



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049332
(43) 공개일자 2024년04월16일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/755 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/755 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7009185</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년08월22일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년03월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2022/075282</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/028456
국제공개일자 2023년03월02일</p> <p>(30) 우선권주장
63/236,225 2021년08월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
바이오버라티브 테라퓨틱스 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02451) 월섬 2엔디 애비뉴 225</p> <p>(72) 발명자
마고디아, 에이제이
미국 02451 매사추세츠 월섬 세컨드 애비뉴 225
바이오버라티브 테라퓨틱스 인크. 내
리우, 통야오
미국 02451 매사추세츠 월섬 세컨드 애비뉴 225
바이오버라티브 테라퓨틱스 인크. 내
자카스, 필립
미국 02451 매사추세츠 월섬 세컨드 애비뉴 225
바이오버라티브 테라퓨틱스 인크. 내</p> <p>(74) 대리인
양영준, 장덕순</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 최적화된 인자 VIII 유전자

(57) 요약

본 발명은 코돈 최적화된 인자 VIII 서열, 코돈 최적화된 인자 VIII 서열을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 코돈 최적화된 인자 VIII 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드, 및 이러한 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61P 7/04 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14343 (2013.01)

C12N 2800/22 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

C12N 2830/48 (2013.01)

C12N 2830/50 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 9와 적어도 85% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 인자 VIII(FVIII) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9와 적어도 90% 동일한, 단리된 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한, 단리된 핵산 분자.

청구항 4

서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 인자 VIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9의 뉴클레오타이드 58 내지 4824와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9의 뉴클레오타이드 58 내지 4824를 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 32에 비해 더 적은 수의 CpG 모티프를 함유하도록 코돈 최적화된, 단리된 핵산 분자.

청구항 10

서열번호 33과 적어도 85% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 인자 VIII(FVIII) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 33과 적어도 90% 동일한, 단리된 핵산 분자.

청구항 12

제10항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 33과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한, 단리된 핵산 분자.

청구항 13

서열번호 33의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 인자 VIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 14

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 유전자 카세트는 서열번호 14와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 16

제14항에 있어서, 유전자 카세트는 서열번호 14와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 17

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트는 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 18

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트는 서열번호 35와 적어도 85% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 유전자 카세트는 서열번호 35와 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 20

제18항에 있어서, 유전자 카세트는 서열번호 35와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 21

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트는 서열번호 35의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 22

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트는

(a) 서열번호 9 또는 서열번호 33과 적어도 85% 동일한 핵산 서열을 포함하는 FVIII 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열;

(b) 상기 뉴클레오타이드 서열의 전사를 제어하는 프로모터; 및

(c) 전사 종결 서열

을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 23

제22항에 있어서, 프로모터는 간-특이적 프로모터인, 단리된 핵산 분자.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 프로모터는 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터인, 단리된 핵산 분자.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터는 mTTR482 프로모터인, 단리된 핵산 분자.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터는 서열번호 16의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 27

제23항에 있어서, 프로모터는 인간 알파-1-안티트립신(A1AT) 프로모터인, 단리된 핵산 분자.

청구항 28

제23항에 있어서, 프로모터는 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 29

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 전사 종결 서열은 폴리아데닐화(polyA) 서열인, 단리된 핵산 분자.

청구항 30

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 전사 종결 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호 서열인, 단리된 핵산 분자.

청구항 31

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 전사 종결 서열은 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 32

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 인핸서 요소를 추가로 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 33

제26항에 있어서, 인핸서 요소는 A1MB2 인핸서 요소인, 단리된 핵산 분자.

청구항 34

제26항 또는 제27항에 있어서, A1MB2 인핸서 요소는 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 35

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 인트론 서열을 추가로 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 36

제25항에 있어서, 인트론 서열은 키메라 인트론, 하이브리드 인트론, 또는 합성 인트론인, 단리된 핵산 분자.

청구항 37

제25항 또는 제26항에 있어서, 인트론 서열은 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 38

제18항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 전사후 조절 요소를 추가로 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 39

제32항에 있어서, 전사후 조절 요소는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE)를 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 40

제33항에 있어서, WPRE는 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 41

제18항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 카세트를 플랜킹하는 제1 역위 말단 반복부(ITR) 및 제2 ITR을 추가로 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 42

제35항에 있어서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 바이러스과 파보비리다에(Parvoviridae)의 구성원으로부터 유래되는, 단리된 핵산 분자.

청구항 43

제35항 또는 제36항에 있어서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 인간 보카바이러스(HBoV1), 인간 에리트로바이러스(B19), 거위 파보바이러스(GPV), 이들의 변이체, 또는 이들의 조합으로부터 유래되는, 단리된 핵산 분자.

청구항 44

제37항에 있어서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 서열번호 1, 2, 또는 21 내지 30과 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 45

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 ITR은 서열번호 1과 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제2 ITR은 서열번호 2와 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 46

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트는 5'에서 3'으로:

- (a) 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 A1MB2 인핸서 요소;
 - (b) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터;
 - (c) 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 키메라 인트론;
 - (d) 서열번호 9 또는 서열번호 33과 적어도 85% 동일한 핵산 서열을 포함하는 FVIII 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열;
 - (e) 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE); 및
 - (f) 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호
- 를 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 47

인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 유전자 카세트

는 5'에서 3'으로:

- (a) 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 알파-1-안티트립신(A1AT) 프로모터;
- (b) 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 키메라 인트론;
- (c) 서열번호 9 또는 서열번호 33과 적어도 85% 동일한 핵산 서열을 포함하는 FVIII 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (d) 서열번호 18의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE); 및
- (e) 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호를 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 상기 유전자 카세트를 플랜킹하는 제1 ITR 및 제2 ITR을 추가로 포함하고, 상기 제1 ITR은 서열번호 1과 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 제2 ITR은 서열번호 2와 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 50

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 핵산 분자 또는 제42항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 51

제50항의 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드.

청구항 52

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 핵산 분자의 생산을 위한 바큘로바이러스 시스템으로서, 상기 핵산 분자는 곤충 세포에서 생산되는, 바큘로바이러스 시스템.

청구항 53

FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서, 제50항의 숙주 세포를 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드가 생산되는 조건하에 배양하는 단계, 및 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 54

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 55

제49항의 벡터 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 56

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 핵산 분자 및 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 핵산 분자를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

청구항 57

대상체에서 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 방법으로서, 서열번호 9, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 58

대상체의 출혈 장애를 치료하는 방법으로서, 서열번호 9, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 59

대상체의 출혈 장애를 치료하는 방법으로서, 제54항 또는 제55항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 출혈 장애는 A형 혈우병인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2021년 8월 23일에 출원된 미국 특허 가출원 63/236,225호에 대한 우선권을 주장하며, 그 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 전자 제출된 서열 목록의 참조

[0004] XML 형식(파일명: SA9-484_SeqListing.xml; 크기: 117,240 바이트; 생성일: 2022년 8월 22일)의 전자 제출된 서열 목록의 내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005] 환자에게 저가의 재조합 FVIII 단백질을 제공하는 데 있어 주요 장애물은 높은 상업적 생산 비용이다. FVIII 단백질은 이중 발현 시스템에서 잘 발현되지 않는다(비슷한 크기의 단백질보다 100~1000배 더 낮음)(Lynch et al., *Hum. Gene. Ther.*; 4:259-72 (1993)). FVIII의 낮은 발현은 부분적으로는, 침묵 요소(Hoebe et al., *Blood* 85:2447-2454 (1995)), 매트릭스 부착형 서열(MAR)(Fallux et al., *Mol. Cell. Biol.* 16:4264-4272 (1996)), 및 전사 신장 억제 요소(Koeberl et al., *Hum. Gene. Ther.*; 6:469-479 (1995))와 같은, FVIII 발현을 억제하는 시스-작용 요소가 FVIII 암호화 서열에 존재하기 때문이다.

[0006] 따라서, 이중 시스템에서 효율적으로 발현되는 FVIII 서열이 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0007] FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 코돈 최적화된 핵산 분자가 개시된다.

[0008] 특정 양태에서, 서열번호 9와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 뉴클레오티드 서열은 인자 VIII(FVIII) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 9와 적어도 90% 동일하다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 9와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 9와 적어도 50% 동일하다.

[0009] 또한, 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 뉴클레오티드 서열은 인자 VIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다.

[0010] 또한, 서열번호 9의 뉴클레오티드 58 내지 4824와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 서열번호 9의 뉴클레오티드 58 내지 4824를 포함한다.

[0011] 특정 양태에서, 서열번호 33과 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 뉴클레오티드 서열은 인자 VIII(FVIII) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 33과 적어도 90% 동일하다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 33과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 33과 적어도 50% 동일하다.

- [0012] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 단리된 핵산 분자는 신호 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 신호 펩티드를 암호화한다.
- [0013] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 단리된 핵산 분자는 서열번호 32보다 더 적은 수의 CpG 모티프를 함유하도록 코돈 최적화된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 단리된 핵산 분자는 서열번호 32에 비해 하나 이상의 CpG 모티프가 결핍되어 있다.
- [0014] 다른 양태에서, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 유전자 카세트는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 14와 적어도 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 14와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 14와 적어도 50% 동일하다.
- [0015] 또한, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 유전자 카세트는 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다.
- [0016] 다른 양태에서, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 유전자 카세트는 서열번호 35와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 35와 적어도 90% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 35와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 서열번호 35와 적어도 50% 동일하다.
- [0017] 또한, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 유전자 카세트는 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다.
- [0018] 다른 양태에서, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 유전자 카세트는 서열번호 9 또는 서열번호 33과 적어도 85% 동일한 핵산 서열을 포함하는 FVIII 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 뉴클레오티드 서열의 전사를 제어하는 프로모터; 및 전사 종결 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다.
- [0019] 일부 구현예에서, 프로모터는 간-특이적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 마우스 트랜스티레틴 (mTTR) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 mTTR482 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 서열번호 16의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0020] 일부 구현예에서, 전사 종결 서열은 폴리아데닐화(polyA) 서열이다. 일부 구현예에서, 전사 종결 서열은 소장 호르몬 폴리아데닐화(bGHPa) 신호 서열이다. 일부 구현예에서, 전사 종결 서열은 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0021] 일부 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 인헨서 요소를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인헨서 요소는 A1MB2 인헨서 요소이다. 일부 구현예에서, A1MB2 인헨서 요소는 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0022] 일부 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 인트론 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 키메라 인트론, 하이브리드 인트론, 또는 합성 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0023] 일부 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 전사후 조절 요소는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE)를 포함한다. 일부 구현예에서, WPRE는 서열번호 18의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0024] 다른 양태에서, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트, 유전자 카세트를 플랭킹하는 제1 역위 말단 반복부(ITR) 및 제2 ITR을 포함하는 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 바이러스과 파코비리다에(Parvoviridae)의 구성원으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 인간 보카바이러스(HBoV1), 인간 에리트로바이러스(B19), 거위 파코바이러스(GPV), 또는 이들의 변이체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 서열번호 1, 2, 또는 21 내지 30과 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 ITR은 서열번호 1과 적어도 약

75% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 ITR은 서열번호 2와 적어도 약 75% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 ITR은 서열번호 1과 적어도 약 50% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 ITR은 서열번호 2와 적어도 약 50% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 ITR은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 제2 ITR은 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

- [0025] 다른 양태에서, 인자 VIII(FVIII) 폴리펩티드를 발현하는 유전자 카세트를 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 유전자 카세트는 5'에서 3'으로: 서열번호 15의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 A1MB2 인핸서 요소; 서열번호 16의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터; 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 키메라 인트론; 서열번호 9 또는 서열번호 33과 적어도 85% 동일한 핵산 서열을 포함하는 FVIII 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열번호 18의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE); 및 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호를 포함하는, 단리된 핵산 분자가 본원에 개시된다.
- [0026] 다른 양태에서, 본원에 개시된 핵산 분자를 포함하는 벡터가 본원에 개시된다.
- [0027] 다른 양태에서, 본원에 개시된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 본원에 개시된다. 또한, 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 곤충 세포이다.
- [0028] 다른 양태에서, 본원에 개시된 핵산 분자의 생산을 위한 바칼로바이러스 시스템이 본원에 개시된다. 일부 양태에서, 핵산 분자는 곤충 세포에서 생산된다.
- [0029] 다른 양태에서, 본원에 개시된 핵산 분자를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 본원에 개시된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0030] 다른 양태에서, 본원에 개시된 핵산 분자 및 이를 필요로 하는 대상체에게 핵산 분자를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트가 본원에 개시된다.
- [0031] 다른 양태에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서, 본원에 개시된 숙주 세포를 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드가 생산되는 조건하에 배양하는 단계, 및 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0032] 다른 양태에서, 대상체에서 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 방법으로서, 서열번호 9, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0033] 다른 양태에서, 대상체의 출혈 장애를 치료하는 방법으로서, 서열번호 9, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0034] 다른 양태에서, 대상체의 출혈 장애를 치료하는 방법으로서, 서열번호 9, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0035] 다른 양태에서, 대상체의 A형 혈우병을 치료하는 방법으로서, 서열번호 9, 서열번호 33, 서열번호 35, 또는 서열번호 14와 적어도 85% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 14의

뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 35의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0036]

도 1은 본 발명의 구현예에 따른 인간 FVIIIXTEN 발현 구성체의 도식적 선형 맵을 보여준다. V1.0 카세트는 트리스테트라플루렌(TTP) 프로모터, 인트론, 우드척 전사후 조절 요소(WPRE), 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호의 조절하에 XTEN 144 펩티드와 융합된(FVIIICo6XTEN) B-도메인 결실 인간 인자 VIII을 암호화하는 코돈 최적화된 cDNA 클론#6(BDD-FVIIICo6)를 포함한다(미국 공개 20190185543호 참조). V2.0 카세트(서열번호 14)는 인헨서 요소(A1MB2)를 갖는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터(mTTR482), 하이브리드 합성 인트론(키메라 인트론), 우드척 전사후 조절 요소(WPRE), 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호의 조절하에 XTEN 144 펩티드와 융합된(FVIIIXTEN) B-도메인 결실(BDD) 코돈 최적화된 인간 인자 VIII(BDDcoFVIII)을 암호화하는 CpG 모티프를 추가로 제거한 코돈 최적화된 cDNA를 포함한다. V3.0 카세트(서열번호 35)는 간-특이적 알파-1-안티트립신(A1AT) 프로모터, 하이브리드 합성 인트론(키메라 인트론), 우드척 전사후 조절 요소(WPRE), 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호의 조절하에 XTEN 144 펩티드와 융합된(FVIIIXTEN) B-도메인 결실(BDD) 코돈 최적화된 인간 인자 VIII(Co-BDD-FVIII)을 암호화하는 CpG 모티프를 추가로 제거한 코돈 최적화된 cDNA를 포함한다. FVIIIXTEN 발현 카세트는 파보바이러스 ITR에 의해 플랭킹된다.

도 2는 파보바이러스 ITR에 의해 플랭킹된 FVIIIXTEN 발현 카세트를, ITR 관련 서열을 인식하고 평할 말단 DNA를 생성하는 제한 효소로 분해하고, 95°C에서 분해의 이중가닥 DNA 산물(FVIII 발현 카세트 및 플라스미드 백본)을 열 변성시킨 후(변성), 4°C에서 냉각하여(복원) 회문 ITR 서열이 접히도록 한, ssDNA 생성에 사용되는 접근법의 도식적 표현을 보여준다. 생성된 ssFVIIIXTEN(ssDNA)을 HemA 마우스에서 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통한 전신 전달에 사용하였다.

도 3은 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 측정된 혈장 FVIII 활성 수준을 그래프로 표현한 것을 보여준다. 혈액 샘플은 B19 ITR에 의해 플랭킹된 단일가닥 V1.0 또는 V2.0 ssFVIIIXTEN(ssDNA) 800 µg/kg을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 전신 주사한 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스로부터 다양한 간격으로 수집되었다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 4는 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 측정된 혈장 FVIII 활성 수준을 그래프로 표현한 것을 보여준다. 혈장 샘플은 표시된 바와 같이 인간 보카바이러스(HBoV1), 인간 에리트로바이러스(B19), 거위 파보바이러스(GPV), 또는 이들의 변이체 ITR 또는 이들의 조합에 의해 플랭킹된 단일가닥 V2.0 ssFVIIIXTEN(ssDNA) 200, 800, 또는 1600 µg/kg을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 전신 주사한 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스로부터 다양한 간격으로 수집되었다. 2개의 하이브리드 ITR 세트도 시험하였다(5'B19-3'GPV 및 5'GPV-3'B19) 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. ITR 서열 및 이들의 변이체는 이전 미국 특허 출원 63/069,114호에 기술되어 있다.

도 5a 및 **5b**는 바칼로바이러스 시스템으로부터 얻은 정제된 ceFVIIIXTEN(ceDNA) 및 이들의 생체내 효능을 나타낸다. **도 5a**는 미국 특허 출원 63/069,073호에 기술된 바와 같이, 연속 용리 전기영동으로부터 얻은 AAV2 또는 HBoV1 ITR을 갖는 정제된 ceFVIIIXTEN(ceDNA)의 아가로스 겔 전기영동 이미지를 보여준다. 순도는 출발 물질(SM)과 비교하여 표시되며, 화살표는 FVIIIXTEN ceDNA 백터(ceDNA), 바칼로바이러스 DNA(vDNA), 및 Sf9 세포 계층 DNA(gDNA)의 크기에 해당하는 DNA 밴드를 나타낸다. **도 5b**는 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 측정된 혈장 FVIII 활성 수준을 그래프로 표현한 것을 보여준다. 혈장 샘플은 표시된 바와 같이 AAV2 또는 HBoV1 ITR에 의해 플랭킹된 ceFVIIIXTEN(ceDNA) 80, 40, 또는 12 µg/kg을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 전신 주사한 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스로부터 다양한 간격으로 수집되었다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. ITR 서열 및 이들의 변이체는 이전 미국 특허 출원 63/069,073호에 기술되어 있다.

도 6a 내지 **6c**는 HBoV1 ITR 구성체에서 FVIIIXTEN의 발현을 유도하는 간-특이적 mTTR 및 인간 A1AT 프로모터의 시험을 보여준다. **도 6a**는 HBoV1 WT ITR에 의해 플랭킹된 간-특이적 mTTR(서열번호 3) 또는 A1AT 프로모터를 갖는 FVIIIXTEN 발현 카세트의 개략도를 보여준다. **도 6b**는 설명된 제한 효소 분해에 의해 생성된 단일가닥 DNA(ssDNA) FVIIIXTEN HBoV1의 아가로스 겔 전기영동 이미지이다. **도 6c**는 도 6a에 도시된 mTTR 또는 A1AT 프로모터 구성체를 주사한 마우스에서의 정상 백분율로 정규화된 FVIII 발현 수준을 보여준다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 7a 내지 **7c**는 바칼로바이러스 시스템으로부터 얻은 정제된 ceFVIIIXTEN AAV2(ceDNA) 중에 대한 연구 결과를

보여준다. 도 7a는 연속 용리 전기영동으로부터 얻은 AAV2 WT ITR을 갖는 정제된 ceFVIIIXTEN(ceDNA)의 전장 (8.3kb) 및 절단된(6.0kb) 중을 나타내는 아가로스 겔 전기영동 이미지를 보여준다. 도 7b는 AAV2 WT ITR을 갖는 전장 8.3kb ceFVIIIXTEN(상단 패널) 및 절단된 6.0kb ceFVIIIXTEN(하단 패널)의 차세대 염기서열(NGS) 분석을 보여준다. 도 7c는 전장 또는 절단된 ceFVIIIXTEN AAV2 구성체를 80 또는 40 $\mu\text{g/kg}$ 으로 주사한 마우스에서의 정상의 백분율로 정규화된 FVIII 발현 수준을 보여준다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 8a 및 8b는 바칼로바이러스 시스템으로부터 얻은 정제된 ceFVIIIXTEN(ceDNA) 및 이들의 생체내 효능을 나타낸다. 도 8a는 미국 특허 출원 63/069,073호에 기술된 바와 같이, 연속 용리 전기영동으로부터 얻은 AAV2 또는 HBoV1 ITR을 갖는 정제된 ceFVIIIXTEN(ceDNA)의 아가로스 겔 전기영동 이미지를 보여준다. 순도는 출발 물질(SM)과 비교하여 표시되며, 화살표는 FVIIIXTEN ceDNA 벡터(ceDNA), 바칼로바이러스 DNA(vDNA), 및 Sf9 세포 계층 DNA(gDNA)의 크기에 해당하는 DNA 밴드를 나타낸다. 도 8b는 표시된 바와 같이 AAV2 또는 HBoV1 ITR에 의해 플랭킹된 ceFVIIIXTEN(ceDNA) 80 또는 40 $\mu\text{g/kg}$ 을 주사한 마우스에서의 정상의 백분율로 정규화된 FVIII 발현 수준을 보여준다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명은 인자 VIII(FVIII) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 코돈 최적화된 유전자를 기술한다. 본 발명은 인자 VIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 코돈 최적화된 핵산 분자, 최적화된 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 최적화된 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드, 및 이러한 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 혈우병과 같은 출혈 장애를 치료하는 방법으로서, 최적화된 인자 VIII 핵산 서열, 최적화된 핵산 서열을 포함하는 벡터, 또는 이에 의해 암호화된 폴리펩티드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명은 숙주 세포에서 증가된 발현을 나타내고, 재조합 FVIII를 생산하는 방법에서 FVIII 단백질의 향상된 수율을 나타내고, 유전자 치료 방법에 사용될 때 잠재적으로 더 큰 치료 효능을 나타내는 최적화된 FVIII 서열을 제공함으로써 당업계의 중요한 요구를 충족시킨다. 특정 구현예에서, 본 발명은 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열과 서열 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 기술한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열과 서열 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 기술한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열과 서열 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 기술한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열과 서열 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 기술한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 XTEN 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다.
- [0039] 본 명세서 및 청구범위에 대한 명확한 이해를 제공하기 위해, 다음 정의가 아래에 제공된다.
- [0040] **정의**
- [0041] 단수 형태의 개체는 하나 이상의 해당 개체를 지칭함에 유의해야 한다. 예를 들어 "뉴클레오티드 서열"은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "하나", "하나 이상", 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0042] "약"이라는 용어는 본원에서 대략, 거의, ~쯤, 또는 ~정도를 의미하는 것으로 사용된다. "약"이라는 용어가 수치 범위와 함께 사용되는 경우, 이는 제시된 수치 값의 위와 아래로 경계를 확장하여 해당 범위를 수식한다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에서 10% 위 또는 아래의(더 높거나 더 낮은) 분산만큼 언급된 값보다 높고 낮은 수치 값을 수식하는 것으로 사용된다.
- [0043] 본 발명의 목적상 "단리된"이라는 용어는 생물학적 물질(세포, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체)이 원래의 환경(해당 물질이 자연적으로 존재하는 환경)으로부터 제거된 경우를 나타낸다. 예를 들어, 식물 또는 동물에서 자연 상태에 존재하는 폴리뉴클레오티드는 단리된 것이 아니지만, 동일한 폴리뉴클레오티드가 자연적으로 존재하는 인접 핵산으로부터 분리된 경우 "단리된" 것으로 간주된다. 특정 수준의 정제가 필요하지는 않다. 재조합적으로 생산된 폴리펩티드 및 숙주 세포에서 발현된 단백질은 임의의 적합한 기술에 의해 분리되거나, 분획되거나, 또는 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 천연 또는 재조합 폴리펩티드와 마찬가지로 본 발명의 목적상 단리된 것으로 간주된다.
- [0044] "핵산", "핵산 분자", "올리고뉴클레오티드", 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되며, 단일가닥 형태 또는 이중가닥 나선형의, 리보뉴클레오타이드(아데노신, 구아노신, 우리딘, 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데

옥시리보뉴클레오시드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티미딘, 또는 데옥시시티딘; "DNA 분자")의 인산 에스테르 중합체 형태, 또는 이의 임의의 포스포에스테르 유사체, 예컨대 포스포로티오에이트 및 티오에스테르를 지칭한다. 이중가닥 DNA-DNA, DNA-RNA, 및 RNA-RNA 나선형이 가능하다. 핵산 분자, 특히 DNA 또는 RNA 분자라는 용어는 분자의 1차 및 2차 구조만을 의미하며, 임의의 특정 3차 형태로 제한하지 않는다. 따라서, 이 용어는 특히 선형 또는 원형 DNA 분자(예를 들어, 제한 단편), 플라스미드, 초나선형 DNA, 및 염색체에서 발견되는 이중가닥 DNA를 포함한다. 특정 이중가닥 DNA 분자의 구조를 논의할 때, 서열은 전사되지 않은 DNA 가닥(즉, mRNA에 상동성인 서열을 갖는 가닥)을 따라 5'에서 3' 방향으로만 서열을 부여하는 통상적인 관례에 따라 본원에서 기술될 수 있다. "재조합 DNA 분자"는 분자생물학적 조작을 거친 DNA 분자이다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 합성 DNA, 및 반합성 DNA를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 "핵산 조성물"은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 핵산을 포함한다.

[0045] 본원에서 사용되는 바와 같이, "암호화 영역" 또는 "암호화 서열"은 아미노산으로 번역될 수 있는 코돈으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일부이다. "종결 코돈"(TAG, TGA, 또는 TAA)은 일반적으로 아미노산으로 번역되지 않지만, 암호화 영역의 일부인 것으로 간주될 수 있다. 그러나, 임의의 플랜킹 서열, 예를 들어 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결자, 인트론 등은 암호화 영역의 일부가 아니다. 일반적으로 암호화 영역의 경계는 생성된 폴리펩티드의 아미노 말단을 암호화하는 5' 말단의 개시 코돈, 및 생성된 폴리펩티드의 카복실 말단을 암호화하는 3' 말단의 번역 종결 코돈에 의해 결정된다. 2개 이상의 암호화 영역이 단일 폴리뉴클레오티드 구성체에, 예를 들어 단일 벡터에, 또는 개별 폴리뉴클레오티드 구성체에, 예를 들어 개별(상이한) 벡터에 존재할 수 있다. 따라서, 단일 벡터는 단지 하나의 암호화 영역을 포함할 수 있거나 2개 이상의 암호화 영역을 포함할 수 있다.

[0046] 포유류 세포에 의해 분비된 특정 단백질은 조면 소포체에 걸쳐 성장하는 단백질 쇄의 배출이 개시되면 성숙 단백질로부터 절단되는 분비 신호 펩티드와 회합된다. 당업자는 신호 펩티드가 일반적으로 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 완전한 또는 "전장" 폴리펩티드로부터 절단되어 분비된 또는 "성숙" 형태의 폴리펩티드를 생성한다는 것을 알고 있다. 특정 구현예에서, 천연 신호 펩티드 또는 해당 서열의 기능성 유도체는 이와 작동가능하게 회합된 폴리펩티드의 분비를 지시하는 능력을 보유한다. 대안적으로, 이중 포유류 신호 펩티드, 예를 들어 인간 조직 플라스미노겐 활성화자(TPA) 또는 마우스 β -글루쿠로니다제 신호 펩티드, 또는 이의 기능성 유도체가 사용될 수 있다.

[0047] "하류"라는 용어는 기준 뉴클레오티드 서열의 3'에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 특정 구현예에서, 하류 뉴클레오티드 서열은 전사의 개시점 다음에 있는 서열과 관련이 있다. 예를 들어, 유전자의 번역 개시 코돈은 전사 개시 부위의 하류에 위치한다.

[0048] "상류"라는 용어는 기준 뉴클레오티드 서열의 5'에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 특정 구현예에서, 상류 뉴클레오티드 서열은 암호화 영역 또는 전사 개시점의 5'측에 위치하는 서열과 관련이 있다. 예를 들어, 대부분의 프로모터는 전사 개시 부위의 상류에 위치한다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 카세트"는 관심 폴리뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 적절한 숙주 세포에서 특정 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 지시할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 유전자 카세트는 암호화 영역의 상류(5' 비암호화 서열), 내부, 또는 하류(3' 비암호화 서열)에 위치하여 관련 암호화 영역의 전사, RNA 가공, 안정성, 번역에 영향을 미치는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 암호화 영역이 진핵 세포에서 발현되도록 의도된 경우, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결 서열은 일반적으로 암호화 서열의 3'에 위치할 것이다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 유전자 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 miRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 이중 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. miRNA 또는 유전자 산물(예를 들어, 치료용 단백질과 같은 폴리펩티드)과 같은 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 암호화 영역과 작동가능하게 회합된 프로모터 및/또는 다른 발현(예를 들어, 전사 또는 번역) 제어 서열을 포함할 수 있다. 작동가능한 회합에서, 유전자 산물, 예를 들어 폴리펩티드에 대한 암호화 영역은 유전자 산물의 발현을 조절 영역(들)의 영향 또는 제어하에 두는 방식으로 하나 이상의 조절 영역과 회합된다. 예를 들어, 프로모터 기능의 유도가 암호화 영역에 의해 암호화된 유전자 산물을 암호화하는 mRNA의 전사를 일으키는 경우, 및 프로모터와 암호화 영역 사이의 연결의 성질이 유전자 산물의 발현을 지시하는 프로모터의 능력을 방해하지 않거나 또는 전사되는 DNA 주형의 능력을 방해하지 않는 경우, 암호화 영역과 프로모터는 "작동가능하게 회합"된 것이다. 프로모터 외에 다른 발현 제어 서열, 예를 들어 인핸서, 오퍼레이터, 리프레서, 및 전사 종결 신호가 또한 유전자 산물 발현을 지시하도록 암호화 영역과 작동가능하게 회합될 수 있다.

- [0050] "발현 제어 서열"은 숙주 세포에서 암호화 서열의 발현을 제공하는 프로모터, 인핸서, 종결자 등과 같은 조절 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일반적으로 발현 제어 서열은 작동가능하게 연결된 암호화 핵산의 효율적인 전사 및 번역을 용이하게 하는 임의의 조절 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 발현 제어 서열의 비제한적인 예는 프로모터, 인핸서, 번역 리더 서열, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, RNA 가공 부위, 이펙터 결합 부위, 또는 스템-루프 구조를 포함한다. 다양한 발현 제어 서열이 당업자에게 알려져 있다. 여기에는 사이토메갈로바이러스(인트론-A와 함께, 즉시 초기 프로모터), 유인원 바이러스 40(초기 프로모터), 및 레트로바이러스(예: 라우스 육종 바이러스) 유래의 프로모터 및 인핸서 세그먼트와 같은(이에 한정되지 않음), 척추동물 세포에서 기능하는 발현 제어 서열이 제한 없이 포함된다. 다른 발현 제어 서열은 척추동물 유전자로부터 유래된 것들, 예컨대 액틴, 열충격 단백질, 소 성장 호르몬, 및 토끼 β -글로빈, 뿐만 아니라 진핵 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열을 포함한다. 추가의 적합한 발현 제어 서열은 조직-특이적 프로모터 및 인핸서, 뿐만 아니라 림포카인-유도성 프로모터(예를 들어, 인터페론 또는 인터류킨에 의해 유도가능한 프로모터)를 포함한다. 다른 발현 제어 서열은 인트론 서열, 전사후 조절 요소, 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 추가의 예시적 발현 제어 서열은 본 명세서의 다른 곳에서 논의된다.
- [0051] 유사하게, 다양한 번역 제어 요소가 당업자에게 알려져 있다. 여기에는 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 및 피코르나바이러스 유래 요소(특히, 내부 리보솜 진입 부위, 또는 IRES)가 포함되나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 본원에서 사용되는 용어 "발현"은 폴리뉴클레오티드가 유전자 산물, 예를 들어 RNA 또는 폴리펩티드를 생성하는 과정을 의미한다. 여기에는 폴리뉴클레오티드의 메신저 RNA(mRNA), 운반 RNA(tRNA), 작은 헤어핀 RNA(shRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 또는 임의의 다른 RNA 산물로의 전사, 및 mRNA의 폴리펩티드로의 번역이 제한 없이 포함된다. 발현은 "유전자 산물"을 생성한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자 산물은 핵산, 예를 들어 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA, 또는 전사체로부터 번역된 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 기술된 유전자 산물은 전사후 변형, 예를 들어 폴리아데닐화 또는 스플라이싱을 갖는 핵산, 또는 번역후 변형, 예를 들어 메틸화, 글리코실화, 지질 첨가, 다른 단백질 서브유닛과의 회합, 또는 단백질 분해 절단을 갖는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "수율"은 유전자의 발현에 의해 생성된 폴리펩티드의 양을 나타낸다.
- [0053] "벡터"는 핵산의 클로닝 및/또는 숙주 세포 내로의 전달을 위한 임의의 비히클을 지칭한다. 벡터는 부착된 분절의 복제를 일으키도록 다른 핵산 분절이 부착될 수 있는 레플리콘일 수 있다. "레플리콘"은 생체내 복제의 자율 단위로서 기능하는, 즉 자체 제어하에 복제가 가능한 임의의 유전 요소(예를 들어, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 의미한다. 용어 "벡터"는 핵산을 시험관내, 생체외, 또는 생체내 세포에 도입하기 위한 바이러스 비히클 및 비바이러스 비히클 둘 다를 포함한다. 예를 들어 플라스미드, 변형된 진핵 바이러스, 또는 변형된 박테리아 바이러스를 포함하는 다수의 벡터가 당업계에 알려져 있고 사용된다. 적합한 벡터 내에 폴리뉴클레오티드를 삽입하는 것은 상보적 점착성 말단을 갖는 선택된 벡터 내에 적절한 폴리뉴클레오티드 단편을 결합시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0054] 벡터는 벡터를 통합한 세포의 선택 또는 식별을 제공하는 선별 마커 또는 리포터를 암호화하도록 조작될 수 있다. 선별 마커 또는 리포터의 발현은 벡터에 포함된 다른 암호화 영역을 통합하고 발현하는 숙주 세포의 식별 및/또는 선택을 가능하게 한다. 당업계에 알려져 있고 사용되는 선별 마커 유전자의 예는 암피실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 카나마이신, 하이그로마이신, 비알라포스 제조제, 설펜아미드 등에 대한 내성을 제공하는 유전자; 및 표현형 마커로 사용되는 유전자, 즉 안토시아닌 조절 유전자, 이소펜타닐 트랜스퍼라제 유전자 등을 포함한다. 당업계에 알려져 있고 사용되는 리포터의 예는 루시퍼라제(Luc), 녹색 형광 단백질(GFP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), β -갈락토시다제(LacZ), β -글루쿠로니다제(Gus) 등을 포함한다. 선별 마커는 리포터로 간주될 수도 있다.
- [0055] 용어 "선별 마커"는 식별 인자, 일반적으로는 마커 유전자의 효과, 즉 항생제 내성, 제조제 내성에 기초하여 선택될 수 있는 항생제 또는 화학물질 내성 유전자, 비색 마커, 효소, 형광 마커 등을 의미하며, 이러한 효과를 이용해 관심 핵산의 유전성을 추적하고/하거나 관심 핵산을 유전시킨 세포 또는 유기체를 식별한다. 당업계에 알려져 있고 사용되는 선별 마커 유전자의 예는 암피실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 카나마이신, 하이그로마이신, 비알라포스 제조제, 설펜아미드 등에 대한 내성을 제공하는 유전자; 및 표현형 마커로 사용되는 유전자, 즉 안토시아닌 조절 유전자, 이소펜타닐 트랜스퍼라제 유전자 등을 포함한다.
- [0056] 용어 "리포터 유전자"는 리포터 유전자의 효과에 기초하여 식별될 수 있는 식별 인자를 암호화하는 핵산을 의미하며, 이러한 효과를 이용해 관심 핵산의 유전성을 추적하고/하거나, 관심 핵산을 유전시킨 세포 또는 유기체를

식별하고/하거나, 유전자 발현 유도 또는 전사를 측정한다. 당업계에 알려져 있고 사용되는 리포터 유전자의 예는 루시페라제(Luc), 녹색 형광 단백질(GFP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), β -갈락토시다제(LacZ), β -글루쿠로니다제(Gus) 등을 포함한다. 선별 마커 유전자는 리포터 유전자로 간주될 수도 있다.

[0057] "프로모터" 및 "프로모터 서열"은 상호교환적으로 사용되며, 암호화 서열 또는 기능성 RNA의 발현을 제어할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 일반적으로, 암호화 서열은 프로모터 서열의 3'에 위치한다. 프로모터는 그 전체가 천연 유전자로부터 유래되거나, 자연에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성되거나, 심지어 합성 DNA 분절을 포함할 수 있다. 상이한 프로모터가 상이한 조직 또는 세포 유형에서, 또는 상이한 발달 단계에서, 또는 상이한 환경적 또는 생리학적 조건에 반응하여 유전자의 발현을 지시할 수 있음을 당업자는 이해한다. 대부분의 경우 대부분의 세포 유형에서 유전자가 발현되도록 하는 프로모터를 일반적으로 "항시성 프로모터"라고 한다. 특정 세포 유형에서 유전자가 발현되도록 하는 프로모터를 일반적으로 "세포-특이적 프로모터" 또는 "조직-특이적 프로모터"라고 한다. 특정 발달 또는 세포 분화 단계에서 유전자가 발현되도록 하는 프로모터를 일반적으로 "발달-특이적 프로모터" 또는 "세포 분화-특이적 프로모터"라고 한다. 프로모터를 유도하는 제제, 생물학적 분자, 화학물질, 리간드, 광 등으로 세포를 노출시키거나 처리한 후 유도되어 유전자가 발현되도록 하는 프로모터를 일반적으로 "유도성 프로모터" 또는 "조절가능한 프로모터"라고 한다. 또한, 대부분의 경우 조절 서열의 정확한 경계가 완전히 정의되는 않았기 때문에, 길이가 다른 DNA 단편이 동일한 프로모터 활성을 가질 수 있음이 인식된다. 추가의 예시적 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된다.

[0058] 프로모터 서열은 일반적으로 전사 개시 부위에 의해 3' 말단에서 결합되고, 상류(5' 방향)로 연장되어 백그라운드보다 높은 검출가능한 수준에서 전사를 개시하는 데 필요한 최소 수의 염기 또는 요소를 포함한다. 프로모터 서열 내에서, 전사 개시 부위(예를 들어 뉴클레아제 S1에 의한 땀핑에 의해 편리하게 정의됨), 및 RNA 중합효소의 결합을 담당하는 단백질 결합 도메인(공통 서열)이 발견될 것이다.

[0059] 용어 "플라스미드"는 세포의 중심 대사의 일부가 아닌 보통 원형 이중가닥 DNA 분자의 형태인 대개 유전자를 운반하는 염색체의 요소를 지칭한다. 이러한 요소는 선택된 유전자 산물에 대한 DNA 서열 및 프로모터 단편을 적절한 3' 비번역 서열과 함께 세포 내로 도입할 수 있는 독특한 구성체로 다수의 뉴클레오타이드 서열이 연결되거나 재조합된, 임의의 공급원 유래의 단일가닥 또는 이중가닥 DNA 또는 RNA의 선형, 원형, 또는 초나선형, 자율 복제 서열, 계승 통합 서열, 파지 또는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

[0060] 사용될 수 있는 진핵 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 폭스바이러스, 예를 들어 백시니아 바이러스 벡터, 마를로바이러스 벡터, 또는 헤르페스바이러스 벡터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비바이러스 벡터는 플라스미드, 리포솜, 전기적으로 하전된 지질(사이토펙틴), DNA-단백질 복합체, 및 생체고분자를 포함한다.

[0061] "클로닝 벡터"는 순차적으로 복제되는 핵산의 단위 길이인 "레플리콘"을 의미하며, 이는 부착된 분질의 복제를 일으키도록 다른 핵산 분질이 부착될 수 있는 플라스미드, 파지, 또는 코스미드와 같은 복제 기점을 포함한다. 특정 클로닝 벡터는 하나의 세포 유형(예를 들어, 박테리아)에서 복제가 가능하고, 다른 세포 유형(예를 들어, 진핵 세포)에서 발현이 가능하다. 일반적으로 클로닝 벡터는 벡터를 포함하는 세포의 선택에 사용될 수 있는 하나 이상의 서열 및/또는 관심 핵산 서열의 삽입을 위한 하나 이상의 다수의 클로닝 부위를 포함한다.

[0062] 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포에 삽입된 후 삽입된 핵산 서열의 발현을 가능하게 하도록 설계된 비히클을 의미한다. 삽입된 핵산 서열은 전술된 바와 같이 조절 영역과 작동가능하게 회합되어 배치된다.

[0063] 벡터는 당업계에 잘 알려진 방법, 예를 들어 형질감염, 전기천공, 미세주입, 형질도입, 세포 융합, DEAE 텍스트란, 인산칼슘 침전, 리포펙션(리포솜 융합), 유전자 총의 사용, 또는 DNA 벡터 운반체에 의해 숙주 세포에 도입된다.

[0064] 본원에서 사용되는 "배양"은 세포 성장 또는 분열을 가능하게 하거나 세포를 살아있는 상태로 유지하는 시험관내 조건하에서 세포를 인큐베이션하는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 "배양된 세포"는 시험관내 증식된 세포를 의미한다.

[0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 단일 "폴리펩티드" 및 복수의 "폴리펩티드"를 포함하는 의미이며, 아미드 결합(펩티드 결합이라고도 함)에 의해 선형으로 연결된 단량체(아미노산)로 구성된 분자를 지칭한다. 용어 "폴리펩티드"는 2개 이상의 아미노산의 임의의 쇠 또는 쇠들을 의미하며, 특정 길이의 생성물을 의미하지는 않는다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드, "단백질", "아미노산 쇠", 또는 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 쇠 또는 쇠들을 나타내기 위해 사용되는 임의의 다른 용어는 "폴리펩티드"의 정

의 내에 포함되며, 용어 "폴리펩티드"는 임의의 이들 용어 대신, 또는 이와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어 "폴리펩티드"는 또한 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아마이드화, 알려진 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질 분해 절단, 또는 비자연발생적 아미노산에 의한 변형을 제한 없이 포함하는, 폴리펩티드의 발현후 변형의 산물을 나타내는 의미이다. 폴리펩티드는 천연 생물학적 공급원으로부터 유래되거나 재조합 기술로 생성될 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역되는 것은 아니다. 이는 화학적 합성을 포함하여 어떤 방식으로든 생성될 수 있다.

[0066] 용어 "아미노산"은 알라닌(Ala 또는 A); 아르기닌(Arg 또는 R); 아스파라긴(Asn 또는 N); 아스파르트산(Asp 또는 D); 시스테인(Cys 또는 C); 글루타민(Gln 또는 Q); 글루탐산(Glu 또는 E); 글리신(Gly 또는 G); 히스티딘(His 또는 H); 이소류신(Ile 또는 I); 라이신(Lys 또는 K); 메티오닌(Met 또는 M); 페닐알라닌(Phe 또는 F); 프롤린(Pro 또는 P); 세린(Ser 또는 S); 트레오닌(Thr 또는 T); 트립토판(Trp 또는 W); 티로신(Tyr 또는 Y); 및 발린(Val 또는 V)을 포함한다. 비전통적인 아미노산은 또한 본 발명의 범위 내에 있으며, 노르류신, 오미틴, 노르발린, 호모세린, 및 기타 아미노산 잔기 유사체, 예컨대 문헌[Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)]에 기술된 것들을 포함한다. 이러한 비자연발생적 아미노산 잔기를 생성하기 위해, 문헌[Noren *et al.* Science 244:182 (1989)] 및 상기 Ellman 등의 문헌의 절차가 사용될 수 있다. 간단히 말하면, 이들 절차는 비자연발생적 아미노산 잔기에 의한 억제자 tRNA의 화학적 활성화에 이은 RNA의 시험관내 전사 및 번역을 수반한다. 비전통적인 아미노산의 도입은 또한 당업계에 알려진 펩티드 화학을 사용하여 달성될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "극성 아미노산"은 0의 순 전하를 갖지만 측쇄의 상이한 부분에 0이 아닌 부분 전하를 갖는 아미노산(예를 들어, M, F, W, S, Y, N, Q, C)을 포함한다. 이러한 아미노산은 소수성 상호작용과 정전기적 상호작용에 관여할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "하전된 아미노산"은 측쇄에서 0이 아닌 순 전하를 가질 수 있는 아미노산(예를 들어, R, K, H, E, D)을 포함한다. 이러한 아미노산은 소수성 상호작용과 정전기적 상호작용에 관여할 수 있다.

[0067] 또한 폴리펩티드의 단편 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드 결합 도메인 또는 결합 분자를 언급할 때 용어 "단편" 또는 "변이체"는 기준 폴리펩티드의 특성(예를 들어, FcRn 결합 도메인 또는 Fc 변이체에 대한 FcRn 결합 친화도, FVIII 변이체에 대한 응고 활성, 또는 VWF 단편에 대한 FVIII 결합 활성) 중 적어도 일부를 유지하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드의 단편은 본원의 다른 곳에 논의된 특정 항체 단편 외에도 단백질 분해 단편 및 결실 단편을 포함하지만, 자연발생 전장 폴리펩티드(또는 성숙 폴리펩티드)를 포함하지는 않는다. 본 발명의 폴리펩티드 결합 도메인 또는 결합 분자의 변이체는 전술한 바와 같은 단편을 포함하고, 또한 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입으로 인해 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 변이체는 자연발생적 또는 비자연발생적일 수 있다. 비자연발생적 변이체는 당업계에 알려진 돌연변이유발 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 포함할 수 있다.

[0068] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열은 당업계에 정의되어 있다. 따라서, 폴리펩티드의 아미노산이 동일한 측쇄 계열의 다른 아미노산으로 대체되는 경우, 치환은 보존적인 것으로 간주된다. 다른 구현예에서, 아미노산의 스트링은 측쇄 계열 구성원의 순서 및/또는 조성을 달리하는 구조적으로 유사한 스트링으로 보존적으로 대체될 수 있다.

[0069] 당업계에 알려진 용어 "동일성 백분율"은 서열을 비교함으로써 결정되는, 2개 이상의 폴리펩티드 서열 또는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 관계이다. 당업계에서, "동일성"은 또한 경우에 따라 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 의미하며, 이는 이러한 서열의 스트링 사이의 일치에 의해 결정된다. "동일성"은 문헌[*Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); 및 *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991)]에 기술된 것들을 포함하되 이에 한정되지 않는 공지된 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 동일성

을 결정하는 바람직한 방법은 시험된 서열 간의 최상의 일치율을 제공하도록 설계된다. 동일성을 결정하는 방법은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램에 코드화되어 있다. 서열 정렬 및 동일성 백분율 계산은 LASERGENE bioinformatics 컴퓨팅 제품군의 Megalign 프로그램(DNASTAR Inc., Madison, WI), GCG 프로그램 제품군 (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX(Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)), 및 DNASTAR(DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 USA)와 같은 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 본 출원의 맥락 내에서, 서열 분석 소프트웨어가 분석에 사용되는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 분석 결과는 참조된 프로그램의 "기본값"을 기반으로 한다는 것이 이해될 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "기본값"은 처음에 초기설정될 때 소프트웨어에 의해 원래 로딩하는 값 또는 매개변수의 임의의 세트를 의미할 것이다. 본 발명의 최적화된 BDD FVIII 서열과 기준 서열 사이의 동일성 백분율을 결정하기 위해, 본 발명의 최적화된 BDD FVIII 서열의 뉴클레오타이드에 상응하는 기준 서열의 뉴클레오타이드만이 동일성 백분율을 계산하는 데 사용된다. 예를 들어, B 도메인을 함유하는 전장 FVIII 뉴클레오타이드 서열을 본 발명의 최적화된 B 도메인 결실(BDD) FVIII 뉴클레오타이드 서열과 비교할 때, A1, A2, A3, C1, 및 C2 도메인을 포함하는 정렬의 부분이 동일성 백분율을 계산하는 데 사용된다. (정렬에서 큰 "갭"을 발생시키는) B 도메인을 암호화하는 전장 FVIII 서열 부분의 뉴클레오타이드는 불일치로 계산되지 않을 것이다. 또한, 본 발명의 최적화된 BDD FVIII 서열 또는 이의 지정된 부분(예를 들어, 서열번호 14의 뉴클레오타이드 2183 내지 4474 및 4924 내지 7006)과 기준 서열 사이의 백분율 동일성을 결정함에 있어서, 백분율 동일성은 본원에 언급한 바와 같이, 일치된 뉴클레오타이드의 수를 최적화된 BDD-FVIII 서열 또는 이의 지정된 부분의 완전한 서열의 뉴클레오타이드의 총 수로 나누어 정렬함으로써 계산될 것이다.

[0070] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "삽입 부위"는 이중 모이어티가 삽입될 수 있는 위치의 바로 상류인, FVIII 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체에서의 위치를 의미한다. "삽입 부위"는 숫자로서 지정되고, 숫자는 삽입 위치의 바로 N-말단인 삽입 부위에 상응하는 성숙 천연 FVIII(서열 번호 20)에서의 아미노산의 수에 해당한다. 예를 들어, "a3이 서열번호 24의 아미노산 1656에 상응하는 삽입 부위에 이중 모이어티를 포함한다"라는 어구는 이중 모이어티가 서열번호 20의 아미노산 1656과 아미노산 1657에 상응하는 두 아미노산 사이에 위치한다는 것을 나타낸다.

[0071] 본원에서 사용되는 어구 "아미노산의 바로 하류"는 아미노산의 말단 카복실기의 바로 옆의 위치를 나타낸다. 유사하게, 어구 "아미노산의 바로 상류"는 아미노산의 말단 아민기 바로 옆의 위치를 나타낸다.

[0072] 본원에서 사용되는 용어 "삽입" 또는 문법상 관련된 용어는 천연 성숙 인간 FVIII(서열번호 20)에서의 유사한 위치에 대한 재조합 FVIII 폴리펩티드에서의 이중 모이어티의 위치를 나타낸다.

[0073] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "반감기"는 생체내 특정 폴리펩티드의 생물학적 반감기를 의미한다. 반감기는 대상체에게 투여된 양의 절반이 동물의 순환계 및/또는 다른 조직으로부터 제거되는 데 필요한 시간으로 표현될 수 있다. 주어진 폴리펩티드의 제거율 곡선이 시간의 함수로 구성될 때, 곡선은 일반적으로 빠른 α -상과 더 긴 β -상을 갖는 2상 곡선이다. α -상은 일반적으로 혈관내 공간과 혈관외 공간 사이의 투여된 Fc 폴리펩티드의 평형을 나타내며, 부분적으로는 폴리펩티드의 크기에 의해 결정된다. β -상은 일반적으로 혈관내 공간에서의 폴리펩티드의 이화작용을 나타낸다. 일부 구현예에서, FVIII 및 FVIII을 포함하는 키메라 단백질은 단상이므로, 알파 상을 갖지 않고 단지 단일 베타 상을 갖는다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원에서 사용되는 용어 반감기는 β -상에서의 폴리펩티드의 반감기를 의미한다.

[0074] 본원에서 사용되는 용어 "연결"은 제1 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열이 각각 제2 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열에 공유 또는 비공유 결합됨을 나타낸다. 제1 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열은 제2 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열에 직접 연결되거나 병치될 수 있거나, 대안적으로 개재 서열이 제1 서열을 제2 서열에 공유 연결할 수 있다. 용어 "연결"은 C-말단 또는 N-말단에서 제1 아미노산 서열이 제2 아미노산 서열에 융합되는 것을 의미할 뿐만 아니라, 전체 제1 아미노산 서열(또는 제2 아미노산 서열)이 제2 아미노산 서열(또는 제1 아미노산 서열, 각각)의 임의의 2개의 아미노산에 삽입되는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 아미노산 서열은 펩티드 결합 또는 링커에 의해 제2 아미노산 서열에 연결될 수 있다. 제1 뉴클레오타이드 서열은 포스포디에스테르 결합 또는 링커에 의해 제2 뉴클레오타이드 서열에 연결될 수 있다. 링커는 펩티드 또는 폴리펩티드(폴리펩티드 쇠의 경우) 또는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 쇠(뉴클레오타이드 쇠의 경우) 또는 임의의 화학적 모이어티(폴리펩티드 및 폴리뉴클레오타이드 쇠 둘 모두의 경우)일 수 있다. 용어 "연결"은 하이픈(-)으로도 표시된다.

[0075] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "회합된"은 제1 아미노산 쇠와 제2 아미노산 쇠 사이에 형성된 공유 또는

비공유 결합을 의미한다. 일 구현예에서, 용어 "회합된"은 공유, 비펩티드 결합 또는 비공유 결합을 의미한다. 이 회합은 콜론, 즉 (:)으로 표시될 수 있다. 다른 구현예에서, 이는 펩티드 결합을 제외한 공유 결합을 의미한다. 예를 들어, 아미노산 시스테인은 제2 시스테인 잔기 상의 티올기와 함께 이황화 결합 또는 가교를 형성할 수 있는 티올기를 포함한다. 대부분의 자연발생 IgG 분자에서, CH1 영역과 CL 영역은 이황화 결합에 의해 회합되고, 2개의 중쇄는 Kabat 넘버링 시스템을 사용하여 239 및 242(EU 넘버링 시스템의 경우 위치 226 또는 229)에 상응하는 위치에서 2개의 이황화 결합에 의해 회합된다. 공유 결합의 예는 펩티드 결합, 금속 결합, 수소 결합, 이황화 결합, 시그마 결합, 파이 결합, 델타 결합, 글리코시드 결합, 애그노스틱(agnostic) 결합, 굽은 결합, 쌍극자 결합, 파이 백본드, 이중 결합, 삼중 결합, 4중 결합, 5중 결합, 6중 결합, 공액, 초공액, 방향족성, 합도결합성, 또는 반결합을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비공유 결합의 비제한적인 예는 이온 결합(예를 들어, 양이온-파이 결합 또는 염 결합), 금속 결합, 수소 결합(예를 들어, 이수소 결합, 이수소 착물, 낮은 장벽 수소 결합, 또는 대칭 수소 결합), 반데르발스 힘, 런던 분산력, 기계적 결합, 할로젠 결합, 친금성, 인터칼레이션, 스테킹, 엔트로피력, 또는 화학적 극성을 포함한다.

[0076] 본원에서 사용되는 "지혈"은 출혈 또는 대출혈의 정지 또는 둔화; 또는 혈관 또는 신체 부위를 통한 혈류의 정지 또는 둔화를 의미한다.

[0077] 본원에서 사용되는 "지혈 장애"는 피브린 응고물질을 형성하는 능력이 손상되거나 없음으로 인한 자발적 또는 외상성 출혈 경향을 특징으로 하는 유전적으로 유전되거나 후천적인 병태를 의미한다. 이러한 장애의 예는 혈우병을 포함한다. 세 가지 주요 형태는 A형 혈우병(인자 VIII 결핍증), B형 혈우병(인자 IX 결핍증 또는 "크리스마스병"), 및 C형 혈우병(인자 XI 결핍증, 경미한 출혈 경향)이다. 기타 지혈 장애는 예를 들어 폰 빌레브란트 질환, 인자 XI 결핍증(PTA 결핍증), 인자 XII 결핍증, 피브리노겐, 프로트롬빈, 인자 V, 인자 VII, 인자 X, 또는 인자 XIII의 결핍증 또는 구조적 이상, GPIb의 결함 또는 결핍증인 베르나르-솔리에(Bernard-Soulier) 증후군을 포함한다. vWF에 대한 수용체인 GPIb는 결함이 있을 수 있으며, 1차 혈전 형성(1차 지혈)의 부족과 출혈 경향 증가, 및 글란즈만 및 네겔리(Glanzmann and Naegeli)의 혈소판무력증(글란즈만 혈소판무력증)으로 이어질 수 있다. 간부전(급성 및 만성 형태)에서, 간에 의한 응고 인자 생성이 불충분하고; 이는 출혈 위험을 증가시킬 수 있다.

[0078] 본 발명의 단리된 핵산 분자, 단리된 폴리펩티드, 또는 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터는 예방적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방적 치료"는 출혈 에피소드 이전에 분자를 투여하는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 일반 지혈제를 필요로 하는 대상체는 수술을 받고 있거나, 수술을 받을 예정이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 또는 벡터는 예방적으로 수술 전 또는 수술 후에 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 또는 벡터는 급성 출혈 에피소드를 제어하기 위해 수술 중 또는 수술 후에 투여될 수 있다. 수술은 간 이식, 간 절제, 치과 시술, 또는 줄기 세포 이식을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0079] 본 발명의 단리된 핵산 분자, 단리된 폴리펩티드, 또는 벡터는 대증적 치료에 또한 사용된다. 용어 "대증적 치료"는 단리된 핵산 분자, 단리된 폴리펩티드, 또는 벡터를 출혈 에피소드의 증상에 반응하여 투여하거나, 출혈을 유발할 수 있는 활동 전에 투여하는 것을 의미한다. 일 양태에서, 대증적 치료는 출혈이 시작될 때, 예컨대 손상 후에, 또는 출혈이 예상될 때, 예컨대 수술 전에 대상체에게 제공될 수 있다. 다른 양태에서, 대증적 치료는 접촉 스포츠와 같이 출혈 위험을 증가시키는 활동 전에 제공될 수 있다.

[0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "급성 출혈"은 근본 원인과 무관하게 출혈 에피소드를 의미한다. 예를 들어, 대상체는 외상, 요독증, 유전성 출혈 장애(예를 들어, 인자 VII 결핍증), 혈소판 장애, 또는 응혈 인자에 대한 항체의 발생으로 인한 내성을 가질 수 있다.

[0081] 본원에서 사용되는 "치료"는 예를 들어 질환 또는 병태의 중증도를 감소시키는 것; 질환 경과 기간을 단축시키는 것; 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상을 개선하는 것; 질환 또는 병태를 반드시 치유하지 않고도 질환 또는 병태가 있는 대상체에게 유익한 효과를 제공하는 것; 또는 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상을 예방하는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 용어 "치료"는 본 발명의 단리된 핵산 분자, 단리된 폴리펩티드, 또는 벡터를 투여함으로써 대상체에서 FVIII 최저 수준을 적어도 약 1 IU/dL, 2 IU/dL, 3 IU/dL, 4 IU/dL, 5 IU/dL, 6 IU/dL, 7 IU/dL, 8 IU/dL, 9 IU/dL, 10 IU/dL, 11 IU/dL, 12 IU/dL, 13 IU/dL, 14 IU/dL, 15 IU/dL, 16 IU/dL, 17 IU/dL, 18 IU/dL, 19 IU/dL, 또는 20 IU/dL로 유지하는 것을 의미한다. 다른 구현예에서, 치료는 FVIII 최저 수준을 약 1 내지 약 20 IU/dL, 약 2 내지 약 20 IU/dL, 약 3 내지 약 20 IU/dL, 약 4 내지 약 20 IU/dL, 약 5 내지 약 20 IU/dL, 약 6 내지 약 20 IU/dL, 약 7 내지 약 20 IU/dL, 약 8 내지 약 20 IU/dL, 약 9

내지 약 20 IU/dL, 또는 약 10 내지 약 20 IU/dL로 유지하는 것을 의미한다. 질환 또는 병태의 치료는 또한 비혈우병 대상체의 FVIII 활성의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%에 필적하는 수준으로 대상체의 FVIII 활성을 유지하는 것을 포함할 수 있다. 치료에 필요한 최소 최저 수준은 하나 이상의 공지된 방법으로 측정할 수 있으며, 개인별로 조정(증가 또는 감소)될 수 있다.

[0082] 본원에서 사용되는 "투여"는 본 발명의 약학적으로 허용되는 인자 VIII-암호화 핵산 분자, 인자 VIII 폴리펩티드, 또는 인자 VIII-암호화 핵산 분자를 포함하는 벡터를 약학적으로 허용되는 경로를 통해 대상체에게 제공하는 것을 의미한다. 투여 경로는 정맥내, 예를 들어 정맥내 주사 및 정맥내 주입일 수 있다. 추가의 투여 경로는 예를 들어 피하, 근육내, 경구, 비강, 및 폐 투여를 포함한다. 핵산 분자, 폴리펩티드, 및 벡터는 적어도 하나의 부형제를 포함하는 약학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.

[0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "이를 필요로 하는 대상체"는 예를 들어 지혈을 개선하기 위한 본 발명의 핵산 분자, 폴리펩티드, 또는 벡터의 투여로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체, 예컨대 포유류 대상체를 포함한다. 일 구현예에서, 대상체는 혈우병이 있는 개체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 다른 구현예에서, 대상체는 FVIII 억제제를 발생시켜 우회 치료를 필요로 하는 개체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 대상체는 성인 또는 미성년자(예를 들어, 12세 미만)일 수 있다.

[0084] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "응혈 인자"는 대상체의 출혈 에피소드를 예방하거나 이의 기간을 감소시키는, 자연적으로 발생하거나 재조합적으로 생산된, 분자 또는 이의 유사체를 의미한다. 즉, 이는 응혈촉진 활성을 갖는, 즉 피브리노겐을 불용성 피브린 메쉬로 전환하여 혈액을 응고시키거나 응혈시키는 역할을 하는 분자를 의미한다. "활성화 가능한 응혈 인자"는 활성 형태로 전환될 수 있는 불활성 형태(예를 들어, 효소원 형태)의 응혈 인자이다.

[0085] 본원에서 사용되는 "응혈 활성"은 피브린 응고물질의 형성으로 이어지고/이어지거나, 대출혈 또는 출혈 에피소드의 중증도, 기간, 또는 빈도를 감소시키는 일련의 생화학적 반응에 관여하는 능력을 의미한다.

[0086] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이종성" 또는 "외인성"은 주어진 환경, 예를 들어 세포 또는 폴리펩티드에서 일반적으로 발견되지 않는 분자를 의미한다. 예를 들어, 외인성 또는 이종성 분자는 세포에 도입될 수 있고, 예를 들어 형질감염 또는 다른 형태의 유전자 조작을 통해 세포를 조작한 후에만 존재하거나, 이종 아미노산 서열은 이것이 자연적으로 발견되지 않는 단백질에 존재할 수 있다.

[0087] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이종 뉴클레오타이드 서열"은 주어진 폴리뉴클레오타이드 서열과 함께 자연적으로 발생하지 않는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 일 구현예에서, 이종 뉴클레오타이드 서열은 FVIII의 반감기를 연장시킬 수 있는 폴리펩티드를 암호화한다. 다른 구현예에서, 이종 뉴클레오타이드 서열은 FVIII의 유체역학적 반경을 증가시키는 폴리펩티드를 암호화한다. 다른 구현예에서, 이종 뉴클레오타이드 서열은 FVIII의 생물학적 활성 또는 기능(예를 들어, 응고촉진 활성)에 유의미한 영향을 미치지 않으면서 FVIII의 하나 이상의 약동학적 특성을 개선하는 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, FVIII은 이종 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드에 링커에 의해 연결되거나 이어진다.

[0088] 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과의 비교로서 본원에서 사용될 때 "기준 뉴클레오타이드 서열"은 FVIII 서열에 상응하는 부분이 최적화되지 않은 점을 제외하고는 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 본질적으로 동일한 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자에 대한 기준 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 32이다.

[0089] 본원에서 사용되는 바와 같이, 뉴클레오타이드 서열과 관련하여, 용어 "최적화된"은 폴리뉴클레오타이드 서열이 해당 폴리뉴클레오타이드 서열의 특성을 향상시키도록 돌연변이된, 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 일부 구현예에서, 최적화는 전사 수준의 증가, 번역 수준의 증가, 정상 상태 mRNA 수준의 증가, 일반 전사 인자와 같은 조절 단백질의 결합의 증가 또는 감소, 스플라이싱의 증가 또는 감소, 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 생성된 폴리펩티드의 수율의 증가를 위해 수행된다. 폴리뉴클레오타이드 서열을 최적화하기 위해 이루어질 수 있는 변화의 예는 코돈 최적화, G/C 함량 최적화, 반복 서열의 제거, AT 풍부 요소의 제거, 잠적 스플라이스 부위의 제거, 전사 또는 번역을 억제하는 시스-작용 요소의 제거, poly-T 또는 poly-A 서열의 추가 또는 제거, 전사를 향상시키는 전사 개시 부위 주위의 서열 추가, 예컨대 Kozak 공통 서열 추가, 스템 루프 구조를 형성할 수 있는 서열의 제거, 불안정화 서열의 제거, CpG 모티프의 제거, 및 이들의 둘 이상의 조합을 포함한다.

[0090] 폴리뉴클레오타이드 서열

- [0091] 본 발명의 특정 양태는 유전자 치료를 위한 AAV 벡터의 결함을 극복하는 것을 목표로 한다. 특히, 본 발명의 일부 양태는, 예를 들어 치료용 단백질 및/또는 miRNA를 암호화하는, 유전자 카세트를 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 치료용 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 치료용 단백질은 응혈 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 miRNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 적어도 하나의 비암호화 영역을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 비암호화 영역은 프로모터 서열, 인트론, 조절 요소, 3'UTR poly(A) 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 조절 요소는 전사후 조절 요소이다.
- [0092] 일 구현예에서, 유전자 카세트는 단일가닥 핵산이다. 다른 구현예에서, 유전자 카세트는 이중가닥 핵산이다. 다른 구현예에서, 유전자 카세트는 단편 말단 이중가닥 핵산(ceDNA)이다.
- [0093] 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 FVIII 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화된다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 mTTR 프로모터 및 합성 인트론에 의해 유도되는 코돈 최적화된 FVIII를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는, 전체가 참조로 포함되는 국제 출원 PCT/US2017/015879호에 개시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 PCT/US2017/015879에 기술된 바와 같은 "hFVIIICo6XTEN" 유전자 카세트이다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 32를 포함한다.
- [0094] 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 XTEN 144 펩티드와 융합된 B-도메인 결실(BDD) 코돈 최적화된 인간 인자 VIII(BDDcoFVIII)를 암호화하는 코돈 최적화된 cDNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 9로 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 14로 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 33으로 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 서열번호 35로 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 XTEN 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다.
- [0095] 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 mTTR 프로모터 및 합성 인트론에 의해 유도되는 코돈 최적화된 FVIII를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 카세트는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHPA) 신호를 추가로 포함한다.
- [0096] 일부 구현예에서, 본 발명은 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 코돈 최적화된 핵산 분자에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 전장 FVIII 폴리펩티드를 암호화한다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 FVIII의 B 도메인의 전부 또는 일부가 결실된 B 도메인-결실(BDD) FVIII 폴리펩티드를 암호화한다. 특정 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 10 또는 이의 단편에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0097] 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는 신호 펩티드 또는 이의 단편을 포함하는 FVIII 폴리펩티드를 암호화한다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 신호 펩티드가 결여된 FVIII 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0098] 본원에서 사용되는 바와 같은 "FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드"는 달리 명시되지 않는 한, 응고에서 정상적인 역할을 하는 기능성 FVIII 폴리펩티드를 의미한다. FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드라는 용어는 응고 경로에서 전장 야생형 인자 VIII의 기능을 유지하는 이의 기능성 단편, 변이체, 유사체, 또는 유도체를 포함한다. "FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드"는 FVIII 단백질, FVIII 폴리펩티드, 또는 FVIII와 상호교환적으로 사용된다. FVIII 기능의 예는 응고를 활성화하는 능력, 인자 IX에 대한 보조인자로서 작용하는 능력, 또는 Ca^{2+} 및 인지질의 존재하에 인자 IX와 테나제(tenase) 복합체를 형성하고, 이어서 인자 X를 활성화 형태인 Xa로 전환시키는 능력을 포함한다. 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 FVIII 중쇄를 갖는 제1 쇠 및 FVIII 경쇄를 갖는 제2 쇠의 2개의 폴리펩티드 쇠를 포함한다. 다른 구현예에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 단일 쇠 FVIII이다. 단일쇄 FVIII은 성숙 인간 FVIII 서열(서열번호 20)에 상응하는 아미노산 잔기 1645 및/또는 1648에 하나 이상의 돌연변이 또는 치환을 포함할 수 있다. 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 출원 PCT/US2012/045784호 참조. FVIII 단백질은 인간, 돼지, 개, 래트, 또는 무린 FVIII 단백질일 수 있다. 또한, 인간과 그 이외의 종으로부터의 FVIII 간의 비교를 통해 기능에 필요할 것 같은 보존된 잔기가 확인되었다. 예

를 들어, 문헌[Cameron et al. (1998) Thromb. Haemost. 79:317-22; 및 미국 특허 6,251,632호] 참조.

[0099] 폴리펩티드의 FVIII 활성을 평가하기 위해 다음의 다수의 시험을 이용할 수 있다: 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 시험, 발색 분석, ROTEM[®] 검정, 프로트롬빈 시간(PT) 시험(INR 결정에도 사용됨), (종종 클라우스(Clauss) 방법에 의한) 피브리노겐 시험, 혈소판 계수, (종종 PFA-100에 의한) 혈소판 기능 시험, TCT, 출혈 시간, 혼합 시험(환자의 혈장이 정상 혈장과 혼합되면 이상이 교정되는지 여부), 응고 인자 검정, 항인지질 항체, D-이량체, 유전자 검사(예를 들어, 인자 V 라이덴, 프로트롬빈 돌연변이 G20210A), 희석 러셀 사독 시간(dRVVT), 기타 혈소판 기능 시험, 트롬보엘라스토그래피(TEG 또는 소노클롯(Sonoclot)), 트롬보엘라스토메트리(TEM[®], 예를 들어 ROTEM[®]), 또는 유글로블린 용해 시간(ELT).

[0100] aPTT 시험은 "고유(intrinsic)" 응고 경로(접촉 활성화 경로라고도 함) 및 공통 응고 경로 둘 모두의 유효성을 측정하는 성능 지표이다. 이러한 시험은 일반적으로, 구입가능한 재조합 응혈 인자, 예를 들어 FVIII 또는 FIX의 응혈 활성을 측정하는 데 사용된다. 이는 외인성 경로를 측정하는 프로트롬빈 시간(PT)과 함께 사용된다.

[0101] ROTEM[®] 분석은 지혈의 전체 동역학: 응혈 시간, 혈전 형성, 혈전 안정성 및 용해에 대한 정보를 제공한다. 트롬보엘라스토메트리에서의 다양한 파라미터는 혈장 응고 시스템의 활성, 혈소판 기능, 섬유소 용해, 또는 이러한 상호작용에 영향을 미치는 많은 요인에 따라 달라진다. 이 분석법은 2차 지혈에 대한 완전한 관점을 제공할 수 있다.

[0102] 본원에서 사용되는 바와 같은, FVIII의 "B 도메인"은 내부 아미노산 서열 동일성 및 트롬빈에 의한 단백질 분해 절단 부위에 의해 정의되는 당업계에 알려진 B 도메인, 예를 들어 전장 인간 FVIII(서열번호 20)의 잔기 Ser741-Arg1648과 동일하다. 다른 인간 FVIII 도메인은 다음 아미노산 잔기에 의해 정의된다: A1, 잔기 Ala1-Arg372; A2, 잔기 Ser373-Arg740; A3, 잔기 Ser1690-Ile2032; C1, 잔기 Arg2033-Asn2172; C2, 잔기 Ser2173-Tyr2332. A3-C1-C2 서열은 잔기 Ser1690-Tyr2332를 포함한다. 잔여 서열인 잔기 Glu1649-Arg1689는 일반적으로 FVIII 경쇄 활성화 펩티드로 지칭된다. 돼지, 마우스, 및 개 FVIII에 대한 B 도메인을 포함하여, 모든 도메인에 대한 경계의 위치도 당업계에 알려져 있다. BDD FVIII의 예는 REFACTO[®] 재조합 BDD FVIII(Wyeth Pharmaceuticals, Inc.)이다.

[0103] "B 도메인 결실 FVIII"는 미국 특허 6,316,226호, 6,346,513호, 7,041,635호, 5,789,203호, 6,060,447호, 5,595,886호, 6,228,620호, 5,972,885호, 6,048,720호, 5,543,502호, 5,610,278호, 5,171,844호, 5,112,950호, 4,868,112호, 및 6,458,563호에 개시된 완전 또는 부분 결실을 가질 수 있으며, 각 문헌은 전체가 본원에 참조로 포함된다. B 도메인 결실 FVIII의 다른 예는 문헌[Hoeben R.C., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323; Meulien et al. (1988), *Protein Eng.* 2(4): 301-6; Toole et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5939-5942; Eaton, et al. (1986) *Biochemistry* 25:8343-8347; Sarver, et al. (1987) *DNA* 6:553-564; 유럽 특허 295597호; 및 국제 공개 WO 91/09122호, WO 88/00831호, 및 WO 87/04187호]에 개시되어 있으며, 각 문헌은 전체가 본원에 참조로 포함된다. 상기 결실 각각은 임의의 FVIII 서열에서 이루어질 수 있다.

[0104] **코돈 최적화**

[0105] 일 구현예에서, 본 발명은 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자로서, 핵산 서열이 코돈 최적화된, 단리된 핵산 분자를 제공한다. 다른 구현예에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하고 코돈 최적화되는 개시 핵산 서열은 서열번호 32이다. 일부 구현예에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열은 인간 발현에 최적화된 코돈이다. 다른 구현예에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 서열은 무린 발현에 최적화된 코돈이다.

[0106] 다양한 숙주의 형질전환을 위한 핵산 분자의 유전자 또는 암호화 영역을 지칭하는 경우의 "코돈 최적화된"이라는 용어는 DNA에 의해 암호화된 폴리펩티드의 변경 없이 숙주 유기체의 일반적인 코돈 사용빈도를 반영하는 핵산 분자의 유전자 또는 암호화 영역에서의 코돈의 변경을 의미한다. 이러한 최적화는 적어도 하나, 또는 하나 초과, 또는 상당 수의 코돈을 해당 유기체의 유전자에서 더 빈번하게 사용되는 하나 이상의 코돈으로 대체하는 것을 포함한다.

[0107] 임의의 폴리펩티드 쇄의 아미노산을 암호화하는 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에서의 편차는 유전자를 암호화하는 서열에서의 변이를 가능하게 한다. 각각의 코돈이 3개의 뉴클레오타이드로 구성되고, DNA를 포함하는 뉴클레오타이드가 4개의 특정 염기로 제한되므로, 64개의 뉴클레오타이드 조합이 가능하고, 그중 61개가 아미노산을

암호화한다(나머지 3개의 코돈은 번역을 종결시키는 신호를 암호화함). 결과적으로, 많은 아미노산이 하나 초과
의 코돈으로 표기된다. 예를 들어, 아미노산 알라닌 및 프롤린은 4개의 삼중자에 의해 암호화되고, 세린 및 아
르기닌은 6개에 의해 암호화되는 반면, 트립토판 및 메티오닌은 단 하나의 삼중자에 의해 암호화된다. 이 축퇴
성은 DNA에 의해 암호화된 단백질의 아미노산 서열을 변경하지 않고도 DNA 염기 조성을 넓은 범위에 걸쳐 변하
게 할 수 있다.

[0108] 많은 유기체는 성장하는 펩티드 쇄에서의 특정 아미노산의 삽입을 암호화하기 위해 특정 코돈을 사용하는 경향
을 나타낸다. 유기체 간 코돈 사용빈도의 차이인 코돈 우선성 또는 코돈 편향은 유전자 코드의 축퇴성에 의해
부여되며, 많은 유기체 사이에서 잘 증명되어 있다. 코돈 편향은 대개 메신저 RNA(mRNA)의 번역 효율과 상관성
이 있으며, 이는 결과적으로 특히, 번역되는 코돈의 특성 및 특정 운반 RNA(tRNA) 분자의 이용가능성에 따라 달
라지는 것으로 여겨진다. 세포에서의 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩티드 합성에서 가장 빈번하게 사용되
는 코돈의 반영이다. 따라서, 유전자는 코돈 최적화를 기반으로, 주어진 유기체에서 최적의 유전자 발현을 위해
맞춤화될 수 있다.

[0109] 다양한 동물, 식물 및 미생물 중에 대해 이용가능한 다수의 유전자 서열을 고려하여, 상대적 코돈 사용 빈도가
계산되었다. 코돈 사용빈도 표는 예를 들어 www.kazusa.or.jp/codon/ (방문일: 2012년 6월 18일)에서 이용가능한
"코돈 사용빈도 데이터베이스"에서 확인할 수 있다. 문헌[Nakamura, Y., et al. Nucl. Acids Res. 28:292
(2000)] 참조.

[0110] 주어진 폴리펩티드 서열을 암호화하도록 코돈을 최적화된 빈도로 무작위 배정하는 것은 각각의 아미노산에 대해
코돈 빈도를 계산한 후, 코돈을 폴리펩티드 서열에 무작위 배정함으로써 수동으로 수행될 수 있다. 추가로, 최
적의 서열을 계산하기 위해 다양한 알고리즘 및 컴퓨터 소프트웨어 프로그램이 사용될 수 있다.

[0111] 다른 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 하나 이상의 CpG 모티프의 제거 및/또는 적어도 하나의 CpG 모티
프의 메틸화에 의해 추가로 최적화된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "CpG 모티프"는 구아노신에 인산염 결합
에 의해 연결된 메틸화되지 않은 시토신을 포함하는 디뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 용어 "CpG 모티프"는 메
틸화된 CpG 디뉴클레오티드 및 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드 둘 다를 포함한다. 메틸화되지 않은 CpG 모
티프는 박테리아 및 바이러스 기원의 핵산(예를 들어, 플라스미드 DNA)에서 일반적이지만, 척추동물 DNA에서는
억제되고 대부분 메틸화된다. 따라서, 메틸화되지 않은 CpG 모티프는 포유류 숙주를 자극하여 급속한 염증 반응
을 일으킨다. Klinman, et al. (1996). PNAS 93:2879-2883. CpG 제거의 예시적인 방법은 문헌[Yew, N. S., et
al. (2002). Mol Ther. 5(6):731-738 및 국제 출원 PCT/US2001/010309호]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서,
본원에 개시된 핵산 분자는 더 적은 수의 CpG 모티프를 포함하도록 변형되었다(즉, "CpG 감소" 또는 "CpG 고
갈"). 일 구현예에서, 선택된 아미노산에 대한 코돈 삼중자 내에 위치한 CpG 모티프는 CpG 모티프가 없는 동일
한 아미노산에 대한 코돈 삼중자로 변경된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 선천성 면역 반응을
감소시키도록 최적화되었다.

[0112] 일부 구현예에서, 서열번호 9에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의
서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 본원에 개시된다.

[0113] 일부 구현예에서, 서열번호 33에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%
의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 본원에 개시된다.

[0114] 일부 구현예에서, 서열번호 14에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%
의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 본원에 개시된다.

[0115] 일부 구현예에서, 서열번호 35에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%
의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 본원에 개시된다.

[0116] 이중 뉴클레오티드 서열

[0117] 일부 구현예에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 이중 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서,
본 발명의 단리된 핵산 분자는 적어도 하나의 이중 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 이중 뉴클레오티드
서열은 5' 말단에서, 3' 말단에서 본 발명의 최적화된 BDD-FVIII 뉴클레오티드 서열과 연결되거나, 또는 최적화
된 BDD-FVIII 뉴클레오티드 서열의 중간에 삽입될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 이중 뉴클레오티드 서열
에 의해 암호화된 이중 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 FVIII 아미노산 서열의 N-말단 또
는 C-말단에 연결되거나, 또는 FVIII 아미노산 서열에서 2개의 아미노산 사이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 이
중 아미노산 서열은 하나 이상의 삽입 부위에서 2개의 아미노산 사이에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중

아미노산 서열은 국제 공개 WO 2013/123457 A1호, WO 2015/106052 A1호, 또는 미국 공개 2015/0158929 A1호(각각은 전체가 참조로 포함됨)에 개시된 임의의 부위에서 본 발명의 핵산 분자에 의해 암호화된 FVIII 폴리펩티드 내에 삽입될 수 있다.

[0118] 일부 구현예에서, 이중 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 이중 아미노산 서열은 B 도메인 또는 이의 단편 내에 삽입된다. 일부 구현예에서, 이중 아미노산 서열은 성숙 인간 FVIII(서열번호 20)의 아미노산 745에 상응하는 아미노산의 바로 하류에서 FVIII 내에 삽입된다. 특정 일 구현예에서, FVIII은 야생형 성숙 인간 FVIII(서열번호 20)에 상응하는 아미노산 746 내지 1637의 결실을 포함하고, 이중 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 이중 아미노산 서열은 야생형 성숙 인간 FVIII(서열번호 20)에 상응하는 아미노산 745의 바로 하류에 삽입된다. 본원에 언급된 FVIII의 삽입 부위는 야생형 성숙 인간 FVIII(서열번호 20)의 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치를 나타낸다.

[0119] 일부 구현예에서, 이중 모이어티는 본 발명의 단백질에 통합되는 경우 생체내 반감기의 연장과 관련된 비구조화 또는 구조화 특징을 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 비제한적 예는 알부민, 알부민 단편, 면역글로불린의 Fc 단편, 인간 융모성 생식선 자극호르몬의 β 서브유닛의 C-말단 펩티드(CTP), HAP 서열, XTEN 서열, 트랜스페린 또는 이의 단편, PAS 폴리펩티드, 폴리글리신 링커, 폴리세린 링커, 알부민 결합 모이어티, 또는 이들 폴리펩티드의 임의의 단편, 유도체, 변이체, 또는 조합을 포함한다. 특정 일 구현예에서, 이중 아미노산 서열은 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 일부, 트랜스페린, 알부민, 또는 PAS 서열이다. 다른 관련된 양태에서, 이중 모이어티는 비폴리펩티드 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 전분(HES), 폴리시알산, 또는 이들 요소의 임의의 유도체, 변이체, 또는 조합에 대한 부착 부위(예를 들어, 시스테인 아미노산)를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 이중 모이어티는 비폴리펩티드 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 전분(HES), 폴리시알산, 또는 이들 요소의 임의의 유도체, 변이체, 또는 조합에 대한 부착 부위로서 기능하는 시스테인 아미노산을 포함한다.

[0120] 특정 구현예에서, 이중 모이어티는 FVIII 단백질의 생물학적 활성 또는 기능에 유의미한 영향을 미치지 않으면서 FVIII 단백질의 하나 이상의 약동학적 특성을 개선한다. 특정 구현예에서, 이중 모이어티는 본 발명의 FVIII 단백질의 생체내 반감기 및/또는 시험관내 반감기를 증가시킨다. FVIII 단백질의 생체내 반감기는 당업자에게 알려진 임의의 방법, 예를 들어 활성 분석법(발색 분석법 또는 1단계 응혈 aPTT 분석법), ELISA, ROTEMTM 등에 의해 결정될 수 있다.

[0121] 다른 구현예에서, 이중 모이어티는 본 발명의 FVIII 단백질 또는 이의 단편(예를 들어, FVIII 단백질의 단백질 분해 절단 후의 이중 모이어티를 포함하는 단편)의 안정성을 증가시킨다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정성"은 환경 조건(예를 들어, 높거나 낮은 온도)에 반응하여 FVIII 단백질의 하나 이상의 물리적 특성을 유지하는 것에 대한 업계에서 인정된 척도를 의미한다. 특정 양태에서, 물리적 특성은 FVIII 단백질의 공유적 구조의 유지(예를 들어, 단백질 분해 절단, 원하지 않는 산화 또는 탈아미드화의 부재)일 수 있다. 다른 양태에서, 물리적 특성은 또한 적절히 폴딩된 상태의 FVIII 단백질의 존재(예를 들어, 가용성 또는 불용성 응집물 또는 침전물의 부재)일 수 있다. 일 양태에서, FVIII 단백질의 안정성은 FVIII 단백질의 생물물리학적 특성, 예를 들어 열 안정성, pH 비폴딩 프로파일, 글리코실화의 안정적 제거, 용해도, 생화학적 기능(예를 들어, 단백질, 수용체, 또는 리간드에 결합하는 능력) 등, 및/또는 이들의 조합을 평가함으로써 측정된다. 다른 양태에서, 생화학적 기능은 상호작용의 결합 친화도에 의해 입증된다. 일 양태에서, 단백질 안정성의 척도는 열 안정성, 즉 열 자극에 대한 저항성이다. 안정성은 당업계에 알려진 방법, 예컨대 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), SEC(크기 배제 크로마토그래피), DLS(동적 광 산란) 등을 사용하여 측정될 수 있다. 열 안정성을 측정하는 방법은 시차 주사 열량측정법(DSC), 시차 주사 형광측정법(DSF), 원편광 이색성(CD), 및 열 자극 분석(thermal challenge assay)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0122] 일부 구현예에서, 이중 모이어티는 하나 이상의 XTEN 서열, 이의 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "XTEN 서열"은 주로 작은 친수성 아미노산으로 구성되는 비자연발생적이고 실질적으로 비반복적인 서열을 갖는 연장된 길이의 폴리펩티드를 의미하며, 이 서열은 생리학적 조건하에서 2차 또는 3차 구조를 낮은 수준으로 갖거나 전혀 갖지 않는다. 이중 모이어티로서, XTEN은 반감기 연장 모이어티의 역할을 할 수 있다. 또한, XTEN은 향상된 약동학적 파라미터 및 용해도 특성을 포함하되 이에 한정되지 않는 바람직한 특성을 제공할 수 있다. XTEN 서열을 도입함으로써 부여될 수 있는 기타 유리한 특성은 향상된 입체형태적 유연성, 향상된 수용해도, 높은 수준의 프로테아제 내성, 낮은 면역원성, 포유류 수용체에 대한 낮은 결합, 또는 증가된 유체역학적(또는 스트로크) 반경을 포함한다.

- [0123] XTEN은 FVIII로의 삽입 또는 연결을 위해 다양한 길이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 유용한 XTEN 서열은 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 또는 2000 개 초과와 아미노산 잔기를 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, XTEN은 약 20개 초과 내지 약 3000개의 아미노산 잔기, 30개 초과 내지 약 2500개의 잔기, 40개 초과 내지 약 2000개의 잔기, 50개 초과 내지 약 1500개의 잔기, 60개 초과 내지 약 1000개의 잔기, 70개 초과 내지 약 900개의 잔기, 80개 초과 내지 약 800개의 잔기, 90개 초과 내지 약 700개의 잔기, 100개 초과 내지 약 600개의 잔기, 110개 초과 내지 약 500개의 잔기, 또는 120개 초과 내지 약 400개의 잔기를 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 특정 일 구현예에서, XTEN은 42개 아미노산보다 길고 144개 아미노산보다 짧은 길이의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0124] 본 발명의 XTEN 서열은 5 내지 14개(예를 들어, 9 내지 14 개) 아미노산 잔기의 하나 이상의 서열 모티프 또는 해당 서열 모티프와 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 모티프는 글리신(G), 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 글루타메이트(E), 및 프롤린(P)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 4 내지 6 종의 아미노산(예를 들어, 5개 아미노산)을 포함하거나, 이로 본질적으로 구성되거나, 이로 구성된다. US 2010-0239554 A1 참조.
- [0125] 본 발명의 키메라 단백질에서 이중 모이어티로서 사용될 수 있는 XTEN 서열의 예는, 예를 들어 미국 특허 공개 2010/0239554 A1호, 2010/0323956 A1호, 2011/0046060 A1호, 2011/0046061 A1호, 2011/0077199 A1호, 또는 2011/0172146 A1호, 또는 국제 특허 공개 WO 2010091122 A1호, WO 2010144502 A2호, WO 2010144508 A1호, WO 2011028228 A1호, WO 2011028229 A1호, 또는 WO 2011028344 A2호에 개시되어 있으며, 각 문헌은 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0126] 하나 이상의 XTEN 서열은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열의 C-말단 또는 N-말단에 삽입되거나, 또는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열에서 2개의 아미노산 사이에 삽입될 수 있다. 예를 들어, XTEN은 하나 이상의 삽입 부위에서 2개의 아미노산 사이에 삽입될 수 있다. XTEN 삽입이 허용되는 FVIII 내 부위의 예는, 예를 들어 국제 공개 WO 2013/123457 A1호 또는 미국 공개 2015/0158929 A1호에서 확인될 수 있고, 이들 문헌은 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0127] 특정 구현예에서, 이중 모이어티는 펩티드 링커이다.
- [0128] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "펩티드 링커" 또는 "링커 모이어티"는 폴리펩티드 쇠의 선형 아미노산 서열에서 2개의 도메인을 연결하는 펩티드 또는 폴리펩티드 서열(예를 들어, 합성 펩티드 또는 폴리펩티드 서열)을 지칭한다.
- [0129] 일부 구현예에서, 펩티드 링커를 암호화하는 이중 뉴클레오티드 서열은 본 발명의 최적화된 FVIII 폴리뉴클레오티드 서열과, 예를 들어 상기 이중 모이어티 중 하나, 예컨대 알부민을 암호화하는 이중 뉴클레오티드 서열 사이에 삽입될 수 있다. 펩티드 링커는 키메라 폴리펩티드 분자에 유연성을 제공할 수 있다. 링커는 일반적으로 절단되지 않지만, 이러한 절단이 바람직할 수 있다. 일 구현예에서, 이들 링커는 프로세싱 동안 제거되지 않는다.
- [0130] 본 발명의 키메라 단백질에 존재할 수 있는 링커의 유형은, 절단 부위(즉, 프로테아제 절단 부위 기질, 예를 들어 인자 XIa, Xa, 또는 트롬빈 절단 부위)를 포함하고 절단 부위의 N-말단 또는 C-말단 또는 양측에 추가 링커를 포함할 수 있는 프로테아제 절단성 링커이다. 이들 절단성 링커는 본 발명의 구성체에 통합되는 경우 이중 절단 부위를 갖는 키메라 분자를 생성한다.
- [0131] 일 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자에 의해 암호화된 FVIII 폴리펩티드는 단일 폴리펩티드 쇠에 포함된 Fc 영역을 형성하도록 cscFc 링커를 통해 연결된 2개 이상의 Fc 도메인 또는 모이어티를 포함한다. cscFc 링커는 적어도 하나의 세포내 프로세싱 부위, 즉 세포내 효소에 의해 절단된 부위에 의해 플랭킹된다. 적어도 하나의 세포내 프로세싱 부위에서의 폴리펩티드의 절단은 적어도 2개의 폴리펩티드 쇠를 포함하는 폴리펩티드를 생성한다.
- [0132] 다른 펩티드 링커는, 예를 들어 FVIII 단백질을 Fc 영역에 연결하기 위해, 본 발명의 구성체에서 임의로 사용될 수 있다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 일부 예시적인 링커는, 예를 들어 하기에 더 상세하게 설명되는 GlySer 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0133] 일 구현예에서, 펩티드 링커는 합성적, 즉 비자연발생적이다. 일 구현예에서, 펩티드 링커는 아미노산의 제1 선

형 서열을, 자연적으로는 연결되지 않거나 자연에서는 유전자 융합되지 않는 아미노산의 제2 선형 서열에 연결시키거나 유전자 융합시키는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드(또는 폴리펩티드)(자연적으로 발생할 수 있거나 발생할 수 없음)를 포함한다. 예를 들어, 일 구현예에서 펩티드 링커는 자연발생 폴리펩티드의 변형된 형태인(예를 들어, 부가, 치환, 또는 결실과 같은 돌연변이를 포함함) 비자연발생적 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 펩티드 링커는 비자연발생적 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 펩티드 링커는 자연에서는 발생하지 않는 선형 서열로 발생하는 자연발생 아미노산을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 펩티드 링커는 자연발생 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다.

[0134] 다른 구현예에서, 펩티드 링커는 gly-ser 링커를 포함하거나 이로 구성된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "gly-ser 링커"는 글리신 및 세린 잔기로 구성되는 펩티드를 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 gly-ser 링커는 펩티드 링커의 2개의 다른 서열 사이에 삽입될 수 있다. 다른 구현예에서, gly-ser 링커는 펩티드 링커의 다른 서열의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 부착된다. 또 다른 구현예에서, 2개 이상의 gly-ser 링커가 펩티드 링커에 직렬로 통합된다. 일 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 분자로부터 유래된) 상부 힌지 영역의 적어도 일부, (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 분자로부터 유래된) 중간 힌지 영역의 적어도 일부, 및 일련의 gly/ser 아미노산 잔기를 포함한다.

[0135] 본 발명의 펩티드 링커는 적어도 하나의 아미노산의 길이이고, 다양한 길이일 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 약 1개 내지 약 50개 아미노산의 길이이다. 이와 관련하여 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 $\pm$ 2개의 아미노산 잔기를 나타낸다. 링커 길이는 양의 정수이어야 하므로, 약 1개 내지 약 50개 아미노산 길이의 길이는 1~3개 내지 48~52개 아미노산 길이의 길이를 의미한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 약 10개 내지 약 20개 아미노산의 길이이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 약 15개 내지 약 50개 아미노산의 길이이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 약 20개 내지 약 45개 아미노산의 길이이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 약 15개 내지 약 35개 또는 약 20개 내지 약 30개 아미노산의 길이이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 500개, 1000개, 또는 2000개 아미노산의 길이이다. 일 구현예에서, 본 발명의 펩티드 링커는 20개 또는 30개 아미노산의 길이이다.

[0136] 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 또는 적어도 100개의 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 펩티드 링커는 적어도 200개, 적어도 300개, 적어도 400개, 적어도 500개, 적어도 600개, 적어도 700개, 적어도 800개, 적어도 900개, 또는 적어도 1,000개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 적어도 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개, 1200개, 1300개, 1400개, 1500개, 1600개, 1700개, 1800개, 1900개, 또는 2000개의 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드 링커는 1~5개의 아미노산, 1~10개의 아미노산, 1~20개의 아미노산, 10~50개의 아미노산, 50~100개의 아미노산, 100~200개의 아미노산, 200~300개의 아미노산, 300~400개의 아미노산, 400~500개의 아미노산, 500~600개의 아미노산, 600~700개의 아미노산, 700~800개의 아미노산, 800~900개의 아미노산, 또는 900~1000개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0137] 펩티드 링커는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 폴리펩티드 서열 내로 도입될 수 있다. 변형은 DNA 서열 분석에 의해 확인될 수 있다. 생산되는 폴리펩티드의 안정적인 생산을 위해 플라스미드 DNA를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다.

[0138] 발현 제어 서열

[0139] 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터는 적어도 하나의 발현 제어 서열을 추가로 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 적어도 하나의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 발현 제어 서열은 예를 들어 프로모터 서열 또는 프로모터-인핸서 조합일 수 있다.

[0140] 항시성 포유류 프로모터는 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT), 아데노신 데아미나제, 피루베이트 키나제 유전자에 대한 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 및 다른 항시성 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 진핵 세포에서 항시적으로 기능하는 예시적인 바이러스 프로모터는 예를 들어 사이토메갈로바이러스(CMV), 유인원 바이러스(예를 들어, SV40), 파필로마 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 라우스 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 폴리오 백혈병 바이러스의 긴 말단 반복부(LTR), 및 기타 레트로

바이러스로부터의 프로모터, 및 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터를 포함한다. 다른 항시성 프로모터는 당업자에게 알려져 있다. 본 발명의 유전자 발현 서열로서 유용한 프로모터는 또한 유도성 프로모터를 포함한다. 유도성 프로모터는 유도제의 존재하에 발현된다. 예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터는 특정 금속 이온의 존재하에 전사 및 번역을 촉진하도록 유도된다. 다른 유도성 프로모터는 당업자에게 알려져 있다.

[0141] 일 구현예에서, 본 발명은 조직 특이적 프로모터 및/또는 인핸서 제어하의 이식유전자의 발현을 포함한다. 다른 구현예에서, 프로모터 또는 다른 발현 제어 서열은 간 세포에서 이식유전자의 발현을 선택적으로 향상시킨다. 특정 구현예에서, 프로모터 또는 다른 발현 제어 서열은 간세포, 동양혈관 세포, 및/또는 내피 세포에서 이식유전자의 발현을 선택적으로 향상시킨다. 특정 일 구현예에서, 프로모터 또는 다른 발현 제어 서열은 내피 세포에서 이식유전자의 발현을 선택적으로 향상시킨다. 특정 구현예에서, 프로모터 또는 다른 발현 제어 서열은 근육 세포, 중추 신경계, 눈, 간, 심장, 또는 이들의 임의의 조합에서 이식유전자의 발현을 선택적으로 향상시킨다. 간 특이적 프로모터의 예는 마우스 트랜스티레틴 프로모터(mTTR), 천연 인간 인자 VIII 프로모터, 인간 알파-1-안티트립신 프로모터(hAAT), 인간 알부민 최소 프로모터, 및 마우스 알부민 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 mTTR 프로모터를 포함한다. mTTR 프로모터는 문헌[Costa et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:4697]에 기술되어 있다. FVIII 프로모터는 문헌[Figueiredo and Brownlee, 1995, J. Biol. Chem. 270:11828-11838]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 간 특이적 프로모터(예를 들어, α 1-안티트립신(AAT)), 근육 특이적 프로모터(예를 들어, 근육 크레아틴 키나제(MCK), 미오신 중쇄 알파(α MHC), 미오글로빈(MB), 및 데스민(DES)), 합성 프로모터(예를 들어, SPc5-12, 2R5Sc5-12, dMCK, 및 tMCK), 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0142] 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 간에 표적화된다. 특정 구현예에서, 이식유전자 발현은 간세포에 표적화된다. 다른 구현예에서, 이식유전자 발현은 내피 세포에 표적화된다. 특정 일 구현예에서, 이식유전자 발현은 내인성 FVIII를 자연적으로 발현하는 임의의 조직에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 중추 신경계에 표적화된다. 특정 구현예에서, 이식유전자 발현은 뉴런에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 구심성 뉴런에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 원심성 뉴런에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 개재뉴런에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 신경교 세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 정상세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 희소돌기아교세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 미세아교세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 뇌실막 세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 수반 세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 위성 세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 근육 조직에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 평활근에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 심근육에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 골격근에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 눈에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 광수용체 세포에 표적화된다. 일부 구현예에서, 이식유전자 발현은 망막 신경절 세포에 표적화된다.

[0143] 본원에 개시된 핵산 분자에 유용한 기타 프로모터는 마우스 트랜스티레틴 프로모터(mTTR), 천연 인간 인자 VIII 프로모터, 인간 알파-1-안티트립신 프로모터(hAAT), 인간 알부민 최소 프로모터, 마우스 알부민 프로모터, 트리스테트라프롤린(TTP; ZFP36으로도 알려짐) 프로모터, CASI 프로모터, CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, α 1-안티트립신(AAT) 프로모터, 근육 크레아틴 키나제(MCK) 프로모터, 미오신 중쇄 알파(α MHC) 프로모터, 미오글로빈(MB) 프로모터, 데스민(DES) 프로모터, SPc5-12 프로모터, 2R5Sc5-12 프로모터, dMCK 프로모터, 및 tMCK 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0144] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 트랜스티레틴(TTR) 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터이다. mTTR 프로모터의 비제한적 예는 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 공개 US2019/0048362호에 개시된 바와 같은 mTTR202 프로모터, mTTR202opt 프로모터, 및 mTTR482 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터 mTTR482이다. mTTR482 프로모터의 예는 문헌[Kyostio-Moore et al. (2016) Mol Ther Methods Clin Dev. 3:16006, 및 Nambiar B. et al. (2017) Hum Gene Ther Methods, 28(1):23-28]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 서열번호 16의 핵산 서열을 포함하는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터이다.

[0145] 발현 수준은 하나 이상의 인핸서 요소를 사용하여 치료 효능을 달성하도록 추가로 향상될 수 있다. 하나 이상의 인핸서는 단독으로 또는 하나 이상의 프로모터 요소와 함께 제공될 수 있다. 일반적으로, 발현 제어 서열은 복수의 인핸서 요소 및 조직 특이적 프로모터를 포함한다. 일 구현예에서, 인핸서는 α -1-마이크로글로불린/비쿠

닌 인헨서의 하나 이상의 카피를 포함한다(Rouet et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:20765-20773; Rouet et al. (1995), Nucleic Acids Res. 23:395-404; Rouet et al (1998) Biochem. J. 334:577-584; Ill et al. (1997) Blood Coagulation Fibrinolysis 8:S23-S30). 일부 구현예에서, 인헨서는 EBP, DBP, HNF1, HNF3, HNF4, HNF6과 같은 간 특이적 전사 인자 결합 부위로부터 유래되며, Enh1은 HNF1, (센스)-HNF3, (센스)-HNF4, (안티센스)-HNF1, (안티센스)-HNF6, (센스)-EBP, (안티센스)-HNF4(안티센스)를 포함한다.

[0146] 일부 구현예에서, 인헨서 요소는 1개 또는 2개의 변형 프로트롬빈 인헨서(pPrT2), 1개 또는 2개의 알파 1-마이크로비쿠닌 인헨서(A1MB2), 변형 마우스 알부민 인헨서(mEa1b), B형 간염 바이러스 인헨서 II(HE11), 또는 CRM8 인헨서를 포함한다. 일부 구현예에서, A1MB2 인헨서는 국제 출원 PCT/US2019/055917호에 개시된 인헨서이다. 일부 구현예에서, 인헨서 요소는 A1MB2이다. 일부 구현예에서, 인헨서 요소는 A1MB2 인헨서 서열의 다수의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, A1MB2 인헨서는 FVIII 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 5'에 위치한다. 일부 구현예에서, A1MB2 인헨서는 mTTR 프로모터와 같은 프로모터 서열의 5'에 위치한다. 일부 구현예에서, 인헨서 요소는 서열번호 15의 핵산 서열을 포함하는 A1MB2 인헨서이다.

[0147] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 인트론 또는 인트론 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 자연발생 인트론 서열이다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 합성 서열이다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 자연발생 인트론 서열로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 하이브리드 합성 인트론 또는 키메라 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은, 닭 베타-액틴/토끼 베타-글로빈으로 구성되고 잘못된 번역 개시를 줄이기 위해 5개의 기존 ATG 서열을 제거하도록 변형된 키메라 인트론이다. 특정 구현예에서, 인트론 서열은 SV40 소형 T 인트론을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 FVIII 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 5'에 위치한다. 일부 구현예에서, 키메라 인트론은 mTTR 프로모터와 같은 프로모터 서열의 5'에 위치한다. 일부 구현예에서, 키메라 인트론은 서열번호 17의 핵산 서열을 포함한다.

[0148] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 전사후 조절 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 조절 요소는 돌연변이된 우드척 간염 바이러스 조절 요소(WPRE)를 포함한다. WPRE는 바이러스 벡터 전달된 이식유전자의 발현을 향상시키는 것으로 여겨진다. WPRE의 예는 문헌[Zufferey et al. (1999) J Virol., 73(4):2886-2892; Loeb et al. (1999) Hum Gene Ther. 10(14):2295-2305]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, WPRE는 FVIII 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 3'에 위치한다. 일부 구현예에서, WPRE는 서열번호 18의 핵산 서열을 포함한다.

[0149] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 전사 종결자를 포함한다. 일부 구현예에서, 전사 종결자는 폴리아데닐화(poly(A)) 서열이다. 전사 종결자의 비제한적인 예는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호(BGHpA), 유인원 바이러스 40 폴리아데닐화 신호(SV40pA), 또는 합성 폴리아데닐화 신호로부터 유래된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 3'UTR poly(A) 테일은 액틴 poly(A) 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 3'UTR poly(A) 테일은 헤모글로빈 poly(A) 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 전사 종결자는 BGHpA이다. BGHpA 전사 종결자의 예는 문헌[Woychik et al.(1984) PNAS 81:3944-3948]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 전사 종결자는 FVIII 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 암호화하는 유전자 카세트의 3' 말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 전사 종결자는 서열번호 19의 핵산 서열을 포함하는 BGHpA이다.

[0150] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 하나 이상의 DNA 핵 표적화 서열(DTS)을 포함한다. DTS는 이러한 서열을 포함하는 DNA 분자의 핵 내로의 전좌를 촉진한다. 특정 구현예에서, DTS는 SV40 인헨서 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, DTS는 c-Myc 인헨서 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 제1 ITR과 제2 ITR 사이에 위치한 DTS를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 제1 ITR의 3' 및 이식유전자(예를 들어, FVIII 단백질)의 5'에 위치한 DTS를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 이식유전자의 3' 및 핵산 분자 상의 제2 ITR의 5'에 위치한 DTS를 포함한다.

[0151] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 톨-유사 수용체 9(TLR9) 억제 서열을 포함한다. 예시적인 TLR9 억제 서열은 예를 들어 문헌[Trieu et al. (2006) Crit Rev Immunol. 26(6):527-44; Ashman et al. Int' l Immunology 23(3): 203-14]에 기술되어 있다.

[0152] **역위 말단 반복부(ITR) 서열**

[0153] 본 발명의 특정 양태는 제1 ITR, 예를 들어 5' ITR, 및 제2 ITR, 예를 들어 3' ITR을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일반적으로, ITR은 원핵 플라스미드로부터의 파코바이러스(예를 들어, AAV) DNA 복제 및 구제, 또는 절제에 관여한다(Samulski et al., 1983, 1987; Senapathy et al., 1984; Gottlieb and Muzyczka, 1988). 또한, ITR은 AAV 프로바이러스 통합 및 AAV DNA의 비리온으로의 패키징에 필요한 최소 서열인 것으로 보인다

(McLaughlin et al., 1988; Samulski et al., 1989). 이 요소는 파코바이러스 계통의 효율적인 증식에 필수적이다. ITR 기능에 필수적인 최소한의 정의 요소는 Rep-결합 부위와 말단 분해 부위에 헤어핀 형성을 가능하게 하는 가변 회문 서열을 추가한 것으로 가정된다. 회문 뉴클레오타이드 영역은 일반적으로 DNA 복제 기점과 바이러스에 대한 패키징 신호로서 시스템에서 함께 기능한다. ITR의 상보적 서열은 DNA 복제 중에 헤어핀 구조로 접힌다. 일부 구현예에서, ITR은 헤어핀 T자형 구조로 접힌다. 다른 구현예에서, ITR은 T자형이 아닌 헤어핀 구조, 예를 들어 U자형 헤어핀 구조로 접힌다. 데이터는 AAV ITR의 T자형 헤어핀 구조가 ITR에 의해 플랭킹된 이식유전자의 발현을 억제할 수 있음을 시사한다. 예를 들어, 문헌[Zhou et al. (2017) *Scientific Reports* 7:5432] 참조. T자형 헤어핀 구조를 형성하지 않는 ITR을 활용하면 이러한 형태의 억제를 피할 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 비-AAV ITR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 T자형 헤어핀을 형성하는 AAV ITR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 비해 개선된 이식유전자 발현을 갖는다.

[0154] 본원에서 사용되는 바와 같이, "역위 말단 반복부"(또는 "ITR")는 하류에 역보체, 즉 회문 서열이 뒤따르는 일련의 뉴클레오타이드(초기 서열)를 포함하는 단일가닥 핵산 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치한 핵산 하위서열을 지칭한다. 초기 서열과 역보체 사이의 개재 뉴클레오타이드 서열은 0을 포함하는 임의의 길이일 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 유용한 ITR은 하나 이상의 "회문 서열"을 포함한다. ITR은 다양한 기능을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 ITR은 헤어핀 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, ITR은 T자형 헤어핀 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, ITR은 T자형이 아닌 헤어핀 구조, 예를 들어 U자형 헤어핀 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, ITR은 세포의 핵에서 핵산 분자의 장기간 생존을 촉진한다. 일부 구현예에서, ITR은 세포의 핵에서 핵산 분자의 영구적인(예를 들어, 세포의 전체 수명 동안) 생존을 촉진한다. 일부 구현예에서, ITR은 세포의 핵에서 핵산 분자의 안정성을 촉진한다. 일부 구현예에서, ITR은 세포의 핵에서 핵산 분자의 유지를 촉진한다. 일부 구현예에서, ITR은 세포의 핵에서 핵산 분자의 지속성을 촉진한다. 일부 구현예에서, ITR은 세포의 핵에서 핵산 분자의 분해를 억제하거나 방지한다.

[0155] 따라서, 본원에서 사용되는 "ITR"은 자체적으로 다시 접혀 이중가닥 분절을 형성할 수 있다. 예를 들어, 서열 GATCXXXGATC는 이중나선을 형성하도록 접힐 때 GATC의 초기 서열 및 이의 보체(3'CTAG5')를 포함한다. 일부 구현예에서, ITR은 초기 서열과 역보체 사이에 연속 회문 서열(예를 들어, GATCGATC)을 포함한다. 일부 구현예에서, ITR은 초기 서열과 역보체 사이에 불연속 회문 서열(예를 들어, GATCXXXGATC)을 포함한다. 일부 구현예에서, 연속 또는 불연속 회문 서열의 상보적 섹션은 서로 상호작용하여 "헤어핀 루프" 구조를 형성한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "헤어핀 루프" 구조는 단일가닥 뉴클레오타이드 분자에서의 적어도 2개의 상보적 서열이 염기쌍을 이루어 이중가닥 섹션을 형성할 때 생긴다. 일부 구현예에서, ITR의 일부만이 헤어핀 루프를 형성한다. 다른 구현예에서, 전체 ITR이 헤어핀 루프를 형성한다.

[0156] 본 발명에서, 적어도 하나의 ITR은 비-아데노바이러스 관련 바이러스(비-AAV)의 ITR이다. 특정 구현예에서, ITR은 바이러스과 파코비리다에의 비-AAV 구성원의 ITR이다. 일부 구현예에서, ITR은 데펜도바이러스(*Dependovirus*) 속 또는 에리트로바이러스(*Erythrovirus*) 속의 비-AAV 구성원의 ITR이다.

[0157] 일부 구현예에서, ITR은 보카바이러스, 데펜도바이러스, 에리트로바이러스, 암도바이러스, 파코바이러스, 텐소바이러스, 이테라바이러스, 콘트라바이러스, 아베파코바이러스, 코피파코바이러스, 프로토파코바이러스, 테트라파코바이러스, 암비텐소바이러스, 브레비텐소바이러스, 헤판텐소바이러스, 펜스틸텐소바이러스, 및 이들의 임의의 조합으로부터의 비-AAV 계통의 ITR이다. 특정 구현예에서, ITR은 인간 보카바이러스(HBoV1)로부터 유래된다. 특정 구현예에서, ITR은 에리트로바이러스 파코바이러스 B19(인간 바이러스)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, ITR은 데펜도파코바이러스로부터 유래된다. 일 구현예에서, 데펜도파코바이러스는 데펜도바이러스 거위 파코바이러스(GPV) 균주이다. 특정 구현예에서, GPV 균주는 약독화된다(예를 들어, GPV 균주 82-0321V). 다른 특정 구현예에서, GPV 균주는 병원성이다(예를 들어, GPV 균주 B). 일부 구현예에서, ITR은 거위 파코바이러스(GPV) 또는 머스코비 오리 파코바이러스(MDPV)의 ITR이다.

[0158] 일부 구현예에서, ITR은 에리트로바이러스 파코바이러스 B19(파코바이러스 B19로도 알려짐, 본원에서는 "B19", 영장류 에리트로파코바이러스 1, B19 바이러스, 및 에리트로바이러스라고도 함)의 ITR이다. 일부 구현예에서, ITR은 인간 보카바이러스(HBoV1)의 ITR이다.

[0159] 특정 구현예에서, 2개의 ITR 중 하나의 ITR은 AAV의 ITR이다. 다른 구현예에서, 구성체에 있는 2개의 ITR 중 하나의 ITR은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 AAV 혈청형의 ITR이다. 특정 일 구현예에서, ITR은 AAV 혈청형 2로부터 유래된다(예를 들어, AAV 혈청형 2의 ITR).

[0160] 본 발명의 특정 양태에서, 핵산 분자는 2개의 ITR, 5' ITR 및 3' ITR을 포함하고, 5' ITR은 핵산 분자의 5' 말

단에 위치하고, 3' ITR은 핵산 분자의 3' 말단에 위치한다. 핵산 분자의 제1 ITR 및 제2 ITR은 동일한 계놈, 예를 들어 동일한 바이러스의 계놈, 또는 상이한 계놈, 예를 들어 2개 이상의 상이한 바이러스 계놈의 계놈으로부터 유래될 수 있다("하이브리드" ITR로도 알려짐). 일부 구현예에서, 제1 ITR은 B19로부터 유래되고, 제2 ITR은 GPV로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 제1 ITR은 GPV로부터 유래되고, 제2 ITR은 B19로부터 유래된다.

[0161] 특정 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 인간 보카바이러스(HBoV1)로부터 유래된 ITR의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성된다. 특정 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 HBoV1로부터 유래된 ITR의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 제2 ITR은 제1 ITR의 역보체이다. 일부 구현예에서, 제1 ITR은 제2 ITR의 역보체이다. 일부 구현예에서, HBoV1로부터 유래된 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, 헤어핀 구조는 T자형 헤어핀을 포함하지 않는다.

[0162] 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 서열번호 1, 2, 21 내지 30에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 그것이 유래된 야생형 ITR의 기능적 특성을 유지한다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 야생형 HBoV1 ITR로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 야생형 B19 ITR로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 야생형 GPV ITR로부터 유래된다.

[0163] 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 서열번호 1, 2, 21 내지 30에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, 헤어핀 구조는 T자형 헤어핀을 포함하지 않는다.

[0164] 본원에 기술된 임의의 제1 ITR 서열이 본원에 기술된 임의의 제2 ITR 서열과 매칭될 수 있다는 것은 당업자에게 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제1 ITR 서열은 5' ITR 서열이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제2 ITR 서열은 3' ITR 서열이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제2 ITR 서열은 5' ITR 서열이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 제1 ITR 서열은 3' ITR 서열이다. 당업자는 유전자 카세트의 구조와 관련하여 본원에 기술된 제1 및 제2 ITR의 적합한 배향을 결정할 수 있을 것이다.

[0165] 다른 특정 구현예에서, ITR은 5' 및 3' 말단에 AAV 계놈으로부터 유래되지 않은 ITR을 포함하도록 유전자 조작된 합성 서열이다. 다른 특정 구현예에서, ITR은 5' 및 3' 말단에 비-AAV 계놈 중 하나 이상으로부터 유래된 ITR을 포함하도록 유전자 조작된 합성 서열이다. 본 발명의 핵산 분자에 존재하는 2개의 ITR은 동일하거나 상이한 비-AAV 계놈일 수 있다. 특히, ITR은 동일한 비-AAV 계놈으로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자에 존재하는 2개의 ITR은 동일하고, 특히 AAV2 ITR일 수 있다.

[0166] 일부 구현예에서, ITR 서열은 하나 이상의 회문 서열을 포함한다. 본원에 개시된 ITR의 회문 서열은 천연 회문 서열(즉, 자연에서 발견되는 서열), 합성 서열(즉, 자연에서 발견되지 않는 서열), 예컨대 의사 회문 서열, 및 이들의 조합 또는 변형된 형태를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0167] 일부 구현예에서, ITR은 헤어핀 루프 구조를 형성한다. 일 구현예에서, 제1 ITR은 헤어핀 구조를 형성한다. 다른 구현예에서, 제2 ITR은 헤어핀 구조를 형성한다. 또 다른 구현예에서, 제1 ITR과 제2 ITR은 둘 다 헤어핀 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 T자형 헤어핀 구조를 형성하지 않는다. 특정 구현예에서, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 T자형이 아닌 헤어핀 구조를 형성한다. 일부 구현예에서, T자형이 아닌 헤어핀 구조는 U자형 헤어핀 구조를 포함한다.

[0168] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 분자의 ITR은 전사적으로 활성화된 ITR일 수 있다. 전사적으로 활성화된 ITR은 적어도 하나의 전사 활성 요소를 포함함으로써 전사적으로 활성화된 야생형 ITR의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 다양한 유형의 전사 활성 요소가 이와 관련하여 사용하기에 적합하다. 일부 구현예에서, 전사 활성 요소는 항시성 전사 활성 요소이다. 항시성 전사 활성 요소는 지속적 수준의 유전자 전사를 제공하고, 이식유전자가 지속적으로 발현되는 것이 요구될 때 선호된다. 다른 구현예에서, 전사 활성 요소는 유도성 전사 활성 요소이다. 유도성 전사 활성 요소는 일반적으로 유도제(또는 유도 조건)의 부재하에 낮은 활성을 나타내고, 유도제(또는 유도 조건으로 전환)의 존재하에 상향조절된다. 유도성 전사 활성 요소는 특정 시간 또는 특정 위치에 서만 발현이 요구될 때, 또는 유도제를 사용하여 발현 수준을 적정하는 것이 바람직할 때 선호될 수 있다. 전사 활성 요소는 또한 조직-특이적일 수 있다. 즉, 이들은 특정 조직 또는 세포 유형에서만 활성을 나타낸다.

[0169] 전사 활성 요소는 다양한 방식으로 ITR에 통합될 수 있다. 일부 구현예에서, 전사 활성 요소는 ITR의 임의의 부

분의 5' 또는 ITR의 임의의 부분의 3'에 통합된다. 다른 구현예에서, 전사적으로 활성화된 ITR의 전사 활성 요소는 2개의 ITR 서열 사이에 위치한다. 전사 활성 요소가 2개 이상의 이격되어야 하는 요소를 포함하는 경우, 이들 요소는 ITR의 부분과 번갈아 나타날 수 있다. 일부 구현예에서, ITR의 헤어핀 구조는 결실되고, 전사 요소의 역위 반복부로 대체된다. 이 후자의 배열은 구조에서 결실된 부분을 모방하는 헤어핀을 생성할 것이다. 전사적으로 활성화된 ITR에 다중 tandem 전사 활성 요소가 또한 존재할 수 있고, 이들은 인접하거나 이격되어 있을 수 있다. 또한, 전사적으로 활성화된 ITR의 전사 활성 요소에 단백질 결합 부위(예를 들어, Rep 결합 부위)가 도입될 수 있다. 전사 활성 요소는 RNA 중합효소에 의한 DNA의 제어된 전사를 통해 RNA를 형성할 수 있는 임의의 서열을 포함할 수 있으며, 예를 들어 하기 정의된 바와 같은 전사 활성 요소를 포함할 수 있다.

[0170] 전사적으로 활성화된 ITR은 핵산 분자로부터 운반되고 발현될 수 있는 이식유전자의 길이를 효과적으로 최대화하는 상대적으로 제한된 뉴클레오타이드 서열 길이의 핵산 분자에 전사 활성화 및 ITR 기능을 둘 다 제공한다. 전사 활성 요소를 ITR에 통합시키는 것은 다양한 방식으로 달성될 수 있다. ITR 서열과 전사 활성 요소의 서열 요건을 비교하면 ITR 내의 요소를 암호화하는 방식에 대해 이해할 수 있다. 예를 들어, 전사 활성 요소의 기능성 요소를 복제하는 ITR 서열의 특정 변화를 도입하여 전사 활성화가 ITR에 추가될 수 있다. 특정 부위의 특정 뉴클레오타이드 서열의 효율적 부가, 결실, 및/또는 변화를 위한 다수의 기술이 당업계에 존재한다(예를 들어, 문헌 [Deng and Nickoloff (1992) Anal. Biochem. 200:81-88] 참조). 전사적으로 활성화된 ITR을 생성하는 다른 방법은 ITR의 목적하는 위치에 제한 부위를 도입하는 것을 수반한다. 또한, 전사적으로 활성화된 ITR에 여러 전사 활성 요소가 당업계에 알려진 방법을 사용하여 통합될 수 있다.

[0171] 예를 들어, 전사적으로 활성화된 ITR은 TATA 박스, GC 박스, CCAAT 박스, Sp1 부위, Inr 영역, CRE(cAMP 조절 요소) 부위, ATF-1/CRE 부위, APB β 박스, APB α 박스, CArG 박스, CCAC 박스, 또는 당업계에 알려진 전사와 관련된 임의의 다른 요소와 같은 하나 이상의 전사 활성 요소를 포함시킴으로써 생성될 수 있다.

[0172] 벡터 시스템

[0173] 본 발명의 일부 구현예는 본원에 기술된 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 코돈 최적화된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및 벡터를 사용하여 출혈 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 대상체에서 증가된 발현을 나타내고 유전자 치료 방법에 사용될 때 잠재적으로 더 큰 치료 효능을 나타내는 최적화된 FVIII 서열을 포함하는 벡터를 제공함으로써 당업계의 중요한 요구를 충족시킨다.

[0174] 본 발명에 적합한 벡터는 발현 벡터, 바이러스 벡터, 및 플라스미드 벡터를 포함한다. 일 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0175] 본원에서 사용되는 바와 같이, 발현 벡터는, 적절한 숙주 세포에 도입될 때, 삽입된 암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소, 또는 RNA 바이러스 벡터의 경우 복제 및 번역에 필요한 요소를 포함하는 임의의 핵산 구성체를 지칭한다. 발현 벡터는 플라스미드, 파지미드, 바이러스, 및 이들의 유도체를 포함할 수 있다.

[0176] 본 발명의 발현 벡터는 본원에 기술된 BDD FVIII 단백질을 암호화하는 최적화된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 일 구현예에서, BDD FVIII 단백질에 대한 최적화된 암호화 서열은 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 핵산 서열은 각 구성요소 핵산 서열이 그 기능을 유지하도록 하는 방식으로 공유적으로 연결되는 경우 작동가능하게 연결된 것이다. 암호화 서열과 유전자 발현 제어 서열은 이들이 암호화 서열의 발현 또는 전사 및/또는 번역을 유전자 발현 제어 서열의 영향 또는 제어하에 두는 방식으로 공유적으로 연결되는 경우 작동가능하게 연결된 것이라고 한다. 5' 유전자 발현 서열에서의 프로모터의 유도가 암호화 서열의 전사를 일으키는 경우, 및 두 DNA 서열 간의 연결의 성질이 (1) 프레임-이동 돌연변이의 도입을 초래하지 않거나, (2) 암호화 서열의 전사를 지시하는 프로모터 영역의 능력을 방해하지 않거나, (3) 단백질로 번역되는 상응하는 RNA 전사체의 능력을 방해하지 않는 경우, 두 DNA 서열은 작동가능하게 연결된 것이라고 한다. 따라서, 생성된 전사체가 목적하는 단백질 또는 폴리펩티드로 번역되도록 유전자 발현 서열이 암호화 핵산 서열의 전사에 영향을 미칠 수 있는 경우, 유전자 발현 서열은 해당 암호화 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것이다.

[0177] 바이러스 벡터는 다음의 바이러스로부터의 핵산 서열을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스, 하비(Harvey) 뮤린 육종 바이러스, 뮤린 유방 종양 바이러스, 및 라우스 육종 바이러스와 같은 레트로바이러스; 렌티바이러스; 아데노바이러스; 아데노 관련 바이러스; SV40형 바이러스; 폴리오마바이러스; 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스; 유두종 바이러스; 헤르페스 바이러스; 백시니아 바이

러스; 폴리오 바이러스; 및 레트로바이러스와 같은 RNA 바이러스. 당업계에 잘 알려진 다른 벡터를 용이하게 사용할 수 있다. 특정 바이러스 벡터는 비필수 유전자가 관심 유전자로 대체된 비세포변성 진핵 바이러스를 기반으로 한다. 일 구현예에서, 바이러스는 아데노 관련 바이러스, 이중가닥 DNA 바이러스이다. 아데노 관련 바이러스는 복제 결함을 갖도록 조작될 수 있으며, 광범위한 세포 유형과 종을 감염시킬 수 있다.

[0178] 거의 모든 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 상이한 AAV 벡터 서열이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 특정 AAV 벡터 서열의 선택은 관심 굴성, 필요한 벡터 수율 등과 같은 알려진 파라미터에 의해 좌우될 것이다. 일반적으로, AAV 혈청형은 아미노산 및 핵산 수준에서 유의미한 상동성을 갖는 게놈 서열을 가지며, 관련된 유전 기능 세트를 제공하고, 관련된 비리온을 생성하고, 유사하게 복제되고 조립된다. 다양한 AAV 혈청형의 게놈 서열 및 게놈 유사성의 개요에 대해서는 예를 들어 GenBank 수탁번호 U89790; GenBank 수탁번호 J01901; GenBank 수탁번호 AF043303; GenBank 수탁번호 AF085716; 문헌[Chlorini et al. (1997) J. Vir. 71: 6823-33; Srivastava et al. (1983) J. Vir. 45:555-64; Chlorini et al. (1999) J. Vir. 73:1309-1319; Rutledge et al. (1998), J. Vir. 72:309-319; 또는 Wu et al. (2000) J. Vir. 74: 8635-47]을 참조한다. AAV 혈청형 1, 2, 3, 4, 및 5는 본 발명과 관련하여 사용하기 위한 AAV 뉴클레오티드 서열의 예시적인 공급원이다. AAV6, AAV7, AAV8 또는 AAV9 또는 예를 들어 캡시드 서플링 기술 및 AAV 캡시드 라이브러리에 의해, 또는 새로 설계, 개발, 또는 진화된 ITR로부터 얻은 새로 개발된 AAV 유사 입자도 본 발명의 특정 적용에 적합하다. 문헌[Dalkara et al. (2013), Sci. Transl. Med. 5(189): 189ra76; Kotterman MA (2014) Nat. Rev. Genet. 15(7):455] 참조.

[0179] 다른 벡터는 플라스미드 벡터를 포함한다. 플라스미드 벡터는 당업계에 광범위하게 기술되어 있으며 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989] 참조. 지난 몇 년 동안, 플라스미드 벡터는 숙주 게놈 내에서 복제되어 숙주 게놈 내에 통합될 수 없기 때문에 생체내 세포에 유전자를 전달하는 데 특히 유리한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 숙주 세포와 양립가능한 프로모터를 갖는 이러한 플라스미드는 플라스미드 내에 작동가능하게 암호화된 유전자로부터 펩티드를 발현할 수 있다. 상업적 공급업체로부터 입수할 수 있는 일반적으로 사용되는 일부 플라스미드는 pBR322, pUC18, pUC19, 다양한 pcDNA 플라스미드, pRC/CMV, 다양한 pCMV 플라스미드, pSV40, 및 pBlueScript를 포함한다. 특정 플라스미드의 추가 예는 pcDNA3.1, 카탈로그 번호 V79020; pcDNA3.1/hygro, 카탈로그 번호 V87020; pcDNA4/myc-His, 카탈로그 번호 V86320; 및 pBudCE4.1, 카탈로그 번호 V53220을 포함하며, 이들은 모두 Invitrogen(Carlsbad, CA.) 제품이다. 다른 플라스미드는 당업자에게 잘 알려져 있다. 또한, 플라스미드는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 DNA의 특정 단편을 제거 및/또는 추가하도록 맞춤 설계될 수 있다.

[0180] 특정 구현예에서, 예를 들어 최적화된 FVIII 이식유전자에 작동가능하게 연결된, 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 벡터 내에 포함시키는 것이 유용할 것이다. 벡터에 포함된 miRNA 표적 서열의 하나 초과 카피는 시스템의 효과성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 하나 초과 카피의 이식유전자를 발현하는 벡터는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 초과 카피의 miRNA 표적 서열의 제어하의 이식유전자를 가질 수 있다. miRNA 표적 서열은 직렬로 배열될 수 있지만, 다른 배열도 포함된다. miRNA 표적 서열을 포함하는 이식유전자 발현 카세트는 또한 안티센스 배향으로 벡터 내에 삽입될 수 있다. miRNA 표적 서열의 예는 전체가 본원에 참조로 포함되는 W02007/000668, W02004/094642, W02010/055413, 또는 W02010/125471에 기술되어 있다. 그러나, 특정 다른 구현예에서, 벡터는 어떠한 miRNA 표적 서열도 포함하지 않을 것이다. miRNA 표적 서열의 포함 여부(및 개수)의 선택은 의도된 조직 표적, 필요한 발현 수준 등과 같은 알려진 파라미터에 의해 좌우될 것이다.

[0181] 숙주 세포

[0182] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "형질전환"은 수여체 숙주 세포에 DNA를 도입하여 유전자형을 변화시키고 결과적으로 수여체 세포의 변화를 일으키는 것을 지칭하는 넓은 의미로 사용된다.

[0183] "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 구성되어 적어도 하나의 이중 유전자를 암호화하는 벡터로 형질전환된 세포를 지칭한다. 본 발명의 숙주 세포는 바람직하게는 포유류 기원; 가장 바람직하게는 인간 또는 마우스 기원이다. 당업자는 목적에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 우선적으로 결정할 수 있는 능력이 있는 것으로 인정된다. 예시적인 숙주 세포주는 CHO, DG44, 및 DUXB11(중국 햄스터 난소 계통, DHFR minus), HELA(인간 자궁경부 암종), CV1(원숭이 신장 계통), COS(SV40 T 항원을 갖는 CV1의 유도체), R1610(중국 햄스터 섬유모세포) BALBC/3T3(마우스 섬유모세포), HAK(햄스터 신장 계통), SP2/0(마우스 골수종), P3.times.63-Ag3.653(마우스

글수종) BFA-1c1BPT(소 내피세포), RAJI(인간 림프구), PER.C6[®], NSO, CAP, BHK21, 및 HEK 293(인간 신장)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 일 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포, HEK293 세포, BHK21 세포, PER.C6[®] 세포, NSO 세포, 및 CAP 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 숙주 세포주는 일반적으로 상업용 서비스, ATCC(American Tissue Culture Collection), 또는 공개 문헌으로부터 이용가능하다.

[0184] 본 발명의 단리된 핵산 분자 또는 벡터를 숙주 세포에 도입하는 것은 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 여기에는 형질감염(전기영동 및 전기천공 포함), 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 외피 DNA와의 세포 융합, 미세주입, 및 온전한 바이러스에 의한 감염이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 문헌[Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)] 참조. 플라스미드는 전기천공을 통해 숙주에 도입될 수 있다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 생성에 적절한 조건에서 성장되고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 분석된다. 예시적인 분석 기술은 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 또는 형광 활성화 세포 분류기 분석(FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.

[0185] 본 발명의 단리된 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포는 적절한 성장 배지에서 성장된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "적절한 성장 배지"는 세포의 성장에 필요한 영양소를 함유하는 배지를 의미한다. 세포 성장에 필요한 영양소는 탄소원, 질소원, 필수 아미노산, 비타민, 미네랄, 및 성장 인자를 포함할 수 있다. 임의로, 배지는 하나 이상의 선택 인자를 함유할 수 있다. 임의로, 배지는 우아혈청 또는 우태혈청(FCS)을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 배지는 실질적으로 IgG를 함유하지 않는다. 성장 배지는 일반적으로, 예를 들어 DNA 구성체 상의 선별 마커에 의해 보완되거나 DNA 구성체와 함께 공동 형질감염되는 필수 영양소의 결핍 또는 약물 선택에 의해 DNA 구성체를 함유하는 세포를 선택할 것이다. 배양된 포유류 세포는 일반적으로, 구입가능한 혈청-함유 또는 혈청-비함유 배지(예를 들어, MEM, DMEM, DMEM/F12)에서 성장된다. 일 구현예에서, 배지는 CDoptiCHO(Invitrogen, Carlsbad, CA.)이다. 다른 구현예에서, 배지는 CD17(Invitrogen, Carlsbad, CA.)이다. 사용되는 특정 세포주에 적절한 배지의 선택은 당업자의 수준 내에 있다.

[0186] 일부 구현예에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 숙주 세포는 곤충 기원이다. 일부 구현예에서, 적합한 곤충 숙주 세포는 예를 들어 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*, Sf)로부터 단리된 세포주 또는 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*, Tni)로부터 단리된 세포주를 포함한다. 당업자는 임의의 Sf 또는 Tni 세포주의 적합성을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 예시적인 곤충 숙주 세포는 Sf9 세포, Sf21 세포, 및 High FiveTM 세포를 제한 없이 포함한다. 예시적인 곤충 숙주 세포는 외래성 바이러스 오염이 없는 임의의 Sf 또는 Tni 세포주, 예를 들어 Sf-랍도바이러스 음성(Sf-RVN) 및 Tn-노다바이러스 음성(Tn-NVN) 세포를 제한 없이 포함한다. 다른 적합한 숙주 곤충 세포는 당업자에게 알려져 있다. 특정 일 구현예에서, 곤충 숙주 세포는 Sf9 세포이다.

[0187] 본 발명의 양태는 본원에 기술된 핵산 분자를 클로닝하는 방법으로서, 복잡한 2차 구조가 가능한 핵산 분자를 적합한 벡터에 삽입하는 단계, 및 생성된 벡터를 적합한 박테리아 숙주 균주에 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 당업계에 알려진 바와 같이, 핵산의 복잡한 2차 구조(예를 들어, 긴 회문 영역)는 박테리아 숙주 균주에서 불안정하고 클로닝하기 어려울 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제1 ITR 및 제2 ITR(예를 들어, 비-AAV 파코바이러스 ITR, 예를 들어 HBoV1 ITR)을 포함하는 핵산 분자는 종래의 방법론을 사용해서는 클로닝하기 어려울 수 있다. 긴 DNA 회문은 DNA 복제를 억제하고, *E. 콜라이*, *바실루스*, *스트렙토코커스*, *스트렙토마이세스*, *S. 세레비시아에*, 마우스, 및 인간의 게놈에서 불안정하다. 이러한 효과는 가닥내 염기쌍 형성에 의한 헤어핀 또는 십자형 구조의 형성으로 인해 발생한다. *E. 콜라이*에서는 SbcC 또는 SbcD 돌연변이체에서 DNA 복제의 억제가 상당히 극복될 수 있다. SbcD는 뉴클레아제 서브유닛이고, SbcC는 SbcCD 복합체의 ATPase 서브유닛이다. *E. 콜라이* SbcCD 복합체는 긴 회문의 복제 방지를 담당하는 엑소뉴클레아제 복합체이다. SbcCD 복합체는 ATP 의존적 이중가닥 DNA 엑소뉴클레아제 활성 및 ATP 독립적 단일가닥 DNA 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 핵이다. SbcCD는 DNA 회문을 인식하고, 발생하는 헤어핀 구조를 공격하여 복제 분기점을 붕괴시킬 수 있다.

[0188] 특정 구현예에서, 적합한 박테리아 숙주 균주는 십자형 DNA 구조를 분해할 수 없다. 특정 구현예에서, 적합한 박테리아 숙주 균주는 SbcCD 복합체의 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, SbcCD 복합체의 파괴는 SbcC 유전자 및/또는 SbcD 유전자의 유전적 파괴를 포함한다. 특정 구현예에서, SbcCD 복합체의 파괴는 SbcC 유전자의 유전적 파괴를 포함한다. SbcC 유전자의 유전적 파괴를 포함하는 다양한 박테리아 숙주 균주는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 제한 없이, 박테리아 숙주 균주 PMC103은 유전자형 *sbcC*, *recD*, *mcrA*, $\Delta mcrBCF$ 를 포함하고; 박테리아 숙주 균주 PMC107은 유전자형 *recBC*, *recJ*, *sbcBC*, *mcrA*, $\Delta mcrBCF$ 를 포함하고; 박테리아 숙주 균주 SURE는 유전자형 *recB*, *recJ*, *sbcC*, *mcrA*, $\Delta mcrBCF$, *umuC*, *uvrC*를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원

에 기술된 핵산 분자를 클로닝하는 방법은 복잡한 2차 구조가 가능한 핵산 분자를 적합한 벡터에 삽입하는 단계, 및 생성된 벡터를 숙주 균주 PMC103, PMC107, 또는 SURE에 도입하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 핵산 분자를 클로닝하는 방법은 복잡한 2차 구조가 가능한 핵산 분자를 적합한 벡터에 삽입하는 단계, 및 생성된 벡터를 숙주 균주 PMC103에 도입하는 단계를 포함한다.

[0189] 적합한 벡터는 당업계에 알려져 있으며, 본원의 다른 곳에 기술되어 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 클로닝 방법론에 사용하기에 적합한 벡터는 저카피 벡터이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 클로닝 방법론에 사용하기에 적합한 벡터는 pBR322이다.

[0190] 따라서, 본 발명은 핵산 분자를 클로닝하는 방법으로서, 복잡한 2차 구조가 가능한 핵산 분자를 적합한 벡터에 삽입하는 단계, 및 생성된 벡터를 SbcCD 복합체의 파괴를 포함하는 박테리아 숙주 균주에 도입하는 단계를 포함하고, 핵산 분자는 제1 역위 말단 반복부(ITR) 및 제2 ITR을 포함하고, 제1 ITR 및/또는 제2 ITR은 서열번호 12 내지 23에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 기능성 유도체와 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법을 제공한다.

[0191] 폴리펩티드의 생산

[0192] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터에 의해 암호화된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 의해 생산된다.

[0193] 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서, 본 발명의 숙주 세포를 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드가 생산되는 조건하에 배양하는 단계, 및 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현은, 동일한 조건하에 배양되었으나 모 FVIII 뉴클레오티드 서열인 서열번호 32를 포함하는 기준 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포에 비해 증가된다.

[0194] 다른 구현예에서, 본 발명은 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 방법으로서, 본 발명의 숙주 세포를 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드가 핵산 분자에 의해 발현되는 조건하에 배양하는 단계를 포함하고, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현이 서열번호 32를 포함하는 기준 핵산 분자를 포함하는 동일한 조건하에 배양된 숙주 세포에 비해 증가되는, 방법을 제공한다.

[0195] 다른 구현예에서, 본 발명은 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 수율을 향상시키는 방법으로서, 숙주 세포를 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드가 핵산 분자에 의해 생산되는 조건하에 배양하는 단계를 포함하고, FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 수율이 서열번호 32를 포함하는 기준 핵산 서열을 포함하는 동일한 조건하에 배양된 숙주 세포에 비해 증가되는, 방법을 제공한다.

[0196] 본 발명의 최적화된 핵산 분자로부터 FVIII 단백질을 재조합적으로 생산하기 위한 다양한 방법이 이용가능하다. 드노보 고상 DNA 합성에 의해 또는 이전에 제조된 폴리뉴클레오티드의 PCR 돌연변이유발에 의해 목적하는 서열의 폴리뉴클레오티드가 생산될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 매개 돌연변이유발은 뉴클레오티드 서열에 치환, 삽입, 결실, 또는 변경(예를 들어, 변경된 코돈)을 준비하는 한 가지 방법이다. 예를 들어, 개시 DNA는 목적하는 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드를 단일가닥 DNA 주형에 혼성화함으로써 변경된다. 혼성화 후, DNA 중합효소를 사용하여 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 주형의 두 번째 상보 가닥 전체를 합성한다. 일 구현예에서, 유전 공학, 예를 들어 프라이머 기반 PCR 돌연변이유발은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 생산하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 변경을 통합하는 데 충분하다.

[0197] 재조합 단백질 생산을 위해, FVIII 단백질을 암호화하는 본 발명의 최적화된 폴리뉴클레오티드 서열이 적절한 발현 비히클, 즉 삽입된 암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소, 또는 RNA 바이러스 벡터의 경우 복제 및 번역에 필요한 요소를 포함하는 벡터에 삽입된다.

[0198] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 적절한 리딩 프레임에서 벡터에 삽입된다. 이어서 발현 벡터는 폴리펩티드를 발현할 적합한 표적 세포 내로 형질감염된다. 당업계에 알려진 형질감염 기술은 인산칼슘 침전(Wigler *et al.* 1978, *Cell* 14 : 725) 및 전기천공(Neumann *et al.* 1982, *EMBO, J.* 1 : 841)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 진핵 세포에서 본원에 기술된 FVIII 단백질을 발현하기 위해 다양한 숙주 발현 벡터 시스템이 활용될 수 있다. 일 구현예에서, 진핵 세포는 포유류 세포(예를 들어, HEK293 세포, PER.C6[®], CHO, BHK, Cos, HeLa 세

포)를 비롯한 동물 세포이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 FVIII 단백질이 분비되도록 하는 신호 서열을 암호화할 수 있다. 당업자는 FVIII 단백질이 번역되는 동안 신호 서열이 세포에 의해 절단되어 성숙한 단백질을 형성한다는 것을 이해할 것이다. 다양한 신호 서열, 예를 들어 천연 인자 VII 신호 서열, 천연 인자 IX 신호 서열, 및 마우스 IgK 경쇄 신호 서열이 당업계에 알려져 있다. 대안적으로, 신호 서열이 포함되지 않는 경우, FVIII 단백질은 세포를 용해시켜 회수될 수 있다.

[0199] 본 발명의 FVIII 단백질은 설치류, 염소, 양, 돼지, 또는 소와 같은 유전자이식 동물에서 합성될 수 있다. 용어 "유전자이식 동물"은 자신의 게놈에 외래 유전자를 통합한 비인간 동물을 의미한다. 이 유전자는 생식세포계열 조직에 존재하기 때문에 부모로부터 자손으로 전달된다. 외인성 유전자가 단세포 배아에 도입된다(Brinster et al. 1985, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 82:4438). 유전자이식 동물을 생산하는 방법은 면역글로불린 분자를 생산하는 유전자이식을 포함하여 당업계에 알려져 있다(Wagner et al. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6376; McKnight et al. 1983, Cell 34 : 335; Brinster et al. 1983, Nature 306: 332; Ritchie et al. 1984, Nature 312: 517; Baldassarre et al. 2003, Theriogenology 59 : 831 ; Robl et al. 2003, Theriogenology 59: 107; Malassagne et al. 2003, Xenotransplantation 10 (3): 267).

[0200] 발현 벡터는 재조합적으로 생산된 단백질을 용이하게 정제 또는 식별할 수 있게 하는 태그를 암호화할 수 있다. 예는 본원에 기술된 FVIII 단백질 암호화 서열이 lac Z 암호화 영역과 인프레임으로 벡터에 결합되어 하이브리드 단백질이 생성될 수 있는 벡터 pUR278(Ruther et al. 1983, EMBO J. 2: 1791)을 포함하나 이에 한정되지 않으며; pGEX 벡터는 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 태그가 있는 단백질을 발현하는 데 사용될 수 있다. 이들 단백질은 일반적으로 가용성이며, 글루타티온-아가로스 비드에 흡착된 후 유리 글루타티온의 존재하에 용리되어 세포로부터 쉽게 정제될 수 있다. 벡터는 정제 후 태그를 쉽게 제거할 수 있도록 절단 부위(예를 들어, PreCission 프로테아제(Pharmacia, Peapack, N. J.))를 포함한다.

[0201] 본 발명의 목적을 위해, 많은 발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 이들 발현 벡터는 일반적으로 숙주 유기체에서 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 필수 부분으로서 복제 가능하다. 발현 벡터는 프로모터(예를 들어, 자연적으로 회합된 프로모터 또는 이중 프로모터), 인핸서, 신호 서열, 스플라이스 신호, 인핸서 요소, 및 전사 종결 서열을 포함하되 이에 한정되지 않는 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 발현 제어 서열은 진행 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내 진행 프로모터 시스템이다. 발현 벡터는 또한 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 바쿨로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV, 또는 MOMLV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 활용할 수 있다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 부위가 있는 폴리시스트론 시스템의 사용을 포함한다.

[0202] 일반적으로, 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 가능하게 하는 선별 마커(예를 들어, 암피실린 내성, 하이그로마이신 내성, 테트라사이클린 내성, 또는 네오마이신 내성)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Itakura et al., 미국 특허 4,704,362] 참조). 염색체에 DNA를 통합한 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입하여 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 대한 원형양성, 살생물제 내성(예를 들어, 항생제), 또는 구리와 같은 중금속에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선별 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결되거나, 공동 형질전환에 의해 동일한 세포에 도입될 수 있다.

[0203] 최적화된 FVIII 서열을 발현하는 데 유용한 벡터의 예는 NEOSPLA(미국 특허 6,159,730호)이다. 이 벡터는 사이토메갈로바이러스 프로모터/인핸서, 마우스 베타 글로빈 주요 프로모터, SV40 복제 기점, 소 성장 호르몬 폴리 아데닐화 서열, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 엑손 1 및 엑손 2, 디하이드로엽산 환원효소 유전자, 및 리더 서열을 포함한다. 이 벡터는 가변 및 불변 영역 유전자의 통합, 세포 내 형질감염에 이은 G418 함유 배지에서의 선별, 및 메토타렉세이트 증폭시 매우 높은 수준의 항체 발현을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 벡터 시스템은 또한 미국 특허 5,736,137호 및 5,658,570호에 교시되어 있으며, 이들 각각은 전체가 본원에 참조로 포함된다. 이 시스템은 높은 발현 수준(예를 들어, 30 pg/세포/일 초과)을 제공한다. 다른 예시적인 벡터 시스템은 예를 들어 미국 특허 6,413,777호에 개시되어 있다.

[0204] 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 폴리시스트론 구성체를 사용하여 발현될 수 있다. 이들 발현 시스템에서, 다량체 결합 단백질의 다중 폴리펩티드와 같은 다수의 관심 유전자 산물이 단일 폴리시스트론 구성체로부터 생산될 수 있다. 이들 시스템은 진행 숙주 세포에서 비교적 높은 수준의 폴리펩티드를 제공하기 위해 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 사용하는 것이 유리하다. 양립가능한 IRES 서열은 본원에 또한 포함되는 미국 특허 6,193,980호에 개시되어 있다.

- [0205] 보다 일반적으로는, 폴리펩티드를 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 준비되면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포에 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 플라스미드를 숙주 세포에 도입하는 것은 상기 논의된 바와 같이, 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 형질전환된 세포는 FVIII 폴리펩티드의 생성에 적절한 조건에서 성장되고, FVIII 폴리펩티드 합성에 대해 분석된다. 예시적인 분석 기술은 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 또는 형광 활성화 세포 분류기 분석(FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.
- [0206] 재조합 숙주로부터 폴리펩티드를 분리하는 프로세스의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은 달리 명시되지 않는 한, 폴리펩티드의 공급원을 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. 즉, "세포"로부터의 폴리펩티드 회수는 회전 침강된(spun down) 전체 세포로부터의 회수, 또는 배지 및 현탁된 세포 둘 모두를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미할 수 있다.
- [0207] 단백질 발현에 사용되는 숙주 세포주는 바람직하게는 포유류 기원, 가장 바람직하게는, 본 발명의 분리된 핵산이 인간 세포에서의 발현에 최적화되었기 때문에 인간 또는 마우스 기원이다. 예시적인 숙주 세포주는 위에 기술되어 있다. FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 생산하는 방법의 일 구현예에서, 숙주 세포는 HEK293 세포이다. FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 생산하는 방법의 다른 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다.
- [0208] 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자는 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포와 같은 비포유류 세포에서도 발현될 수 있다. 이와 관련하여, 박테리아와 같은 다양한 단세포 비포유류 미생물, 즉 배양 또는 발효에서 성장할 수 있는 것들이 또한 형질전환될 수 있음이 이해될 것이다. 형질전환되기 쉬운 박테리아는 장내세균과의 구성원, 예컨대 대장균 또는 살모넬라; 고초균과 같은 간균과; 페렴구균; 연쇄상구균, 및 헤모필루스 인플루엔자의 균주를 포함한다. 박테리아에서 발현될 때 폴리펩티드가 일반적으로 봉입체의 일부가 될 수 있음이 또한 이해될 것이다. 폴리펩티드는 분리, 정제된 후, 기능성 분자로 조립되어야 한다.
- [0209] 대안적으로, 본 발명의 최적화된 뉴클레오티드 서열은 유전자이식 동물의 계놈 내로의 도입 및 유전자이식 동물의 젖에서의 후속 발현을 위해 이식유전자에 통합될 수 있다(예를 들어, 문헌[Deboer *et al.*, US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, 및 Meade *et al.*, US 5,849,992] 참조). 적합한 이식유전자는 카제인 또는 베타 락토글로불린과 같은, 유선 특이적 유전자 유래의 프로모터 및 인핸서와 작동가능하게 연결된 폴리펩티드에 대한 암호화 서열을 포함한다.
- [0210] 시험관내 생성은 스케일 업이 가능하여 많은 양의 목적하는 폴리펩티드를 제공할 수 있다. 조직 배양 조건하의 포유류 세포 배양 기술은 당업계에 알려져 있으며, 균질한 현탁 배양(예를 들어, 에어리프트 반응기 또는 연속 교반 반응기에서의 배양), 또는 고정화 또는 포획 세포 배양(예를 들어, 중공 섬유, 마이크로캡슐, 아가로스 마이크로비드, 또는 세라믹 카트리지에서 배양)을 포함한다. 필요한 경우 및/또는 원하는 경우, 폴리펩티드 용액은, 예를 들어 합성 인지 영역 폴리펩티드의 우선적 생합성 후에, 또는 본원에 기술된 HIC 크로마토그래피 단계 이전 또는 이후에, 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스 크로마토그래피, 또는 (면역-) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 하류 정제를 용이하게 하기 위해 친화성 태그 서열(예를 들어, His(6) 태그)이 임의로 폴리펩티드 서열 내에 부착되거나 포함될 수 있다.
- [0211] 일단 발현되면, FVIII 단백질은 황산암모늄 침전, 친화성 컬럼 크로마토그래피, HPLC 정제, 겔 전기영동 등을 포함하는 당업계의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로 문헌[Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))] 참조). 적어도 약 90~95% 균질성의 실질적으로 순수한 단백질이 약학적 용도에 바람직하며, 98~99% 이상의 균질성이 가장 바람직하다.
- [0212] **약학적 조성물**
- [0213] 본 발명의 분리된 핵산 분자, 핵산 분자에 의해 암호화된 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드, 벡터, 또는 숙주 세포를 함유하는 조성물은 약학적으로 허용되는 적합한 담체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 이들은 활성 화합물을 작용 부위로의 전달을 위해 설계된 제제로 가공하는 것을 용이하게 하는 부형제 및/또는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0214] 약학적 조성물은 볼루스 주사에 의한 비경구 투여(즉, 정맥내, 피하, 또는 근육내)용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 단위 투약 형태, 예를 들어 보존제가 첨가된 앰플 또는 다용량 용기로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액, 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 안정화제, 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 적합한 비히클(예를 들어, 발열원이 없

는 물)과 함께 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

- [0215] 비경구 투여에 적합한 제형은 또한 수용성 형태의 활성 화합물, 예를 들어 수용성 염의 수용액을 포함한다. 또한, 적절한 유성 주사 현탁액으로서 활성 화합물의 현탁액이 투여될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드를 포함한다. 수성 주사 현탁액은, 예를 들어 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 및 텍스트란을 포함하여, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 임의로, 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 분자를 캡슐화하여 세포 또는 간질성 공간 내로 전달하기 위해 리포솜이 또한 사용될 수 있다. 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 생리학적으로 적합한 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등이다. 일부 구현예에서, 조성물은 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함한다. 다른 구현예에서, 조성물은 활성 성분의 보관 수명 또는 효과성을 향상시키는 약학적으로 허용되는 물질, 예컨대 습윤제 또는 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 포함한다.
- [0216] 본 발명의 조성물은 예를 들어 액체(예를 들어, 주사용 및 주입용 용액), 분산액, 현탁액, 반고체 및 고체 투약 형태를 포함하여 다양한 형태일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 방식 및 치료 적용 방식에 따라 다르다.
- [0217] 조성물은 용액, 마이크로 에멀전, 분산액, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 맞춤형 구조로 제형화될 수 있다. 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분의 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 활성 성분을 필요한 양으로 혼입한 후, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들 중 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입하여 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 미리 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 필요한 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조이다. 용액의 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써, 주사용 조성물의 연장된 흡수를 일으킬 수 있다.
- [0218] 활성 성분은 방출 제어형 제형 또는 장치로 제형화될 수 있다. 이러한 제형 및 장치의 예는 임플란트, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함한다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형 및 장치의 제조 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참조.
- [0219] 주사용 데포 제형은 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에 약물의 마이크로캡슐화된 매트릭스를 형성하여 제조될 수 있다. 약물 대 중합체의 비, 및 사용된 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도가 제어될 수 있다. 다른 예시적인 생분해성 중합체는 폴리오르토에스테르 및 폴리무수물이다. 데포 주사용 제형은 또한 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 포획하여 제조될 수 있다.
- [0220] 보충 활성 화합물이 조성물에 혼입될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 키메라 단백질은 다른 응혈 인자, 또는 이의 변이체, 단편, 유사체, 또는 유도체와 함께 제형화된다. 예를 들어, 응혈 인자는 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 인자 XII, 인자 XIII, 프로트롬빈, 피브리노겐, 폰 빌레브란트 인자 또는 제조할 가용성 조직 인자(rsTF) 또는 전술한 임의의 것의 활성화 형태를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 지혈제의 응혈 인자는 또한 항섬유소용해 약물, 예를 들어 엽실론-아미노-카프로산, 트라넥삼산을 포함할 수 있다.
- [0221] 투약 요법은 최적의 원하는 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있고, 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 따라 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투약 단위 형태로 제형화하는 것이 유리하다. 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980)] 참조.
- [0222] 활성 화합물 외에도, 액체 투약 형태는 물, 에틸 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일, 글리세롤, 테트라하이드로푸르톨 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 및 소르비탄의 지방산 에스테르와 같은 불활성 성분을 함유할 수 있다.
- [0223] 적합한 약학적 담체의 비제한적 예는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin]에 또한 기술되어 있다. 부형제의 일부 예는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌,

글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 또한 pH 완충 시약, 및 습윤제 또는 유화제를 함유할 수 있다.

[0224] 경구 투여를 위해, 약학적 조성물은 통상적인 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 또한 액체, 예를 들어 시럽 또는 현탁액으로서 제조될 수 있다. 액체는 현탁제(예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체, 또는 수소화된 식용 지방), 유화제(레시틴 또는 아카시아), 비수성 비히클(예를 들어, 아몬드 유, 오일 에스테르, 에틸 알코올, 또는 분별화된 식물성 오일), 및 보존제(예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 포함할 수 있다. 제제는 또한 착향제, 착색제, 및 감미제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 물 또는 다른 적합한 비히클과 함께 구성하기 위한 건조 제품으로서 제공될 수 있다.

[0225] 협측 투여를 위해, 조성물은 통상적인 프로토콜에 따라 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.

[0226] 흡입 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 편리하게는 부형제를 포함하거나 포함하지 않는 분무 에어로졸의 형태로, 또는 임의로 분사제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소, 또는 다른 적합한 가스와 함께, 가압 팩 또는 분무기로부터의 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 예를 들어 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 화합물과 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기재의 분말 혼합물을 함유하여 제형화될 수 있다.

[0227] 약학적 조성물은 또한 예를 들어 통상적인 좌약 기재, 예컨대 코코아 버터 또는 기타 글리세리드를 함유하는 좌제 또는 정제 관장제로서 직장 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0228] 일 구현예에서, 약학적 조성물은 인자 VIII 활성을 갖는 폴리펩티드, 인자 VIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 최적화된 핵산 분자, 핵산 분자를 포함하는 벡터, 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 국소 투여, 안구내 투여, 비경구 투여, 척추강내 투여, 경막하 투여, 및 경구 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 투여된다. 비경구 투여는 정맥내 또는 피하 투여일 수 있다.

[0229] 치료 방법

[0230] 일부 양태에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법으로서, 본원에 개시된 핵산 분자, 벡터, 폴리펩티드, 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0231] 일부 구현예에서, 본 발명은 출혈 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 A형 혈우병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0232] 단리된 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드는 정맥내, 피하, 근육내, 또는 임의의 점막 표면을 통해, 예를 들어 경구, 설하, 협측, 설하, 비강, 직장, 질, 또는 폐 경로를 통해 투여될 수 있다. 단리된 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드는 또한 신경내, 안구내, 및 척추강내로 투여될 수 있다. 용혈 인자 단백질은 키메라 단백질이 원하는 부위로 천천히 방출되도록 하는 생체고분자 고체 지지체 내에 이식되거나 이에 연결될 수 있다.

[0233] 일 구현예에서, 단리된 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드의 투여 경로는 비경구이다. 본원에서 사용되는 비경구라는 용어는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 단리된 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드는 정맥내 투여된다. 이러한 모든 투여 형태가 본 발명의 범위 내인 것으로 명백히 고려되지만, 투여 형태는 주사용 용액, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적용 용액일 것이다.

[0234] 병태의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지 여부, 기타 투여 약물, 및 치료가 예방적인지 치료적인지 여부를 포함한 다양한 요인에 따라 달라진다. 통상적으로 환자는 인간이지만, 유전자이식 포유류를 비롯한 비인간 포유류도 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해, 당업자에게 알려진 통상적인 방법을 사용하여 적정될 수 있다.

[0235] 본 발명의 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드는 임의로 (예를 들어, 예방적 또는 치료적) 치료를 필요로 하는 장애 또는 병태를 치료하는 데 효과적인 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0236] 본원에서 사용되는 바와 같이, 보조 치료법과 함께 또는 조합하여 본 발명의 단리된 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드를 투여하는 것은 치료법 및 개시된 폴리펩티드의 순차적, 동시적, 공존적, 병행적, 동반적, 또는 동시발생적 투여 또는 적용을 의미한다. 당업자는 병용 치료 요법의 다양한 구성요소의 투여 또는 적용의 시점이 치료의 전반적인 효과성을 향상시키도록 정해질 수 있음을 이해할 것이다. 당업자(예를 들어, 의사)는 선택된 보

조 치료법 및 본 명세서의 교시에 기초하여 과도한 실험 없이 효과적인 병용 치료 요법을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0237] 본 발명의 단리된 핵산 분자, 벡터, 또는 폴리펩티드를 제제 또는 제제들과 함께 또는 조합하여 (예를 들어, 병용 치료 요법을 제공하기 위해) 사용할 수 있다는 것이 또한 인식될 것이다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 조합될 수 있는 예시적인 제제는 치료 중인 특정 장애에 대한 현재 표준 치료를 대표하는 제제를 포함한다. 이러한 제제는 본질적으로 화학적 또는 생물학적 제제일 수 있다. 용어 "생물학적 제제(biologic)" 또는 "생물학제(biologic agent)"는 치료제로서 사용하기 위한 살아있는 유기체 및/또는 이의 산물로부터 제조된 임의의 약학적 활성제를 의미한다.

[0238] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 조합하여 사용되는 제제의 양은 대상체에 따라 달라질 수 있거나, 당업계에 알려진 것에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bruce A Chabner *et al.*, *Antineoplastic Agents*, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1233-1287 (Joel G. Hardman *et al.*, eds., 9th ed. 1996)] 참조. 다른 구현예에서, 표준 치료와 일치하는 양의 이러한 제제가 투여된다.

[0239] 일 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자 및 이를 필요로 하는 대상체에게 핵산 분자를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트가 또한 본원에 개시된다. 다른 구현예에서, 본원에 제공된 핵산 분자의 생산을 위한 바콜로마이어스 시스템이 본원에 개시된다. 핵산 분자는 곤충 세포에서 생산된다. 다른 구현예에서, 발현 구성체에 대한 나노입자 전달 시스템이 제공된다. 발현 구성체는 본원에 개시된 핵산 분자를 포함한다.

[0240] 유전자 치료

[0241] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 분자는 유전자 치료에 사용된다. 본원에 개시된 최적화된 FVIII 핵산 분자는 FVIII의 발현이 필요한 임의의 상황에서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0242] 예를 들어, A형 혈우병에 대한 가능한 치료법으로서 체세포 유전자 치료가 연구되었다. 유전자 치료는 벡터의 단일 투여 후 FVIII의 지속적인 내인성 생성을 통해 질환을 치유할 수 있는 잠재력 때문에 특히 매력적인 혈우병 치료법이다. A형 혈우병은 혈장에서 미량(200 ng/ml)으로 순환하는 단일 유전자 산물(FVIII)의 결여에 전적으로 기인할 수 있는 임상 증상을 나타내기 때문에 유전자 대체 접근법에 매우 적합하다.

[0243] 일 양태에서, 본원에 기술된 핵산 분자는 AAV 유전자 치료에 사용될 수 있다. AAV는 다수의 포유류 세포를 감염시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:3251-3260 및 Grimm *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.* 10:2445-2450] 참조. rAAV 벡터는 세포에서 유전자 산물의 발현을 지시하는 조절 서열의 제어하에 관심 유전자 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 운반한다. 일부 구현예에서, rAAV는 투여에 적합한 담체 및 추가 구성요소와 함께 제형화된다.

[0244] 다른 양태에서, 본원에 기술된 핵산 분자는 렌티바이러스 유전자 치료에 사용될 수 있다. 렌티바이러스는 바이러스 게놈이 RNA인 RNA 바이러스이다. 숙주 세포가 렌티바이러스에 감염되면, 게놈 RNA는 감염된 세포의 염색체 DNA에 매우 효율적으로 통합되는 DNA 중간체로 역전사된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스는 투여에 적합한 담체 및 추가 구성요소와 함께 제형화된다. 다른 양태에서, 본원에 기술된 핵산 분자는 아데노바이러스 치료에 사용될 수 있다. 유전자 치료를 위한 아데노바이러스의 사용에 대한 검토는 예를 들어 문헌[Wold *et al.* (2013) *Curr Gene Ther.* 13(6):421-33]에서 확인할 수 있다. 다른 양태에서, 본원에 기술된 핵산 분자는 비바이러스 유전자 치료에 사용될 수 있다.

[0245] 본 발명의 최적화된 FVIII 단백질은 출혈 응고 장애, 혈관질환, 근육 출혈, 구강 출혈, 대출혈, 근육으로의 대출혈, 구강 대출혈, 외상, 두부 외상, 위장 출혈, 두개내 대출혈, 복부내 대출혈, 흉곽내 대출혈, 골절, 중추신경계 출혈, 후인두 공간에서의 출혈, 후복막 공간에서의 출혈, 및 장요근초에서의 출혈로 이루어진 군으로부터 선택되는 출혈 질환 또는 장애의 치료에 대한 유전자 치료 접근법을 사용하여 포유류, 예를 들어 인간 환자에서 생체내 생산될 수 있고 치료적으로 유익할 것이다. 일 구현예에서, 출혈 질환 또는 장애는 혈우병이다. 다른 구현예에서, 출혈 질환 또는 장애는 A형 혈우병이다. 이는 적합한 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 최적화된 FVIII 암호화 핵산의 투여를 포함한다. 특정 구현예에서, 이들 서열은 바이러스 벡터에 통합된다. 이러한 유전자 치료에 적합한 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 엡스타인 바 바이러스 벡터, 파코바바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 및 아

데노 관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터는 복제-결합 바이러스 벡터일 수 있다. 다른 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1 유전자 또는 E3 유전자에 결실을 갖는다. 다른 구현예에서, 서열은 당업자에게 알려진 비바이러스 벡터에 통합된다.

[0246] 다른 양태에서, 본원에 개시된 방법은 살아있는 유기체의 유전 정보(예를 들어, 게놈)의 표적화된 특이적 변경을 위한 기술을 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변경" 또는 "유전 정보의 변경"은 세포 게놈의 임의의 변화를 의미한다. 유전 장애의 치료와 관련하여, 변경은 삽입, 결실, 및/또는 수정을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0247] 일부 양태에서, 변경은 또한 유전자 녹인, 녹아웃, 또는 녹다운을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "녹인"은 DNA 서열 또는 이의 단편을 게놈 내에 추가하는 것을 의미한다. 녹인될 이러한 DNA 서열은 전체 유전자 또는 유전자들을 포함할 수 있고, 유전자 또는 이의 임의의 부분 또는 단편과 회합된 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 야생형 단백질을 암호화하는 cDNA가 돌연변이 유전자 보유 세포의 게놈에 삽입될 수 있다. 녹인 전략은 결함이 있는 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 대체할 필요가 없다. 일부 경우에, 녹인 전략은 기존 서열을 제공된 서열로 치환하는 것, 예를 들어 돌연변이 대립유전자를 야생형 카피로 치환하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 용어 "녹아웃"은 유전자 또는 유전자 발현의 제거를 의미한다. 예를 들어, 리딩 프레임의 파괴를 초래하는 뉴클레오타이드 서열의 결실 또는 부가에 의해 유전자가 녹아웃될 수 있다. 또 다른 예로서, 유전자의 일부를 관련없는 서열로 대체함으로써 유전자가 녹아웃될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "녹다운"은 유전자 또는 유전자 산물(들)의 발현의 감소를 의미한다. 유전자 녹다운의 결과로, 단백질 활성 또는 기능이 약화될 수 있거나 단백질 수준이 감소 또는 제거될 수 있다.

[0248] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 핵산 서열은 게놈 편집에 사용된다. 게놈 편집은 일반적으로 게놈의 뉴클레오타이드 서열을 바람직하게는 정확하게 미리 정해진 방식으로 변형하는 프로세스를 의미한다. 본원에 기술된 게놈 편집 방법의 예는 부위 지정 뉴클레아제를 사용하여 게놈의 정확한 표적 위치에서 대옥시리보핵산(DNA)을 절단함으로써 게놈 내의 특정 위치에 단일가닥 또는 이중가닥 DNA 손상을 생성하는 방법을 포함한다. 문헌[Cox et al. (2015). Nature Medicine 21(2): 121-31]에서 최근 검토된 바와 같이, 이러한 손상은 상동성 기반 복구(HDR) 및 비상동성 말단 연결(NHEJ)과 같은 자연적인 내인성 세포 프로세스에 의해 복구될 수 있으며 정기적으로 복구된다. 이 두 가지 주요 DNA 복구 프로세스는 일련의 대체 경로로 구성된다. NHEJ는 이중가닥 손상으로 인해 발생하는 DNA 말단을 직접 연결하며, 때로는 뉴클레오타이드 서열이 손실되거나 추가되어 유전자 발현을 방해하거나 향상시킬 수 있다. HDR은 정의된 DNA 서열을 손상 지점에 삽입하기 위한 주형으로서 상동성 서열 또는 공여체 서열을 활용한다. 상동성 서열은 자매 염색분체와 같은 내인성 게놈에 있을 수 있다. 대안적으로, 공여체는 뉴클레아제 절단된 유전자좌와의 상동성이 높은 영역을 갖는 플라스미드, 단일가닥 올리고뉴클레오타이드, 이중가닥 올리고뉴클레오타이드, 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드, 또는 바이러스와 같은 외인성 핵산일 수 있지만, 이는 절단된 표적 유전자좌에 통합될 수 있는 추가적인 서열 또는 결실을 포함한 서열 변화를 포함할 수도 있다. 세 번째 복구 메커니즘은 절단 부위에서 작은 결실 및 삽입이 발생할 수 있다는 점에서 NHEJ와 유전적 결과가 유사한, "대체 NHEJ"라고도 하는 미세상동성 매개 말단 연결(MMEJ)일 수 있다. MMEJ는 DNA 손상 부위를 플랭킹하는 몇 개의 염기쌍의 상동성 서열을 활용하여 보다 선호되는 DNA 말단 연결 복구 결과를 유도할 수 있으며, 최근 보고에 따르면 이 프로세스의 분자 메커니즘이 더욱 명확해졌다(예를 들어, 문헌[Cho and Greenberg (2015). Nature 518, 174-76] 참조). 일부 경우에, DNA 손상 부위의 잠재적인 미세상동성 분석을 기반으로, 예상되는 복구 결과를 예측하는 것이 가능할 수 있다.

[0249] 이러한 게놈 편집 메커니즘 각각은 목적하는 게놈 변경을 생성하는 데 사용될 수 있다. 게놈 편집 프로세스의 한 단계는 의도된 돌연변이의 부위 근처의 표적 유전자좌에서 1개 또는 2개의 DNA 손상(후자의 경우 이중가닥 손상 또는 2개의 단일가닥 손상)을 생성하는 것일 수 있다. 이는 CRISPR 엔도뉴클레아제 시스템 등의 부위 지정 폴리펩티드를 사용하여 달성할 수 있다.

[0250] 다른 양태에서, 본원에 기술된 핵산 분자는 FVIII ceDNA의 지질 나노입자(LNP) 매개 전달에 사용될 수 있다. 양이온성 지질과 중성 지질, 콜레스테롤, PEG, PEG화 지질, 및 올리고뉴클레오타이드와 같은 다른 지질 성분으로 형성된 지질 나노입자는 혈장 내 핵산 분해를 차단하고 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 촉진하는 데 사용되어 왔다. 이러한 지질 나노입자는 본원에 기술된 핵산 분자를 대상체에게 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0251] 본 발명은 대상체에서 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 방법으로서, 본 발명의 단리된 핵산 분자를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 폴리펩티드의 발현이 서열번호 32를 포함하는 기준 핵산 분자에 비해 증가되는, 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 대상체에서 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드

의 발현을 증가시키는 방법으로서, 본 발명의 벡터를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 폴리캡티드의 발현이 기준 핵산 분자를 포함하는 벡터에 비해 증가되는, 방법을 제공한다.

[0252] 본원에 기술된 모든 다양한 양태, 구현예, 및 옵션은 임의의 모든 변형으로 조합될 수 있다.

[0253] 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별 공보, 특허, 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적 및 개별적으로 나타난 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0254] 본 발명을 개괄적으로 설명하였지만, 본원에 제공된 실시예를 참조하여 추가 이해를 얻을 수 있다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 제한하려는 의도가 아니다.

[0255] **실시예**

[0256] **실시예 1: 변형된 FVIIIXTEN 발현 카세트**

[0257] 표적화된 숙주에 대한 암호화 서열을 코돈 최적화함으로써 이식유전자 발현 수준이 증가될 수 있는 것으로 가정하였다. 미국 공개 20190185543호에 기술된 바와 같이 이전 연구에서 V1.0 FVIIICo6XTEN 발현 카세트(서열번호 32)를 사용하여 더 높은 수준의 FVIII 발현이 입증되었다(도 1). 그러나, 표적 특이성을 추가로 개선하고 면역 원성을 감소시키기 위해, FVIIIXTEN 발현 카세트를 고갈된 CpG 모티프로 코돈 최적화하여 파보바이러스 ITR을 갖는 FVIIIXTEN 발현 카세트를 암호화하는 DNA 벡터에 대해 발생하는 선천적 면역 반응을 감소시켰다. 본 연구에서, 변형된 V2.0 FVIIIXTEN 발현 카세트는 인헨서 요소(A1MB2)를 갖는 간-특이적 변형 마우스 트랜스티레틴(mTTR) 프로모터(mTTR482), 하이브리드 합성 인트론(키메라 인트론), 우드척 전사후 조절 요소(WPRE), 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(bGHpA) 신호의 조절하에 XTEN 144 펩티드와 융합된(FVIIIXTEN) B-도메인 결실 인간 인자 VIII(BDDcoFVIII)을 암호화하는 코돈 최적화된 cDNA로 구성된다(서열번호 14)(도 1). 변형된 V2.0 FVIIIXTEN 발현 카세트의 생체내 기능성은 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스에서 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통한 전신 전달에 의해 단일가닥(ss) 또는 닫힌 말단(ce) DNA 형태의 다양한 파보바이러스 ITR로 입증되었다.

[0258] **실시예 2: 단일가닥 FVIIIXTEN(ssFVIIIXTEN) DNA**

[0259] 생체내 유의미하게 더 높은 수준의 활성을 나타낸 변형된 FVIIIXTEN

[0260] ITR 영역 내에 형성된 헤어핀이 더 높은 수준에서 이식유전자의 장기간 지속적인 발현을 유도하는 것으로 가정하였다. 변형된 FVIIIXTEN 발현 카세트의 생체내 기능성을 검증하기 위해, 미리 형성된 에리트로바이러스 B19 ITR을 갖는 V1.0 또는 V2.0 인간 FVIIIXTEN으로 구성된 단일가닥 DNA(ssDNA)를 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스에서 시험하였다. 이들 마우스에는 경증 A형 혈우병 환자에서 자주 관찰되는 돌연변이가 있는 변형된 인간 응고 인자 VIII(FVIII) cDNA의 발현을 유도하는 뮤린 알부민(*A1b*) 프로모터로 설계된 인간 *FVIII-R593C* 이식유전자가 포함되어 있다. 이들 마우스는 또한 *FVIII* 유전자의 녹아웃을 보유하고 있으며 내인성 FVIII 단백질이 결핍되어 있다. 이들 이중 돌연변이 마우스는 인간 FVIII 주사에 내성이 있고 FVIII 활성이 없다. 이들은 억제 항체를 거의 생성하지 않으며, 인간 FVIII로 치료한 후 FVIII 반응성 T 세포 또는 B 세포가 결여되어 있다. hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스는 문헌[Bril, et al. (2006) Thromb. Haemost. 95(2): 341-7]에 추가로 기술되어 있다.

[0261] 95°C에서 MscI 분해의 이중가닥 DNA 단편 산물(FVIII 발현 카세트 및 플라스미드 백본)을 변형시킨 후(변형), 4°C에서 냉각하여(복원) 회문 ITR 서열이 접히도록 하여, 미리 형성된 B19 ITR을 갖는 ssFVIIIXTEN을 생성하였다(도 2). 이어서 ssFVIIIXTEN을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 800 µg/kg으로 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스에게 전신 주사했다. 주사된 마우스로부터 5.5개월 동안 지시된 간격으로 혈장 샘플을 수집하고, 제조사의 지침에 따라 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 FVIII 활성을 측정하였다.

[0262] V1.0 및 V2.0 ssFVIIIXTEN 주사된 동물에 대한 정상의 백분율로 정규화된 혈장 FVIII 활성을 도 3에 나타내었다. 결과는 V1.0 ssFVIIIXTEN과 비교하여 V2.0 주사된 코호트에서 FVIII 활성의 유의미한 개선을 보여주었다. 그러나, 56일차까지 FVIII 발현의 초기 감소가 관찰되었지만 이후 168일차까지 수준이 안정화되었으며, 이는 주사된 동물의 간으로부터의 파보바이러스 ITR 플랭킹된 V2.0 ssFVIIIXTEN의 지속적인 발현을 시사한다. 따라서, 이들 결과는 생체내 V1.0과 비교하여 FVIII 활성의 장기간 지속적인 발현이 있는 변형된 FVIIIXTEN의 기능성을 증명한다.

[0263] 생체내 초생리학적 수준의 FVIII 발현을 나타낸 인간 보카바이러스(HBoV1) ITR

- [0264] 이식유전자 발현의 안정성과 장기간 지속성에 대한 ITR의 영향을 확인하기 위해, 인간 보카바이러스(HBoV1), 인간 에리트로바이러스 B19, 거위 파보바이러스(GPV), 또는 이들의 변이체 ITR을 사용하여 개선된 버전의 FVIIIXTEN을 생체내 시험하였다. 이들 ITR은 각각의 숙주에서 바이러스 게놈의 장기간 지속성에 필요한 열안정성과 ITR-특이적 요소를 기반으로 설계되었다. 시험 ITR 변이체 및 예측된 2차 구조는 이전 미국 특허 출원 63/069,114호에 기술되어 있다. 개별 변이체 ITR을 Golden Gate Assembly를 사용하여 합성 FVIIIXTEN 발현 구성체에 클로닝하고, Genewiz 시퀀싱 기관에서 시퀀싱을 통해 검증하였다. 이어서 전술한 바와 같이, 서열 검증된 구성체를 사용하여 ssFVIIIXTEN(ssDNA)을 생성한 후, 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 200, 800, 또는 1600 $\mu\text{g/kg}$ 으로 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스에게 전신 주사했다. 주사된 마우스로부터 5.5개월 동안 지시된 간격으로 혈장 샘플을 수집하고, 제조사의 지침에 따라 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 FVIII 활성을 측정하였다.
- [0265] V2.0 ssFVIIIXTEN 주사된 동물에 대한 정상의 백분율로 정규화된 혈장 FVIII 활성을 도 4에 나타내었다. 결과는 다양한 수준이기는 하지만 시험된 모든 파보바이러스 ITR에서 장기간 지속적인 FVIIIXTEN 발현을 보여주었다. 시험된 GPV ITR의 모든 변이체 또는 하이브리드는 다른 파보바이러스 ITR과 비교하여 FVIIIXTEN 발현 수준의 지속적인 감소를 나타냈다. 대조적으로, HBoV1 및 B19 ITR은 56일차까지 FVIIIXTEN의 초기 감소를 보인 후, 168일차까지 안정화되었으며, 이는 생체내 FVIIIXTEN 이식유전자의 ITR 의존적 지속성을 시사한다. GPV ITR과 달리, B19 및 HBoV1 ITR은 둘 모두 시험 변이체와 무관하게 유의미하게 더 높은 수준의 FVIII 발현을 나타냈으며, 이는 생체내 FVIIIXTEN 이식유전자의 ITR 의존적 안정성을 시사한다.
- [0266] 시험된 다양한 파보바이러스 ITR 중에서, HBoV1 ITR은 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스에서 정상 FVIII 활성의 유의미하게 더 높은 수준(100% 초과)을 나타냈다(도 4). 이들 결과는 다양한 파보바이러스 ITR을 사용하여 변형된 FVIIIXTEN 발현의 기능성을 증명하고, 생체내 이식유전자 발현의 ITR 의존적 안정성 및 지속성을 입증한다.
- [0267] **실시예 3: 단편 말단 FVIIIXTEN(ceFVIIIXTEN) DNA**
- [0268] ssFVIIIXTEN(ssDNA)은 변형된 FVIIIXTEN 발현 카세트의 생체내 발현에 효과적이었지만, 비바이러스 유전자 치료 벡터로 사용되는 ssDNA와 관련된 몇 가지 제한 사항이 있다. 그중 하나는 대장균에서 선택 및 증폭에 필요한 항생제 내성 유전자 및 원핵 복제 기점과 같은 외부 서열을 또한 포함하는 플라스미드 DNA를 생성하는 데 사용된 원핵 숙주(대장균)로 인한 내독소 오염 수준이다. 이러한 문제와 제한 사항을 해결하기 위해, 파보바이러스 ITR을 갖는 FVIIIXTEN 발현 카세트에 구성된 단편 말단 DNA(ceDNA) 형태의 DNA 치료 약물 물질을 생성하기 위한 진핵 세포 기반 시스템을 개발하였다. ceDNA의 유전적 구성은 재조합 AAV 벡터 DNA와 유사하지만 입체형태가 다르다.
- [0269] 이 DNA 벡터를 생성하기 위해, 생물학적 제제 제조에 널리 사용되며 재조합 인플루엔자 백신 제조를 위해 FDA가 승인한 유일한 플랫폼인 바콜로바이러스 곤충 세포 시스템을 활용하였다. 미국 특허 출원 63/069,073에 기술된 바와 같이, ceDNA 생산의 세 가지 다른 접근법을 바콜로바이러스 시스템에 사용하였다. 출발 물질(SM)과 비교하여 AAV2 또는 HBoV1 ITR을 갖는 변형된 FVIIIXTEN을 암호화하는 예시적인 정제된 ceDNA가 도 5a에 나타나 있다.
- [0270] ceDNA로부터 발현되는 변형된 FVIIIXTEN의 기능성을 검증하기 위해, 정제된 ceFVIIIXTEN을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 0.3 μg , 1.0 μg , 또는 2.0 μg /마우스(각각 12 μg , 40 μg , 및 80 $\mu\text{g/kg}$ 에 해당)로 hFVIIIR593C^{+/+}/HemA 마우스에게 전신 주사했다. 전술한 바와 같이, 주사된 마우스로부터 지시된 간격으로 혈장 샘플을 수집하고 발색 분석법으로 FVIII 활성을 측정하였다.
- [0271] ceFVIIIXTEN 주사된 동물에 대한 정상의 백분율로 정규화된 혈장 FVIII 활성을 도 5b에 나타내었다. 결과는 주사 후 56일차까지 시험된 최고 용량에서 관찰된 초생리학적 수준(정상의 500% 초과)의 FVIII 발현을 갖는 HemA 마우스에서 용량 의존적 반응을 보여주었다. 흥미롭게도, ceFVIIIXTEN 용량(80 $\mu\text{g/kg}$)보다 최소 20배 더 높은 1600 $\mu\text{g/kg}$ 으로 ssFVIIIXTEN을 마우스에 주사했을 때 유사한 수준의 발현이 달성되었다(도 4). 이 데이터는 ceDNA가 ssDNA 형태에 비해 더 높은 수준의 FVIII 발현을 제공한다는 것을 시사한다. 따라서, 이러한 연구는 ssDNA 또는 ceDNA로부터 발현되는 변형된 FVIIIXTEN의 기능성을 증명하고, 최적화된 ITR의 사용과 함께 코돈 최적화가 기능성 이식유전자를 생성하고 이의 장기간 지속성을 향상시킬 수 있음을 확인시켜 준다.
- [0272] **실시예 4: 변형된 FVIIIXTEN 발현 카세트**
- [0273] V2.0 FVIIIXTEN 발현 카세트는 mTTR 프로모터 및 인핸서 요소를 포함한다(도 1 참조). 그러나, 이 프로모터는 마우스 간 특이적이며, 거대 동물 모델이나 인간 환자에서 간-특이성을 확인하기 위한 제대로 된 연구나 특성화

가 이루어져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 V2.0 발현 카세트에서 mTTR 프로모터 및 인헨서 요소를 인간 간-특이적 알파-1-안티트립신(A1AT) 프로모터(서열번호 36)로 대체하여 V3.0 FVIIIXTEN 발현 카세트(서열번호 35)를 생성하였다(도 1).

[0274] **실시예 5: FVIIIXTEN HBoV1 mTTR 대 A1AT ssDNA 생체내 효능**

[0275] mTTR 대 A1AT 프로모터의 생체내 기능성을 검증하기 위해, 미리 형성된 HBoV1 ITR을 갖는 코돈 최적화된 인간 FVIIIXTEN(ssFVIIIXTEN)을 포함하는 단일가닥 DNA(ssDNA)로 도 6a에 도시된 구성체를 생성하였다. 95℃에서 PmlI 분해의 이중가닥 DNA(dsDNA) 단편 산물(mTTR 또는 A1AT FVIII 발현 카세트 및 플라스미드 백본)을 변성시킨 후, 4℃에서 냉각하여 회문 ITR 서열이 접히도록 하여, 미리 형성된 HBoV1 ITR을 갖는 ssFVIIIXTEN을 생성하였다. 생성된 ssFVIIIXTEN을 0.8 내지 1.2% 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였다. 겔 분석 결과 ssFVIIIXTEN에 대한 dsDNA의 크기가 절반으로 나타났으며, 이는 효율적인 헤어핀 형성을 시사한다(도 6b).

[0276] ssFVIIIXTEN을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 10 µg/마우스로 hFVIIIR593C+/+/HemA 마우스에게 전신 주사했다. 주사된 마우스로부터 5.5개월 동안 7일 간격으로 혈장 샘플을 수집하였다. 제조사의 지침에 따라 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 혈장 FVIII 활성을 측정하였다.

[0277] ssFVIIIXTEN 주사된 동물에 대한 정상의 백분율로 정규화된 혈장 FVIII 활성을 도 6c에 나타내었다. 이들 결과는 주사 후 21일까지 동등한 수준의 FVIII 발현을 보여주었으며, 이는 hFVIIIR593C+/+/HemA 마우스 동물 모델에서 mTTR 또는 A1AT 프로모터에 의해 발현되는 FVIIIXTEN 수준에 유의미한 차이가 없음을 시사한다.

[0278] **실시예 6: FVIIIXTEN AAV2 전장 대 절단된 ceDNA 생체내 효능**

[0279] 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터는 ITR-ITR 연쇄체 형성을 통해 다양한 복제 형태의 바이러스 게놈(예를 들어, 단량체, 이량체, 또는 다량체)을 생성하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 이전에, AAV2 WT ITR에 의해 플랭킹된 V2.0 코돈 최적화된 FVIIIXTEN(ceFVIIIXTEN)을 포함하는 단편 말단 DNA(ceDNA) 벡터가 바칼로바이러스 시스템에서 단량체 및 다량체 형태의 벡터 게놈과 함께 ceFVIIIXTEN의 절단된 종을 생성한 것을 관찰하였다. 예를 들어, 국제 출원 PCT/US21/47218호 참조.

[0280] 본 연구에서, ceFVIIIXTEN의 절단된 종의 특성을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 국제 출원 PCT/US21/47218호에 기술된 바와 같이 연속 용리 전기영동을 통해 ceFVIIIXTEN의 전장 및 절단된 종을 둘 다 정제하였다. ceFVIIIXTEN의 두 종 모두의 순도는 아가로스 겔 전기영동에 의해 측정되었으며, 결과는 ceFVIIIXTEN의 전장(8.3kb) 및 절단된(6.0kb) 종의 크기에 해당하는 주요 밴드를 보여주었다(도 7a).

[0281] ceFVIIIXTEN의 두 종 모두의 뉴클레오타이드 서열을 추가로 검증하기 위해, 본 발명자들은 정제된 ceFVIIIXTEN 물질에 대해 MiSeq Illumina Sequence Analyzer를 사용하여 차세대 염기서열(NGS) 분석을 수행하였다. 도 7b에 도시된 NGS 결과는 숙주 세포 및/또는 바칼로바이러스 게놈에서 유래된 일부 불순물과 함께 전장 ceFVIIIXTEN 서열 판독에 대한 80% 초과 커버리지(상단 패널) 및 절단된 ceFVIIIXTEN 종에 대한 75% 초과 커버리지를 나타냈다. NGS 데이터의 추가 분석 결과, 절단된 ceFVIIIXTEN 판독은 ceFVIIIXTEN의 5' 말단에 ITR 서열을 유지하면서 키메라 인트론 영역의 상당 부분이 누락된 것으로 나타났다.

[0282] ceFVIIIXTEN의 절단된 종의 기능성을 추가로 검증하기 위해, ceFVIIIXTEN의 정제된 전장 또는 절단된 종을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 40 또는 80 µg/kg으로 hFVIIIR593C+/+/HemA 마우스에게 전신 주사했다. 주사된 마우스로부터 7일 간격으로 혈장 샘플을 수집하고, 제조사의 지침에 따라 Chromogenix Coatest® SP Factor VIII 발색 분석법으로 혈장 FVIII 활성을 측정하였다. ceFVIIIXTEN 주사된 동물에 대한 정상의 백분율로 정규화된 혈장 FVIII 활성을 도 7c에 나타내었다.

[0283] 결과는 전장 ceFVIIIXTEN 주사된 코호트에서 초생리학적 수준의 FVIII 발현을 보여주었다. 그러나, 절단된 ceFVIIIXTEN을 주사한 동물은 주사 후 21일까지 시험된 두 용량 모두에서 2배 더 낮은 FVIII 발현을 나타냈다(도 7c). 이 데이터는 생체내 V2.0 코돈 최적화된 FVIIIXTEN의 발현 수준의 개선에 대한 키메라 인트론의 기여를 추가로 뒷받침한다(도 7c).

[0284] **실시예 7: FVIIIXTEN 단편 말단 DNA(ceFVIIIXTEN) 생체내 효능**

[0285] 본 연구에서, 본 발명자들은 변형된 FVIIIXTEN을 암호화하고 AAV2 또는 HBoV1 ITR에 의해 플랭킹된 ceDNA의 생체내 효능을 조사하였다. 이전에 설명한 바와 같이(예를 들어, 국제 출원 PCT/US21/47218호 참조), AAV2 또는 HBoV1 ITR을 사용하여 바칼로바이러스 시스템에서 ceFVIIIXTEN DNA를 생성하였다. 출발 물질(SM)과 비교하여 각

ceDNA의 순도를 아가로스 겔을 사용하여 분석하고 도 8a에 나타내었다.

[0286] 정제된 ceFVIIIXTEN을 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 1.0 μ g 또는 2.0 μ g/마우스(각각 40 μ g 또는 80 μ g/kg에 해당)로 hFVIIIR593C+/+/HemA 마우스에게 전신 주사했다. 전술한 바와 같이, 주사된 마우스로부터 간격을 두고 혈장 샘플을 수집하고 발색 분석법으로 FVIII 활성을 측정하였다.

[0287] ceFVIIIXTEN 주사된 동물에 대한 정상의 백분율로 정규화된 혈장 FVIII 활성을 도 8b에 나타내었다.

[0288] 결과는 AAV2 또는 HBoV1 ITR에 의해 플랭킹된 ceDNA 벡터에 대해 비슷한 FVIII 발현 수준을 보여주었다. 앞서 살펴본 바와 같이, FVIII 발현 수준은 처치된 동물에서 256일차까지 점차 감소했으며, 이는 간 간세포에서의 시간 경과에 따른 벡터의 손실을 시사한다. 이들 연구는 AAV2 또는 HBoV1 ITR을 포함하는 ceDNA 벡터로부터 발현되는 변형된 V2.0 FVIIIXTEN의 기능성 및 장기간 지속성을 증명한다.

[0289] 특정 구현예에 대한 상기 설명은 본 발명의 일반적인 속성을 완전히 밝혀 제3자가 해당 분야 기술 내의 지식을 적용함으로써, 본 발명의 일반 개념을 벗어나지 않으면서 과도한 실험 없이 이러한 특정 구현예를 다양한 응용에 맞도록 용이하게 수정 및/또는 조정할 수 있을 것이다. 따라서, 본원에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 이러한 조정 및 수정은 개시된 구현예의 균등물의 의미 및 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본원에서의 어법 및 용어는 제한을 위한 것이 아니라 설명을 위한 것이므로 본 명세서의 용어 또는 어법은 교시 및 지침에 비추어 당업자에 의해 해석되어야 한다는 것이 이해되어야 한다.

[0290] 본 발명의 다른 구현예는 본원에 개시된 발명의 명세서 및 실시를 고려함으로써 당업자에게 명백할 것이다. 명세서 및 실시에는 단지 예시적인 것으로 간주되고 본 발명의 진정한 범위 및 사상은 다음의 청구범위에 의해 나타나는 것으로 의도된다.

[0291] 본원에 인용된 모든 특허 및 공개문헌은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0292] 서열

표 1

후가 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열

서열번호 / 설명	뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열
서열번호 1: HBov1 5' ITR	GTGGTTGTACAGACGCCATCTTGGAAATCCAATATGCTGCCGGCTCAGTCATGCCTGCGCTGCGCGCAGCGCTGCG CGCGCGCATGATCTAATCGCCGGCAGACATATTGGATTCCAAGATGGCGTCTGTACAACCAC
서열번호 2: HBov1 3' ITR	TTGCTTATGCAATCGCGAAACTCTATATCTTTTAATGTGTTGTTGTGTACATGCCCATCTTAGTTTTATATACAGT GCGCGCTTAGTTATATAACATGCATGTTATATAACTAAGCGCCAGCTGATATAAACTAAGATGGCGCATGTACAAC AACAAACACATTAAGATATAGAGTTTCGCGATTGCATAAGCAA
서열번호 3: HBov1-5' ITR- mTR482- 인트론- coBDDFVIIIXT EN (V2.0)- WPRE- bGHpolyA- HBov1-3' ITR	GTATACCTGCAGGCTAGCCACGTGTTGTTGTGTACATGCCCATCTTAGTTTTATATACAGTGGCGCTTAGTTATA TAACATGCATGTTATATAACTAAGCGCCAGCTGATATAAACTAAGATGGCGCATGTACAACAAACACATTAATAA GATATAGAGTTTCGCGATTGCAAGCTTGGCCCCAGGTTAATTTTAAAAAGCAGTCAAAGGTCAAGTGGCCCTTGGC AGCATTACTCTCTCTATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAACATTCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAAC ATCTGGACTTATCTCTGGGCTCTCCCACTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTAAAAAGCAGTCAAAGGTCAAA GTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAACATTCTGGAGGCAGGA GAAGAAATCAACATCTGGACTTATCTCTGGGCTCTCCCACTGATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCTGTTC AAACATGTCCTAATCTCTGCGGGCAAGGTCGGCAGTAGTTTCCATCTTACTCAACATCTCCCACTGTCAGTA GGATCTGTCTGTCTGCACATTTCTGAGAGCAGTGTTCGATACTCTAATCTCCCGGGCAAGGTCGATTGACTT TTTTCCATCTTACTCAACATCTCCCACTGTCAGTAGGATCTGTCTGTCTGCACATTTCTGAGAGCAGTGTTCGGA TACTCTAATCTCCCGGGCAAGGTCGATTGACTTAGGTTACTTATTCTCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGA ATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAGCCCTTCACAG GAGAAGCGTCAACAGATCCACAAGCTCTGTAGAGTCGCTGCGCGCTGCTTCGCCCGTGGCCGCTCGCCGCG CGCTCGCGCGCGCCCGGCCGTCTGACTGACCGCTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCTCTCC GGGCTGTAATAGCGCTTGGTTATTGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGA AGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGTGTGCTGCGTGGGAGCGCCGCTGCGGCTCCG GCTGCCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCACTGTGCGCAGGGGAGCGCGG CCGGGGCGGTGCCCGCGTGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGTGCGGGGTGTGTGCTGCGGGGGTG AGCAGGGGGTGTGGGCGCGTGGTGGGCTGCAACCCCCCTGCAACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCAGCGCCGGC TTCGGGTGCGGGGCTCCGACGGGGCTGGCGCGGGGCTCGCGTGCCTGGGCGGGGGTGGCGGAGGTGGGGGTGCC GGGCGGGGCGGGGCGGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTG AGGCGCGGCGAGCGCAGCTTGTCTTTTATGGTAATCTGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCAATCTG TGGCGAGCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCACCCCCCTAGCGGGGCGGGGGCAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAATGGGCGGGGAGGGCTTGTGCTGCTGCCGCGCCGCTCCCTTCTCCCTTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCG GGGGAGCGGCTGCTTGGGGGGGAGGGGCGAGGGCGGGGTTGCGCTTGTGCGTGTGACCGGGCTCTAGAGGCTTC TGCTAACCTTGTCTTGCCTTCTCTTTTCTACAGCTCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTT TGGCAAGAATTACTCGAGGCCACCATGCAGATTGAATGTCCACTTGTCTTCTGTGCTCTGTGCTTTTGTCTT CTCGGCCACCCGCGGTATTACTTAGTGCTGTGGAATGAGCTGGGACTACATGCAGTCCGACCTGGGAGAACTGCC GGTGGACGCGAGATTCCACCTAGAGTCCGAAAGTCTTCCATTCAACACCTCCGTGGTCTACAAAAGACCTGTT CGTGGAGTTCACTGACCACCTTTCAATATTGCCAAGCGCGCCCCCTGGATGGGCTGCTTGGTCTACGATCCA AGCAGAGGTCTACGACACCTGGTCACTCACTGAAGAATAGGCTCAACCCCGTGTGCTGCTGTGGAAGT GTCTTACTGGAAGGCTCAGAGGGTGCCGAATATGATGACCAGACAGCAGAGGGAAAAGGAGGATGACAAAGTGT TCCGGGTGGCAGCCACTTACGTGTGGCAAGTGTGAAGGAAAACGGGCTATGGCTCGGACCCCTATGCTGAC CTACTCTACCTGTCCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTAACTCGGGACTGATCGCGCCCTTGTGGTGTGACAGAGA AGGCAGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCAGACCTGCACAAGTTCATTCTGTTGTTGTGTGTTGATGAAGGAAAGTC CTGGCACTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGCAAGGATAGAGATGCGGCTCGGCCAGAGCTGGCCTAAAATGCACAC CGTCAACGGATATGTGAACAGGTGCTCTTGGCTCATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGATTGGCATGTGATCGG CATGGGTACTACTCGGAAGTGCATAGTATCTTTCTGGAGGGCCATACCTTCTGGTGCACACACAGCAGGCGCTC GCTGGAATCTCGCTTATCACTTTCTGACTGCGCAGACCTCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGTGTTCTGTCA CATCAGCTCCCATCAGCATGATGGGATGGAGGCTATGTCAAAGTGGACTCTGCTGCTGAGGAGCCACAGCTCCGGAT GAAGAAATGAGGAGCGGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGAGTGTGCGGATTGATGACGA CAACAGCCGCTCTTATCAAAATTAGATCAGTGGCGAAGACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCCCGCA

[0293]

	GGAGAGGAGTGGGACTACGCGCCGCTGGTGTGGCCAGACGACAGGAGCTACAAGTCCCAGTACCTCAACAACGG GCGCAGCGCATTTGGCAGGAAGTACAAGAAAGTCCGCTTTCATGGCTACACTGATGAAACCTTCAAGACGAGGGAAGC CATCCAGCACGAGTACGGCATCTTGGGACCGCTCTTTACGGCGAAGTCGGGGATACCTGCTCATCTTTTCAAGAA CCAGGCATCGCGCCCTACAACATCTACCTCACGGGATCACAGACGTGCGCCGCTCTACTCCCGCCGGCTGCCAA GGGAGTGAAGCAGCTGAAGGATTTTCCATCTGCGGGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACTGTGGAAGA TGGCCCTACCAAGTCGAGCCCTCGCTGTCTGACCCGGTACTATTCTCGTTTGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCTC GGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATCTGTACAAGGAGTCCGTGGACAGCGCGGAACAGATCATGTCCGACAAGCG CAACGTGATCTGTTCTCTGCTTTGATGAAAACAGATCGTGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTTCTCGCCAA CCAGCGGGAGTGAACCTGGAGGACCCGGAGTTCCAGGCCTCAAAACATTATGCACTCTATCAACGGCTATGTTTGA CTCGCTCAACCTGAGCGTGTGCTGCATGAAGTGGCATACTGTTACATCTGTCATCGGAGCCAGACCGACTTCCT GTCCTGTTCTTCTCCGGATACACCTTCAAGCATAGATGGTGTACGAGGACACTCTGACCTCTTCCATTTTCCGG AGAACTGTGTTTCTGTCATGTCATGGAACCCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATACTCGGACTTCCGGAATAGAGG GATGACCCGCTGCTGAAAGTGTCCAGCTGTGACAGAATACCGGCGATTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTC CGCTTATCTGCTGTCCAAGAACACGCCATTGAACCCAGGTCTTCTCCAAAACGGTGACCCGACCTCCGAAAGCGC CACCCAGAGTCAGGACCTGGCTCGGAACCGGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGACTTCCGAGTCCGCAACCCC CGAGAGTGGACCCGGATCCGAACAGCAACCTCAGGATCAGAAACCCCGGGAATTCGGAATCCGCCACTCCCGAGTC GGGACCAAGGACCTCCACTGAGCTTCCGAGGGAGCGCCCGGATCCCTGCTGGATCCCTACAGCACTGAAGA AGGCACCTCAGAATCCGCGACCCCTGAGTCCGGCTCGAAGCGAACCCGCCACTCCGTTCCGAAACCCCTGGGAC TAGCGAGAGCGCCACTCCGGAATCGGGCCAGGAAGCCCTGCCGGATCCCGACAGCAGGAGGGAAGCCCGC CGGGTCACCGACTTCACTGAGGAGGGAGCTCATCCCCCGCTGCTGAAGCGGCATCAAGAGAGAGTACACGAGC CACTCTCCAGTCGATCAGGAAGAAATGACTACGACGATACTATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTGACAT CTACGATGAGGATGAGAACCACTCCCTCGGAGCTTTCAGAAGAAACCCGCCACTACTTCTATCGCTGCCGTGGAGCG GCTGTGGGATTACGGGATGTCCAGCTCACCGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCCGATTCAA GAAGGTCTGTGTTCCAAGAGTTCACGACGGGTCTTCACTCAACCCCTGTACCGGGCGAATCAACGAACACTGGG ACTGCTTGGGCGGTATATCAGGGCAGAAGTGGAGATAACATCATGGTCACCTTCCGCAACAGGCTCCCGCCGTA CAGCTTCTACTTCTACTGATCTCTACGAGGAAGATCAGCGCAGGGAGCCGAGCCCGGAAGAATTCGCTAAGCC TAACGAACCTAAGACCTACTTTTGGAGGTCACAGCATCACATGGCCCCGACCAAGAGCAGTTTGACTGTAAAGCTG GGCTTACTTCTCGATGTGGACCTGGAGAAAGGACGTGCACTCGGGACTCATTGGCCGCTCCTTGTGTGCCATACTAA TACCTGAAACCTGCTCACGGTCGCAAGTCACAGTGCAGGAGTTCGCCCTCTTCTTCAACATCTTCGATGAAACAAA GTCTTGGTACTTTACTGAGAATGGAACGCAATTGCAAGGACCCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCACCTTCAA GGAAACCTACCGGTTTCACTGCGATTACCGCTACATAATGGACAGTTTGCAGGACTGGTCATGGCCAGGACAGAG AATTCGGTGGTATCTGCTCTCATGGGCTCAACGAAACATTCACAGCATTCATTTTCCGGCATGTGTTACCGCT CCGGAAGAAGGAAGATGAGTCAAGATGGCTCTGTACAACCTTACCCTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAATGCTGCTAG CAAGGCCGGCATTGGAGAGTGAATGCTGATCGGAGAGCATTGACGCCGAATGTCCACCTGTTTCTGTGTA CTCAACAAAGTGGCAGACCCGCTGGGAATGGGCTCAGGTCAATTAGGGATTTCCAGATCACTGCTTCCGGGCGATA CGGGCAGTGGGCACTTAAGTTGGCCGGCTGCACTACTTGGCTCATCAATGCTTGGTCCACCAAGGAACCTTCTC CTGGATTAAAGTGGACCTCTGCGCCCAATGATTATTACGGTATTAAGACCCAGGGTGCCCGACAGAAGTTCTCTC ACTCTACATCTCGCAATTCATCATATGTACAGCTGGATGGGAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGAAATCCACTGG AACGCTCATGTGTTTTCGGCAACGTGGACTCTCCGGCATTAAGCACAACTCTTCAACCTCCGATCATTGCTCG GTACATCTCGGCTGACCCCACTCACTACAGCATCCGGTCCACCTCGCGATGGAACCTGATGGGTTGTGACCTGAATC CTGCTCCATGCCCCCTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCGATGACAGATCACCCTCTTCACTACTTCAACACAT GTTGCGACCTGGTCCCCGTGAAAGGCCCTGCACTTCAAGGTGCTCCAATGCGTGGCGCTCAAGTGAACAA CCCCAAGGAGTGGCTCAGGTGCACTTCAAAAAGACATGAAGGTACCGGAGTGACACCCAGGGCGTGAAGTCCCT GCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAGTTCCTCATCTCTCAAGCCAAGACGACATCAGTGGACCTGTTCTTCAAAA CGGAAAGTCAAAATATTCCAGGCAACAGGACTCTTCAACCTGTGGTCAACAGCTGGACCCCATTTGCTGAC CCGCTACCTCCGATCACCCTCAAGCTGGGTCCACAGATCGACTGCGCATGGAGGTCCTTGGATGCGAAGGCCA AGATCTGTAAGCGGGCTCATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATA TGTGCTCTTTTACGCTATGTGATACGCTGCTTAAATGCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGATGGCTTTCAT TTTCTCTCTTTGATAAATCTGGTGTGCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGACGCAAGTGGCGTGGT GTGACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACTGTGAGCTCTTTCGGGACTTTCGC TTTTCCCCCTCCTATTGACAGGGCGGAATCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG CACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAATCATGCTCTTCTTGGCTGCTGCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGAGCTCTTCTGTACGCTCTTCCGGCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCGCGGCTGCTGCGGCTCT GCGGCTCTTCCGCTCTTCCGCTTCCGCTTCCAGCAGAGTGGATCTCTTGGGGCTTCCCGCTGCTAGGCG ACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCTTCTTGAACCTGGAAGGTGCACTCCC ACTGTCTTCTCAATAAAATGAGGAAATGATCGCATGCTGAGTGGTGTCTTATTTGCGGGGTGGGGTG GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGATGCTGGGGAAGACATGGGCGCGCAGGCTGTG GACGCCCCGGGATACCGCATCGCTCGCGACGATAAAGTATATGTGAGTGGTGTACAGACGCACTTGGAAATC CAATATGCTGCGGCGATTAGATCATGCGCGCGCAGCGCTGCGCGCAGCGCAGGATGACTGAGCCGCGAGAC ATATTGGATTCCAAGATGGCTGTGTACAACACGCTGTTAAGTGCAGACTAGTGAGCTCGTTAAC
서열번호 4:	GCGGCCGGGATCCGCCACCATGGCATTCAATCCGCCGTAATACGCGATTTTCAACCCGCTTTACGTATGTCT TTAAGTTTCCGTACCTCAATGGAAGAGAAAGAGTGGCTACTGCACGCTTGTGCTCCACGGCACCGAGCAGTCCA

[0294]

Sf 코돈 최적화된 HBov1 NS1	TGATTCAATTACGTAACGTGCCCCACACCCGGACGAGGATATTATCCGGGACGATCTTCTAATAAGTTTGGGAAGATA GGGATTTCGGGGCGGTCCTGTGTAAAGCGGTATACATGGCTACTACCAGTTGATGTCTACAAGCAACGCAATATGT TCCCAAGGTGCGACATAATCGTTCAGTCAGAGTTAGGTGAAAAAATTTACATTGTCTATATTATCGTTGGAGGCGAAG GCCTATCAAAGAGAAACGCTAAGAGCTCTTGCGCTCAGTTTTACGGACTTATATTAGCAGAAATTATCCAGCGCTGTA AGAGTTTACTAGCCACCCGTCGTTTGAGCCGGAAGAAGCGGATATATTTATACGTTGAAGAAAGCGGAGCGCGAGG CCTGGGGTGGAGTTACTGGCGGTAAACATGCAAAATCTTACAATACAGGGACCGTCGGGGTGACCTGCATGCACAGACTG TTGATCCCCCTCAGATTCTTCAAAAATTATTTGTTACCGAAGAACCGATGCATAAGTAGTTACAGCAAACTGATGTCT GTACTAGCCCTGATAACTGGTTCATTCTGGCCGAAAAACGTAATCGCATACACTTATCAATGGATTGCCGCTTCCCG AGCACTATCGAAAAAACTATATGCCACCCTGGATAATGAAGTTATACCTGGACCACAGACTATGGCGTATGGAGGGA GAGGCCCTTGGGAACATTTACCCGAGGTGGGTGACCAGAGGCTTGCCGCAAGTTCCGTGAGCACTACGTATAAGCCAA ACAAGAAGGAGAAAGCTAATGCTCAACCTCCTCGACAAGTGTAAAGGAGTTGAATCTTCTAGTTTATGAGGATCTTGTAG CGAACTGCCAGAGCTGCTGCTCATGTCTAGAAGGCCAACCTGGAGGTGCTCGACTCATCGAGCAAGTACTAGGAATGC ATCACATCAATGTATGCTCGAATTTACCGCGCTAACGTACCTCTTCCATCTGCATCCGGTGACATCGCTGGATAGTG ACAACAAAGCTTACAGCTTTTACTAATTCAGGGGTACAACCCCTGGCAGTGGGGCATGCTCTCTGTTGTGTGTTAA ACAAACAATTTGGTAAACAGAACACAGTCTGTTTTTACGGGCCAGCATCTACTGGGAAAAACAAATATGGCAAAAGCGA TTGTGCAGGGAATCCGGCTATATGGCTGCGTCAACCATCTTAACAAGGGTTTTGTTTTCAATGATTGTCGACAAACGCC TCGTAGTCTGGTGGGAGGAATGCCATATGCACAGGACTGGGTGGAGCGAGCAAGTGATTTCTTGGCGGGACCGAAT GTCTGATCGAGCTCAAGCACAGAGATTCTGTCTATTGACACAAACGCTGTAAATAATTTGACTAATCAGCACTTT ACGCCGTGCTGGGAGGGAATTCGTTGCTCACGTTTACGCTGCGCTCTCAAAGAACGGGTATTACAGCTGAATTTTA TGAAACCACTCCCCAACTTTTGGTGAGATAACCGCACAGAAATCGCTGCTGCTACAGTGGTGTCTTTAATGAAT ATGACTGACACCTGACAGGTTTCAAACAGAAAGTGAATTTGGACAAGATACCTAATCTATTTCCGTTGGGGGATTGT GCCCAACACATTTCCCAAGATTTTACACTTTCAGCAAAATGGGTATTGCACGGACTGCGGGGGCTACCTTCCCACTCCG CTGATAATTTCAATGTATACCGATCGGGCTAGCGAAACATCCACCGGCGACATAACGCCCTCCAATGATTCGAATCTA GAGCTGCACTCTCGAGGCATGCGGTACC
서열번호 5: 외측 프라이머	GTGGACGTGAAGAAACC
서열번호 6: 내측 프라이머	GGTCATAGCTGTTTCCTGTG
서열번호 7: hr5, ie1, neo, p10PAS	ATTAAGCTTCCGCGTAAAAACAATCAAGTATGAGTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACCGAAC TGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAAACGACGATCAGTGGATGATGTCATTTGTTTTCAAATCGAGATGATGTC ATGTTTTGCACACGGCTCATAAATCGCTTTACGGGTAGAATTCACGTGTAACGACGATCGATTGATGAGTCATTT GTTTTGCAATATGATATCATAAATGACTCATTGTTTTTCAAACCGAACCTTGATTACGGGTAGAATTTACTACTT GTAAAGCACAATCAAAAAGATGATGTCATTTGTTTTTCAAACCTGAACCTCGCTTACGAGTAGAATTTACGTGTAAA ACACAATCAAGAAATGATGTCATTTGTTATAAAAAATAAAGCTGATGTCATGTTTTGCACATGGCTCATAACTAAAT CGCTTTACGGGTAGAATTTACGCGCGTGCATGCTTTGTGATGCGCGACATTTTTGTAGGTTATTGATAAAATGA ACGGATACGTTGCCGACATTATCATTAAATCCTTGGCGTAGAATTTGTCGGGTCCATTGTCCGTGTCGCTAGCATG CCCATAACGGACCTCGTACTTTTGGCTTCAAAGTTTTGCGCACAGACAAAATGTGCCACATTGACGCTCTGCATGT GTGCGCGTTACCACAATCCCAACGGCGAGTGTACTTGTGTATGCAATAAATCTCGATAAAGGCGCGGCGCGCA ATGACGTGATCAGCTACGCTCCTCGTTCCTTCAAGGACGGTGTATCGACCTCAGATTAATGTTTATCGGCCGA CTGTTTTCGTATCCGCTCACCAACCGCTTTTGCATTAACTGTATGTCGGCGGATGTTCTATATCTAATTTGAAT AAATAACGATAACCGCTTGGTTTTAGAGGGCATAATAAAGAAATATTGTTATCGTGTTCGCCATTAGGGCAGTAT AAATTGACGTTCTGTTGGATATTGTTTCAAGTTGACACTGGCGGCGACAAGATCGTGAACAAACCAAGTGAC GCGGCCGATTTGTAAAAAATAAATAAATAATGATCGAGCAGGACGGCTGCACGCTGGTTCTCCAGCTGCTTGG GTCGAGCGTCTGTTCCGGTACGACTGGGCTCAGCAGACCATCGTTGCTCCGACGCTGCTGTGTTCCGTCTGTCGCT CAGGGTCTGCCGCTGTTCTGTCAGAACCGACCTGTCCGGTCTCTGAACGAGCTGCAGGACGAGGCTGCTGCTG TCCTGGCTGGCTACCACTGGTGTCCCTTGCCTGCTGCTGCTGGACGTGGTCACTGAGGCTGGTCTGACTGGCTGCTG CTGGGAGAAGTGCTGGACAGGACCTGCTGCTCCAGCCACCTGGCTCCAGCTGAGAAGGTGCCATCATGGCTGACGCT ATGCTGCTGCTGCACACCTGGACCTGCTACCTGCCCTTTCGACCAACCAAGCTAAGCACCCTATCGAGCGTCTGCT ACCCGTATGGAAGCTGGCTGGTGGACAGGACGACCTGGACGAAGAACACCAAGGACTGGCCCTGCTGAGCTGTTT GCTGCTGTAAGGCTCGATGCTCCGACGGCGAGGACCTGGTGGTACTCACGGCGACGCTTGCCTGCCAACATCATG GTCGAGAAGCGTGGTTTCTCCGGTTTATCGACTGCGGTGCTGCGGTGCTGACGTTACCAGGATATCGCTCTG GCTACCCGTGATATCGCTGAGGAACCTGGGTGGCGAGTGGGCTGACAGATTCTGGTGTGACGGTATCGTCTGCC GACTCCAGCGTATCGCTTCTACGCTGCTGGACGAGTTCTTAAGCCCTTGTAAACGCCACAATTGTGTTGT TGCAATAAACCCATGATTATTTGATTAAATGTTGTTTTCTTTGTTATAGACAATAGTGTGTTTTGCCATAACCGG GTACC

[0295]

서열번호 8: hr5_iel.e6FP .p10PAS	ATTAAGCTTCCGCGTAAACACAACATCAAGTATGAGCTACAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACCGAAC TGGCTTTACGAGTGAAGTTCTACTTTGTAACCGACGATCAGTGGATGATGTCAATTTGTTTTGCACGTCAGAGATGATGTC ATGTTTTGCACACGGCTATAACTCGCTTTTACCGGTAGAATTCTACGTGTAAACGACGATCAATGTAGTCACTTT GTTTTGCAATATGATATACATAAATGACTCACTTTGTTTTCAAACCGCAACTTGATTTACGGGTAGAATTCTACTT GTAAAGCACAATCAAAAAGATGATGTCATTTGTTTTCAAACCTGAACCTGCCTTTACAGATAGAATTTCTACGTGTAA ACACAATCAAGAAGATGATGCTATTTGTTATAAAAAAAGAGCTGATGTGATGTTTGACATGGCTCACTAACTAACT CGCTTTACGGGTAGAATTCTACGCGCGTCGATGTCCTTTGTGATGCGCGCACATTTTTGTAGGTTATTGATAAAATGA ACGGATACGTTGCCCGACATCTATAATTAACCTTTGGCGTAGAATTTGTCCGGTTCATTGTCCGTGCGCGTAGCATCT CCGGTAAACGACCTGCTACTTTTGGCTTCAAGGTTTGTGCGACAGACAAATGGCCACTTGCAGCTTCGATGT GTGCGCGTTACCAACAATCCCAACGCGCAGTGTACTTGTGTATGCAAAATAATCTCGATAAAGGCGCGCGCGCA ATGCAGCTGATCAGCTACGCTCTCTGTTCCGTTCAAGGACGGTGTATCGACCTCAGATTAATGTTTATCGGCCG CTGTTTTGATTCGCTCACCAACCGTTTTTGCATTAACATTGTATGTGCGGGGATGTTCTATATCAATTTGAA AAATAAACGATAACCGGTTGGTTTTAGAGGGCATAAATAAGAAATATTTGATCGTGTTCGCCATTAGGGCAGTAT AAATTCAGCTTTCATGTTGGATATTGTTTCAAGTTGACACTGCGCGCGCAAGATCTGGAACACAGGTGAC GCGGCGCCATTTGTAATAAAAAATAAATAAAATGTTGTTCCAAAGGCGAGGAACCTGTCACCGGTGTCTGTGCCATC CTGTGGAACCTGGACGGCAGTCAAGCGGTGCAAGATTTCCCGTGTCTGGCGACGAGGCGACGCTACCTACGGGA AAGCTGACCTGAAGTTGATCTGCACACCGCGAAGCTGCCGTGCTTTGGCTTACCGTGGTCAACCTCTGTACCTAC GGTGTCCAGTGCTTCTCCGTTACCCGACCATGAAAGCAGCAGATTTCTTCAAGTCCGCTATGCCCGAGGGTTAC GTGCAAGAGCTGATCACTTCTTCAAGGACAGCGGCACTACAAGACCCGTGCTGAAGTGAAGTTGCAAGGCGACAC CTCTGGAACCGTATCGAGTCGAAGGTTATGCACTTCAAGGAAGATGGAACACTCTGGGCGCAAGCTCTGAGTACAC TACAACCTCCCAACAGGTGATACATCATGGCCGACAGCAAAAGAACGGCATCAAGTGAACCTTCAAGATCCGCGACCA ATCGAGGACGGTTCCGTGACGCTGGCTGACCATACCAAGACCAACCCCACTGGCGACGGTCTGTGCTGCTGCTG GACAAACACTACCTGTCCACCGTCCGCTGTGTTCAAGGACCCCAAGGAGAGCGTGACCACTGGTGTGCTGTGAG TTCTGTGACCGCTGCTGGTATCACTTGGGCGATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGCCCTTTGTAACGCCACAATTGTGTT TGTGCAAAATAAACCATGATTATTTGATTAATAATGTTGTTTTCTTGTTCATAGACAATAGTGTGTTTTGCTTAA CGGGTACC
서열번호 9 coBDFVIIIXT EN(2,0)출 염호화하는 뉴클레오티드 서열	ATGCAGATTGAAGTGTCACTTGTCTTCTTCTGTGCTCTCGGTTTGTGCTTCTGGCCACCGCCGTTACTTACTTA GGTGCTGTGGAAGTGAAGTGGGACTCATGAGTCCGACTGGGAGAACTGCGGTTGGACGCGAGATTTCCCACTAGA GTCCCGAAGTCTTCTCCATTCAACACCTCCGTGGTCTACAAAAAGACCTGTCTGTGGAGTTCACTGACCACCTTTTC AATATTGCAAGCGCCGCCCCCTGGATGGGCTGTCTGGTCTTACGATCAAGAGAGGCTTACGACACCGTGGTCT ATCACTGAAGAACTGCCCCCTCACCCGCTGTGCTGATGCTGGAGATGCTCACTGGAAGGCTCAGAGGGT GCCGAATATGATGACAGACAGCAGAGGGGAAAGGAGGATGACAAAGTGTTCGCGGTTGCGACGCACACTTACGTG TGGCAAGTGCTGAAGAAAAAGGGCTCATGGCGCTGGACCCCTATGCTGACCTACTCTTACCTGTCCATGTGGAC CTATTGGAAGGATCTCAACTCGGAGTGATGCGCGCTCTTGGTGTGAGAGAAGGACGCTGGCGAAGGAAAAAGCT CAGACCGCTGCAGAAGTTCATTCTGTGTTGTGCTGATGAAGGAAGTCTTGGCATCTCAGAAACCAAGAAGTCTG CTGATGTCAGGATAGAGTGGGCTCGGCGAGAGCTGGCTAAATGCACAGCTCAACAGGATATGTAAGACGGTCTG CTCCTGGCTCATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGATTGGCATGTGATCGGCATGGGTACTACTCGGAAAGTGCAT AGTATCTTTCTGGAGGGGCACTGATCTTGGTGGCAACACAGACAGGCTCTGCTGGAATCTCGCTCTATCACTTCT TTGACTGCGAGACCTCTTATGGACCTTGGACAGTTCTGCTGTTCTGTACATCACTCCCATCAGCATAGATGGG ATGGAGGCCATATGCAAGTGGACTCTGCCCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAAGAACAAATGAGGAAGCGAGGAAT TACGACGACGAGCTGACTGACAGCGAAATGGAGCTGCTGCGATTTCATGACGACAGACAGCCGCTCTTCTATCCAAAT AGATCAAGTGGCGAAGAGACCCCAAGCTGGGTGCATACATTGCGCGCGAGGAAGAGGCTGGGATGACGCGCG CTGTGCTGGCGCCAGACGACAGGAGCTACAAGTCCAGTACCTCAACACAGGGCGCGACGCAATTGGCAGGAAGTAC AAGAAGATCCGCTTATGGCTCACTGATGAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCGACAGAGTCAGGACTCTCTG GGACCGCTCTTTACGGCGAAGTGGGGAATACCTGTCTCATTTTTCAAGAACAGGACCTCGGGCCCTACAACATC TACCCTCAGGGATCAGACAGCTGCGCCGCTCTACTCCGCGGCTGCGCAAGGGAATGAAGCACTGGAAGGATTT CCGATCTGCCGGGAGAACTCTCAAGTACAAGTGGACCTGACTGTGGAGATGGGCTTCCCAAGTGGACCTCTGCG TGTCTGACCCGGTACTATTCTCGTTTGTGAACATGGAGCGGACCTGGCTCGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATC TGCTACAAGGAGTCGTTGGACCGCGGGGAACAGATCATGTCCGACAGCGCAAGCTGATCTGTTCTGTCTGTTT GTGATAAACAGATGTGGTACTTGACTGAGAATATCAAGCGGTTTCTGCCAACAGCGGAGTGAACATGGAGAGC CCGGAGTTCCAGGCTCAAAACATTATGCACTCTATCAACGGGTATGTGTTGCACTCGCTCCAATGAGCGTGTGCTG CATGAAGTGGCATACTGTTACATTGTGTCATCGGAGCCAGACCGACTTCTGTCCGTTGTTCTCTCCGGATACAC TTAAGCATAAAGATGGTGTACGAGGACACTTGACCTTCTTCCATTTTTCGAGGAAGATGTGTTTCATGTATGGAA AACCCGGGCTTGTGGAATCTGGGTTGCCATAACTCGAATCTCCGGAATAGAGGATGACCGCTCTGCTGAAGATGTC AGCTGTGACAGAAGATACCGGCTATTACGACGAGGACGCTATGAGGACATCTCCGCTTATCTGCTGTGCAAGCAAC GCCATTGAACCCAGGTCTTCTCCAAAAACGGTGACCGACCTCGAAAGCGCCACCCAGAGTCAGGACCTGGCTCG GAACCCGCTACTCTGGGCTCAGAGACAGCTGGGAGCTTCCGAGTCCGCAACCCCGAGAGTGAACCCGGATCGAACCA CGAACCTCAGGATCGAAACCCGGGAACCTCGGAATCCGCACTCCGAGTGGGACGAGGACCTCTGAGCTCT TCCGAGGGAAGCGCCCTCGGATCCCTGCTGGATCCCCTACCAGCACTGAAGGAAGGCACTCAGAATCCGCGACCTC GAGTCTGGGCTTGAAGAGCAACCGCCACCTCCGGTTCCGAACCCCTGGGATACGCGAGAGCGCACTCCGAATCG GGCCCGAGGAAGCTTGGCGGATCCCGGACGACAGCGAGGGAAGCCCGCGGGTCAACGACTTCCATCGAGGA

	GGAGCCTCATCCCCCGTGTGCTGAAGCGGCATCAAGAGAGATCACCAGGACCTCTCCAGTCCGATCAGGAAGAA ATTGATACGACGATACATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGATGAGGATGAGAACAGTCC CCTCGGAGCTTTACAGAAGAAAACCGCCACTACTTTCATCGCTGCCGTGGAGCGGCTGTGGGATACGGGATGTCCAGC TCACCGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCAGTTCAAGAAGGTCTGTTCAGAGATTACCC GACGGGTCTTCTACTCAACCCCTGTACCAGGCGCAACTCAACGAACACCTGGGACTGCTTGGGCGTATATCAGGGCA GAAGTGAAGATAACATCATGTTCACTTCCGCAACCAAGGCTCCCGGCGGTACAGCTTCTACTTCTACTGATCTCC TACGAGGAAGATCAGCGGCGAGGAGCCGAGCCCGGAAGAACTTCGTCAAGCCTAACGAACTAAGACCTACTTTTGG AAGGTCCAGCATCAGATGCCCCGACCAAGACGAGTTCGACTGTAAGCCTGGGCGTACTTCTCCGATGTGGACCTG GAGAAGGACGTGCACTCGGACTCATTGGCCCGCTCCTTGTGTGCCATACTAATACCTGAACCTGTCTACGGTCGC CAAGTCACAGTGCAGGAGTTCCGCCCTCTTCCACCATCTTCGATGAAACAAAGTCTGGTACTTTACTGAGAACATG GAACGCAATTGACGGGCACCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCACCTTCAAGGAAACTACCGGTTTCATGCCATT AACGGCTACATAATGGACACGTTGCCAGGACTGGTTCATGGCCAGGACAGAGAAATCCGGTGGTATCTGCTCTCATG GGCTCAACGAAACATTACAGCATTCAATTTTCCGGCCATGTGTTACCGTCCGGAAGGAAGAGTACAAGATG GCTCTGTACAACCTTACCCTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAATGCTGCTAGCAAGGCCGGCATTGGAGAGTGGAA TGCTGTATCGGAGAGCATTGACGCCGGAATGTCACCCCTGTTTCTGTGTACTTCAACAAAGTCCAGACCCCGCTG GGAATGGCTCAGTGCATATTAGGATTTCAGATCAGTCTTCCGGGCACTACGGGCACTGGGCACTAAGTTGGCC CGGCTGCACTACTCTGGCTCATCAATGCTTGGTCCACCAAGGAACCTTCTCTGGATTAGGTTGAGCCTCTGGCC CCAATGATTATTACGGATTAAAGACCAAGGTTGCCGACAGAGTTCTCTCACTACATCTCGCAATTATCATATA ATGTACAGCCTGGATGGGAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGAACTCCACTGGAACGCTCATGGTGTTTTTCGGCAAC GTGGACTCTCCGGCATTAAAGCACAACATCTCAACCTCCGATCATTGCTCGGTACATCCGGTGCACCCAACTCAC TACAGCATCCGGTCCACCTGCGGATGGAAGTGTGGTTGTGACCTGAACCTCTGCTCCATGCCCTTGGGATGGAA TCCAAGGCCATTAGCATGACAGATCAGCGCTTCTACATCTTCAACAACTGTCGCGACTGGTCCCGCTCGAAG GCCCGCTGCACTCCCAAGGTCTTCAATGCTGGCGGCTCAAGTGAACAACTCCAGGAGTGGTCCAGGTGCAAG TTCCAAAGACCATGAAGGTACCGGAGTGACCAACCGGCGTGAAGTCCCTGCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAG TTCTCTCATCTCTCAAGCCAGACGGACATCAGTGGACCTGTTTCTTCCAAACGGAAGTCAAGATTTCCAGGGC AACAGGACTCTTCAACCTCTGTTGTCAGCCTGGACCCCTTCTGCTGACCCGCTACCTCCGCATCCACCCCA AGTGGGTCCACAGATCGCATGCGATGGAGGTCCTTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACTAA
서열번호 10 coBDDFVIIIXT EN(V2,0)의 아미노산 서열	ATRRYYLGAVELSNDYMQSDLGELPVDARFPPRPVKSFPFNTSVVYKTLFVEFTDHLFNIAPRPPWMLGLGPTIQA EVYDVTVITLKNMASHPVS LHAVGVSYNKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPFGGSHTYVHVQLKENGPMASDPLCLTY SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSNHSETKNSLMQORDAASARAWPKMHTV NGVYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLAQTLMLDLGQFLFCHI SSHQHDGMEAYVYKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNDNSPSFIQIRSVAKKHPKTHVHYIAEE EDWDYAPLVLPDDRYSYKSYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHEGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQ ASRPYNIYPHIGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMRDLASG LIGPLLIYCKESVQGRNQIMSDKRNILFVSVDENRSMYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIHMSINGYVDFS LQLSVLCHVAYWYILSIGAQTDLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGM TALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNGAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGASSPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVENMKKEDFDIY DEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSPHVLRNRAQSGSVQPKKVVVFQFTDGSFTQPLRYGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIWVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVNETKTYFWKVQHMAPTKDEFCKAWA YFSDVDLEKDVHSLIGPLLVCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKE NRYRFAINGYINDTLPLGLVMAQDQIRIRNYLLSMGSENIHSHFSGHVFTVRKKEEYKMAVLYNLYPGVFETVENLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTFLVYSNKCQTPLGMAHGHIRDFQITASQYQGWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIHIGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARY IRLHPHYSIRSLRMLMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNP KEHLQVDFQTKMKTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVQGNQDSFTPVVNSLDPLLTR YLRHHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
서열번호 11 coBDDFVIIIXT EN(V2,0)의 신호 펩티드	MQIELSTCFFLCLLRFCFS
서열번호 12 BDD 성숙 인간 FVIII 의 아미노산 서열	ATRRYYLGAVELSNDYMQSDLGELPVDARFPPRPVKSFPFNTSVVYKTLFVEFTDHLFNIAPRPPWMLGLGPTIQA EVYDVTVITLKNMASHPVS LHAVGVSYNKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPFGGSHTYVHVQLKENGPMASDPLCLTY SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSNHSETKNSLMQORDAASARAWPKMHTV NGVYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLAQTLMLDLGQFLFCHI SSHQHDGMEAYVYKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNDNSPSFIQIRSVAKKHPKTHVHYIAEE EDWDYAPLVLPDDRYSYKSYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHEGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQ ASRPYNIYPHIGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMRDLASG

[0297]

	LIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRLFPNPAGVQLEDPEFQASNMHSINGYVDFS LQLSVLCHEVAYWYLSIGAQDFLSVFFSGYTFKHKMVEYDITLTLFFPSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGM TALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVVKRHRQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEHKK EDFDIYDEDEHQSPRSFQKTRHYFAAVERLNDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGEL NEHLGLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIEYEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFWKQVHHMPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME DPTFKENIRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSENIHSHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINANST KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGLMVFFGNVDSSGIKHNFNP PIIARYIRLHPHYSIRSLRMLMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNWR PQVNNPKENLQVDFQKTMKVTGVTGQVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD PPLLTRYLRHQPQSVWHQIALRMEVLGCEAQDLY
서열번호 13 BID 성숙 인간 FVIII 출 암호화하는 뉴클레오타이드 서열	ATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTCTGTGCTCTTTGCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTG GGTGACGTGGAACTGTCTATGGGACTATATGCAAGTGATCTCGGTGAGCTGCTGTGGACGCAAGATTCTCTCTAGA GTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGGATCACCCTTTTC AACATCGCTAAGCCCAAGGCCACCTCGATGGGTCTGCTAGGTCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTC ATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCTGTGCTGCTTCTGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAGCTTCTGAGGGA GCTGAATATGATGATCAGACAGTCAAGGGGAGAAAGAGATGATAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTC TGGCAGGTCTGAAAGAGAAATGGTCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCTTACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGAC CTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAGGGAGTCTGGCCAAAGGAAAAGACA CAGACCTTGACAAAATTTATACTACTTTTGTGCTATTGATGAAGGGAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCC TTGATGACAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCTGCGCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAACAGGCT CTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCTGAAGTGAC CTAATATTCTCGAAGGTACACATTTCTTGTGAGGAACCATGCCAGGCGCTCTTGGAAATCTGCCCAATCACTTTCT CTTACTGCTCAACACTCTTGTGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTATATCTCTTCCCAACATGATGGC ATGGAAGCTTATGTCAAGTAGACAGTGTCTCAGAGGAACCCCACTACGAATGAAAAATATGAAAGAGCGGAAGAC TATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGTATGATGACAATCTCCTTCTCTTATCCAAAT CGCTCAGTTGCCAAGAGCATCTAAAACCTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCC TTAGTCTTCCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTAC AAAAAAGTCCGATTATGGCATACAGATGAAACCTTAAAGACTCGTGAAGCTATTACGATGAATCAGGAATCTTG GGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATTTAAGAAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATC TACCCTCAGGAATCACTGATGCTCGTCTTGTATTCAAGGAGATTACAAAAGGTGTAACAACTTTGAAGGATTTT CCAAATCTGCCAGGAGAAATATTCAAAATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGGCCCACTAAATCAGATCTCGG TGCTGACCCGCTTACTCTAGTTTCTGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCTCATC TGCTACAAGAAATCTGTAGATCAAGAGGAAACCAAGATAATGTGACACAGAGGAATGTCACTGTTTTCTGTATT GATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCAGAGAAATATACAACGCTTTCTCCCAATCCAGCTGGAGTGACAGTTGAGGAT CCAGAGTTCCAGGCTTCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTGTAGTGTGACAGTTGTCAGTTGTTTG CATGAGGTGGCATACTGTTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCTTTCTGCTTCTCTCTGGATATACC TTCAACACAAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCTATTCCATTCTCAGGAGAAATGTCTCTGTCATGTCAGTGA AAGGAGGCTCTATGGATTCTGGGTGCCCAACTCAGACTTTCGGAACAGAGGATGACCGCTTACTGAAGGTTTCT AGTTGTGACAAAGAACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGATATTTACGATACCTTGTGAGTAAAAACAAT GCCATTGAACCAAGAGCTTCTCTCAAAACCCACAGCTCTTGAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTACTCTT CAGTCAGATCAAGAGGAAATGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAGGAGATTGTTGACATTTATGAT GAGGATGAAATCAGAGCCCCCGAGCTTTCAAAAGAAAACAGCACTATTTTATTGCTGAGTGGAGAGGCTCTGG GATTATGGGATGATGCTCCCACTGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTT GTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCTCTG GGGCCATATAAGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCTTCT TATTCTAGCCTTATTTCTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACTAGAAAAAATTTGTCAAGCCTAATGAA ACCAAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGAAGTCAAGAGCTGGGCTTAT TTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAACACATG AACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTGTTTTACCATCTTTGATGAGACCAAGGCTGG TACTTCACTGAAATATGGAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCACTTTTAAAGAGAAAT TATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAGGATTCGA TGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAACATCCATTCTATTCAATTCAGTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAA AAAGAGGAGTATAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCT GGAATTTGGCGGGTGAATGCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTCTGGTGTACAGCAAT AAGTGTGAGACTCCCCGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGCTTCAGGACAAATGGACAG TGGGCCCCAAAGCTGGCCAGACTTCTATTCTCCGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAGGAGCCCTTTCTTGGATC AAGGTGGATCTGTTGGCACAATGATTATCACGGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAAGGTTCTCCAGCTCTAC ATCTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAGTGGCAGACTTATCAGGAAATTCAGTGGAACTTA ATGGTCTTCTTGGCAATGTGGATTCTCTGGGATAAACAATATTTTAAACCCTCAATTTATGCTCGATACATC CGTTTGACCCCACTCATTATGATTCGACAGCACTCTTCGATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGACG

[0298]

	ATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCTACTTTACCAATATGTTTGCC ACCTGGTCTCTCTCAAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCAAAA GAGTGGCTGCAAGTGGACTTCAGAGAACAAATGAAAGTCAAGGAGTAACACTCAGGGAGTAAATCTCTGCTTACC AGCATATGTGAAGGAGTTCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTTTTTTTCAGAAATGGCAAA GTAAGGTTTTTCAGGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTAC CTTGAATTCACCCAGAGTTGGTGACACAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGTCGCGAGGCACAGGACCTC TAC
서열번호 14 V2,0 발현 카세트 mTTR482- 인트론- coBDDFVIIIXT EN (V2,0)- WPRE- bGHPolyA	GGCCCCAGGTAAATTTTTAAAGCAGTCAAAGTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTACTCTCTCTATTGACTTTGG TTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCTCTC CCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTTAAAGCAGTCAAAGTCAAAGTGGCCCTTGGCAGCATTACTCTCTC TATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCC TCTGGGCTCTCCCCACCGATATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCTGTTCAACATGTCTTAATCTCTGCTGGGGC AAAGGTCGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCCTCCAGTGTACGTAGGATCTGTCTGTCTGCACATTTCGTA GAGCGAGTGTTCGATACTCTAATCTCCGGGGCAAAGTCTGATTGACTTAGGTACTTATTCTCTTTTGTGACT AAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGTATAA AAGCCCTTACCAAGGAGAAGCCGTACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGGAATTCTCAGGAGCACAAACATTCCTG GAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCTCTCCCCACCGATATCTACCTGCTGATCGCCCG CCCCGTTCACAAATGTCTTAATCTCTGCTGGGGCAAAGTGGCAGTAGTTTTCCATCTTACTCAACATCTCCCA GTGACGTAGGATCCTGTCTGTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTCCGATACTCTAATCTCCCGGGCAAAGGTCG TATTGACTTAGGTACTTATTCTCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCA GGGATCAGCAGCTGGGTTGGAAGGAGGGGTATAAAGCCCTTCAACAGGAGAAGCGTCAACAGATCCACAAGC TCTCTAGAGTCTGCTGCGCTGCTTCCGCCGTGCTTCCGCCGTGCTTCCGCCGTGCTGCGCCGCCCGGCCCTG ACTGACCCGCTTCTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCTCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTATTG ACGGCTTGTCTTTCTGTGCTGCTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAAGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTC GGGGGGTGCCTGCTGTGTGTGTGCTGCGGGAGCGCCGCTGCGGCTCCGCGTGCCTGGCGGCTGTGAGCGTGC GCGGGCGCGGGGCTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGG GGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCTGCGGGGTGTGCTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGCGCGCTGCTGCG GCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCCGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGC TGCGCGGGGGCTGCCGTGCCGGCGGGGGGTGGCGGAGGTGGGGGTGCCGGCGGGGGCGGGGCGGCTCGGGCCG GGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCGGAGCGCGGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGACGCTTGTCT TTATGGTAATCTGTCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCAATCTGTGCGGAGCGAAATCTGGGAGGCGCG CCGACCCCCCTAGCGGGCGGGGGCAAGCGGTGCGGGCGCGGAGGAAAGAAATGGGCGGGAGGGCTTCTGTG GTGCGCGCGCGCGGCTTCTCTCTCTCCAGCTCGGGGTGCTCCGCGGGGGAGCGGTGCTTCCGGGGGGAGCG GGGCGAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGCGGTGTGACCGGGCGGCTAGAGGCTCTGTAACTTGTCTTGTCTTCTCT TTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAGAAATTAATCTCAGGGC GACATGAGTGTGACTTGTCTTCTCTGCTCTCTGCGGTTTGTCTTCTGCGCACCCGCGGTATTACTTAGG TGCTGTGGAATCGAGCTGGGACTACATGACGTCGACCTGGGAGAACTGCCGGTGGAGCGGAGATTCCACCTAGAG CCCCAAGTCTTCCCATTCACACCTCCGTGGTCTACAAAAGACCTGTTCTGAGGATTCACTGACCACTTTTCAA TATTGCCAAGCCGCGCCCCCTGGATGGGCTGCTTGGTCTTACGATCAAGCAGAGGTCTACGACACCGTGGTCAT CACACTGAAGAACATGGCTCACACCCCGTGTGCTGATGCTGTGGAGTGTCTACTGGAAGGCTCAGAGGGTGC CGAATATGATGACCAAGACAGCCAGAGGGAAAAGGAGGATGACAAAGTGTTCGGGGTGGCAGCCACACTTACGTGT GCAAGTGTCTGAAGGAAACGGGCTATGGCGTGGACCCCTATGCTGACCTACTCTACCTGTCTCCATGTGGACCT TGTGAAGGATCTCAACTCGGGACTGATCGCGCCCTCTTGGTGTGAGAGAAGGCAGCCTGGCGAAGGAAAAGACTCA GACCTGCAACAAGTTCATTCTGTTGTTGTGTGTTGATGAAAGAAAGTCTGGCACTCAGAAACCAAGAACTCGCT GATGACGAGTATGAGATGCGGCTCGGCCAGAGCTGGCTAAAATGCACACCTCAACGGATATGTGAACAGGTGCT CCCTGGCTCATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGATTGGCATGTGATCGGCATGGGTACTACTCGGAAAGTGCATAG TATCTTTCTGGAGGGCCATACCTTCTGGTGCAGAACACAGACAGGCTCGCTGGAATCTCGCTATCACTTTCTT GACTGCGAGACCTCTTATGGACCTTGGACAGTTCTGCTGTTCTGTGCATCAGCTCCCATCAGCATGATGGGAT GGAGGCTATGTCAAAGTGGACTCTGCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAAGAACAATGAGGAAGCGGAGGATTA CGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGAGTCTGTGCGATTGATGACGACCAACAGCCGCTCTTATCTCAAAATAG ATCAGTGGCGAAGAAGCACCCAGACCTGGGTGCACTACATTGCCGCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCGCGCT GGTGTGCGCGCAGACGACGAGGAGCTACAAGTCCAGTACCTCAACAACGGGCGCAGCGCATTTGGCAGGAAGTACAA GAAAGTCCGCTTATGGCTACACTGATGAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCCAGCAGAGTCAAGGATCCTGGG ACCGCTCTTTACGGCGAAGTGGGGATACCTGCTCATTTTTCAAGAACCAGGCATCGCGGCCCTACAACATCTA CCCTCACGGGATCACAGAGTGTGCGCCGCTTACTCCCGCGGCTGCCAAGGGAGTGAAGCACCTGAAGGATTTTCC CATCTGCGGGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGACCTGACTGTGGAAGATGGCCCTACCAAGTGGGACCTCGCTG TCTGACCCGGTACTATTCTCTGTTTGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCTCGGGGCTGATTGGTCCGCTGCTGATCTG CTACAAGGAGTCCGTGGACAGCGCGGGAACAGATCATGTCCGACAAGCGCAAGTGTCTCTGCTGCTTTGA TGAAAAAGATCTGGTACTTGTGAGAAATATCAGCGGTTCTGCCAACCCAGCGGGAGTGAACCTGGAGGACCC GGAGTTCCAGGCTCAACATTAATGCACTATCAACGGCTATGTGTTGACTCGCTCAACTGAGCGTGTGCTGCA TGAAGTGGCACTGTGTACATTCTGCTCATCGGAGCCAGACGACTTCTGTCCGTGTTCTCTCGGATACACCTT CAAGCATAAGATGTGTACGAGGACACTCTGACCTCTTCCCATTTTCCGAGAAACTGTGTTTATGTCAATGAAAA

	CCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATAACTCGGACTTCCGGAATAGAGGGATGACCGCCCTGCTGAAAGTGTCCAG CTGTGACAAAGAAATACCGGCGATTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCTTATCTGCTGTCCAAAGAAACACGC CATTGAACCCAGGTCCTTCTCCAAAACGGTGACCCGACCTCCGAAAGCGCCACCCAGAGTCAAGGACCTGGCTCGGA ACCGGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGACTTCCGAGTCCGCAACCCCGAGAGTGGACCCGGATCCGAACACAG AACCTCAGGATCAGAAACCCCGGAACCTCGGAATCCGCCACTCCGAGTGGGACACGACCTCCACTGAGCCTTC CGAGGGAAGCGCCCGGATCCCTTGTGTGATCCCTACAGCAGCTGAAGAAGGCACCTCAGAAATCCGCGACCCCTGA GTCCGGCCCTGGAAGCGAACCCGCCACTCCGGTTCGAAACCCCTGGGACTAGCGAGAGCGCCACTCCGGAATCGGG CCAGGAAGCCTTCCGGATCCCGACGACACCGAGGAGGGAAGCCCGCCGGGTACCAGACTTCCACTGAGGAGGG AGCCTCATCCCCCGTGTGAAAGCGGATCAAGAGAGATCACCAGGACCACTCTCAGTCCGATCAGGAAGAAAT TGACTACGACGATATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGATGAGGATGAGAACCAGTCCCC TCGGAGCTTTCAGAAAGAAACCCGCCACTTCTCATGCTGCCGTGGAGCGGCTGTGGGATTACGGGATGTCCAGCTC ACCGCATGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAGGATCGGTGCCCACTTCAAGAAGGTCTGTGTTCCAAGAGTTCACCGA CGGGTCTTCTACTCAACCCCTGTACCGGGCGAACTCAACGAACCTGGGACTGCTTGGGCCGTATATCAGGGCAGA AGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCGCAACAGGCTCCCGGCCGTACAGCTTCTACTTCTACTGATCTCCTA CGAGGAAGATCAGCGGCAGGGAGCGAGCCCGGAAGAATTCGTCAAGCCTAACGAACTAAGACCTACTTTTGGA GGTCCAGCATCATATGGCCCGACCAAGACGAGTTCGACTGTAAGGCTGGGCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGA GAAGGACGTGCACTCGGGACTCATTGGCCCGCTCTTGTGTGCCATACTAATACCTGAAACCTGCTCAGGTCGCA AGTCAAGTGCAAGGAGTTCGCCCTCTTCTTCAACATCTTCGATGAACAAAGTCTGGTACTTTACTGAGAATGGA ACGCAATGCAAGGACCTTGCACATCCAGATGGAAGATCCACCTTCAAGGAAACTACCGGTTTCATGCCATTAA CGGTACATAATGACACGTTGCCAGGACTGGTATGCGCCAGGACAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTCTCATGGG CTCCAACGAAACATTCACAGCATTCTTTTCCGGCCATGTGTTACCGTCCGGAAGGAAGAGTACAAGATGGC TCTGTACAACTCTACCTTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAATGCTGCCTAGCAAGGCGGGCATTGAGAGAGTGAATG CCTGATCGGAGAGCATTGTCACGCCGAATGTCCACCTGTTTCTGTGTACTCCAACAAGTGCAGACCCCGCTGGG AATGGCCTCAGGTATATTAGGGATTTCAGATCACTGCTTCCGGGCGTACGGGCGTGGGACCTAAGTTGGCCCG GCTGCACTACTCTGGCTCCATCAATGCTGGTCCACCAAGGAACCTTCTCTGGATTAGGTGGACCTCTCGGCC AATGATTATTCAGGTATTAAAGCCAGGGTCCCGACAGAAGTCTCTCACTACATCTCGCAATTCATCATAAT GTACAGCCTGGATGGGAAGAGTGGCAGACCTACCGGGAACTCCACTGGAACGCTCATGGTGTGTTTCCGCAACGT GGACTCTCCGGCATTAAAGCACAACATCTCAACCTCCGATCATGCTCGGTACATCCGGTGCACCCAACTCACTA CAGCATCCGGTCCACCTCGGATGGAATGATGGGTTGTGACCTGAACCTCTGCTCCATGCCCCCTGGGATGGAATC CAAGGCCATTAGCATGACAGATCACCCTCTTCACTTCAACACATGTTCCGCACTGGTCCCGCTCGAAGGC CCGCTGCACTTCCAAGTCCCTCAATGCGTGGCGGCTCAAGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTCAGGTGCACTT CCAAAAGACCATGAAGGTCAACGAGTGACCAACCGGCGTGAAGTCCCTGCTGACCTCTATGTACGTTAAGGAGTT CCTCATCTCTCAAGCAAGACGAGATCAGTGGACCTGTTCTTCAAAACGGAAGTCAAGTATTCCAGGGCAA CCAGGACTCCTTCAACCCCTGTGGTCAACAGCCTGGACCCCACTTGTGACCCGCTACCTCCGATCCACCCCAAAG CTGGGTCCACGATGCACTGCGCATGGAGGTCTTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACTAAGCGGCGCTCATAA TCACCTCTGGATTACAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATGTTGCTCTTTACGCTATGTGGATA CGCTGCTTTAATGCTTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGATAGGCTTTCATTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTT GCTGTCTCTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCC CACTGGTTGGGGCATTGGCACCACTGTGAGCTCTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTCTCTCTATTGCCACGGCGGA ACTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGG GAAATCATCGTCTTCTTGGTGTGCTGCTGTGTTGCCACCTGGATTGCGCGGGGAGCTCTTGTGCTACGTCCTC TTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCCGCTTCG CCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCGGCTCCCGCTGCTAGGCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCATCT GTTGTTTCCCTTCCCGCTGCTTCTTACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTTAATAAATGAGGAA ATTGCATCGATTGCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGCAAGGAGGAGGATTGG GAAGACAATAGCAGGATGCTGGGGAAGACCATGGGCGCGGACGCTGTGACGCCGGGCGGTACCGCATGCTC GCGACGCATAAG
서열번호 15 AIMB2 인핸서	GGCCCCAGGTTAATTTTAAAGCAGTCAAGGTCAAGGTGGCCCTTGGCAGCATTACTCTCTATTGACTTTGG TTAATAATCTCAGGAGCACAAATCTCTGGAGGAGGAGAGAAATCAACATCTGGACTTATCTCTGGGCTCTC CCCACCTTCGATGGCCCCAGGTTAATTTTAAAGCAGTCAAGGTCAAGGTGGCCCTTGGCAGCATTACTCTCTC TATTGACTTTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAATCTCTGGAGGAGGAGAGAAATCAACATCTGGACTTATCC TCTGGGCTCTCCCCAC
서열번호 16 MTR 프로모터	GATATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCTGTTCAACATGTCTAATCTCTGTCGGGGCAAGGTGCGCAGTAGTTT TCCATCTTACTCAACATCTCCAGTGTACGTAGGATCCTGTCTGTCTGCACATTTCTGATAGCGAGTGTCCGATAC TCTAATCTCCCGGGCAAGGTGCTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATC AGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGTATAAAGCCCTTACCAGGAG AAGCGTCACACAGATCCACAAGCTCTGCTAG
서열번호 17	TCAGGAGCAACAACATCTCTGGAGGAGGAGAGAAATCAACATCTGGACTTATCTCTGGGCTCTCCCCACCGAT ATCTACCTGCTGATCGCCCGGCCCTGTTCAACATGTCTAATCTCTGTCGGGGCAAGGTGCGCAGTAGTTTTCC

[0300]

키메라 인트론	ATCTTACTCAACATCTCCAGTGTACGTAGGATCTGTCTGTCTGCACATTCGTAGAGCAGTGTTCGATACTCT AATCTCCCGGGGCAAGGTCGATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAG AGGTTTGGAGTACGTTGGCAGGGATCAGCAGCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCTTCACAGGAGAAG CCGTACACACAGATCCACAAGCTCTGTAGAGTCTGCGCGCTGCCTTCGCCCGTCCCGCCGCGCCTC GCGCCCGCCCGCCGCTCTGACTGACCGCTTACTCCACAGGTAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCCGGGCTG TAATTAGCGCTTGGTTATTGACGGCTTGTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAAGGGCC TTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCTGTGTGTGCTGCGGGAGCGCGCTGCGGCTCCGCGCTGCC CGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCGCGGGCTTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGCGCGGGG CGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTCCGGGGTGTGTGCTGGGGGGTGAACAGG GGGTGTGGCGCGCTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCGGG TGCGGGCTCCGTCACGGGCGTGGCGCGGGGCTGCGCGTCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAAGTGGGGGTGCGGGCGG GGCGGGGCCCTTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGGAGCGCGCGGGCTGTGAGGGCGC GGCAGCGCCGACCATTTGCTTTATGGAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCAATCTGTGCGGA GCCAAATCTGGGAGGCGCGCGCCACCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCGGCGAGGAAGAAAT GGCGGGGAGGGCTTCGTGCTGCGCGCGCGCGCTCCCTTCTCCTCTCAGCCTCGGGGCTGTCCCGGGGGGA CGGCTGCTTCCGGGGGAGCGGGGAGGGCGGGGTTCCGCTTCTGCGGTGTGACCGGCGCTAGAGCCTCTGCTAA CCTTGTCTTGCCTTCTCTTTCTCCTACAGCTCTGGGCAACGCTGCTGTTATTGTGCTGCTCATATTTGGCAA AGAAATTA
서열번호 18 WPRE	TCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTACGCTATG TGATACGCTGCTTAAATGCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCTGTATAAATC CTGGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGCTGTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGC AACCCCACTGGTTGGGCAATTGCCACACCTGTGAGTCTCTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTCTCCCTATGTCAC GGCGGAATCATCGCGCTGCTTGCCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGT GTGCGGGAAATCATCTGCTTCTGCTGCTGCGCTGCTGTTGCCACCTGAGATTCTGCGCGGGACGCTCTTCTGCTA CGTCCCTTGGCGCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCCGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCG CCTTCCCTCAGACGAGTCTGATCTCCTTTTGGGCGGCTCCCGGCTG
서열번호 19 bGFPa	CGACTGTGCTTCTAGTGGCAGCATCTGTTGTTGGCCCTCCCGCTGCTTCTGACCTGGAAGGTGCCACTC CCACTGCTCTTCTAATAAAATGAGGAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG TGGGCGAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGCATGCTGGGGA
서열번호 20 야생형 인간 성숙 FVIII 단백질의 아미노산 서열	ATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPPRVKSPFFNTSVVYKTLFVEFTDHLFNIAPRPPWMLGLGPTIQA EVYDVTVVITLNMASHPVSLHAGVSYNKAASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHYVHVQLKENGPMASDPLCLTY SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQLHKFILLFAVDEGKSNHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTV NGYVNRSLPGLIGCHRKSYYVHVIGMTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTITFLAQTLMLDLQGLFLFCHI SSHQHDMEAYVVKVDSCEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSMDVVRFDNDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWHYIAAEE EDWDYAPLVLPADDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHEGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQ ASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFFVMMERDLASG LIGPLLIYKESVDQRGNQIMSDKRNILFVSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIHMSINGYVFD LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFSGYTFKHKMVEYEDTLTFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGM TALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPIWFAHRTMP KIQNVSSDDLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSQDMVFTPEGLQLR LNEKLTGAATELKKLDFKVSSTNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDQLDITLFGKSSPLTESGGPL SLSEENNDKLLSEGLMNSQESSWGNVSSSTESGRLFKGKRAHGALLTKDNALFKVVISLKTNKTNNNSATNRKTH IDGPSLLIENSFVQNIILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNP DMSFFKMLFLPESARWIQRTGKNSLNSGGPSPKQLVSLGPEKSVGGQNFLEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFP SRNLFLTNLDNLHENHNTNQEKIKQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGKNFMKNLFLSTRQNVESYDGAAPVL QDFRSLNDSTNRKKTAAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKALKQFRLPLEETE LEKRIIVDDTSTQNSKNMKHLTPSLTQIDYNEKEGAITQSPSLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPPIRPIYL TRVLFDQNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILLLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKVENTVLPK PDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNLSPGHLDLVEGSLQGTGAIKWEANRPGKVPFLRVATESAKTPSK LLDPLAWDMHYGTQIPKEEWSQESPEKTAFAKKKDTILSLNACESNHAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQ NPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPH VLRNRAQSGSVQPKKVVVFQEFDTGGSFTQPLRYGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSISYEE DQRQGAEPKRFVKNETKTYFNKVQHMAPTKDEFCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHRQVT VQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSM ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSSLYISQFIIMYS LDGKKWQTYRGNSTGLMVFFGNVDSGSIKHNIIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSNPLGNESKA

[0301]

	ISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSHYVKEFLI SSSQDGHQNTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSNVHQIALRMEVLGCEAQDLY
서열번호 21 B19 WT 5'	CCAAATCAGATGCCCGCGTCCGCCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAAGATGGCGGACAATTACGTCATTTCTGT GACGTCATTTCTGTGACGTCATTTCCGGTGGGCGGGACTTCCGGAATTAGGGTTGGCTCTGGGCCAGCTTGTGGG GTTGCCCTTGACACTAAGACAAGCGGCGCGCGCTTGATCTTAGTGGCAGCTCAACCCCAAGCGCTGGCCAGAGCCAA CCCTAATTCCGGAAGTCCCGCCACCGGAAGTACGTCACAGGAAATGACGTACAGGAAATGACGTAATTGTCCGCC ATCTGTACCGGAAGTCCCGCTACCGGCGGCGACCGCGGCATCTGATTGGTGTCTTTTAAATTTT
서열번호 22 B19 WT 3'	AAAATTTAAAGAAGACACCAATCAGATGCCGCCGGTCCGCCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAAGATGGCGGAC AATTACGTCATTTCTGTGACGTCATTTCTGTGACGTCATTTCCGGTGGGCGGGACTTCCGGAATTAGGGTTGGCTC TGGGCCAGCGCTTGGGGTTGACGTGCCACTAAGATCAAGCGGCGCGCGCTTGTCTTAGTGTCAAGGCAACCCCAAGC AAGCTGGCCAGAGCCAACTAATTCGGAAGTCCCGCCACCGGAAGTACGTCACAGGAAATGACGTACAGGAA ATGACGTAATTGTCCGCATCTTGACCGGAAGTCCCGCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTGG
서열번호 23 5'_B19_최소	CCAAATCAGATGCCCGCGTCCGCCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAGCGCGCGCTGTACCGGAAGTCCCGCTA CCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTGGTGTCTTTTAAATTTT
서열번호 24 3'_B19_최소	AAAATTTAAAGAAGACACCAATCAGATGCCGCCGGTCCGCCCGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAGCGGCGCGCTG TACCGGAAGTCCCGCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTGG
서열번호 25 5'_6PY_최소	CTCATTGGAGGGTTCGTTCTGTTGCAACGTTCTGTCGATGCGAACGAACGTTTCAACGAACGAACCTCCAATGAGAC TCAAGGACAAGAGGATATTTTGCAGCGCAGGAAGTG
서열번호 26 3'_6PY_최소	CACCTTCTGGCGCGCAAAATATCCTCTTGCTTGTGAGTCTCATTGGAGGGTTCGTTCTGTTCAACGTTCTGTCGATG CGAACGAACGTTTCAACGAACGAACCTCCAATGAG
서열번호 27 5'_6PY_Δ 186	CTCATTGGAGGGTTCGTTCTGTTGCAACGCAATCAGGGGAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCGGTCAATGCTTCCG GTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCCGATGCTGTCTATCGCTACCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATCG TGACAGACTGGAGAGCGTGCTTATAATATCGGCTCTCAGGAGTGGAGCACCAGTGGCCAGATACGTGGCCACCC AGGGCTATCTGATCTCCAACCTCGACGATGCGAACTACGTACCGGATGTGCTGACCGGAAGCATGTGACCGGAAC TTGCTGCTTCCCCCTCCCTGATTGGTGGTTCGAACGAACGAACCTCCAATGAGACTCAAGGACAAGAGGATAT TTTGCAGCGCAGGAAGTG
서열번호 28 3'_6PY_Δ 186	CACCTTCTGGCGCGCAAAATATCCTCTTGCTTGTGAGTCTCATTGGAGGGTTCGTTCTGTTCAACGCAATCAGGG GAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCGGTGACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTTCGATGCTGTCTAT CGCTACCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATGTCGACAGACTGGAGAGCGTGCTTATAATATCGGCTCTCA GGAGTGGAGCACACAGTGGCCAGATACGTGGCCACCCAGGGCTATCTGATCTCCAACCTTCGACGATGCGAACTACG TCACCGGATGTGCTGACCGGAAGCATGTGACCGGAACCTTGGCTCACTTCCCCCTCCCTGATTGGTGGTTCGAACG AACGAACCTCCAATGAG
서열번호 29 5'_6PY_Δ 120	CTCATTGGAGGGTTCGTTCTGTTGCAACGCAATCAGGGGAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCGGTCAATGCTTCCG GTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCCGGTGACGTGCTTCTGTACGTGTTTCCGGTGCATGCTGTCTATCGCT ACCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATGTCGACAGACTGGAGAGCGTGCTTATAATATCGGCTCTCAGGAGT GGAGCACCACAGTGGCCAGATACGTGGCCACCCAGGGCTATCTGATCTCCAACCTTCGACGATGCTACGTGACCGGA AACAGTGACAGGAAGCAGTGACCGGAACCTACGTACCGGATGTGCTGACCGGAAGCATGTGACCGGAACCTTGGCT CACTTCCCCCTCCCTGATTGGTGGTTCGAACGAACGAACCTCCAATGAGACTCAAGGACAAGAGGATATTTGCG CGCAGGAAGTG
서열번호 30 3'_6PY_Δ 120	CACCTTCTGGCGCGCAAAATATCCTCTTGCTTGTGAGTCTCATTGGAGGGTTCGTTCTGTTCAACGCAATCAGGG GAGGGGGAAGTGACGCAAGTTCGGTGACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCCGGTCACTGCTTC CTGTCACTGTTTCCGGTGACGTGAGCATGCTGTCTATCGCTACCCATCCCTGTCTGAGATCAAGGGCGTGATGCT GCACAGACTGGAGAGCGTGCTTATAATATCGGCTCTCAGGAGTGGAGCACCAGTGGCCAGATACGTGGCCACCC

[0302]

	GGGCTATCTGATCTCCAACCTTCGACGGCATGCGACCGGAAACACGTGACAGGAAGCACGTGACCGGAACACGTGACCGGATGCGTCAACGGAAAGCATGTGACCGGAACCTTGCGTCACTTCCCCCTCCCCGATTGGCTGGTTCCGACGAACGACGACCCCTCAATGAG
서열번호 31 아생형 인간 FVIII의 핵산 서열	ATGCAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTCTGTGCTTTTTCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTG GGTGACAGTGGAACGTGTCATGGGACTATATGCAAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCTGTGGACGCAAGATTTCCTCTAGA GTGCCAAAATCTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACCGGATCACCTTTTC AACATCGCTAAGCCCAAGGCCACCCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTC ATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCTGTCACTCTTCACTGCTGTTGGTGTATCTACTGGAAGCTTCTGAGGGA GCTGAATATGATGATCAGACCAAGTCAAGGGGAGAAAGAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACATATGTC TGGCAGGTCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCTTACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGAC CTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACA CAGACCTTGACAAAATTTATACTACTTTTGTGCTATTGATGAAGGGAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCC TTGATGACGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAACAGGTCT CTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCCTCTCAAGTGCAC TCAATATCTCTCGAAGGTCAACATTTCTTGTGAGGAACCATGCCAGGCGTCTTGGAAATCTCGCCAAATACTTCT CTTACTGCTCAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTGTGATATCTTCCCACCAACATGATGGC ATGGAAGCTTATGTCAAAAGTAGACAGTGTCTCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAAATATGAAGAAGCGGAAGAC TATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGTATGATGACAACCTCTCCTTCTTTATCCAAAT CGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCTAAAACCTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCC TTAGTCTCTGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTTGAACATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTAC AAAAAAGTCCGATTTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTACAGCATGAATCAGGAATCTTG GGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATTTAAGAAATCAAGCAAGCAGACCATATACATC TACCCTCAGGAATCACTGATGCTCGTCTTTGTATTCAAGGAGATTACAAAAGGTGTAACAACTTTGAAGGATTTT CCAATTTGCGCAGGAGAAATATTCAAAATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGGCCCACTAAATCAGATCTCTGG TGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCTCATC TGCTACAAAGAACTCTGATGATCAAGAGGAAACCAAGATAATGTGACAGCAAGGAATGTCTCTGTTTCTGTATT GATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCAGAGAAATACAAACGCTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGAT CCAGAGTTCCAAAGCTTCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTGTAGTGTGAGCTTGTGAGTTGTTT CATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCTTCTGCTCTTCTCTGGATATACC TTCAACACAAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCCATCTCAGGAGAACTGTCTTCATGTCGATGGAA AACCCAGGTCTATGGATTCTGGGTGCCACAACCTCAGACTTTCGGAACAGAGGATGACCGCTTACTGAAGGTTTCT AGTTGTGACAAAGAACCTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGATATTTACGCATCTTGTGATGATAAAACAT GCCATTGAACCAAGAGCTTCTCCAGAATTCAAGACACCTAGCACTAGGCAAGCAATTTAATGCCACCACAATT CCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCTTGGTTTGCACACAGAACCTATGCTTAAATACAAAATGTCTCTCT AGTGATTGTTGTGCTCTTGGCAGAGAGTCTACTCCACATGGGCTATCCTTATCTGATCTCCAAAGAGCCAAAT GAGACTTTTCTGATGATCCATACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACACATTCAGGCCA CAGCTCCATCAGCTGGGACATGGTATTTACCCCTGAGTCAGGCTTCCAATTAAGATTAAATGAGAACTGGGGACA ACTGCAGCAACAGAGTTGAAGAACTTGATTTCAAAGTTTCTAGTACATCAATAATCTGATTCAACAATTCATCA GACAATTTGGCAGCAGGACTGATAATACAAGTTCTTAGGACCCCAAGTATGCCAGTTCTATTGATAGTCAATTA GATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCTCTCCCTTACTGAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAATAAT GATTCAAAAGTTGTAGAATCAGGTTAATGAATAGCCAAAGAAAGTTCATGGGGAAAAATGTATCGTCAACAGAGAGT GGTAGGTTATTTAAAGGAAAAAGAGCTCATGGACCTGCTTGTGACTAAAGATAATGCCTTATTCAAAGTTAGCATC TCTTTGTTAAAGACAAACAACTTCCAATAATTAGCAACTAATAGAAAGACTCAATTGATGGCCCATCTATTATTA ATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGAACACTGAGTTTAAAAAAGTGAACCTTTGATTCT GACAGAATGCTTATGGACAAAATGCTACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAACTACTTCTCAAAAAAC ATGGAATGGTCCAACAGAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCAGATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTTAAGATG CTATTCTTGGCAGAAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAGAACTCTCTGAACTCTGGGCAAGGCCCAAGT CCAAAGCAATTAGTATCTTAGGACCAAGAAAAATCTGTGGAAGGTGAGAATTTCTGTCTGAGAAAAACAAAGTGGTA GTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAGAGATGGTTTTTCCAAAGCAGCAGAAACCTATTTCTACT AACTTGGATAATTTACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAAATTCAGGAAGAAATAGAAAAGAGGAAACA TTAATCCAAGAGAATGTAGTTTTCCTCAGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAAATTCATGAAGAACCTTTCTTA CTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTCTATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATTAAAT GATTCAACAAATAGAACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAGGGGAGGAAGAACTTGGAAAGGCTTGGGA AATCAAAACCAAGCAAAATTTAGAGAAATATGCATGCACCAAGGATATCTCTAATACAAGCCAGCAGAAATTTGTC ACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTAGACTCCCACTAGAAAGAAACAGAACTTGAAAAAGGATAATTGTG GATGACACCTCAACCCAGTGGTCCAAAACATGAACATTTGACCCCGAGCACCTCACACAGATAGACTACAATGAG AAGGAGAAAGGGCCATTACTCAGTCTCCCTTATCAGATTGCTTACGAGGAGTCTAGCATCCCTCAAGCAATAGA TCTCCATTACCATTGCAAGGTATCATCTTTCCATCTATTAGACCTATATCTGACCAGGGTCTTATTCAGAGAC AACTCTTCTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCTTTCTTCAAGGA GCCAAAAAAATAACTTTCTTTAGCCATTCTAACCTTGGAGATGACTGGTGATCAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGG ACAAGTGCCACAATTCAGTCACATAAGAAAGTTGAGAACACTGTTCTCCCGAAACGAGACTTGCCCAAAACATCT

[0303]

	GGCAAAGTTGAATTGCTTCCAAAGTTCACATTTATCAGAAGGACCTATTCCTACGGAACTAGCAATGGGTCTCCT GGCCATCTGGATCTCGTGGAAAGGAGCCTTCTCAGGGAAACAGAGGAGCGATTAAAGTGAATGAAGCAACAGACCT GGAAAAAGTTCCCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTGCAAAAGACTCCCTCCAAGCTATTGGATCTCTGCTTGG GATAACCACTATGTGACTCAGATACCAAAAGAGAGTGGAAATCCCAAGAGAAAGTACCAGAAAAACAGCTTTAAAG AAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTAAGCAATCATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGACAAAAAAG CCCGAAATAGAAAGTCACTGGGCAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAAAACCCACAGCTTTGAAACGC CATCAACGGGAAATAACTCGTACTACTTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATGACTATGATGATACCATATCAGTTGAA ATGAAGAGGAGAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAATCAGAGCCCCGAGCTTTCAAAAGAAAAACAGACAC TATTTTATTGCTGAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAG AGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGT GGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTC AGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGTACAGAGGCAAGGAGCAGAA CCTAGAAAAAATTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAACTTACTTTTGGAAAGTGAACATCATATGGCACCCTACTAAA GATGAGTTTGACTGCAAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGACTCAGGCCTGATTGGA CCCTCTTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTT TTACCACATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAAATGGAAGAAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATC CAGATGGAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACTGGC TTAGTAATGGCTCAGGATCAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGAGCAATGAAAAATCCATTTCTATTCTAT TTCACTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAGAGGAGTAAAAATGGCACTGTCAATCTCTATCCAGGTGTTTT GAGACAGTGGAAATGTACATCTCAAGCTGGAATTTGGCGGTGGAATGCCTTATTGGCAGCATCTACATGCTGGG ATGAGACACACTTTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTGAGACTCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTT CAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGCAGTGGGCCCCAAGCTGGCCAGACTTCATTATTCGGATCAATCAATGCC TGAGAGCACAAGGAGCCTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACAATGATTATTACGGCATCAAGACCCAG GGTGCCCGTCAGAAGTCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAGTGGCAG ACTTATCAGGAAATTCCTGGAACCTTAAATGGTCTCTTTGGCAATGGGATTCTCTGGGATAAAACACAAATATT TTTAACCCCTCAATTTATTGCTCGATACATCCGTTTGCACCCAACTCATTATAGCAATTCGAGCACTCTTCGATGGAG TTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACT GCTTCATCTACTTTACCAATATGTTTGCACCTGGTCTCTTCAAAAGCTCGACTTCACCTCAAAGGAGGAGTAAT GCCGGAGACTCAGGTGAATAATCCAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCAGAGACAATGAAAGTCACAGGAGTA ACTACTCAGGAGGATAAATCTCTGCTTACCAGATGATGTGAAGGAGTCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCAT CAGTGGACTCTCTTTTTCAGAAATGGCAAGTAAAGGTTTTTCAGGGAATCAAGACTCTCTCAGCACTGTGGTGAAC TCTTAGACCCACCGTTACTGACTCGTACCTTCGAATTCACCCCAAGAGTGGGTGACCCAGATTGCCCTGAGGATG GAGGTTCTGGGCTGCGAGGACACAGGACCTCTAC
서열 번호 32 BID- cd6FVII(V1, I)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 (XEN 없음)	GCCACTCGCCGGTACTACCTTGGAGCGGTGGAGCTTTTCATGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAACTCCCCGTG GATGCCAGATTCCCCCGCGTGCCAAAGTCTTCCCTTTAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCTCTTTGTG GAGTTCCTGACCACTGTTCAACATCGCCAAAGCGCGCCACCTTGGATGGGCTCCTGGGACCGACATTCAAGCT GAAGTGTACGACACCGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCGTCCCAACCCGCTGCTCCGATGCGGTGCGAGTGTCC TACTGGAAGGCTCCGAAGGAGTGAAGTACGACGACAGACTAGCCAGCGGGAAGAGGAGCAGTAAAGTGTTCCTCG GGCGGCTCGCATACTACGTGTGGCAAGTCTTGAAGGAAACGACCTATGGCATCCGATCTCTGTGCTGACTTAC TCTACCTTTCCCATGTGGACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGTGCATTTCTGCTGCGCGGAAGGT TCGCTCGTCAAGGAAAGACCCAGACCTCCATAAGTTTCATCCTTTTGTTCGCTGTGTTGATGAGGAAAGTCAATGG CATTCCGAACTAAGAACTCGCTGATGACGACCGGGATGCCGCTCAGCCCGCGCTGGCTAAAAATGCATACAGT AACGGATACGTGAATCGGTCACTGCCCGGCTCATCGTTGTACAGAAAGTCCGTGACTGGCACGTCATCGGCATG GGCACTACGCTGAAGTGCATCTCTTCTGGAAGGACACCTTCTCGTGCACCAACCCGCGAGGCTCTCTG GAAATCTCCCCGATTACCTTTCTGACCGCCAGACTCTGCTCATGGACCTGGGCGAGTTCTTCTCTCTGCGCATC TCCAGCCATCAGCAGACGGAATGGAGGCTACGTGAAGGTGGACTCATGCCGGAAGAACCTCAGTTGCGGATGAAG AACCAACGAGGAGGCGGAGGACTATGACGACGATTGACTGACTCCGAGATGGAGCTGTCGGGTTGATGACGACAAAC AGCCCAAGCTTCTATCAGATTGCGAGCTGGCCAAAGACCCCAAAACCTGGGTGCACTACATCGCGGCCGAGGAA GAAGATTGGGACTACGCCCGTGGTGTGGCACCAGTACCGGTCTACAAAGTCCAGTATCTGAACAATGGTCCG CAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGGGTTTCATGGCGTACACTGACGAAACGTTTAAAGACCGGAGGCCATT CAACATGAGAGCGGATTTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAGGTGCGGATACCTGCTCATCTTCAAAAACCAAG GCCTCCCGGCTTACAACATCTACCTCACGGAATCACGACGTGCGGCACTTACTCGCGCGCTGCCAAGGGG GTCAAGCACCTGAAAGACTTCCCTATCTGCGGGCGAAATCTTCAAGTATAAGTGGACCGTCACCGTGGAGGACGGG CCCACCAAGAGCGATCTAGGTGTGACTCGGTACTACTCCAGCTTCTGTAACATGGAACGGGACCTGGCATCGGGA CTCATTGGACCGCTGCTGATCTGTACAAAGAGTGGTGGATCAACGCGGCAACAGATCATGTCGACAGCGCAAC GTGATCTGTTCTCCGTGTTTGTGAAAAACAGATCCTGGTACCTCACTGAAAAATCCAGAGGTTCTTCCAAACCCC GCAGGAGTGAACATGGAGGACCTGAGTTTTCAGGCTCGAATATCATGCACTCGATTACGGTTACGTGTTGACTCG CTCAGCTGAGCGTGTGCTCCATGAAGTCTGTTACTGGTACATTTCTGCTCATCGCGGCCAGACTGACTTCTGAGC GTGTTCTTTCCGGTTACACCTTTAAGCACAAGATGGTGTACGAAGATACCTGACCTGTTCCCTTTCTCCGGCGAA ACGGTGTCTGATGAGGAGAACCGGGTCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACAGCGACTTTCGGAACCGCGGAATG ACTGCCCTGTGAAGGTGCTCATGCGACAAGAACCCGAGACTACTACGAGGACTCTACGAGGATATCTCAGCC

[0304]

	TACCTCCTGTCCAGAACAACGCGATCGAGCCGCGCAGCTTCAGCCAGAACCCTGTGCTGAAGAGGCACCAGCGA GAAATTAACCCGGACCACTTCAATCGGATCAGGAGGAAATCGACTACGACGACACCATCTCGGTGGAAATGAAGAAG GAAGATTTCTGATATCTACGACGAGGACGAAATCAGTCCCTCGCTCATTCCAAAAGAAAATAGACACTACTTTATC GCCGCGGTGGAAAGACTGTGGGACTATGGAATGTATCCAGCCCTCACGTCTTCGGAAACCGGGCCAGAGCGGATCG GTGCTCAGTTCAAGAAAGTGGTGTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCGCTGTACCGGGGAGAACTG AACGAACACCTGGGCTGTCTGGTCCCTACATCCGCGCGGAAGTGGAGGATAACATCATGGTGACCTTCCTGAACCAA GCATCCAGACCTTACTCTTCTATTCTCTCTGATCTCATACGAGGAGGACAGCGCAAGGCGCCGAGCCCGCAAG AATCTCGTCAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGTCCAACACCATATGGCCCCGACCAAGGATGAGTTT GACTGCAAGGCTGGGCTACTTCTCCGACGTGGACCTTGAAGAAGATGCCATTCCGGCTGTACCGGGCTGTCTG GTGTGTACACCAACACCTGAAACCGCATGGACGCCAGGTACCGTCCAGGAGTTTGTCTGTCTTCCACATT TTTGACGAACTAAGTCTGGTACTTACCGAGAATATGGAGCGAAACTGTAGAGCGCCCTGCAATATCCAGATGGAA GATCCGACTTTCAAGGAGAACTATAGATTCCACGCCATCAACGGGTACATCATGGATACTCTGCGGGCTGTCTATG GCCAGGATCAGAGGATTCGGTGGTACTTGTGTCAATGGGATCGAACGAAACATTCACTCCATTCACTTCTCCGGT CACGTGTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCGCTGTACAATCTGTACCCCGGGGTGTTCGAAACTGTG GAGATGCTGCGCTCAAGGCCGGCATCTGGAGAGTGGAGTGCTGTATCGGAGAGCACCTCCACGCGGGGATGTCCACC CTCTTCTGGTGTACTCGAATAAGTGCCAGACCCCGCTGGGATGGCTCGGGCCACATCAGAGACTTCCAGATCACA GCAAGCGGACAAATACGGCAATGGGCGCCGAAGCTGGCCGCTTGCACACTTCCGGATCGATCAACGCATGGTCCACC AAGGAACCGTTCTCTGGGATTAAGGTGGACCTCTGGCCCTATGATTATCCAGGAAATTAAGACCCAGGGCGCAGG CAGAAGTCTCTCTCTGTACATCTCGCAATTATCATCATGTACAGCTGGAGGGGAAAGTGGCAGACTTACAGG GGAACTCCACCGGACCCCTGATGGTCTTTTCGGCAACGTGGATTCTCTCGGCATTAAGCACACATCTTCAACCCA CCGATCAGCAGATATATTAGGCTCCACCCCACTCACTACTCAATCCGCTCAACTTTCGGATGGAACTCATGGGG TGGACCTGAACTCTGTCTCATGCGCTTGGGGATGGAATCAAGGCTATTAGCGACGCCAGATCACCGCAGCTCC TACTTCACTAACATGTTCTGCCACCTGGAGCCCTCAAGGCCAGGCTGCACTTGCAGGGACGGTCAAAATGCTGGCGG CCGCAAGTGAACAATCCGAAGGAATGGCTTCAAGTGGATTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGAGTCAACCCAG GGAGTGAAGTCCCTTCTGACCTCGATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCCAGGACGGGACCACTGGACC CTGTTCTTCCAAAACGGAAAGGTCAAGGTGTTCCAGGGGAACAGGACTCGTTACACCCGTGGTGAACCTCTGGAC CCCCACTGCTGACGCGGTACTTGAAGATTATCTCTCAGTCTGGTCCATCAGATTGCATTGCAATGGAACTCTG GGTGCAGGGCCAGGACCTGTACTGA
서열번호 33 coBDDFVIII(V 2.0)을 암호화하는 뉴클레오타드 서열 (XTEN 없음)	GCCACCCCGGGTATTACTTAGGTGCTGTGGAAGTGAAGTGGGACTACATGCAATCCGACCTGGGAGAACTGCCGGTG GAGCGGAGATTCACACCTAGAGTCCCGAAGTCTTCCATTCAACACCTCCGCTGGTCTACAAAAGACCTGTTCTGTG GAGTTCACGTACACCTTTTCAATATTGGCAAGCGCGCCCTCGGATGGGCTGCTTGGTCTACGATCCAAAGCA GAGGTCTACGACACCTGGTGTATCACTGAAGAATATGGGCTCACACCCGCTGTCTGCTGATGCTGTGGGAGTGTCC TACTGGAAAGGCTCAGAGGGTCCGAATATGATGACCAAGACAGCCAGAGGGGAAAGGAGGATGACAAAGTGTCCCG GGTGGCAGCCACCTTACGTGTGGCAAGTGTGGAAGGAAACGGGCTATGGCGTCCGAGCCCTTATGCCTGACCTAC TCTACCTGTCTTGTGGACCTGTGAAGGATCTCACTCGGACTGATCGGCGCTCTTGGTGTGAGAGAAAGGC AGCTTGGCGAAGGAAAGACTCAGACCTGCACAAGTTCTTCTGTTGTTGTGTGTTGATGAGGAAAGTCTTGG CACTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGACAGGATAGAGATGCGGCTCGGCGAGAGCTGGCTTAAATGACACCGCTG ACGGAATATGTGAACAGGTCTGCTCTGGCTCATCGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTATTGGCATGTGATCGGCATG GGTACTACTCCGGAAGTGCATAGTATCTTCTGGAGGGCCATACCTTCTTGGTGCAGCAACACAGACAGGCTCGCTG GAAATCTCGCTATCACTTCTTGAATGCGCAGACCTCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGCTGTCTGTGACATC AGCTCCCATCAGCATGATGGGATGGAGGCTATGTCAAAGTGGACTCTGCGCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAA AACATGAGGAAGCGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGAGCTGTGCGATTGATGACGACAA AGCCCGTCTTATCCAAATTAGATCAGTGGCGAAGAAGCACCCAAAGACCTGGGTGCACTACATTGCCCGCAGGAA GAGGACTGGGACTACGCGCCGCTGGTGTGCGGCCAGACGACAGGAGCTACAAGTCCAGTACCTCAACACGGGCGG CAGCGCATTGGCAGGAAGTACAAGAAAGTCCGCTTATGGCTTACATGATGAAACCTTCAAGACGAGGGGAAAGCCATC CAGCAGAGTCAAGCATCTGGGACCGCTCTTACGGCGAAGTGGGGATACCTGCTCATTTTTCAAGAACCAAG GCATCGCGGCTTACAACATCTACCCTCACGGGATCACAGAGTGCAGCCGCTCTACTCCCGCGGCTGCCAAGGGA GTGAAGCACCTGAAGGATTTTCCATCTGCGGGGAGAAATTTCAAGTACAAGTGGACCGTGTGTGGAAAGATGGC CTTACCAAGTCCGACCTCGTGTCTGACCCGCTACTTCTCTGTTTGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCTCGGGG CTGATTGTTGCTGCTGTCTGTACAAGGAGTCCGTGGACAGCGCGGGAACAGATCATGTCGACAAAGCGCAAC GTGATCCTGTTCTGTCTTTGATGAAACAGATCGTGGTACTTGACTGAGAATATCCAGCGGTCTCTGCCAACCCA GCGGGAGTGAACCTGGAGGACCCGAGTTCCAGGCTCAAACATTATGCACTCTATCAACGGCTATGTGTTGACTCG CTCAAATGAGCGTGTGCTGATGAAGTGGCATACTGGTACATTCTGTCCATCGGAGCCAGACCGACTTCTGTCC GTGTTCTTCTCCGATACACTTCAAGCATAAGATGGTGTACGAGGACACTTGACCTCTTCCATTTTCCGGAGAA ACTGTGTTCTGATGCAATGGAAACCCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATAACTCGGACTTCCGGAATAGAGGGATG ACCGCCCTGTGAAGGTGTCCAGCTGTGACAAGAATACCGGCAATTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCT TATCTGCTGTTCAAGAACACGCCATTGAACCCAGGCTCTTCTCCAAAACGGTGCACCGGCTCATCCCCCGCTG CTGAAGCGGATCAAGAGAGATCACAGGACACTCTCAGTCCGATCAGGAAGAAATTGACTACGACGATATC AGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTGCATCTACGATGAGGATGAGAACCAGTCCCTCGGAGCTTTCAGAAAGAA ACCCGCCACTACTTATCTGCTGCGGTGGAGCGGCTGTGGGATTACGGGATGTCCAGCTCACCGCATGTGCTGCGGAA AGAGCGCAGTCAGGATCGTGTCCCGTCAAGAAAGTCTGTGTTCAAGAGTTCACCGACGGGCTCTTCACTCAACCC CTGTACCGGGGCGAACTCAACGAACACCTGGGACTGCTTGGGCGTATATCAGGGCAGAGTGAAGATAACATCATG

[0305]

	GTACACCTTCGGAACAGGCGCTCCGGCGGTACAGCTTCTACTCTTCACTGATCTCCTACGAGGAAGATCAGCGGCAG GGAGCCGAGCCCGGAAGAACTTCGTCAAGCCTAACGAACTAAGACCTACTTTTGGAGGTCCAGCATCACATGGCC CCGACCAAGACGAGTTGACTGTAAAGCCTGGGCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAGGAAGGACGTGCACTCGGGA CTCATTGGCCCGCTCTTGTGTGCATACTAATACCCTGAACCTGCTCAGGTCGCAAGTCACAGTGCAGGAGTTC GCCCTCTTCTCACCATCTTCGATGAAACAAAGTCTGGTACTTTACTGAGAATGGAACGCAATTGCAGGGCACCC TGCACATCCAGATGGAAGATCCACCTTCAAGGAAACTACCAGTTCATGCCATTAAAGGCTACATAATGGACAG TTGCCAGGACTGGTTCATGGCCAGGACGAGAGATCCGGTGGTATCTGCTCTCCATGGGCTCCAACGAAACATTCAC AGCATTCTTTTTCCGGCATGTGTTACCGTCCGGAAGGAAGGATACAAGATGGCTCTGTACAACCTCTACCT GGAGTGTTCGAGACTGTGGAATGCTGCCTAGCAAGGCGGCGATTGGAGAGTGAATGCCTGATCGGAGAGCATTG CACGCCGGAATGTCCACCTGTTTCTTGTGTACTCCAACAAGTGCCAGACCCCGCTGGGAATGGCTCAGGTCTATT AGGGATTTCCAGATCACTCTTCGGGGCAGTACGGGCGTGGGCACCTAAGTTGGCCCGGCTGCACTACTCTGGCTCC ATCAATGCTGGTCCACCAAGGAACCTTCTCTGGATTAAAGGTGGACCTCTGGCCCAATGATTATTCACGGTATT AAGACCCAGGGTGCCGACAGAAGTCTCTCACTCTACATCTCGAATTCTACATAATGTACAGCCTGGATGGGAAG AAGTGGCAGACCTACCAGGGAACCTCCACTGGAACGCTCATGGTGTTCCTGGCAACGTGGACTCTCCGGCATTAAAG CACACATCTTCAACCTCCGATCATTGCTCGGTACATCCGGCTGCACCAACTCACTACAGCATCCGGTCCACCTG CGGATGGAAGTGTGGGTTGTGACCTGAACCTCTGCTCATGCCCTTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCGATGCA CAGATCACCCTCTTCACTCTTCAACATGTTTCGCGACCTGGTCCCGCTGGAAGGCCCGCTGCACTTCAAGGT CGTCCAATGCGTGAAGGCTCAAGTGAACCAACCCCAAGGAGTGGCTCCAGGTGCACTTCCAAAGACCATGAAGGT ACCAGAGTGACCAACAGGGCGTGAAGTCTCTGCTGACCTCATGTACGTTAAGGAGTTCCTCATCTCTCAAGCCAA GACGGACATCAGTGGACCTGTTCTTCAAAACGGAAGTCAAGTATTCAGGGCAACAGGACTCTTCAACCT GTGGTCAACAGCTGGACCCCTTCTGACCCGCTACCTCCGATCCACCCCAAGGTGGGTCCACAGATCGCA CTCGCATGGAGGCTCTGGATGCGAAGCCCAAGATCTGTACTAA
서열번호 34 V1.0 발현 카세트 TTP-인트론- BDDFVIIcoB TEN (V1.0)- WPRE- bGHPolyA	ATGACAGATTGAGCTGTCCACTTGTTCCTCTCTGCTCCTGCGCTTCTGTTTCTCCGCCACTCGCCGGTACTACCTT GGAGCCGTGGAGCTTTCATGGGACTACATGACAGCGACCTGGGCGAACTCCCCGTGGATGCCAGATTCCCCCCCCG GTGCCAAAGTCTTCCCTTTAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAACCTCTTTGTGAGTTCACTGACCACTGTTC AACATCGCAAGCGCGCCCACTTGGATGGGCTCTGGGACGACATTCAAGCTGAAGTGTACGACACCGTGGTG ATCACCTGAAGAATCGGCTCCACCCGCTGCTCCTGATGCGGTGGAGTGTCTACTGGAAGGCTCCGAAGGA GCTGAGTACGACGACGACTAGCCAGCGGGAAGGAGGACGATAAAGTGTTCGGGCGGCTCGCATACTTACGTG TGGCAAGTCTGAAGGAAACGGACCTATGGCATCCGATCTCTGTGCTGACTTACTCTACTTTCCATGTGGAG CTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGTGCATCTCTGTGCGCGGAAGGTTGCTCGCTAAGGAAAGGAC CAGACCTCCATAAGTTCATCTTTTGTTCGCTGTGTTGATGAAGGAAGTCAATGGCATTCCGAACCTAAGAACTCG CTGATGACGAGGACGGGATGCCGCTCAGCCCGCGCTGGCTAAAATGCATACAGTCAACGGATACGTGAATCGGTCA CTGCCCGGCTCATCGGTTGTACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTATCGGCATGGGCATACGCTGAAGTGAC TCCATCTTCTGGAAGGGCACACTTCTCTGTCGCAACACCGCGGAGGCTCTCTGGAATCTCCCGATTACCTTT CTGACCGCCAGACTCTGCTCATGGACTGGGCGAGTTCCTTCTTCTGCGCACTCTCCAGCATCAGCAGCAGGA ATGGAGGCTACGTGAAGGTGGACTCATGCCGGAAGAACCTCAGTTGCGGATGAAGAACACGAGGAGGCGAGGAC TATGACGACGATTGACTGACTCCGAGATGGAGCTGCTGCGGTTGATGACGACAAACAGCCCGCTTCTATCCAGAT CGCAGCTGGCCAAAGACACCCCAAACTGGGTGCACTACATCGCGCGGAGGAAGAAGATTGGGACTACGCCCG TTGGTGTGCGACCCGATGACCGGTCTGTAAGTCCAGTATCTGAACAATGGTCCGACGCGATTGGCAGAAAGTAC AAGAAAGTGCAGTTATGGCGTACACTGACGAAACGTTTAAAGCCGGGAGGCCATTCAACATGAGAGCGGCACTTCG GGACCACTGCTGTACGGAGAGGTGGCGATACCTGCTCATCATCTTCAAAACCAAGGCTCCCGGCTTACAACATC TACCTCAGGAATCACCAGCTGCGGCGCTACTCTGCGGCGCTGCCGAAGGGCGTCAAGCACCTGAAAGACTTC CCTATCTGCGGGCGAAATCTTCAAGTATAAGTGGACCTGACCGTGGAGGACGGGCCACCAAGAGCGATCCTAGG TGCTGACTCGGTACTTCCAGCTTCTGGAACATGGAACGGGACCTGGCATCGGACTCATTGGACCGTGTGATC TGCTACAAGAGTCGGTGGATCAACGCGGCAACGATCATGTCCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCTCCGTGTTT GATGAAAACAGATCCTGGTACCTCACTGAAAACATCCAGAGGTTCTTCCAAACCCGAGGAGTGCAACTGGAGGAC CCTGAGTTTCAGGCTCGAATATCATGCACTCGATTAACGGTTACGTGTTGACTCGCTGCAACTGAGCGTGTGCTC CATGAAGTCTGTTACTGGTACATCTGTCCATCGGCGCCAGACTGACTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGTTACACC TTTAAAGCACAAGATGGTACGAAGATACCTGACCTGTTCCCTTTCTCGGCGAAACGGTGTTCATGTGATGGAG AACCCGGGTCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACAGCGACTTTCGGAACCGCGGAATGACTGCCCTGTGAAGGTGTCC TCATGCGACAAGAACACCGGAGACTACTACGAGGACTCTACGAGGATATCTAGCTACCTCCTGTCCAAGAACAC GCGATCGAGCCGCGAGCTTCAAGCAGAACGCGCGCCCAACATCAGAGAGCGCCACCTTGAAGTGGTCCCGGAGC GAGCCAGCCACATCTGGGTGGAACGCGAGGCAAGTGAAGTCTGCAACTCCCGAGTCCGGACCTGGCTCCGAGCT GCCATAGCGGCTCCGAGACTCCGGGAATTCGAGAGCGCTACACCAGAAAGCGGACCCGGAACCACTACCGAAT AGCGAGGCTCTGCTCGGGCAGCCAGCCGCTCTCTACATCCAGGAGGAGGGCACTTCCGAATCCGCCACCCCG GAGTCAAGGCGAGGATCTGAACCGCTACCTCAGGCACTGAGACGCCAGGAACGAGCGAGTCCGCTACACCGGAGT GGGCGAGGGAGCCCTGCTGGATCTCTACGTCCACTGAGGAAGGTCACCAAGCGGCTCGCCACCAAGCACTGAAGAA GGTGCTCTGAGCCGCTGTGCTGAAGAGCACAGCGAGAAATTACCCGACCACTTCCAATCGGATCAGGAGGAA ATCGACTACGACGACCATCTCGGTGGAATGAAGAAAGGAAGATTTCGATATCTACGACGAGGACGAAATCAGTCC CTCGCTCATTTCAAAAGAACTAGACACTACTTTATCGCCGCGGTGGAAGACTGTGGACTATGGAATGTCTCC AGCCCTCAGCTCTTCCGAACCGGCGCAGAGCGGATCGGTGCTCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCAGGAGTTACCC GACGCGAGTTCACCGAGCGCTGTACCGGGGAACTGAACGAACCTGGGCTGCTCGGTCTCATCTCCGCGC

[0306]

[illegible]

	CTGGAAGGCTCAGAGGGTCCGAATATGATGACACAGACCAGCCAGAGGGAAGGAGGATGACAAAGTGTCCCGGG TGGCAGCCACACTTACGTGTGGCAAGTGTGAAAGGAAACGGGCTATGGCGTCGGACCCCCATGCTGACCTACTC CTACCTGTCCATGTGGACCTTGTGAAGGATCTCAACTCGGGACTGATCGCGCCCTCTTGGTGTGACAGAAAGGCA CCTGGCGAAGGAAAGACTACAGCCCTGACAAAGTTCTTCTGTTGTTGCTGTGTTGATGAAGGAAAGTCTTGGA CTCAGAAACCAAGAACTCGCTGATGACGAGATAGAGATGCGGCTCGGCCAGAGCTGGCTAAAATGCACACCGTCAA CGGATATGTGAACAGTCTGCTCCCTGGCCTCATCGGCTGCCAGAGAAAGTCCGTGATTGGCATGTGATCGGCATGGG TACTACTCCGGAAGTGCATAGTATCTTCTGGAGGGCCATACCTTCTGGTGCGCAACACAGACAGGCTCTGCTGGA AATCTCGCTATCACTTTCTGACTGCGCAGACCTCTTATGGACCTTGGACAGTTCCTGTCTGTCTGTACATCAG CTCCCATCAGCATGATGGGATGGAAGGCTATGTCAAAGTGGACTCTGCGCTGAGGAGCCACAGCTCCGGATGAAGAA CAATGAGGAAGCGGAGGATTACGACGACGACCTGACTGACAGCGAAATGGAGCTCGTGCGATTTCATGACGACAACAG CCCGTCTTCTCAATTAAGTATAGTGGCGAAGAACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCCGCCGAGGAAAG GGACTGGGACTACGCGCCCTGCTGCTGGCGCCAGACGACAGGAGCTCAAGTCCCAGTACCTCAACACGGGCCGCA GCGCATTTGGCAGGAAGTACAAGAAAGTCCGCTTCTGCGCTACACTGATGAACCTTCAAGACGAGGGAAGCCATCCA GCACGAGTCAGGCTCTCCGGGACCGCTCTTTACGGCGAAGTGGGGATACCTGTCTCATATTTCAAGAACGAGGC ATCGGGGCTTACAACTATACCTTACGGGATCAGACGCTGCGCCGCTCTACTCCGCCGGCTGCCAAGGGAGT GAAGCACCTGAAGGATTTTCCCATCTGCGCGGAGAAATCTTCAAGTACAAGTGGACCTGACTGTGGAAGATGGCCC TACCAAGTCGGACCTCGCTGTCTGACCCGGTACTATTCTCTGTTTGTGAACATGGAGCGGACCTGGCCTCGGGCT GATTGGTCCGCTGCTGATCTGCTACAGGAGTCCGTGGACAGCGGGGAAACAGATCATGTCCGACAAAGCGCAACGT GATCTCTGTTCTCTGCTTTGATGAAACAGATCGTGGTACTTGAAGTGAAGATATCCAGCGGTTCTCGCCAAACCCAGC GGGAGTGAACCTGGAGGACCGGAGTTCAGGCTCAAACTATGCACTCTATCAACGGCTATGTGTTCTGACTCGCT CCAAGTGAAGCTGTGCTGCTGATGAAGTGGCATACTGGTACATTTCTGCTCATCGGACCCAGACGACTCTCTGCTG GTTCTTCTCGGATACACCTTCAAGCATAAAGTGTGTACGAGGACACTGTACCCCTTCTCCATTTTCCGGAAGAA TGTGTTCTATGTCATGGAAGGAAACCGGGCTTGTGGATTCTGGGTTGCCATACTCGGACTTCCGGAATAGAGGGATGAC CGCCCTGCTGAAAGTGTCCAGCTGTGACAAGAAATACCGGCGATTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCTCCGCTTA TCTGCTGTCCAAAGAACACGCCATTGAACCCAGGTCCTTCTCCAAACCGGTGACCGACCTCCGAAAGCGCCACCCC AGAGTCAGGACCTGGCTCGGAACCGGCTACCTCGGGCTCAGAGACACCGGGGACTTCCGAGTCCGCAACCCCGAGAG TGGACCCGGATCCGAACGACCACTCAGGATCAGAAACCCCGGGAATTCGGAATCCGCCACTCCCGAGTCGGGACC AGGCACCTCCACTGAGCCTTCCGAGGGAAGCGCCCGGATCCCTGCTGGATCCCTACGAGCTGAAGAAAGGAC CTAGAACTCCCGACCCCTGAGTCCGGCTTGGAAAGCAACCCCGACCTCCGGTTCGGAACCCCTGGGACTAGCGA GAGCGCACTCCGGAATCGGGCCAGGAAGCCTGCGGATCCCGACAGCACCAGGAGGGAAGCCCGCCGGGTC ACCGACTTCCACTGAGGAGGAGCTTACCCCCCGTGTGAAGCGGCTCAAGAGAGAGTACCAAGGACCTCT CCAGTCCGATCAGGAAGAAATGACTACGACGATCTATCAGCTGGAGATGAAGAAAGGAGGACTTCGACATCTACGA TGAGGATGAGAACAGTCCCTCGGAGCTTTCAGAAAGAAACCCGCCACTACTTCTATGCTGCGGTGGAGCGGCTGTG GGATTCGGGATGTCCAGCTCACCCTGCTGTGCTGCGGAATAGAGCGCAGTCAAGATCGTGCCCAAGTTCAAGAAAGT CGTGTTCAGAGGTTCAACGACGGTCTTCACTCAACCCCTGTACCGGGCGAACTCAACGAACCTTGGGACTGCT TGGGCCGTATCAGGGCAGAAGTGAAGATAAATCATGGTCACTTCCGCAACCGGCTCCCGCCGCTACAGCTT CTACTTCTACTGATCTCTACGAGGAAGATCAGCGGAGGAGCCGAGCCCGGAAGAACTTCGTCAAGCTTAACGA AACTAAGACTTCTTTGAAGGTTCAAGCATCATATGGCCCGCAACAAAGACAGTTCGACTGTAAGGCTTGGGCTA CTTCTCGGATGTGAGCTGGAAAGGAGCTGCACTCGGACTCATTGGCCGCTCTTGTGTGCTACTAATACCT GAACCTGCTCAGGTCGCAAGTCAAGTGCAGGAGTTTCGCCCTCTTCTTCACTCTTCTGATGAAACAAAGTCTCTG GTACTTTACTGAGAACATGGAACGCAATTGACGGGACCCCTGCAACATCAGATGGAAGATCCACCTTCAAGGAAAA CTACGGTTTCTCATGCCATTACCGCTACATAATGGACAGTTGCCAGGACTGGTCTATGGCCAGGACGAGAAATCCG GTGGTATGCTCTCCATGGCTCCAACGAAACATTACAGCATTCATTTTCCGGCATGTGTTACCGTCCGGAA GAAGGAAGAGTACAGATGGCTGTGTACAACCTTACCTGGAGTGTTCGAGACTGTGGAATGCTGCTAGCAAGG CGGCTATTGGAGAGTGGAAATGCTGTGAGAGAGCATTTGACGCGGGAATGTCCACCTGTTTCTGTGTACTCCAA CAAGTGGCAGACCCCGCTGGGAATGGCTCAGGTCAATATTAGGGATTTCAGATGCTGCTCGGGCAGTACGGGCA GTGGGCACCTAAGTTGGCCGGCTGCACTACTGCTGCTCAATGCTGGTCCACCAAGGAACCTTCTCTGGAT TAAGGTGACCTCTCGGCCCAATGATTATTACGGTATTAGACCCAGGTTGCCGACAGAAATTCCTCACTCTA CATCTCGCAATTTATCATATATGACGCTGGATGGGAAGAGTGGCAGACCTACCGGGGAACTCCACTGGAACGCT CATGGTGTTTTGGGCAACGTGGACTCTCCGGCATTAAGCACAACATTTCAACCTCCGATCATTGCTGCTGAT CCGGCTGACCCCACTACTACAGCATCCGGTCCACCTGCGGATGGAAGTGGGTTGTGACCTGAACTCTGCTC CATGCCCCCTGGGATGGAATCCAAGGCCATTAGCGATGACAGATCACCCTCTTCTACTTCAACAACTGTTGCG GACCTGGTCCGCTCGGAAGGCCCGCTGCACTTCAAGGTGCTTCAATGCGTGGCGGCTCAAGTGAACAAACCCAA GGAGTGGCTCAGGTGCACTTCAAAAGACCATGAAGTCAACGGAGTACCAACCGGCGTGAAGTCCCTGCTGAC CTCTATGATGCTTAAGGAGTTCTCATCTCTCAAGCAAGACGGACATCAGTGGACCTGTTCTTCAAAACGGAAA AGTCAAGATTTTCAAGGCAACCGGACTCTTCAACCTGTGGTCAACAGCTTGGACCCCTTGTGCTGACCCGCTA CTCTCGCATCCACCCCAAGTGGGTCCACAGATGCACTGCGCATGGAGGTCCTTGGATGCAAGGCCAAGATGT GTACTAAGCGGCGCTCATATAAATCTGGAATTACAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGATGGCTTTCATTTTCTC TCTCTGTATATAATCTCTGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGAC TGTGTTTGTGTCGACGCAACCCCACTGGTGGGGCATTCACCACTGTGACGCTCTTCCGGGACTTTCGCTTTCCC CTCTCTATTGCCACGGCGAATCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGCTGGCTGTGGGCACTGA CAATTCCTGTGTGTGCTGGGGAATCATGCTCTTCTTGGTGTGCTGCGCTGTGTTGCCACTGGATTTCTGCGCGG
--	---

[0308]

	GACGCTCTTCTGCTACGTCCTTCCGGCCCTCAATCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCC TCTTCCGCGCTTCTGCTTCCGCTTCCAGACGAGTGGATCTCCCTTGGGCGGCTCCCGCTGCTAGGCGACTGTG CCTTCTAGTTGCGAGCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCTTCTTGAACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTC CTTCTCTAATAAAATGAGGAAATGATCGATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTATCTGCGGGGTGGGGTGGGCA GACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGATGCTGGGGAAGACCATGGGCGCGCAGGCTGTGACGCGC CGGGCGGTACCGGATCGCTCGCAGCATAAAG
서열번호 36	ATCGATGGCCCCAGGTTAATTTTAAAAAGCAGTCAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTG CTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCTTGGAGGCGAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCTCTGGG CCTCTCCCACTTCTGATGGCCCCAGGTTAATTTTAAAAAGCAGTCAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTAC TCTCTCTGTTTGTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCTTGGAGGCGAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGAC TTATCTCTTGGGCTCTCCCACTTCAAGTACGCTAGCTTGGGCTGGTCAAATTAAGACCTCTCTCTGCTCTG AGCAGCTGGGGGCGAGCTAAGCAGAGGGCTGTGCAAGCCACATAAAGAGCTACTGTGTGCCAGGCACTTCAACC GAGGCACTTCAAGCATGCTTGGGAATGAACTTCAACTCTTGGGATGCAAGTGAAGAGTTCTGGTTTCAAGAGA GGTGAAGCGGCTGCTGAGGCGAGCAGCTCTTCTTACAGATGTGCTTCCCACTCTACCTGTCTCACGGCCCC CCATGCGAGCTGACGGTTGTGTCTGCTCAGTCACTGCTTCAATTTTCCATGGGACCATCAAGAGGGTGTGTTGTGTC TAAGGCTGACTGGGTAACCTTGGATGAGCGGCTCTCCGCTGTGAGCCTGTTCTCTCATCTGTCAAATGGGCTCAAC CCACTCTGATCTCCAGGGCGGAGTAACTTCAAGCATCAGGCACTTGGGGTGAAGTCAAGTAAATGGTAGACTTGTG TACCAAGTGAAGACGCTCAAGGATTTGCAAGTGAAGGAGGAGGCGAGTAAAGTGGTACTTCCAGAGAGTGTGTC ACTACGCGCCCTCCACTTGGACACAGGAGCTGTGGTTTCTGAGCGAGTACAATGACTCCTTCCGTAAGTG CAGTGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAGCGTCCGGGAGCGTGAAGGCGGAGTCAAGTCCAGGCAAGTGGACTTA GCCCTTGTGCTCTCCGATAACTGGGGTGAACCTTGGTTAATTAACAGGAGCTTCCCGCTTGGCTTGGAT CCACTGCTTAATACGAGGAGGAGGAGGCGCTGCTCTCAGCTTCAAGGACCACTGACTGGGACAG

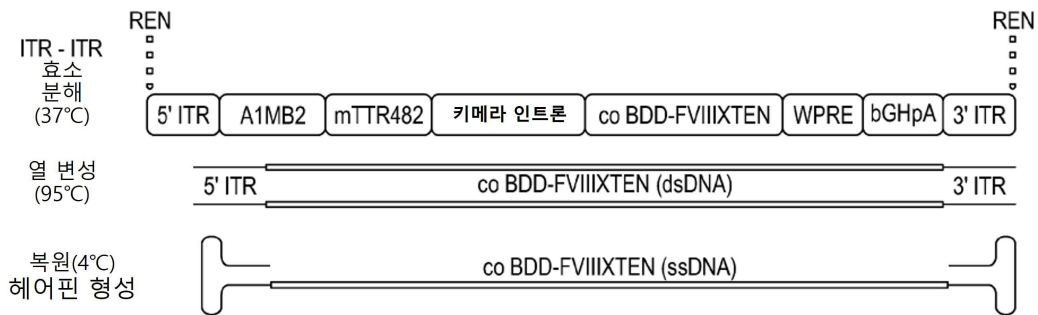
[0309]

도면

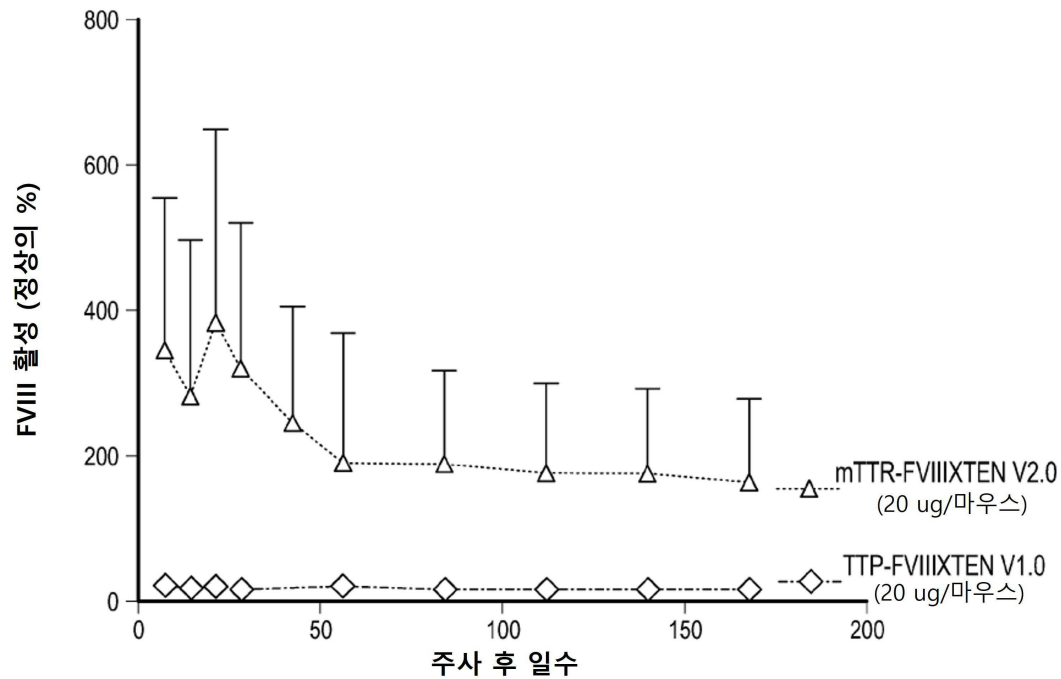
도면1



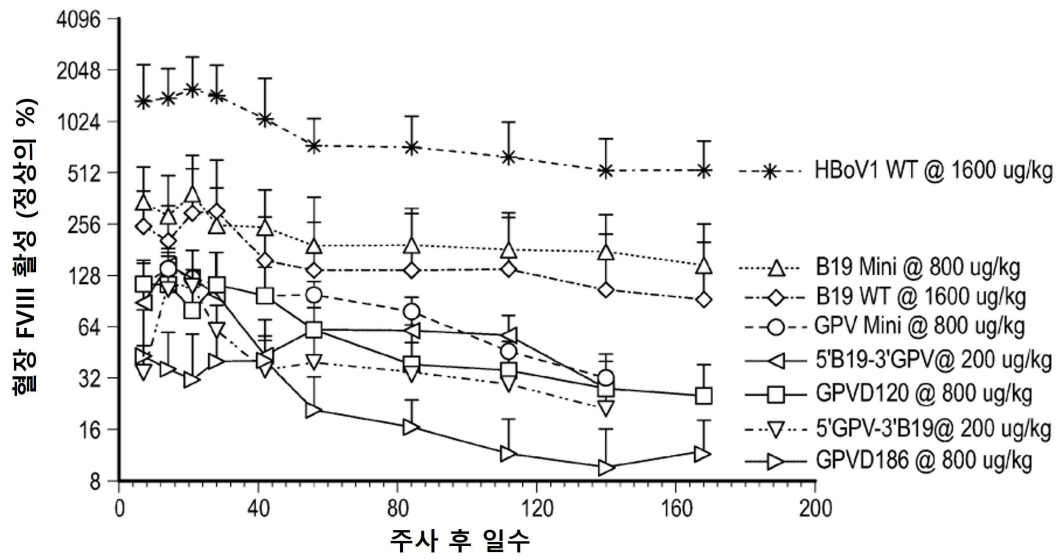
도면2



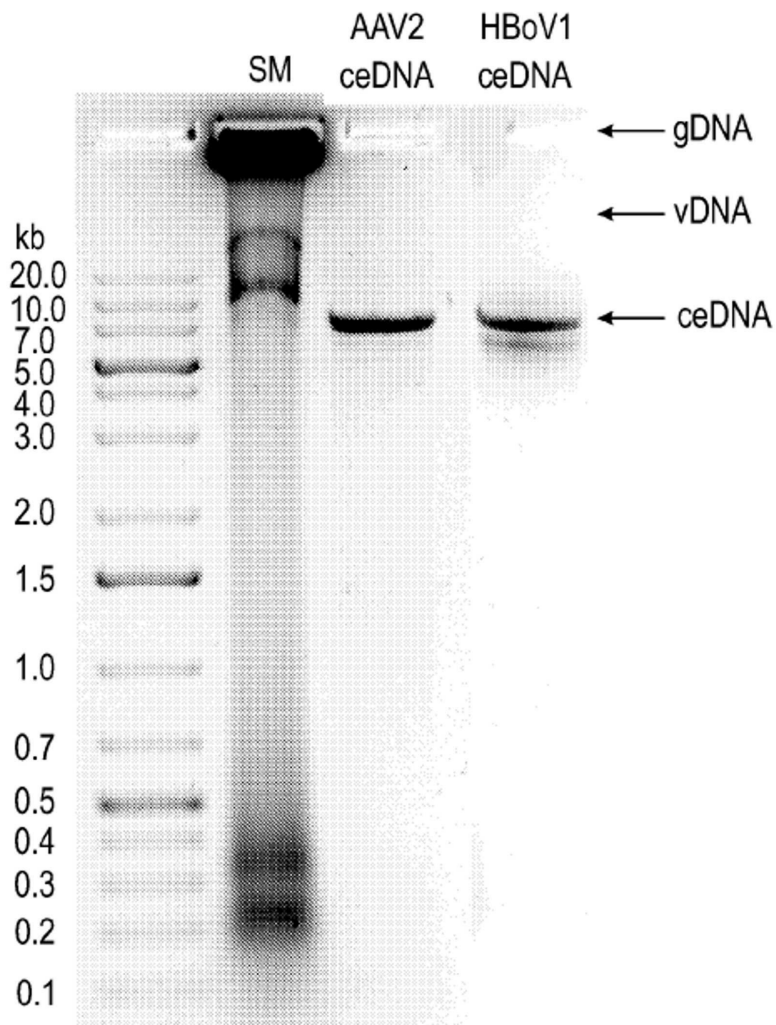
도면3



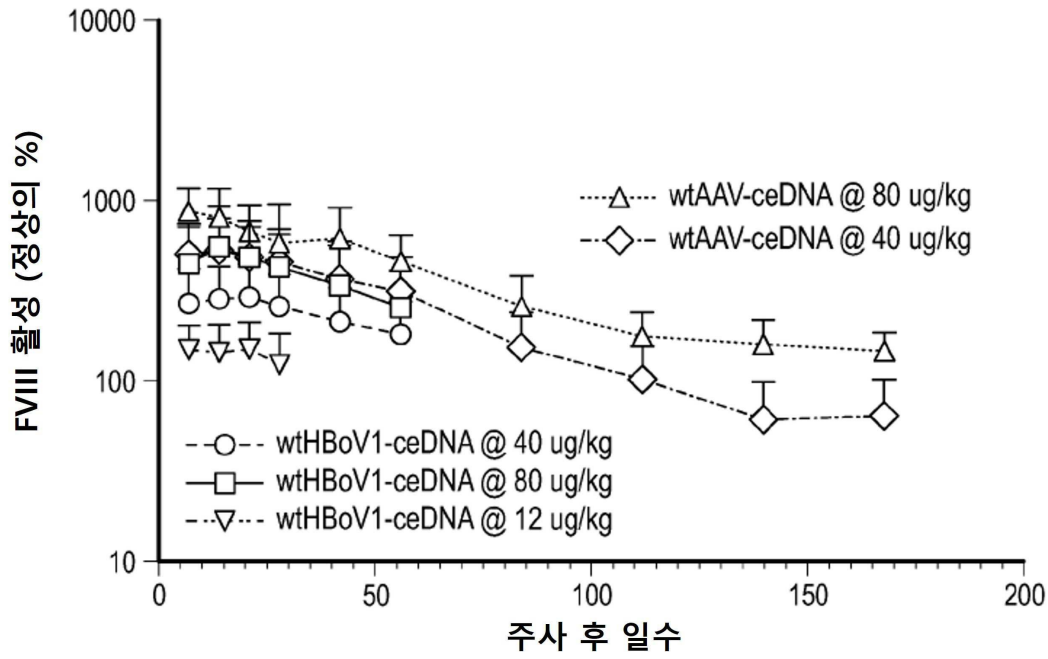
도면4



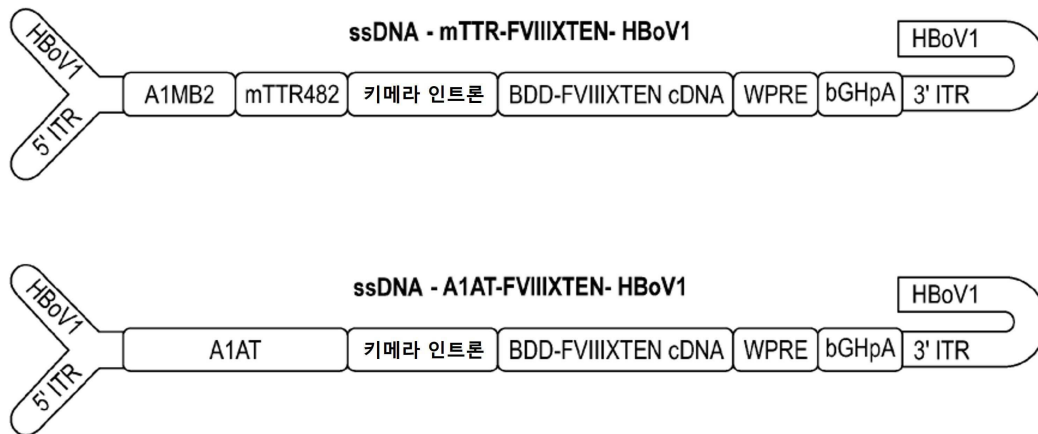
도면5a



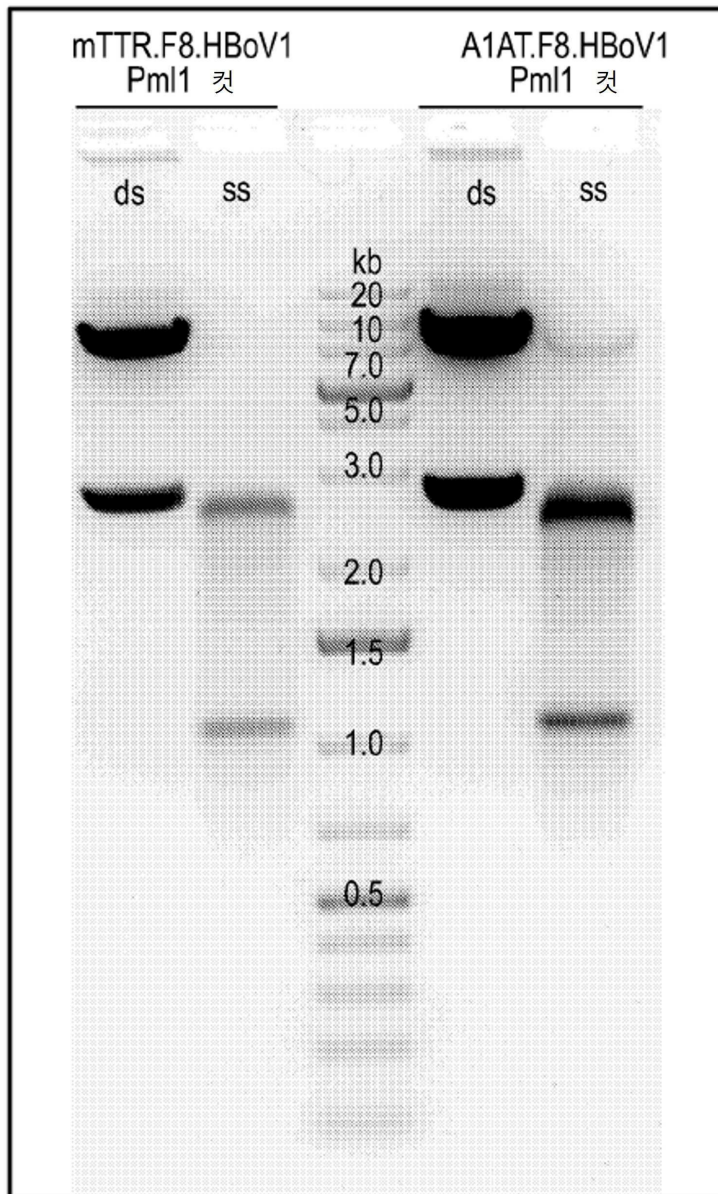
도면5b



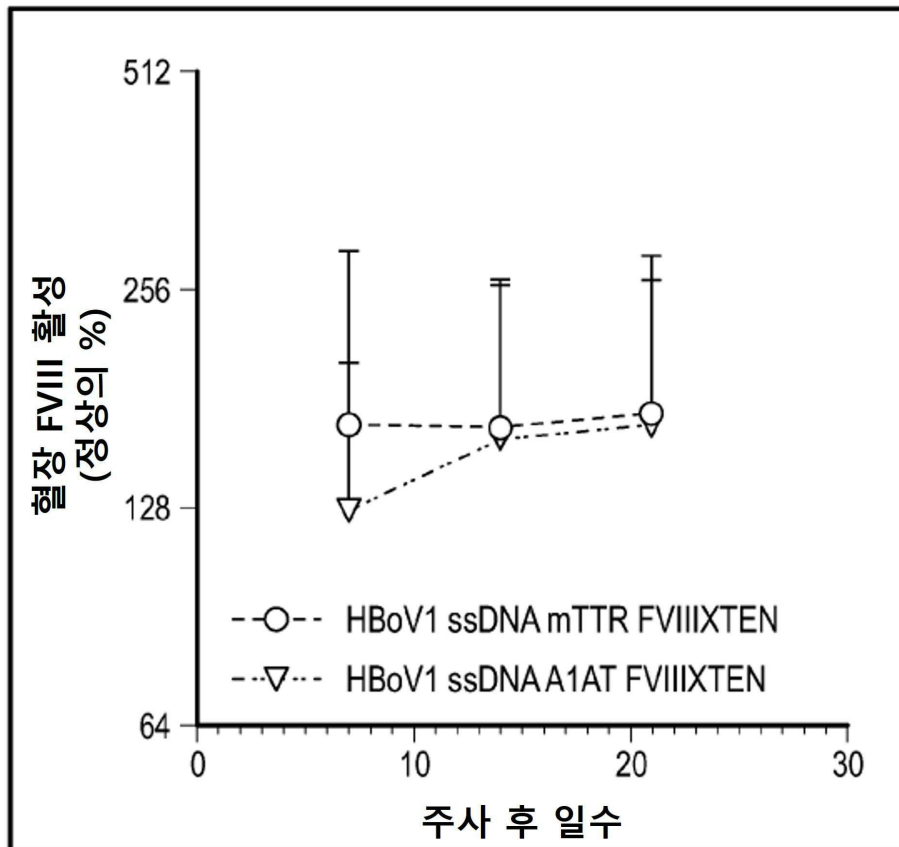
도면6a



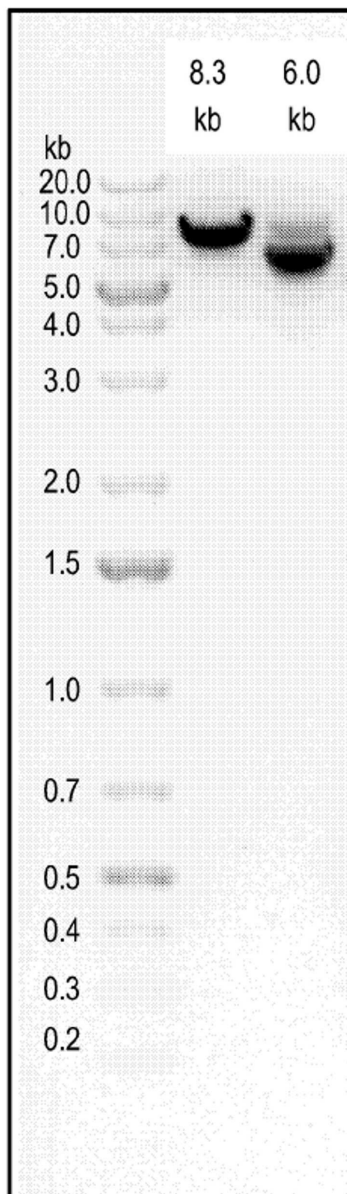
도면6b



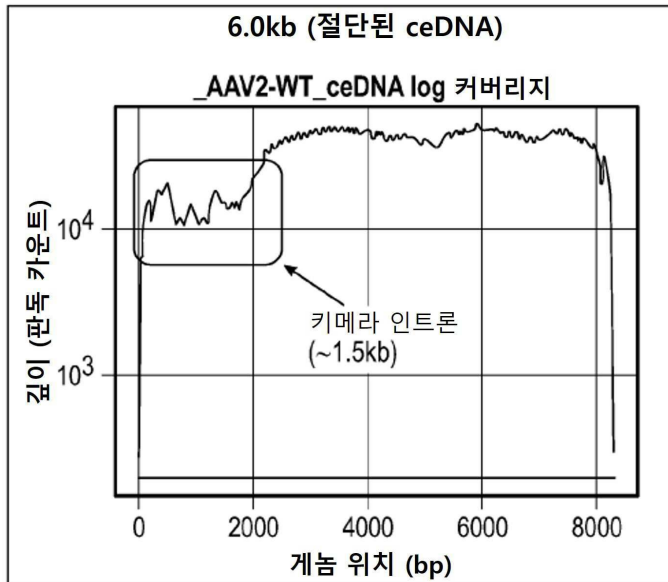
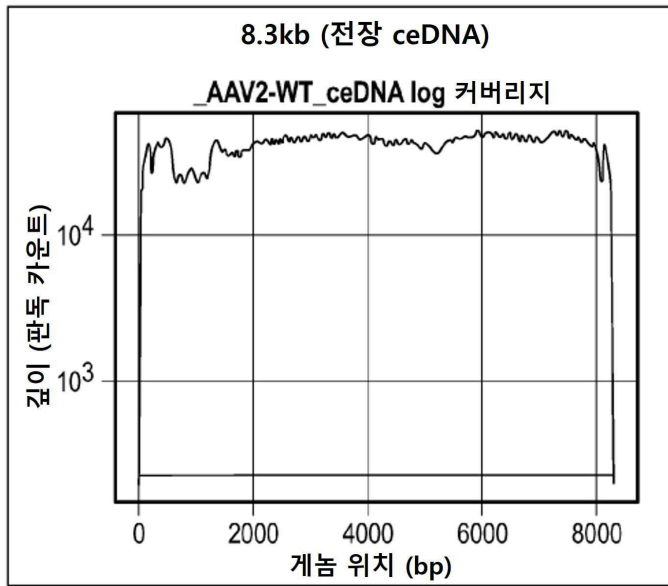
도면6c



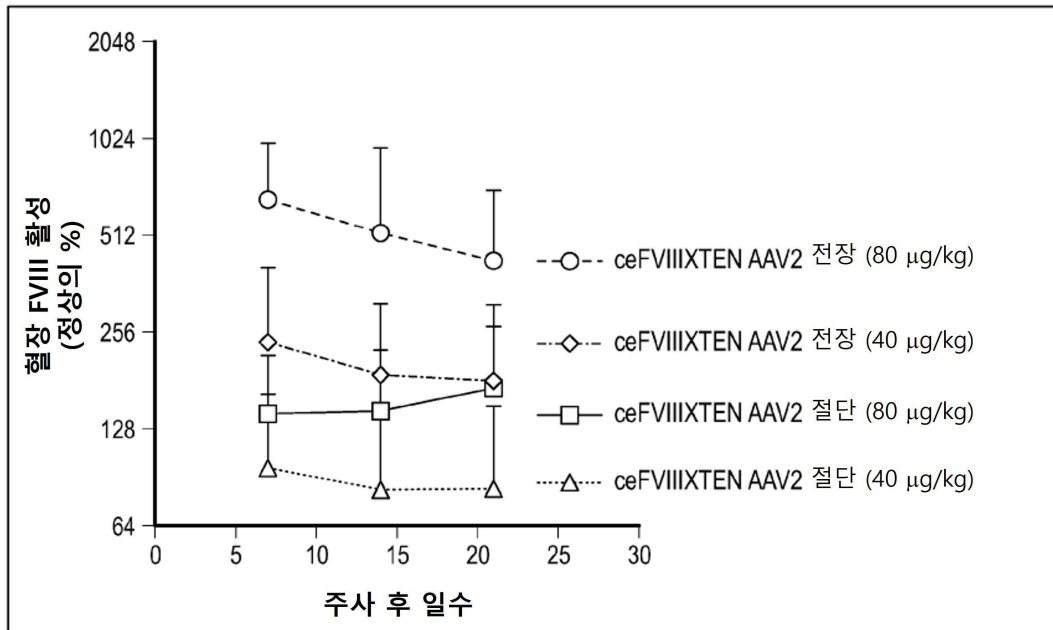
도면7a



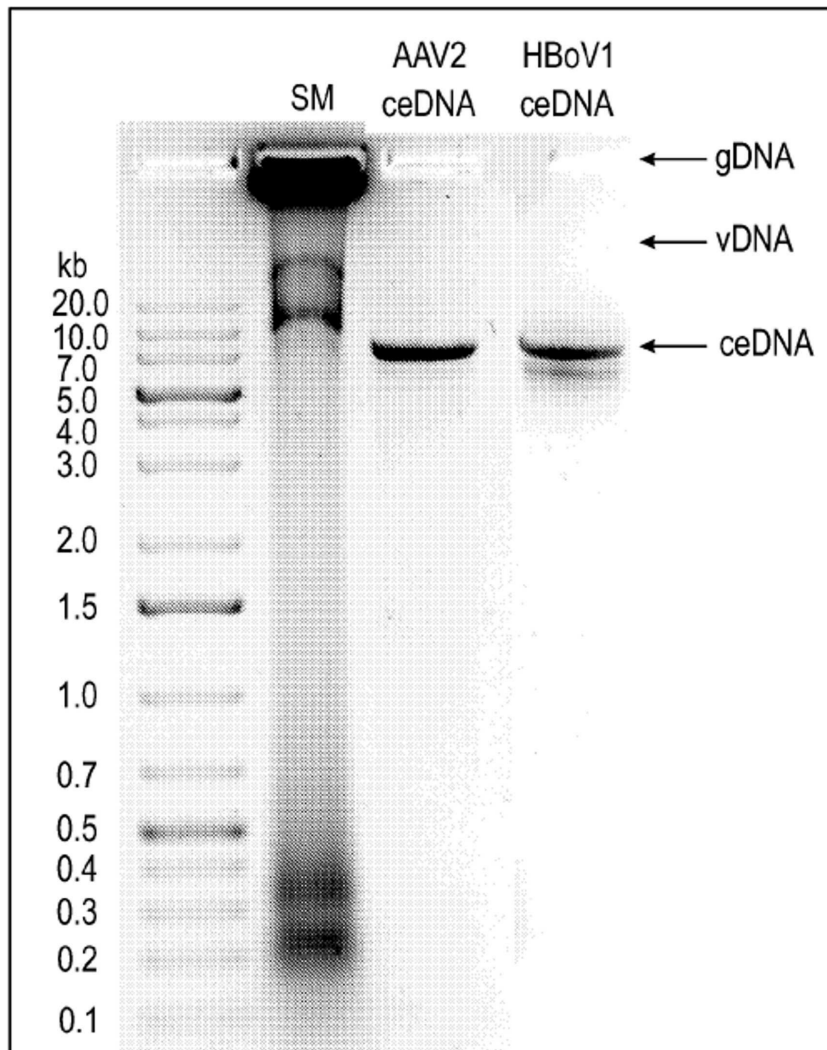
도면 7b



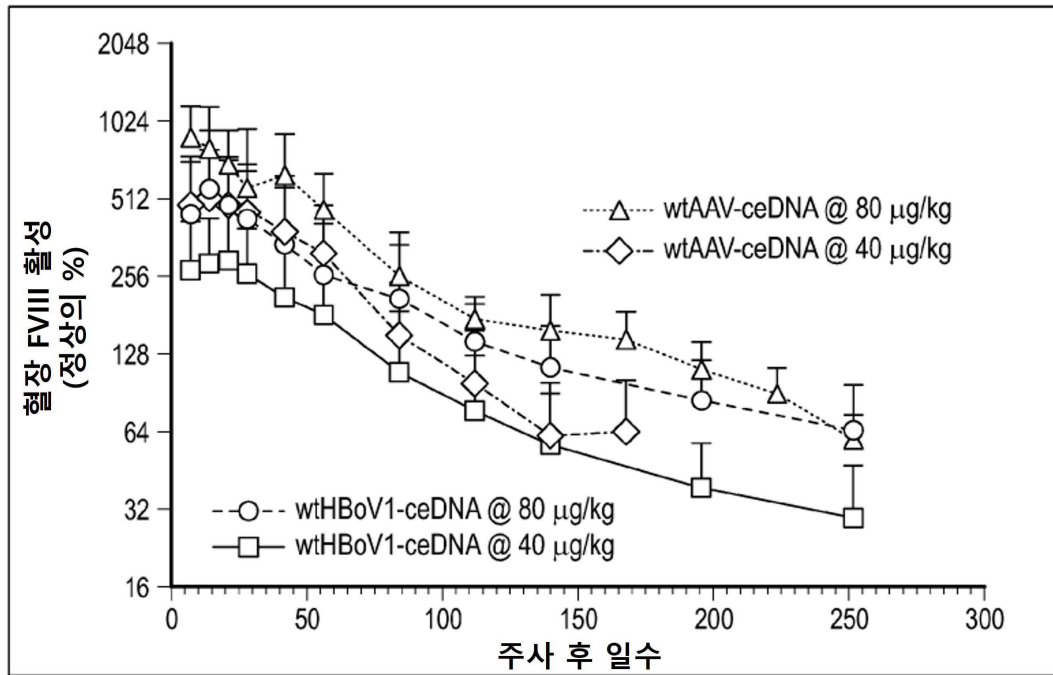
도면7c



도면8a



도면8b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.