202342751

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202342751 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：112114536 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 04 月 19 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/12 (2006.01)* *C12N15/63 (2006.01)*
C12N15/64 (2006.01) *C07K14/745 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P7/00 (2006.01)*

(30)優先權：2022/04/28 俄羅斯聯邦 RU2022111695

(71)申請人：俄羅斯聯邦商拜奧卡德聯合股份公司 (俄羅斯聯邦) JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" (RU)
俄羅斯聯邦

(72)發明人：佩瑞佩 瑪利亞 PEREPELKINA, MARIYA PAVLOVNA (RU)；弗拉索 艾琳娜 VLASOVA, ELENA VENIAMINOVNA (RU)；佛米那 安娜西亞 FOMINA, ANASTASIIA VLADIMIROVNA (RU)；葛后菲 保羅 GERSHOVICH, PAVEL MIKHAILOVICH (RU)；馬科瓦 維塔利亞 MARKOVA, VITALIIA ALEKSANDROVNA (RU)；摩羅佐 狄密崔 MOROZOV, DMITRY VALENTINOVICH (RU)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 70 頁

(54)名稱

編碼基於ＦＶＩＩＩ－ＢＤＤ和異源信號肽的融合蛋白的分離的核酸及其用途

(57)摘要

本申請涉及遺傳學、基因療法和分子生物學的領域。更具體地，本發明涉及編碼基於 FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子 VIII)和異源信號肽的融合蛋白的核酸，涉及基於此的表達盒和載體，涉及用於生產基於 FVIII-BDD 和異源信號肽的融合蛋白的宿主細胞，以及進一步涉及上述載體的各種用途。

The present application relates to the fields of genetics, gene therapy, and molecular biology. More specifically, the present invention relates to a nucleic acid that encodes a fusion protein based on FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII)) and on a heterologous signal peptide, to an expression cassette and a vector based thereon, to a host cell for producing the fusion protein based on FVIII-BDD and on a heterologous signal peptide, and further to various uses of the above vector.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

編碼基於ＦＶＩＩＩ－ＢＤＤ和異源信號肽的融合蛋白的分離的核酸及其用途

【英文發明名稱】

ISOLATED NUCLEIC ACID THAT ENCODES FUSION PROTEIN BASED ON FVIII-BDD AND ON HETEROLOGOUS SIGNAL PEPTIDE, AND USE THEREOF

【中文】

本申請涉及遺傳學、基因療法和分子生物學的領域。更具體地，本發明涉及編碼基於FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子VIII)和異源信號肽的融合蛋白的核酸，涉及基於此的表達盒和載體，涉及用於生產基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的宿主細胞，以及進一步涉及上述載體的各種用途。

【英文】

The present application relates to the fields of genetics, gene therapy, and molecular biology. More specifically, the present invention relates to a nucleic acid that encodes a fusion protein based on FVIII-BDD (B-domain deleted coagulation factor VIII)) and on a heterologous signal peptide, to an expression cassette and a vector based thereon, to a host cell for producing the fusion protein based on FVIII-BDD and on a heterologous signal peptide, and further to various uses of the above vector.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

編碼基於ＦＶＩＩＩ－ＢＤＤ和異源信號肽的融合蛋白的分離的核酸及其用途

【英文發明名稱】

ISOLATED NUCLEIC ACID THAT ENCODES FUSION PROTEIN BASED ON FVIII-BDD AND ON HETEROLOGOUS SIGNAL PEPTIDE, AND USE THEREOF

【技術領域】

本申請涉及遺傳學、基因療法和分子生物學的領域。更具體地，本發明涉及編碼基於FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子VIII)和異源信號肽的融合蛋白的核酸，涉及基於此的表達盒和載體，涉及用於生產基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的宿主細胞，並且進一步涉及上述載體的各種用途。

【先前技術】

血友病是一種隱性的、X-連鎖的遺傳障礙，其造成參與繼發性止血的蛋白之一的缺乏。血友病A (或經典血友病)是最常見的血友病變體；每5000名新生男性中就有1人患此病(2019年全球年度調查報告，WFH https://www.wfh.org/en/our-work-research-data/annual-

global-survey)，並且它由凝血因子VIII蛋白的缺乏造成。根據俄羅斯血友病協會(Russian Haemophilia Society)，在俄羅斯有超過6500名血友病A患者(2019年全球年度調查報告，WFH)。

凝血因子VIII (FVIII)是一種主要從竇狀隙肝上皮細胞分泌到血液中的280 kDa蛋白(Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII/ Blood. 2014年6月12日;123(24):3706-13. doi: 10.1182/blood-2014-02-555151. 2014年4月4日電子公開. PMID: 24705491和Everett LA, Cleuren AC, Khoriaty RN, Ginsburg D. Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells/ Blood. 2014年6月12日;123(24):3697-705. doi: 10.1182/blood-2014-02-554501. 2014年4月9日電子公開. PMID: 24719406)。活化的FVIII作為異源二聚體在生物體中循環，所述異源二聚體由通過非共價金屬依賴性相互作用彼此結合的重鏈(A1、A2、B結構域)和輕鏈(A3、C1、C3結構域)組成。作為FVIII加工的結果，只有A1-A3、C1、C2結構域存在於該蛋白的活化形式中。這一事實促進了B-結構域缺失的重組FVIII (FVIII-BDD)的產生，其活性不劣於全長FVIII (Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. Biochemical, immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted factor VIII/

Blood. 1993年6月1日;81(11):2925-35. PMID: 8499631)。不同於主要屬蛋白酶的凝血級聯的其它蛋白，FVIII是一種糖蛋白。但是，它在活化的凝血因子X (FXa)的產生所必需的tenase複合物的形成中起重要作用，FXa是最後的共同凝血途徑的第一個成員，該途徑最終導致交聯纖維蛋白形成。

FVIII基因的內含子1或內含子22的倒位造成超過一半病例的重度血友病A (Habart D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions/ J Thromb Haemost. 2003年4月;1(4):773-81. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00149.x. PMID: 1287141)。在其它情況下，FVIII序列中的異常與各種突變有關，所述突變包括反義突變、讀框移位、剪接位點突變、缺失和插入。

在血友病A中的出血傾向與定義的FVIII活性相關，並且被分類為輕度(0.05-0.40 IU/mL)、中度(0.01-0.05 IU/ml)或重度(<0.01 IU/ml)。輕度血友病患者通常經歷僅與醫學干預或損傷有關的異常出血。相反，中度血友病患者對相對較輕的損傷表現出延長的出血反應，而重度疾病患者經常具有自發性出血。重度血友病A表現出自發性關節積血、軟組織血腫、腹膜後出血、腦內出血和延遲術後出血。隨著時間的推移，由復發性關節積血和軟組織血腫引起的併發症可以導致嚴重的關節病、關節攣縮和假腫瘤，

從而導致慢性疾病。具有血友病A的輕度、中度和重度變體的患者的比例尚不明確，但最近的流行病學研究報告稱，約60%的血友病A患者具有重度變體(2019年全球年度調查報告，WFH)。

迄今為止，重組FVIII注射劑形式的終身替代療法是血友病A患者的護理標準(2019年全球年度調查報告，WFH)。儘管在治療血友病方面取得了成功，但這種方案仍具有嚴重問題。血友病A的預防性替代療法包括在患有該疾病的重度變體的患者的一生中每3天一次靜脈內注射重組FVIII。這種治療方案是非常昂貴的，並且不能保證沒有主要與關節積血相關的併發症。在某些情況下，患者產生抑制性抗體。血友病A的抑制性變體更常見於重度疾病的患者中，並且需要使用替代方案來治療和預防該疾病(Eckhardt CL, van der Bom JG, van der Naald M, Peters M, Kamphuisen PW, Fijnvandraat K. Surgery and inhibitor development in haemophilia A: a systematic review/ J Thromb Haemost. 2011年10月; 9(10):1948-58. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04467.x. PMID: 21838755)。

借助於編碼FVIII基因的基於腺伴隨病毒(AAV)的病毒(表達)載體的血友病A的基因療法已經在一系列臨床前和臨床研究中顯示出優秀結果(Bunting S, Zhang L, Xie L, Bullens S, Mahimkar R, Fong S, Sandza K, Harmon D, Yates B, Handyside B, Sihn CR, Galicia N, Tsuruda L, O'Neill CA, Bagri A, Colosi P, Long S, Vehar G, Carter B. Gene Therapy

with BMN 270 Results in Therapeutic Levels of FVIII in Mice and Primates and Normalization of Bleeding in Hemophilic Mice/ Mol Ther. 2018年2月7日;26(2):496-509. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.12.009. 2017年12月14日電子公開.PMID: 29292164和Peyvandi F, Garagiola I. Clinical advances in gene therapy updates on clinical trials of gene therapy in haemophilia/ Haemophilia. 2019年9月;25(5):738-746. doi: 10.1111/hae.13816. 2019年7月8日電子公開.PMID: 31282050)。與治療血友病的傳統方案不同，使用AAV的基因療法允許在給患者單次施用治療劑後數年內將外源性FVIII的表達水平維持在足夠的水平(Long BR, Veron P, Kuranda K, Hardet R, Mitchell N, Hayes GM, Wong WY, Lau K, Li M, Hock MB, Zoog SJ, Vettermann C, Mingozzi F, Schweighardt B. Early Phase Clinical Immunogenicity of Valoctocogene Roxaparvovec, an AAV5-Mediated Gene Therapy for Haemophilia A/ Mol Ther. 2021年2月3日;29(2):597-610. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.12.008. 2020年12月10日電子公開. PMID: 33309883)。

迄今為止，在世界上還沒有註冊用於治療血友病A的基因治療產品。

因此，需要開發用於治療血友病A的基因治療產品，以及將提高用於治療血友病A的基因治療產品的效力的解決方案。

【發明內容】

本發明的作者出人意料地發現，與使用編碼具有天然存在的FVIII信號肽(野生型)的FVIII-BDD蛋白的核酸相比，使用編碼以下融合蛋白的核酸造成增加的FVIII-BDD蛋白生產和活性水平：

1)具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽(SP-FIX)的融合蛋白，或

2)具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和免疫球蛋白Gκ鏈信號肽(SP-IgGK)的融合蛋白，或

3)具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽(SP-乳清蛋白)的融合蛋白。

定義和一般方法

除非在本文中另外定義，否則結合本發明使用的所有技術和科學術語將具有本領域技術人員通常理解的相同含義。

此外，除非上下文另外要求，否則單數術語應包括複數術語，並且複數術語應包括單數術語。通常，本文描述的細胞培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、分析化學、有機合成化學、醫學和藥物化學以及蛋白和核酸的雜交和化學的當前分類和方法是本領域技術人員眾所周知的並且在本領域中被廣泛使用。如本領域常見的，或如本文描述的，根據生產商的指南進行酶反應和純化方法。

術語“天然存在的”、“天然的”或“野生型”用於描述可在自然界中發現的與人工生產的物體不同的物體。例如，存在於生物體(包括病毒)中的蛋白或核苷酸序列是天然存在的，所述序列可以從自然界中的來源分離出來並且沒有在實驗室中被人故意修飾。

如在本說明書和隨後的申請專利範圍中所使用的，除非上下文另有規定，否則詞語“包括(include)”和“包含(comprise)”或其變體，諸如“包括”(includes)、“包括”(including)、“包含(comprises)”或“包含(comprising)”應理解為暗示包括所述的整數或整數集合，但是不排除任何其它整數或整數集合。

蛋白(肽)

如在本說明書中使用的，術語“肽”、“多肽”和“蛋白”可互換使用，並且它們表示由通過肽鍵共價連接的氨基酸殘基組成的化合物。多肽包括天然肽、重組肽、合成肽或其組合。

核酸分子

在本說明書中可互換使用的術語“核酸”、“核酸序列(nucleic sequence)”、“核酸序列(nucleic acid sequence)”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”是指精確的核苷酸序列(無論是否修飾)，其決定核酸的片段或區域(無論是否含有非天然核苷酸)，並且是雙鏈

DNA或RNA、單鏈DNA或RNA、或所述DNA的轉錄產物。

如在本說明書中使用的，作為非限制性例子，多核苷酸包括通過本領域可用的任何方式獲得的所有核酸序列，作為非限制性例子，所述方式包括重組方式，即使用普通克隆技術和PCR等從重組文庫或細胞基因組克隆核酸序列，以及通過合成方式。

這裡還應包括，本發明不涉及在其天然染色體環境中(即在天然狀態下)的核苷酸序列。本發明的序列已經被分離和/或純化，即它們被直接或間接採樣，例如通過複製，它們的環境已經被至少部分地改變。因此，本文還應提及通過重組遺傳學(例如借助於宿主細胞)或通過化學合成而獲得的分離的核酸。

除非另外指出，否則術語核苷酸序列涵蓋其互補物。因此，具有特定序列的核酸應被理解為涵蓋具有其互補序列的其互補鏈的核酸。

載體

本文中使用的術語“載體”是指能夠運輸已經與其連接的另一種核酸的核酸分子。此外，術語“載體”在本文中表示能夠運輸核酸的重組病毒顆粒。

在本說明書中使用的術語“表達”被定義為由其啟動子驅動的特定核苷酸序列的轉錄和/或翻譯。

用途

“基因療法”是將基因插入受試者的細胞和/或組織中，以治療疾病，通常是遺傳性疾病，其中有缺陷的突變體等位基因被功能性等位基因替換。

“治療(Treat)”、“治療(treatment)”和“療法(therapy)”表示減輕或消除生物障礙和/或至少一種其附隨症狀的方法。

術語“受試者”、“患者”、“個體”等在本說明書中可互換使用，並且它們表示適用於在本說明書中描述的方法的任何動物。在某些非限制性的實施方案中，所述受試者、患者或個體是人。所述受試者可以是任何年齡的雄性或雌性。

“治療有效量”或“有效量”表示正在施用的治療劑的量，該量將在某種程度上緩解正在治療的疾病的一種或多種症狀。

【圖式簡單說明】

[**圖 1**]的圖顯示了與編碼具有野生型FVIII信號肽的FVIII-BDD的核酸相比，在用編碼基於FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子VIII)和異源信號肽之一的融合蛋白的核酸轉染以後，在培養液中增加的FVIII-BDD蛋白生產水平。

1是用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和天然存在的FVIII信號肽的融合蛋白(SP-FVIII-

FVIII-BDD)。

2是用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽的融合蛋白(SP-FIX-FVIII-BDD)。

3是用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽的融合蛋白(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)。

4是用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和免疫球蛋白G κ鏈信號肽的融合蛋白(SP-IgGK-FVIII-BDD)。

[**圖 2**]的圖顯示了與編碼具有野生型FVIII信號肽的FVIII-BDD的核酸相比，在用編碼基於FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子VIII)和異源信號肽之一的融合蛋白的核酸轉染以後在培養液中增加的FVIII-BDD蛋白活性水平。

1是在用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和天然存在的FVIII信號肽的融合蛋白(SP-FVIII-FVIII-BDD)。

2是在用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽的融合蛋白(SP-FIX-FVIII-BDD)。

3是在用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所

述核酸編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽的融合蛋白(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)。

4是在用核酸轉染細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所述核酸編碼具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和免疫球蛋白G κ鏈信號肽的融合蛋白(SP-IgGK-FVIII-BDD)。

[**圖 3**]的圖顯示了與包含編碼具有野生型FVIII信號肽的FVIII-BDD的核酸的rAAV表達載體相比，當以包含編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白的核酸的rAAV表達載體的形式在體外遞送核酸時增加的FVIII-BDD蛋白生產水平。

1是在用表達載體轉導細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和天然存在的FVIII信號肽的融合蛋白(SP-FVIII-FVIII-BDD)的核酸。

2是在用表達載體轉導細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽的融合蛋白(SP-FIX-FVIII-BDD)的核酸。

3是在用表達載體轉導細胞以後的FVIII-BDD蛋白水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽的融合蛋白(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)的核酸。

[**圖 4**]的圖顯示了與包含編碼具有野生型FVIII信號肽的FVIII-BDD的核酸的rAAV表達載體相比，當以包含編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白的核酸的rAAV表達載體的形式在體外遞送核酸時增加的FVIII-BDD蛋白活性水平。

1是在用表達載體轉導細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和天然存在的FVIII信號肽的融合蛋白(SP-FVIII-FVIII-BDD)的核酸。

2是在用表達載體轉導細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽的融合蛋白(SP-FIX-FVIII-BDD)的核酸。

3是在用表達載體轉導細胞以後的FVIII-BDD活性水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽的融合蛋白(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)的核酸。

[**圖 5**]的圖顯示了當以rAAV表達載體的形式將編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白的核酸在體內遞送給B6.129S-F8tm1Smoc (HemA)小鼠時增加的FVIII-BDD蛋白水平。

1是注射不含AAV的對照溶液以後在動物血漿中的FVIII-BDD蛋白水平(陰性對照)。

2是在注射表達載體以後在動物血漿中的FVIII-BDD蛋

白水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽的融合蛋白(SP-FIX-FVIII-BDD)的核酸。

3是在注射表達載體以後在動物血漿中的FVIII-BDD蛋白水平，所述表達載體包含編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於人FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽的融合蛋白(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)的核酸。

【實施方式】

核酸

在一個方面，本發明涉及一種分離的核酸，其編碼包括選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子VIII)和異源信號肽的融合蛋白。

“分離的”核酸分子是從至少一種核酸分子-雜質中鑒定和分離出的核酸分子。分離的核酸分子不同於在自然條件下發現的形式或集合。因此，分離的核酸分子不同於存在於在自然條件下的細胞中的核酸分子。

信號肽提供在細胞內的目標蛋白向靶細胞器的運輸，或促進目標蛋白向細胞間隙中的分泌。

在某些實施方案中，所述分離的核酸編碼融合蛋白，其基於具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的FVIII-BDD和具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的FIX信號肽。

在某些實施方案中，所述分離的核酸編碼融合蛋白，

其基於具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的FVIII-BDD和具有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的免疫球蛋白Gκ鏈信號肽。

在某些實施方案中，所述分離的核酸編碼融合蛋白，其基於具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的FVIII-BDD和具有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的乳清蛋白信號肽。

在某些實施方案中，所述分離的核酸編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白。具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的給定融合蛋白包括具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的FVIII-BDD和具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的FIX信號肽。

在某些實施方案中，所述分離的核酸編碼具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白。具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的給定融合蛋白包括具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的FVIII-BDD和具有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的免疫球蛋白Gκ鏈信號肽。

在某些實施方案中，所述分離的核酸編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白。具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的給定融合蛋白包括具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的FVIII-BDD和具有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的乳清蛋白信號肽。

在某些實施方案中，所述分離的核酸是SEQ ID NO: 11的核苷酸序列。所述給定的核酸編碼具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和FIX信號肽的融合蛋白。

在某些實施方案中，所述分離的核酸是SEQ ID NO: 12的核苷酸序列。所述給定的核酸編碼具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和免疫球蛋白G κ鏈信號肽的融合蛋白。

在某些實施方案中，所述分離的核酸是SEQ ID NO: 13的核苷酸序列。所述給定的核酸編碼具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和乳清蛋白信號肽的融合蛋白。

表達盒、表達載體

在一個方面，本發明涉及一種表達盒，其包括編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的上述核酸。

本文中使用的術語“表達……的盒”或“表達盒”特別表示能夠在適當的條件下觸發編碼目標多肽的多核苷酸的表達的DNA片段，所述多核苷酸的序列被包括在所述表達盒中。當引入宿主細胞中時，表達盒尤其能夠銜接細胞機制以將編碼目標多肽的多核苷酸轉錄成RNA，所述RNA然後通常進一步加工並最終翻譯成目標多肽。表達盒可以被包含在表達載體中。

本發明的表達盒包含啟動子作為元件。本文中使用的術語“啟動子”特別表示促進啟動子可操作地連接的多核苷酸的轉錄的DNA元件。啟動子可以進一步形成啟動子/增強子元件的一部分。儘管“啟動子”和“增強子”元件之間的物理邊界並不總是明確的，但術語“啟動子”通常表示在核

酸分子上被RNA聚合酶和/或任何相關因子結合並且在該處開始轉錄的位點。增強子在時間上以及在空間上增強啟動子活性。本領域已知許多啟動子在廣泛的細胞類型中具有轉錄活性。啟動子可以分為兩類，即組成性地起作用的啟動子和通過誘導或去抑制來調節的啟動子。這兩類都適合用於蛋白表達。用於在真核細胞中、特別是在哺乳動物細胞中高水平生產多肽的啟動子應當是強的並且優選地在廣泛的細胞類型中具有活性。能夠在許多細胞類型中驅動表達的強組成型啟動子是本領域眾所周知的，並且因此，本文沒有必要詳細描述它們。

根據本發明的一個實施方案，將HLP啟動子用在本發明的表達盒中。

在某些實施方案中，所述表達盒在5'端到3'端方向包括以下元件：

左側(第一個)ITR(反向末端重複序列)；

啟動子；

編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的上述核酸中的任一種；

聚腺苷酸化信號；

右側(第二個)ITR。

表達盒的上述結構元件彼此可操作地連接。

本文中使用的術語"可操作地連接的"表示發生功能關聯的多核苷酸(或多肽)元件的連接。當一個核酸存在與另一個核酸序列的功能關聯條件時，所述核酸是"可操作地

連接的”。例如，如果轉錄調節序列影響編碼序列的轉錄，則其可操作地連接至所述編碼序列。術語“可操作地連接的”是指，被連接的DNA序列通常是連續的，並且在需要連接兩個蛋白編碼區的情況下，也是連續的並存在於讀碼框中。

在某些實施方案中，所述表達盒包括具有SEQ ID NO: 14的核苷酸序列的左側(第一個)ITR。

在某些實施方案中，所述表達盒包括具有SEQ ID NO: 15的核苷酸序列的HLP啟動子。

在某些實施方案中，所述表達盒包括具有SEQ ID NO: 16的核苷酸序列的聚腺苷酸化信號。

在某些實施方案中，所述表達盒包括具有SEQ ID NO: 17的核苷酸序列的右側(第二個)ITR。

在某些實施方案中，所述表達盒在5’端到3’端方向包括以下元件：

具有SEQ ID NO: 14的核苷酸序列的左側(第一個)ITR(反向末端重複序列)；

具有SEQ ID NO: 15的核苷酸序列的啟動子；

編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的上述核酸中的任一種；

具有SEQ ID NO: 16的核苷酸序列的聚腺苷酸化信號；

具有SEQ ID NO: 17的核苷酸序列的右側(第二個)ITR。

在一個方面，本發明涉及一種表達載體，其包括編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的上述核酸中的任一種或上述表達盒中的任一種。

在本發明的某些實施方案中，所述載體是質粒，即可以在其中插入額外DNA區段的環狀雙鏈DNA段。

在本發明的某些實施方案中，所述載體是病毒(表達)載體，其中可以將額外DNA區段插入病毒基因組中。

在本發明的某些實施方案中，載體能夠在其被引入的宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌複製起點的細菌載體和附加型載體)。在本發明的進一步實施方案中，載體(例如非附加型載體)可以在引入宿主細胞後整合到宿主細胞的基因組中，並從而與宿主基因一起複製。此外，某些載體能夠指導與其可操作地連接的基因的表達。這樣的載體在本文中被稱作“重組表達載體”(或簡單地稱作“表達載體”)。

表達載體包括質粒、逆轉錄病毒、腺病毒、腺伴隨病毒(AAV)、植物病毒，諸如花椰菜花葉病毒、煙草花葉病毒、黏粒、YAC、EBV等。可以將DNA分子插入載體中，使得載體內的轉錄和翻譯控制序列發揮其調節DNA的轉錄和翻譯的預期功能。可以選擇與所使用的表達宿主細胞相容的表達載體和表達控制序列。通過標準方法(例如互補限制位點的連接，或者如果不存在限制位點則進行平頭末端連接)可以將DNA分子引入表達載體中。

在某些實施方案中，所述表達載體是重組腺伴隨病毒

(AAV)。

在某些實施方案中，所述AAV選自包括下述AAV血清型的集合：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、rAAV.rh8、rAAV.rh1O、rAAV.rh20、rAAV.rh39、rAAV.Rh74、rAAV.RHM4-1、AAV.hu37、rAAV.Anc80、rAAV.Anc80L65、rAAV.7m8、rAAV.PHP.B、rAAV2.5、rAAV2tYF、rAAV3B、rAAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15或AAV.HSC16。

在本發明的某些實施方案中，所述載體或盒可以包括表達控制序列。在本說明書中使用的術語“表達控制序列”表示引起其插入的編碼序列的表達和加工所必需的多核苷酸序列。本領域技術人員將理解，表達載體或盒的設計(包括表達控制序列的選擇)可能取決於諸如要轉化的宿主細胞的類型的選擇、所需的蛋白表達水平等因素。表達控制序列包括合適的轉錄起始、終止、啟動子和增強子序列；有效的RNA加工信號諸如剪接和聚腺苷酸化信號；穩定細胞質mRNA的序列；提高翻譯效率的序列(即，Kozak共有序列)；增強蛋白穩定性的序列；以及當需要時，增強蛋白分泌的序列。這樣的控制序列的性質隨宿主生物而

變化；在原核生物中，這樣的控制序列通常包括啟動子、核糖體結合位點和轉錄終止序列；在真核生物中，這樣的控制序列通常包括啟動子和轉錄終止序列。在哺乳動物中的表達宿主細胞的優選表達控制序列包括確保在哺乳動物細胞中的高蛋白表達水平的病毒元件，諸如從逆轉錄病毒LTR、巨細胞病毒(CMV) (諸如CMV啟動子/增強子)、猿猴病毒40 (SV40) (諸如SV40啟動子/增強子)、腺病毒(例如主要晚期啟動子腺病毒(AdMLP))、多瘤病毒衍生出的啟動子和/或增強子，和強哺乳動物啟動子諸如TTR啟動子、天然免疫球蛋白啟動子、肌動蛋白啟動子和HLP (雜合的肝特異性啟動子)。表達控制序列至少涵蓋其存在對於表達和加工而言重要的所有組分。

除了上述基因和表達控制序列之外，本發明的重組表達載體還可以攜帶額外的序列，諸如調節載體在宿主細胞中的複製的序列(例如複製起點)和可選擇標誌物基因。可選擇標誌物基因有助於在其中已經引入載體或盒的宿主細胞的選擇。

在本發明的一個實施方案中，所述表達載體涉及包含側接細小病毒序列或反向末端重複(ITR)序列的一個或多個目標多核苷酸序列、目標基因或轉基因的載體。

本發明的盒和載體都不包含編碼腺伴隨病毒的非結構蛋白(Rep)和結構蛋白(Cap)的基因的核苷酸序列。

宿主細胞

在一個方面，本發明涉及一種宿主細胞，其用於生產基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白，或用於生產上述表達載體中的任一種，所述宿主細胞包含編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的上述核酸中的任一種。

本文中使用的術語“宿主細胞”表示已將根據本發明的重組表達載體或盒引入其中的細胞。本發明涉及宿主細胞，其可以包括例如根據本發明的上述載體。應當理解，“宿主細胞”不僅指特定的受試細胞，而且還指這樣的細胞的後代。因為修飾可能由於突變或環境影響而發生在後代中，因此這樣的後代可能實際上與親本細胞不相同；但是，這樣的細胞仍然被包括在本文所使用的術語“宿主細胞”的範圍內。

根據本發明的表達載體或盒可以用於哺乳動物細胞、植物細胞、細菌或酵母宿主細胞的轉染。通過將多核苷酸引入宿主細胞中的任何已知技術，可以完成轉染。用於將異源多核苷酸引入哺乳動物細胞中的方法是本領域眾所周知的，並且包括葡聚糖介導的轉染、陽離子聚合物-核酸複合物轉染、磷酸鈣沉澱、聚凝胺介導的轉染、原生質體融合、將多核苷酸包封在脂質體中以及將DNA直接顯微注射到細胞核中。此外，可以通過病毒(表達)載體將核酸分子引入哺乳動物細胞中。

用作轉化用的宿主的哺乳動物細胞系是本領域眾所周知的，並且包括多個可用的永生化細胞系。這些包括例如

中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、FreeStyle 293細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、非洲綠猴腎細胞(COS)、人肝細胞癌細胞(例如，Hep G2)、A549細胞、SK-HEP1、HUH7、Hep-RG和許多其它細胞系。通過確定哪些細胞系具有高表達水平並提供所生產的蛋白的必要特徵來選擇細胞系。可以使用的其它細胞系是昆蟲細胞系，諸如Sf9或Sf21細胞。當將本發明的重組表達載體引入哺乳動物宿主細胞中時，通過將宿主細胞培養足以在宿主細胞中表達融合蛋白的時間段來生產融合蛋白，或者更優選地，將融合蛋白分泌到在其中培養宿主細胞的培養基中。使用標準的蛋白純化技術，可以從培養基中分離融合蛋白。植物宿主細胞包括例如煙草(Nicotiana)、擬南芥(Arabidopsis)、浮萍、玉米、小麥、馬鈴薯等。細菌宿主細胞包括埃希氏菌屬(Escherichia)和鏈黴菌屬(Streptomyces)物種。酵母宿主細胞包括粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和巴斯德畢赤酵母(Pichia pastoris)。

上述宿主細胞不表示使用人胚胎生產的宿主細胞。

上述宿主細胞不表示通過修飾人種系細胞的遺傳完整性而生產的宿主細胞。

藥物組合物

在一個方面，本發明涉及用於將FVIII-BDD基因遞送

給靶細胞的藥物組合物，其包括上述表達載體或盒中的任何一種。

在某些實施方案中，用於將FVIII-BDD基因遞送給靶細胞的藥物組合物包括與一種或多種藥學上可接受的賦形劑組合的上述表達載體或盒中的任何一種。

上述組合物中的活性物質以有效量存在，例如以生物有效量存在。

“藥物組合物”是指這樣的組合物：其包含根據本發明的上述表達載體中的任一種和至少一種選自由藥學上可接受的和藥理學上相容的賦形劑、填充劑、溶劑、稀釋劑、載劑、助劑、分配劑或遞送劑組成的集合的組分。

本發明的藥物組合物及其製備方法對本領域技術人員來說無疑是顯而易見的。所述藥物組合物應優選按照GMP(良好生產規範)要求來製備。

在藥物組合物的某些實施方案中，它可以包括緩衝組合物、張度劑(滲透調節劑或滲透劑)、穩定劑和/或增溶劑。

“藥學上可接受的”是指不具有生物學或其它負面副作用的材料，例如，該材料可以施用給受試者而不造成任何不希望的生物學作用。因此，這樣的藥物組合物可以用於例如細胞的離體轉染或本發明的上述表達載體中的任一種直接向受試者的體內施用。

術語“賦形劑”在本文中用於描述除了本發明的以上成分以外的任何成分。這些是無機或有機性質的物質，其用

於藥物生產/製備中以便賦予藥物產品必要的物理化學性能。

根據本發明的藥物組合物是一種穩定的組合物。

如果活性劑在指定的貯存期限中在例如2-8℃的貯存溫度保持其物理穩定性和/或化學穩定性和/或生物活性，那麼藥物組合物是“穩定的”。優選地，活性劑保持物理和化學穩定性、以及生物活性。基於在加速或天然老化條件下的穩定性試驗的結果調節貯存期。

在某些實施方案中，所述藥物組合物是用於靜脈內施用的溶液。

在某些實施方案中，所述藥物組合物是用於製備用於靜脈內施用的溶液的濃縮物。

用途

在一個方面，本發明涉及上述表達盒或載體中的任一種或上述組合物將FVIII-BDD基因遞送給靶細胞的用途。

在一個方面，本發明涉及上述表達盒或載體中的任一種或上述組合物將FVIII-BDD蛋白提供給受試者的用途，所述受試者具有血友病A和/或不具有FVIII基因的功能性拷貝。

FVIII基因的功能性拷貝的缺失表示在基因組的FVIII基因的所有拷貝中的滅活突變或缺失，這導致FVIII基因的功能的喪失或缺陷。

在一個方面，本發明涉及一種向具有血友病A的受試

者提供FVIII-BDD蛋白的方法，其包含將治療有效量的上述表達載體中的任一種或上述組合物引入有此需要的受試者的細胞中。

在一個方面，本發明涉及一種將FVIII-BDD基因遞送給具有血友病A的受試者的靶細胞的方法，其包含將上述表達載體中的任一種或上述組合物引入所述受試者的細胞中。

需要將FVIII-BDD基因遞送給靶細胞的受試者，或需要提供FVIII-BBD蛋白的受試者表示具有血友病A的受試者，或表示具有凝血因子FVIII缺乏症的受試者，或表示在FVIII基因中具有導致FVIII基因的功能喪失或缺陷的滅活突變或缺失的受試者。

在一個方面，本發明涉及上述表達載體中的任一種或上述組合物用於在具有血友病A的受試者中治療血友病A的用途。

在一個方面，本發明涉及一種用於治療受試者中的血友病A的方法，其包含將治療有效量的上述表達載體中的任一種或上述組合物施用給具有血友病A的受試者中。

在某些實施方案中，血友病A是重度血友病A (<1%因子VIII活性)或中度血友病A (1-5%因子VIII活性)。

示例性施用模式包括局部應用、鼻內、吸入、透黏膜、透皮、腸內(例如口服、直腸)、胃腸外(例如靜脈內、皮下、真皮內、肌肉內)施用、以及直接組織或器官注射。

在所述用途的某些實施方案中，將上述表達載體中的任一種或上述組合物作為靜脈內輸注施用給受試者。

將上述表達載體中的任一種以有效量施用給生物體中。優選地將上述表達載體中的任一種以生物有效量施用給生物體中。表達載體的“生物有效”量是足以造成細胞轉導和核酸序列在細胞中的表達的量。如果將表達載體施用至體內細胞中，則表達載體的“生物有效”量是足以造成靶細胞的轉導和核酸序列在靶細胞中的表達的量。

根據本發明的上述表達載體中的任一種的劑量將取決於特定載體的施用模式，並且可以以常規方式確定它們。

用於施用根據本發明的上述表達盒或載體中的任一種的細胞可以是任何類型的細胞，包括但不限於上皮細胞(例如皮膚、呼吸道和腸道上皮細胞)、肝細胞、肌細胞、胰腺細胞(包括胰島細胞)、肝細胞、脾細胞、成纖維細胞、內皮細胞等。

根據本發明的上述表達盒或載體中的任一種不用於修飾人種系細胞的遺傳完整性。

在所述用途的某些實施方案中，根據本發明的上述表達載體中的任一種以及基於此的產品被用作單一療法。

在所述用途的某些實施方案中，將根據本發明的上述表達載體中的任一種以及基於此的產品與使用凝血因子濃縮物、去氨加壓素和/或纖維蛋白溶解抑制劑的替代療法聯合使用。

在所述用途的某些實施方案中，將根據本發明的上述

表達載體中的任一種以及基於此的產品與單克隆抗體(例如，emicizumab)聯合使用。

在所述用途的某些實施方案中，將根據本發明的上述表達載體中的任一種以及基於此的治療劑與RNA干擾治療劑(例如，fitusiran)聯合使用。

在所述用途的某些實施方案中，將根據本發明的上述表達載體中的任一種以及基於此的產品施用給受試者中一次。

在所述用途的某些實施方案中，將根據本發明的上述表達載體中的任一種以及基於此的產品重複地施用給受試者中。

實施例

為了更好地理解本發明，提供以下實施例。這些實施例只是用於說明的目的，不應解釋為以任何方式限制本發明的範圍。

在本說明書中引用的所有出版物、專利和專利申請通過引用併入本文。儘管為了理解清楚的目的已經通過說明和實施例對前述發明進行了比較詳細的描述，但是本領域普通技術人員考慮到本發明的教導會容易地明白，可以對其做出某些改變和修改而不脫離所附實施方案的精神或範圍。

材料和一般方法

重組DNA技術

如在Sambrook, J. 等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所描述的，使用標準方法操作DNA。根據生產商的方案使用分子生物學試劑。簡而言之，在選擇性抗生素壓力下生長的大腸桿菌細胞中生產質粒DNA以供進一步操作，使得所述質粒不會在細胞群體中丟失。我們使用商業試劑盒從細胞中分離質粒DNA，測量濃度，並通過限制性內切核酸酶處理或PCR擴增將其用於克隆。使用連接酶將DNA片段彼此連接，並轉化到細菌細胞中用於克隆的選擇和進一步生產。所有得到的遺傳構建體都通過限制性模式和完整Sanger測序得到了證實。

基因合成

從通過化學合成製備的寡核苷酸製備期望的基因區段。通過將寡核苷酸在彼此頂部複性，隨後從邊界引物進行PCR擴增，收集300-1000 bp長的基因片段(其側接獨特的限制位點)。結果，產生片段的混合物，包括期望的片段。將所述片段在限制位點處克隆到中間載體中，隨後通過DNA測序確認亞克隆片段的DNA序列。

DNA序列確定

通過Sanger測序確定DNA序列。分析DNA和蛋白序

列，並在SnapGene Viewer 4.2或更高版本中處理序列數據，用於序列創建、繪製、分析、注釋和說明。

培養細胞培養物

實驗使用了以下細胞系：HEK293 (人胚胎腎克隆293)、HUH7 (人肝細胞癌細胞系)和HepG2 (人肝細胞癌細胞系)。將用於生產AAV的懸浮HEK293細胞在37℃和5% CO_2的標準條件下在不含FBS和抗生素的完全培養基上培養。將用於試驗AAV產品效力的黏附性HUH7和HepG2細胞在37℃和5% CO_2的標準條件下在補充了10% FBS、抗生素/抗真菌劑的完全DMEM培養基上培養。將HUH7和HepG2細胞在達到80-90%匯合後進行傳代培養。將TrypLE Select酶(10x)用於解離細胞單層。使用錐蟲藍染色劑和一次性細胞計數室，使用自動Countess II計數器，評估細胞生存力。

細胞培養物的轉染

為了評價在轉染後融合蛋白的新變體的功能，我們使用了質粒，其包含用於表達hFVIII-BDD轉基因的各種變體的表達盒。將HepG2細胞系以10000個細胞/cm^2的密度預接種到12-孔平板的孔中。一天後，以與Lipofectamine 3000的複合物引入具有相同拷貝數的質粒。在轉染後第7天，通過ELISA和產色測定確定培養液中FVIII-BDD蛋白的水平和活性。在6個獨立實驗中進行了研究，其包含評估培

養液中FVIII-BDD蛋白的水平和活性。使用未經轉染的HepG2細胞作為陰性對照。

基於AAV的表達載體的組裝和純化

為了組裝包含FVIII-BDD基因的密碼子優化變體的AAV表達載體，我們使用了HEK293生產細胞，其被如下3種質粒轉染：

1)包含用於表達hFVIII-BDD轉基因的各種變體的AAV表達盒的質粒；

2)用於表達AAV6血清型Cap基因和AAV2血清型Rep基因的質粒。每個基因使用替代性讀碼框，編碼幾種蛋白產物；

3)用於表達AAV衣殼的組裝和包裝所需的腺病毒Ad2基因的質粒。

72小時以後，裂解細胞，並使用過濾、色譜法和超速離心方法純化和濃縮顆粒。使用對重組病毒基因組的區域具有特異性的引物和樣品，通過定量PCR來確定顆粒的滴度，並表示為每1ml中的病毒基因組拷貝數。

細胞培養物的轉導

將HUH7細胞系以10000個細胞/cm^2的密度預接種到12-孔平板的孔中。在將細胞附著到黏附基質之後，以500000 vg/細胞的MOI引入AAV製備物。在轉導後第7天，通過ELISA和產色測定確定培養液中FVIII-BDD蛋白的水

平和活性。在6個獨立實驗中進行了研究，其包含評估培養液中FVIII-BDD蛋白的水平和活性。使用未經轉導的細胞作為陰性對照。

通過ELISA確定凝血因子VIII-BDD蛋白的量

通過非競爭性固相酶免疫測定(ELISA)的夾心法評估在HepG2細胞系轉染和HUH7細胞系轉導以後在培養液中以及在給動物(小鼠)注射靶候選物以後在血漿中血液凝血因子VIII-BDD蛋白的含量。簡而言之，將在稀釋緩衝液中稀釋的樣品引入用對凝血因子VIII-BDD特異性的一級抗體敏化的96-孔平板孔中。給相同平板加載用於繪製校正曲線的標準品，即對照品。將平板在37℃的溫度溫育1小時。在引入生物素化的抗體、鏈黴親和素過氧化物酶綴合物的溶液和TMB之前，用洗滌緩衝液洗滌平板孔。引入含有對因子VIII-BDD特異性的生物素化檢測抗體的溶液，並將平板在37℃的溫度溫育30分鐘。然後將鏈黴親和素過氧化物酶綴合物溶液加入所得複合物中，並將平板在37℃的溫度溫育30分鐘。引入TMB溶液以觀察酶反應。在達到所需的染色強度後，向所有孔中加入停止溶液以停止反應。然後測量平板孔中溶液的光密度。考慮樣品的初步稀釋，通過校正曲線確定試驗樣品中凝血因子VIII-BDD的濃度。

通過ELISA確定凝血因子VIII-BDD蛋白的活性水平

通過產色測定評估在用靶候選物轉染HepG2細胞和轉

導HUH7細胞以後培養液中凝血因子VIII蛋白的活性。該測定基於這樣的事實，即在鈣離子、磷脂和因子IXa存在下，因子X轉化為活化形式Xa，因子VIII在反應中作為輔因子起作用，並且因子X活化的速率與因子VIII的水平線性相關。簡而言之，將在稀釋緩衝液中稀釋的培養液樣品、用於繪製校正曲線的標準品和對照品引入96-孔平板的孔中。將平板在37℃的溫度溫育3分鐘。將包含因子IXa、因子X、凝血酶、$CaCl_2$和磷脂的因子試劑溶液引入平板的所有孔中。將平板在37℃的溫度溫育4分鐘。將生色底物S-2765+I-2581的溶液引入平板的所有孔中。將平板在37℃的溫度溫育7分鐘。在達到所需的染色強度後，向所有孔中加入20%的乙酸溶液以停止反應。然後測量平板孔中溶液的光密度。考慮樣品的初步稀釋，通過校正曲線確定試驗樣品中凝血因子VIII的活性。

對實驗動物的體內研究

將缺乏FVIII的B 6.129S-F8tm1Smoc (HemA)小鼠(6-8周齡的雄性)用於實驗。經由向尾靜脈中的單次靜脈內注射，將產品施用給動物。將不含AAV的緩衝溶液施用給陰性對照組的動物。在施用產品前的注射當天進行血漿取樣，然後在引入表達載體後的第14天和第56天進行血漿取樣。

統計數據分析

結果指示，採用平均值±標准偏差(SD)、單向方差分析(ANOVA)接著Dunnett多重配對比較來比較實驗結果，並確定它們是統計學顯著的。

實施例1

為了增加蛋白FVIII-BDD (B-結構域缺失的凝血因子VIII)的分泌水平，通過將野生型FVIII信號肽的序列置換為與在SEQ ID NO: 2 (SP-FIX)或SEQ ID NO: 3 (SP-IgGK)或SEQ ID NO: 4 (SP-乳清蛋白)中指定的氨基酸序列對應的信號肽來修飾SEQ ID NO: 6 (SP-FVIII-FVIII-BDD)的序列，從而導致與SEQ ID NO: 7 (SP-FIX-FVIII-BDD)、SEQ ID NO: 8 (SP-IgGK-FVIII-BDD)和SEQ ID NO: 9 (SP-乳清蛋白FVIII-BDD)的氨基酸序列對應的融合蛋白的產生。

在由與SEQ ID NO: 14的序列對應的左側(第一個) ITR (反向末端重複序列)、HLP啟動子(SEQ ID NO: 15)、目標基因、聚腺苷酸化信號(SEQ ID NO: 16)、右側(第二個) ITR (SEQ ID NO: 17)組成的表達盒中，在體外細胞轉染過程中試驗了得到的核酸，其編碼包括選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白，其中所述目標基因是SEQ ID NO: 10-13的序列之一。作為對照，我們使用了與SEQ ID NO: 10的序列對應的編碼包括天然存在的FVIII-BDD信號肽的人FVIII-BDD蛋白(SP-FVIII-FVIII-BDD)的核酸。

與使用編碼SEQ ID NO: 6的具有天然存在的信號肽的FVIII-BDD蛋白(SP-FVIII-FVIII-BDD)的SEQ ID NO: 10的核酸相比，使用編碼具有SEQ ID NO: 7-9的序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白的SEQ ID NO: 11-13的所有核酸導致增加的FVIII-BDD蛋白的生產(圖1)和活性(圖2)水平。進一步，與使用SEQ ID NO: 10的核酸(SP-FVIII-FVIII-BDD)相比在轉染後生產的培養液中FVIII-BDD蛋白生產水平的驚人增加被以下序列證實：具有4.3倍增加的SEQ ID NO: 11的序列(SP-FIX-FVIII-BDD)，具有1.3倍增加的SEQ ID NO: 12的序列(SP-IgGK-FVIII-BDD)，和具有4.9倍增加的SEQ ID NO: 13的序列(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)。我們在轉染後生產的培養液中觀察到FVIII-BDD活性的類似結果：當將SEQ ID NO: 10的核酸(SP-FVIII-FVIII-BDD)與SEQ ID NO: 11 (SP-FIX-FVIII-BDD) (8.6倍增加)、SEQ ID NO: 12 (SP-IgGK-FVIII-BDD) (1.9倍增加)和SEQ ID NO: 13 (SP-乳清蛋白FVIII-BDD) (7.2倍增加)的核酸進行比較時，觀察到驚人增加。在FVIII-BDD蛋白生產結果和活性結果之間觀察到的一致性指示，天然存在的FVIII-BDD信號肽置換為與SEQ ID NO: 2 (SP-FIX)或SEQ ID NO: 3 (SP-IgGK)或SEQ ID NO: 4 (SP-乳清蛋白)的氨基酸序列對應的信號肽導致FVIII-BDD蛋白生產和活性的顯著增加，並且不會影響FVIII-BDD蛋白功能性。

因而，編碼包括選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8或

SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白的所得核酸能夠造成在宿主細胞中的FVIII-BDD蛋白體外表達，並且具有在生產細胞中生產重組FVIII-BDD蛋白用於治療血友病A的高潛力。

實施例2

我們生產了包含SEQ ID NO: 11-13的核酸的rAAV表達載體，所述核酸編碼包括選自SEQ ID NO: 7-9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白。通過體外轉導HUH7細胞來檢查所述表達載體。作為對照，我們使用了包含SEQ ID NO: 10的核酸的rAAV表達載體，所述核酸編碼與SEQ ID NO: 6的序列對應的人FVIII-BDD蛋白(SP-FVIII-FVIII-BDD)，其包括天然存在的FVIII信號肽。

與使用包含SEQ ID NO: 10的核酸(SP-FVIII-FVIII-BDD)的表達載體相比，使用包含SEQ ID NO: 11-13的核酸的表達載體導致增加的FVIII-BDD蛋白生產(圖3)和活性(圖4)水平。進一步，與使用具有SEQ ID NO: 10的核酸(SP-FVIII-FVIII-BDD)的表達載體相比，在轉導後生產的培養液中FVIII-BDD蛋白生產水平的驚人增加被以下表達載體證實：具有2.7倍增加的具有SEQ ID NO: 11的序列(SP-FIX-FVIII-BDD)的表達載體，具有2.4倍增加的具有SEQ ID NO: 13的序列(SP-乳清蛋白-FVIII-BDD)的表達載體。我們在轉導後生產的培養液中觀察到FVIII-BDD活性的類似結果。當將具有SEQ ID NO: 10的核酸(SP-FVIII-

FVIII-BDD)的表達載體與具有SEQ ID NO: 11 (SP-FIX-FVIII-BDD) (3.9倍增加)和SEQ ID NO: 13 (SP-乳清蛋白-FVIII-BDD) (3.5倍增加)的核酸的表達載體進行比較時，我們觀察到驚人增加。結果與根據通過轉染HepG2細胞所產生的數據一致。

因而，所開發的rAAV表達載體能夠造成體外FVIII-BDD蛋白表達，所述rAAV表達載體編碼包括選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白。

實施例3

為了在體內研究包含選自SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 13的核酸的rAAV表達載體，所述核酸編碼包括選自SEQ ID NO: 7或SEQ ID No. 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白，我們使用了缺乏FVIII的B6.129S-F8tm1Smoc (HemA)實驗室小鼠。在研究中使用的rAAV產品的劑量為$6x10^{13}$ vg/kg。使用不含AAV的對照溶液作為陰性對照。經由向尾靜脈中的單次靜脈內流體動力學施用，將產品施用給動物。在施用產品前在注射當天進行血漿取樣，然後在引入產品後的第14天和第56天進行血漿取樣。如上所述，通過ELISA確定血漿樣品中凝血因子VIII-BDD蛋白的水平。

體內研究(圖5)表明，使用包含選自SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 13的核酸的兩種rAAV表達載體在第14天和第

56天表現出動物血漿中因子VIII-BDD的水平的顯著增加(圖5)。當使用包含SEQ ID NO: 11的核酸的表達載體時，我們在注射後第14天和第56天分別在動物血漿中觀察到296和504 ng/ml的FVIII-BDD表達。當使用包含SEQ ID NO: 13的核酸的表達載體時，我們在注射後第14天和第56天分別在動物血漿中觀察到270和381 ng/ml的FVIII-BDD表達。

因此，所開發的包含選自SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 13的核酸的rAAV表達載體能夠造成體內FVIII-BDD蛋白表達並且具有用於基因治療血友病A的高潛力，所述核酸編碼包括選自SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO 9的氨基酸序列的基於FVIII-BDD和異源信號肽之一的融合蛋白。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"  dtdVersion="V1_3"
fileName="895326-中文序列表-本所自行自原文加上申請人、發明人、發明名稱中譯.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-05-
12">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>112114536</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-04-19</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>FPCH23160096TW</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>RU2022111695</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-04-28</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">俄羅斯聯邦商拜奧卡德聯合股份公司
</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>JOINT STOCK COMPANY BIOCAD</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">佩瑞佩  瑪利亞</InventorName>
 <InventorNameLatin>Perepelkina, Mariya Pavlovna</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="en">Isolated nucleic acid that encodes fusion
protein based on FVIII-BDD and on heterologous signal peptide, and use
thereof</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="zh">編碼基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白的分離
的核酸及其用途</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>17</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>FVIII signal peptide</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Naturally occurring sequence</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>MQIELSTCFFLCLLRFCFS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q3">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>FIX signal peptide</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Naturally occurring sequence</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAEC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q5">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>immunoglobulin G kappa chain signal
peptide</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Naturally occurring sequence</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="4">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q7">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>signal peptide of Lactalbumin</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q8">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Naturally occurring sequence</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>MMSFVSLLLVGILFHATQA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1438</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1438</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q9">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>FVIII-BDD protein (coagulation factor VIII with
deleted B domain)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1438</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q10">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA
KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK
ENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDA
ASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD
LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTW
VHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLL
IIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERD
LASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVF
DSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGM
TALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKED
FDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL
GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWA
YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENY
RFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIW
RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLL
APMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHY
SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK
TMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQ
IALRMEVLGCEAQDLY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1457</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1457</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q11">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>FVIII-BDD protein with wild type signal peptide (SP-
FVIII-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..1457</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q12">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTS
VVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK
EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFD
EGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQ
ASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDD
NSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQ
HESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTK
SDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSME
NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQS
DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQE
FTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFW
KVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMER
NCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYN
LYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSG
SINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH
NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSN
AWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL
DPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="7">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1466</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1466</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q13">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>fusion protein based on human FVIII-BDD and signal
peptide of FIX (SP-FIX-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1466</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q14">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRV
PKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY
DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHK
FILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGH
TFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSE
MDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE
TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWT
VTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRF
LPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS
```

GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQR
EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVP
QFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVK
PNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS
WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKK
EEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP
KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG
NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA
RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQD
SFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1458</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1458</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q15">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>fusion protein based on human FVIII-BDD and signal peptide of immunoglobulin G kappa chain (SP-IgGk-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1458</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>METDTLLLWVLLLWVPGSTGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT
SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE
KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVF
DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHR
QASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD
DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAI
QHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPT
KSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQ
LEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSM
ENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQ
SDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQ
EFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYF
WKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENME
RNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALY
NLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYS
GSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK
HNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRS
NAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS
LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1457</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1457</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q17">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>fusion protein based on human FVIII-BDD and signal peptide of Lactalbumin (SP-Lactalbumin-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1457</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q18">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MMSFVSLLLVGILFHATQAATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTS
VVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK
EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFD
EGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQ
ASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDD
NSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQ
HESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTK
SDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSME
NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQS
DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQE
FTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFW
KVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMER
NCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYN
LYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSG
SINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH
NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSN
AWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL
DPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY</INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>4374</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..4374</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q19">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Nucleic acid that encodes the FVIII-BDD protein with
wild type signal peptide (SP-FVIII-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..4374</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q20">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgcaaatagagctctccacctgcttctttctgtgcctttgcgattctgctttagtgccac
cagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactatatgcaaagtgatctcggtgagctgcctgtggacgcaa
gatttcctcctagagtgccaaaatcttttccattcaacacctcagtcgtgtacaaaaagactctgtttgtagaattcacg
gatcacctttcaacatcgctaagccaaggccaccctggatgggtctgctaggtcctaccatccaggctgaggtttatga
tacagtggtcattacacttaagaacatggcttcccatcctgtcagtcttcatgctgttggtgtatcctactggaaagctt
ctgagggagctgaatatgatgatcagaccagtcaaagggagaaagaagatgataaagtcttccctggtggaagccataca
```

tatgtctggcaggtcctgaaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtgccttacctactcatatctttctcatgt
ggacctggtaaaagacttgaattcaggcctcattggagccctactagtatgtagagaagggagtctggccaaggaaaaga
cacagaccttgcacaaatttatactacttttgctgtatttgatgaagggaaaagttggcactcagaaacaaagaactcc
ttgatgcaggatagggatgctgcatctgctcgggcctggcctaaaatgcacacagtcaatggttatgtaaacaggtctct
gccaggtctgattggatgccacaggaaatcagtctattggcatgtgattggaatgggcaccactcctgaagtgcactcaa
tattcctcgaaggtcacacatttcttgtgaggaaccatcgccaggcgtccttggaaatctcgccaataactttccttact
gctcaaacactcttgatggaccttggacagtttctactgttttgtcatatctcttcccaccaacatgatggcatggaagc
ttatgtcaaagtagacagctgtccagaggaaccccaactacgaatgaaaaataatgaagaagcggaagactatgatgatg
atcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgatgatgacaactctccttcctttatccaaattcgctcagttgcc
aagaagcatcctaaaacttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgctcccttagtcctcgcccc
cgatgacagaagttataaaagtcaatatttgaacaatggccctcagcggattggtaggaagtacaaaaaagtccgattta
tggcatacacagatgaaacctttaagactcgtgaagctattcagcatgaatcaggaatcttgggacctttacttttatggg
gaagttggagacacactgttgattatatttaagaatcaagcaagcagaccatataacatctaccctcacggaatcactga
tgtccgtcctttgtattcaaggagattaccaaaaggtgtaaaacatttgaaggattttccaattctgccaggagaaatat
tcaaatataaatggacagtgactgtagaagatgggccaactaaatcagatcctcggtgcctgacccgctattactctagt
ttcgttaatatggagagagatctagcttcaggactcattggccctctcctcatctgctacaaagaatctgtagatcaaag
aggaaaccagataatgtcagacaagaggaatgtcatcctgttttctgtatttgatgagaaccgaagctggtacctcacag
agaatatacaacgctttctccccaatccagctggagtgcagcttgaggatccagagttccaagcctccaacatcatgcac
agcatcaatggctatgtttttgatagtttgcagttgtcagtttgtttgcatgaggtggcatactggtacattctaagcat
tggagcacagactgacttcctttctgtcttcttctctggatataccttcaaacacaaaatggtctatgaagacacactca
ccctattcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcgatggaaaacccaggtctatggattctggggtgccacaactca
gactttcggaacagaggcatgaccgccttactgaaggtttctagttgtgacaagaacactggtgattattacgaggacag
ttatgaagatatttcagcatacttgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaagaagcttctctcaaaacccaccagtct
tgaaacgccatcaacgggaaataactcgtactactcttcagtcagatcaagaggaaattgactatgatgataccatatca
gttgaaatgaagaaggaagattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagcccccgcagctttcaaaagaaaacacg
acactattttattgctgcagtggagaggctctgggattatgggatgagtagctccccacatgttctaagaaacagggctc
agagtggcagtgtccctcagttcaagaaagttgttttccaggaatttactgatggctcctttactcagcccttataccgt
ggagaactaaatgaacatttgggactcctggggccatatataagagcagaagttgaagataatatcatggtaactttcag
aaatcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttatttcttatgaggaagatcagaggcaaggagcagaaccta
gaaaaaactttgtcaagcctaatgaaaccaaaacttacttttggaaagtgcaacatcatatggcacccactaaagatgag
tttgactgcaaagcctgggcttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgtgcactcaggcctgattggacccttct
ggtctgccacactaacacactgaaccctgctcatgggagacaagtgacagtacaggaatttgctctgtttttcaccatct
ttgatgagaccaaaagctggtacttcactgaaaatatggaaagaaactgcagggctccctgcaatatccagatggaagat
cccacttttaaagagaattatcgcttccatgcaatcaatggctacataatggatacactacctggcttagtaatggctca
ggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatccattctattcatttcagtggacatgtgt
tcactgtacgaaaaaaagaggagtataaaatggcactgtacaatctctatccaggtgtttttgagacagtggaaatgtta
ccatccaaagctggaatttggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacacttttctggt
gtacagcaataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattagagattttcagattacagcttcaggacaat
atggacagtgggccccaaagctggccagacttcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagccctttct
tggatcaaggtggatctgttggcaccaatgattattcacggcatcaagacccagggtgcccgtcagaagttctccagcct

ctacatctctcagtttatcatcatgtatagtcttgatgggaagaagtggcagacttatcgaggaaattccactggaacct
taatggtcttctttggcaatgtggattcatctgggataaaacacaatatttttaaccctccaattattgctcgatacatc
cgtttgcacccaactcattatagcattcgcagcactcttcgcatggagttgatgggctgtgatttaaatagttgcagcat
gccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttcatcctactttaccaatatgtttgccacct
ggtctccttcaaaagctcgacttcacctccaagggaggagtaatgcctggagacctcaggtgaataatccaaaagagtgg
ctgcaagtggacttccagaagacaatgaaagtcacaggagtaactactcagggagtaaaatctctgcttaccagcatgta
tgtgaaggagttcctcatctccagcagtcaagatggccatcagtggactctctttttcagaatggcaaagtaaaggttt
ttcagggaaatcaagactccttcacacctgtggtgaactctctagacccaccgttactgactcgctaccttcgaattcac
ccccagagttgggtgcaccagattgccctgaggatggaggttctgggctgcgaggcacaggacctctactga
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>4401</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..4401</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q21">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Nucleic acid that encodes fusion protein based on human FVIII-BDD and signal peptide of FIX (SP-FIX-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..4401</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q22">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgccttttagg
atatctactcagtgctgaatgtgccaccagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactatatgcaaagtg
atctcggtgagctgcctgtggacgcaagatttcctcctagagtgccaaaatcttttccattcaacacctcagtcgtgtac
aaaaagactctgtttgtagaattcacggatcacctttcaacatcgctaagccaaggccaccctggatgggtctgctagg
tcctaccatccaggctgaggtttatgatacagtggtcattacacttaagaacatggcttcccatcctgtcagtcttcatg
ctgttggtgtatcctactggaaagcttctgagggagctgaatatgatgatcagaccagtcaaagggagaaagaagatgat
aaagtcttccctggtggaagccatacatatgtctggcaggtcctgaaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtg
ccttacctactcatatctttctcatgtggacctggtaaaagacttgaattcaggcctcattggagccctactagtatgta
gagaagggagtctggccaaggaaaagacacagaccttgcacaaatttatactacttttgctgtatttgatgaagggaaa
agttggcactcagaaacaaagaactccttgatgcaggatagggatgctgcatctgctcgggcctggcctaaaatgcacac
agtcaatggttatgtaaacaggtctctgccaggtctgattggatgccacaggaaatcagtctattggcatgtgattggaa
tgggcaccactcctgaagtgcactcaatattcctcgaaggtcacacatttcttgtgaggaaccatcgccaggcgtccttg
gaaatctcgccaataactttccttactgctcaaacactcttgatggaccttggacagtttctactgttttgtcatatctc
ttcccaccaacatgatggcatggaagcttatgtcaaagtagacagctgtccagaggaaccccaactacgaatgaaaaata
atgaagaagcggaagactatgatgatgatcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgatgatgacaactctcct
tcctttatccaaattcgctcagttgccaagaagcatcctaaaacttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactg
ggactatgctcccttagtcctcgcccccgatgacagaagttataaaagtcaatatttgaacaatggccctcagcggattg
gtaggaagtacaaaaaagtccgatttatggcatacacagatgaaacctttaagactcgtgaagctattcagcatgaatca
ggaatcttgggacctttactttatggggaagttggagacacactgttgattatatttaagaatcaagcaagcagaccata
taacatctaccctcacggaatcactgatgtccgtcctttgtattcaaggagattaccaaaaggtgtaaaacatttgaagg
attttccaattctgccaggagaaatattcaaatataaatggacagtgactgtagaagatgggccaactaaatcagatcct
cggtgcctgacccgctattactctagtttcgttaatatggagagagatctagcttcaggactcattggccctctcctcat
ctgctacaaagaatctgtagatcaaagaggaaaccagataatgtcagacaagaggaatgtcatcctgttttctgtatttg
atgagaaccgaagctggtacctcacagagaatatacaacgctttctccccaatccagctggagtgcagcttgaggatcca
gagttccaagcctccaacatcatgcacagcatcaatggctatgttttgatagtttgcagttgtcagtttgtttgcatga
ggtggcatactggtacattctaagcattggagcacagactgacttcctttctgtcttcttctctggatataccttcaaac
acaaaatggtctatgaagacacactcaccctattcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcgatggaaaacccaggt
ctatggattctggggtgccacaactcagactttcggaacagaggcatgaccgccttactgaaggtttctagttgtgacaa
gaacactggtgattattacgaggacagttatgaagatatttcagcatacttgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaa
gaagcttctctcaaaacccaccagtcttgaaacgccatcaacgggaaataactcgtactactcttcagtcagatcaagag
gaaattgactatgatgataccatatcagttgaaatgaagaaggaagattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagag
cccccgcagctttcaaaagaaaacacgacactattttattgctgcagtggagaggctctgggattatgggatgagtagct
ccccacatgttctaagaaacagggctcagagtggcagtgtccctcagttcaagaaagttgttttccaggaatttactgat
ggctcctttactcagcccttataccgtggagaactaaatgaacatttgggactcctggggccatatataagagcagaagt

tgaagataatatcatggtaactttcagaaatcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttatttcttatgagg
aagatcagaggcaaggagcagaacctagaaaaaactttgtcaagcctaatgaaaccaaaacttacttttggaaagtgcaa
catcatatggcacccactaaagatgagtttgactgcaaagcctgggcttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgt
gcactcaggcctgattggacccccttctggtctgccacactaacacactgaaccctgctcatgggagacaagtgacagtac
aggaatttgctctgtttttcaccatctttgatgagaccaaaagctggtacttcactgaaaatatggaaagaaactgcagg
gctccctgcaatatccagatggaagatcccacttttaaagagaattatcgcttccatgcaatcaatggctacataatgga
tacactacctggcttagtaatggctcaggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatcc
attctattcatttcagtggacatgtgttcactgtacgaaaaaaagaggagtataaaatggcactgtacaatctctatcca
ggtgtttttgagacagtggaaatgttaccatccaaagctggaatttggcgggtggaatgccttattggcgagcatctaca
tgctgggatgagcacacttttctggtgtacagcaataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattagag
attttcagattacagcttcaggacaatatggacagtgggccccaaagctggccagacttcattattccggatcaatcaat
gcctggagcaccaaggagccctttttcttggatcaaggtggatctgttggcaccaatgattattcacggcatcaagaccca
gggtgcccgtcagaagttctccagcctctacatctctcagtttatcatcatgtatagtcttgatgggaagaagtggcaga
cttatcgaggaaattccactggaaccttaatggtcttctttggcaatgtggattcatctgggataaaacacaatattttt
aaccctccaattattgctcgatacatccgtttgcacccaactcattatagcattcgcagcactcttcgcatggagttgat
gggctgtgatttaaatagttgcagcatgccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttcat
cctactttaccaatatgtttgccacctggtctccttcaaaagctcgacttcacctccaagggaggagtaatgcctggaga
cctcaggtgaataatccaaaagagtggctgcaagtggacttccagaagacaatgaaagtcacaggagtaactactcaggg
agtaaaatctctgcttaccagcatgtatgtgaaggagttcctcatctccagcagtcaagatggccatcagtggactctct
tttttcagaatggcaaagtaaaggtttttcagggaaatcaagactccttcacacctgtggtgaactctctagacccaccg
ttactgactcgctaccttcgaattcacccccagagttgggtgcaccagattgccctgaggatggaggttctgggctgcga
ggcacaggacctctactga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>4377</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..4377</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q23">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Nucleic acid that encodes fusion protein based on human FVIII-BDD and signal peptide of Kappa chain of immunoglobulin G (SP-IgGk-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..4377</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q24">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagaccgacaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccgggtcgaccggtgc
caccagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactatatgcaaagtgatctcggtgagctgcctgtggacg
caagatttcctcctagagtgccaaaatcttttccattcaacacctcagtcgtgtacaaaaagactctgtttgtagaattc
acggatcacctttttcaacatcgctaagccaaggccaccctggatgggtctgctaggtcctaccatccaggctgaggttta
tgatacagtggtcattacacttaagaacatggcttcccatcctgtcagtcttcatgctgttggtgtatcctactggaaag
cttctgagggagctgaatatgatgatcagaccagtcaaagggagaaagaagatgataaagtcttccctggtggaagccat
acatatgtctggcaggtcctgaaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtgccttacctactcatatctttctca
tgtggacctggtaaaagacttgaattcaggcctcattggagccctactagtatgtagagaagggagtctggccaaggaaa
agacacagaccttgcacaaatttatactacttttgctgtatttgatgaagggaaaagttggcactcagaaacaaagaac
tccttgatgcaggatagggatgctgcatctgctcgggcctggcctaaaatgcacacagtcaatggttatgtaaacaggtc
tctgccaggtctgattggatgccacaggaaatcagtctattggcatgtgattggaatgggcaccactcctgaagtgcact
caatattcctcgaaggtcacacatttcttgtgaggaaccatcgccaggcgtccttggaaatctcgccaataactttcctt
actgctcaaacactcttgatggaccttggacagtttctactgttttgtcatatctcttcccaccaacatgatggcatgga
agcttatgtcaaagtagacagctgtccagaggaaccccaactacgaatgaaaaataatgaagaagcggaagactatgatg
atgatcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgatgatgacaactctccttcctttatccaaattcgctcagtt
gccaagaagcatcctaaaacttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgctcccttagtcctcgc
ccccgatgacagaagttataaaagtcaatatttgaacaatggccctcagcggattggtaggaagtacaaaaaagtccgat
ttatggcatacacagatgaaacctttaagactcgtgaagctattcagcatgaatcaggaatcttgggacctttacttttat
ggggaagttggagacacactgttgattatatttaagaatcaagcaagcagaccatataacatctaccctcacggaatcac
tgatgtccgtcctttgtattcaaggagattaccaaaaggtgtaaaacatttgaaggattttccaattctgccaggagaaa
tattcaaatataaatggacagtgactgtagaagatgggccaactaaatcagatcctcggtgcctgacccgctattactct
agtttcgttaatatggagagagatctagcttcaggactcattggccctctcctcatctgctacaaagaatctgtagatca
```

aagaggaaaccagataatgtcagacaagaggaatgtcatcctgttttctgtatttgatgagaaccgaagctggtacctca
cagagaatatacaacgctttctccccaatccagctggagtgcagcttgaggatccagagttccaagcctccaacatcatg
cacagcatcaatggctatgtttttgatagtttgcagttgtcagtttgtttgcatgaggtggcatactggtacattctaag
cattggagcacagactgacttcctttctgtcttcttctctggatataccttcaaacacaaaatggtctatgaagacacac
tcaccctattcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcgatggaaaacccaggtctatggattctggggtgccacaac
tcagactttcggaacagaggcatgaccgccttactgaaggtttctagttgtgacaagaacactggtgattattacgagga
cagttatgaagatatttcagcatacttgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaagaagcttctctcaaaacccaccag
tcttgaaacgccatcaacgggaaataactcgtactactcttcagtcagatcaagaggaaattgactatgatgataccata
tcagttgaaatgaagaaggaagattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagcccccgcagctttcaaaagaaaac
acgacactattttattgctgcagtggagaggctctgggattatgggatgagtagctccccacatgttctaagaaacaggg
ctcagagtggcagtgtccctcagttcaagaaagttgttttccaggaatttactgatggctcctttactcagcccttatac
cgtggagaactaaatgaacatttgggactcctggggccatatataagagcagaagttgaagataatatcatggtaacttt
cagaaatcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttatttcttatgaggaagatcagaggcaaggagcagaac
ctagaaaaaactttgtcaagcctaatgaaaccaaaacttacttttggaaagtgcaacatcatatggcacccactaaagat
gagtttgactgcaaagcctgggcttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgtgcactcaggcctgattggacccct
tctggtctgccacactaacacactgaaccctgctcatgggagacaagtgacagtacaggaatttgctctgtttttcacca
tctttgatgagaccaaaagctggtacttcactgaaaatatggaaagaaactgcagggctccctgcaatatccagatggaa
gatcccacttttaaagagaattatcgcttccatgcaatcaatggctacataatggatacactacctggcttagtaatggc
tcaggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatccattctattcatttcagtggacatg
tgttcactgtacgaaaaaaagaggagtataaaatggcactgtacaatctctatccaggtgtttttgagacagtggaaatg
ttaccatccaaagctggaatttggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacacttttct
ggtgtacagcaataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattagagattttcagattacagcttcaggac
aatatggacagtgggccccaaagctggccagacttcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagcccttt
tcttggatcaaggtggatctgttggcaccaatgattattcacggcatcaagacccagggtgcccgtcagaagttctccag
cctctacatctctcagtttatcatcatgtatagtcttgatgggaagaagtggcagacttatcgaggaaattccactggaa
ccttaatggtcttctttggcaatgtggattcatctgggataaaacacaatatttttaaccctccaattattgctcgatac
atccgtttgcacccaactcattatagcattcgcagcactcttcgcatggagttgatgggctgtgatttaaatagttgcag
catgccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttcatcctactttaccaatatgtttgcca
cctggtctccttcaaaagctcgacttcacctccaagggaggagtaatgcctggagacctcaggtgaataatccaaaagag
tggctgcaagtggacttccagaagacaatgaaagtcacaggagtaactactcagggagtaaaatctctgcttaccagcat
gtatgtgaaggagttcctcatctccagcagtcaagatggccatcagtggactctctttttcagaatggcaaagtaaagg
ttttcagggaaatcaagactccttcacacctgtggtgaactctctagacccaccgttactgactcgctaccttcgaatt
caccccagagttgggtgcaccagattgccctgaggatggaggttctgggctgcgaggcacaggacctctactga</INS
DSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>4374</INSDSeq_length>

<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..4374</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q25">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Nucleic acid that encodes fusion protein based on human FVIII-BDD and signal peptide of Lactalbumin (SP-Lactalbumin-FVIII-BDD)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..4374</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q26">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgatgtcctttgtctctctgctcctggttggcatcctgttccatgccacccaggccgccac
cagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactatatgcaaagtgatctcggtgagctgcctgtggacgcaa
gatttcctcctagagtgccaaaatcttttccattcaacacctcagtcgtgtacaaaaagactctgtttgtagaattcacg
gatcacctttcaacatcgctaagccaaggccaccctggatgggtctgctaggtcctaccatccaggctgaggtttatga
tacagtggtcattacacttaagaacatggcttcccatcctgtcagtcttcatgctgttggtgtatcctactggaaagctt
ctgagggagctgaatatgatgatcagaccagtcaaagggagaaagaagatgataaagtcttccctggtggaagccataca
tatgtctggcaggtcctgaaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtgccttacctactcatatctttctcatgt
ggacctggtaaaagacttgaattcaggcctcattggagccctactagtatgtagagaagggagtctggccaaggaaaaga
cacagaccttgcacaaatttatactacttttgctgtatttgatgaagggaaaagttggcactcagaaacaaagaactcc
ttgatgcaggatagggatgctgcatctgctcgggcctggcctaaaatgcacacagtcaatggttatgtaaacaggtctct

gccaggtctgattggatgccacaggaaatcagtctattggcatgtgattggaatgggcaccactcctgaagtgcactcaa
tattcctcgaaggtcacacatttcttgtgaggaaccatcgccaggcgtccttggaaatctcgccaataactttccttact
gctcaaacactcttgatggaccttggacagtttctactgttttgtcatatctcttcccaccaacatgatggcatggaagc
ttatgtcaaagtagacagctgtccagaggaaccccaactacgaatgaaaaataatgaagaagcggaagactatgatgatg
atcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgatgatgacaactctccttcctttatccaaattcgctcagttgcc
aagaagcatcctaaaacttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgctcccttagtcctcgcccc
cgatgacagaagttataaaagtcaatatttgaacaatggccctcagcggattggtaggaagtacaaaaaagtccgattta
tggcatacacagatgaaacctttaagactcgtgaagctattcagcatgaatcaggaatcttgggacctttacttttatggg
gaagttggagacacactgttgattatatttaagaatcaagcaagcagaccatataacatctaccctcacggaatcactga
tgtccgtcctttgtattcaaggagattaccaaaaggtgtaaaacatttgaaggattttccaattctgccaggagaaatat
tcaaatataaatggacagtgactgtagaagatgggccaactaaatcagatcctcggtgcctgacccgctattactctagt
ttcgttaatatggagagagatctagcttcaggactcattggccctctcctcatctgctacaaagaatctgtagatcaaag
aggaaaccagataatgtcagacaagaggaatgtcatcctgttttctgtatttgatgagaaccgaagctggtacctcacag
agaatatacaacgctttctccccaatccagctggagtgcagcttgaggatccagagttccaagcctccaacatcatgcac
agcatcaatggctatgtttttgatagtttgcagttgtcagtttgtttgcatgaggtggcatactggtacattctaagcat
tggagcacagactgacttcctttctgtcttcttctctggatataccttcaaacacaaaatggtctatgaagacacactca
ccctattcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcgatggaaaacccaggtctatggattctggggtgccacaactca
gactttcggaacagaggcatgaccgccttactgaaggtttctagttgtgacaagaacactggtgattattacgaggacag
ttatgaagatatttcagcatacttgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaagaagcttctctcaaaacccaccagtct
tgaaacgccatcaacgggaaataactcgtactactcttcagtcagatcaagaggaaattgactatgatgataccatatca
gttgaaatgaagaaggaagattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagcccccgcagctttcaaaagaaaacacg
acactattttattgctgcagtggagaggctctgggattatgggatgagtagctccccacatgttctaagaaacagggctc
agagtggcagtgtccctcagttcaagaaagttgttttccaggaatttactgatggctcctttactcagcccttataccgt
ggagaactaaatgaacatttgggactcctggggccatatataagagcagaagttgaagataatatcatggtaactttcag
aaatcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttatttcttatgaggaagatcagaggcaaggagcagaaccta
gaaaaaactttgtcaagcctaatgaaaccaaaacttacttttggaaagtgcaacatcatatggcacccactaaagatgag
tttgactgcaaagcctgggcttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgtgcactcaggcctgattggaccccttct
ggtctgccacactaacacactgaaccctgctcatgggagacaagtgacagtacaggaatttgctctgtttttcaccatct
ttgatgagaccaaaagctggtacttcactgaaaatatggaaagaaactgcagggctccctgcaatatccagatggaagat
cccacttttaaagagaattatcgcttccatgcaatcaatggctacataatggatacactacctggcttagtaatggctca
ggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatccattctattcatttcagtggacatgtgt
tcactgtacgaaaaaaagaggagtataaaatggcactgtacaatctctatccaggtgtttttgagacagtggaaatgtta
ccatccaaagctggaatttggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacacttttctggt
gtacagcaataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattagagattttcagattacagcttcaggacaat
atggacagtgggccccaaagctggccagacttcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagccctttct
tggatcaaggtggatctgttggcaccaatgattattcacggcatcaagacccagggtgcccgtcagaagttctccagcct
ctacatctctcagtttatcatcatgtatagtcttgatgggaagaagtggcagacttatcgaggaaattccactggaacct
taatggtcttctttggcaatgtggattcatctgggataaaacacaatatttttaaccctccaattattgctcgatacatc
cgtttgcacccaactcattatagcattcgcagcactcttcgcatggagttgatgggctgtgatttaaatagttgcagcat
gccattgggaatggagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttcatcctactttaccaatatgtttgccacct

ggtctccttcaaaagctcgacttcacctccaagggaggagtaatgcctggagacctcaggtgaataatccaaaagagtgg
ctgcaagtggacttccagaagacaatgaaagtcacaggagtaactactcagggagtaaaatctctgcttaccagcatgta
tgtgaaggagttcctcatctccagcagtcaagatggccatcagtggactctctttttcagaatggcaaagtaaaggttt
ttcagggaaatcaagactccttcacacctgtggtgaactctctagacccaccgttactgactcgctaccttcgaattcac
ccccagagttgggtgcaccagattgccctgaggatggaggttctgggctgcgaggcacaggacctctactga</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q27">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Left-hand (first) ITR (inverted terminal
repeats)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Naturally occurring sequence</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttgg
tcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>252</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..252</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q29">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>HLP promoter</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..252</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q30">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tgtttgctgcttgcaatgtttgcccattttagggtggacacaggacgctgtggtttctgagc
caggggggcgactcagatcccagccagtggacttagcccctgtttgctcctccgataactggggtgaccttggttaatatt
caccagcagcctccccccgttgcccctctggatccactgcttaaatacggacgaggacagggccctgtctcctcagcttca
```

```
ggcaccaccactgacctgggacagtgaatc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>60</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q31">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Polyadenylation signal</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q32">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cgcgaataaaagatctttattttcattagatctgtgtgttggtttttgtgtgatgcagc</
INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="17">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>141</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q33">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Right-hand ITR</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Naturally occurring sequence</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc
gggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg<
/INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種分離的核酸，其編碼基於FVIII-BDD(B-結構域缺失的凝血因子VIII)和異源信號肽的融合蛋白，所述融合蛋白包括選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列。

【請求項2】根據請求項1之分離的核酸，其中該基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列。

【請求項3】根據請求項1之分離的核酸，其中該基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列。

【請求項4】根據請求項1之分離的核酸，其中該基於FVIII-BDD和異源信號肽的融合蛋白具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列。

【請求項5】根據請求項2之分離的核酸，該核酸是SEQ ID NO: 11的核苷酸序列。

【請求項6】根據請求項3之分離的核酸，該核酸是SEQ ID NO: 12的核苷酸序列。

【請求項7】根據請求項4之分離的核酸，該核酸是SEQ ID NO: 13的核苷酸序列。

【請求項8】一種表達盒，其包含根據請求項1-7中的任一項之核酸。

【請求項9】根據請求項8之表達盒，該表達盒在5’端到3’端方向包含以下元件：

左側(第一個)ITR(反向末端重複序列)；

啟動子；

根據請求項1-7中的任一項之核酸；

聚腺苷酸化信號；

右側(第二個)ITR。

【請求項10】一種表達載體，其包含根據請求項1-7中的任一項之核酸或根據請求項8-9中的任一項之表達盒。

【請求項11】根據請求項10之表達載體，其中該表達載體是重組腺伴隨病毒(AAV)。

【請求項12】根據請求項11之表達載體，其中該AAV選自包括下述AAV血清型的集合：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、rAAV.rh8、rAAV.rhlO、rAAV.rh20、rAAV.rh39、rAAV.Rh74、rAAV.RHM4-1、AAV.hu37、rAAV.Anc80、rAAV.Anc80L65、rAAV.7m8、rAAV.PHP.B、rAAV2.5、rAAV2tYF、rAAV3B、rAAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15或AAV.HSC16。

【請求項13】一種用於生產基於FVIII-BDD和異源信

號肽的融合蛋白或用於生產根據請求項11-12之表達載體的宿主細胞，該宿主細胞包含根據請求項1-7中的任一項之核酸。

【請求項14】一種用於將FVIII-BDD基因遞送給靶細胞的藥物組合物，該藥物組合物包含與一種或多種藥學上可接受的賦形劑組合的根據請求項10-12中的任一項之表達載體或盒。

【請求項15】根據請求項10-12中的任一項之表達載體或根據請求項14之組合物用於將FVIII-BDD基因遞送給靶細胞的用途。

【請求項16】根據請求項10-12中的任一項之表達載體或根據請求項14之組合物將FVIII-BDD蛋白提供給受試者的用途，該受試者具有血友病A和/或不具有FVIII基因的功能性拷貝。

【請求項17】一種用於將FVIII-BDD蛋白提供給具有血友病A的受試者的方法，該方法包含將治療有效量的根據請求項10-12中的任一項之表達載體或根據請求項14之組合物施用到有此需要的受試者的細胞中。

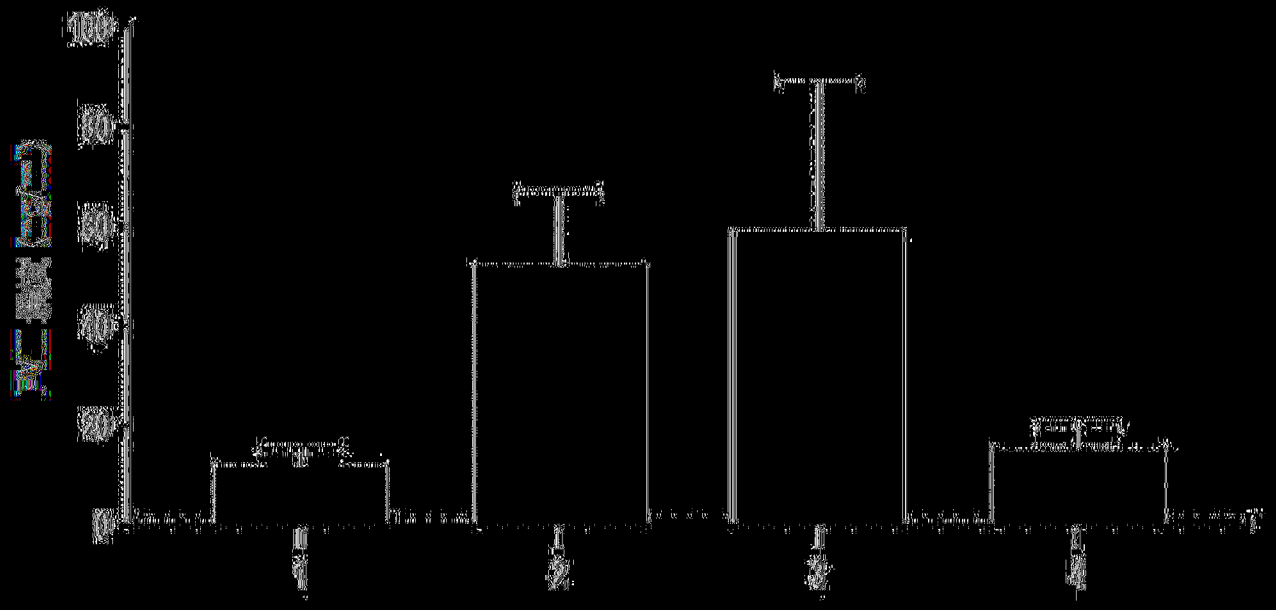
【請求項18】一種將FVIII-BDD基因遞送給具有血友病A的受試者的靶細胞的方法，該方法包含將根據請求項10-12中的任一項之表達載體或根據請求項14之組合物施用到受試者的細胞中。

【請求項19】根據請求項10-12中的任一項之表達載體或根據請求項14之組合物用於治療具有血友病A的受試

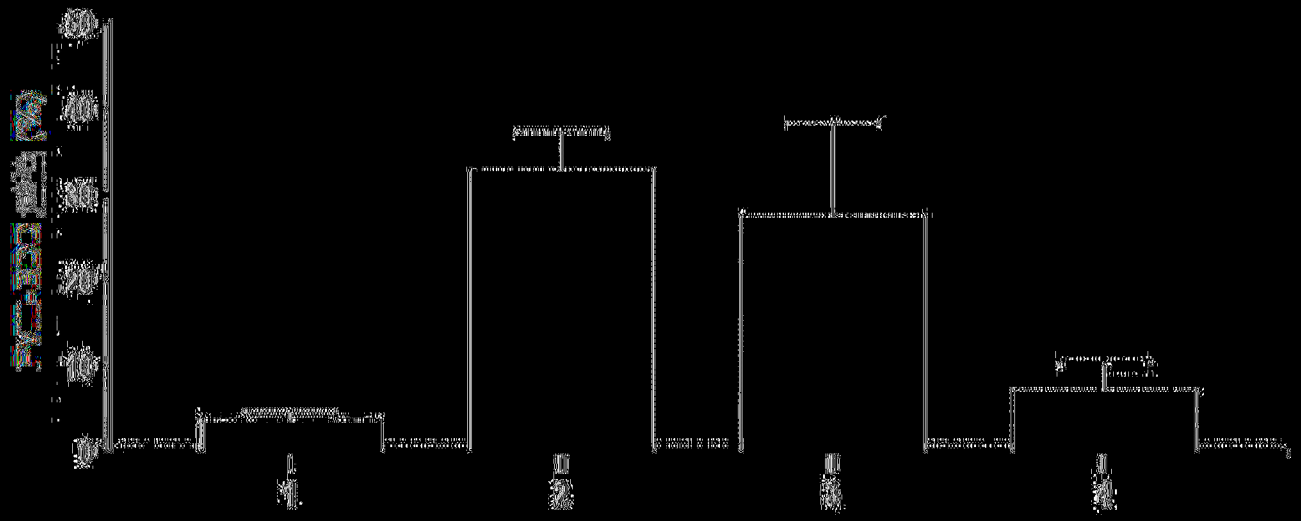
者中的血友病A的用途。

【請求項20】一種治療受試者中的血友病A的方法，該方法包含將治療有效量的根據請求項10-12中的任一項之表達載體或根據請求項14之組合物施用給具有血友病A的受試者。

(發明圖式)



(圖 1)



(圖 2)

895326

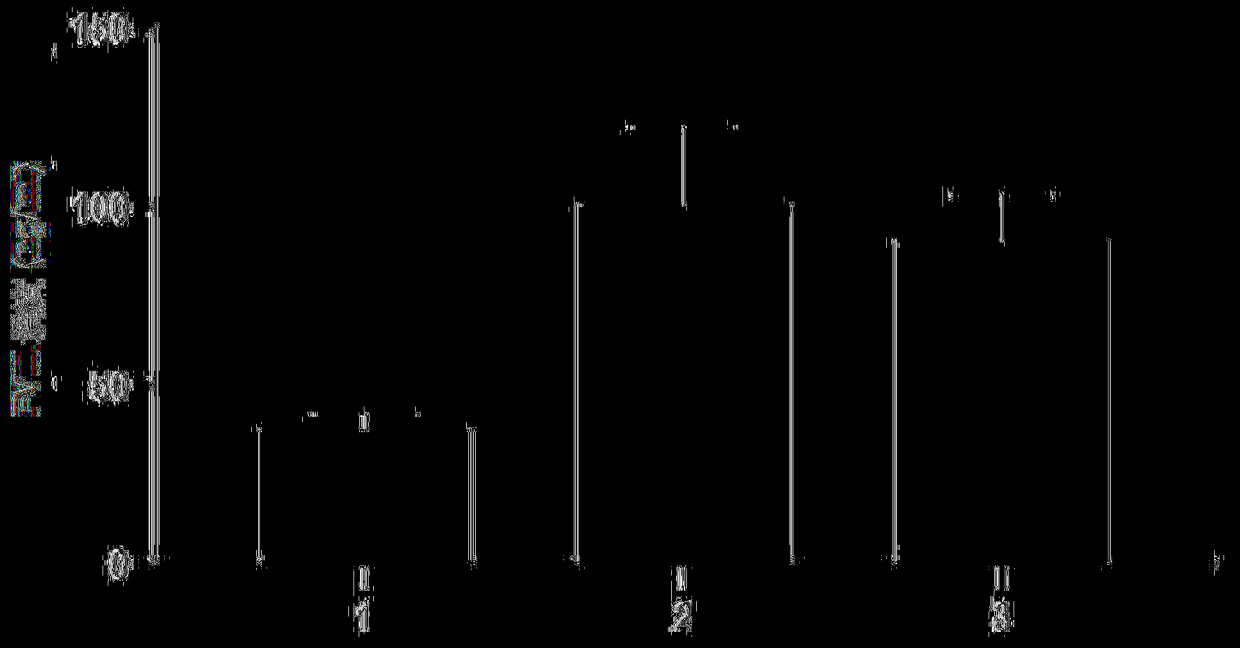


圖 3

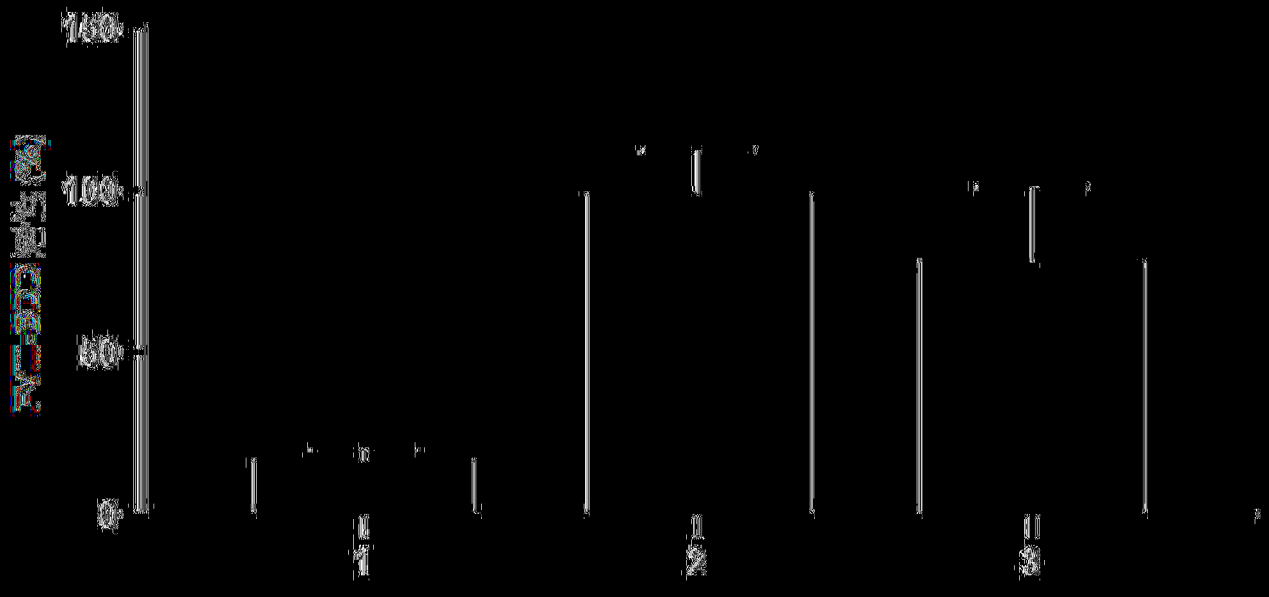
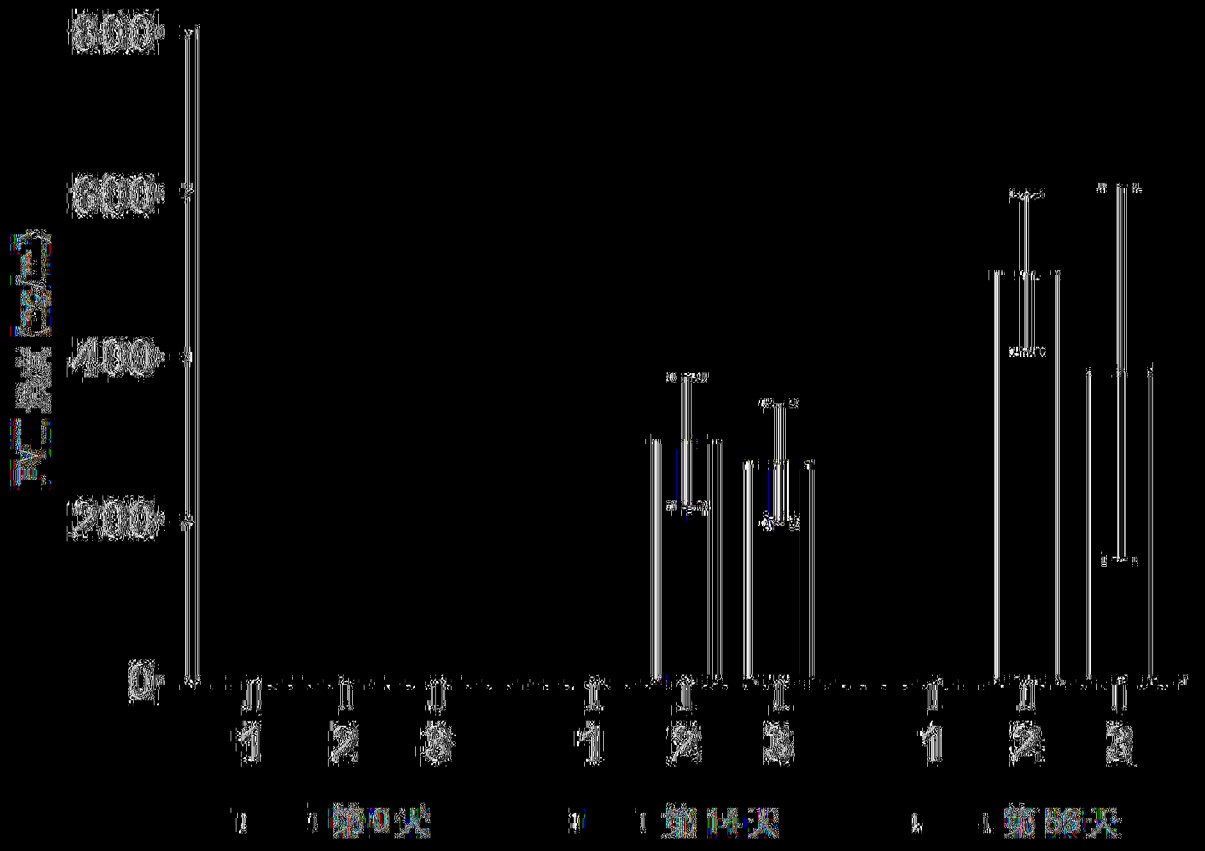


圖 4



(圖5)