank 編號：AAO88201，SEQ ID NO：18 胺基酸序列之 rh.10，其藉由引用被併入本文。允許來自此編碼序列的一些變異，其可以包括與 AAO88201 及 US 2013/0045186A1 中所引用的胺基酸序列具有約 99%同一性的序列(其藉由引用被併入)(即，自該引述序列少於約 1%的變異)，條件為保持用於親和性捕獲純化的配體結合位點的完整性，並且序列的變化基本上不改變用於離子交換樹脂純化的衣殼的 pH 範圍(如本文進一步討論)。因此，生產衣殼、編碼序列之方法、及生產 rAAV 病毒載體之方法已被描述。參見例如，Gao 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(10), 6081-6086(2003)and US 2013/0045186A1。

【0018】本文所使用，「NAb 力價」一詞係產生多少中和抗體(例如，抗-AAV NAb)之測量，其中抗體中和其目標抗原決定基(例如，AAV)的生理作用。抗-AAV NAb 力價可被測量，如下所述，例如，Calcedo, R.等人，Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390，其藉由引用被併入本文。

【0019】於胺基酸序列之上下文中「同一性百分比(%)」、「序列同一性」、「序列同一性百分比」、或「百分比一致的」一詞係指當對應排列比較時，兩序列中為相同的殘基。在蛋白質全長、多肽、約 32 個胺基酸、約 330 個胺基酸、或其胜肽片段或對應的核酸序列編碼序列器上可容易測定胺基酸序列百分比同一性。適合的胺基酸片段可為至少約 8 個胺基酸長度，且可為至多約 700 個胺基酸，一般而言，當於兩不同序列之間指「同一性」、「同源性」或「相似性」時，「同一性」、「同源性」或「相似性」係由「排列比對的(aligned)」序列來測定。「排列比對的」序列或「排列比對」係指多個核酸序列或蛋白質(胺基酸)序列，與參考序列相比，通常包含缺失或額外的鹼基或胺基酸的校正。使用許多公開或市售 Multiple Sequence Alignment Programs 進行排列比對。序列排列比對程式可用於胺基酸序列，例如，「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及「Match-Box」程式。一般而言，此等程式之任一者皆於內定值下使用，儘管本項技術領域中具通常知識者可根據需要改變這些設定。或者，本項技術領域中具通常知識者可以利用提供至少由參考的算法及程式提供的同一性的程度或排列比對之另一算法或電腦程式。參見，例如，J. D. Thomson 等人，Nucl. Acids. Res., 「A comprehensive comparison of multiple sequence alignments」, 27(13) : 2682-2690(1999)。

【0020】如本文所使用，「操縱連結」一詞係指表現控制序列與感興趣的基因及表現控制序列相連，該表現控制序列以反向或遠距離的作用來控制感興趣的基因。

【0021】「複製缺陷病毒」或「病毒載體」係指一重組、合成或人工病毒顆粒，其中含感興趣的基因之表現匣(expression cassette)被包裝於病毒衣殼或封套中，其亦包裝在病毒衣殼或封套中的任何病毒基因體序列皆為複製缺陷的；即，其無法產生後代病毒顆粒但保有感染目標細胞的能力。於一具體實施例中，此病毒載體之基因體不包括編碼複製所需酵素的基因(基因體可被工程處理為「無膽的(gutless)」-僅含與人工基因體增幅及包裝所需訊號側接的感興趣的轉基因)，但此等基因可能在生產過程中被提供。因此，它被認為於基因治療之使用為安全的，因為除非存在複製所需的病毒酵素，否則後代病毒顆粒的複製及感染無法發生。

【0022】應注意「一」或「一個」一詞係指一或以上。因此，「一」(或「一個」)、「一個或多個」和「至少一個」一詞在本文中可互換使用。

【0023】「包含」、「含有」、及「包括」一詞被解釋為包括但不是排他性的。「組成」、「構成」及其變化被單獨解釋，而不是包含在內。儘管在說明書中的各種具體實施例使用「包含」語言來呈現，但在其它情況下，相關具體實施例亦意圖用「由...組成」或「基本上由...組成」語言進行解釋和描述。

【0024】如本文所使用，除非另有說明，「約」一詞意指所給參考文獻之 10% 的變異性。

【0025】除非在本說明書中另有定義，否則本文中使用的技術及科學術語具有與本項技術領域中具通常知識者通常所了解及參考的公開文獻的相同意義，其提供了本項技術領域中具通常知識者對於本申請案所使用許多用語的一般指引。

5.1 基因治療載體

【0026】於一態樣，提供一帶有人類凝血因子 8(hF8 或 hFVIII)基因之重組物腺相關病毒(rAAV)載體以用於基因治療。此 rAAV.hFVIII 載體應具有對肝臟的向性(例如，帶有 AAVhu.37 或 AAVrh.10 衣殼之 rAAV)且該 hFVIII 轉基因應受肝臟特異性表現控制組件所控制。此載體被調配於適合輸注至人類患者之緩衝液/載劑中。此緩衝液/載劑應包括一防止 rAAV 黏至輸注管但不干擾活體內 rAAV 結合活性之成分。

5.1.1. rAAV.hFVIII 載體

5.1.1.1. hFVIII 序列

【0027】人凝血因子 VIII 產生為具有結構域結構 A1-A2-B-A3-C1-C2 之大的 330-kDa 醣蛋白，其中 A 和 C 結構域兩者皆具有內序列同源性(internal sequence homology)以及與因子 V(FV)之 A 及 C 之約 40% 的序列同一性，其共享相同的結構域結構。B 結構域，其構成 38% 之全部序列，對於促凝活性為非必要的。FVIII 中 B 結構域被刪除(BDD)且經短 14 個胺基酸連結物(FVIII SQ)

取代者係於臨床上使用作為替換重組物 FVIII 產品，且已顯示導致全長野生型 FVIII 的 mRNA 量增加 17 倍，分泌蛋白質增加 30%。參見，McIntosh 等人，Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant, *Blood*, 121(17): 3335-44(Feb 2013) and Ward et al, Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression, *Blood*, 117(3): 798-807(Jan 2011)，其藉由引用被併入本文。

【0028】於一具體實施例中，此 hFVIII 基因編碼示於 SEQ ID NO: 3 之 hFVIII 蛋白質，其為一 FVIII，其中 B 結構域被刪除(BDD)且以短的 14 個胺基酸連結物(FVIII-BDD-SQ)取代。如此，於一具體實施例中，此 hFVIII 轉基因可包括，但不限於，SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 提供之一或多個序列，其被提供於附上的序列表中，其藉由引用被併入本文。SEQ ID NO: 1 提供天然的人類 FVIII-BDD-SQ 之 cDNA。SEQ ID NO: 2 提供人類 FVIII-BDD-SQ 之經工程處理的 cDNA，其已被密碼子優化用於在人類中表達(有時於本文中稱為 hFVIIIco-SQ 或 hFVIIIco-BDD-SQ)。應了解於一些具體實施例中，本文提及 hFVIII 可能係指天然或經密碼子優化序列之 hFVIII-BDD-SQ。或者或另外，基於網絡或可商業上取得的電腦程式以及基於服務的公司可用於將胺基酸序列反向轉譯成核酸編碼序列，包括 RNA 及/或 cDNA 兩者。參見，例如，EMBOSS 之 backtranseq, www.ebi.ac.uk/Tools/st/;

Gene Infinity(www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html) ;
ExPasy(www.expasy.org/tools/)。其意旨在包含編碼所述
hFVIII 多肽序列的所有核酸，包括已針對所欲目標受試
者中表達之優化的核酸序列(例如藉由密碼子優化)。於
一具體實施例中，此編碼 hFVIII 之核酸序列共享至少
95%同一性，與 SEQ ID NO: 1 之天然 hFVIII 編碼序列。
於另一具體實施例中，此編碼 hFVIII 之核酸序列共享至
少 90、85、80、75、70 或 65%同一性，與 SEQ ID NO:
1 之天然 hFVIII 編碼序列。於一具體實施例中，此編碼
hFVIII 之核酸序列共享約 77%同一性，與 SEQ ID NO: 1
之天然 hFVIII 編碼序列。於一具體實施例中，此編碼
hFVIII 之核酸序列為 SEQ ID NO: 2。於另一具體實施例
中，此編碼 hFVIII 之核酸序列共享至少 99%、97%、95%、
90%、85%、80%、75%、70%、或 65%同一性，與 SEQ ID
NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 之 hFVIII 編碼序列。於另一具
體實施例中，此編碼 hFVIII 之核酸序列為 SEQ ID NO:
19。於另一具體實施例中，此編碼 hFVIII 之核酸序列共
享至少 90、85、80、75、70、或 65%同一性，與 SEQ ID
NO: 19 之 hFVIII 編碼序列。於又另一具體實施例中，
此編碼 hFVIII 之核酸序列共享至少 40、41、42、43、44、
45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、
57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、
69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、
81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、
93、94、95、96、97、98、或 99%同一性，與 SEQ ID NO:

1 或 SEQ ID NO: 2 之 hFVIII 編碼序列。於又另一具體實施例中，此編碼 hFVIII 之核酸序列共享至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、或 99% 同一性，與 SEQ ID NO: 19 之 hFVIII 編碼序列。參見，Ward 等人，Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression, Blood, 117(3): 798-807(Jan 2011)，其藉由引用被併入本文，用於討論 FVIII-SQ 的各種變異體，包括密碼子優化的變異體。

【0029】密碼子優化的編碼區可以各種方法設計。此優化可以使用可線上使用的方法(例如，GeneArt)、公開的方法或提供密碼子優化服務的公司來執行該優化，例如，DNA2.0(Menlo Park, CA)。一種密碼子優化方法被描述，例如，於國際專利公開號 No. WO 2015/012924，其藉由引用被併入本文。亦參見，例如，US 專利公開號 No. 2014/0032186 及 US 專利公開號 No. 2006/0136184。適當地，產物的開放讀碼框(open reading frame, ORF)的整個長度被修飾。然而，於一些具體實施例中，僅 ORF 之一片段被變更。藉由使用此等方法之一者，可以應用

頻率於任何指定的多肽序列，且產生編碼多肽之密碼子優化的編碼區的核酸片段。

【0030】許多選項可用於進行密碼子的實際改變或用於合成如本文所述之設計的密碼子優化的編碼區。使用本項技術領域中具通常知識者熟知的標準及常規分子生物學操作可進行此種修飾或合成。於一方法中，藉由標準方法合成一系列長度為 80-90 個核苷酸及跨越所需序列長度之互補寡核苷酸對。合成此等寡核苷酸對，使得在退火(annealing)時它們形成 80-90 個鹼基對的雙股片段，其含有黏性末端，例如，合成該對中的各寡核苷酸以延伸超出與該對中的其它寡核苷酸互補的區域之 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多個鹼基。每對寡核苷酸之單股末端設計為與另一對寡核苷酸的單股末端退火。使寡核苷酸對退火，然後將約 5 至 6 個此等雙股片段經由內聚單股末端(cohesive single stranded ends)一起退火，然後連接在一起並克隆到標準細菌克隆載體中，例如，可獲自 Thermo Fisher Scientific Inc.之 TOPO®載體。然後此構築體以標準方法定序。製備由連接在一起的 80 至 90 個鹼基對片段的 5 至 6 個片段組成的幾個構築體，即約 500 個鹼基對的片段，使得整個所欲序列於一系列質體構築體中表現。然後以適當的限制酶切割此等質體的插入物並連接一起以形成最終構築體。然後將最終的構築體克隆到標準細菌克隆載體中並定序。對本項技術領域中具通常知識者來說，另外的方法將為顯而易見的。此外，基因合成為商業上容易獲得的。

5.1.1.2. rAAV 載體

【0031】因為 hFVIII 天生於肝臟中表現，使用顯示肝臟向性之 AAV 為冀望的。於一具體實施例中，此供應衣殼之 AAV 為 AAVrh.37。於另一具體實施例中，此供應衣殼之 AAV 為 AAVrh.10。然而，可使用具肝臟向性之多種 rAAV 載體之任一者。

【0032】於下列實施例所描述之一特定具體實施例，該基因治療載體為於轉甲狀腺素蛋白啟動子控制下表現 hFVIII 轉基因之 AAVhu.37 載體，稱為 rAAVhu.37.TTR.hFVIII。外部 AAV 載體成分為一血清型 hu.37， $T=1$ ，二十面體衣殼，由三種 AAV 病毒蛋白質 VP1、VP2 及 VP3 以比率 1: 1: 10 所構成之 60 個複製數。該衣殼含有一單股 DNA rAAV 載體基因體。

【0033】該 rAAVhu.37.TTR.hFVIII 基因體含有以兩個 AAV 反向末端重複(Inverted terminal repeats, ITRs)側接的 hFVIII 轉基因。該 hFVIII 轉基因包括增強子、啟動子、hFVIII 編碼序列、及多腺苷酸化(polyA)訊號。此等控制序列為「操縱連結」至 hFVIII 基因序列。此表現匣可被工程處理至用於生產之病毒載體質體上。

【0034】ITRs 是負責於載體生產過程中基因體之複製及包裝的遺傳組件，且為生成 rAAV 所需的唯一病毒順式(*cis*)組件。將表達匣包裝至 AAV 病毒顆粒中所需的最小序列為 AAV 5'和 3'ITR，其可為與衣殼具有相同的 AAV 來源，或不同 AAV 來源(產生 AAV 假型(pseudotype))。於一具體實施例中，使用來自 AAV2 的

ITR 序列或其缺失型(Δ ITR)。然而，可選擇來自其它 AAV 來源。當 ITR 的來源為來自 AAV2 且 AAV 衣殼來自另一個 AAV 來源時，生成的載體可被稱為假型。典型地，AAV 載體的表現匣包含 AAV 5'ITR、hFVIII 編碼序列及任何調節序列，以及 AAV 3' ITR。然而，此等組件之其它構形可能為合適的。已經描述了稱為 Δ ITR 的 5'ITR 之縮短版，其中 D 序列及終端解析位點(terminal resolution site, trs)被刪除。於其它具體實施例中，使用全長 AAV 5'及 3' ITRs。於一具體實施例中，此 5' ITR 序列示於 SEQ ID NO: 11。於一具體實施例中，3' ITR 序列示於 SEQ ID NO: 12。

【0035】由肝臟特異性啟動子驅動 hFVIII 編碼序列的表現。因為 hFVIII 轉基因之大小，使用相對較小尺寸的啟動子為所欲地。本文所述的說明性質體及載體使用甲狀腺素蛋白(TTR)(本文亦稱為 P3)啟動子或其修飾形式。TTR 啟動子序列示於 SEQ ID NO: 7。或者，可使用其它肝臟特異性啟動子，諸如甲狀腺素結合球蛋白(TBG)(本文中亦稱為 P1)啟動子，或其縮短版，TBG-S1，其序列示於 SEQ ID NO: 8。另一適合的啟動子為 α 1 抗-胰蛋白酶(A1AT)，或其修飾版(本文中亦稱為 P2)，示於 SEQ ID NO: 9。其它適合的啟動子包括人類白蛋白(Miyatake et al., J. Virol., 71: 5124-32(1997))，humAlb；及 B 型肝炎病毒核啟動子(Sandig 等人，Gene Ther., 3: 1002-9(1996))。參見，例如，The Liver Specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor,

rulai.schl.edu/LSPD，其經引用被併入。儘管不太希望，本文所述載體中可使用及利用其它啓動子，諸如病毒啓動子、組成型啓動子、可調節的啓動子[參見，例如，WO 2011/126808 及 WO 2013/04943]、或對生理暗示有反應的啓動子。

【0036】於一具體實施例中，此表現控制序列包括一或多個增強子。於一具體實施例中，包括轉甲狀腺素蛋白(enTTR)(來自轉甲狀腺素蛋白之 100 bp 增強子序列)，其序列示於 SEQ ID NO: 5。參見 Wu 等人，Molecular Therapy, 16(2): 280-289, Feb. 2008，其藉由引用被併入。於另一具體實施例中，包括 En34 增強子(來自人類脂蛋白元(apolipoprotein)肝控制區之 34 bp 核增強子)，其示於 SEQ ID NO: 4。於又另一具體實施例，包括 ABPS(來自 α 1-微球蛋白之 100 bp 遠端的增強子/比庫蛋白前驅物[ABP]至 42 bp 之縮短版)增強子。此種序列示於 SEQ ID NO: 6。於另一具體實施例中，存有多於一個增強子。此種組合可包括多於一個之本文所述任何增強子之一拷貝，及/或多於一型之增強子。於各種具體實施例中，以下列組合之一者存有增強子：

【0037】表 1：增強子組合

組合名稱	En34	ABPS	EnTTR	淨長度(bp)
E01	1	0	0	34
E02	0	1	0	42
E03	0	0	1	100
E04	1	1	0	76
E05	0	1	1	142
E06	1	0	1	134
E07	2	0	0	68
E08	0	2	0	84
E09	0	0	2	200
E10	1	1	1	176
E11	2	0	1	168
E12	0	2	1	184
E13	1	2	0	118
E14	2	1	0	110

【0038】於一具體實施例中，增強子以下列順序組合：5'-EnTTR-ABPS-En34-啟動子-3'。於另一具體實施例中，增強子以下列順序組合：5'-啟動子-EnTTR-ABPS-En34-3'。於一具體實施例中，表現控制序列包括 enTTR。於另一具體實施例中，表現控制序列包括兩拷貝之 ABPS 及 1 拷貝之 enTTR。

【0039】除了啟動子，表現匣及/或載體可含有其它適當的轉錄起始、終止、增強子序列、及有效的 RNA 處理訊號。此種序列包括拼接及多腺苷酸化(polyA)訊號；安定細胞質 mRNA 的序列；增強轉錄效力的序列(即，Kozak consensus sequence)；增進蛋白質安定性的序列；及當冀望時，增進編碼產物的分泌的序列。於一具體實施例中，多腺苷酸化(polyA)訊號被包括以調節 hFVIII mRNA 轉錄之終止。本文中有用的 polyA 訊號為人工 polyA，其大小為約 75bp(PA75)，示於 SEQ ID NO: 10。

其它適合的 polyA 序列之例包括例如，牛生長荷爾蒙、SV40、兔 β 球蛋白、及 TK polyA，於其它者中者。

【0040】於一具體實施例中，調節序列被選擇使得總 rAAV 載體基因體大小為約 5 至約 5.5 千鹼基。於另一具體實施例中，調節序列被選擇以使總 rAAV 載體大小為約 5.1kb。於另一具體實施例中，調節序列被選擇以使總 rAAV 載體基因體大小為約 5.2kb。於另一具體實施例中，總 rAAV 載體基因體大小為少於 5kb。

【0041】於一具體實施例中，載體基因體為 SEQ ID NO: 13 之 nt 1 至 nt 5110。於一具體實施例中，載體基因體為 SEQ ID NO: 14 之 nt 1 至 nt 5194。於一具體實施例中，載體基因體為 SEQ ID NO: 15 之 nt 1 至 nt 5138。於另一具體實施例中，載體基因體為 SEQ ID NO: 16 之 nt 1 至 nt 5222。

5.1.2. rAAV.hFVIII 調配物

【0042】於一具體實施例中，rAAV.hFVIII 載體被提供於醫藥組成物中，其包含水性載劑、賦形劑、稀釋劑或緩衝液。於一具體實施例中，該緩衝液為 PBS。於一特定具體實施例，rAAV.hFVIII 調配物為含有有效量之 rAAV.hFVIII 載體懸浮於含 0.001% Pluronic F-68 於 TMN200(200 mM 氯化鈉、1 mM 氯化鎂、20 mM Tris, pH 8.0)的水溶液之懸浮液。然而，已知各種適合的溶液，包括該等包括緩衝鹽水、界面活性劑及生理上相容的鹽或鹽的混合物中的一種或多種的溶液，其被調節至等於約 100mM 氯化鈉(NaCl)至約 250mM 的離子強度之氯化鈉或調節至等效離子濃度之生理上相容的鹽。

【0043】例如，本文提供之懸浮液可含有 NaCl 及 KCl 兩者。pH 可為於範圍 6.5 至 8.5，或 7 至 8.5，或 7.5 至 8。適合的界面活性劑、或界面活性劑之組合，可選自：泊洛沙姆(Poloxamers)，即由以兩個聚氧乙烯(聚(氧化乙烯))之親水鏈位於兩側的聚氧丙烯(聚(氧化丙烯))的中心疏水鏈構成之非離子性三嵌段共聚物；SOLUTOL HS 15(聚乙二醇-15 羥基硬脂酸酯)；LABRASOL(聚氧基辛酸甘油酯)；聚氧基 10 油醯基醚；TWEEN(聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯)，乙醇及聚乙二醇。於一具體實施例中，此調配物含有泊洛沙姆。此等共聚物通常以字母「P」(由於泊洛沙姆)後面跟隨三個數字：前兩個數字 $\times 100$ 得到聚氧丙烯核心之大約分子量，最後一個數字 $\times 10$ 得到聚氧乙烯含量百分比。於一具體實施例中，選擇泊洛沙姆 188。此界面活性劑可以懸浮劑之至多約 0.0005 %至約 0.001%-量的範圍存在。於另一具體實施例中，載體被懸浮於含 180 mM 氯化鈉、10 mM 磷酸鈉、0.001%泊洛沙姆 188，pH 7.3 的水溶液。

【0044】於一具體實施例中，此調配物係適合使用於人類受試者且經靜脈內投予。於一具體實施例中，此調配物係經由團式注射(bolus injection)由周圍靜脈遞送。於一具體實施例中，此調配物係經由輸注約 10 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於一具體實施例中，此調配物經由輸注約 90 分鐘(± 10 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經由輸注約 20 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經

由輸注約 30 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經由輸注約 40 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經由輸注約 50 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經由輸注約 60 分鐘(± 5 分鐘)而由 15 周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經由輸注約 70 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。於另一具體實施例中，此調配物經由輸注約 80 分鐘(± 5 分鐘)而由周圍靜脈遞送。然而，此時間可依需要或冀望而被調整。可使用任何適當的方法或路徑以遞送如本文所述之含 AAV 的組成物，且可選擇地，共同投予其它活性藥物或與本文所述的 hFVIII 之 AAV 調節的遞送結合之療法。投予途徑包括例如全身、口服、吸入、鼻內、氣管內、動脈內、眼內、靜脈內、肌肉內、皮下、皮內及其它非經口的投予途徑。

【0045】於一具體實施例中，此調配物可含有例如，每公斤患者體重約 1.0×10^{11} 基因體拷貝數(GC/kg)至約 1×10^{14} GC/kg，每公斤患者體重約 5×10^{11} 基因體拷貝數(GC/kg)至約 3×10^{13} GC/kg，或約 1×10^{12} 至約 1×10^{14} GC/kg，如藉由 oqPCR 或微滴式數位 PCR(digital droplet PCR(ddPCR))測量，如描述於例如，M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14，其藉由引用被併入。於一具體實施例中，rAAV.hFVIII 調配物為一含有至少 1×10^{13} 或以上之基因體拷貝數(GC)/mL 之懸浮

液，如藉由 oqPCR 或微滴式數位 PCR(ddPCR)測量，如描述於例如，上述 M. Lock 等人。

【 0046 】 爲了保證空衣殼自投予至病患的 AAV.hFVIII 的投劑被移除，於載體純化製程期間將空衣殼自載體顆粒分離，例如，使用本文討論之方法。於一具體實施例中，含經包裝的基因體之載體顆粒自空衣殼純化，使用描述於 2016 年 12 月 9 日申請之國際專利申請案 No. PCT/US2016/066013 之方法，及 2016 年 4 月 13 日申請之 US 專利申請案 No. 62/322,055，標題爲「對於 AAVrh.10 可量測的純化方法」，其藉由引用被併入本文。簡言之，兩步驟純化方案被描述，其選擇性地捕捉及自 rAAV 生產細胞培養物之澄清、濃縮的上清液中分離含基因組之 rAAV 載體顆粒。此製程利用於高鹽濃度下進行之親和性捕捉法隨後以陰離子交換樹脂法於高 pH 下進行，以提供 rAAV 載體顆粒，其實質上無 rAAV 中間物。於 AAVhu.37 系載體可使用相似的純化法。其它純化法被描述於例如，US 專利申請案 Nos. 62/266,347、62/266,357、62/322,071、62/266,351、62/322,083、62/266,341、及 62/322,098，其每一者藉由引用被併入。

【 0047 】 儘管可利用任何常規的製造方法，本文所描述之方法(及於國際專利申請案號 PCT/US2016/066013)得到載體製劑，其中 50 至 70%間之該顆粒具有一個載體基因體，即 50%至 70%的完整顆粒。如此，對於 1.6×10^{12} GC/kg 的示例性劑量，及總顆粒劑量將介於 2.3×10^{12} 至

3×10^{12} 顆粒。於另一具體實施例中，建議的劑量是半對數更高，或 5×10^{12} GC/kg，且總顆粒劑量將為 7.6×10^{12} 至 1.1×10^{13} 顆粒之間。於一具體實施例中，此調配物之特徵為 rAAV 存料具有「空」對「完整」之比率為 1 以下，較佳為少於 0.75，更佳為 0.5，較佳少於 0.3。

【0048】簡言之，於一具體實施例中，提供一種自 AAV 衣殼中間物分離 AAV 病毒顆粒之方法，其涉及：使包含重組物 AAV 病毒顆粒及 AAV 衣殼中間體之混合物作快速液相層析，其中 AAV 病毒顆粒及 AAV 中間體結合至於 pH 約 10.0 下平衡的陰離子交換樹脂且經歷鹽梯度同時監測析出液於約 260 和約 280 的紫外吸收，其中 AAV 完整衣殼從當 A260/A280 比率達到轉折點時被析出的餾分收集。

【0049】於一具體實施例中，此方法進一步包括 (a) 混合包含 AAV 病毒顆粒及 AAV 衣殼中間物之懸浮液與包含 20mM 至 50 mM Bis-Tris 丙烷(BTP)且 pH 約 10.0 之緩衝液 A；(b)裝填(a)之懸浮液至強陰離子交換樹脂管柱(c)以緩衝液 1% B 洗滌裝填的陰離子交換樹脂，其中緩衝液 1% B 包含具有 10mM 至 40 mM NaCl 離子強度之鹽及 BTP，具 pH 約 10.0；(d)對裝填和洗滌的陰離子交換樹脂應用增加的鹽濃度梯度，其中鹽梯度相當於約 10 mM 至約 40 mM NaCl；及(e)自於鹽濃度相當於至少 70 mM NaCl 時獲得的洗滌液收集 rAAV 顆粒，而該 rAAV 顆粒為至少約 90%純化自 AAV 中間物。於一具體實施例中，此藉由基因體拷貝測定。

【0050】於一具體實施例中，此中間物洗析自陰離子交換樹脂，當鹽濃度相當於大於約 50 mM NaCl。於更另一具體實施例，緩衝液 A 進一步與 NaCl 混合成最終濃度 1M 以便形成或製備緩衝液 B。於又另一具體實施例，鹽梯度具有離子強度相當於 10 mM 至約 190 mM NaCl。洗析梯度可為由 1%緩衝液 B 至約 19%緩衝液 B。可選擇地，含陰離子交換樹脂的容器為單塊式管柱(monolith column)且於緩衝液 A、緩衝液 B、及鹽梯度為約 60 個管柱體積。

【0051】rAAV 顆粒(包裝基因體)之存料或製品係「實質上無」AAV 空衣殼(及其它中間物)，當存料中 rAAV 顆粒為至少約 75%至約 100%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、或至少 99%之 rAAV 於存料且「空衣殼」少於約 1%、少於約 5%、少於約 10%、少於約 15%之 rAAV 於存料或製品。

【0052】於另一具體實施例，rAAV 顆粒之平均產量為至少約 70%。此可藉由確定裝填到管柱上的混合物中的力價(基因體拷貝)和最終洗析中存在的量來計算。此外，此等可以基於 q-PCR 分析及/或 SDS-PAGE 技術來確定，例如本文所述之彼等技術或本領域已經描述之彼等技術。

【0053】例如，為了計算空及完整顆粒含量，對於裝填的 GC 顆粒繪製所選樣品(例如，其中顆粒之 GC=#的 # 之碘克沙醇(iodixanol)梯度純化製劑)的 VP3 帶體積。所得到的線性方程式($y=mx+c$)用於計算測試製品波峰的

帶體積中的顆粒數。然後將每 20 μ L 裝填的顆粒數(pt)乘以 50，得到顆粒(pt)/mL。Pt/mL 除以 GC/mL 得到顆粒與基因體拷貝數的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL 給予空的 pt/mL。空的 pt/mL 除以 pt/mL 及 $\times 100$ ，得到空顆粒的百分比。

【0054】一般而言，本領域已知用於測定具有包裝基因體的空衣殼及 AAV 載體顆粒的方法。參見，例如，Grimm et al., *Gene Therapy*(1999)6: 1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.*(2003)7: 122-128。爲了測試變性衣殼，該方法包括使經過處理的 AAV 存料進行 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳，由能夠分離三種衣殼蛋白的任何凝膠組成，例如含有緩衝液中 3-8%Tris-乙酸鹽的梯度凝膠，然後運行凝膠直到樣品材料分離，並將凝膠吸漬(blotting)到尼龍或硝酸纖維素膜上，較佳爲尼龍。然後使用抗-AAV 衣殼抗體作爲結合變性衣殼蛋白質之一次抗體，較佳爲抗-AAV 衣殼單株抗體，最佳爲 B1 抗-AAV-2 單株抗體(Wobus et al., *J. Virol.*(2000)74: 9281-9293)。然後使用二次抗體，其與一次抗體結合，並含有檢測與一次抗體結合的方法，更佳爲含有與其共價結合的檢測分子的抗-IgG 抗體，最佳爲與辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase)共價連接的綿羊抗-小鼠 IgG 抗體。用於檢測結合的方法用於半定量測定一次和二次抗體之間的結合，較佳爲能夠檢測放射性同位素發射、電磁輻射或比色變化的檢測方法，最佳爲化學發光檢測套組。例如，對於 SDS-PAGE，可以取出來自管柱濾份的

樣品並在含有還原劑(例如 DTT)的 SDS-PAGE 裝填緩衝液中加熱，並將衣殼蛋白質在預傾斜梯度聚醯胺凝膠(例如 Novex)上解析。銀染色可使用 SilverXpress (Invitrogen, CA)根據製造商的說明進行。在一具體實施例中，管柱濾份中的 AAV 載體基因體(vg)的濃度可以藉由定量即時 PCR(Q-PCR)測量。將樣品稀釋並以 DNase I(或另一種合適的核酸酶)消化以移除外源 DNA。在核酸酶失活後，使用引子及對引子之間的 DNA 序列特異的 TaqMan™螢光探針進一步稀釋和增幅樣品。在 Applied Biosystems Prism 7700 序列檢測系統上測量每一樣品達到規定螢光量(閾值循環，Ct)所需的循環次數。使用與 AAV 載體中含有相同序列的質體 DNA 以產生 Q-PCR 反應中的標準曲線。從樣品獲得的循環閾值(Ct)值以藉由將其標準化為質體標準曲線的 Ct 值來確定載體基因體力價。亦可使用基於數位 PCR 的終點測定法。

【0055】於一態樣，本文提供了最佳化的 q-PCR 方法，其利用廣效絲胺酸蛋白酶，例如蛋白酶 K(例如可自 Qiagen 商購獲得)。更具體而言，最佳化的 qPCR 基因體力價測定與標準測定相似，只是除了在 DNase I 消化後，將樣品以蛋白酶 K 緩衝液稀釋並以蛋白酶 K 處理，隨後經熱失活。適當地，樣品以蛋白酶 K 緩衝液稀釋，其量等於樣品量。蛋白酶 K 緩衝液可以濃縮至 2 倍以上。通常，蛋白酶 K 處理為約 0.2mg/mL，但可由 0.1mg/mL 至約 1mg/mL 變化。處理步驟通常在約 55℃下進行約 15 分鐘，但可於較低溫度(例如約 37℃至約 50℃)下進行較長

時間(例如，約 20 分鐘至約 30 分鐘)，或於較高溫度(例如，高達約 60°C)，於較短的時間期間(例如約 5 至 10 分鐘)。相似地，熱失活通常在約 95°C 下約 15 分鐘，但溫度可能降低(例如約 70 至約 90°C)並延長時間(例如約 20 分鐘至約 30 分鐘)。然後將樣品稀釋(例如 1000 倍)，並如標準測定中所述進行 TaqMan 分析。

【 0056 】另外，或者可以使用微滴式數位 PCR(ddPCR)。例如，已經描述了藉由 ddPCR 測定單股及自身互補的 AAV 載體基因體力價的方法。參見例如 M.Lock 等人，Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods ; 2014 年 4 月 ; 25(2) : 115-25 。 doi : 10.1089/hgtb.2013.131 。 Epub 2014 年 2 月 14 日。

5.1.3 製造

【 0057 】可以如圖 13 所示的流程圖所示製造 rAAV.hFVIII 載體。簡而言之，細胞(例如 HEK 293 細胞)在合適的細胞培養系統中增殖並轉染用於產生載體。然後可以收取 rAAV.hFVIII 載體，濃縮並純化以製備主體載體(bulk vector)，然後在下游製程中填充及完成。

【 0058 】製造本文所述的基因治療載體的方法包括本領域熟知之方法，例如用於產生基因治療載體的質體 DNA 之生產、載體之生產、及載體之純化。在一些具體實施例中，基因治療載體為 AAV 載體，且所產生的質體係編碼 AAV 基因體及感興趣基因的 AAV 順式質體、含有 AAV rep 和 cap 基因的 AAV 反式質體、及腺病毒輔助質體。載體生產過程可以包括方法步驟，例如細胞培養

的開始、細胞繼代、細胞的接種、以質體 DNA 之轉染細胞、將轉染後的培養基更換為無血清培養基、以及含有載體的細胞的收取及培養基。收取的含載體的細胞及培養基在本文中稱為粗細胞收取。

【0059】粗細胞收穫物之後可為有關方法步驟，例如載體收穫物的濃縮、載體收穫物的滲濾、載體收穫物的微流化、載體收穫物的核酸酶消化、微流化中間體的過濾、色層法的純化、藉由超速離心的純化、藉由切向流過濾進行緩衝液交換、製備及過濾以製備主體載體。

【0060】於一具體實施例中，生產質體為示於 SEQ ID NO: 13 者。於一具體實施例中，生產質體為示於 SEQ ID NO: 14 者。於一具體實施例中，生產質體為示於 SEQ ID NO: 15 者。於另一具體實施例中，生產質體為示於 SEQ ID NO: 16 者。

【0061】於一特定具體實施例，用於製造基因治療載體之方法被描述於下文第 8 節。

5.2 患者族群

【0062】基於數個原因而選擇重度或中度 A 型血友病 (HemA) 患者研究群。重度 A 型血友病患者被定義為具有少於 1% 之正常因子 VIII (FVIII) 活性如此須經常輸注 FVIII 以控制其易出血體質。這代表了正常生活的重大負擔，此外，FVIII 的血液量通過眾所周知的峰谷模式，其為不理想的。嚴重患者的 FVIII 血液量低於 1% 的事實使得可以在施用 rAAV.hVIII 後，可以可靠地測量 FVIII 血液中血液量即使低至中等程度的增加。最近的臨床試驗

證實了此方法的有效性。中度 HemA 患者定義為血液中 FVIII 量之 1%至多 5%。

【0063】為治療候選人的患者較佳是 ≥ 18 歲的成年男性，診斷為中度/重度或重度 A 型血友病。於一具體實施例中，患者具有基線 FVIII 活性 $\leq$ 正常之 2%或記錄的 FVIII 活性史 $\leq 2\%$ 。於一些具體實施例中，可以治療 < 18 歲的患者。治療候選人包括每年至少出現 3 次出血事件的受試者，需要以 FVIII 依需要進行治療。其它治療候選人包括以 FVIII 預防療程治療的受試者。證明該受試者適合治療的其它標準包括 FVIII 至少 100 天之暴露史；無暴露外源性 FVIII 的抑制劑(中和抗體)歷史之記錄；對外源 FVIII 或 rAAV.FVIII 載體組成物的任何組分無已知的過敏反應。

【0064】在治療之前，A 型血友病患者應評估用於遞送 hFVIII 基因(例如 AAVhu.37 或 AAVrh.10)的 AAV 血清型的 NAb。此種 NAb 可以干擾轉導效率及降低治療效果。具有基線血清 NAb 力價 $\leq 1:5$ 的 A 型血友病患者是用 rAAV.hFVIII 基因治療方案來治療的良好候選者。

【0065】受試者可被允許在其照護醫師的判斷之前及基因治療治療之前同時繼續其照護治療之標準(例如，重組 FVIII 治療)。或者，在施用基因治療之前，醫生可能寧願選擇停止照護療法的標準，並且可選擇性地在施用基因治療後恢復照理治療標準作為輔助療法。

【0066】基因治療療程之期望終點係在治療治療給予後，FVIII 活性從基線增加到正常的 3%至多 52 週。於一

具體實施例中，患者在以 rAAV.hFVIII 治療後，單獨及/或與輔助治療組合使用，達到期望的循環 FVIII 量(例如 5%或更高)。於另一具體實施例中，以 rAAV.hFVIII 治療後，單獨及/或與輔助治療組合使用，患者達到循環 FVIII 量之 10%、15%、20%或以上。於另一具體實施例中，在以 rAAV.hFVIII 治療後，單獨及/或與輔助治療組合使用，患者達到循環 FVIII 量之 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、95%、95%或以上。

【0067】然而，具有以下特徵中之一種或多種的患者可以由其照護醫師的判斷下排除在治療之外：

- 1.重大肝病史(即門靜脈高壓)。
- 2.顯著肝炎或肝硬化。
- 3.活性 B 型肝炎病毒(HBV)或 C 型肝炎病毒(HCV)感染的證據。
- 4.人類免疫缺陷病毒(HIV)感染的病史及以下任何一種：CD4+細胞計數 <350 個細胞/ mm^3 ，在第 0 天之前 6 個月內或血漿病毒載量大於 200 個拷貝/ml 的抗反轉錄病毒治療療程的變化，於 2 個不同的場合，藉由 PCR 測量。
- 5.抗 AAVhu.37(或抗 AAVrh10，視情況而定)中和抗體力價 $>1:5$ 或 $\geq 1:10$ 。
- 6.參與(目前或之前)另一個基因治療研究。
- 7.在篩選前 3 個月內參與另一項調查性藥物研究。

【0068】在其它具體實施例中，照護醫師可確定此等生理特徵(醫療史)中的一種或多種的存在不應排除本文提供的治療。

5.3.投劑&投予路徑

【0069】於一具體實施例中，rAAV.hFVIII 載體於每一患者中呈單劑被遞送。於另一具體實施例中，rAAV.hFVIII 載體於每一患者中呈多劑被遞送。於另一具體實施例中，rAAV.hFVIII 載體於每一患者中呈兩劑被遞送。於一具體實施例中，受試者以最小有效劑量(MED)(於本文實施例中所述的前臨床研究證實)被遞送。如本文所使用，MED 係指所需達成正常因子 VIII 活性之 5%的 rAAV.hFVIII 劑量。

【0070】如常規，載體力價係根據載體製劑的 DNA 含量來確定。於一個具體實施例中，使用如實施例所述的定量 PCR 或最佳化的定量 PCR 來測定 rAAV.hFVIII 載體製劑的 DNA 含量。於一具體實施例中，使用如實施例所述的微滴式數位 PCR 來測定 rAAV.hFVIII 載體製劑之 DNA 含量。於一具體實施例中，劑量為約 1×10^{11} 基因體拷貝數(GC)/kg 體重至約 1×10^{13} GC/kg，包含終點。於一具體實施例中，劑量為 5×10^{11} GC/kg。於另一具體實施例中，劑量為 5×10^{12} GC/kg。於特定具體實施例中，投予患者 rAAV.hFVIII 之劑量為至少 5×10^{11} GC/kg、 1×10^{12} GC/kg、 1.5×10^{12} GC/kg、 2.0×10^{12} GC/kg、 2.5×10^{12} GC/kg、 3.0×10^{12} GC/kg、 3.5×10^{12} GC/kg、 4.0×10^{12} GC/kg、 4.5×10^{12} GC/kg、 5.0×10^{12} GC/kg、 5.5×10^{12} GC/kg、

6.0×10^{12} GC/kg、 6.5×10^{12} GC/kg、 7.0×10^{12} GC/kg、或 7.5×10^{12} GC/kg。再者，複製缺陷病毒組成物可被調劑成劑量單位以含有複製缺陷病毒的量為約 1.0×10^9 GC 至約 1.0×10^{15} GC 的範圍。如本文所使用，「劑量」一詞可指於治療過程中遞送給受試者的總劑量或在單次(多次)投予中遞送的量。

【0071】於另一具體實施例中，組合物將於之後再次被投予。可選擇地，允許多次重新投予。此種再次投予可以是與本文所述的相同類型的載體或不同的病毒載體。

【0072】於一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 1%。於一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 2%。於一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 3%。於一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 4%。於一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 5%。於另一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95%或以上。

【0073】於一些具體實施例中，rAAV.hFVIII 與一種或多種用於治療 A 型血友病的治療組合投予，諸如投予重組 FVIII。

5.4.測量臨床目標

【0074】治療效果的測量可藉由血漿因子 VIII 量及因子 VIII 活性測定的轉基因表現及活性來測量。功效的進一步評估可藉由替代因子 VIII 要求和自發性出血發作頻率的臨床評估來確定。此種評估可以在產品投予 4 週後每週進行兩次，每週從第 6 週至第 12 週，在第一年的剩餘時間內每月進行一次，間隔 6 個月，共 5 年。

【0075】投予後的基因治療載體的安全性可藉由在藥物投予後至多約 52 週的多個時間點評估的不良事件的數量、身體檢查的變化及/或臨床實驗室參數進行評估。儘管可較早觀察到生理學效應，例如在約一週內，於一具體實施例中，穩定態水平的表現量達到約 12 週。於產品投予 4 週後，可以每週兩次，每週從第 6 週至第 12 週進行以下評估，在第一年的剩餘時間內每月進行一次，間隔時間為 6 個月，共 5 年。此種評估包括：

a.身體檢查

b.ECG

c.生物化學評估：血清電解質、BUN、肌酸酐、鈣、磷酸鹽、總蛋白質、白蛋白、LDH、CPK、AST、ALT、鹼性磷酸酶、膽紅素

d.血液學評估：CBC 及差異的凝血概況

e.尿液分析

f.免疫學評估：

g.血清學對 hu.37 衣殼(或 rh.10 衣殼，視情況而定)及因子 VIII 的反應

h.T 細胞對 hu.37 衣殼(或 rh.10 衣殼，視情況而定)及因子 VIII 抗原的反應

i.載體 DNA 之評估；血漿、尿液及唾液中的 qPCR 測量。

【0076】與沒有 A 型血友病的患者的 hFVIII 量相比，在約 12 週或其它期望的時間點，可以將藉由 rAAV.hFVIII 投予達到的 hFVIII 增加評估為定義的 hFVIII 的百分比變化，即所謂的約 100%之正常 hFVIII 量。於另一具體實施例中，此變化係與患者的基線 hFVIII 量比較。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 3%。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 4%。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 5%。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 6%。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 7%。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 8%。於一具體實施例中，期望的功效係將患者中因子 VIII 量增加至正常的 9%。於另一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 10%。於另一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 量增加至正常的 15%。於另一具體實施例中，劑量足以將患者中的因子 VIII 水平增加至正常的 20%或更高。於一具體實施例中，凝血組作為推斷 FVIII 活性的標準測試的一部分進行。

【0077】如本文所使用，當患者表現足夠量的 FVIII 以到達此等臨床終點中的至少一個時，本文中的 rAAV.hFVIII 載體「功能性替代」或「功能性補充」患者缺陷的 FVIII 以活性 FVIII。在非血友病患者中達到低至正常野生型臨床終點水平的約 1%至小於 100%的 hFVIII 的表現量可提供功能性替代。

【0078】於一具體實施例中，可以在投予後約 8 小時至約 24 小時早期觀察到表現。可以在投予後數天至數週內觀察到上述所欲臨床效果之一種或多種。

【0079】長期(長達 260 週)的安全性及功效可於 rAAV.hFVIII 投予後進行評估。

【0080】在一方面，提供將 hFVIII 基因產物遞送至人類患者的療法。該療法包括(a)遞送包含如本文所述表現匣的第一 rAAV.hFVIII 載體；及(b)遞送包含如本文所述表現匣的第二 rAAV.hFVIII 載體，其中第一重組 AAV 載體或第二 AAV 載體具有 AAV3B 衣殼。AAV3B 之序列示於 SEQ ID NO: 29 及目錄編號 No. AAB95452.1。於一具體實施例中，第一或第二 AAV 載體之另一者具有 rh.10 衣殼。於另一具體實施例中，第一或第二 AAV 載體之另一者具有 AAVhu.37 衣殼。此種療法被述於國際專利申請案 No. PCT/US16/42472，其藉由引用被併入。

【0081】本文所述之病毒載體可用於製備遞送 hFVIII 至需要的受試者(例如，人類患者)之醫藥，供給功能性 hFVIII 至受試者，及/或用於治療 A 型血友病。

【0082】於一具體實施例中，給予 rAAV.hFVIII 載體之第二次投予。於一具體實施例中，此第二次投予之 rAAV.hFVIII 載體具有相同於如第一次劑量提供的 AAV 衣殼。於一具體實施例中，該第二次投予之 rAAV.hFVIII 載體具有 AAVrh.10 衣殼。於另一具體實施例中，該第二次投予之 rAAV.hFVIII 載體具有不同於第一劑之載體的 AAV 衣殼。於一具體實施例中，第二次投予之 rAAV.hFVIII 載體具有對肝臟的向性。於一具體實施例中，第二次投予之 rAAV.hFVIII 載體具有 AAV3B 衣殼。

【0083】於另一方面，本發明涉及標定患者之肝細胞。

【0084】於一方面，第一 rAAV 及第二 rAAV 之遞送被暫時分開至少約一個月、至少約三個月、或約 1 年至約 10 年。

【0085】下列實施例僅為說明且無意用來限制本發明。

實施例

6.實施例 1：前臨床試驗

6.1 hFVIII 載體

【0086】不像人類因子 FIX(hFIX)，hFVIII 的 cDNA 係大的多且需要進行調整以使此轉基因適應標準的 AAV 基因體。由於 B 結構域缺失(BDD)hFVIII 轉基因為 1457 個胺基酸，並且包含轉錄的其它必需元件，AAV 載體仍然處於其包裝能力的極限。因此，已經採取步驟來減少包括轉基因表現控制組件在內的其它組件的大小。

【0087】爲了將 hFVIII 的表現限制在肝臟，同時保持組件的大小盡可能小，數個強的肝特異性啓動子被縮短並組合，與多達三個肝特異性增強子序列的組合產生 42 個增強子/啓動子組合。於投予 AAV 載體後，在 FVIII KO 小鼠中評價轉基因的 hFVIII 活性和免疫原性。

6.1.1 前臨床試驗的 AAV 載體生產

【0088】生產含增強子/啓動子組合之一者的 42 個質體。使用三個增強子序列生產 14 個增強子組合；En34(來自人類脂蛋白元肝控制區之 34 bp 核增強子)、ABPS(來自 $\alpha 1$ -微球蛋白/比庫蛋白前驅物[ABP]至 42 bp 的 100 bp 遠端增強子縮短版)、及 EnTTR(來自轉甲狀腺素蛋白之 100 bp 增強子序列)。增強子組合的數目受限，由於總 ITR-ITR 大小及增強子於下列序列之組合：5'-EnTTR-ABPS-En34-啓動子-3'。表 1.14 種增強子組合中的每一種都插入三個啓動子之一的上游；TBG-S1(P1，肝特異性甲狀腺素結合球蛋白或 TBG 啓動子的縮短版)，A1AT(P2，修飾的 SERINA1 [$\alpha 1$ -抗胰蛋白酶]啓動子)和 TTR(P3，轉甲狀腺素蛋白啓動子)。將所得構築體設計爲表現人類因子 VIII 蛋白的密碼子優化版本，其中 B 結構域被刪除且經短的 14 個胺基酸的連結子 hFVIIIco-SQ(SEQ ID NO: 2)代替。

【0089】如 Gao G, Lu Y, Calcedo R, et al. Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. Mol Ther. 2006; 13(1):77-87 所述製造所有 AAV 載體，其藉由引用被併入。簡言之，將來自

42 個增強子/啟動子組合之一的表現 hFVIII 的質體以 AAVrh10 病毒衣殼包裝。來自 E06.TTR 的表現 hFVIII 的質體也包裝在 AAV8, AAV9, AAVhu37 和 AAVrh64R1 病毒衣殼中。

6.1.2 載體之 SDS-PAGE 分析

【0090】研究中使用的 AAVrh10 增強子/啟動子組合載體批次歷經十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 進行純度評估，如 Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, et al. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. Hum Gene Ther. 2010; 21(10):1259-1271 所述，其藉由引用併入本文。簡言之，含有 5×10^9 GC 的變性及還原載體樣品裝填於 SDS-PAGE。使用 Syngene 成像分析系統及 GeneTool 軟體 (Syngene, Frederick, MD)，將固定後的 SYPRO 紅寶石染色劑 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 染色蛋白質，顯色，然後定量。計算衣殼 (VP1、VP2 和 VP3 蛋白質表示總蛋白質) 的純度百分比。42 個載體的純度百分比範圍為 29% (AAVrh10.E12.P3) 至 100%，平均純度為 90% (資料未顯示)。

6.1.3 小鼠

【0091】FVIII KO 小鼠的育種對獲自 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)，並且在特定無病原體條件下，在賓夕法尼亞大學的轉譯研究實驗室保存了

一個菌落。賓夕法尼亞大學的 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)批准了所有的動物程序及計劃書。IV 注射到 6-12 週齡的雄性 FVIII KO 的到尾靜脈中，每隻小鼠用 10^{10} GC 載體。將載體在磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)中稀釋，並注入 100 μ l 載體稀釋液。藉由後眼眶出血，每兩週將血漿收集到檸檬酸鈉收集管中。

6.1.4 hFVIII 活性之測定

【0092】依據製造商手冊以 COATEST SP4 套組測量血漿中 hFVIII 活性(DiaPharma, OH, USA)。於注射後 2 週，小鼠顯示由 0.12 - 2.12 IU/ml 之大範圍 hFVIII 活性(圖 5)。

【0093】五種構築體證實顯著增加的活性程度超過其它者；E03.TTR、E05.A1AT、E05.TTR、E06.TTR 及 E12.A1AT(圖 5A)。在第 2 週時觀察到的 hFVIII 活性程度的變化是在產生針對轉基因的抗體之前(圖 5B)。因此，於活性程度上有構築體依賴性顯著差異。

6.1.5 小鼠血漿中抗-hFVIII IgG 之偵測

【0094】以 ELISA 偵測小鼠血漿中抗 hFVIII 之 IgG 抗體，其中所有試劑來自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)，除非另有陳述。將 ELISA 板用 0.1M 碳酸鹽緩衝液(pH9.6)中的 1 μ g/ml BDD-hFVIII-SQ(Xyntha, Wyeth Pharmaceuticals Inc., Dallas, TX, USA)塗覆，並於 4 $^{\circ}$ C 培育隔夜。將孔以 PBS 中的 0.05% Tween 20 洗滌 5 次，並以 PBS 中的 5% 脫脂乳(Bio Rad, Hercules, CA, USA)於室溫下封阻 1 小時。移除封阻緩衝液後，將稀釋在 5%

脫脂乳中的血漿樣品加入板中並在室溫下培育 1 小時。使用來自初始小鼠的血漿樣品作為對照組。然後將板洗滌 5 次，並以 1：1000 稀釋加入 HRP-綴合的抗小鼠 IgG 之脫脂乳中。室溫培育 90 分鐘後，將板洗滌 8 次，加入 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)進行檢測。使用 2N 硫酸在室溫下 5 分鐘後停止反應，並使用 BioTek μ Quant 平盤讀數器(Winooski, VT, USA)於 450nm 讀取板。

【0095】 FVIII KO 小鼠在載體投予後第 4 週顯示 hFVIII 的抗體產生，並且在第 8 週時，42 個載體組中的大部分小鼠具有可檢測的抗 hFVIII IgG 程度，hFVIII 活性程度對應降低(圖 6)。分別於圖 7 及圖 8 中呈現以力價定量的 hFVIII 活性及抗體產生的時間過程。注射了構築體 E05.A1AT、E10.A1AT 及以 E06 增強子組合的所有啟動子的 50%以上的小鼠在第 8 週時具有對轉基因的抗體。然而，在所有組中都未見到針對轉基因的抗體。對於 42 個載體組中的 6 個(E11.TTR、E13.TBG-S1、E13.A1AT 及使用 E01 的所有構築體)中的 6 個，於第 8 週沒有檢測到 hFVIII 抗體(圖 6)，兩組在整個 12 週的研究期間沒有可檢測的抗體(E01.A1AT 及 E11.TTR)。亦進行了產生對 hFVIII 抗體之事件分析的時間。小鼠以使用表現用之 E01.A1AT、E11.TTR、E01.TBG-S1、E11.A1AT 及 E13.TBG-S1 的載體注射具有最長的抗體表現時間，而含有 E06.TTR、E06.A1AT、E05.A1AT、E09.TBG-S1 及 E14.TTR 的構築體具有最短的抗體表現時間。

6.1.6 統計分析

【0096】爲了依據第 2 週血漿中的 hFVIII 活性來鑑定類似的治療組，使用具有 Tukey 事後檢驗的單一固定因子 ANOVA 模型分析數據，以鑑定彼此不同的組平均活性水平。對於產生針對 hFVIII 的抗體進行事件分析的時間。

6.1.9 藉由各種 AAV 衣殼比較活性及免疫原性

【0097】其次，確定活性程度的差異，查明使用的 AAV 衣殼對免疫原性的潛在貢獻。於本研究，選擇了先前研究中最具免疫原性的基因組-E06.TTR。有趣的是，該構築體在第 2 週時產生比其它大多數構築體顯著更高的表現，但是在接下來的幾週中，於 80%的注射小鼠中產生抗 hFVIII 轉基因抗體。

【0098】以五個 AAV 衣殼：AAVrh10、AAV8、AAV9、AAVhu37 及 AAVrh64R1 中的一個包裝使用將 E06 增強子與肝特異性 TTR 啟動子組合的相同的載體基因體。再次，FVIII KO 小鼠以每隻小鼠 10^{10} GC 的劑量 IV 注射，並且在整個 12 週研究中遵循血漿 hFVIII 活性水平及抗 hFVIII IgG 力價。基於用於基因轉移的 AAV 載體，觀察到轉基因的表現及免疫原性的全然不同的差異(圖 9)。在投予載體後第 2 週，血漿中的 hFVIII 活性變化由 AAVrh64R1 投予後 0.51 IU/ml，至 AAVrh10 投予爲 1.26IU/ml(圖 9A)。在研究期間，數隻小鼠產生的抗 hFVIII 抗體，其範圍爲從 AAV8 或 AAV9 載體投予的小鼠的 20%至接受 AAVrh10 的 63%的小鼠(圖 9B)。因此，

即使以高度免疫原性的增強子及啓動子組合，對轉基因的免疫反應可基於用於基因轉移的 AAV 衣殼而變化。

6.1.10 討論

【0099】先前於使用 HLP 啓動子表現的 FVIII KO 小鼠中的研究在整個研究期間沒有檢測到轉基因的抗體。HLP 啓動子序列與 E01.A1AT 增強子/啓動子組合類似，其中在該 12 週研究期間，投予該 AAVrh10 載體的小鼠中沒有檢測到的抗體。不幸地，來自 FVIII KO 小鼠的該載體的活性相對較低，在載體投予後第 2 週僅在血漿中可檢測到 0.189 IU/ml，在第 6 週時的峰值程度為 0.303 IU/ml。

【0100】有趣地，用於相同轉基因匣的基因轉移用 AAV 衣殼顯著影響 hFVIII 的免疫原性和峰值 hFVIII 活性兩者。爲了研究衣殼對抗-hFVIII 抗體產生的影響，使用最具免疫力的轉基因匣(E06.TTR)。研究的五種載體衣殼可分爲兩組：彼等係 $\leq 20\%$ 的產生了抗-hFVIII 抗體(AAV8 和 AAV9)的小鼠，及彼等係 $>20\%$ 的發展了體液免疫反應(AAVrh10、AAVhu37 和 AAVrh64R1)的小鼠。對與 AAV8 衣殼相關的 hFVIII 轉基因的耐受性或許是不令人驚訝的，因爲先前的研究顯示，此衣殼之 IV 遞送可於肝的耐受致病性質的背景下活化轉基因特異性調節性 T 細胞。此外，吾人先前已經顯示，於 B 型血友病小鼠中 IM 注射 AAV8 後，沒有可檢測到的 FIX 抑制劑。因此，即使以高度免疫原性的增強子和啓動子組合，對轉基因的免疫反應可基於用於基因轉移的 AAV 衣殼而變化。

【0101】在投予五種不同的 AAV 衣殼後，血漿中的 hFVIII 活性程度亦於載體投予後的第 2 週時由以 AAVrh64R1 的 0.51 IU/ml 顯著地變化到 AAVrh10 的 1.26 IU/ml。與 AAV8 相比，來自 AAVrh10 載體的表現顯著升高，與於 63% 的小鼠中抗-hFVIII 抗體的產生一致。此種衣殼比較研究使用高度免疫原性的轉基因匣進行，且很可能不仿造於人類中所見~30% 的 A 型血友病患者對重組蛋白產生抗體。因此，在投予 AAVrh10 載體後產生的較高表現程度可能更有利於臨床情況，該情況為需要較低劑量的載體以顯著改善出血事件的發生率並補充重組 hFVIII 蛋白質。

【0102】由本研究的結果，選擇 E03.TTR(圖 1； SEQ ID NO：13)、E03.A1AT(圖 3； SEQ ID NO：15)、E12.TTR(圖 2； SEQ ID NO：14)及 E12.A1AT(圖 4； SEQ ID NO：16)構築體進行進一步測試。

6.2 劑量研究

6.2.1 於 FVIII KO 小鼠的研究告知適當的 MED

【0103】FVIII KO 小鼠於 C57BL/6 及 129 背景接受尾靜脈注射 AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75 之四個載體劑量之一者。此種載體劑量為 5×10^{10} GC/kg、 5×10^{11} GC/kg、 5×10^{12} GC/kg 及 5×10^{13} GC/kg。包括僅接收對照物品(媒劑緩衝液)的動物組作為媒劑對照。於載體投予後，每日監測動物進行一般觀察。於適當的時間點從動物收集血液以捕獲 hFVIII 活性程度。於投劑後第 60 天犧牲子群 A 中的動物，於投予後第 28 天犧牲子群 B

中的動物，並且在投劑後第 3 天犧牲子群 C 中的動物。於屍檢時亦收集血液用於血清化學組及血液學。犧牲的動物將被屍體剖檢；收取用於生物分佈及組織病理學檢查的器官，如右側腹股溝淋巴結、右睪丸、胰臟、十二指腸、結腸、腦、右腓腸肌、胃、右腎、右肺、脾臟、心臟、肝臟、及若有的話，剖檢病變(gloss lesions)。對於接受載體之最高劑量的小鼠和接受對照物的小鼠，提取總細胞 DNA 及 RNA。對提取的 DNA/RNA 進行 qPCR 及 RT-qPCR 測定，分別測量器官中的載體基因體拷貝數及轉錄程度。藉由 COATEST 試驗，測試物的功效由血漿中的 hFVIII 蛋白質活性程度確定。再者，藉由抗-hFVIII IgG ELISA 試驗再次監測抗-hFVIII 抗體，並藉由凝血酶原時間(PT)試驗評估凝血的外在途徑。

6.3 於非人類靈長類中的研究

6.3.1 於 NHP 中的表現研究

【0104】此非 GLP 研究的主要目的係評估 NHP 中潛在的載體相關毒性及生物分佈。

【0105】使用雄性獼猴及食蟹獼猴於此研究。於此研究中僅使用雄性動物，由於 A 型血友病係一種 X-連結的遺傳性疾病。所有獼猴具有 NAb 力價 $<1:5$ ，在如前所述確定的研究開始時(CALCEDO et al.(2009)Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. J Infect Dis, 199, 381-90)。於投予前，用 IM 注射氯胺酮(ketamine)(10-15mg/kg)與右美托咪定(dexmedetomidine)(0.05-0.10mg/kg)的混合物麻醉獼

猴。通過隱靜脈向獼猴 IV 投予載體。於研究開始前採集血液樣本，並經由靜脈穿刺股靜脈進行兩週。血液樣本的所有臨床病理檢查均由 Antech Diagnostics(Irvine, CA) 進行，包括完整的血細胞計數和差異、完整的臨床化學物質和凝血組。

【0106】進行了在 NHP 中表現 hFVIII 的試驗性研究。分別以 3×10^{12} GC/kg 的 AAVrh10(圖 10A)和來自 ABP2.TGB-S1 增強子/啓動子組合的表現 hFVIII 的 AAVhu37(圖 10B)載體 IV 投予兩隻恒河獼猴和兩隻食蟹獼猴。在所有動物中觀察到高峰表現，但是係於 6-8 週期間觀察到。以 AAVrh10 注射的獼猴中觀察到 hFVIII 的體液免疫反應。於接受 AAVhu37 的一隻動物中，抗-hFVIII 抗體的發展被延遲，在載體投予後 12 週發生，且在整個研究過程中另一隻動物沒有發展。接受 AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA7 的獼猴注射後追蹤 35 個月(圖 22 至 24)。

【0107】基於 FVIII KO 小鼠研究及此小型試驗性恒河獼猴研究，選擇原始的 42 種增強子/啓動子組合的兩個用於進一步評估食蟹獼猴，使用兩種不同的分化體(Clade) E 衣殼進行表現。

6.3.2 於 NHP 中的進一步研究

【0108】隨後以下列四種載體之一種投劑至 20 隻雄性食蟹獼猴：AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75 及

AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75(n=5 隻獼猴，每種載體)。IV 投予載體，以 1.2×10^{13} GC/kg 劑量(基於中間 oqPCR 力價)。使用一種衣殼加增強子/啓動子組合，於載體投予後第 2 週觀察到正常 FVIII 水平的 37%的峰值表現，然後在正常值的 20%上平滑化(圖 11)。儘管在第 8 週時在大多數獼猴中檢測到 hFVIII 的抗體，但在載體投予後第 30 週，兩隻動物中的抗體仍然不可檢測(圖 12)。下文討論方法。產生的抗體藉由使用時間進行事件分析，確定 AAVrh10 和 AAVhu37 之間存在顯著差異(圖 14)。

6.3.3 NHP 血漿中 hFVIII 表現之測定

【0109】藉由 ELISA 測量 hFVIII 表現，其中所有試劑均來自 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO, USA)，除非另有說明。以 0.1M 碳酸鹽緩衝液(pH9.6)中 1:500 稀釋的抗-hFVIII IgG(Green Mountain Antibodies, VT, USA)塗覆 ELISA 板，並於 4°C 下培育隔夜。將孔以 PBS 中的 0.1% Tween20 洗滌四次，並以 PBS 中的 5%無脂乳(Bio Rad, Hercules, CA, USA)在室溫下封阻 1 小時。移除封阻緩衝液後，將稀釋在 5%脫脂乳中的血漿樣品加入板中並於室溫下培育 1 小時。然後將板洗滌四次，並以 1:1000 稀釋於無脂乳中加入抗-hFVIII IgG(ThermoFisher Scientific, MA, USA)。於室溫下培育 1 小時後，洗滌四次，並以 1:1000 稀釋加入 HRP 綴合的抗綿羊 IgG 於無脂乳中。於室溫下培育 90 分鐘後，將板洗滌 5 次，加入 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)進行檢測。使用 2N 硫酸

在室溫下 5 分鐘後停止反應，並使用 BioTek μ Quant 平盤讀數器(Winooski, VT, USA)於 450nm 讀取板(圖 11)。

【0110】將在單次靜脈內注射 AAVhu37.TBG-S1.hFV III-SQ.PA75 後於食蟹獼猴(35 個月)中人 FVIII 的長期穩定表現的結果示於圖 22。結果顯示直到 35 個月剖檢為穩定表現。肝臟酵素檢測結果示於圖 23。結果顯示肝臟酵素程度在正常範圍內，除了肝臟生檢後暫時升高外。對 AAVhu.37 衣殼的中和抗體(Nab)反應如圖 24 所示。

【0111】使用單一細胞技術檢測 NHP M11269 的肝細胞中的 AAV 載體 DNA 及 RNA，如上所述，其以 3E12 GC/kg 靜脈內投予 AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75。評估單一細胞肝細胞存在 AAV 基因體及表現。載體後 150 週，藉由以膠原酶/蛋白酶之混合物灌注而自肝楔分離肝細胞。將單一細胞分選到 96 孔板的各個孔中。來自一個 96 孔板的細胞係藉由使用針對人 FVIII 的探針的數位 PCR 定量的細胞中的全基因體增幅(WGA)及 AAV 基因體。第二個 96 孔板係用於評估 FVIII 表現的全轉錄體增幅(WTA)。

【0112】結果如下表 3 所示。AAV 基因體可在約 25% 的單一細胞評估中檢測到。僅於~4%或 20%之收取 DNA 的細胞中檢測出 RNA 表現。RNA 表現細胞可分層成低及高的兩種類型。不清楚為什麼大量的細胞吸收載體但無法表現轉基因。此等結果藉由 CMC 核進行的原位雜交研究證實(數據未顯示)。

【0113】表 3：陽性單一細胞 DNA 及 RNA 百分比

單一細胞(w152)	樣品	陽性/全部	陽性百分比
	DNA	23/96	24%
	RNA	4/96	4%
	RNA/DNA 陽性細胞	4/23	17%

肝臟均質物	樣品	w42 生檢	w152 屍檢
	DNA(GC/細胞)	10	7.6 +/-1.1
	hFVIII RNA (拷貝數 ug RNA)	4.4 +/- 1.1 E4	6.4 +/- 0.7E4

6.3.4 於 NHP 血漿中抗-hFVIII IgG 的偵測

【0114】如前所述，藉由 ELISA 測量 NHP 血漿中的抗 hFVIII 的 IgG 抗體，除了以 1:2000 稀釋加入 HRP 綴合的抗-NPP IgG 以進行檢測(圖 12)。

6.3.5 於 NHP 血漿中貝什斯達(Bethesda)力價的偵測

【0115】藉由 Nijmegen 修飾的貝什斯達試驗測定抗人 FVIII 的抑制性抗體(Giles *et al.*, 1998)。一貝什斯達單位表示正常人類血漿之凝血活性之 50%的抑制。

6.3.6 肝臟生檢

【0116】於載體投予 5 週後藉由微剖腹術自每組的兩個 NHP 進行肝臟生檢。動物的選擇基於在第 4 週的血漿中的 hFVIII 表現。選擇的第一種動物是具有中值 hFVIII 水平的動物，所選擇的第二種動物是具有最接近或第二最接近 hFVIII 水平的動物(若最接近者為中值者)達到平均水平。取肝組織樣本進行組織病理學、載體生物分佈及轉基因 mRNA 分析。於肝臟生檢後第 3 天，採血用於完整的血球計數及差異、完整的臨床化學物質及凝血組。

6.3.7 免疫抑制程序

【0117】在載體投予後，於 hFVIII 的可檢測抗體(貝什斯達單位>1)存在下，於 hFVIII 表現的能力喪失的需要的動物中，啟動免疫抑制程序。免疫抑制程序如前所述，以利妥昔單抗(rituximab)(250mg/m²，IV，每週 4 次，總共 4 次輸注)及環磷醯胺(300mg/m²，每 15 天緩慢靜脈內輸注，總共 8 個劑量，4 個月)(Mcintosh et al.(2013)。單一外周靜脈投予編碼新穎的人類因子 VIII 變異體的 rAAV 載體之 FVIII 的治療程度(Blood, 121, 3335-44.)。

6.3.8 載體生物分布

【0118】來自 C57BL/6J 小鼠的組織樣品(腹股溝淋巴結、腰骶淋巴結、肌肉[右腓腸肌]、右睪丸、胰臟、右腎、脾臟、右肺臟、心臟及肝臟)於屍檢時迅速冷凍，使用 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)提取 DNA。於提取的 DNA 中的載體基因體拷貝數(GC)及提取的 RNA 中的相對 hFVIII 轉錄物表現的檢測及定量，如前所述藉由即時 PCR 進行。簡言之，使用針對載體之 hFVIII 轉基因序列設計的引子/探針定量載體 GC 及 RNA。於每隻小鼠(n=3 隻/組)之一個肝臟樣品上進行來自肝臟之 GC 的定量。使用常規化至 18S 表現的每個樣品之 $\Delta\Delta CT$ 來確定 RNA 相對轉錄物表現。

【0119】於 18 個 AAVrh10 增強子/啟動子載體的子集評估載體生物分佈。表現 hFVIIIco IV 的 AAVrh10 載體以每隻小鼠 10¹¹GC 的劑量投予於 6 至 8 週齡的 C57BL/6J 野生型小鼠。於載體投予 14 日後屍檢小鼠並

收集肌肉(右腓腸肌)、右睪丸、胰臟、右腎、脾、右肺、心臟及肝臟。提取 DNA 及 RNA，並使用針對載體的 hFVIII 轉基因序列設計的引子/探針來量化載體 GC 及 RNA 轉錄物量。於載體投予組中，肝臟載體 GC(圖 20A)或 RNA 轉錄物量(圖 20B)無顯著差異，且於對照(PBS)投予組中無可檢測的 GC 或 RNA。然而，無論增強子序列如何，使用的 A1AT 啟動子進行表現的載體的肝臟中，RNA 轉錄量有較高的趨勢(圖 20B)。於收集的其它組織，hFVIII RNA 轉錄物量比肝臟平均低 1000 倍，但於投予 E01.TBG-S1、E02.A1AT、E09.A1AT 及 E09.TTR 後，C57BL/6J 小鼠的肌肉及心臟中觀察到較高的肝外表現(圖 21)。

6.4.載體之試驗

【0120】進行包括血清型鑑別、空粒子含量及轉基因產物鑑別的表徵試驗。所有試驗的描述呈現如下。

6.4.1 基因體拷貝(GC)力價

【0121】使用最佳化的定量 PCR(oqPCR)分析法藉由與同族質體標準品比較來確定基因體拷貝力價。oqPCR 分析法利用 DNase I 及蛋白酶 K 的接續消化，然後進行 qPCR 分析來測量經包覆的載體基因體拷貝。使用靶向 PA75 polyA 區域的序列特異性引子及與該相同區域雜交的螢光標記的探針組合來完成 DNA 偵測。與質體 DNA 標準曲線的比較能夠力價測定，不需要任何後 PCR 樣品操作。已於試驗中導入許多標準、驗證樣品及對照(用於背景及 DNA 污染)。藉由建立及定義試驗參數，包括靈

敏度、偵測限度、定量範圍以及測定內及精確度之間的限定，已判定此試驗合格。建立一個內部 AAVrh.10 參考批次，並用於進行資格研究。

6.4.2 載體衣殼同一性：VP3 之 AAV 衣殼質譜分析

【0122】藉由基於以質譜(MS)分析 VP3 衣殼蛋白質的胜肽的測定來確認載體的 AAV2/hu.37 或 AAV2/rh.10 血清型。此方法涉及由 SDS-PAGE 凝膠切割的 VP3 蛋白質條帶的多酶消化(胰蛋白酶、乳糜蛋白酶及內蛋白酶 Glu-C)，隨後在 Q-Exactive Orbitrap 質譜儀上的 UPLC-MS/MS 上表徵以定序衣殼蛋白質。開發了串聯質譜(MS)方法，其允許鑑定某些污染蛋白質並能從質譜衍生胜肽序列。

6.4.3 空的對完全粒子比率

【0123】載體粒子分佈概況使用分析超離心(AUC)於分析超離心機中測得的沉降速度作為獲得關於大分子結構異質性、確認差異及締合狀態或聚集狀態資訊的優異方法。將樣品裝入細胞並以 12000RPM 在 Beckman Coulter Proteomelab XL-I 分析超速離心機中沉澱。每兩分鐘記錄折射率掃描進行 3.3 小時。數據藉由 c(s)模型(Sedfit 程式)進行分析，計算的沉降係數與常規化的 c(s)值繪製。應觀察代表此單體載體的主峰。遷移慢於主要單體峰的峰之出現指出空/錯組裝的顆粒。空顆粒峰的沉降係數係使用空 AAV8 顆粒製劑建立。主要單體峰及先前峰的直接定量能夠確定空粒子對完全粒子的比率。

6.4.4 感染力價

【0124】感染單位(IU)試驗係用於確認於 RC32 細胞(表現 HeLa 細胞的 rep2)中載體的生產性攝取及複製。簡言之，96 孔板中的 RC32 細胞藉由連續稀釋的載體及均勻稀釋的 Ad5 共同感染，每次稀釋 rAAV 時重複 12 次。感染後 72 小時分解細胞，進行 qPCR 以偵測輸入時 rAAV 載體增幅。進行終點稀釋 TCID₅₀ 計算(Spearman-Kärber)以確認呈 IU/ml 表示的複製力價。由於「感染性」值端視與細胞接觸的顆粒、受體結合、內化、轉運到細胞核及基因體複製而定，它們受到分析幾何學及所使用的細胞系中適當受體與後結合路徑的存在的影響。對 AAV 載體導入至關重要的受體及後結合途徑通常於永生化細胞系中被維持，如此感染性分析力價並非「感染性」顆粒數量存在的絕對測量度。然而，經衣殼化的 GC 與「感染單位」的比率(描述為 GC/IU 比)可被使用作為每批次的產品的一致性。

7.實施例 2：治療人類受試者的程序

【0125】此實施例係關於由於凝血因子 8(FVIII)基因突變引起的具有遺傳學證實的 X 連鎖的 A 型血友病患者的基因療法治療。於該實施例中，向患有 A 型血友病的患者施予基因治療載體 AAVhu.37.hFVIII，表現 hFVIII 的複製缺陷型腺相關病毒載體 hu.37(AAVhu.37)。使用 FVIII 量作為轉基因表現的替代物可用來評估治療功效。主要功效評估包括治療後約 12 週的 FVIII 量，其後持續至少 1 年。於肝生檢樣品中，可於治療後測量長期安全性及轉基因表現的持續性。

7.1.基因治療載體-AAV.hFVIII

7.1.1.AAVhu.37.hFVIII

【0126】 AAVhu.37.hFVIII 載體由 AAV 載體活性成分及調配物緩衝液組成。外部 AAV 載體組分為血清型 hu.37， $T=1$ 個二十面體衣殼，由 AAV 病毒蛋白質 VP1、VP2 及 VP3 的 60 個拷貝組成，預測比例為 1:1:10。衣殼含有單鏈 DNA 重組 AAV(rAAV)載體基因體(圖 1-圖 4)。

【0127】 此基因體含有以兩個 AAV 反向末端重複(ITRs)側接的人類因子 VIII(FVIII)轉基因。增強子、啟動子、人類因子 VIII(hFVIII)編碼序列、及多腺苷酸化(polyA)訊號包含刪除的 B 結構域、密碼子最佳化人類 FVIII 轉基因。ITR 係負責基因體於載體生產過程中複製及包裝的遺傳組件，且為生產 rAAV 所需的唯一病毒順式組件。於一具體實施例中，人類 FVIII 編碼序列之表現係由轉甲狀腺素蛋白啟動子(SEQ ID NO: 7)驅動。於另一具體實施例中，人類 FVIII 編碼序列之表現係由經修飾的 A1AT 啟動子(SEQ ID NO: 9)驅動。該構築體包括至少一增強子組件以刺激啟動子活性。於一具體實施例中，包括 enTTR 增強子(SEQ ID NO: 5)。於另一具體實施例中，ABP-S 增強子(SEQ ID NO: 6)之兩個拷貝進行此 enTTR 增強子(SEQ ID NO: 5)之一個拷貝。包括約 75nt 的合成 polyA 訊號(SEQ ID NO: 10)以媒介人類 FVIII mRNA 轉錄物的終止。

【0128】 該載體係作為調配物緩衝液中之 AAVhu.37.hFVIII 載體的懸浮液而提供。於一個具體實

施例中，該調配物緩衝液為 TMN200 中的 0.001%Pluronic F-68(200mM 氯化鈉、1mM 氯化鎂、20mM Tris，pH8.0)。

【0129】於下節描述載體的製備及特性記述的詳細內容。

7.1.2. AAVrh.10.hFVIII

【0130】AAVrh.10.hFVIII 載體由 AAV 載體活性成分及調配物緩衝液組成。外部 AAV 載體組分為血清型 rh.10， $T=1$ 個二十面體衣殼，由 60 拷貝數之三種 AAV 病毒蛋白 VP1、VP2 及 VP3 組成，預測比例為 1:1:10。衣殼含有單股 DNA 重組 AAV(rAAV)載體基因體(圖 1-圖 4)。

【0131】基因體含有由兩個 AAV 反向末端重複(ITR)兩端側接的人類因子 VIII(FVIII)轉基因。增強子、啟動子、人類因子 VIII(hFVIII)編碼序列及多腺苷酸化(polyA)訊號包含 B 結構域缺失的密碼子最佳化的人類 FVIII 轉基因。ITR 係負責基因體於載體生產過程中複製及包裝的遺傳組件，為生成 rAAV 所需的唯一病毒順式組件。於一具體實施例中，人類 FVIII 編碼序列的表現由轉甲狀腺素蛋白啟動子(SEQ ID NO: 7)驅動。於另一具體實施例中，人類 FVIII 編碼序列的表現由修飾的 A1AT 啟動子(SEQ ID NO: 9)驅動。該構築體包含至少一個刺激啟動子活性的增強子組件。於一具體實施例中，包括一 enTTR 增強子(SEQ ID NO: 5)。於另一具體實施例中，ABP-S 增強子(SEQ ID NO: 6)的兩拷貝進行 enTTR 增強子(SEQ ID NO: 5)的一拷貝。包括約 75 nt 之合成的

polyA 訊號 (SEQ ID NO: 10) 以調節人類 FVIII mRNA 轉錄物的終止。

【0132】該載體係作為調配物緩衝液中 AAVrh.10.hFVIII 載體的懸浮液而被提供。於一具體實施例中，調配物緩衝液係 TMN200 中的 0.001% Pluronic F-68 (200mM 氯化鈉、1mM 氯化鎂、20mM Tris, pH8.0)。

7.2. 患者族群

【0133】有幾個原因選擇嚴重的 A 型血友病患者作為研究族群。嚴重的 A 型血友病患者被定義為具有小於正常因子 VIII (FVIII) 活性的 1%，因此需要頻繁地輸注 FVIII 以控制其易出血體質。此代表了進行正常生活的重大負擔，此外，FVIII 的血液水平經過了眾所周知的峰谷模式，此係不理想的。嚴重患者的 FVIII 血液水平低於 1% 的事實使得可以在 AAV.hFVIII 已被投予後，可以可靠地測量 FVIII 血液水平中甚至低至中等程度的增加。最近的臨床試驗證實了此種方法的有效性。

【0134】作為治療候選人的患者較佳為 ≥ 18 歲的成年男性，診斷為中度/重度或重度 A 型血友病。於一具體實施例中，患者具有基線 FVIII 活性 $\leq$ 正常的 2% 或經記錄的 FVIII 活性史 $\leq 2\%$ 。於一些具體實施例中，可以治療 < 18 歲的患者。治療候選人包括每年至少出現 3 次依需要進行以 FVIII 治療之出血事件的受試者。其它治療候選人包括以 FVIII 預防性療程治療的受試者。證明該受試者適合治療的其它標準包括 FVIII 至少 100 天的暴露史；沒有記錄到對外源性 FVIII 的抑制劑 (中和抗體) 的歷

史；對外源性 FIX 或 AAV.hFVIII 的任何成分無已知的過敏反應。

【0135】治療的患者可以具有基線血清 AAV.37 或 AAVrh10(適合所選的載體)中和抗體(Nab)力價 $\leq 1:5$ 。

【0136】可以允許受試者在其照護醫師的判斷下於基因治療之前及與基因治療同時繼續其照護治療標準(例如，替換 FVIII)。或者，在施予基因治療之前，醫生可能較喜歡停止照護療法的標準，並且可選擇地於施予基因治療後恢復護理治療標準作為輔助療法。

7.3.投劑&投予路徑

【0137】患者接受經由周圍靜脈輸注投予的單次劑量的 AAVrh.10.hFVIII 或 AAVhu.37.hFVIII。投予於患者的 AAVrh.10.hFVIII 或 AAVhu.37.hFVIII 的劑量為約 5×10^{11} GC/kg 或 1.6×10^{12} GC/kg 或 5×10^{12} GC/kg 或 1×10^{13} GC/kg。為了確保從投予患者的 AAVrh.10.hFVIII 或 AAVhu.37.hFVIII 的藥劑中移除空衣殼，藉由氯化銨梯度超速離心或藉由離子交換層析，於淨化過程中將空衣殼自載體顆粒分離，如上所述。

7.4.測量臨床目標

【0138】主要的評估係是為了經投予產品的安全性。以下評估於產品投予後的 4 週，每週進行兩次，從第 6 週至第 12 週每週進行一次，於第一年的剩餘時間內每月進行一次，於共 5 年期間，以 6 個月間隔進行。

a.身體檢查；

b.ECG；

c.生化評估：血清電解質、BUN、肌酐、鈣、磷酸鹽、總蛋白質、白蛋白、LDH、CPK、AST、ALT、鹼性磷酸酶、膽紅素；

d.血液學評估：CBC 及區別的、凝血概況；

e.尿液分析；

f.免疫學評估；

g.對 hu.37 或 rh.10 衣殼及對因子 VIII 的血清學反應；

h.T 細胞對 hu.37 或 rh.10 衣殼及因子 VIII 抗原的反應；

i.載體 DNA 之評估；血漿、尿液及唾液中的 qPCR 測量。

【0139】次要評估係基於轉基因表現及活性的測量，如下列測定：

a.血漿因子 VIII 程度及因子 VIII 活性；

b.替代因子 VIII 需求及自發性出血發作頻率的臨床評估。

8.實施例 3：AAV.hFVIII 之製造

8.1.用於生產 AAV.hFVIII 的質體

【0140】AAVrh.10.hFVIII 係藉由 3 種質體 DNA 轉染人類 HEK 293 MCB 細胞而產生

(i)如第 8.2.1.1-8.2.1.4 節所述之載體質體；

(ii)一種 AAV 輔助質體，稱為 pAAV2.rh10.KanR，含 AAV rep2 及 cap rh10 野生型基因，描述於第 8.2.2.1 節；及

(iii)一種輔助腺病毒質體，稱為 pAdDeltaF6(Kan)，描述於第 8.2.3 節。

【0141】AAVhu.37.hFVIII 係藉由 3 種質體 DNA 轉染人類 HEK 293 MCB 細胞產生 AAVhu.37.hFVIII：

(i)一種載體質體，如第 8.2.1.1-8.2.1.4 節所述；

(ii)一種 AAV 輔助質體，稱為 pAAV2.hu.37.KanR，含 AAV rep2 及 cap hu.37 野生型基因，述於第 8.2.2.2 節；及

(iii)一種輔助腺病毒質體，稱為 pAdDeltaF6(Kan)，述於第 8.2.3 節。

8.2.1 順式質體(載體基因體表現構築體)：

【0142】8.2.1.1 含有人類 FVIII 表現匣的 pAAV.E03.p3.hF8co-SQ.PA75(圖 1)。該順式質體編碼 rAAV 載體基因體。人類 FVIII-SQco cDNA 的表現係由具有 enTTR 增強子的 TTR 啟動子驅動。表現匣的 polyA 訊號為約 75nt 之人工 polyA 序列。

序列組件之描述

【0143】1.反向末端重複(ITR)：AAV ITR 是兩端相同但方向相反的序列。當以反式提供 AAV 和腺病毒(ad)輔助功能時，AAV2(GenBank# NC001401)ITR 序列作為載體 DNA 複製的起點及載體基因體的包裝訊號。因此，ITR 序列代表載體基因體複製及包裝所需的唯一順式作用序列。示例性的載體中使用的 5'ITR 序列示於 SEQ ID NO：11。示例性的載體中使用的 3'ITR 序列示於 SEQ ID NO：12。

2. *TTR* 啟動子：轉甲狀腺素蛋白啟動子 (SEQ ID NO: 7) 且被用於驅動高程度的肝臟特異性 hFVIII 基因表現。

3. *TTR* 增強子 (*enTTR*)：來自轉甲狀腺素蛋白之 100 bp 增強子序列 (SEQ ID NO: 5) 係存於載體表現串級以增進 FVIII 表現。

4. 人類凝血因子 VIII (*FVIII*) cDNA (SEQ ID NO: 1 顯示天然的序；SEQ ID NO: 2 顯示最佳化序列的密碼子)。人類凝血因子 8 (*FVIII*) cDNA 編碼血塊形成必需的凝血因子。該 hFVIII 為一 B-結構域缺失的序列，其中 B 結構域已以短的「SQ」序列替代，如本文所述。該 hFVIII cDNA 係於人類中用於表現的經最佳化的密碼子。

5. 人工多腺苷酸化訊號：(SEQ ID NO: 10) 75bp 人工多腺苷酸化訊號提供於 hFVIII mRNA 之有效率的多腺苷酸化的順式序列。此組件功能作為轉錄終止之訊號，於初期轉錄物之 3' 端的特異性裂解事件後添加多腺苷酸化尾段。

【 0144 】 8.2.1.2 含人類 FVIII 表現匣之 pAAV.E12.p3.hF8co-SQ.PA75 (圖 2)。此順式質體編碼 rAAV 載體基因體。人類 FVIII-SQco cDNA 之表現係由具 ABPS 及 *enTTR* 增強子之 *TTR* 啟動子驅動。於表現匣之 polyA 訊號為約 75nt 之人工 polyA 序列。

序列組件之描述

1. 反向末端重複 (*ITR*)：相同於 8.2.1.1

2. *TTR* 啟動子：相同於 8.2.1.1

3.增強子：來自 $\alpha 1$ -微球蛋白/比庫蛋白前驅物[ABP]至 42bp(SEQ ID NO：6)的 100bp 遠端增強子的縮短版本，其中來自轉甲狀腺素蛋白(enTTR)(SEQ ID NO：5)的兩個拷貝的 100bp 增強子序列存在於載體表現匣中以增加 FVIII 的表現。

4.人類凝血因子 VIII(FVIII)cDNA：相同於 8.2.1.1

5.人工多腺苷酸化訊號：相同於 8.2.1.1

【 0145 】 8.2.1.3 含人類 FVIII 表現匣之 pAAV.E03.p2.hF8co-SQ.PA75(圖 3)。此順式質體編碼 rAAV 載體基因體。人類 FVIII-SQco cDNA 之表現由具 enTTR 增強子之經修飾的 A1AT 啟動子驅動。表現匣用之 polyA 訊號為約 75nt 之人工 polyA 序列。

序列組件之描述

1.反向末端重複(ITR)：相同於 8.2.1.1

2.A1AT 啟動子：修飾的 SERINA1 [$\alpha 1$ -抗胰蛋白酶] 啟動子(SEQ ID NO：9)，用於驅動高水平的肝特異性 hFVIII 基因表現。

3.TTR 增強子(enTTR)：來自轉甲狀腺素蛋白的 100bp 增強子序列存在於載體表達匣中以增加 FVIII 的表現。

4.人類凝血因子 VIII(FVIII)cDNA：相同於 8.2.1.1

5.人工多腺苷酸化訊號：相同於 8.2.1.1

【 0146 】 8.2.1.4 含人類 FVIII 表現匣的 pAAV.E12.p2.hF8co-SQ.PA75(圖 4)。此順式質體編碼 rAAV 載體基因體。人類 FVIII-SQco cDNA 之表現係由

具 ABPS 及 enTTR 增強子的 TTR 啟動子驅動。表現匣之 polyA 訊號為約 75nt 之人工 polyA 序列。

序列組件之描述

- 1.反向末端重複(*ITR*): 相同於 8.2.1.1
- 2.*AIAT* 啟動子: 相同於 8.2.1.3
- 3.*Enhancer*: 相同於 8.2.1.1
- 4.人類凝血因子 *VIII(FVIII)*cDNA: 相同於 8.2.1.1
- 5.人工多腺苷酸化訊號: 相同於 8.2.1.1

8.2.2 輔助質體

8.2.2.1 AAVrh10 輔助質體 pAAV2.rh10.KanR

【0147】此 AAVrh10 輔助質體(8,036 bp)編碼 4 種野生型 AAV2 rep 蛋白質及 3 種野生型 AAV VP 衣殼蛋白質，來自血清型 rh10。一新穎 AAV 序列獲自恒河獼猴的肝臟組織 DNA 並指定為 AAV 血清型 rh10。為了產生嵌合包裝構築體，自質體 p5E18 中移除 AAV2 蓋帽基因，並以從靈長類動物肝 DNA 增幅的 AAVrh10 蓋帽基因的 PCR 片段替換，得到質體 p5E18VD2/rh10。注意，通常驅動 rep 表現的 AAV p5 啟動子在此構築體中由 rep 的 5'末端移動到 rh10 蓋帽基因之 3'末端。此種排列用於啟動子與 rep 基因(即，質體骨架)之間引入間隔物，以向下調節 rep 的表現並增加支持高力價載體產生的能力。p5E18 中的質體骨架係來自 pBluescript KS。藉由直接定序驗證質體的所有組成部分。最後將安比西林(ampicillin)抗性基因替換為康黴素(kanamycin)抗性基因，得到 pAAV2/rh10(Kan)。

8.2.2.2 AAVhu.37 輔助質體 pAAV2.hu.37.KanR

【0148】此 AAVhu.37 輔助質體(8,036bp)編碼 4 種野生型 AAV2 rep 蛋白質及來自血清型 hu.37 的 3 種野生型 AAV VP 衣殼蛋白質。pAAV2.rh10.KanR 質體的示意圖如下所示。爲了產生嵌合包裝構築體，從質體 p5E18 中移除 AAV2 蓋帽基因，並以從靈長類動物肝 DNA 增幅的 AAVhu.37 蓋帽基因的 PCR 片段替換，得到質體 p5E18VD2/hu.37。p5E18 中的質體骨架係來自 pBluescript KS。藉由直接定序驗證質體的所有組成部分。最後將安比西林抗性基因替換爲康黴素抗性基因，得到 pAAV2/hu.37(Kan)。

8.2.3 pAdDeltaF6(Kan)adenovirus 輔助質體

【0149】質體 pAdDeltaF6(Kan)的大小爲 15,774bp。質體含有 AAV 複製重要的腺病毒基因體，即 E2A、E4 及 VA RNA(腺病毒 E1 功能由 293 細胞提供)，但不含其它腺病毒複製或結構基因。該質體不含有複製關鍵的順式組件，諸如腺病毒反向末端重複序列，因此，預期不會產生感染性腺病毒。其衍生自 E1、E3 刪除的 Ad5 分子選殖株(pBHG10，基於 pBR322 的質體)。於 Ad5 DNA 中引入缺失以移除不需要的腺病毒基因的表現，並將腺病毒 DNA 的量從 32kb 減少至~12kb。最後將安比西林抗性基因替換爲康黴素抗性基因，得到 pAdΔF6(kan)。此 3 種腺病毒基因的同一性藉由 Qiagen Genomic Services 在被送至 Aldevron Inc.用於質體 DNA 製造的質體源庫中進行的 DNA 質體定序證實。DNA 分析顯示與 3 種腺病毒 5

型基因區域(GenBank 登錄號 AF369965)具有 100%的同源性。

8.2.4 細菌種源細胞庫(Bacterial Master Cell Banks , MCB)

【0150】用於支持 DTX101 製造的三種 DNA 生產質體的細菌 MCBs 係由 Aldevron Inc.生產。細胞庫由選定培養物的擴增製成，並進行廣泛的測試以對 Aldevron SOPs 後的每種細菌 MCB 進行鑑定，並依據與 CBER 建議。進行及記錄關於三種質體中的每一種的細菌 MCB 產生及測試的細節的資訊。

8.2.5 質體 DNA 製造

【0151】生產過程中使用的所有質體均由 Aldevron Inc.以其 GMP-S™品質體系及利用 cGMP 製造最顯著特徵的基礎設施生產；可溯源性、文件控制及材料隔離。進行及記錄關於每個質體的質體 DNA 產生與測試的細節的資訊。

8.2.6 人類胚胎腎臟(Human Embryonic Kidney , HEK)293 種源細胞庫(MCB)

【0152】原始產自 Frank Graham 及其同事將 HEK 293 細胞轉化為具有剪切腺病毒 5 型 DNA 的 HEK 細胞。細胞表現高力價 rAAV 生產所需的 E1a 及 E1b 基因產物。HEK293 細胞係黏附的且為高度可轉染，在 DNA 質體轉染時產生高力價的 rAAV。

8.3 重組 AAV 載體製造

8.3.1 製造方法的描述

【0153】1.細胞接種：合格的人類胚胎腎臟 293 細胞株用於生產過程。將細胞培養在補充有 10% γ 輻射照射胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的 Dulbecco's Modified Eagle 培養基 (DMEM) 的培養基中。細胞為依賴於錨定，且細胞解離使用非動物細胞解離試劑 TrypLE Select 來完成。於 5%(+/-0.5%)CO₂ 環境氣體中將細胞保持於 37°C (+/-1°C)。

【0154】2.暫時性轉染：在 3 日之生長 (DMEM 培養基 + 10%FBS) 後，以新鮮無血清 DMEM 培養基替代 Hyperstack 細胞培養基，並使用最佳化的 PEI 沉澱法以 3 種生產質體轉染。

於 BSC 中製備足夠的 DNA 質體轉染複合物以轉染 20 個 Corning 36 層 HyperStacks(每 BDS 批次)。最初製備含有 3.0mg pDTX.hFIX.101 載體質體、60mg pAdDeltaF6(Kan)、30mg pAAV2.rh10.KanR AAV 輔助質體及 GMP 級 PEI(PEIPro, PolyPlus Transfection SA)的 DNA/PEI 混合物。混合均勻後，將溶液於室溫下靜置 25 分鐘，然後加入到無血清培養基中淬滅該反應，然後加入 Corning 36 層 Hyperstacks。轉染混合物於所有 36 層的 Hyperstack 之間均衡，細胞在 5%(+/-0.5%)CO₂ 環境於 37°C (+/-2°C) 下培育 5 日。

【0155】3.細胞媒介收取：使用拋棄式生物處理袋從每個 Hypertack 收取轉染的細胞和培養基，藉由無菌地將培養基排出單位。於培養基收取後，將~80 升體積補充以最終濃度為 2mM 的 MgCl₂(Benzonase 的輔助因子)

及添加 Benzonase 核酸酶 (Cat # : 1.016797.0001, Merck 集團), 終濃度為 25 單位/ml。將產品(拋棄式生物處理袋)於 37°C 下培養箱中培育 2-3 小時, 以提供足夠的時間用於轉染程序的結果的收取中殘留的細胞和質體 DNA 之酵素消化。進行此步驟以最小化最終載體 DP 中殘留 DNA 的量。於培育期間後, 加入 NaCl 至最終濃度為 500mM, 以幫助在過濾及下游切向流過濾期間之產物回收。

【 0156 】 4.澄清: 使用由蠕動泵驅動的無菌密封管及袋組件的串聯連接的深度過濾器膠囊 (1.2 μ m/0.22 μ m), 自產品中移除細胞及細胞碎片。媒劑通過 Sartorius Sartoguard PES 膠囊過濾器 (1.2 μ m/0.22 μ m)(Sartorius Stedim Biotech Inc.)。

【 0157 】 5.大規模切向流過濾 (Tangential Flow Filtration): 以使用 Spectrum Labs 生產的定製無菌密封的生物處理管、袋子及膜組件的切向流過濾 (TFF) 達成澄清物的體積減少 (10-20 倍)。

8.4 以第二載體再投予

8.4.1 AAV3B 或 AAV5 之再投予

【 0158 】評估使用 AAV3B 或 AAV5 在先前以 AAVrh10 或 AAV8 載體處理的恒河獼猴中的載體再次投予的功效。如前所述製備如表 4 所示的載體, 其中在 HEK293 細胞中三次轉染後從上清液中回收載體, 並於碘克沙醇 (iodixanol) 梯度上純化。藉由數位 PCR 方法測定載體力價。

基於預先存在的 NAb 的狀況，將 24 隻雄性恒河獼猴 (3-5 歲) 納入 8 組 (n=3/組；表 1)。獼猴在第 0 天以 1.0×10^{13} GC/kg AAV.TBG.hCG.WPRE 注射，AAV 載體如表 4 所示。於第 12 週，獼猴接種第二次注射， 1.0×10^{13} GC/kg AAV.TBG.hCG.WPRE，AAV 載體如表 4 所示。肝臟生檢於第 2 週和第 14 週進行，屍檢在第 26 週進行。

【 0159 】 表 4： 群組及載體摘述

群組	動物 ID	第一次注射	第二次注射
G1A	RA0931	PBS	AAV3B.TBG.rhAFP
	RA1388		
	RQ9715		
G1B	RA0923	PBS	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1275		
	RQ9383		
G2A	RA0985	AAVrh10.TBG.rhCG.WPRE	AAV3B.TBG.rhAFP
	RQ9638		
	RQ9746		
G2B	RA0992	AAVrh10.TBG.rhCG.WPRE	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1322		
	RA1417		
G3A	RA1234	AAV8.TBG.rhCG.WPRE	AAV3B.TBG.rhAFP
	RQ9737		
	RQ9751		
G3B	RA1339	AAV8.TBG.rhCG.WPRE	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1390		
	RQ9805		
G4	RA0548	AAV3B.TBG.rhCG.WPRE	N/A
	RA0658		
	RQ9840		
G5	RA0968	AAV5.TBG.rhCG.WPRE	N/A
	RA1208		
	RA1239		

【0160】藉由酵素連結免疫吸收試驗(ELISA)測量血清中轉基因(rhCG-恒河猴慢性促性腺素 b 次單元之表現程度。爲了肝臟中測量載體 DNA 拷貝數，於萃取自於肝生檢及屍檢收集的肝臟樣品的全部細胞 DNA 進行 QPCR 試驗。AAV Nab 試驗如前述進行。肝臟切片以抗-CG 抗體染色用於顯像。

【0161】圖 15 顯示藉由 AAVrh10、AAV8、AAV3B 及 AAV5 載體(第一載體注射)之 rhCG 表現量的比較。圖 16A-16D 顯示於不同時間點的肝臟中 rhCG 載體 DNA 拷貝數。圖 17A-17B 顯示以表現 rhAFP 之 AAV3B(圖 17A)或 AAV5(圖 17B)載體再投予後 rhAFP 程度(第二載體注射)。圖 18A 及圖 18B 顯示肝臟中 rhAFP 載體基因體拷貝數。圖 19 顯示於獼猴有差異的 AAV Nab 反應。

【0162】於自然的動物中，分化體的 E 載體(AAVrh10 & AAV8)證實最高程度的門靜脈基因轉移，以 AAV5 載體具有最低；門靜脈區域最接近進入的血管供應，接受最充氧的血液，且爲肝臟代謝過程的重要區域。AAVrh10 及 AAV5 誘發較 AAV8 和 AAV3B 更高程度的中和抗體(NAb)。於血清陰性動物中 AAV3B 注意到轉基因表現中顯著的動物與動物之間的變化。於試驗的短時間框架內，由 AAVrh10 誘發的 NAb 似乎已經抑制隨後以血清學不同的 AAV3B 血清型的活體內轉導；先前暴露於 AAV8 並未干擾 AAV3B 轉導。

【0163】本說明書中引用的所有刊物以及美國臨時專利申請案第 62/323,336、62/331,807 及 62/428,866 號均

藉由引用併入本文。相似地，本文參考並出現在附加的序列表中的 SEQ ID NO 以及序列表本身被併入作為參考。雖然已經參考特定具體實施例來描述本發明，但應當理解，於不脫離本發明精神下可作修飾。此等修飾意圖落入所附申請專利範圍的範疇內。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 賓州大學委員會 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA)
<120> 治療 A 型血友病之基因治療
<130> UPN-16-7798PCT
<140> 106112302
<141> 2017-04-13
<150> US 62/323,336
<151> 2016-04-15
<150> US 62/331,807
<151> 2016-05-04
<150> US 62/428,866
<151> 2016-12-01
<160> 20
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 4371
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tcattcaac 180
acctcagctg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
gctaagocaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccattccaggc tgaggtttat 300
gatacagtggt tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagttt tcatgtgttt 360
ggtgtatcct actggaaaag ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
gagaaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcotta octactcata tttttotcat 540
gtggacotgg taaaagactt gaattcaggc ctoattggag cctactagt atgtagagaa 600
gggagtotgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgotgta 660
tttgatgaag ggaaaaagttg gcactcagaa acaagaact cttgatgca ggatagggat 720
gctgcatctg ctggggcctg gctaaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtat tggaatgggc 840
accactctg aagtgcactc aatattcttc gaaggtcaca cttttcttgt gaggaacct 900
cgccaggcgt ccttggaat ctgcccaata actttctta ctgtcctaac actcttgatg 960
gacottggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactga tggcatggaa 1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
gaagcgggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgtcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
tgggtacatt acattgtctg tgaagaggag gactgggact atgtccctt agtcctcgcc 1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatac acagatgaaa ctttaagac togtgaagot 1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttaotttatg gggaagttgg agacacactg 1440

ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccccca cggaatcaat	1500
gatgtccgto ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atccctgggtg cctgacccgc tattactota gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaato tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgto agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt attttagtag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgto agtttgttg catgagggtg catactggta cattctaago	1980
attggagcac agactgactt cctttctgto ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtotatg aagacacact caccctatto ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggctctatg gattctgggg tggcacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttctg agtaaaaaa atgccattga accaagaago	2280
ttctcccaga atccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca ttatgatga gtaggaaat cagagcccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgtctg agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
catgtttcaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cctttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagtgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
agaaatcagg cctctctgto ctattccttc tattctagcc ttattttcta tgaggaagat	2760
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac ttgtcgaag ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttgaaag tgcaacatca tatggcacc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcaat caggcctgat tggacccctt	2940
ctggtctgcc aactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtac agtacaggaa	3000
tttgctctgt ttttcacat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaatatatg	3060
gaaagaaact gcagggtctc ctgcaatctc cagatggaag atccacttt taaagagaat	3120
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180
caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct	3240
attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctct atccagggtt ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt	3360
tggcgggtgg aatgccttat tggcagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt	3480
cagattacag cticaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc	3660
ctctacatct ctacgtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat	3720

```

cgaggaaatt ccactggaac cttaatggto ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780
aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gctcgatata tccgtttgca cccaactcat 3840
tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc 3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacctac 3960
tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaaggggagg 4020
agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttcacg 4080
aagacaatga aagtcacagg agtaactact caggaggtaa aatctctgct taccagcatg 4140
tatgtgaagg agttctcat ctocagcagt caagatggcc atcagtggac tctotTTTT 4200
cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac ottogaattc acccccagag ttgggtgcac 4320
cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta c 4371

```

<210> 2
 <211> 4374
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 構築の序列

```

<400> 2
atgcagatcg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggtctg ottctcggc 60
acccggcggg actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg 120
ggagagctgc cagtggatgc ccggttccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac 180
accagcgtgg tgtacaagaa gacctgttc gtggagtcca ccgatcacct gttcaacatc 240
gccaaagcac ggccaccctg gatgggactg ctgggaccaa ccattcagcg cgaggtgtac 300
gataccgtgg tgatcacctt gaagaacatg gcctctcctc ctgtgtccct gcacgcctg 360
ggagtgagct actggaaggc cagcgaggga gccgagtacg atgatcagac cagccagcgg 420
gagaaggagg atgataaggt gttcccagga ggaagccaca cctacgtgtg gcaggtgctg 480
aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac 540
gtggatctgg tgaaggatct gaacagcgga ctgatcggag ccctgtctgt gtgccgggag 600
ggaagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gttcgcctg 660
ttcgatgagg gaaagagctg gcacagcgag accaagaaca gcctgatgca ggatcgggat 720
gccgccagcg ccgggcctg gccaaagatg cacaccgtga acggatactg gaaccggagc 780
ctgccaggac tgatcggatg ccaccggaag agcgtgtact ggacgtgat cggaatggga 840
accaccccag aggtgcactc tatcttctg gagggacaca ctttctgtgt goggaaccac 900
cggcaggcca gcctggagat cagcccaatc accttctga ccgccagac cctgtgatg 960
gatctgggac agttctgtct gttctgcat atcagcagcc accagcacga tggaatggag 1020
gcctacgtga aggtggatag ctgccagag gagccacagc tgcggatgaa gaacaacgag 1080
gaggccgagg attacgatga tgatctgacc gatagcgaga tggatgtgtt gcggttcgat 1140
gatgataaca gccaaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaaagacc 1200
tggtgtcact acatgcgcgc cgaggaggag gattgggatt acgcccact ggtgtcggc 1260

```

cctgatgacg ggagctacaa gagccagtag ctgaacaacg gaccacagcg gatcggacgg	1320
aagtacaaaa aagtgcgggt catggccctac accgatgaga ccttcaagac ccgggaggcc	1380
atccagcacg agagcggat cctgggacca ctgctgtacg gagagggtgg agataccctg	1440
ctgatcatct tcaagaacca ggcagccgg ccatacaaca tctaccaca cggaatcacc	1500
gatgtgcggc cactgtacag ccggcggctg ccaaggagg tgaagcacct gaaggatttc	1560
ccaatcctgc caggagagat ctccaagtag aagtggacag tgacagtggg ggatggacca	1620
accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	1680
gacctggcct ctggactgat tggaccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag	1740
agaggaaaac agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag	1800
aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagatttc tgccaaacc agccggagtg	1860
cagctggagg atccagagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cggatacgtg	1920
ttcgatagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cagagggtgg cctattggtg taccctgagc	1980
atcggagccc agaccgattt cctgagcgtg ttcttcagcg gatacacctt caagcacaag	2040
atggtgtacg aggataccct gacctgttc ccattctccg gagagaccgt gttcatgagc	2100
atggagaacc caggactgtg gatcctggga tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2160
atgactgccg tgctgaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatta ctatgaggat	2220
agctatgagg atatctctgc ctacctgtg agcaagaaca atgccattga gccagaagc	2280
ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2340
cagtctgacg aggaggagat tgattatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2400
gattttgata totatgatga ggaagagaac cagagcccaa gaagcttcca gaagaagacc	2460
agacactact tcatogctgc agtggagaga ctgtgggatt atggaatgag cagcagccca	2520
cacgtgtcga gaaacagagc ccagagcggg tctgtgccac agttcaagaa ggtgggttgc	2580
caggagtcca ccgatggaag ctccaccag ccaactgtacc ggggagagct gaacagagac	2640
ctgggactgc tgggaccata catccgggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc	2700
cggaaccagg ccagccggcc atacagcttc tacagcagcc tgatcagcta caggaggat	2760
cagcggcagg gagccagacc acggaagaac ttctgtgaagc caaacgagac caagacctac	2820
ttctggaagg tgcagcacca catggcccca accaaggatg agttcgattg caaggcctgg	2880
gcctacttca gcatgtgga tctggagaag gatgtgcaca gggactgat cggaccactg	2940
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccca gccacggag ggcagggtgac cgtgcaggag	3000
ttgcacctgt tottcacat ctctgatgag accaagagct ggtacttcac cgagaacatg	3060
gagcggaaat gccgggcccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3120
taccggttcc acgcatcaa cggatacatc atggataccc tgccaggact ggtgatggcc	3180
caggatcagc ggatccggtg gtacctgtg agcatgggaa gcaacagaga catccacagc	3240
atccacttca ggcgacacgt gttcaccgtg cggaagaagg aggagtacaa gatggccctg	3300
tacaacctgt acccaggagt gttcgagacc gtggagatgc tgccaagcaa ggcgggaatc	3360
tggcgggtgg agtgcctgat cggagagcac ctgcacgccg gaatgagcac cctgttctg	3420
gtgtacagca acaagtcca gacccactg ggaatggcca ggcgacacat ccgggatttc	3480
cagatcaccg ccagcggaca gtacggacag tgggcccaca agctggcccg gctgcactac	3540

agcggaagca tcaacgcctg gagcaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg 3600
ctggcccaaa tgatcatcca cggaatcaag acccaggagg cccggcagaa gttcagcagc 3660
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtg gcagacctac 3720
cggggaaaaca gcaccggaac cctgatggtg ttcttcggaa acgtggatag cagcgggaatc 3780
aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gcccgataca tccggctgca cccaaccac 3840
tacagcatca gaagcacctt gcggatggag ctgatgggat gtgatctgaa cagctgctcc 3900
atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgcc agatcaccgc cagcagctac 3960
ttcaccaaca tgttcgccac ctggagccca agcaaggccc ggctgcacct gcagggacgg 4020
agcaacgcct ggcgccaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggatttcag 4080
aagaccatga agtgaccgg agtgaccacc caggagtgga agagcctgct gactagcatg 4140
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagtggac cctgttcttc 4200
cagaacggaa aggtgaaggt gttccaggga aaccaggata gcttcacccc agtggtgaa 4260
agcctggatc caccactgct gaccgatac ctgcggatcc accacagag ctgggtgcac 4320
cagatgcgcc tgagaatgga ggtgctggga tgcgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 3
<211> 1457
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu

450	455	460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu		
465	470	475 480
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro		
	485	490 495
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys		
	500	505 510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe		
	515	520 525
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp		
	530	535 540
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg		
	545	550 555 560
Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu		
	565	570 575
Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val		
	580	585 590
Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu		
	595	600 605
Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp		
	610	615 620
Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val		
	625	630 635 640
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp		
	645	650 655
Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe		
	660	665 670
Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr		
	675	680 685
Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro		
	690	695 700
Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly		
	705	710 715 720
Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp		
	725	730 735
Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys		
	740	745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
805 810 815

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
820 825 830

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
835 840 845

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
850 855 860

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
865 870 875 880

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
885 890 895

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
900 905 910

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
915 920 925

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
930 935 940

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
945 950 955 960

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
965 970 975

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
980 985 990

Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
995 1000 1005

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
1010 1015 1020

Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1025 1030 1035

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1040 1045 1050

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr	1055	1060	1065
Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe	1070	1075	1080
Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met	1085	1090	1095
Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met	1100	1105	1110
Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly	1115	1120	1125
Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser	1130	1135	1140
Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg	1145	1150	1155
Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro	1160	1165	1170
Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser	1175	1180	1185
Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro	1190	1195	1200
Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe	1205	1210	1215
Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp	1220	1225	1230
Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu	1235	1240	1245
Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn	1250	1255	1260
Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro	1265	1270	1275
Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly	1280	1285	1290
Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys	1295	1300	1305
Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn	1310	1315	1320
Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln	1325	1330	1335

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
1340 1345 1350

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
1355 1360 1365

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
1370 1375 1380

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
1385 1390 1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
1415 1420 1425

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1445 1450 1455

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 4
tgtttgctgc ttgcaatggt tgcccatttt aggg 34

<210> 5
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 5
ctacctctgt atgcccggc ccctgttcaa acatgtccta atactotgtc tctgcaagg 60
tcattcagtag ttttccatct tactcaacat cctcccagtg 100

<210> 6
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 6
aggttaattt ttaaactggt tgctctgggt aataatctca gg 42

<210> 7
<211> 190
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 7
atttcataga acgaatgttc cgatgctcta atctctctag acaaggttca tatttgtatg 60
ggttacttat tctctctttg ttgactaagt caataatcag aatcagcagg ttgcagtca 120
gattggcagg gataagcagc ctagctcagg agaagtgagt ataaaagccc caggctggga 180
gcagccatca 190

<210> 8
<211> 176
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 8
actcaaagtt caaaccttat cattttttgc ttgttcctc ttggccttgg tttgtacat 60
cagctttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggtta atttataact aagagtgtc 120
tagttttgca atacaggaca tgcataaaaa atggaaagat gttgctttct gagaga 176

<210> 9
<211> 218
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 9
tggacacagg acgtgtgtgt ttctgagcca gggggcgact cagatcccag ccagtggact 60
tagccctgt ttgtctctcc gataactggg gtgaccttg ttaatattca ccagcagcct 120
cccccgttgc cctcttgat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 180
cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaata 218

<210> 10
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 10
aataaagtct gagtgggogg cagcctgtgt gtgcctgggt tctctctgtc ccggaatgtg 60
caaacaatgg aggtg 75

<210> 11
<211> 168
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 11
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt 60
ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct ttagttaat gattaacccg ccatgctact tatctact 168

- <210> 12
- <211> 164
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 構築の序列

<400> 12
gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagtggcc 60
actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcgcgacgc 120
ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgago gagcgagcgc gcag 164

- <210> 13
- <211> 7920
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 構築の序列

<400> 13
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cgggcgctcg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgacagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct ttagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactta agctacctcg 180
tgatcgcccc gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgaag ggtcatcagt 240
agttttccat ctactcaac atcctcccag tggattcat ttcatagaac gaatgttccg 300
atgctcta atctctagac aaggttcata ttgtatggg ttacttatto tctctttgtt 360
gactaagtca ataacagaa tcagcaggtt tgcagtcaga ttggcaggga taagcagcct 420
agctcaggag aagttagtat aaaagccca ggctgggagc agccatcago ggcgcgccacc 480
atgcagatcg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggttctg cttctccgcc 540
accgcggcgt actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg 600
ggagagctgc cagtggatgc ccggttccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac 660
accagcgtgg tgtacaagaa gacctgttc gtggagtcca ccgatcacct gttcaacatc 720
gccaaagccc gcccaacctg gatgggactg ctgggaccaa ccatccaggc cagggtgtac 780
gataccgtgg tgatcacct gaagaacatg gcctctcacc ctgtgtccct gcacgccgtg 840
ggagttagct actggaaggc cagcagaggga gccgagtacg atgatcagac cagccagcgg 900
gagaaggagg atgataaggt gttccaggga ggaagccaca cctacgtgtg gcagggtgtg 960
aaggagaacg gaaccaatggo cagcagatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac 1020
gtggatctgg tgaaggatct gaacagcgga ctgatcggag ccctgctggt gtgccgggag 1080
ggaagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gttcgcgtg 1140
ttcgtgagg gaaagagctg gcacagcgag accaagaaca gcctgatgca ggatcgggat 1200
gccgccagcg ccggggcctg gccaaagatg cacaccgtga acggatacgt gaaccggagc 1260
ctgccaggac tgatcggatg ccaccggaag agcgtgtact ggcacgtgat cggaatggga 1320
accacccagc aggtgcactc tatcttctg gagggacaca ctttctggt gcggaaccac 1380

cggcaggcca gcctggagat cagcccaatc accttcctga ccgcccagac cctgctgatg	1440
gatctgggac agttcctgct gttctccat atcagcagcc accagcacga tggaatggag	1500
gcctacgtga aggtggatag ctgccagag gagccacagc tgcggatgaa gaacaacgag	1560
gaggcogagg attacgatga tgatctgacc gatagcgaga tggatgtggt gcggttcgat	1620
gatgataaca gccaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaaagacc	1680
tgggtgcact acatcgccgc cgaggaggag gattgggatt acgcccact ggtgctggcc	1740
cctgatgato ggagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gaccacagcg gatcggacgg	1800
aagtacaaaa aagtggggtt catggcctac accgatgaga ccttcaagac cggggaggcc	1860
atccagcacg agagcggaat cctgggacca ctgctgtacg gagagtgagg agataccctg	1920
ctgatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccatacaaca tctaccaca cggaatcacc	1980
gatgtgcgcc cactgtacag ccggcggctg ccaaggggag tgaagcacct gaaggatttc	2040
ccaatcctgc caggagagat cttcaagtac aagtggacag tgacagtgga ggatggacca	2100
accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	2160
gaacctggcct ctggactgat tggaccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag	2220
agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag	2280
aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaccc agccggagtg	2340
cagctggagg atccagagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cggatacgtg	2400
ttcgatagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cacgagtggt cctatttgta taccctgagc	2460
atcggagccc agaccgatit cctgagcgtg ttcttcagcg gatacacctt caagcacaa	2520
atggtgtacg aggataccct gacctgttc ccattctccg gagagaccgt gttcatgagc	2580
atggagaacc caggactgtg gatcctggga tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2640
atgactgccc tgtgaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatta ctatgaggat	2700
agctatgagg atatctctgc ctacctgtg agcaagaaca atgccattga gccagaagc	2760
ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2820
cagtctgato aggaggagat tgattatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2880
gattttgata totatgatga ggatgagaac cagagcccaa gaagcttcca gaagaagacc	2940
agacactact tcatogctgc agtgagagaga ctgtgggatt atggaatgag cagcagccca	3000
cacgtgctga gaaacagagc ccagagcgga tctgtgccac agttcaagaa ggtggtgttc	3060
caggagtcca ccgatggaag cttcaccag ccactgtacc ggggagagct gaacgagcac	3120
ctgggactgc tgggaccata catccgggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc	3180
cggaaaccagg ccagccggcc atacagcttc tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggat	3240
cagcggcagg gagccagacc acggaagaac ttctgaagc caaacgagac caagacctac	3300
ttctggaagg tgcagacca catggcccca accaaggatg agttcgattg caaggcctgg	3360
gcctacttca gcgatgtgga tctggagaag gatgtgcaca gcggactgat cggaccactg	3420
ctggtgtgcc acaacaacac cctgaaccca gccacggac ggcaggtgac cgtgcaggag	3480
ttcgccctgt tottaccat cttcgatgag accaagagct ggtacttcac cgagaacatg	3540
gagcggaact gccgggcccc ttcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3600
taccggttcc acgcoatcaa cggatacatc atggataccc tgccaggact ggtgatggcc	3660

caggatcagc ggatccggtg gtacctgctg agcatgggaa gcaacgagaa catccacagc	3720
atccacttca gcggacacgt gtaccacgtg cggagaagg agggatataa gatggccctg	3780
tacaacctgt acccaggagt gttagagacc gtggagatgc tgccaagcaa ggccggaatc	3840
tggcgggttg agtgctgat cggagagcac ctgcacgccg gaatgagcac cctgttctctg	3900
gtgtacagca acaagtgccg gacccactg ggaatggcca gcggacacat cggggatttc	3960
cagatcaccc ccagcggaca gtacggacag tgggcccaca agctggcccg gctgcactac	4020
agcgggaagca tcaacgcctg gaggaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg	4080
ctggcccaca tgatcatcca cggaatcaag acccaggag cccggcagaa gttagcagc	4140
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtg gcagacctac	4200
cggggaaaaca gcaccggaac cctgatggtg ttcttcggaa acgtggatag cagcggatc	4260
aagcacaaca tcttaacccc accaatcatc gcccgatata tccggtgca cccaaccac	4320
tacagcatca gaagcaccct gcggatggag ctgatgggat gtgatctgaa cagctgctcc	4380
atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgtatccc agatcacccg cagcagctac	4440
ttcaccacaa tgttggccac ctggagccca agcaaggccc ggctgcacct gcagggacgg	4500
agcaacgcct ggccggccaca ggtgaataac ccaaggagt ggctgcaggt ggatttcag	4560
aagaccatga aggtgaccgg agtgaccacc caggaggatga agagcctgct gactagcatg	4620
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagtggac cctgttcttc	4680
cagaacggaa aggtgaagggt gttccaggga aaccaggata gcttcacccc agtgggtgaa	4740
agcctggatc caccactgct gaccgatac ctgcggatcc accacagag ctgggtgcac	4800
cagatcgccc tgagaatgga ggtgctggga tgcgaggccc aggatctgta ctgatgagca	4860
tgcaataaag tctgagtggg cggcagccctg tgtgtccctg ggttctctct gtcccgaat	4920
gtgcaacaaa tggaggtgct cgagtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaacta	4980
aggaaccctc agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgtcgtctcg ctactgagg	5040
ccggcgagcc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgccc ggccgacctc gtgagcgagc	5100
gagcgcgcag ccttaattaa cctaattcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg	5160
aaaaccctgg cgtaaccaca cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc	5220
gtaatagcga agaggcccg accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg	5280
aatgggagcc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtgtgtgtt acgcgcagcg	5340
tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgtttcttc ccttccttc	5400
tcgccaggtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc	5460
gatttagtgc tttagcgcac ctgcaccca aaaaacttga ttaggtgat ggttcacgta	5520
gtgggccatc gccctgatag acggtttttt gccctttgac gttggagtcc acgttcttta	5580
atagtggact ctgtttcaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg	5640
atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa	5700
aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca ctttcgggg	5760
aaatgtgcgc ggaaccccta ttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct	5820
catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat	5880

tcaacatttc cgtgtogccc ttattccctt ttttgggca ttttgccctc ctgtttttgc	5940
tcaccocagaa acgctgttga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg	6000
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg	6060
ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga	6120
cgccggggcaa gagcaactcg gtcccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta	6180
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	6240
tgccataacc atgagtata acactcgcc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc	6300
gaaggagcta accgtttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg	6360
ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc	6420
aatggcaaca acgttgccga aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgcca	6480
acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct	6540
tcoggtctgc tggtttattg ctgataaato tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat	6600
cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg	6660
gagtcaggca actatggatg aacgaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat	6720
taagcattgg taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact	6780
tcatttttaa tttaaaagga tctagtgaa gatcctttt gataatctca tgacccaaat	6840
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	6900
ttcttgagat cctttttttc tgocgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccacgct	6960
accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg	7020
cttcagcaga gcgcagatc caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca	7080
cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc	7140
tgtgtccagt ggcgataagt cgtgtottac ogggttggac tcaagacgat agttacogga	7200
taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagccagct tggagcgaa	7260
gaacctacac gaactgagat acctacagc tgagctatga gaaagcgcca ogcttcocga	7320
agggagaaa ggcgacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag	7380
ggagcttcca gggggaaaac cctggtatct ttatagtct gtccgggttc gccacctctg	7440
acttgagcgt ogatttttgt gatgctctgc agggggcg agcctatgga aaaacgccag	7500
caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgtggcct tttgtcaca tgttctttcc	7560
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgc tttgagttag ctgataccgc	7620
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc	7680
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgocggtt gccgattcat taatgcagct ggcacgacag	7740
gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca	7800
ttaggcacc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag	7860
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccagat ttaattaagg	7920

<210> 14
 <211> 8004
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 構築の序列

<400> 14

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctcctcact	120
aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactta agctacctcg	180
tgatgcccgg gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
agttttccat cttactcaac atcctcccag tgaggttaat ttttaactg tttgctctgg	300
ttaataatct caggaggta atttttaaac tgtttgctct ggtaataat ctcagggaat	360
tcatttcata gaacgaatgt tccgatgtc taatctctct agacaagggt catatttgta	420
tgggttactt attctctctt tgttgactaa gtcaataatc agaatacagca ggtttgcagt	480
cagattggca gggataagca gcctagctca ggagaagtga gtataaaagc ccaggctgg	540
gagcagccat cagcggccgc caccatgcag atcgagctga gcacctgctt cttcctgtgc	600
ctgctcggtt tctgtctctc cgccaccggg cgggtactacc tggggaccgt ggagctgagc	660
tgggattaca tgcagagcga tctgggagag ctgccagtg atgcccgtt cccaccacgg	720
gtgcaaaga gcttccatt caacaccagc gtgggtgaca agaagacct gttcgtggag	780
ttcaccgato acctgttcaa catgccaaag ccacggccac cctggatggg actgctggga	840
ccaaccatcc aggcggaggt gtacgatacc gtggtgatca cctgaagaa catggcctct	900
catcctgtgt cctgcacgc cgtgggagt agctactgga aggcagcga gggagcag	960
tacgatgato agaccagcca gggggagaag gaggatgata aggtgttccc agggaggaagc	1020
cacacctacg tgtggcaggt gctgaaggag aacggaccaa tggccagcga tccactgtgc	1080
ctgacctaca gctacctgag ccacgtggat ctggtgaagg atctgaacag cggactgato	1140
ggagccctgc tgggtgtcgc ggagggaagc ctggccaagg agaagacca gacctgcac	1200
aagttcatcc tgctgttcgc cgtgttcgat gagggaaaga gctggcacag cgagaccaag	1260
aacagcctga tgcaggatcg ggtgcccgc agcggccggg cctggccaaa gatgcacacc	1320
gtgaacggat acgtgaaccg gacctgcca ggaactgacg gatgccaccg gaagagcgtg	1380
tactggcacg tgatcggaat gggaaccacc ccagagggtgc actctatctt cctggaggga	1440
cacaccttcc tgggtcggaa ccaccggcag gccagcctgg agatcagccc aatcaccttc	1500
ctgaccgccc agacctgct gatggatctg gacagttcc tgcgtttctg ccatatcagc	1560
agccaccagc acgatggaat ggaggcctac gtgaagggtg atagctgccc agaggagcca	1620
cagctcgcca tgaagaacaa cgaggaggcc gaggattacg atgatgatct gaccgatagc	1680
gagatggatg tgggtcgggt cgtgatgat aacagcccaa gcttcatcca gatcgggagc	1740
gtggccaaga agcaccacaa gacctgggtg cactacatcg ccgccagga ggaggattgg	1800
gattacgccc cactggtgct ggcctgat gatggagct acaagagcca gtacctgaac	1860
aacggaccac agcggatcgg acggaagtac aaaaaagtgc gttcatggc ctacaccgat	1920
gagaccttca agaccggga ggccatccag cagagagcgc gaatcctggg accactgctg	1980
tacggagagg tgggagatac cctgctgato atcttcaaga accaggccag ccggccatac	2040
aacatctacc cacacggaat caccgatgtg cggccactgt acagccggcg gctgocaaag	2100
ggagtgaagc acctgaagga ttccaatc ctgccaggag agatcttcaa gtacaagtgg	2160

acagtgcagc tggaggatgg accaaccaag totgatccaa gatgcotgac cagatactac	2220
agcagotttg tgaacatgga gagagacctg gcctctggac tgattggacc actgctgac	2280
tgctacaagg agttgttggg tcagagagga aaccagatca tttctgataa gagaaatgtg	2340
atctctttct ctgtgtttga tgagaacaga agctggtacc tgacagagaa catocagaga	2400
ttcttgccaa acccagccgg agtgcagctg gaggatccag agttccaggc cagcaacatc	2460
atgcacagca tcaacggata cgtgttcgat agcctgcagc tgagcgtgtg cctgcacgag	2520
gtggcctatt ggtatatcct gagcatcgga gccagaccg atttctgag cgtgttcttc	2580
agcggataca ccttcaagca caagatggtg tacgaggata cctgaccct gttccattc	2640
tcgggagaga ccgtgttcat gagcatggag aaccaggac tgtggatcct gggatgccac	2700
aactctgatt tcagaaacag aggaatgact gccctgctga aagtgtccag ctgtgataag	2760
aacactggag attactatga ggatagctat gaggatatct ctgcctacct gctgagcaag	2820
aacaatgcca ttgagccaag aagcttcagc cagaaccac cagtgtgaa gagacaccag	2880
agagagatca ccagaaccac cctgcagtct gatcaggagg agattgatta tgatgatacc	2940
atctctgttg agatgaagaa ggaggatttt gatatctatg atgaggatga gaaccagagc	3000
ccaagaagct tcagaagaa gaccagacac tacttcatcg ctgcagtga gagactgttg	3060
gattatggaa tgagcagcag ccacacgtg ctgagaaaca gagccagag oggatctgtg	3120
ccacagttca agaagggtgt gttccaggag ttaccgatg gaagcttcac ccagccactg	3180
taccggggag agctgaacga gcacctggga ctgctgggac catacatccg ggccgagggtg	3240
gaggataaca tcatggtgac cttccggaac caggccagcc ggccatacag cttctacagc	3300
agcctgatca gctacagga ggatcagcgg caggggagccg agccacggaa gaacttcgtg	3360
aagccaaacg agaccaagac ctacttcttg aaggtgcagc accacatgac cccaaccaag	3420
gatgagttcg attgcaagc ctgggcctac ttcagcgatg tggatctgga gaaggatgtg	3480
cacagcggac tgatoggacc actgctggtg tgccacacca acacctgaa ccagccccc	3540
ggacggcagg tgacctgca ggagttogcc ctgttttca ccatcttga tgagaccaag	3600
agctggtact tcaccagaa catggagcgg aactgcccgg ccccttcaa catccagatg	3660
gaggatccaa ccttcaagga gaactaccgg ttccacgcca tcaacggata catcatggat	3720
acctgcccag gactggtgat ggcccaggat cagcggatcc ggtggtacct gctgagcatg	3780
ggaagcaacg agaacatcca cagcatccac ttcagcggac acgtgttcac cgtgcggaag	3840
aaggaggagt acaagatggc cctgtacaac ctgtaccag gagtgttga gaccgtggag	3900
atcttgccaa gcaaggccgg aatctggcgg gtggagtgc tgatcggaga gcacctgcac	3960
gccggaatga gcacctgtt cctggtgtac agcaacaagt gccagacccc actgggaatg	4020
gccagcggac acatccggga ttccagatc accgccagc gacagtacgg acagtgggac	4080
ccaaagctgg cccggctgca ctacagcga agcatcaac cctggagcac caaggagcca	4140
ttcagctgga tcaaagtgga tctgtggcc ccaatgatca tccacggaat caagaccag	4200
ggagcccgcc agaagttcag cagcctgtac atcagccagt tcatcatcat gtacagcctg	4260
gatggaaaga agtggcagac ctaccgggga aacagcaccg gaacctgat ggtgttcttc	4320
ggaacgtgg atagcagcgg aatcaagcac aacatcttca accaccaat catgcccga	4380
tacatccggc tgcaccaac ccactacagc atcagaagca ccctgcggat ggagctgatg	4440

ggatgtgato tgaacagctg ctccatgcc a ctgggaatgg agagcaaggc catcagcgat	4500
gccagatca cgcgcagcag ctacttcacc aacatgttcg ccacctggag cccaagcaag	4560
gcccggctgc acctgcaggg acggagcaac gcctggcggc cacaggtgaa taaccxaaag	4620
gagtggctgc aggtggattt ccagaagacc atgaaggta cggagtgac caccagggga	4680
gtgaagagcc tgcctgactag catgtatgtg aaggagtcc tgatcagcag cagccaggat	4740
ggacaccagt ggaccctgtt cttccagaac ggaaaggta aggtgttcca gggaaaccag	4800
gatagottca cccagtggt gaacagcctg gatccaccac tgotgaccg ataactcgg	4860
atccaccac agagctgggt gcaccagatc gccctgagaa tggaggtgt gggatgcag	4920
gccaggtatc tgtactgatg agcatgcaat aaagtctgag tggcggcag octgtgtgtg	4980
cctgggttct ctctgtccg gaatgtgaa acaatggagg tgcctgagta gataagtagc	5040
atggcgggtt aatcattaac tacaaggaa ccctagtgt ggagttggc actccctctc	5100
tgcgcgtcg ctgcctcact gaggcgggc gaccaaagg cgcgcagc cgggctttg	5160
ccggggggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagcctaa ttaacotaat tcaactggcg	5220
tcgttttaca acgtogtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaactaat cgccttgag	5280
cacatccccc tttgcgcagc tggcgttaata gcgaaggc ccgcaccgat cgccttccc	5340
aacagttgcg cagcctgaat ggcgaaagg acgcgcctg tagcggcgca ttaagcggg	5400
cgggtgtgtt ggttacgcgc agcgtgacc ctacacttg cagcgccta gcgcccgtc	5460
ctttcgcttt cttcccttc tttctcgcca cgttcgcgg ctttcccgat caagctctaa	5520
atcgggggct ccttttagg ttcgattta gtgctttac gcacctgac ccaaaaaac	5580
ttgattaggg tgatggttca cgtagtggc catcgccctg atagacggt tttcgccctt	5640
tgacgttga gtccacgttc tttaatagt gactottgtt ccaaactgga acaacactca	5700
accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttc gcctattgtt	5760
taaaaaatga gotgatttaa caaaaattt acgcgaattt taacaaaata ttaacgtta	5820
caatttaggt ggcaatttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta	5880
aatacattca aatatgtatc cgtcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata	5940
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttcgtgtc gcccttattc cttttttgc	6000
ggcattttgc cttctgttt ttgctcacc agaaacgtg gtgaaagtaa aagatgtga	6060
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	6120
tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgtatg	6180
tggcgcggtt ttatcccgtt ttgacgccg gcaagagcaa ctoggtcgcc gcatacacta	6240
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	6300
gacagtaaga gaattatgca gtgtgocat aaccatgagt gataacactg cggccaactt	6360
acttctgaca acgatcggag gacgaagga gctaaccgt tttttgcaca acatggggga	6420
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	6480
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgaacctat taactggcga	6540
actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc	6600
aggaccactt ctgcgtcgg cccttcggc tggctggtt attgtgata aatctggagc	6660

cggtgagcgt ggggtotcgc gtatcattgc agcaactggg ccagatggta agccctccg 6720
tatacgtagt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat 6780
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata 6840
tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct 6900
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttcact gagcgtcaga 6960
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt ttctgcgcg taatctgctg 7020
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccago ggtggtttgt ttgccgcatc aagagctacc 7080
aactcttttt cogaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct 7140
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc 7200
tctgctaato ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtctgttc ttaccgggtt 7260
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggtggaacgg ggggttcgtg 7320
cacacagccc agcttggagc gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagct 7380
atgagaaagc gccacgcttc cgaaggagg aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag 7440
ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag 7500
tcctgtcggg ttccgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg 7560
gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg 7620
gccttttgct cacatgttct ttctgogtt atccctgat tctgtggata accgtattac 7680
cgcttttgag tgagctgata ccgctcgcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt 7740
gagcagaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacccct ctcccgcgc gttggccgat 7800
tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgaactgaaa gggggcagt agcgcaacgc 7860
aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttcggc 7920
tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca 7980
tgattacgcc agatttaatt aagg 8004

<210> 15
<211> 7948
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 15
ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt 60
ggtgcgccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggcaa ctccatcact 120
aggggttctt ttagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactta agctacctcg 180
tgatgcgccg gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt 240
agttttccat ctactcaac atcctccag tggaaattct gacacaggac gctgtggtt 300
ctgagccagg gggcgactca gatccagcc agtggactta gccctgttt gctcctcoga 360
taactggggt gaccttggtt aatattcacc agcagcctcc ccggtggcc ctctggatcc 420
actgcttaaa tacggagag gacagggcc tgtctctca gttcaggca ccaccactga 480
cctgggacag tgaatagcgg ccgccaccat gcagatcgag ctgagcaact gotttctct 540
gtgcctgctg cggttctgct tctccgcac ccggcggtac tacctgggag cgtggagct 600

gagctgggat tacatgcaga gcgatctggg agagctgcc a gtggatgcc ggttcccacc	660
acgggtgcc aagagcttcc cattcaaac cagcgtggtg tacaagaaga ccctgttctg	720
ggagttcacc gatcacctgt tcaacatcgc caagccacgg ccaccctgga tgggactgct	780
gggaccaacc atccaggccg aggtgtacga tacctgtgtg atcacctga agaaccatggc	840
ctctcatcct gtgtccctgc acgcctggg agtgagctac tgggaaggcca gcgaggggagc	900
cgagtacgat gatcagacca gccagcggga gaaggaggat gataaggtgt tcccaggagg	960
aagccacacc tacgtgtggc aggtgtctgaa ggagaacgga ccaatggcca gcgatccact	1020
gtgcctgacc tacagctacc tgagccacgt ggatctggtg aaggatctga acagcggact	1080
gatcggagcc ctgtctgtgt gccgggaggg aagcctggcc aaggagaaga ccagaccct	1140
gcacaagtto atcctgtgtg tcgccgtgtt cgatgaggg aagagctggc acagcgagac	1200
caagaacagc ctgatgcagg atcgggatgc cgcagcggc cgggcctggc caaagatgca	1260
caccctgaac ggatactga accggagcct gccaggactg atcggatgcc accggaagag	1320
cgtgtactgg cacgtgatcg gaatgggaac caccacagag gtgcactcta tcttctgga	1380
gggacacacc tttctgtgac ggaaccaccg gcaggccagc ctggagatca gcccaatcac	1440
cttctgacc gccacagacc tctgtatgga tctgggacag ttctgtgtgt tctgccatat	1500
cagcagccac cagcacgatg gaatggaggc ctacgtgaag gtggatagct gccagagga	1560
gccacagctg cggatgaaga acaacgagga ggccgaggat tacgatgatg atctgaccga	1620
tagcgagatg gatgtgtgac ggttcgatga tgataacagc ccaagcttca tccagatccg	1680
gagcgtggcc aagaagcacc caaagacctg ggtgcactac atgcgcgcg agggaggagga	1740
ttgggattac gcccactgg tctgtggccc tgatgatogg agctacaaga gccagtacct	1800
gaacaacgga ccacagcgga tcggacggaa gtacaaaaa gtgcggttca tggcctacac	1860
cgatgagacc ttcaagacc gggaggccat ccagcacgag agcgggaatcc tgggaccact	1920
gctgtacgga gaggtgggag ataccctgtg gatcatcttc aagaaccagg ccagccggcc	1980
atacaacatc taccacacg gaatcaccga tgtgcggcca ctgtacagcc ggccgctgcc	2040
aaaggagtg aagcacctga aggtttccc aatcctgcca ggagagatct tcaagtacaa	2100
gtggacagt acagtggagg atggaccaac caagtctgat ccaagatgcc tgaccagata	2160
ctacagcagc tttgtgaaca tggagagaga cctggcctct ggactgattg gaccactgct	2220
gatctgtac aaggagtctg tggatcagag aggaaccag atcatgtctg ataagagaaa	2280
tgtgatcctg ttctctgtgt ttgatgagaa cagaagctgg tacctgacag agaaccatca	2340
gagattcctg ccaaacccag ccggagtga gctggaggat ccagagttcc aggccagcaa	2400
catcatgcac agcatcaacg gatactgtt cgatagcctg cagctgagcg tgtgcctgca	2460
cgaggtggcc tatttggtata tcttgagcat cggagcccag accgatttcc tgagcgtgtt	2520
cttcagcgga tacaccttca agcacaagat ggtgtacgag gataccctga ccctgttccc	2580
attctccgga gagaccgtgt tcatgagcat ggagaaccca ggactgtgga tcttgggatg	2640
ccacaactct gatttcagaa acagaggaat gactgccctg ctgaaagtgt ccagctgtga	2700
taagaacct ggagattact atgaggatag ctatgaggat atctctgcct acctgtgag	2760
caagaacaat gccattgagc caagaagctt cagccagaac ccaccagtgc tgaagagaca	2820

ccagagagag atcaccagaa ccccccgtga gtctgatcag gaggagattg attatgatga	2880
taccatctct gtggagatga agaaggagga ttttcatatc tatgatgagg atgagaacca	2940
gagcccaaga agcttcacga agaagaccag acactacttc atcgtctgag tggagagact	3000
gtgggattat ggaatgagca gcagcccaca cgtgctgaga aacagagccc agagcggatc	3060
tgtgccacag ttcaagaagg tgggtttcca ggagttcacc gatggaagct tcaccagcc	3120
actgtaccgg ggagagctga acgagcacct gggactgctg ggaccataca tccgggccga	3180
ggtggaggat aacatcatgg tgaccttccg gaaccaggcc agccggccat acagcttcta	3240
cagcagcctg atcagctacg aggaggatca gcggcaggga gccgagccac ggaagaactt	3300
cgtgaagcca aacgagacca agacctactt ctggaagggt cagcaccaca tggccccaac	3360
caaggatgag ttcatgtga aggcctgggc ctacttcagc gatgtggatc tggagaagga	3420
tgtgcacagc ggactgatcg gacctgtgt ggtgtgccac accaacacc tgaaccagc	3480
ccacggacgg caggtgaccg tgcaggagtt cgcctgttc ttaccatct tcgatgagac	3540
caagagctgg tacttcaccg agaactgga gcggaactgc cgggcccctt gcaacatcca	3600
gatggaggat ccaaccttca aggagaacta ccggttcac gccatcaacg gatacatcat	3660
ggataccctg ccaggactgg tgatggccca ggatcagcgg atccggtggt acctgtgag	3720
catgggaagc aacgagaaca tccacagcat ccacttcagc ggacacgtgt tcaccgtcg	3780
gaagaaggag gattacaaga tggccctgta caacctgtac ccaggagtgt tcgagaccgt	3840
ggagatgctg ccaagcaagg ccggaatctg gcgggtggag tgccgtatcg gagagcacct	3900
gcacgccgga atgagcacc ttgtcctggt gtacagcaac aagtgcaga cccactggg	3960
aatggccagc ggacacatcc gggatttcca gatcaccgcc agcggacagt acggacagt	4020
ggccccaag ctggcccggc tgcactacag cgggaagcgc aacgcctgga gcaccaagga	4080
gccattcagc tggatcaaag tggatctgtt ggcccaatg atcatccag gaatcaagac	4140
ccaggagacc cggcagaagt tcagcagcct gtacatcagc cagttcatca tcatgtacag	4200
cctggatgga aagaagtggc agacctaccg gggaaacagc accggaacc tgatggtgtt	4260
cttcggaaac gtgtagatga gcggaatcaa gcacaacatc ttcaaccac caatcatgc	4320
ccgatacatc cggctgcacc caaccacta cagcatcaga agcacctgc gtagggagct	4380
gatgggatgt gatctgaaca gctgtccat gccactggga atggagagca aggccatcag	4440
cgatgccag atcaccgcca gcagctactt caccaacatg ttgccacct ggagcccaag	4500
caaggcccg ctgcacctgc agggacggag caacgcctgg cggccacagg tgaataacc	4560
aaaggagtgg ctgcagtggt atttcagaa gacctgaag gtgaccggag tgaccacca	4620
gggagtgaag agcctgtga ctagcatgta tgtgaaggag ttctgatca gcagcagcca	4680
ggatggacac cagtggacc ttgtcttcca gaacggaaag gtgaagggt tccagggaaa	4740
ccaggatagc ttaccccag tggtaacag cctggatcca ccactgtga cccgatacct	4800
gcggatccac ccacagagct ggtgaccca gatcgccctg agaatggagg tgctgggatg	4860
cgaggccag gatctgtact gatgagcatg caataaagtc tgagtggcg gcagcctgtg	4920
tgtgcctggg ttctctctgt cccggaatgt gcaaacatg gaggtgctcg agtagataag	4980
tagcatggcg ggttaatcat taactacaag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc	5040
ttcttgcgct ctgctcgtc cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgccg acgcccgggc	5100

tttgcgggg cgccctcagt gagcgagcga ggcgcagcc ttaattaacc taattcactg	5160
gcgctggtt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatgcctt	5220
gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag agggccgcac cgatgcctt	5280
tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc	5340
gcggcgggtg tgggtgttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc	5400
gctcctttcg cttctttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggttttcc cgtcaagct	5460
ctaaatcggg ggtccctttt agggttccga tttagtctt tacggcacct cgaacccaaa	5520
aaacttgatt aggggtgtagg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc	5580
cctttgacgt tggagtccac gtcttttaat agtggactct tgttccaaac tggacaaca	5640
ctcaacccta tctcgttcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttggccctat	5700
tggttaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg	5760
cttacaattt aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aacctctatt tgtttatttt	5820
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata acctgataa atgttcaat	5880
aatattgaaa aaggaagagt atgagtatto aacatttcgc tctgcctt attcctttt	5940
ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgcgc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	6000
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	6060
tccttgagag ttttcgccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcatttt aaagttctgc	6120
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgtt cgcgcatac	6180
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	6240
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgc ccataacct gatgataac actcggcca	6300
acttacttct gacaacgato ggaggacoga aggagctaac cgttttttg cacaacatgg	6360
gggatcatgt aactgcctt gatcgttggg aacgggagct gaatgaagcc ataccaaacg	6420
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	6480
gcgaactact tactotagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	6540
ttgcaggacc acttotgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	6600
gagccggtga gogtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	6660
cccgatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatagac	6720
agatcgtga gataggtgcc tcactgatta agcatggta actgtcagac caagtttact	6780
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggato taggtgaaga	6840
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	6900
cagaccccg agaaaagato aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	6960
gctgcttga aacaaaaaaa ccacgcctac cagcgtggtt ttgtttgcc gatcaagagc	7020
taccaactct ttttccgaag gtaactggtt tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	7080
ttctagtga gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	7140
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	7200
ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggtga acggggggtt	7260
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	7320

agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggg ggacagggtat ccgtaagcg	7380
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatott	7440
atagtctgtg cgggttttgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	7500
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt	7560
gctggccttt tgctcacatg ttotttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	7620
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	7680
cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	7740
cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt ttcccagctg gaaagcgggc agtgagcgca	7800
acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc	7860
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	7920
accatgatta cgcagattt aattaagg	7948

<210> 16
 <211> 8032
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 構築の序列

<400> 16	
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt	60
ggtcgcggg cctcagtgag cgcgcgagcg cgcagagagg gagggccaa ctccatcact	120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctactta agctacctcg	180
tgatcggcgc gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgaag ggtcatcagt	240
agttttccat ctactcaac atctcccag tgaggttaat ttttaactg tttgctctgg	300
ttaataatct caggaggta atttttaaac tgtttctct gtttaataat ctcagggaat	360
tctggacaca ggacgctgtg gtttctgago cagggggcga ctacagatccc agccagtga	420
cttagccctt gtttctcct ccgataactg gggtagacct ggttaatatt caccagcagc	480
ctccccggtt gccctcttgg atocactgtt taaatacggc cgcagacagg gccctgtctc	540
ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaata gcggccgcc ccatgcagat	600
cgcagctgagc acctgcttct tctgtgcct gctcgggttc tgcttctccg ccaccggcg	660
gtactacctg ggagccgttg agctgagctg ggattacatg cagagcgatc tgggagagct	720
gccagtggat gcccggttcc caccacgggt gccaaagagc ttccattca acaccagcgt	780
ggtgtacaag aagacctgtt tctgtggagt caccgatcac ctgttcaaca tcgccaagcc	840
acggccaccc tggatgggac tgctgggacc aacctccag gccgaggtgt acgataccgt	900
ggtgatcacc ctgaagaaca tggcctctca tctgtgtcc ctgcacgcc tgggagtga	960
ctactggaag gccagcgagg gagccagta cgatgatcag accagccagc gggagaagga	1020
ggatgataag gtgttccag gaggaagcca cacctacgtg tggcagggtc tgaaggagaa	1080
cggaccaatg gccagcgatc cactgtgcct gacctacagc tacctgagcc acgtggatct	1140
ggtgaaggat ctgaacagcg gactgatcgg agccctgctg gtgtgccggg agggaagcct	1200
ggccaaggag aagaccaga cctgcacaa gttcatcctg ctgttcgccg tgttcgatga	1260
gggaaagagc tggcacagcg agaccaagaa cagcctgatg caggatcggg atgccgccag	1320

cgccccgggcc tggccaaaga tgcacaccgt gaacggatac gtgaaccgga gcctgccagg	1380
actgatcgga tggcaccgga agagcgtgta ctggcacgtg atcggaatgg gaaccacccc	1440
agaggtgcac totatcttcc tggagggaca cacccttctg gtgggaacc accggcaggc	1500
cagcctggag atcagcccaa tcaccttcct gaccgccag accctgctga tggatctggg	1560
acagttcctg ctgttctgcc atatcagcag ccaccagcac gatggaatgg aggccctacgt	1620
gaaggtggat agctgccag aggagccaca gctgcggatg aagaacaacg aggaggccga	1680
ggattacgat gatgatctga cggatagcga gatggatgtg gtgcggttcg atgatgataa	1740
cagcccaagc ttcatccaga tccggagcgt ggccaagaag cacccaaaga cctgggtgca	1800
ctacatgcc gccgaggagg aggattggga ttacgcccc ctggtgctgg cccctgatga	1860
tggagctac aagagccagt acctgaacaa cggaccacag cggatcggac ggaagtacaa	1920
aaaagtgcgg ttcatggcct acaccgatga gacctcaag acccgggagg ccatccagca	1980
cgagagcgga atcctgggac cactgtgtga cggagagggt ggagataccc tgctgatcat	2040
cttcaagaac caggccagcc ggccatacaa catctacca caccgaatca ccgatgtgcg	2100
gccactgtac agccggcggc tgccaaaggg agtgaagcac ctgaaggatt tcccaatcct	2160
gccaggagag atcttcaagt acaaggagc agtgacagtg gaggatggac caaccaagtc	2220
tgatccaaga tgctgacca gatactacag cagctttgtg aacatggaga gagacctggc	2280
ctotggactg attggaccac tgotgatctg ctacaaggag totgtggatc agagaggaaa	2340
ccagatcatg tctgataaga gaaatgtgat cctgtttctt gtgtttgatg agaacagaag	2400
ctggtacctg acagagaaca tccagagatt cctgccaaac ccagccggag tgcagctgga	2460
ggatccagag ttccaggcca gcaacatcat gcacagcatc aacggatacg tgttcgatag	2520
cctgcagctg agcgtgtgcc tgcacgaggt ggcctattgg tatatcctga gcacggagc	2580
ccagaccgat ttcttgagcg tgtttctcag cggatacacc ttcaagcaca agatggtgta	2640
cgaggatacc ctgacctgt tccattctc cggagagacc gtgttcata gcatggagaa	2700
cccaggactg tggatcctgg gatgccacaa ctctgatttc agaaacagag gaatgaactgc	2760
cctgctgaaa gtgtccagct gtgataagaa cactggagat tactatgagg atagctatga	2820
ggatactctt gacctctgc tgagcaagaa caatgccatt gagccaagaa gcttcagcca	2880
gaaccacca gtgtgaaga gacaccagag agagatcacc agaaccacc tgcagtctga	2940
tcaggaggag attgattatg atgataccat ctctgtggag atgaagaagg aggattttga	3000
tatctatgat gaggatgaga accagagccc aagaagcttc cagaagaaga ccagacacta	3060
cttcatcgct gcagtggaga gactgtggga ttatggaatg agcagcagcc cacacgtgct	3120
gagaaacaga gccagagcg gatctgtgcc acagttcaag aagggtggtg tccaggagtt	3180
caccgatgga agcttcaccc agccactgta ccggggagag ctgaacgagc acctgggact	3240
gctgggacca tacatccggg ccgagggtgga ggataacatc atggtgacct tccggaacca	3300
ggccagccgg ccatacagct tctacagcag cctgatcagc tacgaggagg atcagcggca	3360
gggagccgag ccacggaaga acttctgtaa gccaaacgag accaagacct acttctggaa	3420
ggtgcagcac cacatggccc caaccaagga tgagttcgat tgcaaggcct gggcctactt	3480
cagcgatgtg gatctggaga aggatgtgca cagcggaact atcggaccac tgctggtgtg	3540

ccacaccaac accotgaacc cagcccacgg acggcaggtg accgtgcagg agttcgcct	3600
gtttttcacc atcttcgatg agaccaagag ctggtacttc accgagaaca tggagcggaa	3660
ctgccggggc ccttgcaaca tccagatgga ggatccaacc ttcaaggaga actaccggtt	3720
ccacgccatc aacggataca tcatggatag cctgccagga ctggtgatgg cccaggatca	3780
gcggatccgg tggtaacctg tgagcatggg aagcaacgag aacatccaca gcatccactt	3840
cagcggacac gtgttcaccg tgcggaagaa ggaggagtag aagatggccc tgtacaacct	3900
gtaccagga gtgttcgaga ccgtggagat gctgccaagc aaggccggaa tctggcgggt	3960
ggagtgcctg atcggagagc acctgcacgc cggaatgagc accctgttcc tgggtacag	4020
caacaagtgc cagaccocac tgggaatggc cagcggacac atccgggatt tccagatcac	4080
cgcagcggga cagtacggac agtggggccc aaagtggcc cggctgcact acagcgggag	4140
catcaacgcc tggagcacca aggagccatt cagctggatc aaagtggatc tgcggggccc	4200
aatgatcatc cacggaatca agaccaggg agcccggcag aagttcagca gcctgtacat	4260
cagccagttc atcatcatgt acagcctgga tggaaagaag tggcagacct accggggaaa	4320
cagcaccgga accctgatgg tgtttctcgg aaacgtggat agcagcggaa tcaagcacia	4380
catcttcaac ccaccaatca tgcgccgata catccggctg caccacaacc actacagcat	4440
cagaagcacc ctgcggatgg agctgatggg atgtgatctg aacagctgct ccatgccact	4500
gggaatggag agcaaggcca tcagcgatgc ccagatcacc gccagcagct acttcaccaa	4560
catgttcgcc acctggagcc caagcaaggc cggctgcac ctgcagggac ggagcaacgc	4620
ctggcggcca caggtgaata acccaaagga gtggctgcag gtggatttcc agaagaccat	4680
gaagtgacc ggagtacca cccaggaggt gaagagcctg ctgactagca tgtatgtgaa	4740
ggagttcctg atcagcagca gccaggatgg acaccagtgg accctgttct tccagaacgg	4800
aaagtgtaag gtgttcagg gaaaccagga tagcttcacc ccagtgtga acagcctgga	4860
tccaccactg ctgaccgat acctgcggat ccaccacag agctgggtgc accagatcgc	4920
cctgagaatg gaggtgctgg gatcgagggc ccaggatctg tactgatgag catgcaataa	4980
agtctgagtg ggcggcagcc tgtgtgtgcc tgggttctct ctgtccgga atgtgcaaac	5040
aatggagtg ctgagtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta caaggaaacc	5100
ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgtcactga ggcggggcga	5160
ccaaaggctg cccgacgcc gggctttgcc cgggcggcct cagtgcgca gcgagcgcgc	5220
agccttaatt aacctaatc actggccgtc gttttacaac gtctgactg ggaaaacct	5280
ggcgttaccc aacttaatg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc	5340
gaagaggccc gcaccgatg ccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatgggac	5400
gcgccctgta gcggcgcat aagcggcg gcgtgtgttg ttacgcgag cgtgaccgt	5460
acacttgcca gcgccctagc gccgcctcct ttgccttct tcccttcctt tctgccacg	5520
ttgcgggct tccccgtca agctctaat cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt	5580
gttttacggc acctgcaccc caaaaaactt gattagggtg atggttcacg tagtgggcca	5640
tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg acgttggagt ccacgttctt taatagtga	5700
ctcttgttcc aaactggaac aacctcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa	5760
gggattttgc cgatttcggc ctattgtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	5820

gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttaggtgg cacttttcgg ggaatgtgc	5880
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac	5940
aataacccctg ataatagttt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt	6000
tcctgtgtcg ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag	6060
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg	6120
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa	6180
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtatt gacgcgggco	6240
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga ctgtgttgag tactcaccag	6300
tcacagaaaa gcatottacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa	6360
ccatgagtga taacactcgc gccaaactta ttctgacaac gatcggagga cgaaggagc	6420
taaccgcttt ttgcacaaac atgggggcat atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg	6480
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa	6540
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa	6600
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg	6660
gtgtgtttat tgctgataaa totggagcgc gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag	6720
cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg	6780
caactatgga tgaacgaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt	6840
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt	6900
aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac	6960
gtgagtttcc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag	7020
atcctttttt tctgcgcgta atctgtctgt tgcaacaaa aaaaccacgc ctaccagcgg	7080
tggtttgttt gccgcatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaagtaact ggcttcagca	7140
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac caattcaaga	7200
actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca	7260
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc	7320
agcgtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag ctggagcga acgacctaca	7380
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cagccttccc gaaggagaa	7440
aggcggacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc	7500
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc	7560
gtcgattttt gtgatgtctg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg	7620
cctttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat	7680
ccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagt agctgatacc gctcgcgca	7740
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcatga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca	7800
aaaccgctct ccccgcgctg tggcggatto attaatgcag ctggcagcag aggtttcccg	7860
actggaaagc gggcagttag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac	7920
cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac	7980
aatttcacac aggaacagc tatgacctg attacccag atttaattaa gg	8032

<210> 17
<211> 738
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> AAVhu. 37 衣殼

<400> 17

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
180 185 190

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Thr Asn Thr Gly
580 585 590

Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

- <210> 18
- <211> 738
- <212> PRT
- <213> 未知
- <220>
- <223> AAVrh.10 衣殼
- <400> 18

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
180 185 190

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
260 265 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540
 Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
 580 585 590
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
 610 615 620
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
 625 630 635 640
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 650 655
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
 660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp
705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 19
<211> 4371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 構築の序列

<400> 19
atgcagatcg agctgtctac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggttctg cttcagcgcc 60
accagaoggt actatctggg cgccgtggaa ctgagctggg actacatgca gagcgacctg 120
ggcgagctgc cgttggaagg cagattccct ccaagagtgc ccaagagctt ccccttcaac 180
acctccgtgg tgtacaagaa aacctgttgc gtggaattca ccgaccacct gttcaatatc 240
gccaaagccc gacccccctg gatgggcctg ctgggacctc caattcaggo cgagggtgtac 300
gacacgctcg tgatcacctc gaagaacatg gccagccacc ccgtgtctct gcacgcctg 360
ggagtgtcct actggaaggc ctctgagggc gccgagtagc acgatcagac cagccagcgc 420
gagaaagagg acgacaaggt gtccctggtc ggcagccaca cctacgtgtg gcagggtctg 480
aaagaaaacg gcccctatggc ctccgacctc ctgtgcctga catacagcta cctgagccac 540
gtggacctcg tgaaggacct gaacagcggc ctgatcggag ccctgtctgt gtgtagagag 600
ggcagcctgg ccaaagagaa aaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gttcgcctg 660
ttcgacgagg gcaagagctg gcacagcgag acaaagaaca gcctgatgca ggaccgggac 720
gccgcctctg ctagagcctg gcccaaatg cacacgtga acggctacgt gaacagaagc 780
ctgcccgga ctagcggctg ccaccggaag tctgtgtact ggcacgtgat cggcatgggc 840
accaccctg aggtgcacag catctttctg gaaggacaca cctttctgt gcggaaccac 900
cggcaggcca gcctggaaat cagccctatc accttctga ccgccagac actgctgatg 960
gacctgggcc agttttctgt gttctgccac atcagctccc accagcacga cggcatggaa 1020
gcctacgtga aggtggacag ctgcccggag gaacccagc tgcggatgaa gaacaacgag 1080
gaagccgagg actacacga cgacctgacc gacagcgaga tggacgtggt gcgcttcgac 1140
gacgataaca gcccagctt catccagatc agaagcgtgg ccaagaagca cccaagacc 1200
tggtgtcact atatgcgcgc cgaggaagag gactgggatt acgcccctct ggtgtgtggc 1260
cccgacgaca gaagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gccccagcg gatcgccgg 1320

aagtataaga aagtgcgggtt catggcctac accgacgaga cattcaagac cagagaggcc	1380
atccagcacg agagcggcat cctgggccct ctgtgtatg gcgaagtggg cgacacoctg	1440
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcaga ccctacaaca tctacctca cggcatcacc	1500
gacgtgcggc cctgtactc tagaaggctg cccaaggcgg tgaacacct gaaggacttc	1560
cccattctgc ccggcgagat ctccaagtac aagtggaccg tgaccgtgga agatggcccc	1620
accaagagcg accccagatg cctgacacgg tactatagca gcttcgtgaa catggaacgg	1680
gaacctggcct ccggcctgat tggccactg ctgattctgt acaaagaaag cgtggaccag	1740
cggggcaacc agatcatgag cgacaagcgg aacgtgatcc tgtttagcgt gttogatgag	1800
aaaccggtcct ggtatctgac cgagaatata cagcggttcc tgccaaccc tgccggcgtg	1860
cagctggaag atcctgagtt ccaggcctcc aacatcatgc actccatcaa tggctatgtg	1920
ttcgacagcc tgcagctgag cgtgtgcctg caccagggtg cctactggta catcctgagc	1980
atcggggccc agaccgactt cctgtccgtg ttcttctccg gctacacctt caagcacaag	2040
atggtgtacg aggataccct gacctgttc ccttttagcg gcgaaaccgt gttcatgagc	2100
atggaaaacc ccggcctgtg gatcctgggo tgccacaaca gcgaacttcg gaacagaggc	2160
atgaccgccc tgctgaagg ttcagctgc gacaagaaca ccggcgacta ctacgaggac	2220
agctatgagg acatcagcgc ctacctgctg agcaagaaca acccatcga gcccagaagc	2280
ttcagccaga acccccccgt gctgaagcgg caccagagag agatacccg gaccacctg	2340
cagtcggacc aggaagagat cgattacgac gacaccatca gcgtggaaat gaagaaagaa	2400
gatttgcaca tctaogacga ggacgagaac cagagcccc ggtcctttca gaaaaagacc	2460
cggcactact tcattgcgcg tgtggaacgg ctgtgggact acggcatgag cagcagccct	2520
cacgtgctga gaaacagggc ccagagcggc agcgtgccc agttcaagaa agtgggttgc	2580
caggaattca cagacggcag ctccaccag cctctgtacc gcggcgagct gaacgagcac	2640
ctgggactgc tggggcccta tatcagagcc gaagtggag ataacatcat ggtcaccttc	2700
cggaatcagg cctcccgcc ctacagcttc tacagctccc tgatcagcta cgaagaggac	2760
cagagacagg gcgctgagcc ccggaagaac ttctgtaagc ccaacagagac taagacctac	2820
ttttggaagg tgcagacca catggcccct acaaaggacg agttcgactg caaggcctgg	2880
gcctacttct ccgacgtgga cctggaaaag gacgtgcact ctgggctgat cggccccctg	2940
ctcgtgtgcc acaccaacac cctgaatccc gccacggca gacaggtgac agtgcaggaa	3000
ttcgccctgt tcttcacct cttcgacgaa acaaagagct ggtacttcac cgaaaacatg	3060
gaaagaaact gccgggtcc ctgcaacatc cagatggaag atccacctt caaagagAAC	3120
taccggttc acccatcaa cggctacatc atggacacac tgcccgccct cgtgatggct	3180
caggatcagc ggatccggtg gtatctgctg tccatgggct ccaacgagaa catccacagc	3240
atccacttca gcggccactg gttcacogtg cggaaaaaag aagagtacaa aatggccctg	3300
tacaacctgt accctggggt gttogagaca gtggaaatgc tgccagcaa ggccggcatc	3360
tggcgggtgg agtgtctgat ccggcagcac ctgcacgtg ggatgagcac actgtttctg	3420
gtgtacagca acaagtcca gacacctctg ggcattggct ctggccacat ccgggacttt	3480
cagatcacag ccagcggcca gtacggccag tgggccccaa aactggccag actgcactac	3540
agcggcagca tcaacgcctg gtccacaaa gagcccttca gctggatcaa ggtggacotg	3600

ctggctocca tgatcatcca cggaatcaag acccagggcg ccagacagaa gttcagcago 3660
ctgtacatca gccagtcat catcatgtac agcctggacg gcaagaagtg gcagacctac 3720
cggggcaata gcaccggcac cctgatgtg ttcttcggca acgtggactc cagcggcatt 3780
aagcacaaca tcttcaaccc ccccatcatt gcccggtaca tccggctgca ccccaaccac 3840
tacagcatcc ggtccaccct gagaatggaa ctgatgggct gcgacctgaa ctctgtctcc 3900
atgcccttgg ggatggaaag caaggccatc tccgacgcc agatcacgcg ctccagctac 3960
ttaccaaca tgttcgccac ctggtcccca tccaaggccc ggctgcacct gcagggcaga 4020
agcaatgctt ggaggcctca ggtgaacaac cccaagagt ggctgcaggt ggacttccag 4080
aaaacctga aagtaccgg cgtgaccacc cagggcgtga agtctctgt gacctctatg 4140
tacgtgaaag agttctgtat ctccagcagc caggacggcc accagtggac cctgtttttc 4200
cagaacggca aagtgaagt gtttcagggg aaccaggact ccttcacccc cgtcgtgaat 4260
agcctggacc ctccactgt gaccagatac ctgcggatcc accctcagag ttgggtgcac 4320
cagattgtct tgcggatgga agtctgtgga tgcgaggccc aggacctgta c 4371

<210> 20
<211> 736
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> AAV3B 衣殼

<400> 20

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly

145	150	155	160
Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr	165	170	175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro	180	185	190
Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly	195	200	205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser	210	215	220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile	225	230	235
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu	245	250	255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr	260	265	270
Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His	275	280	285
Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp	290	295	300
Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val	305	310	315
Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu	325	330	335
Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr	340	345	350
Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp	355	360	365
Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser	370	375	380
Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser	385	390	395
Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu	405	410	415
Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg	420	425	430
Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr	435	440	445

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser
 450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn
 485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn
 500 505 510

Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
 530 535 540

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln
 565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
 580 585 590

Thr Arg Thr Val Asn Asp Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700

Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val
 705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

申請專利範圍

1. 一種有用於 A 型血友病之肝臟導向治療劑之重組腺相關病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV), 該 rAAV 包含 AAV 衣殼、及包裝於其中的載體基因體, 該載體基因體包含:
 - (a) AAV 5' 反向末端重複(inverted terminal repeat, ITR)序列;
 - (b) 選自 En34 增強子、ABPS 增強子、轉甲狀腺素蛋白增強子(enTTR)、及其組合的增強子;
 - (c) 選自 TBG-S1 啟動子、A1AT 啟動子、及轉甲狀腺素蛋白(TTR)啟動子的肝臟特異性啟動子;
 - (d) 編碼具有凝血功能的人類因子 VIII 的編碼序列; 及
 - (e) AAV 3' ITR 序列;其中該編碼序列包含 SEQ ID NO: 2 所呈現的核苷酸序列。
2. 如請求項 1 之 rAAV, 其中該轉甲狀腺素蛋白啟動子包含 SEQ ID NO: 7 所呈現的核苷酸序列。
3. 如請求項 1 之 rAAV, 其中 AAV 衣殼為 hu37 衣殼。
4. 如請求項 1 之 rAAV, 其中 AAV 5' ITR 序列及/或 AAV 3' ITR 序列係來自 AAV2。
5. 如請求項 1 之 rAAV, 其中該 enTTR 包含 SEQ ID NO: 5 所呈現的核苷酸序列。
6. 如請求項 1 之 rAAV, 其中該載體基因體進一步包含多腺苷酸(polyA)序列。

- 7.如請求項 6 之 rAAV，其中該多腺苷酸序列包含 SEQ ID NO：10 所呈現的核苷酸序列。
- 8.如請求項 1 之 rAAV，其中該載體基因體的大小為約 5 千鹼基至約 5.5 千鹼基。
- 9.如請求項 1 之 rAAV，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：13 所呈現的核苷酸序列之 nt 1-5110。
- 10.如請求項 1 至 9 中任一項之 rAAV，其用於治療具有 A 型血友病之患者，其中該 rAAV 係以約 1×10^{12} 至約 1×10^{14} 個基因體拷貝數(genome copies, GC)/kg 之水性懸浮液被遞送至患者。
- 11.如請求項 10 之 rAAV，其中該 rAAV 係於之後的時間點被再次投予。
- 12.一種適合投予至 A 型血友病患者之水性懸浮液，該懸浮液包含約 1×10^{12} 拷貝數(GC)/mL 至約 1×10^{14} GC/mL 之如請求項 1 至 10 中任一項之 rAAV。
- 13.如請求項 12 之水性懸浮液，其中該懸浮液係適合靜脈注射。
- 14.如請求項 12 之水性懸浮液，其中該懸浮液進一步包含界面活性劑、防腐劑、及/或緩衝液。
- 15.如請求項 1 之 rAAV，其中
該增強子為 enTTR 且包含 SEQ ID NO：5 所呈現的核苷酸序列；且
該肝臟特異性啟動子為 TTR 啟動子且包含 SEQ ID NO：7 所呈現的核苷酸序列。

- 16.如請求項 15 之 rAAV，其中該 AAV 5'ITR 序列包含 SEQ ID NO：11 所呈現的核苷酸序列且該 AAV 3'ITR 序列包含 SEQ ID NO：12 所呈現的核苷酸序列。
- 17.如請求項 15 之 rAAV，其中該載體基因體進一步包含 polyA 序列。
- 18.如請求項 17 之 rAAV，其中該 polyA 序列包含 SEQ ID NO：10 所呈現的核苷酸序列。
- 19.如請求項 15 之 rAAV，其中該 AAV 衣殼為 hu37 衣殼。

圖式

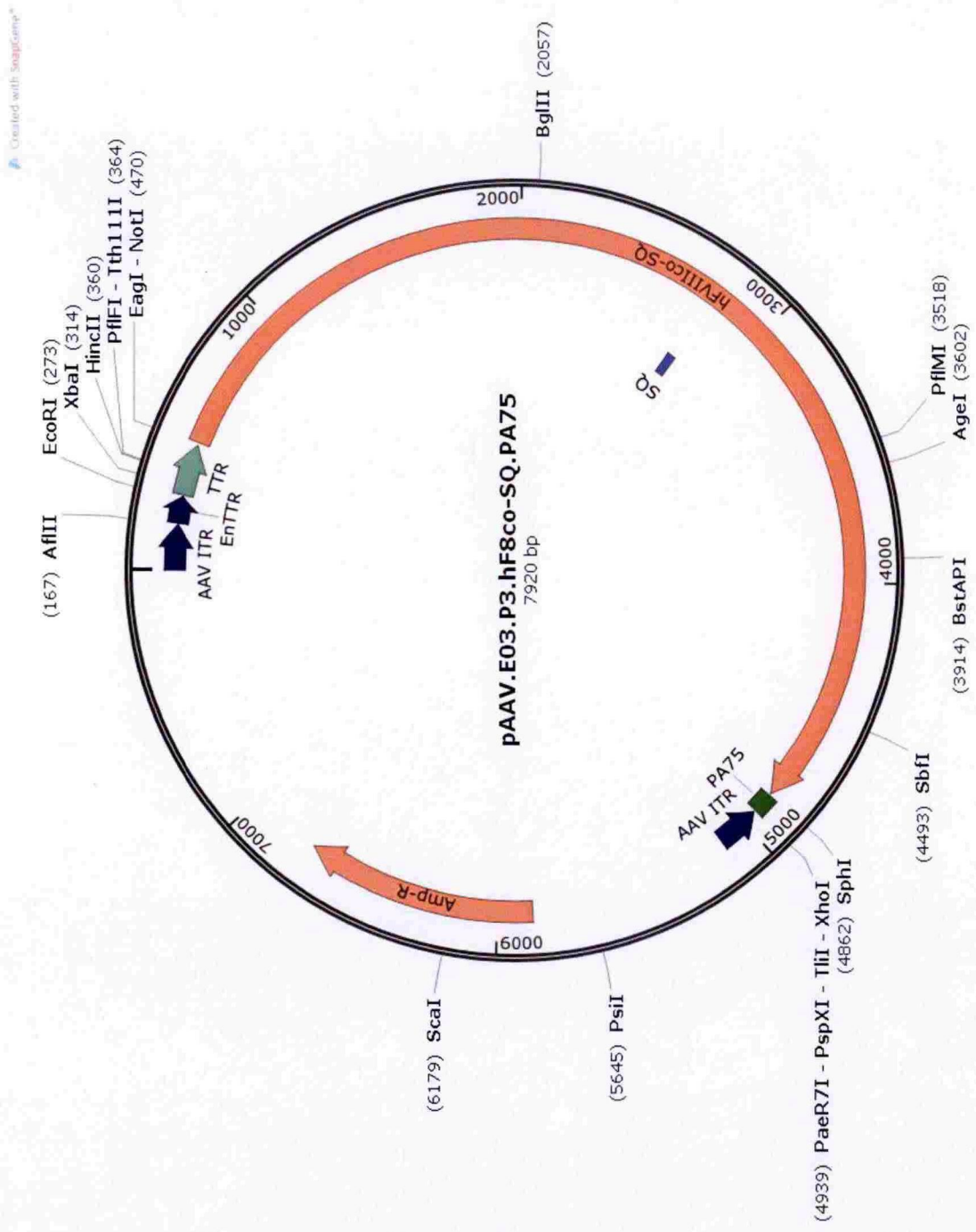


圖 1

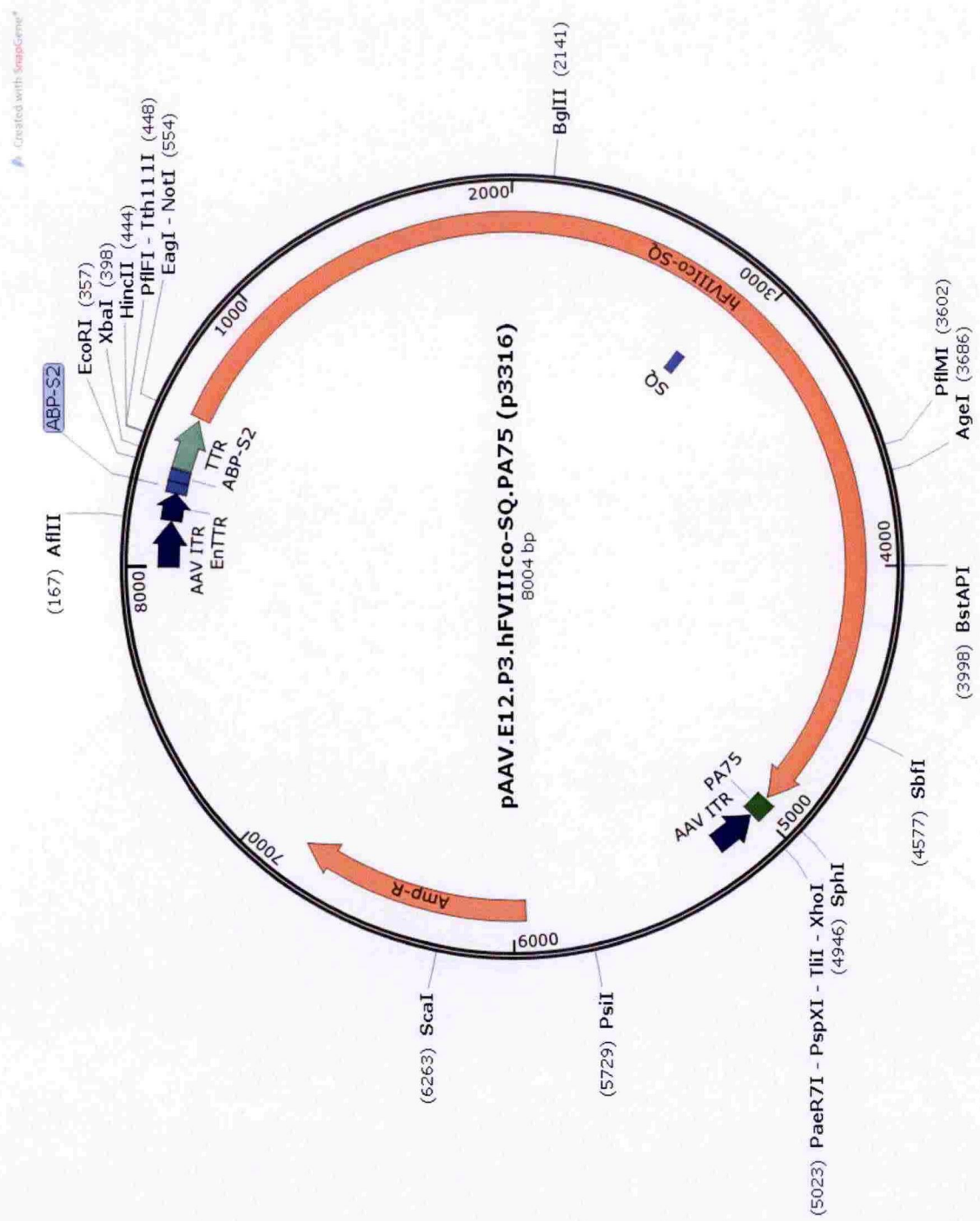
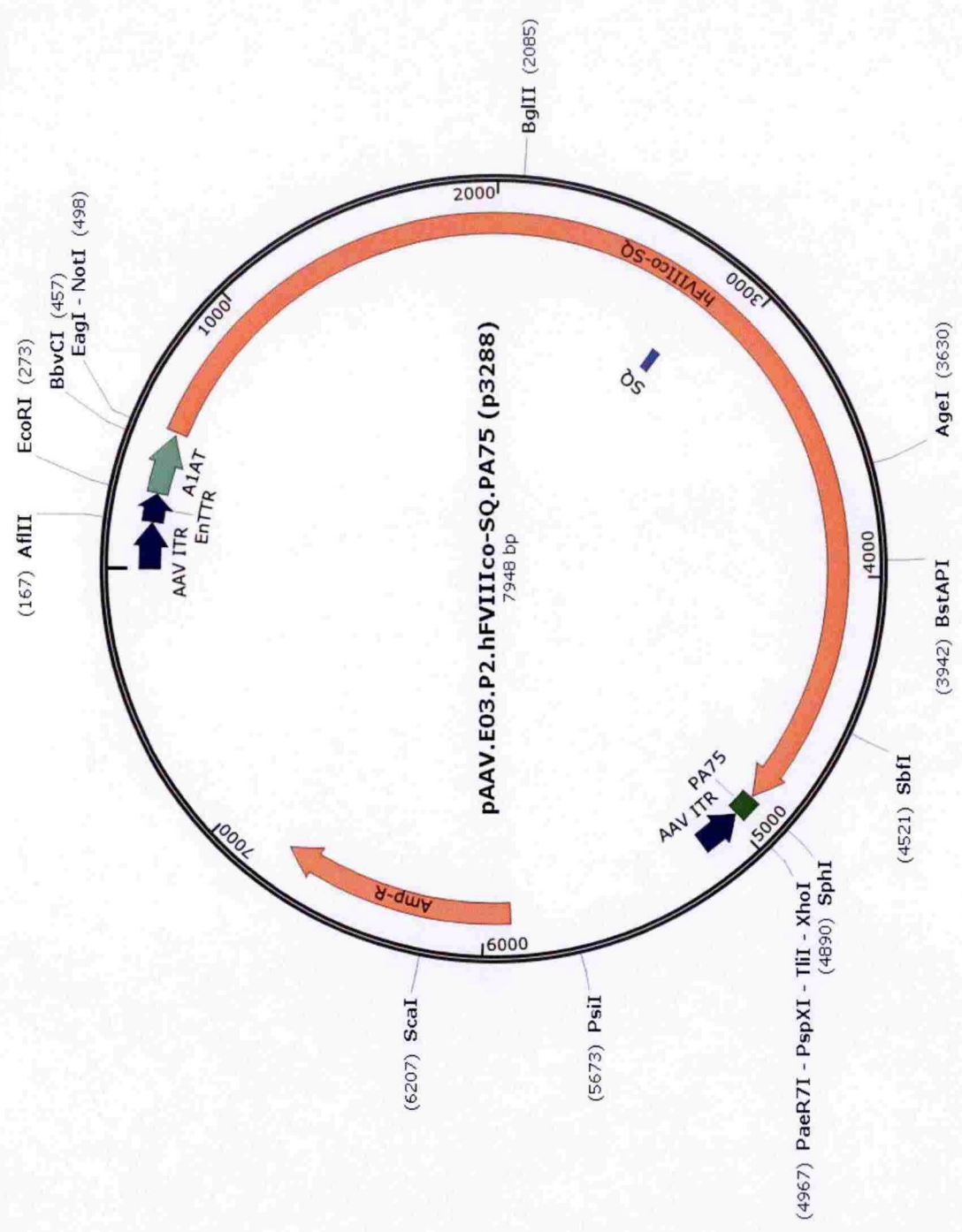


圖 2

Created with SnapGene®



3

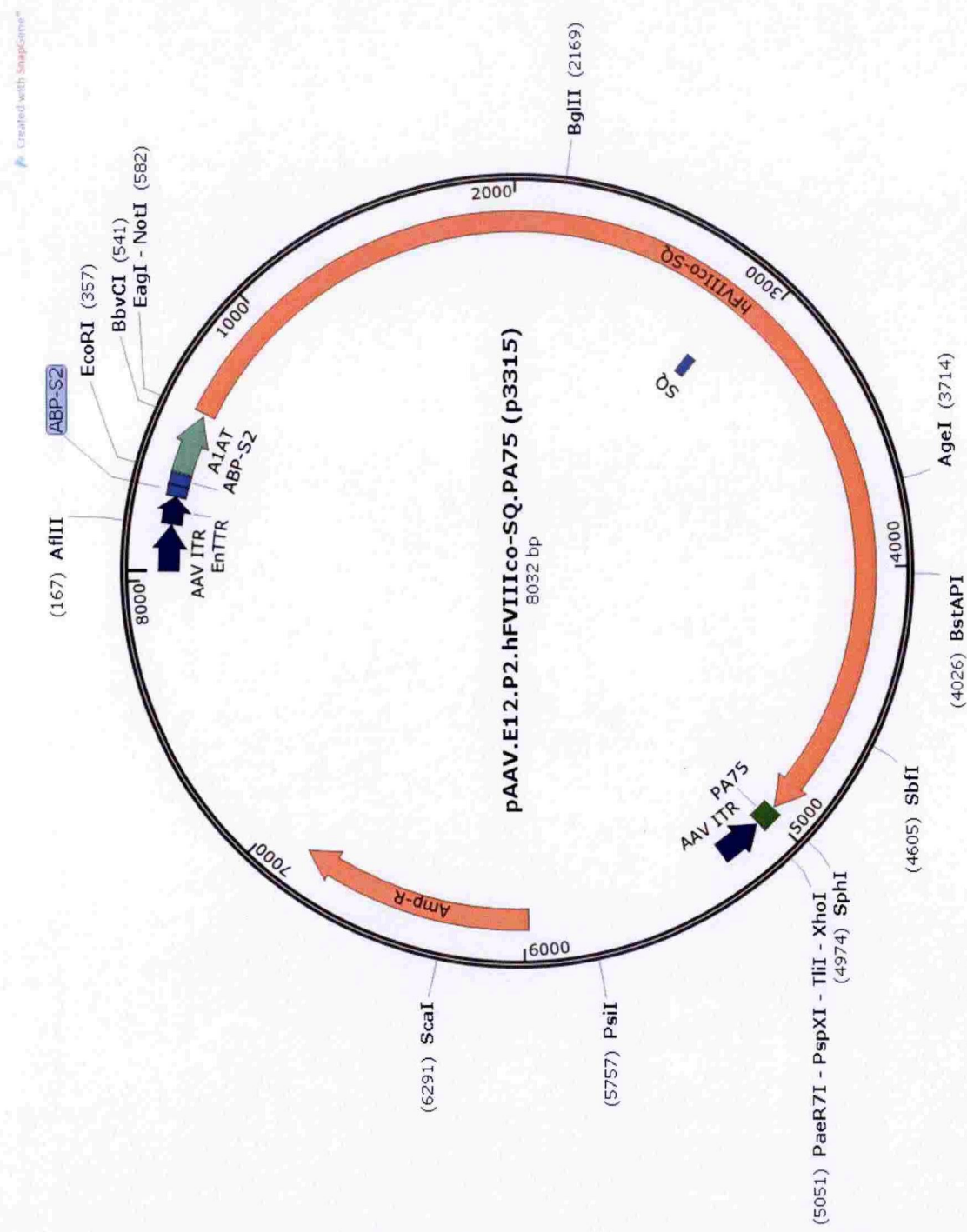


圖 4

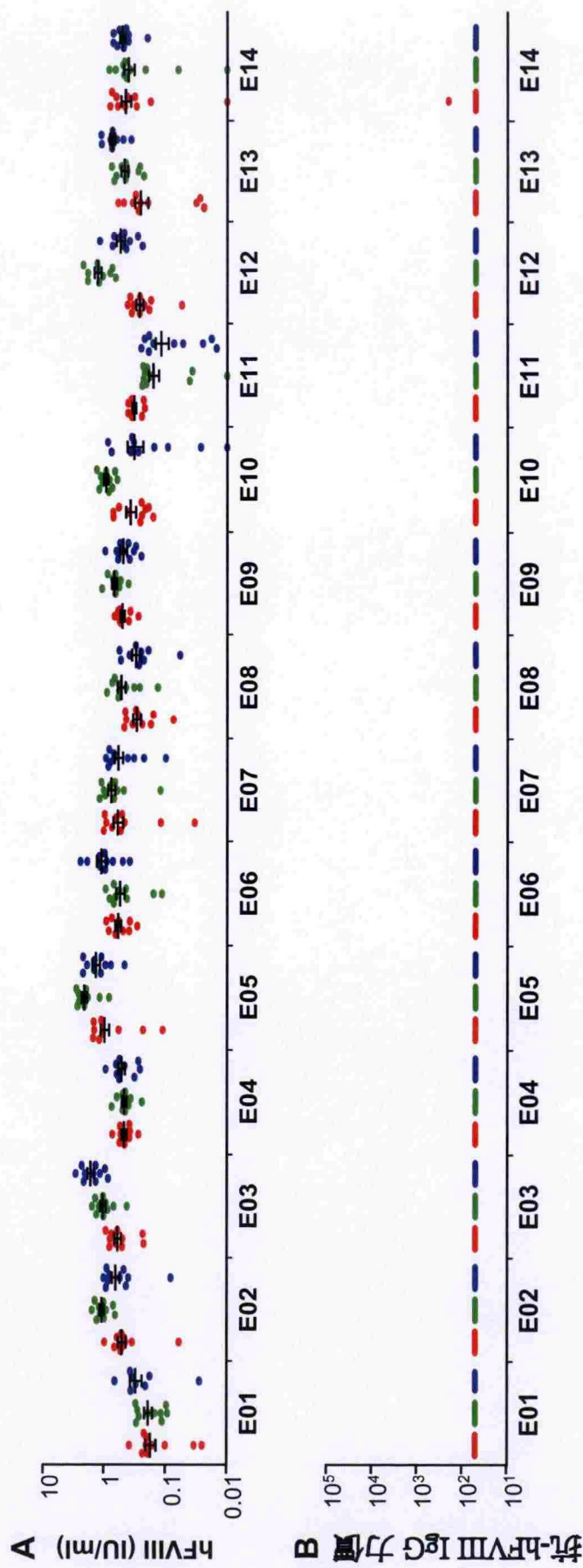


圖 5

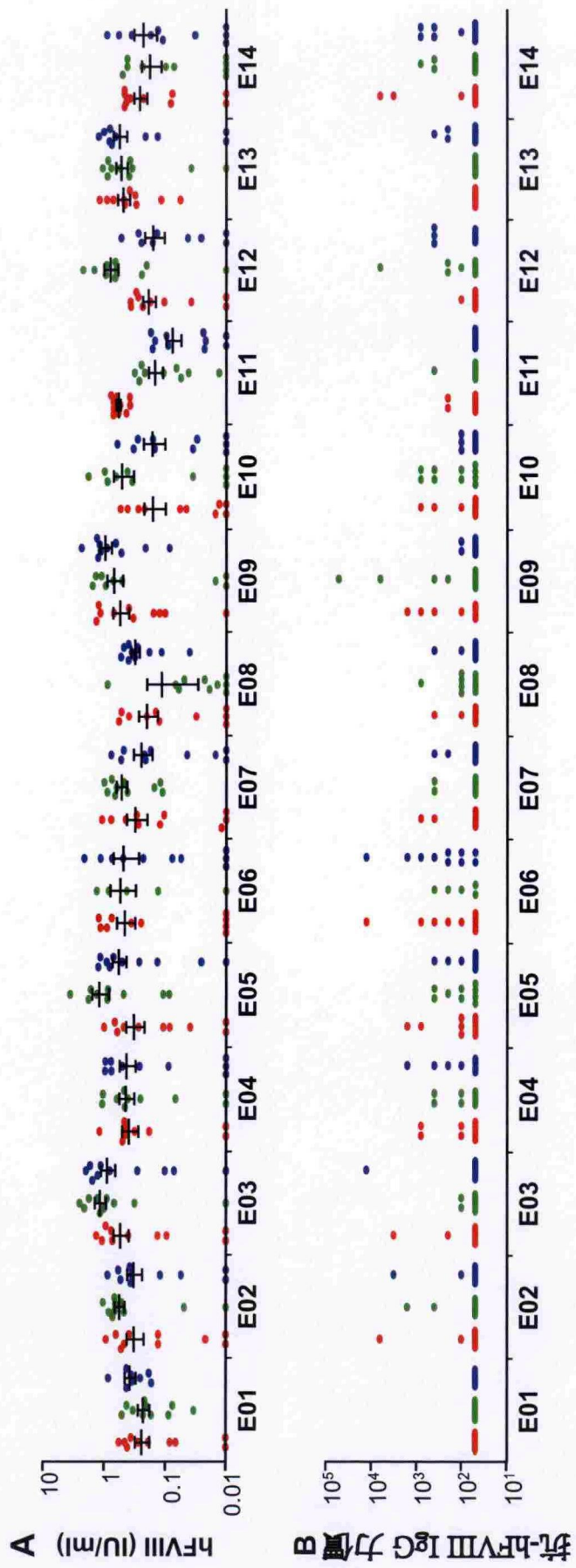


圖 6

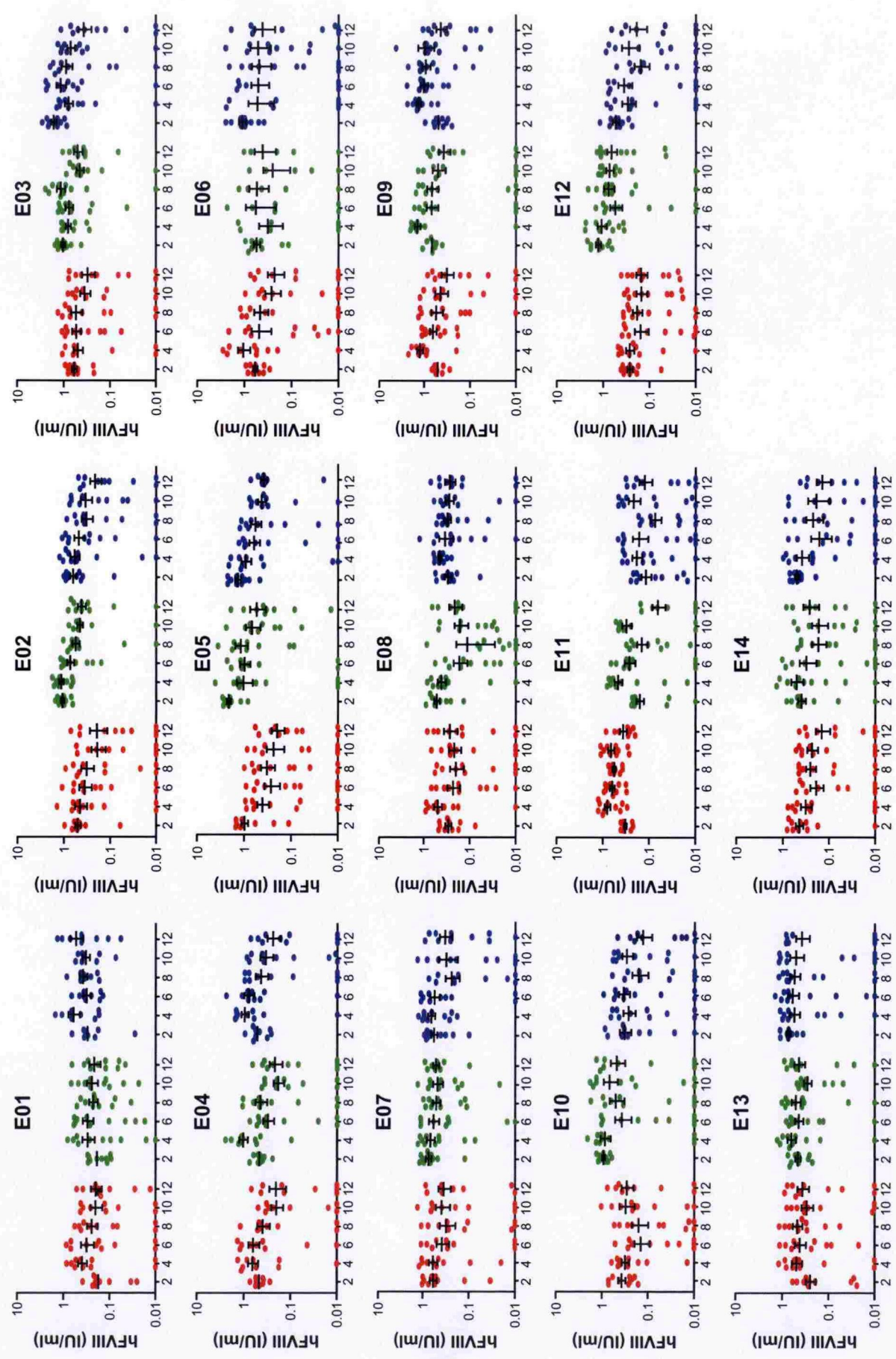
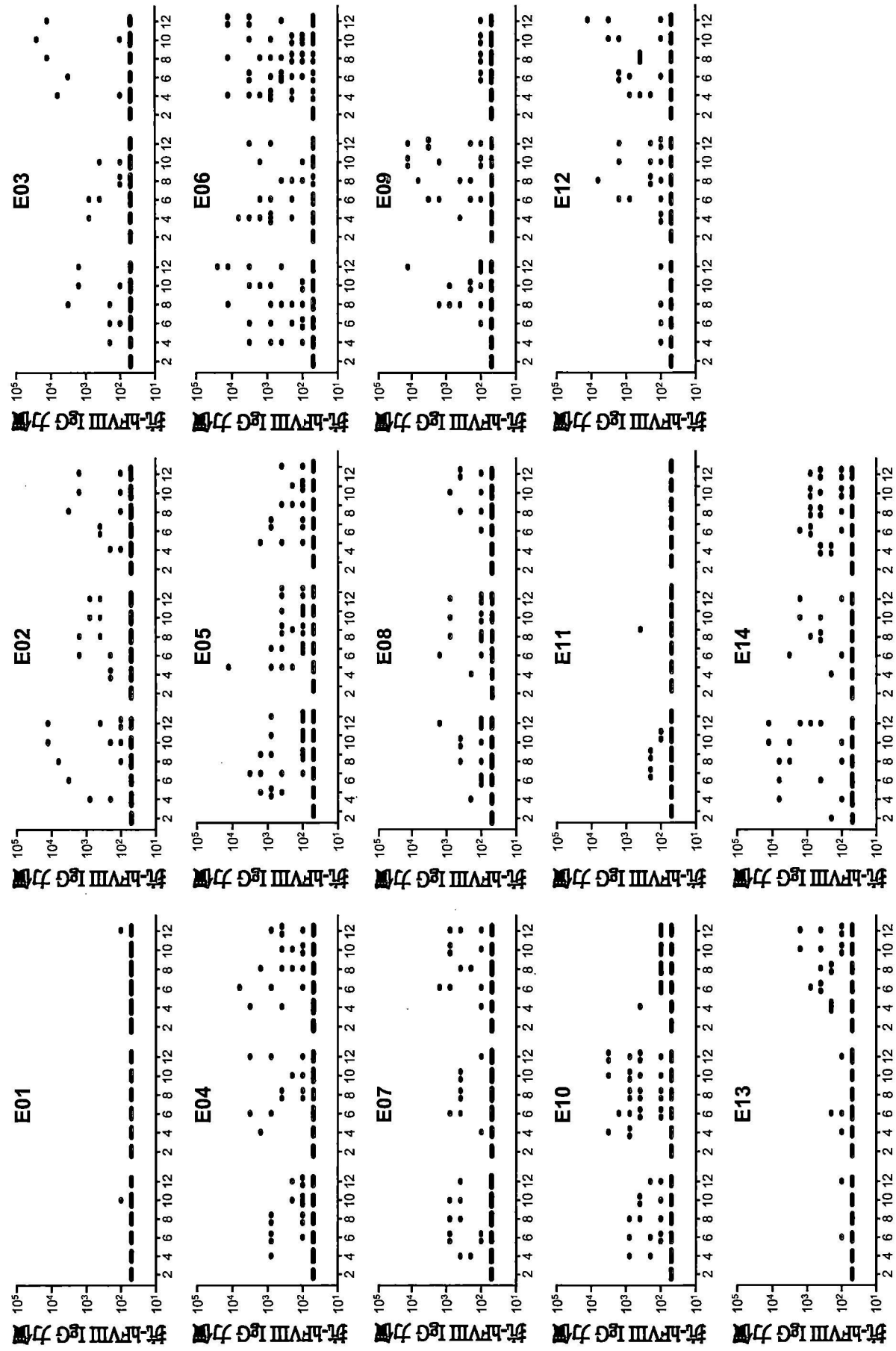
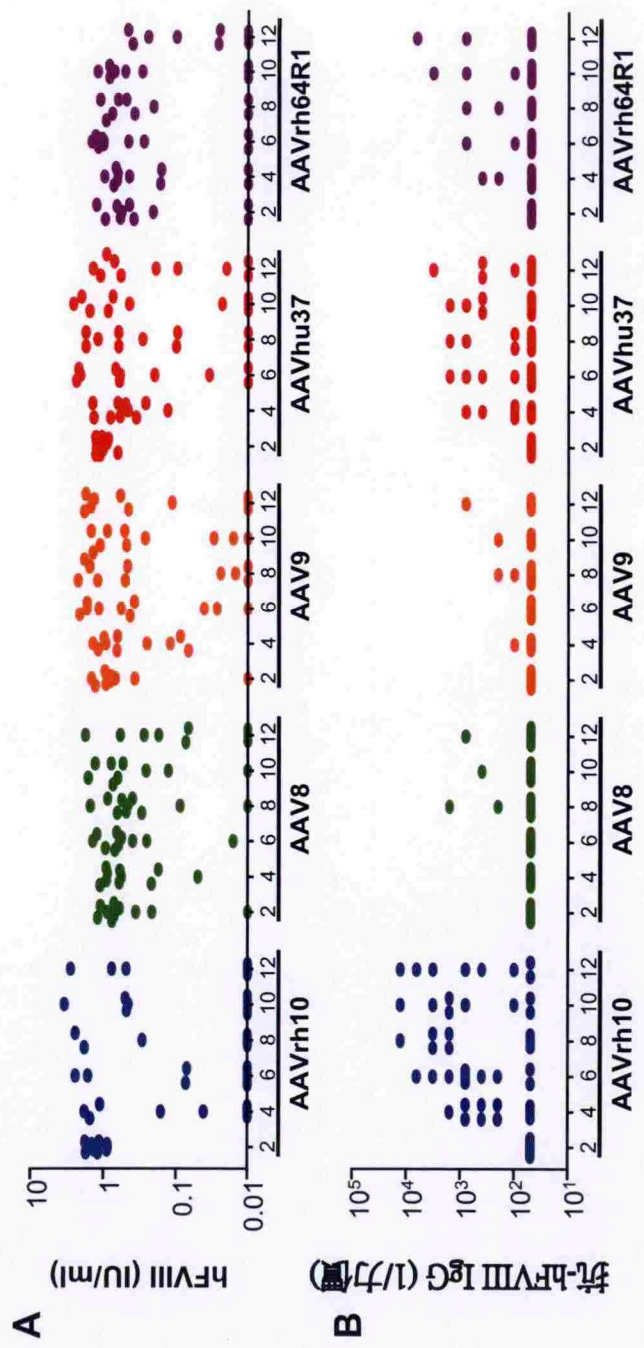


圖 7

8





9

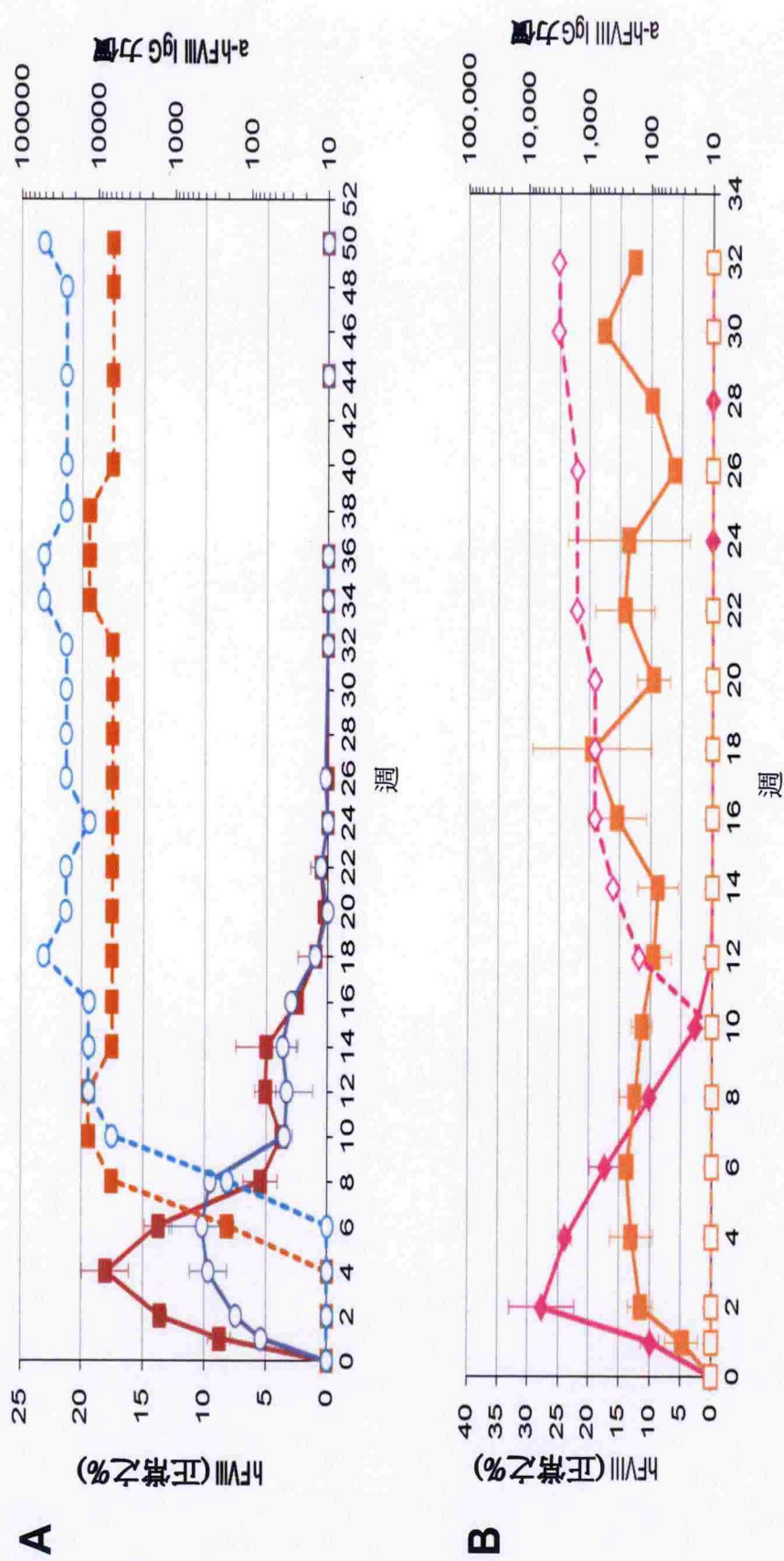


圖 10

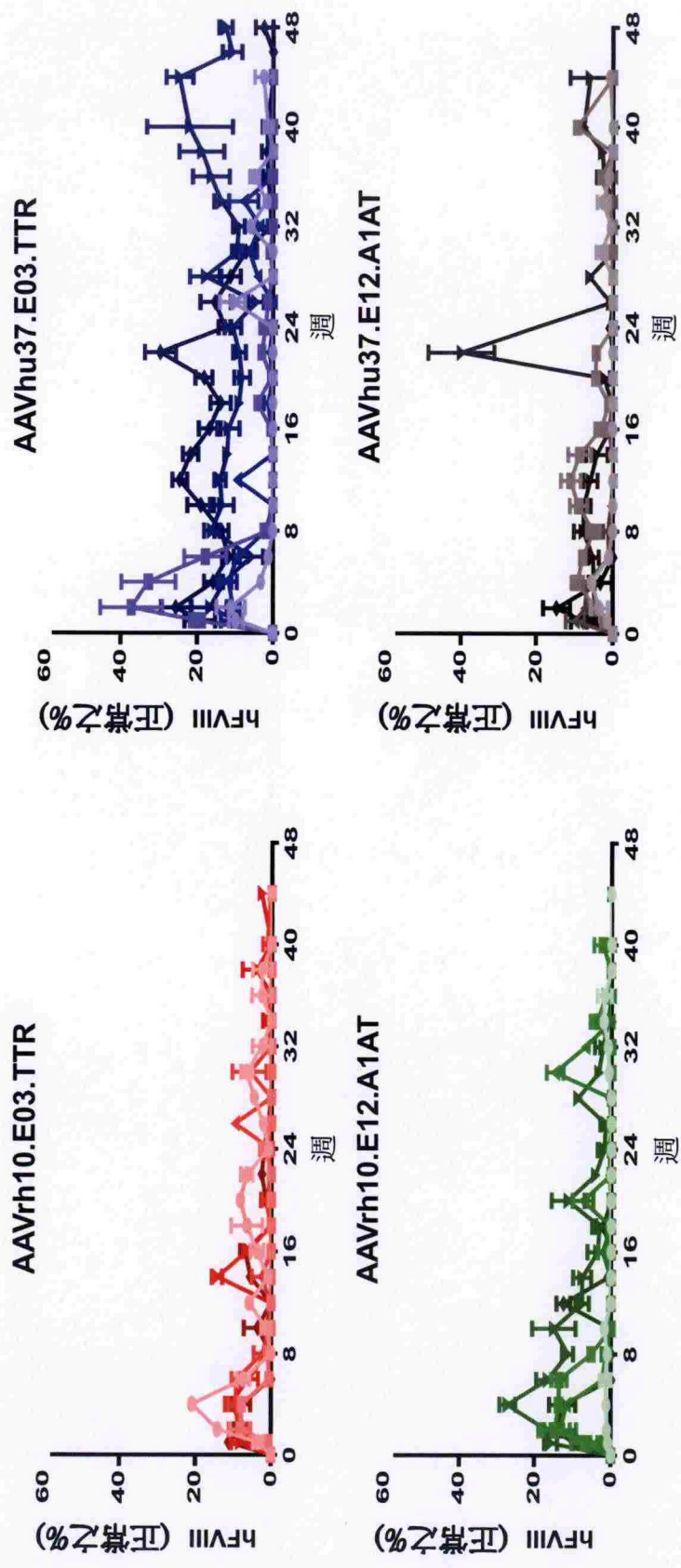


圖 11

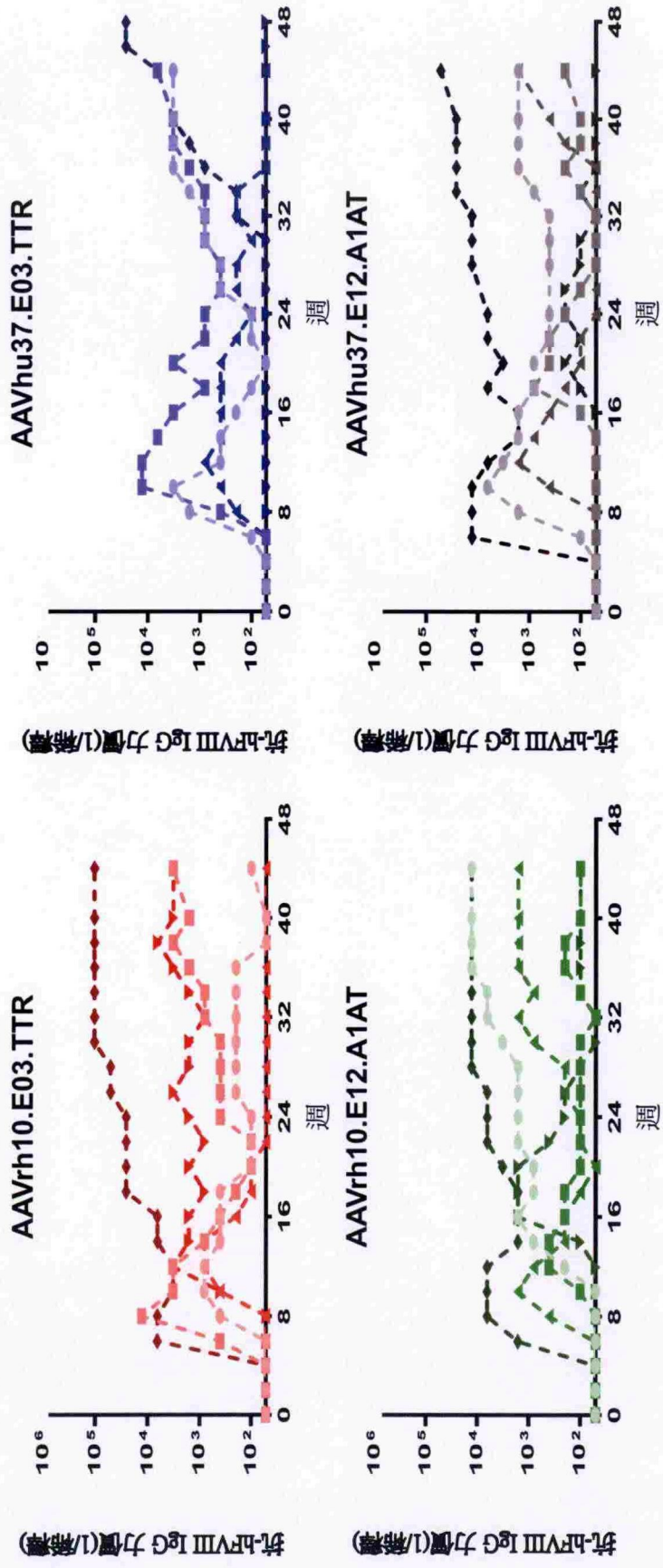


圖 12

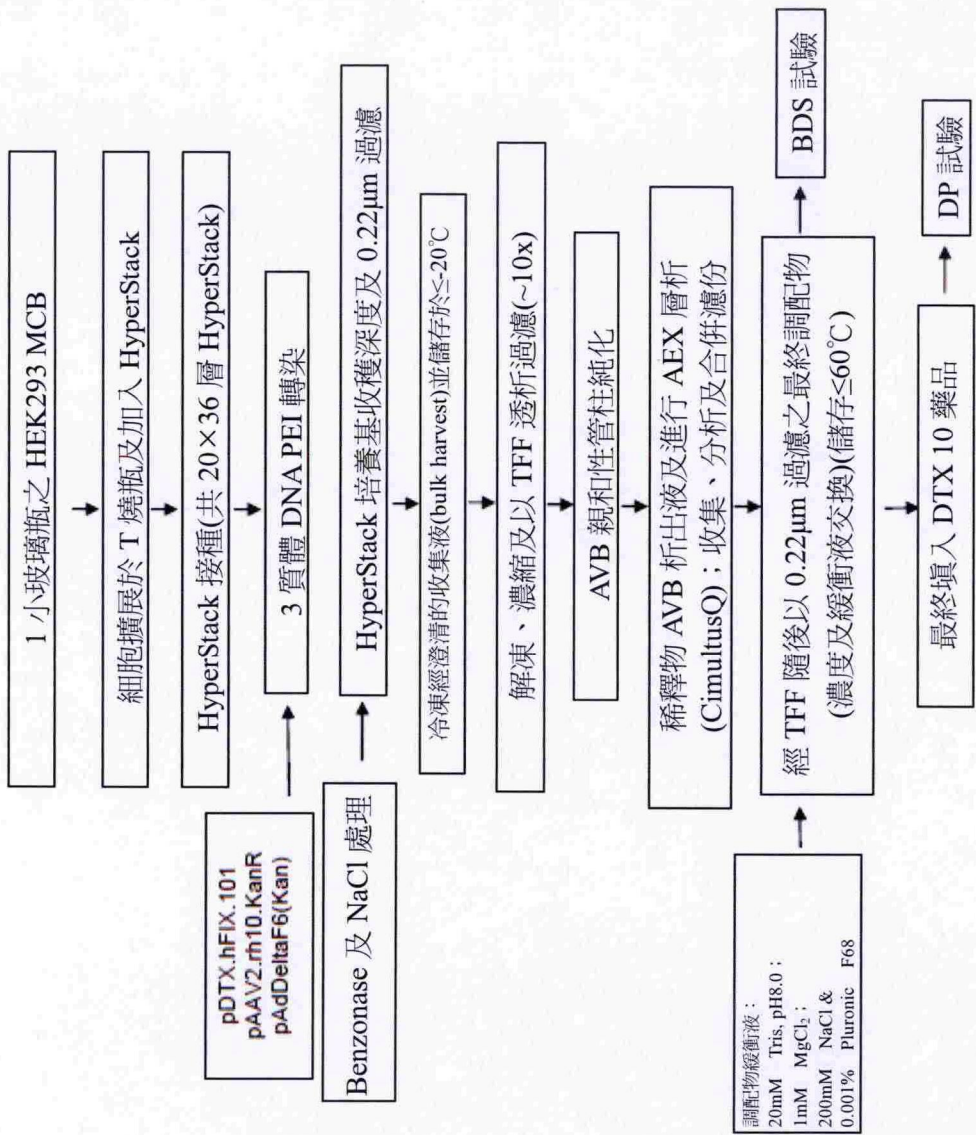


圖 13

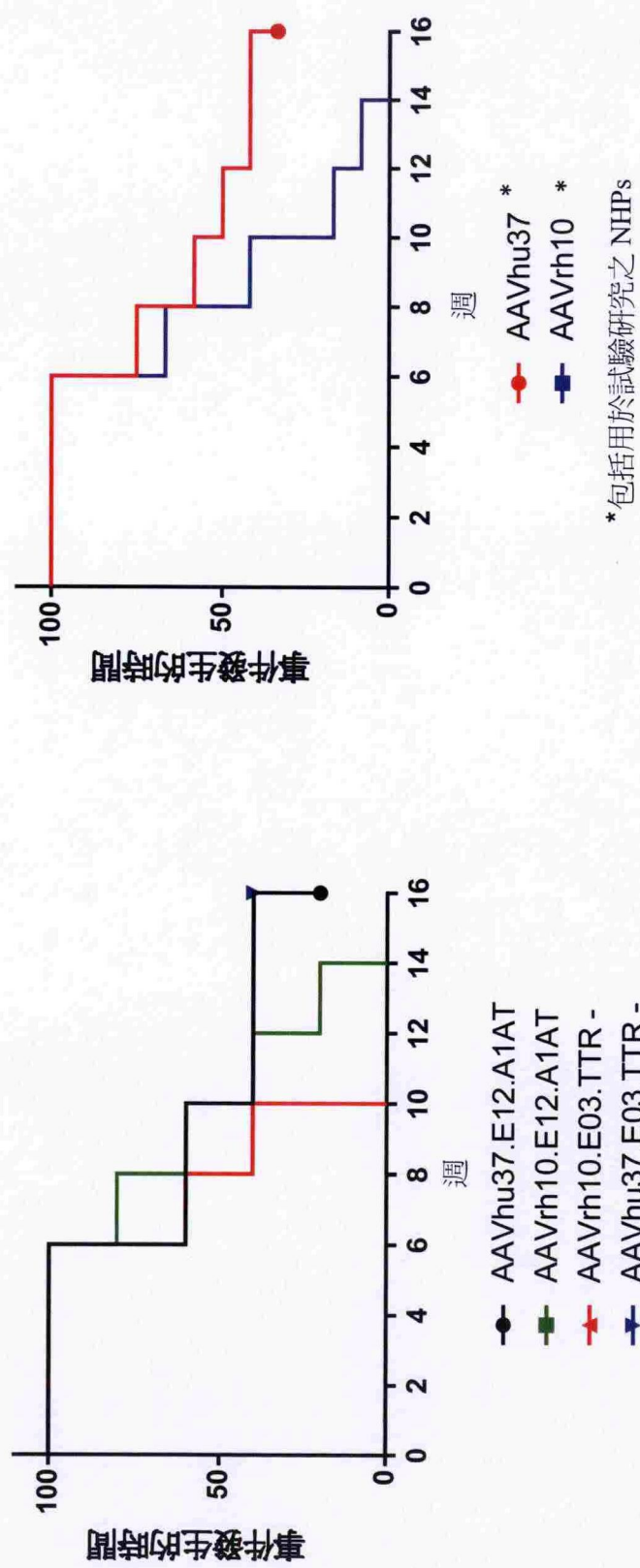


圖 14

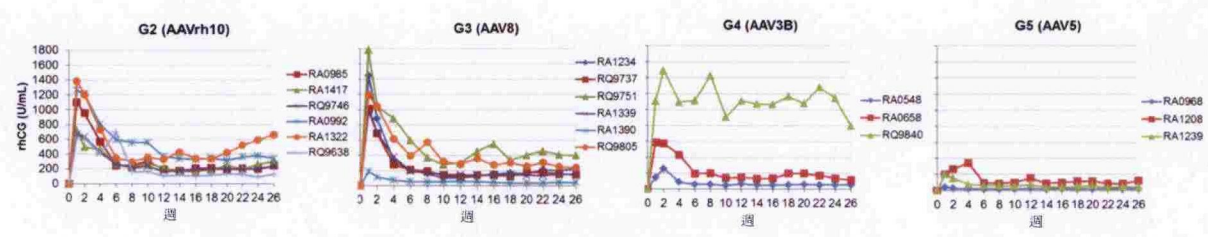


圖 15

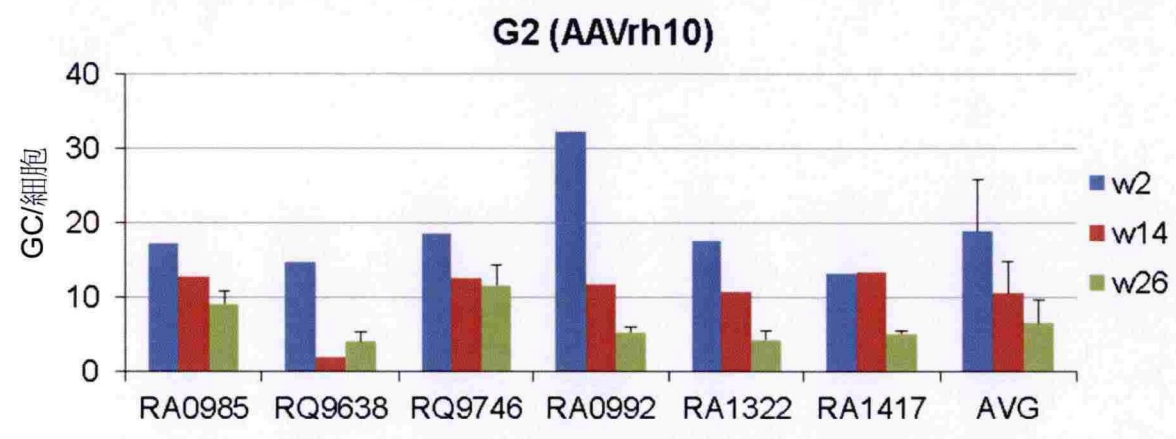


圖 16A

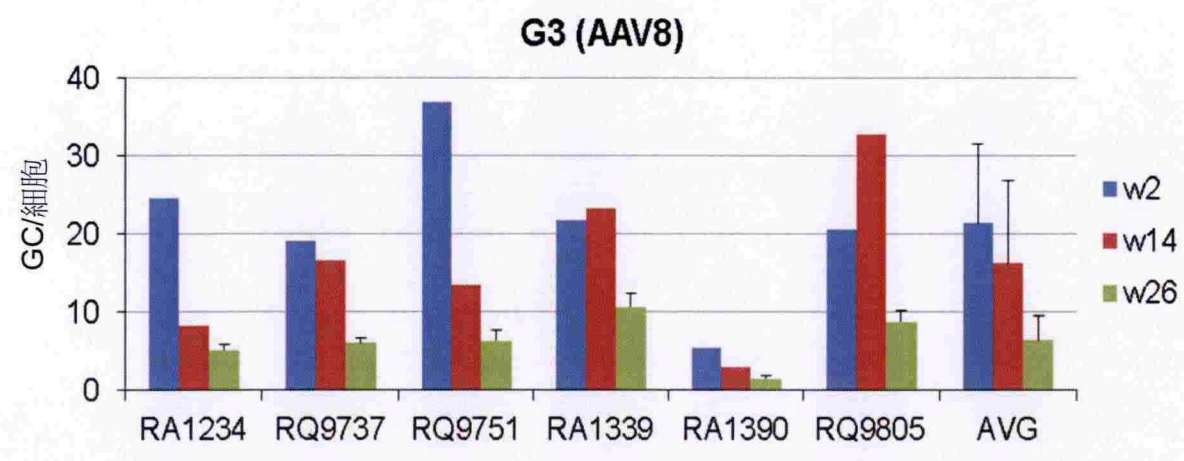


圖 16B

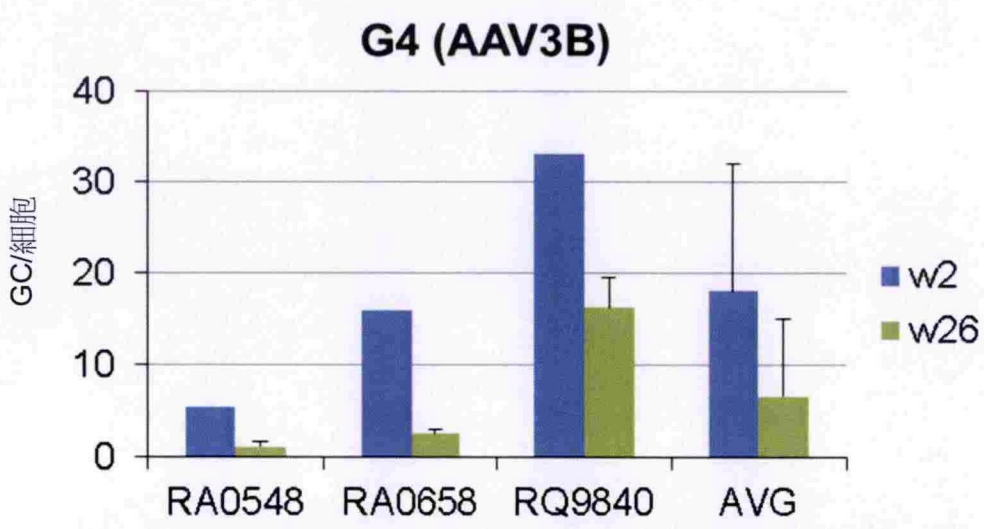


圖 16C

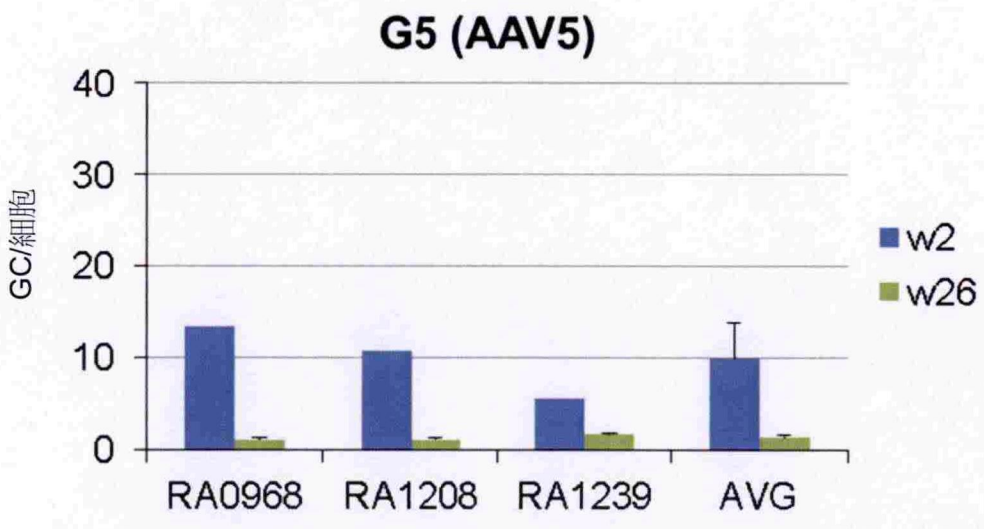


圖 16D

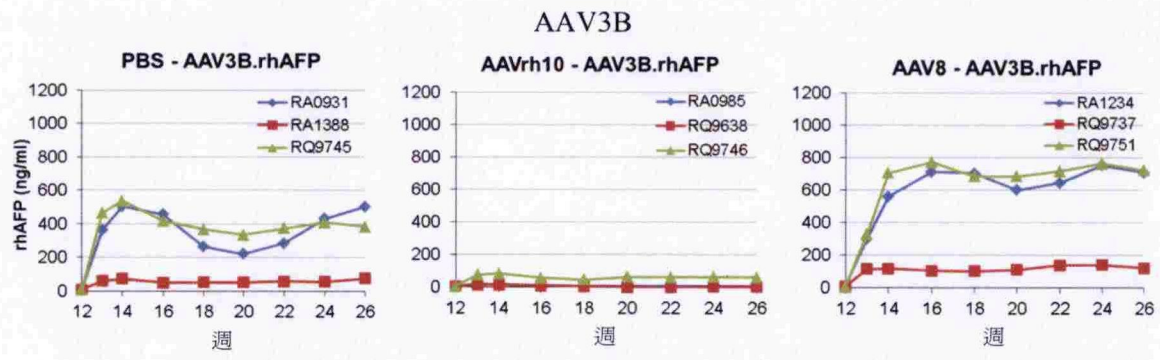


圖 17A

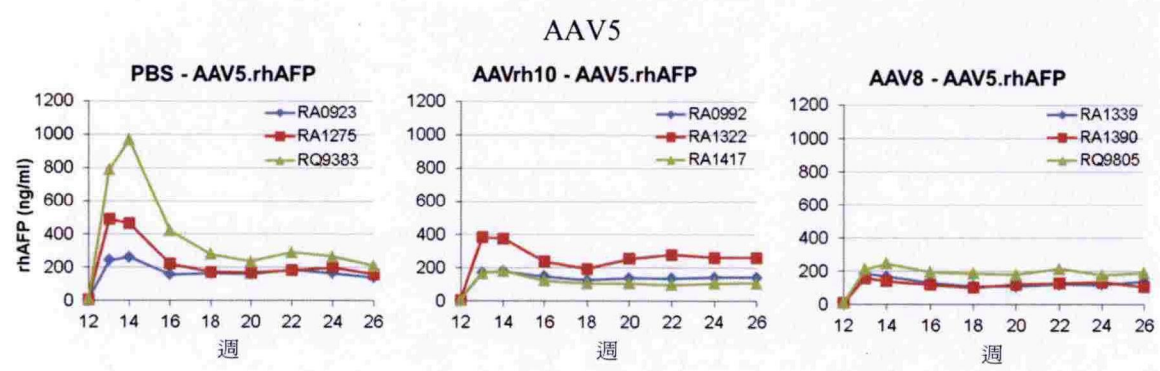


圖 17B

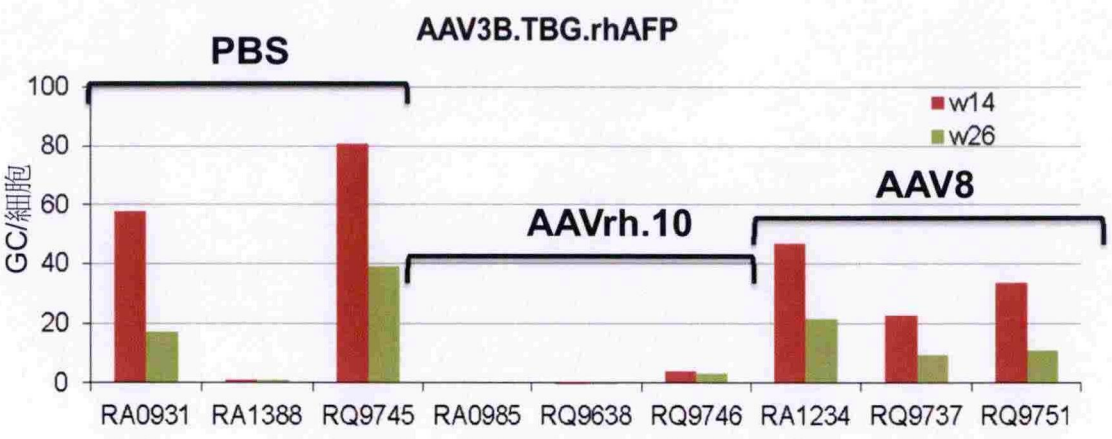


圖 18A

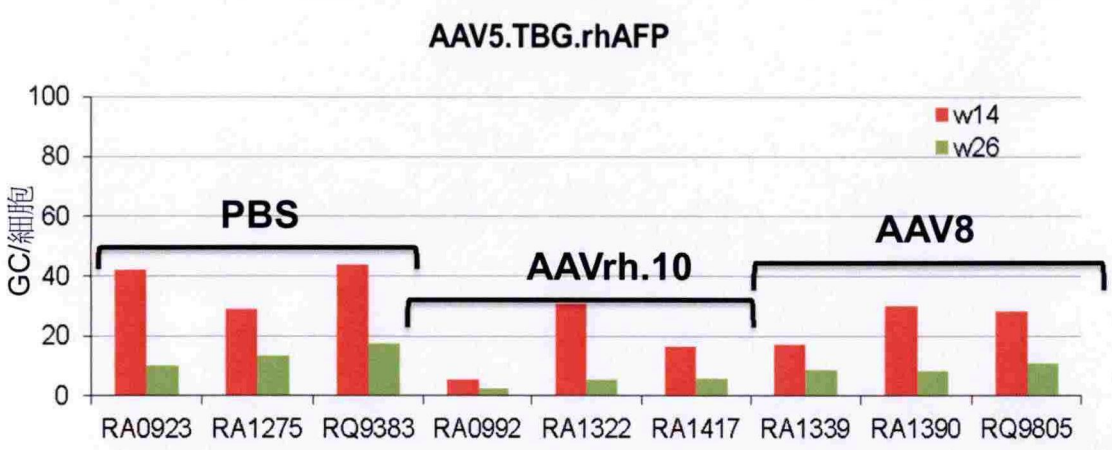


圖 18B

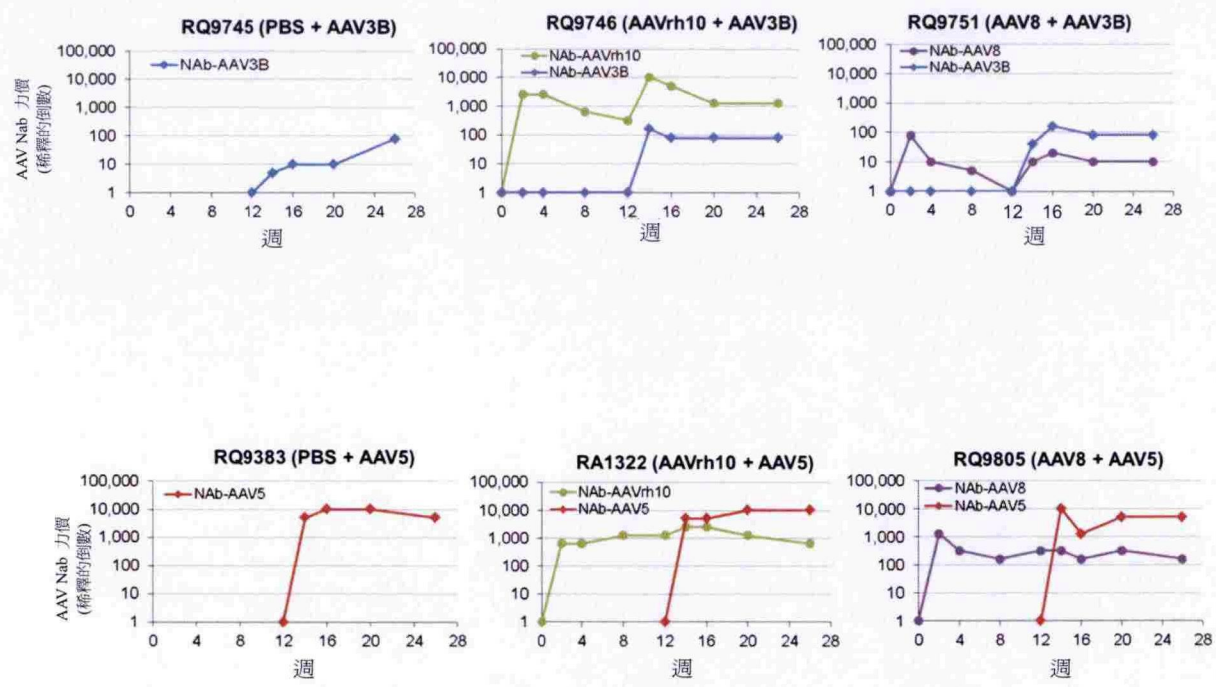


圖 19

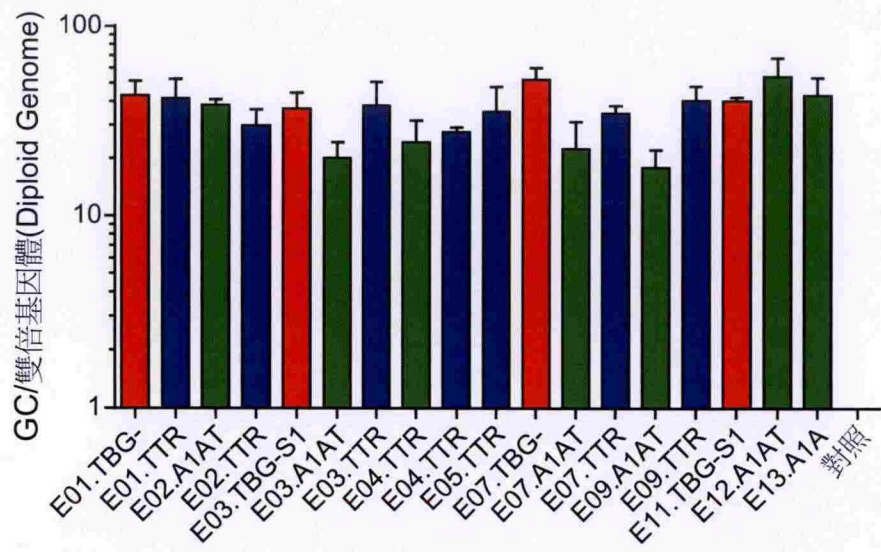


圖 20A

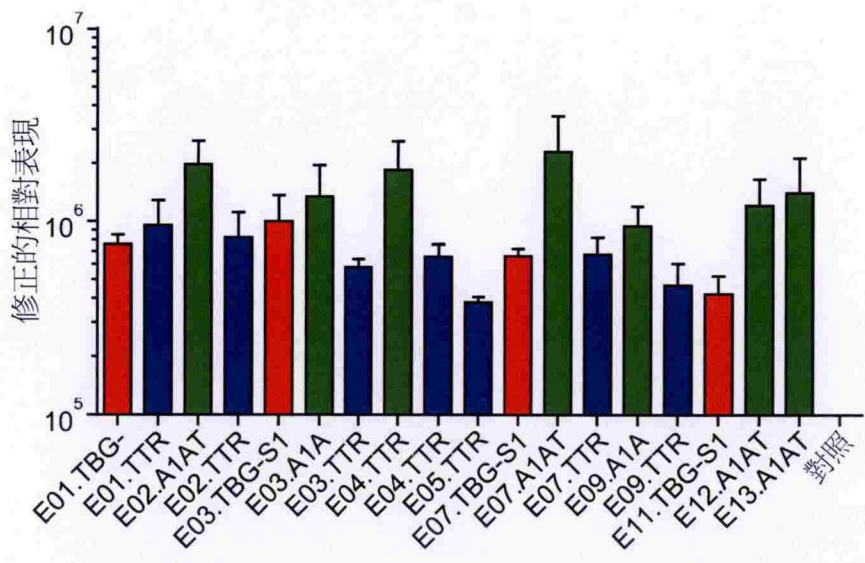


圖 20B

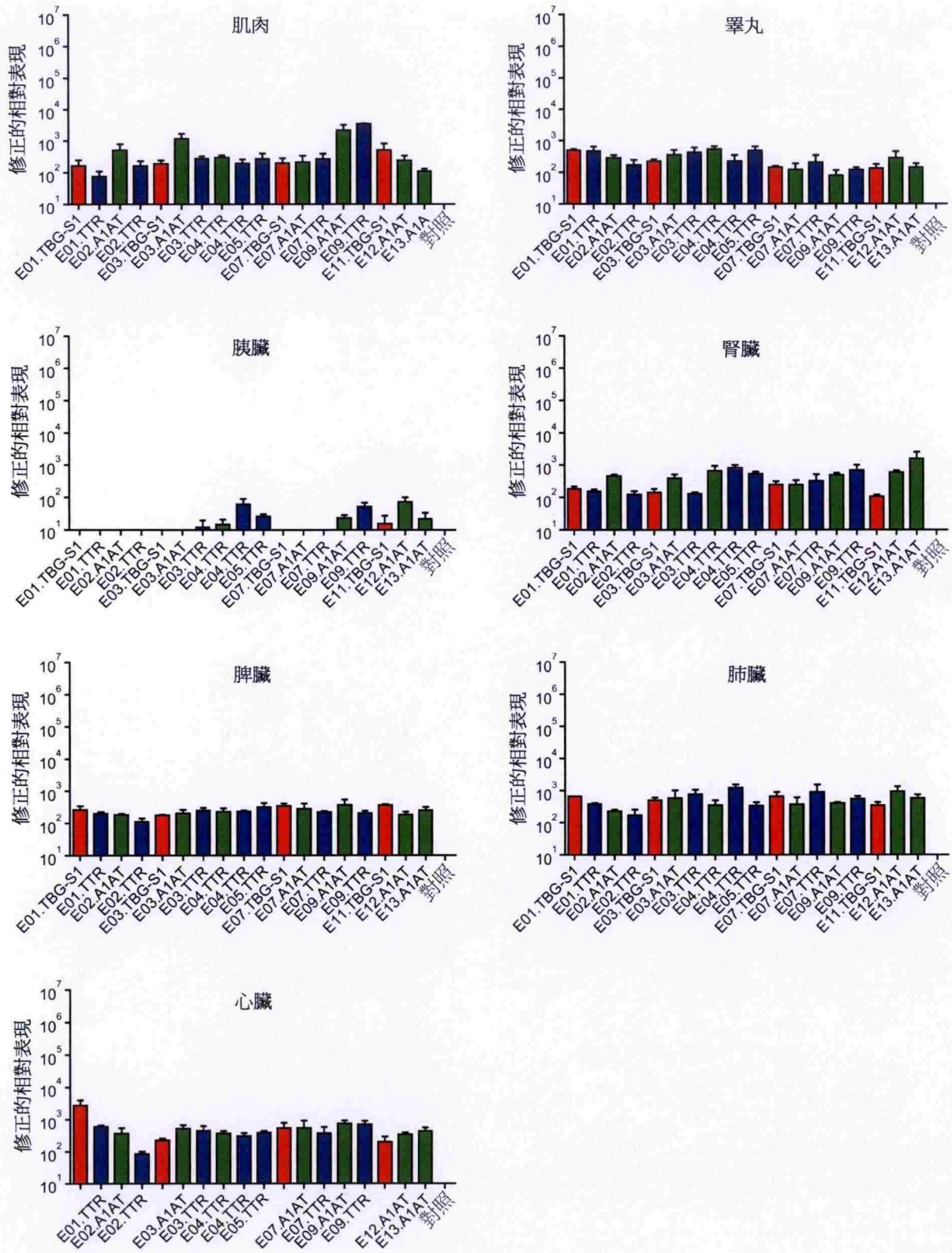


圖 21

AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3x10¹² GC/kg)

M11269

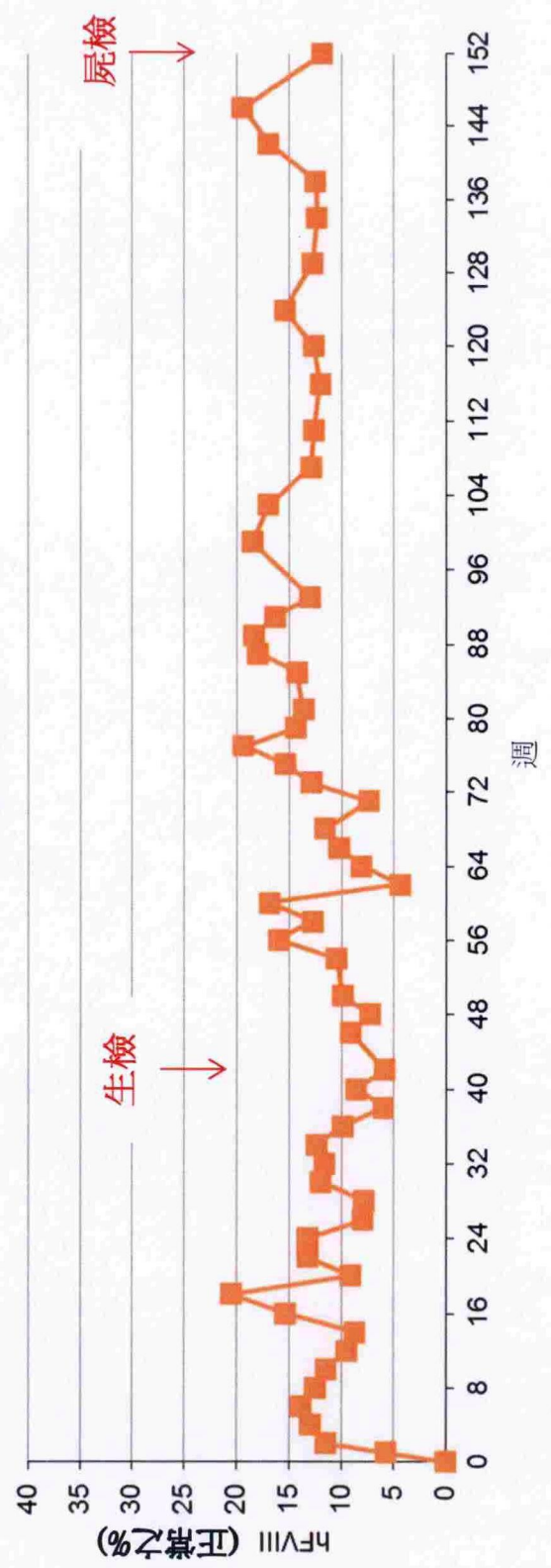


圖 22

AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3x10¹² GC/kg)

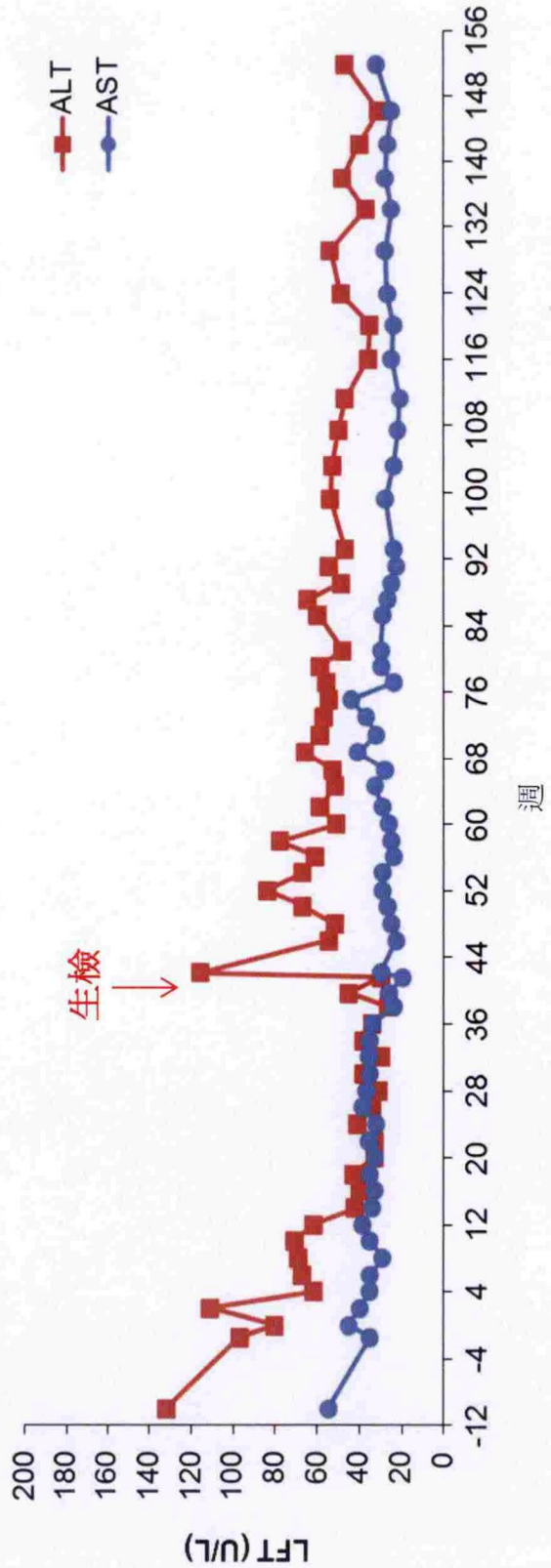


圖 23

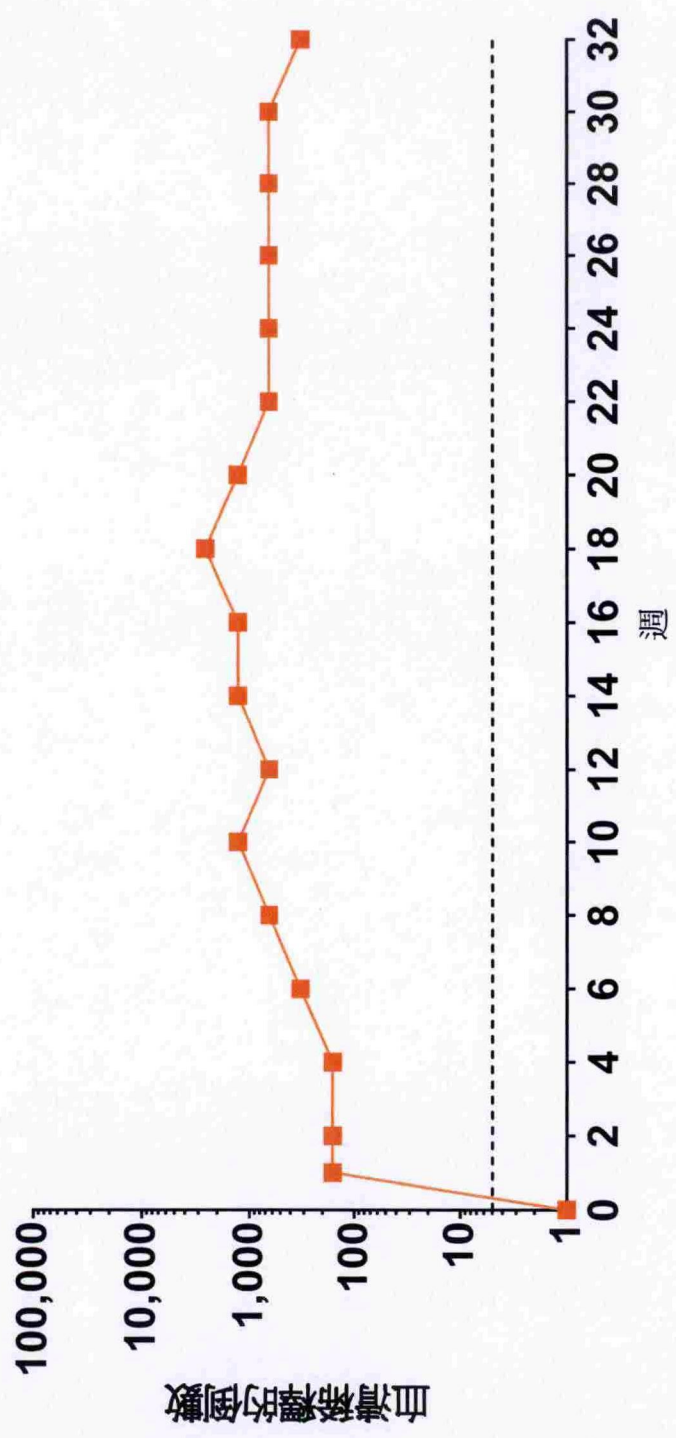


圖 24

同一性百分比陣列-由 Clustal2.1 產生

1: hFVIIIco 100.00 77.24 (SEQ ID NO: 2)
2: hFVIII 77.24 100.00 (SEQ ID NO: 1)

hFVIIIco	atgcagatcgagctgagcacctgcttcttctctgtgcctgctgcggttctgcttctccgcc	60
hFVIII	atgcaaatagagctctccacctgcttcttctctgtgccttttgcgattctgcttttagtgcc	60
	***** ** ***** ***** ***** ***** *****	
hFVIIIco	acccggcggtactacctgggagccgtggagctgagctgggattacatgcagagcgatctg	120
hFVIII	accagaagatactacctgggtgcagtggaaactgtcatgggactatatgcaaagtgatctc	120
	*** * * ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****	
hFVIIIco	ggagagctgccagtggtatgccgggttcccaccacgggtgccaaagagcttcccattcaac	180
hFVIII	ggtgagctgcctgtggacgcaagatttctcctagagtgcacaaatcttttccattcaac	180
	** ***** ***** ** * ** ** * ***** ** *****	
hFVIIIco	accagcgtggtgtacaagaagaccctgttcgtggagtccacgatcacctgttcaacatc	240
hFVIII	acctcagtcgtgtacaaaaagactctgtttgtagaattcacggatcaccttttcaacatc	240
	*** ** ***** ***** ***** ** ***** ***** *****	
hFVIIIco	gccaaagccacggccaccctggatgggactgctgggaccaaccatccaggccgaggtgtac	300
hFVIII	gctaagccaagccaccctggatgggtctgctaggtcctaccatccaggctgaggtttat	300
	** ***** ***** ***** ***** ** ***** *****	
hFVIIIco	gatacogtggtgatcacctgaagaacatggcctctcatcctgtgtccctgcacgcctg	360
hFVIII	gatacagtggtcattacacttaagaacatggcttcccatcctgtcagttctcatgtgtt	360
	***** ***** ** ** ** ***** ***** ***** ** ** **	
hFVIIIco	ggagtgcgactactggaaggccagcgagggagccgagtagcatgatcagaccagccagcgg	420
hFVIII	ggtgtatcctactggaaagcttctgagggagctgaatatgatgatcagaccagtcaaagg	420
	** ** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** ** **	
hFVIIIco	gagaaggaggatgataaggtgttcccaggaggaagccacacctacgtgtggcaggtgtg	480
hFVIII	gagaagaagatgataaagtcttccctgggtggaagccatacatatgtctggcaggtcctg	480
	***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** *****	
hFVIIIco	aaggagaacggaccaatggccagcgatccactgtgcctgacctacagctacctgagccac	540
hFVIII	aaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtgccttacctactcatatcttttctcat	540
	** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** ** ** **	
hFVIIIco	gtggatctggtgaaggatctgaacagcggactgatcgagccctgctggtgtgccgggag	600
hFVIII	gtggacctggtaaaagacttgaattcaggcctcattggagccctactagtagtagagaa	600
	***** ***** ** ** ***** ** ** ***** ***** ** ** **	
hFVIIIco	ggaagcctggccaaggagaagaccagaccctgcacaagttcatcctgctgttcgcctg	660
hFVIII	gggagctctggccaaggaaaagacacagaccttgacaaaatttatactactttttgctgta	660
	** ** ***** ***** ***** ***** ** ** ** **	
hFVIIIco	ttcgatgagggaaaagagctggcacagcgagaccaagaacagcctgatgcaggatcgggat	720
hFVIII	tttgatgaagggaaaagttggcactcagaaacaaagaactccttgatgcaggatagggat	720
	** ***** ** ** ***** ** ***** * *****	
hFVIIIco	gccgcagcgccccgggctggccaaagatgcacacgctgaacggatagctgaaccggagc	780
hFVIII	gctgcacgtgctcgggcctggcctaaaatgcacacagtcgaatggttatgtaaacaggtct	780
	** ** ** ***** ***** ***** ***** ** ** **	

圖 25

hFVIIIco	gacctggcctctggactgattggaccactgctgatctgctacaaggagtctgtggatcag	1740
hFVIII	gatctagcttcaggactcattggccctctcctcatctgctacaaagaatctgtagatcaa	1740
	** ** *	
hFVIIIco	agaggaaaccagatcatgtctgataagagaaatgtgatcctgttctctgtgtttgatgag	1800
hFVIII	agaggaaaccagataatgtcagacaagaggaatgtcatcctgtttctgtatttgatgag	1800
	* *	
hFVIIIco	aacagaagctggtacctgacagagaacatccagagattcctgccaaaccagccggagtg	1860
hFVIII	aaccgaagctggtacctcacagagaatatacaacgctttctcccaatccagctggagtg	1860
	** *	
hFVIIIco	cagctggaggatccagagttccaggccagcaacatcatgcacagcatcaacggatacgtg	1920
hFVIII	cagcttgaggatccagagttccaagcctccaacatcatgcacagcatcaatggctatgtt	1920
	* *	
hFVIIIco	ttcgatagcctgcagctgagcgtgtgcctgcacgaggtggcctatttggtatatacctgagc	1980
hFVIII	tttgatagtttgagttgtcagtttgttgcagtgaggtggcctactggtacattctaagc	1980
	** *	
hFVIIIco	atcggagcccagaccgatttccctgagcgtgttcttcagcggatacaccttcaagcacaag	2040
hFVIII	attggagcacagactgacttcccttctgtcttctctctggtatataccttcaaacacaaa	2040
	** *	
hFVIIIco	atggtgtacgaggataccctgaccctgttcccattctccggagagaccgtgttcatgagc	2100
hFVIII	atggtctatgaagacacactcacctatttcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcg	2100
	* *	
hFVIIIco	atggagaacccaggactgtggatcctgggatgccacaactctgatttcagaaacagagga	2160
hFVIII	atggaaaacccaggtctatggattctgggtgccacaactcagactttcggaacagaggc	2160
	* *	
hFVIIIco	atgactgccctgctgaaagtgtccagctgtgataagaacactggagattactatgaggat	2220
hFVIII	atgacgccttactgaagggttctagttgtgacaagaacactggtgattattacaggagc	2220
	* *	
hFVIIIco	agctatgaggatatctctgcctacctgctgagcaagaacaatgccattgagccaagaagc	2280
hFVIII	agttatgaagatatctcagcatacttgctgagtaaaaaacaatgccattgaaccaagaagc	2280
	** *	
hFVIIIco	ttcagccagaacccaccagtgctgaagagacaccagagagagatcaccagaaccacctg	2340
hFVIII	ttctcccagaatccaccagttctgaaacgccatcaacgggaaataaactcgactactctt	2340
	** *	
hFVIIIco	cagtctgatcaggaggagattgattatgatgataccatctctgtggagatgaagaaggag	2400
hFVIII	cagtcagatcaagaggaaattgactatgatgataccatatcagttgaaatgaagaaggaa	2400
	* *	
hFVIIIco	gattttgatatactatgatgaggatgagaaccagagcccaagaagcttcagaagaagacc	2460
hFVIII	gattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagccccgcagctttcaaaagaaaaca	2460
	* *	
hFVIIIco	agacactacttcatcgctgcagtgaggagactgtgggattatggaatgagcagcagccca	2520
hFVIII	cgacactattttattgctgcagtgaggagaggtctgtgggattatgggatgagtagctccca	2520
	* *	
hFVIIIco	caegtgtgagaaacagagcccagagcggatctgtgccacagttcaagaaggtggtgttc	2580
hFVIII	catgttctaagaaacagggctcagagtggtcagtgccctcagttcaagaaagttgttttc	2580
	** *	

圖 25(續)

hFVIIIco	caggagttcaccgatggaagcttcacccagccactgtaccggggagagctgaacgagcac	2640
hFVIII	caggaatttactgatggctcctttactcagcccttataccgtggagaactaaatgaacat	2640
	***** ** * ***** ** * ***** * ***** ***** ** * ** *	
hFVIIIco	ctgggactgctgggaccatacatccgggcccaggtggaggataaacatcatggtgaccttc	2700
hFVIII	ttgggactcctggggccatatataagagcagaagttgaagataatatcatggttaactttc	2700
	***** ***** ***** ** * ** * ** * ** ***** ***** ** *	
hFVIIIco	cggaaccaggccagccggccatacagcttctacagcagcctgatcagctacgaggagat	2760
hFVIII	agaaatcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttatttcttatgaggaagat	2760
	* ** ***** ** * ** * ***** ***** ** * ***** ** *	
hFVIIIco	cagcggcagggagccgagccacggaagaacttcgtgaagccaaacgagaccaagacctac	2820
hFVIII	cagaggcaaggagcagaacctagaaaaaactttgtcaagcctaataaaccaaaacttac	2820
	*** ***** ** * ** * ** * ***** ** ***** ** * ***** ** *	
hFVIIIco	ttctggaaggtgcagcaccacatggccccaaccaaggatgagttcgattgcaagcctgg	2880
hFVIII	ttttggaagtgcaacatcatatggcaccactaaagatgagttgactgcaagcctgg	2880
	** ***** ***** ** * ** * ***** ** * ** * ***** ** *	
hFVIIIco	gcctaacttcagcgatgtggatctggagaaggatgtgcacagcggactgatcggaccactg	2940
hFVIII	gcttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgtgcactcaggcctgattggaccctt	2940
	** ** * ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *	
hFVIIIco	ctggtgtgccacaccaacacctgaaccagccacggacggcaggtgacctgcaggag	3000
hFVIII	ctggtctgccacactaacacactgaacctgctcatgggagacaagtgcagtagcaggaa	3000
	***** ***** ***** ***** ***** ** * ** * ** * ***** ** *	
hFVIIIco	ttcgccctgttcttcaccatcttcgatgagaccaagagctggtacttcaccgagaacatg	3060
hFVIII	tttgctctgtttttcaccatctttgatgagacaaaagctggtacttcaactgaaaatatg	3060
	** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** * ** *	
hFVIIIco	gagcggaaactgccgggccccttgcaacatccagatggaggatccaaccttcaaggagaac	3120
hFVIII	gaaagaaactgcagggtccctgcaatatccagatggaagatcccacttttaagagaaat	3120
	** * ***** ** * ** * ***** ***** ***** ** * ** * *****	
hFVIIIco	taccggttccacgccatcaacggatacatcatggataccctgccaggactggtgatggcc	3180
hFVIII	tatcgcttccatgcaatcaatggctacataatggatacactacctggcttagtaatggct	3180
	** ** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** ** * ** * *****	
hFVIIIco	caggatcagcggatccggtggtacctgctgagcatgggaagcaacgagaacatccacagc	3240
hFVIII	caggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatccattct	3240
	***** ** * ** * ***** ***** ***** ***** ** * *****	
hFVIIIco	atccacttcagcggacacgtgttcaccgtgcggaagaaggaggagtacaagatggccctg	3300
hFVIII	attcatttcagtggaacatgtgttactgtacgaaaaaagaggagtataaaatggcactg	3300
	** ** ***** ***** ***** ***** ** * ** * ***** ***** ** *	
hFVIIIco	tacaacctgtaccaggagtgttcgagaccgtggagatgctgccaagcaaggccggaatc	3360
hFVIII	tacaatctctatccagggtgtttttgagacagtggaaatgttaccatccaaagctggaatt	3360
	***** ** * ** * ***** ** * ***** ***** ***** ** * ** * *****	
hFVIIIco	tggcgggtggagtgcctgatcggagagcacctgcacgccggaatgagcacacctgttctctg	3420
hFVIII	tggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacactttttctg	3420
	***** ***** ***** ** * ***** ** * ** * ***** ***** ** *	
hFVIIIco	gtgtacagcaacaagtgccagacccactgggaatggccagcggacacatccgggatttc	3480
hFVIII	gtgtacagcaataagtgtcagactccctgggaatggcttctggacacattagagatttt	3480
	***** ***** ***** ** ***** ***** ***** ** * *****	

圖 25(續)

hFVIIIco	cagatcaccgccagcggacagtagcggacagtgggccccaaagctggcccggtgcactac	3540
hFVIII	cagattacagcttcaggacaatatggacagtgggccccaaagctggccagacttcattat	3540
	***** ** **	
hFVIIIco	agcgggaagcatcaacgcctggagcaccaaggagccattcagctggatcaaagtggatctg	3600
hFVIII	tccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagcccttttcttgatcaaggaggatctg	3600

hFVIIIco	ctggccccaatgatcatccacggaatcaagaccagggagcccggcagaagttcagcagc	3660
hFVIII	ttggcaccaatgattattcacggcatcaagaccaggggtgcccgtcagaagttctccagc	3660

hFVIIIco	ctgtacatcagccagttcatcatcatgtacagcctggatggaaagaagtggcagacctac	3720
hFVIII	ctctacatctctcagtttatcatcatgtatagtcttgatgggaagaagtggcagacttat	3720
	**	
hFVIIIco	cggggaaacagcaccggaaccctgatgggtgttcttcggaaacgtggatagcagcggaaac	3780
hFVIII	cgaggaaattccactggaaccttaattgggtcttctttggcaatgtggattcatctgggata	3780
	**	
hFVIIIco	aagcacaacatcttcaaccaccaaactcatcgcccgatacatccggctgcacccaaccac	3840
hFVIII	aaacacaatatcttcaaccctccaattattgctcgatacatccgtttgcacccaactcat	3840
	**	
hFVIIIco	tacagcatcagaagcaccctgcggatggagctgatgggatgtgatctgaacagctgtcc	3900
hFVIII	tatagcattcgcagcactcttcgcagtgagttgatgggctgtgatttaaatagttgcagc	3900
	**	
hFVIIIco	atgccactgggaatggagagcaaggccatcagcgatgccagatcaccgccagcagctac	3960
hFVIII	atgccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttcacctac	3960

hFVIIIco	ttcaccaacatgttcgccacctggagcccaagcaaggcccggtgcacctgcaggagcg	4020
hFVIII	tttaccaatatgtttgccacctggtctccttcaaaagctcgacttcacctccaaggagg	4020
	**	
hFVIIIco	agcaacgcctggcgccacaggtgaataacccaaaggagtggctgcaggtggatttccag	4080
hFVIII	agtaatgcctggagacctcaggtgaataatccaaaagagtggctgcaagtggacttccag	4080
	**	
hFVIIIco	aagaccatgaaggtagccggagtgaccacccagggagtgaagagcctgctgactagcatg	4140
hFVIII	aagacaatgaaagtcacaggagtaactactcagggagtaaaatctctgcttaccagcatg	4140

hFVIIIco	tatgtgaaggagttcctgatcagcagcagccaggatggacaccagtggacctgttcttc	4200
hFVIII	tatgtgaaggagttcctcatctccagcagtcagatggccatcagtgactctctttttt	4200

hFVIIIco	cagaacggaaaggtagaggtgttccagggaaaccaggatagcttcacccagtggtgaac	4260
hFVIII	cagaatggcaaaagtaaagggttttttcagggaaatcaagactccttcacacctgtgggaac	4260

hFVIIIco	agcctggatccaccactgctgaccogatacctgcggatccaccacagagctgggtgcac	4320
hFVIII	tctctagacccaccgttactgactcgctaccttcgaattcaccaccagagttgggtgcac	4320
	**	
hFVIIIco	cagatcgccctgagaatggaggtgctgggatgcgagggccaggatctgtactga	4374
hFVIII	cagattgcctgaggatggaggttctgggctgcgaggcacaggacctctac---	4371

圖 25(續)