



(21)申請案號：108144569

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 05 日

(51)Int. Cl. : C12N15/86 (2006.01)

C12N9/64 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P7/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/12/06 美國

62/776,393

(71)申請人：美商百歐維拉提夫治療公司 (美國) BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (US)
美國(72)發明人：劉 彤瑤 LIU, TONGYAO (US)；查格 道格拉斯 DRAGER, DOUGLAS (US)；帕
塔羅約 懷特 蘇珊娜 PATARROYO-WHITE, SUSANNAH (US)；坎托瑞 阿萊
西奧 CANTORE, ALESSIO (IT)；納爾迪尼 路易吉 NALDINI, LUIGI (IT)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：111 項 圖式數：11 共 164 頁

(54)名稱

表現因子 I X 之慢病毒載體的用途

(57)摘要

本文提供了包含編碼具有因子 IX(FIX)活性多肽的核酸序列的慢病毒載體及使用此類慢病毒載體的方法。本文公開之肝臟導向的慢病毒載體可以用於基因療法，其中所述慢病毒基因遞送使得能夠將轉基因表現盒穩定整合到兒科(例如，新生兒)或成年受試者的目標細胞(例如，肝細胞)之基因組中，從而實現在低慢病毒載體劑量下 FIX 表現的改善。本文還提供了治療如血友病之出血性障礙(例如，B 型血友病)的方法，所述方法包括向有需要的受試者以低劑量投予肝臟導向的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有 FIX 活性序列多肽的核酸序列。

The present disclosure provides lentiviral vectors comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide with factor IX (FIX) activity, and methods of using such lentiviral vectors. The liver-targeted lentiviral vectors disclosed herein can be used for gene therapy, wherein the lentiviral gene delivery enables stable integration of the transgene expression cassette into the genome of targeted cells (e.g., hepatocytes) of pediatric (e.g., neonatal) or adult subjects, achieving an improvement in FIX expression at low lentiviral vector doses. The present disclosure also provides methods of treating bleeding disorders such as hemophilia (e.g., hemophilia B) comprising administering to a subject in need thereof a liver-targeted lentiviral vector comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide with FIX activity sequence at low dosages.

【發明摘要】

【中文發明名稱】 表現因子IX之慢病毒載體的用途
【英文發明名稱】 USE OF LENTIVIRAL VECTORS EXPRESSING
FACTOR IX

【中文】

本文提供了包含編碼具有因子IX (FIX) 活性多肽的核酸序列的慢病毒載體及使用此類慢病毒載體的方法。本文公開之肝臟導向的慢病毒載體可以用於基因療法，其中所述慢病毒基因遞送使得能夠將轉基因表現盒穩定整合到兒科（例如，新生兒）或成年受試者的目標細胞（例如，肝細胞）之基因組中，從而實現在低慢病毒載體劑量下FIX表現的改善。本文還提供了治療如血友病之出血性障礙（例如，B型血友病）的方法，所述方法包括向有需要的受試者以低劑量投予肝臟導向的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有FIX活性序列多肽的核酸序列。

【英文】

The present disclosure provides lentiviral vectors comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide with factor IX (FIX) activity, and methods of using such lentiviral vectors. The liver-targeted lentiviral vectors disclosed herein can be used for gene therapy, wherein the lentiviral gene delivery enables stable integration of the transgene expression cassette into the genome of targeted cells (e.g., hepatocytes) of pediatric (e.g., neonatal) or adult subjects, achieving an improvement in FIX expression at low lentiviral vector doses. The present disclosure also provides methods of treating bleeding disorders such as hemophilia (e.g., hemophilia B) comprising administering to a subject in need thereof a liver-targeted lentiviral vector comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide with FIX activity sequence at low dosages.

【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】 表現因子IX之慢病毒載體的用途

【英文發明名稱】 USE OF LENTIVIRAL VECTORS EXPRESSING
FACTOR IX

【技術領域】

相關申請案

【0001】 本申請要求享有2018年12月6日提交的美國臨時專利申請號為62/776,393的優先權，其全部公開內容在此通過引用的方式併入本文中。

對電子提交的序列表的引用

【0002】 以ASCII文字檔（名稱：SA9-468TW_SequenceListing_ST25；大小：28,470位元組；以及創建日期：2019年12月2日）電子提交的序列表的內容通過引用以其整體併入本文。

【先前技術】

【0003】 凝血路徑部分地涉及在血小板表面上形成因子VIIIa（FVIIIa）和因子IXa（FIXa）的酶複合物（Xase複合物）。FIXa是一種絲胺酸蛋白酶，其在沒有其輔因子FVIIIa的情況下催化活性相對較弱。Xase複合物將因子X（FX）裂解為因子Xa（FXa），所述因子Xa（FXa）轉而與因子Va（FVa）相互作用以裂解凝血酶原並生成凝血酶。B型血友病是一種出血性障礙，它是由FIX基因中導致FIX活性不足的突變和/或缺失引起的。

【0004】 在血友病中，血液凝結受到缺乏某些血漿凝血因子的干擾。B型血友病（也稱為Christmas氏病）是最常見的遺傳性出血障礙之一。它是由因子IX的缺乏引起的，因子IX的缺乏可能是由於因子IX蛋白的合成

減少或具有減低活性的缺陷分子導致的。它導致體內和體外血液凝結活性下降，並且受影響個體的一生中都需要進行廣泛的醫學監測。在沒有有效預防的情況下，復發性關節積血（haemarthroses）導致進行性和致殘性關節病的發展以及生活品質低下（Giangrande P., Expert Opin Pharmacother. 2005; 6:1517-24）。

【0005】 B型血友病的治療是使用高度富集有因子IX的外源性因子濃縮物來替代缺失的凝血因子。然而，從血液中產生這種濃縮物充滿了技術困難。因此，在本領域中需要一種FIX療法，其係克服當前替代療法的困難和局限性。通過將包含編碼具有FIX活性多肽的核酸序列的轉基因表現盒，穩定整合到目標細胞的基因組中，基因療法成為持續治療B型血友病的潛在方法。

【發明內容】

【0006】 本文提供了在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予有效劑量的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有因子IX（FIX）活性多肽的核苷酸序列，其中所述慢病毒載體被包裝在過表現CD47的HEK293T細胞中，相較於未修飾的HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）中所產生的對照慢病毒載體，所述慢病毒載體包含更高的CD47蛋白表面表現量，並且其中相對於誘導與所述慢病毒載體相同的FIX活性所需的對照慢病毒載體的對照劑量，有效劑量降低。

在一些實施例中，所述對照慢病毒載體在所述對照慢病毒載體的表面上包含19個分子/ μm^2 的CD47。在一些實施例中，比在HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）中產生的對照慢病毒載體，所述慢病毒載體在所述慢病毒載體的表面上包含多至少約1.5倍、至少約2.0倍、至少約2.5倍、至少約3.0倍、至少約3.5倍、至少約4.0倍、至少約4.5倍、至少約5.0倍、至少約5.5倍、至少約6.0倍、至少約6.5倍、至少約7.0倍、至少約7.5倍、至少約8.0倍、至少

約8.5倍、至少約9.0倍、至少約9.5倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍的CD47蛋白。

【0007】 在一些實施例中，所述有效劑量少於約 5×10^{10} 轉導單位/kg (TU/kg)、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、或少於約 8×10^8 TU/kg。

【0008】 在一些實施例中，所述受試者在所述投予後展現出一種或多種以下特性：(a) 相對於所述對照慢病毒載體，所述慢病毒載體的巨噬細胞轉導減少；(b) 相對於所述對照慢病毒載體，對所述慢病毒載體的同種特異性免疫反應降低；(c) 在投予至少3周後，相對於正常FIX活性為至少30%的FIX活性；(d) 所述慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中的組織特異性表現；和(e) (a)至(d)的任何組合。

【0009】 在一些實施例中，所述同種特異性免疫反應包括回應於所述慢病毒載體的細胞激素釋放。在一些實施例中，所述細胞激素係選自於MIP-1a、MIP-1b、MCP-1及其任何組合。在一些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MIP-1a表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MIP-1a表現。在一些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MIP-1b表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MIP-1b表現。在一些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MCP-1表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MCP-1表現。

【0010】 在一些實施例中，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後至少三周展現出相對於正常FIX活性至少約75%、至少約100%、至少約125%、

至少約150%、至少約175%、至少約200%、至少約225%、至少約250%、至少約275%、或至少約300%的FIX活性。在一些實施例中，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後至少三周展現出相對於正常FIX活性至少約150%的FIX活性。在一些實施例中，相對於投予所述對照慢病毒載體的對照劑量的受試者，在投予所述慢病毒載體後24小時至48小時的血漿FIX活性增加。在一些實施例中，相對於投予所述對照慢病毒載體的對照劑量的受試者，所述血漿FIX活性在所述投予後增加了至少約2倍、至少約3倍、至少約4倍、至少約5倍、至少約6倍、至少約7倍、至少約8倍、至少約9倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、或至少約200倍。

【0011】 在一些實施例中，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，所述受試者展現出所述慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加。在一些實施例中，所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的載體拷貝數（VCN）高至少約2倍、至少約3倍、至少約4倍、至少約5倍、至少約6倍、至少約7倍、至少約8倍、至少約9倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、或至少約200倍。在一些實施例中，所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在

肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少10倍。在一些實施例中，所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少50倍。在一些實施例中，所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少100倍。

【0012】 在一些實施例中，所述CD47是人類CD47。在一些實施例中，所述人類CD47包含與SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列至少60%、至少約70%、至少70%、至少約80%、至少85%、至少約90%、至少95%、至少約96%、至少97%、至少約98%、至少99%、或約100%相同的胺基酸序列。在一些實施例中，所述慢病毒載體不包含MHC-I多肽。在一些實施例中，所述慢病毒載體是在與所述HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）相比表現高濃度CD47的宿主細胞中產生的。

【0013】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。

【0014】 本文還提供了在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予低於 5×10^{10} 轉導單位/kg（TU/kg）的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有因子IX（FIX）活性多肽的核苷酸序列，其中所述慢病毒載體包含與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO:

1所示的核苷酸序列具有至少85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【0015】 在一些實施例中，所述劑量為約 5×10^{10} TU/kg、約 4.5×10^{10} TU/kg、約 4×10^{10} TU/kg、約 3.5×10^{10} TU/kg、約 3×10^{10} TU/kg、約 2.5×10^{10} TU/kg、約 2×10^{10} TU/kg、約 1.5×10^{10} TU/kg、約 1×10^{10} TU/kg、約 9.5×10^9 TU/kg、約 9×10^9 TU/kg、約 8.5×10^9 TU/kg、約 8×10^9 TU/kg、約 7.5×10^9 TU/kg、約 7×10^9 TU/kg、約 6.5×10^9 TU/kg、約 6×10^9 TU/kg、約 5.5×10^9 TU/kg、約 5×10^9 TU/kg、約 4.5×10^9 TU/kg、約 4×10^9 TU/kg、約 3.5×10^9 TU/kg、約 3×10^9 TU/kg、約 2.5×10^9 TU/kg、約 2×10^9 TU/kg、約 1.5×10^9 TU/kg、約 1×10^9 TU/kg、約 9.5×10^8 TU/kg、約 9×10^8 TU/kg、約 8.5×10^8 TU/kg、約 8×10^8 TU/kg、約 7.5×10^8 TU/kg、約 7×10^8 TU/kg、約 6.5×10^8 TU/kg、約 6×10^8 TU/kg、約 5.5×10^8 TU/kg、約 5×10^8 TU/kg、約 4.5×10^8 TU/kg、約 4×10^8 TU/kg、約 3.5×10^8 TU/kg、約 3×10^8 TU/kg、約 2.5×10^8 TU/kg、約 2×10^8 TU/kg、約 1.5×10^8 TU/kg、或約 1×10^8 TU/kg。在一些實施例中，所述劑量少於 5×10^{10} TU/kg、少於 4.5×10^{10} TU/kg、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3.5×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2.5×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1.5×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9.5×10^9 TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8.5×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7.5×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6.5×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5.5×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、

少於 4.5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3.5×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、
 少於 2.5×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1.5×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、
 少於約 9.5×10^8 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、少於約 8.5×10^8 TU/kg、少於約
 8×10^8 TU/kg、少於約 7.5×10^8 TU/kg、少於約 7×10^8 TU/kg、少於約 6.5×10^8
 TU/kg、少於約 6×10^8 TU/kg、少於約 5.5×10^8 TU/kg、少於約 5×10^8 TU/kg、
 少於約 4.5×10^8 TU/kg、少於約 4×10^8 TU/kg、少於約 3.5×10^8 TU/kg、少於約
 3×10^8 TU/kg、少於約 2.5×10^8 TU/kg、少於約 2×10^8 TU/kg、少於約 1.5×10^8
 TU/kg、或少於約 1×10^8 TU/kg。在一些實施例中，所述劑量在 1×10^8 與 5×10^{10}
 TU/kg之間、在 1×10^8 與 5×10^9 TU/kg之間、在 1×10^8 與 1×10^9 TU/kg之間、在 1×10^8
 與 1×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2×10^9 與 5×10^{10} TU/kg
 之間、在 3×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 4×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 5×10^9
 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 2×10^9 與 6×10^9 TU/kg之
 間、在 3×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 4×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 5×10^9 與 6×10^9
 TU/kg之間、在 6×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 7×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在
 8×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 9×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 10^{10} 與 5×10^{10}
 TU/kg之間、在 1.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、
 在 2.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3.5×10^{10} 與
 5×10^{10} TU/kg之間、在 4×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、或在 4.5×10^{10} 與 5×10^{10}
 TU/kg之間。在一些實施例中，所述劑量在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9
 與 4.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 4×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 3.5×10^{10}
 TU/kg之間、在 1×10^9 與 3×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 2.5×10^{10} TU/kg之間、
 在 1×10^9 與 2×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 1.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 10^{10}
 TU/kg之間、在 1×10^9 與 9×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 8×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9
 與 7×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 5×10^9 TU/kg之
 間、在 1×10^9 與 4×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 3×10^9 TU/kg之間、和在 1×10^9 與
 2×10^9 TU/kg之間。在一些實施例中，所述劑量在 1×10^{10} 與 2×10^{10} TU/kg之間、

在 1.1×10^{10} 與 1.9×10^{10} TU/kg之間、在 1.2×10^{10} 與 1.8×10^{10} TU/kg之間、在 1.3×10^{10} 與 1.7×10^{10} TU/kg之間、或在 1.4×10^{10} 與 1.6×10^{10} TU/kg之間。在一些實施例中，所述劑量為約 4×10^9 TU/kg至約 6×10^9 TU/kg。

【0016】 在一些實施例中，所述慢病毒載體以單劑量或多劑量投予。在一些實施例中，所述慢病毒載體經由靜脈內注射投予。在一些實施例中，所述受試者是兒科受試者。在一些實施例中，所述受試者是成年受試者。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽包含與SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列具有至少90%序列同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。

【0017】 在一些實施例中，所述慢病毒載體包含組織特異性啟動子。在一些實施例中，所述組織特異性啟動子選擇性地增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現。在一些實施例中，選擇性增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現的組織特異性啟動子包括APOA2啟動子、SERPINA1 (hAAT) 啟動子、mTTR啟動子、MIR122啟動子或其任何組合。在一些實施例中，所述目標肝細胞是肝細胞。在一些實施例中，將所述經分離的核酸分子係穩定地整合到所述肝細胞的基因組中。

【0018】 在一些實施例中，所述慢病毒載體包含剪接供體位點。在一些實施例中，所述慢病毒載體包含剪接受體位點。在一些實施例中，所述慢病毒載體包含gag序列、pol序列、rev序列、rev反應元件 (RRE) 或其任何組合。在一些實施例中，所述gag序列是全長或截斷的gag序列。在一些實施例中，所述慢病毒載體包含增強子、微小RNA的目標序列、轉錄後調控元件、包裝訊號、多聚A序列、內含子序列或其任何組合。

【0019】 在一些實施例中，所述慢病毒載體的劑量係以一次投予或分成至少兩個子劑量來投予。在一些實施例中，所述慢病毒載體的劑量係重複至少兩次。

【0020】 在一些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列還包含

編碼訊息胜肽的核酸序列。在一些實施例中，編碼訊息胜肽的核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸1至84；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸1至84；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸1至84；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸1至84；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸1至84；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸1至84。在一些實施例中，編碼具有FIX活性多肽的核苷酸序列，進一步包含編碼前肽的核酸序列。在一些實施例中，編碼前肽的核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸85至138；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸85至138；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸85至138；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸85至138；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸85至138；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸85至138。

【0021】 在一些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列，進一步包含編碼異源胺基酸序列的異源核苷酸序列。在一些實施例中，所述異源胺基酸序列是白蛋白、免疫球蛋白Fc區、XTEN序列、人類絨毛膜促性腺激素的β次單元的C末端肽（CTP）、PAS序列、HAP序列、CTP肽序列、轉鐵蛋白、白蛋白結合部分，或這些多肽的任何片段、衍生物、變異體或組合。在一些實施例中，所述異源胺基酸序列連接至一胺基酸序列的N末端或C末端，所述胺基酸序列係由編碼具有FIX活性多肽的核苷酸序列所編碼，或者所述異源胺基酸序列係插入在所述胺基酸序列的兩個胺基酸之間。在一些實施例中，所述異源部分係插入在具有FIX活性的多肽內，緊接對應於以下胺基酸之胺基酸的下游：SEQ ID NO: 2的胺基酸103、SEQ ID NO: 2的胺基酸105、SEQ ID NO: 2的胺基酸142、SEQ ID NO: 2的胺基酸149、SEQ ID NO: 2的胺基酸162、SEQ ID NO: 2的胺基酸166、SEQ ID NO: 2的胺基酸174、SEQ ID NO: 2的胺基酸224、SEQ ID NO: 2的胺基酸226、SEQ ID NO: 2的胺

基酸228、SEQ ID NO: 2的胺基酸413、或其任何組合。在一些實施例中，所述FIX多肽是R338L變異體FIX多肽。

【0022】 在一些實施例中，所述慢病毒載體是在宿主細胞中產生的。在一些實施例中，所述宿主細胞表現CD47。在一些實施例中，所述宿主細胞經修飾以過表現CD47。在一些實施例中，所述宿主細胞不表現MHC-I。在一些實施例中，所述宿主細胞是CD47^高/MHC-I。在一些實施例中，所述宿主細胞是CD47^高/MHC-I HEK 293T細胞。

【0023】 本文還提供了包含核苷酸序列的慢病毒載體，所述核苷酸序列包含 (i) 組織特異性啟動子，和 (ii) SEQ ID NO: 1所示的核酸序列，其中所述組織特異性啟動子驅動所述核酸序列在肝細胞中的表現。

【0024】 本文還提供了包含核苷酸序列的慢病毒載體，所述核苷酸序列包含 (i) 剪接供體位點；(ii) 剪接受體位點；(iii) gag序列；(iv) Rev反應元件；(v) 增強子；(vi) 轉錄後調控元件；(vii) 與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核酸序列；和 (viii) 微小RNA的目標序列。

【0025】 在一些實施例中，所述核酸序列編碼具有FIX活性的多肽，所述多肽包含與SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列具有至少90%序列同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。

【0026】 在一些實施例中，相較於在HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）中產生的對照慢病毒載體，所述慢病毒載體的表面包含更高位準的CD47蛋白。在一些實施例中，所述慢病毒載體的表面不包含MHC-I。

【0027】 本文還涉及在有需要的受試者中治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予有效劑量的本文公開的慢病毒載體。在一些實施例

中，所述有效劑量少於約 5×10^{10} 轉導單位/kg (TU/kg)、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、或少於約 8×10^8 TU/kg。在一些實施例中，所述有效劑量為約 5×10^{10} TU/kg、約 4.5×10^{10} TU/kg、約 4×10^{10} TU/kg、約 3.5×10^{10} TU/kg、約 3×10^{10} TU/kg、約 2.5×10^{10} TU/kg、約 2×10^{10} TU/kg、約 1.5×10^{10} TU/kg、約 1×10^{10} TU/kg、約 9.5×10^9 TU/kg、約 9×10^9 TU/kg、約 8.5×10^9 TU/kg、約 8×10^9 TU/kg、約 7.5×10^9 TU/kg、約 7×10^9 TU/kg、約 6.5×10^9 TU/kg、約 6×10^9 TU/kg、約 5.5×10^9 TU/kg、約 5×10^9 TU/kg、約 4.5×10^9 TU/kg、約 4×10^9 TU/kg、約 3.5×10^9 TU/kg、約 3×10^9 TU/kg、約 2.5×10^9 TU/kg、約 2×10^9 TU/kg、約 1.5×10^9 TU/kg、約 1×10^9 TU/kg、約 9.5×10^8 TU/kg、約 9×10^8 TU/kg、約 8.5×10^8 TU/kg、約 8×10^8 TU/kg、約 7.5×10^8 TU/kg、約 7×10^8 TU/kg、約 6.5×10^8 TU/kg、約 6×10^8 TU/kg、約 5.5×10^8 TU/kg、約 5×10^8 TU/kg、約 4.5×10^8 TU/kg、約 4×10^8 TU/kg、約 3.5×10^8 TU/kg、約 3×10^8 TU/kg、約 2.5×10^8 TU/kg、約 2×10^8 TU/kg、約 1.5×10^8 TU/kg、或約 1×10^8 TU/kg。在一些實施例中，所述有效劑量少於 5×10^{10} TU/kg、少於 4.5×10^{10} TU/kg、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3.5×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2.5×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1.5×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9.5×10^9 TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8.5×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7.5×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6.5×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5.5×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4.5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3.5×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2.5×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1.5×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9.5×10^8 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、少於約 8.5×10^8 TU/kg、少於約 8×10^8 TU/kg、少於約 7.5×10^8 TU/kg、少於約 7×10^8 TU/kg、少於約 6.5×10^8 TU/kg、少於約 6×10^8 TU/kg、少於約 5.5×10^8 TU/kg、少於約 5×10^8 TU/kg、少於約 4.5×10^8 TU/kg、少於約

4×10^8 TU/kg、少於約 3.5×10^8 TU/kg、少於約 3×10^8 TU/kg、少於約 2.5×10^8 TU/kg、少於約 2×10^8 TU/kg、少於約 1.5×10^8 TU/kg、或少於約 1×10^8 TU/kg。

在一些實施例中，所述有效劑量在 1×10^8 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^8 與 5×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^8 與 1×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^8 與 1×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 2×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 3×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 4×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 5×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg 之間、在 2×10^9 與 6×10^9 TU/kg 之間、在 3×10^9 與 6×10^9 TU/kg 之間、在 4×10^9 與 6×10^9 TU/kg 之間、在 5×10^9 與 6×10^9 TU/kg 之間、在 6×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 7×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 8×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 9×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 1.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 2×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 2.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 3×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 3.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 4×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間、或在 4.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg 之間。

在一些實施例中，所述有效劑量在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 4.5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 4×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 3.5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 3×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 2.5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 2×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 1.5×10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 10^{10} TU/kg 之間、在 1×10^9 與 9×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^9 與 8×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^9 與 7×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^9 與 5×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^9 與 4×10^9 TU/kg 之間、在 1×10^9 與 3×10^9 TU/kg 之間、和在 1×10^9 與 2×10^9 TU/kg 之間。

在一些實施例中，所述有效劑量在 1×10^{10} 與 2×10^{10} TU/kg 之間、在 1.1×10^{10} 與 1.9×10^{10} TU/kg 之間、在 1.2×10^{10} 與 1.8×10^{10} TU/kg 之間、在 1.3×10^{10} 與 1.7×10^{10} TU/kg 之間、或在 1.4×10^{10} 與 1.6×10^{10} TU/kg 之間。

在一些實施例中，所述有效劑量為約 4×10^9 TU/kg 至約 6×10^9 TU/kg。

【0028】 在一些實施例中，所述慢病毒載體以單劑量或多劑量投予。在一些實施例中，所述慢病毒載體經由靜脈內注射投予。在一些實施例中，

所述受試者是兒科受試者。在一些實施例中，所述受試者是成年受試者。

【0029】 在一些實施例中，所述核苷酸序列如SEQ ID NO: 1所示。本文還涉及包含本文公開的核酸序列的載體。在一些實施例中，所述載體包含組織特異性啟動子。在一些實施例中，所述組織特異性啟動子選擇性地增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現。在一些實施例中，選擇性增強具有FIX活性多肽在目標肝細胞中的表現的組織特異性啟動子，包括APOA2啟動子、SERPINA1 (hAAT) 啟動子、mTTR啟動子、MIR122啟動子或其任何組合。在一些實施例中，所述目標肝細胞是肝細胞。

【0030】 在一些實施例中，所述載體包含剪接供體位點。在一些實施例中，所述載體包含剪接受體位點。在一些實施例中，所述載體包含gag序列、pol序列、rev序列、rev反應元件 (RRE) 或其任何組合。在一些實施例中，所述gag序列是全長或截斷的gag序列。在一些實施例中，所述載體包含增強子、微小RNA的目標序列、轉錄後調控元件、包裝訊號、多聚A序列、內含子序列或其任何組合。

【0031】 本文還涉及包含本文公開的核酸序列或載體的細胞。在一些實施例中，所述細胞是哺乳動物細胞。在一些實施例中，所述細胞是CHO細胞、HEK293細胞、BHK21細胞、PER.C6®細胞、NS0細胞和CAP細胞。在一些實施例中，所述細胞是人類細胞。在一些實施例中，所述細胞表現CD47蛋白。在一些實施例中，所述細胞被修飾以過表現CD47。在一些實施例中，與未修飾以過表現CD47的對照細胞相比，所述細胞在所述細胞的表面上包含多至少約1.5倍、至少約2.0倍、至少約2.5倍、至少約3.0倍、至少約3.5倍、至少約4.0倍、至少約4.5倍、至少約5.0倍、至少約5.5倍、至少約6.0倍、至少約6.5倍、至少約7.0倍、至少約7.5倍、至少約8.0倍、至少約8.5倍、至少約9.0倍、至少約9.5倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍的CD47蛋白。在一些實施例中，所述CD47是人類

CD47。在一些實施例中，所述細胞不表現MHC-I。

【0032】 本文還涉及產生慢病毒載體的方法，所述方法包括在合適的條件下培養本文公開的細胞。

【圖式簡單說明】

【0033】 圖1是慢病毒載體（「LV-coFIX-1-R338L」）的載體圖譜，所述慢病毒載體包含編碼具有FIX活性多肽的核酸。

【0034】 圖2A至圖2B是在八周齡投予包含編碼具有FIX活性多肽的核酸序列的慢病毒載體後，HemB小鼠的血漿FIX活性的圖示。圖2A顯示了經由尾靜脈注射法以 $3E9$ 、 $7.5E9$ 、 $2E10$ 或 $6E10$ TU/kg的劑量投予LV-coFIX-1-R338L的血漿FIX活性，並且圖2B顯示了相應的劑量反應曲線。誤差條表示標準差（圖2B）。

【0035】 圖3A至圖3B是在8周齡經由尾靜脈注射法以 $7.5E9$ （圓形）、 $2E10$ （方形）或 $6E10$ （三角形）TU/kg的劑量投予LV-coFIX-1-R338L的HemB小鼠，在長達6個月中的不同時間點的血漿FIX活性（圖3A）和血漿FIX抗原（圖3B）的圖示。誤差條表示標準差（圖3A至圖3B）。

【0036】 圖4A至圖4B是在新生兒、青少年或成年時期，長達6個月中的不同時間點的持續FIX表現（圖4A）和採用相似劑量的LV-FIX劑量反應（圖4B）的圖示。將HemB小鼠在八周齡（方形）或兩日齡（圓形）時以 $7.5E9$ 、 $2E10$ 或 $6E10$ TU/kg的劑量經靜脈內注射投予LV-coFIX-1-R338L；或將HemB小鼠在兩周齡（三角形）時以 $3E9$ 、 $7.5E9$ 或 $2E10$ TU/kg的劑量經靜脈內注射投予LV-coFIX-1-R338L，如圖所示（圖4A）。通過八周齡（方形）、兩周齡（三角形）和兩日齡（圓形）的HemB小鼠在圖4A中測試的各種劑量下以FIX活性來量測劑量反應。誤差條表示標準差（圖4A至圖4B）。

【0037】 圖5是說明投予對照慢病毒載體（LV；黑色圓形）或具有高表面位準的CD47的慢病毒載體（CD47hi LV；灰色圓形）後，NOD小鼠巨噬

細胞中慢病毒載體的載體拷貝數（VCN）的圖，並且測定了存在於巨噬細胞中的慢病毒載體分子的數量。HEK293T細胞VCN資料顯示為對照。誤差條表示標準差。

【0038】 圖6A至圖6C是在投予包含編碼具有FIX活性多肽的核酸序列的慢病毒載體後，豚尾猴（*Macaca nemestrina*）中的血漿FIX活性（圖6A）、血漿FIX抗原（圖6B）和FIX功能（由APTT時間表示；圖6C）的圖示，所述核酸序列包裝在對照慢病毒載體（LV-FIX；#1、#2和#3）、具有高表面位準的CD47的慢病毒載體（CD47^{hi} LV-FIX；#4、#5和#6）或載體對照（vehicle control）（#7）中。

【0039】 圖7A至圖7B是在投予CD47^{hi}慢病毒載體後，以血漿FIX活性（圖7A）和血漿FIX抗原（圖7B）所表示之，於豚尾猴中由慢病毒載體所介導的穩態FIX表現的圖示，所述CD47^{hi}慢病毒載體包括含有編碼具有FIX活性多肽的核酸序列的慢病毒載體，且是以E9 TU/kg的劑量投予。誤差條表示標準差（圖7A至圖7B）。

【0040】 圖8A至圖8D是在投予載具（vehicle，白色圓形）、對照慢病毒載體（LV；黑色圓形）或具有高表面位準的CD47的慢病毒載體（CD47^{hi} LV；灰色圓形）包括含有編碼具有FIX活性的多肽的核酸序列的慢病毒載體的慢病毒載體後，豚尾猴中ALT位準（圖8A）、AST位準（圖8B）、淋巴位準（圖8C）和體溫（圖8D）的圖示。

【0041】 圖9A至圖9C是在投予載具（vehicle，黑色圓形）、對照慢病毒載體（LV；黑色方形）或具有高表面位準的CD47的慢病毒載體（CD47^{hi} LV；空心方形）包括含有編碼具有FIX活性的多肽的核酸序列的慢病毒載體的慢病毒載體後，豚尾猴中MIP-1a（9A）、MIP-1b（9B）和MCP-1（9C）的表現位準的圖示。

【0042】 圖10是說明在向豚尾猴投予載具（vehicle，三角形）、對照慢病毒載體（修正三角形）或CD47^{hi} LV；圓形）後，包含編碼具有FIX活性

多肽的核酸序列的慢病毒載體其組織特異性分佈（通過VCN表示）的散點圖。每個資料集表示一隻豚尾猴。

【0043】 圖11A和圖11B是在投予（以 2.5×10^9 TU/kg的劑量投予的）CD47^高慢病毒載體（包括含有編碼具有FIX活性的肽的核酸序列的慢病毒載體）後，以血漿FIX活性（圖11A）和血漿FIX抗原（圖11B）所表示之，豚尾猴中慢病毒載體所介導的穩態FIX表現的圖示。

【實施方式】

【0044】 本文描述了包含編碼具有FIX活性多肽的核酸的慢病毒載體，及使用所述慢病毒載體的方法。因此，在一些態樣中，本文涉及基因療法，所述基因療法包括投予慢病毒載體，所述慢病毒載體包含含有編碼具有FIX活性多肽的核酸序列的核酸分子。在特定態樣中，本文涉及治療如血友病之出血性障礙（例如，B型血友病）的方法，所述方法包括向受試者投予包含肝臟導向（例如，肝臟導向細胞）最佳化且經密碼子最佳化的FIX核酸序列的慢病毒載體。本文通過基因治療方法滿足了本領域的重要需求，所述基因治療方法致使將包含編碼具有FIX活性多肽的核酸序列之轉基因表現盒，穩定整合到目標細胞的基因組中。

【0045】 當將慢病毒載體以 5×10^{10} 轉導單位/kg（TU/kg）或更低（例如，約 1.5×10^{10} TU/kg或更少、或約 1.5×10^9 TU/kg或更少、或約 1×10^8 TU/kg或更少）的至少一個劑量投予至受試者時，該系統證明了具有FIX活性的多肽在目標細胞（例如，肝細胞）中的長期表現增加。

【0046】 本文的示例性構築體在附圖和序列表中進行了說明。

【0047】 為了提供對說明書和申請專利範圍的清晰理解，係提供了以下定義。

I. 定義

【0048】 應注意，術語「一個/一種（a）」或「一個/一種（an）」實體是指一個/一種或多個/多種該實體：例如，「一個核苷酸序列」應理解為表示一個或多個核苷酸序列。因此，術語「一個/一種（a或an）」、「一個/一種或多個/多種」以及「至少一個/一種」在本文中可以互換使用。

【0049】 術語「約」在本文中用於表示大約、大致、大約地或在.....左右。當術語「約」與數值範圍結合使用時，它通過擴展高於和低於所述數值的邊界來修飾該範圍。通常，術語「約」在本文中用於向上或向下（較高或較低）修飾高於和低於所述值10%差異的數值。

【0050】 出於本文的目的，術語「分離的」表示已經從其原始環境（其天然存在的環境）移取的生物材料（細胞、多肽、多核苷酸，或其片段、變異體或衍生物）。例如，在植物或動物中以天然狀態存在的多核苷酸是未分離的，但是與其天然存在的相鄰核酸分離的相同多核苷酸被認為是「分離的」。不要求具體純化水準。出於本文的目的，宿主細胞中表現的重組產生的多肽和蛋白質被視為是分離的，已經通過任何適當的技術分離、分級分離或部分或基本上純化的天然或重組多肽也被視為是分離的。

【0051】 「核酸」、「核酸分子」、「寡核苷酸」和「多核苷酸」可互換使用並且是指呈單股形式或雙股螺旋的核糖核苷（腺苷、鳥苷、尿苷或胞苷；「RNA分子」）或去氧核糖核苷（去氧腺苷、去氧鳥苷、去氧胸苷或去氧胞苷；「DNA分子」）的磷酸酯聚合形式或其任何磷酸酯類似物，如硫代磷酸酯和硫代酸酯。雙股DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA螺旋是可能的。術語核酸分子、特別是DNA或RNA分子僅僅是指分子的一級和二級結構，並且不將其限制為任何特定三級形式。因此，這個術語包括尤其在線性或環狀DNA分子（例如，限制性片段）、質體、超螺旋化DNA和染色體中發現的雙股DNA。在討論特定雙股DNA分子的結構時，在本文中可以根据正常慣例描述序列，即僅沿DNA的非轉錄鏈（即，具有與mRNA同源的序列的鏈）以5'至3'方向給出序列。「重組DNA分子」是已經經歷分子

生物學操縱的DNA分子。DNA包括但不限於cDNA、基因組DNA、質體DNA、合成DNA和半合成DNA。本文的「核酸組合物」包含如本文所述的一種或多種核酸。

【0052】 如本文所用，「編碼區」或「編碼序列」是多核苷酸中由可轉譯成胺基酸的密碼子組成的部分。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)通常不轉譯成胺基酸，但是可以認為其是編碼區的一部分，但是任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子等)不是編碼區的一部分。編碼區的邊界通常由5'末端的起始密碼子(編碼所得多肽的胺基末端)和3'末端的轉譯終止密碼子(編碼所得多肽的羧基末端)來決定。兩個或更多個編碼區可以存在於單一多核苷酸構築體中(例如，在單一載體上)，或者存在於分開的多核苷酸構築體中(例如，在分開的(不同的)載體上)。那麼，這樣的話，單一載體可以僅含有單個編碼區，或者包含兩個或更多個編碼區。

【0053】 哺乳動物細胞分泌的某些蛋白質與分泌訊息胜肽相關，所述分泌訊息胜肽在當生長中的蛋白質鏈跨越粗糙內質網開始輸出後，會從成熟蛋白質切割下來。一般技術者知道，訊息胜肽通常與多肽的N末端融合，並從完整或「全長」多肽切割，以產生多肽的分泌或「成熟」形式。在某些實施例中，天然訊息胜肽或該序列的功能衍生物，所述功能衍生物保留引導與其可操作地締合的多肽分泌的能力。可替代地，可以使用異源哺乳動物訊息胜肽，例如人組織型纖溶酶原啟動物(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸糖苷酶訊息胜肽，或其功能衍生物。

【0054】 如本文所用，術語「具有FIX活性的多肽」是指具有與凝血因子IX相關的一種或多種活性多肽。多種測試可用於評估凝結系統(包括FIX)的功能：啟動部分促凝血酶原激酶時間(aPTT)測試、呈色測定、ROTEM[®]測定、凝血酶原時間(PT)測試(也用於確定INR)、纖維蛋白原測試(通常通過克勞斯法(Clauss method)進行)、血小板計數、血小板功能測試

（通常通過PFA-100進行）、TCT、出血時間、混合測試（如果將患者的血漿與正常血漿混合，是否矯正異常）、凝血因子測定、抗磷脂抗體、D-二聚體、遺傳測試（例如，因子V Leiden、凝血酶原突變G20210A）、稀釋魯塞爾（Russell）蝰蛇毒時間（dRVVT）、雜項血小板功能測試、凝血彈性描記法（TEG或Sonoclot）、血栓彈性測定（TEM[®]，例如ROTEM[®]）或優球蛋白溶解時間（ELT）。

【0055】 aPTT測試是量測「固有」（也稱為接觸啟動路徑）和常見凝血路徑二者功效的表現指示物。這個測試一般用於量測市售重組凝血因子（例如，FIX）的凝血活性。它與量測外部路徑的凝血酶原時間（PT）結合使用。

【0056】 ROTEM[®]分析提供關於止血的整體動力學的資訊：凝血時間、凝塊形成、凝塊穩定性和溶解。血栓彈性測定中的不同參數依賴於血漿凝結系統的活性、血小板功能、纖維蛋白溶解或影響這些相互作用的許多因素。該測定可以提供次級止血的全面見解。

【0057】 術語「下游」是指位於參考核苷酸序列3'的核苷酸序列。在某些實施例中，下游核苷酸序列是指在轉錄起點之後的序列。例如，基因的轉譯起始密碼子位於轉錄起始位元點的下游。

【0058】 術語「上游」是指位於參考核苷酸序列5'的核苷酸序列。在某些實施例中，上游核苷酸序列是指位於編碼區或轉錄起點的5'側的序列。例如，大多數啟動子位於轉錄起始位點的上游。

【0059】 如本文所用，術語「基因調控區」或「調控區」是指位於編碼區的上游（5'非編碼序列）、內部或下游（3'非編碼序列），並且影響相關編碼區的轉錄、RNA加工、穩定性或轉譯的核苷酸序列。調控區可以包括啟動子、轉譯前導序列、內含子、多聚腺苷酸化識別序列、RNA加工位點、效應子結合位點和莖環結構。如果意圖在真核細胞中表現編碼區，則多聚腺苷酸化信號和轉錄終止序列通常將位於編碼序列的3'。

【0060】 編碼基因產物（例如多肽）的多核苷酸可包括與一個或多個編

碼區可操作地締合的啟動子和/或其他表現(例如,轉錄或轉譯)控制元件。在可操作的締合中,基因產物(例如多肽)的編碼區與一個或多個調控區以如下的方式締合:將基因產物的表現置於一個或多個調控區的影響或控制之下。例如,如果啟動子功能的誘發導致編碼由編碼區編碼的基因產物的mRNA的轉錄,並且如果啟動子與編碼區之間的連接的性質確實不會干擾啟動子引導基因產物表現的能力或干擾DNA範本被轉錄的能力,則編碼區與啟動子是「可操作地締合的」。除了啟動子以外的其他表現控制元件(例如,增強子、操縱子、抑制子和轉錄終止訊號)也可以與編碼區可操作地締合以引導基因產物表現。

【0061】 「轉錄控制序列」是指提供編碼序列在宿主細胞中的表現的DNA調控序列,如啟動子、增強子、終止子等。多種轉錄控制區是熟習此項技術者已知的。這些轉錄控制區包括但不限於作用於脊椎動物細胞中的轉錄控制區,例如但不限於來自巨細胞病毒(立即早期啟動子,與內含子-A結合)、猿猴病毒40(早期啟動子)和逆轉錄病毒(如勞斯肉瘤病毒)的啟動子和增強子區段。其他轉錄控制區包括衍生自脊椎動物基因的那些,如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素和兔 β 珠蛋白,以及能夠控制真核細胞中基因表現的其他序列。另外的合適的轉錄控制區包括組織特異性啟動子和增強子以及淋巴激素誘導型啟動子(例如可由干擾素或介白素誘導的啟動子)。

【0062】 類似地,多種轉譯控制元件是一般技術者已知的。這些包括但不限於核糖體結合位點、轉譯起始和終止密碼子,以及衍生自小核糖核酸病毒的元件(特別是內部核糖體進入位點,或IRES,也稱為CITE序列)。

【0063】 如本文所用的術語「表現」是指多核苷酸產生基因產物(例如RNA或多肽)的過程。它包括但不限於將多核苷酸轉錄成信使RNA(mRNA)、轉移RNA(tRNA)、小髮夾RNA(shRNA)、小干擾RNA(siRNA)或任何其他RNA產物,以及將mRNA轉譯為多肽。表現產生「基因產物」。如

本文所用，基因產物可以是通過基因轉錄產生的核酸（例如信使RNA），或者是從轉錄物轉譯的多肽。本文描述的基因產物還包括經過轉錄後修飾（例如聚腺苷酸化或剪接）的核酸，或經過轉譯後修飾（例如甲基化、糖基化、脂質的添加、與其他蛋白質亞基締合或蛋白水解切割）的多肽。如本文所用，術語「產量」是指通過基因表現產生的多肽的量。

【0064】 「載體」是指用於將核酸選殖（cloning）和/或轉移到宿主細胞中的任何載具。載體可以是複製子，可以將另一核酸區段與其連接以實現所連接區段的複製。「複製子」是指在體內作為自主複製單元（即能夠在其自身控制下複製）起作用的任何遺傳元件（例如質體、噬菌體、粘質體、染色體、病毒）。術語「載體」包括用於體外、離體或體內將核酸引入細胞的病毒和非病毒載具。很多載體是本領域已知和使用的，包括例如質體、修飾的真核病毒或修飾的細菌病毒。通過將合適的多核苷酸片段連接到具有互補粘性末端的選擇載體中，可將多核苷酸插入合適的載體中。

【0065】 可以對載體進行工程化以編碼為可選標記或報導子，所述可選標記或報導子提供對已經併入所述載體的細胞的選擇或鑒定。可選標記或報導子的表現允許鑒定和/或選擇併入並表現載體上包含的其他編碼區的宿主細胞。本領域中已知並使用的可選標記基因的例子包括：提供針對氨苄西林、鏈黴素、慶大黴素、卡那黴素、潮黴素、雙丙氨磷除草劑、磺胺嘧啶等的抗性的基因；和用作表型標記的基因，即花色苷調控基因、異戊烷基轉移酶基因等。本領域中已知並使用的報導子的例子包括：螢光素酶（Luc）、綠色螢光蛋白（GFP）、氯黴素乙醯轉移酶（CAT）、 β -半乳糖苷酶（LacZ）、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶（Gus）等。還可以將可選標記視為報導子。

【0066】 術語「可選標記」是指能夠基於標記基因的效應（即，對抗生素的抗性、對除草劑的抗性、比色標記、酶、螢光標記等）加以選擇的鑒別因子（通常是抗生素或化學抗性基因），其中所述效應用於追蹤所關注核酸的遺傳性和/或鑒別已經遺傳所關注核酸的細胞或生物體。本領域中已

知並使用的可選標記基因的例子包括：提供針對氨苄西林、鏈黴素、慶大黴素、卡那黴素、潮黴素、雙丙氨磷除草劑、磺胺嘧啶等的抗性的基因；和用作表型標記的基因，即花色苷調控基因、異戊烷基轉移酶基因等。

【0067】 術語「報導基因」是指編碼能夠基於報導基因的效應加以鑒別的鑒別因子的核酸，其中所述效應用於追蹤所關注核酸的遺傳性、鑒別已經遺傳所關注核酸的細胞或生物體和/或量測基因表現誘導或轉錄。本領域中已知並使用的報導基因的例子包括：螢光素酶(Luc)、綠色螢光蛋白(GFP)、氯黴素乙醯轉移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(Gus)等。也可以將可選標記基因視為報導基因。

【0068】 「啟動子」與「啟動子序列」可互換使用並且是指能夠控制編碼序列或功能RNA的表現的DNA序列。一般而言，編碼序列位於啟動子序列的3'。啟動子可以整體衍生自天然基因，或者由衍生自在自然界中發現的不同啟動子的不同元件構成，或者甚至包含合成DNA區段。熟習此項技術者應理解，不同的啟動子可以引導基因在不同組織或細胞類型中、或在不同發育階段、或回應不同環境或生理條件而表現。使基因在大多數細胞類型中在大多數時間表現的啟動子一般被稱為「持續型(constitutive)啟動子」。使基因在特定細胞類型中表現的啟動子一般被稱為「細胞特異性啟動子」或「組織特異性啟動子」。使基因在發育或細胞分化的特定階段表現的啟動子一般被稱為「發育特異性啟動子」或「細胞分化特異性啟動子」。在用誘導啟動子的試劑、生物分子、化學品、配位體、光等對細胞進行暴露或處理後被誘發並且使基因表現的啟動子一般被稱為「誘導型啟動子」或「可調型啟動子」。還認識到，由於在大多數情況下，尚未完全限定調控序列的確切邊界，所以不同長度的DNA片段可以具有相同的啟動子活性。

【0069】 啟動子序列通常以其3'末端的轉錄起始位點為邊界，並向上游(5'方向)延伸以包括以高於背景的可偵檢位準起始轉錄所必需的最小數目的鹼基或元件。在啟動子序列內將發現轉錄起始位點（例如通過用核酸酶

S1映射（mapping）簡便地限定）以及負責RNA聚合酶結合的蛋白質結合結構域（共有序列）。

【0070】 術語「質體」是指染色體外元件，其通常攜帶不是細胞中心代謝的一部分的基因，並且通常是環狀雙股DNA分子的形式。此類元件可以是衍生自任何來源的單股或雙股DNA或RNA的線性、環狀或超螺旋化的自主複製序列、基因組整合序列、噬菌體或核苷酸序列，其中多個核苷酸序列已經接合或重組至獨特構築體中，所述構築體能夠將用於所選基因產物的啟動子片段和DNA序列以及適當的3'非轉譯序列引入細胞中。

【0071】 「轉殖載體（cloning vector）」是指「複製子」，其是單位長度的核酸，其為連續複製並包含複製起點，如質體、噬菌體或粘質體，另一核酸區段可以與所述複製子連接以實現所連接區段的複製。某些轉殖載體能夠在一個細胞類型（例如細菌）中複製並在另一個細胞類型（例如真核細胞）中表現。轉殖載體通常包含可用於選擇包含所述載體的細胞的一個或多個序列，和/或用於插入所關注核酸序列的一個或多個多轉殖位點。

【0072】 術語「表現載體」是指設計用於使得插入的核酸序列在插入宿主細胞內後能夠表現的載具。如上所述，將插入的核酸序列置於與調控區可操作地締合。

【0073】 通過本領域熟知的方法將載體引入宿主細胞內，所述方法例如轉染、電穿孔、顯微注射、轉導、細胞融合、DEAE葡聚糖、磷酸鈣沈澱、脂轉染（溶酶體融合）、基因槍或DNA載體轉運蛋白的使用。如本文所用，「慢病毒載體」是指複製缺陷型雜交病毒顆粒。在一些情況下，慢病毒載體是指慢病毒載體顆粒和封閉的慢病毒基因組。在一些情況下，慢病毒載體是指慢病毒基因組，包括其任何修飾。

【0074】 如本文所用，「培養」（「culture」、「to culture」和「culturing」）意指在允許細胞生長或分裂的體外條件下孵育細胞或使細胞維持存活狀態。如本文所用，「培養的細胞」是指體外繁殖的細胞。

【0075】 如本文所用，術語「多肽」意在涵蓋單數「多肽」以及複數「多肽」，並且是指由通過醯胺鍵（也稱為肽鍵）線性連接的單體（胺基酸）構成的分子。術語「多肽」是指兩個或更多個胺基酸的任何一條或多條鏈，而不是指特定長度的產物。因此，肽、二肽、三肽、寡肽、「蛋白質」、「胺基酸鏈」或用於指代兩個或更多個胺基酸的一條或多條鏈的任何其他術語均包括在「多肽」的定義中，且術語「多肽」可以代替這些術語中的任何術語使用，或可以與這些術語中的任何術語互換使用。術語「多肽」還意指多肽的表現後修飾的產物，所述表現後修飾包括但不限於糖基化、乙醯化、磷酸化、醯胺化、通過已知保護/封閉基團衍生化、蛋白水解切割或通過非天然存在胺基酸進行的修飾。多肽可以衍生自天然生物來源或通過重組技術產生，但不一定從指定的核酸序列轉譯。它可以以任何方式生成，包括通過化學合成。

【0076】 術語「胺基酸」包括丙胺酸（Ala或A）；精胺酸（Arg或R）；天門冬醯胺酸（Asn或N）；天門冬胺酸（Asp或D）；半胱胺酸（Cys或C）；麩醯胺酸（Gln或Q）；麩胺酸（Glu或E）；甘胺酸（Gly或G）；組胺酸（His或H）；異白胺酸（Ile或I）；白胺酸（Leu或L）；離胺酸（Lys或K）；甲硫胺酸（Met或M）；苯丙胺酸（Phe或F）；脯胺酸（Pro或P）；絲胺酸（Ser或S）；蘇胺酸（Thr或T）；色胺酸（Trp或W）；酪胺酸（Tyr或Y）；和纈胺酸（Val或V）。非傳統胺基酸也在本文的範圍內，並且包括正白胺酸、鳥胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸和其他胺基酸殘基類似物，如Ellman等人 *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991)中所述的那些。為了產生此類非天然存在的胺基酸殘基，可以使用Noren等人 *Science* 244:182 (1989)和Ellman等人（同前註）的程序。簡單來說，這些程序涉及用非天然存在的胺基酸殘基化學啟動抑制劑tRNA，之後進行RNA的體外轉錄和轉譯。引入非傳統胺基酸也可以使用本領域中已知的肽化學來實現。如本文所用，術語「極性胺基酸」包括具有零個淨電荷，但是在其側鏈的不同部分具有非零部分電荷的胺基酸（例

如，M、F、W、S、Y、N、Q、C）。這些胺基酸可以參與疏水相互作用和靜電相互作用。如本文所用，術語「帶電胺基酸」包括在其側鏈上具有非零淨電荷的胺基酸（例如，R、K、H、E、D）。這些胺基酸可以參與疏水相互作用和靜電相互作用。

【0077】 本文還包括多肽的片段或變異體及其任何組合。當提及本文的多肽結合結構域或結合分子時，術語「片段」或「變異體」包括保留參考多肽的至少一些特性（例如，對於FcRn結合結構域或Fc變異體的FcRn結合親和力，對於具有FIX活性的多肽的凝結活性）的任何多肽。除了本文其他地方討論的特異性抗體片段之外，多肽的片段還包括蛋白水解片段以及缺失片段，但不包括天然存在的全長多肽（或成熟多肽）。本文的多肽結合結構域或結合分子的變異體包括如上所述的片段，以及由於胺基酸取代、缺失或插入而具有改變的胺基酸序列的多肽。變異體可以是天然存在的或非天然存在的。非天然存在的變異體可以使用本領域中已知的突變誘發技術來產生。變異體多肽可包含保守性或非保守性胺基酸取代、缺失或添加。

【0078】 「保守性胺基酸取代」是其中用具有類似側鏈的胺基酸殘基替代胺基酸殘基的取代。本領域已經定義了具有相似側鏈的胺基酸殘基家族，包括鹼性側鏈（例如離胺酸、精胺酸、組胺酸）、酸性側鏈（例如天門冬胺酸、麩胺酸）、不帶電荷的極性側鏈（例如甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸）、非極性的側鏈（例如丙胺酸、缬胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸）、 β -分支側鏈（例如蘇胺酸、缬胺酸、異白胺酸）、以及芳香族側鏈（例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸）。因此，如果多肽中的胺基酸被來自相同側鏈家族的另一種胺基酸替代，則所述取代被認為是保守性的。在另一個實施例中，一串胺基酸可以用側鏈家族成員的順序和/或組成不同的結構上相似的串保守地替代。

【0079】 如本領域中已知的術語「同一性百分比」是兩個或更多個多肽

序列或者兩個或更多個多核苷酸序列之間的關係，如通過比較序列所確定。在本領域中，根據具體情況，「同一性」也意指多肽或多核苷酸序列之間的序列關聯性程度，如通過此類序列的串之間的匹配所確定。「同一性」可以通過已知的方法容易地計算出，所述方法包括但不限於以下文獻中所述的那些：*Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., 編輯) Oxford University Press, 紐約(1988)；*Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., 編輯) Academic Press, 紐約(1993)；*Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., 和Griffin, H. G., 編輯) Humana Press, 新澤西州(1994)；*Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., 編輯) Academic Press (1987)；和*Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. 和Devereux, J., 編輯) Stockton Press, 紐約(1991)。確定同一性的較佳方法設計為給出所測試序列之間的最佳匹配。確定同一性的方法被編纂於可公開獲得的電腦程式中。序列比對和同一性百分比計算可以使用序列分析軟體來進行，所述序列分析軟體是例如LASERGENE生物資訊學計算套件的Megalign程式 (DNASTAR Inc., 威斯康辛州麥迪森市)、GCG程式套件(Wisconsin Package 9.0版, Genetics Computer Group(GCG), 威斯康辛州麥迪森市)、BLASTP、BLASTN、BLASTX(Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990))和DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. 威斯康辛州麥迪森市 53715 美國)。

【0080】 在本申請案的上下文中將理解，在使用序列分析軟體進行分析的情況下，除非另外指定，否則分析結果將基於所參考程式的「缺省值 (default values)」。如本文所用的「缺省值」將意指在首次初始化時最初用軟體載入的任一組值或參數。

【0081】 「融合」或「嵌合」蛋白質包含與第二胺基酸序列連接的第一胺基酸序列，所述第一胺基酸序列與所述第二胺基酸序列在自然界中不天然連接。通常存在於分開的蛋白質中的胺基酸序列可以在融合多肽中聚集在一起，或者通常存在於相同蛋白質中的胺基酸序列可以以新的排列方式

置於融合多肽中，例如，本文的FIX結構域與Ig Fc結構域的融合物。例如，通過化學合成，或通過產生和轉譯多核苷酸來產生融合蛋白，在所述多核苷酸中以所需關係編碼肽區域。嵌合蛋白還可以包含通過共價非肽鍵或非共價鍵與第一胺基酸序列締合的第二胺基酸序列。

【0082】 如本文所用，術語「插入位點」是指具有FIX活性的多肽或其片段、變異體或衍生物中的位置，所述位置緊接可以插入異源部分的位置的上游。「插入位點」被指定為編號，所述編號是在人類FIX R338L變異體（SEQ ID NO: 11至12）中插入位點對應的胺基酸的編號，所述胺基酸緊接插入位置的N末端，除非另有說明。

【0083】 如本文所用的片語「緊接胺基酸的下流」是指緊挨胺基酸的末端羧基的位置。類似地，片語「緊接胺基酸的上游」是指緊挨胺基酸的末端胺基的位置。

【0084】 如本文所用的術語「插入的（inserted）」、「插入（is inserted）」、「插入至（inserted into）」或語法相關術語是指相對於天然成熟人類FIX中的類似位置，異源部分在重組FIX多肽中的位置。如本文所用，所述術語是指重組FIX多肽相對於天然成熟人類FIX的特徵，並不表示、暗示或意指製備重組FIX多肽的任何方法或工藝。

【0085】 如本文所用，術語「半衰期」是指具體多肽在體內的生物半衰期。半衰期可以表示為投予受試者的數量的一半被從動物的循環性和/或其他組織中清除所需的時間。當給定多肽的清除曲線被視為時間的函數時，所述曲線通常是雙相的，具有快速的 α 相和更長的 β 相。 α 相通常表示所投予的Fc多肽在血管內與血管外空間之間的平衡，並且部分取決於多肽的大小。 β 相通常表示多肽在血管內空間中的分解代謝。在一些實施例中，FIX和包含FIX的嵌合蛋白是單相的，並且因此不具有 α 相，而是只具有單一 β 相。因此，在某些實施例中，本文所用的術語半衰期是指多肽在 β 相中的半衰期。

【0086】 如本文所用的術語「連接」是指第一胺基酸序列或核苷酸序列

分別與第二胺基酸序列或核苷酸序列共價或非共價接合。第一胺基酸或核苷酸序列可以與第二胺基酸或核苷酸序列直接接合或並置，或者可替代地，間插序列可以將第一序列與第二序列共價接合。術語「連接」不僅指第一胺基酸序列在C末端或N末端與第二胺基酸序列融合，還包括將整個第一胺基酸序列（或第二胺基酸序列）插入第二胺基酸序列（或第一胺基酸序列，分別地）中的任何兩個胺基酸中。在一個實施例中，第一胺基酸序列可以通過肽鍵或連接子連接至第二胺基酸序列。第一核苷酸序列可以通過磷酸二酯鍵或連接子連接至第二核苷酸序列。連接子可以是肽或多肽（對於多肽鏈）或者核苷酸或核苷酸鏈（對於核苷酸鏈）或任何化學部分（對於多肽和多核苷酸鏈二者）。術語「連接」也用連字號（-）表示。

【0087】 如本文所用，術語「與.....締合」是指在第一胺基酸鏈與第二胺基酸鏈之間形成的共價或非共價鍵。在一個實施例中，術語「與.....締合」是指共價、非肽鍵或非共價鍵。這種締合可以用冒號表示，即（:）。在另一個實施例中，它指除肽鍵外的共價鍵。例如，胺基酸半胱胺酸包含硫醇基，所述硫醇基可與第二半胱胺酸殘基上的硫醇基形成二硫鍵或二硫橋。在大多數天然存在的IgG分子中，CH1區域和CL區域通過二硫鍵締合，並且這兩個重鏈使用Kabat編號系統（位置226或229，EU編號系統）在對應於239和242的位置處通過兩個二硫鍵締合。共價鍵的例子包括但不限於肽鍵、二硫鍵、 σ 鍵、 π 鍵、 δ 鍵、糖苷鍵、抓氫鍵（agnostic bond）、彎曲鍵、偶極鍵、 π 背鍵（backbond）、雙鍵、三鍵、四重鍵、五重鍵、六重鍵、共軛鍵、超共軛鍵、芳香鍵、哈普托鍵（hapticity）或反鍵（antibonding）。非共價鍵的非限制性例子包括離子鍵（例如陽離子- π 鍵或鹽鍵）、金屬鍵、氫鍵（例如二氫鍵、雙氫配合物、低勢壘氫鍵或對稱氫鍵）、凡德瓦力、倫敦分散力、機械鍵、鹵鍵、親金作用、插層反應、堆積、熵力或化學極性。

【0088】 本文所用的術語「單體-二聚體雜合物」是指包含通過二硫鍵相

互締合的第一多肽鏈和第二多肽鏈的嵌合蛋白，其中第一鏈包含凝血因子（例如，FIX）和第一Fc區，並且第二鏈包含無凝血因子的第二Fc區，基本上由所述第二Fc區組成或由所述第二Fc區組成。因此，單體-二聚體雜合構築體是包含僅具有一種凝血因子的單體態樣和具有兩個Fc區的二聚體態樣的雜合物。

【0089】 如本文所用的止血意指停止或減慢出血（bleeding）或出血症（hemorrhage）；或者停止或減慢經過血管或身體部分的血液。

【0090】 如本文所用，止血障礙是指基因遺傳性或獲得性病症，其特徵在於由於形成纖維蛋白凝塊的能力受損或不能形成纖維蛋白凝塊，自發地或由於創傷而容易出血的傾向。此類障礙的例子包括血友病。三種主要形式是A型血友病（因子VIII缺乏）、B型血友病（因子IX缺乏或「Christmas氏病」）和血友病C（因子XI缺乏，輕度出血傾向）。其他止血障礙包括例如溫韋伯氏疾病（von Willebrand disease）、因子XI缺乏（PTA缺乏）、因子XII缺乏、纖維蛋白原、凝血酶原、因子V、因子VII、因子X或因子XIII的缺乏或結構異常、伯納德－蘇里爾症候群（Bernard-Soulier syndrome，它是GPIb的缺陷或缺乏）。vWF受體GPIb可能缺陷並導致缺少初級凝塊形成（初級止血）和增加的出血傾向、以及Glanzmann和Naegeli的血小板無力症（Glanzmann血小板無力症）。在肝功能衰竭（急性和慢性形式）中，肝臟的凝血因子產生不足；這可能增加出血風險。

【0091】 包含本文的經分離的核酸分子的慢病毒載體可預防性地使用。如本文所用，術語「預防性治療」是指在出血發作之前投予分子。在一個實施例中，需要一般止血劑的受試者正在進行或即將進行手術。例如，本文的慢病毒載體可以作為預防藥在手術之前或之後投予。本文的慢病毒載體可以在手術期間或之後投予以控制急性出血發作。手術可包括但不限於肝移植、肝切除、牙科手術或幹細胞移植。

【0092】 本文的慢病毒載體也用於按需治療。術語「按需治療」是指響

應於出血發作的症狀或在可能引起出血的活動之前投予本文公開的慢病毒載體。在一個態樣中，可以在出血開始時（如在損傷後）或在預期要出血時（如在手術前），將按需治療投予受試者。在另一個態樣中，可以在增加出血風險的活動（如接觸運動）之前投予按需治療。

【0093】 如本文所用，術語「急性出血」是指無論任何根本原因的出血發作。例如，受試者可能患有創傷、尿毒癥、遺傳性出血性障礙（例如，FIX缺乏）、血小板障礙或由於產生針對凝血因子的抗體而出現的抗性。

【0094】 舉例來說，本文所用的治療（treat、treatment、treating）是指疾病或病症嚴重程度的降低；病程持續時間的縮短；與疾病或病症有關的一種或多種症狀的改善；為患有疾病或病症的受試者提供有益的效果，而不一定治癒所述疾病或病症，或預防與疾病或病症相關的一種或多種症狀。在一個實施例中，術語「治療」（「treating」或「treatment」）指通過投予本文的慢病毒載體，將受試者中FIX低谷位準維持在至少約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或20 IU/dL。在另一個實施例中，治療（treating或treatment）是指將FIX低谷位準維持在約1 IU/dL與約20 IU/dL之間、約2 IU/dL與約20 IU/dL之間、約3 IU/dL與約20 IU/dL之間、約4 IU/dL與約20 IU/dL之間、約5 IU/dL與約20 IU/dL之間、約6 IU/dL與約20 IU/dL之間、約7 IU/dL與約20 IU/dL之間、約8 IU/dL與約20 IU/dL之間、約9 IU/dL與約20 IU/dL之間、或約10 IU/dL與約20 IU/dL之間。疾病或病症的治療（treatment或treating）還可以包括將受試者的FIX活性維持在與非血友病受試者中FIX活性的至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、或20%相當的位準。在一個實施例中，術語「治療」（「treating」或「treatment」）指通過投予本文的慢病毒載體，將受試者中FIX低谷位準維持在至少約30 IU/dL、40 IU/dL、50 IU/dL、60

IU/dL、70 IU/dL、80 IU/dL、90 IU/dL、100 IU/dL、110 IU/dL、120 IU/dL、130 IU/dL、140 IU/dL、或150 IU/dL。在另一個實施例中，治療（treating或treatment）意指將FIX低谷位準維持在約10與約20 IU/dL之間、約20與約23 IU/dL之間、約30與約40 IU/dL之間、約40與約50 IU/dL之間、約50與約60 IU/dL之間、約60與約70 IU/dL之間、約70與約80 IU/dL之間、約80與約90 IU/dL之間、約90與約100 IU/dL之間、約110與約120 IU/dL之間、約120與約130 IU/dL之間、約130與約140 IU/dL之間、或約140與約150 IU/dL之間。疾病或病症的治療（treatment或treating）還可以包括將受試者的FIX活性維持在與非血友病受試者中FIX活性的至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、或150%相當的水準。治療所需的最低之低谷位準可以通過一種或多種已知方法量測，並且可以針對每個人進行調整（增加或減少）。

【0095】 如本文所用，「投予」意指經由醫藥上可接受的途徑將本文的醫藥上可接受的編碼FIX的核酸分子、FIX多肽、或包含編碼FIX的核酸分子的載體投予至受試者。投予途徑可以是靜脈內的，例如靜脈內注射和靜脈內輸注。其他投予途徑包括例如皮下、肌肉內、口服、經鼻和經肺投予。核酸分子、多肽和載體可以作為包含至少一種賦形劑的醫藥組合物的一部分來投予。

【0096】 如本文所用，片語「有需要的受試者」包括將受益於本文的核酸分子、多肽或載體的投予例如以改良止血的受試者（如哺乳動物受試者）。在一個實施例中，受試者包括但不限於患有血友病的個體。在另一個實施例中，受試者包括但不限於已經產生FIX抑制劑，並且因此需要旁路療法的個體。受試者可以是成年人或未成年人（例如，小於12歲）。在一些實施例中，受試者是女性。在其他實施例中，受試者是男性。

【0097】 如本文所用，術語「凝血因子」是指天然存在的或重組產生的

分子或其類似物，其預防受試者的出血發作或縮短出血發作的持續時間。換句話說，其意指具有促凝血活性（即，負責將纖維蛋白原轉化為不溶性纖維蛋白的網狀物，從而引起血液凝結或凝塊）的分子。「可啟動的凝血因子」是呈能夠被轉化為活性形式的無活性形式（例如，呈其酶原形式）的凝血因子。

【0098】 如本文所用的凝血活性意指參與生化級聯反應的能力，所述級聯反應以形成纖維蛋白凝塊告終和/或降低出血症或出血發作的嚴重程度、持續時間或頻率。

【0099】 如本文所用，術語「異源的」或「外源的」是指此類分子通常在指定背景下（例如，在細胞中或在多肽中）未發現。例如，外源或異源分子可以例如通過轉染或其他形式的遺傳工程化引入細胞中並且僅在操縱細胞之後存在，或者異源胺基酸序列可以存在於其天然不存在的蛋白質中。

【0100】 如本文所用，術語「異源核苷酸序列」是指不與指定多核苷酸序列一起天然存在的核苷酸序列。在一個實施例中，異源核苷酸序列編碼能夠延長FIX的半衰期的多肽。在另一個實施例中，異源核苷酸序列編碼增加FIX的流體動力學半徑的多肽。在其他實施例中，異源核苷酸序列編碼改善FIX的一種或多種藥物代謝動力學特性但不顯著影響其生物學活性或功能（例如，其促凝血活性）的多肽。在一些實施例中，FIX通過連接子與異源核苷酸序列編碼的多肽連接或相連。異源核苷酸序列編碼的多肽部分的非限制性例子尤其包括免疫球蛋白恆定區或其部分、白蛋白或其片段、白蛋白結合部分、轉鐵蛋白、美國專利申請號20100292130的PAS多肽、HAP序列、轉鐵蛋白或其片段、人類絨毛膜促性腺激素的 β 次單元的C末端肽（CTP）、白蛋白結合小分子、XTEN序列、FcRn結合部分（例如，完整Fc區或其結合至FcRn的部分）、單鏈Fc區（ScFc區，例如如US 2008/0260738、WO 2008/012543或WO 2008/1439545中所述）、聚甘胺酸連接子、聚絲胺酸

連接子、選自甘胺酸（G）、丙胺酸（A）、絲胺酸（S）、蘇胺酸（T）、麩胺酸（E）和脯胺酸（P）的兩種類型胺基酸的6-40個胺基酸的肽和短多肽（具有從小於50%至大於50%變化的二級結構程度）、或其兩個或更多個組合。在一些實施例中，異源核苷酸序列編碼的多肽連接至非多肽部分。非多肽部分的非限制性例子包括聚乙二醇（PEG）、白蛋白結合小分子、聚唾液酸（PAS）、羥乙基澱粉（HES）、其衍生物或其任何組合。

【0101】 如本文所用，術語「Fc區」定義為多肽中對應於天然Ig的Fc區的部分，即如通過其兩條重鏈的相應Fc結構域的二聚締合所形成。天然Fc區與另一Fc區形成同二聚體。相比之下，如本文所用的術語「遺傳融合的Fc區」或「單鏈Fc區」（scFc區）是指合成二聚Fc區，其包括在單一多肽鏈內遺傳連接（即，在單個連續基因序列中編碼）的Fc結構域。

【0102】 在一個實施例中，「Fc區」是指單一Ig重鏈中的部分，所述部分始於緊鄰木瓜蛋白酶切割位點（即，IgG中的殘基216，以重鏈恆定區的第一個殘基為114）上游的鉸鏈區並終於抗體的C末端。因此，完整Fc結構域至少包含鉸鏈結構域、CH2結構域和CH3結構域。

【0103】 根據Ig同型，Ig恆定區的Fc區可以包括CH2、CH3和CH4結構域以及鉸鏈區。包含Ig的Fc區的嵌合蛋白賦予嵌合蛋白若干種所需特性，包括增加的穩定性、增加的血清半衰期（參見Capon等人, 1989, *Nature* 337:525）以及與Fc受體（如新生Fc受體（FcRn））的結合（美國專利號6,086,875、6,485,726、6,030,613；WO 03/077834；US2003-0235536A1），上述文獻通過引用以其整體併入本文。

【0104】 如本文所用，關於核苷酸序列的術語「最佳化的」是指編碼多肽的多核苷酸序列，其中所述多核苷酸序列已經突變以增強該多核苷酸序列的特性。在一些實施例中，進行最佳化以增加轉錄水準、增加轉譯水準、增加穩態mRNA水準、增加或減少調控蛋白（如一般轉錄因子）的結合、增加或減少剪接或增加多核苷酸序列產生的多肽的產量。可以對多核苷酸序

列進行以使其最佳化的變化的例子包括密碼子最佳化、G/C含量最佳化、去除重複序列、去除富含AT的元件、去除隱蔽剪接位點、去除阻遏轉錄或轉譯的順式作用元件、添加或去除多聚T或多聚A序列、在轉錄起始位點周圍添加增強轉錄的序列（如Kozak共有序列）、去除可以形成莖環結構（stem loop structure）的序列、去除穩定序列及其兩個或更多個組合。

II. FIX慢病毒基因療法

【0105】 體細胞基因治療作為一種可能的治療出血性疾病，特別是血友病的治療方法已經被探索出來。基因療法是一種特別有吸引力的血友病治療，因為它具有通過在單次投予編碼FIX的載體後，持續地內源性產生FIX來治癒疾病的潛力。B型血友病非常適合基因替代方法，因為其臨床表現是由功能性FIX的表現降低造成的。

【0106】 慢病毒載體由於其經由整合來維持轉基因表現的巨大容量和能力，作為基因遞送載具越來越受到重視。慢病毒載體已經在眾多的離體（*ex-vivo*）細胞療法臨床專案中，被評估為具有良好的功效和安全性。

【0107】 本文提供了在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向受試者投予有效劑量的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列。在一些實施例中，慢病毒載體包裝在慢病毒顆粒中，所述慢病毒載體包含比對照慢病毒載體（例如在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體）更高位準的表面CD47蛋白表現，所述對照慢病毒載體不具有高表面表現量的CD47蛋白，即含有正常（自然）表面表現量的CD47蛋白。在一些實施例中，相對於誘導與慢病毒載體相同的FIX活性所需的對照慢病毒載體的對照劑量，有效劑量降低。

【0108】 本文的其他態樣提供了在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予低於 5×10^{10} 轉導單位/kg（TU/kg）

的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有因子IX（FIX）活性的多肽的核苷酸序列，其中所述慢病毒載體包含與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核苷酸序列。

【0109】 在一些實施例中，相對於對照慢病毒載體，受試者在投予後展現出慢病毒載體的巨噬細胞轉導減少。在一些實施例中，相對於對照慢病毒載體，受試者在投予後展現出降低的對慢病毒載體的同種特異性免疫反應。在一些實施例中，受試者在投予至少3周後展現出相對於正常FIX活性為至少30%的FIX活性。在一些實施例中，受試者在投予後展現出慢病毒載體在肝、脾或在肝和脾二者中的組織特異性表現。

【0110】 在一些實施例中，同種特異性反應包含回應於投予的慢病毒載體的細胞激素的釋放。在一些實施例中，相對於在投予對照慢病毒載體後的細胞激素的表現，受試者在投予慢病毒載體後展現出與同種特異性反應相關的細胞激素的較低表現。在一些實施例中，細胞激素是促炎性細胞激素。在某些實施例中，細胞激素選自MIP-1a、MIP-1b、MCP-1、介白素-2（IL-2）、干擾素 γ 及其任何組合。在某些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MIP-1a表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MIP-1a表現。在某些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MIP-1b表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MIP-1b表現。在某些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MCP-1表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MCP-1表現。在某些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的IL-2表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的IL-2表現。在某些實施例中，相對於在投予所述對照慢病毒載體之後

的干擾素 γ 表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的干擾素 γ 表現。

【0111】 在一些實施例中，相對於在投予對照慢病毒載體後細胞激素的表現，細胞激素的表現降低了至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在某些實施例中，在投予慢病毒載體後偵檢不到細胞激素的表現。在某些實施例中，受試者在投予慢病毒載體後選自MIP-1a、MIP-1b、MCP-1、介白素-2（IL-2）、干擾素 γ 及其任何組合的細胞激素其表現係無法檢測到。

【0112】 在一些實施例中，相對於投予前的血漿FIX活性，受試者在投予慢病毒載體後展現出增加的血漿FIX活性。在一些實施例中，在投予後至少1天、至少約2天、至少約3天、至少約4天、至少約5天、至少約6天、至少約7天、至少約8天、至少約9天、至少約10天、至少約11天、至少約12天、至少約13天、至少約14天、至少約3周、至少約4周、至少約5周、至少約6周、至少約7周、或至少約8周觀察到增加。在一些實施例中，相對於投予對照慢病毒載體的對照劑量的受試者，在投予慢病毒載體後約12小時至約60小時、約12小時至約48小時、約12小時至約36小時、約12小時至約24小時、約24小時至約60小時、約24小時至約48小時、約24小時至約36小時、約36小時至約60小時、約36小時至約48小時、或約48小時至約60小時的血漿FIX活性增加。在一些實施例中，在投予慢病毒載體後至少一周、兩周或三周，投予慢病毒載體後的FIX活性為相對於正常FIX活性的至少約75%、至少約100%、至少約125%、至少約150%、至少約175%、至少約200%、至少約225%、至少約250%、至少約275%、或至少約300%。在某些實施例中，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後至少三周展現出相對於正常FIX活性至少約150%的FIX活性。在某些實施例中，所述受試者在投予所述慢病

毒載體之後至少三周展現出相對於正常FIX活性至少約200%的FIX活性。在某些實施例中，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後至少三周展現出相對於正常FIX活性至少約225%的FIX活性。

【0113】 在一些實施例中，相對於投予所述對照慢病毒載體的對照劑量的受試者，所述血漿FIX活性在投予後增加了至少約2倍、至少約3倍、至少約4倍、至少約5倍、至少約6倍、至少約7倍、至少約8倍、至少約9倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、或至少約200倍。

【0114】 在一些實施例中，在投予後，慢病毒載體特異性地定位於受試者的肝、脾或肝和脾二者，其中在肝、脾或肝和脾二者中發現的慢病毒載體濃度大於受試者體內的另外的器官。在一些實施例中，受試者體內的其他器官選自睪丸、淋巴結、肌肉、胸腺、腎、肺、心臟、額葉皮質、視丘、尾狀核、丘（colliculi）、小腦、周邊血液單核球（PBMC）及其任何組合。在一些實施例中，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，所述受試者展現出所述慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加。慢病毒載體的定位可以使用本領域已知的任何方法和/或單位來量測和/或表示。在一些實施例中，所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的載體拷貝數（VCN）高至少約2倍、至少約3倍、至少約4倍、至少約5倍、至少約6倍、至少約7倍、至少約8倍、至少約9倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、

至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、至少約200倍、至少約250倍、至少約300倍、至少約400倍、或至少約500倍。

【0115】 在某些實施例中，受試者展現出慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少10倍。在某些實施例中，受試者展現出慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少50倍。在某些實施例中，受試者展現出慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少100倍。在某些實施例中，受試者展現出慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少150倍。

A. 免疫反應抑制

【0116】 在一些實施例中，慢病毒載體（例如慢病毒顆粒）在其表面上含有一種或多種多肽，在投予至人類受試者後所述一種或多種多肽抑制對慢病毒載體的免疫反應。本文的某些態樣涉及慢病毒載體或向受試者投予慢病毒載體的方法，其中慢病毒載體在其表面上含有CD47。在一些實施例中，慢病毒載體的表面包含一種或多種CD47分子。CD47是「自體標記

(marker of self) 蛋白，其在人類細胞上廣泛表現。CD47的表面表現抑制巨噬細胞誘發的內源性細胞的吞噬作用，其係藉由CD47與巨噬細胞所表現的SIRP α 間的相互作用。表現高量CD47的細胞，在體內較不可能被人類巨噬細胞所靶向和破壞。

【0117】 在一些實施例中，慢病毒載體在其表面上包含高濃度的CD47多肽分子。在一些實施例中，慢病毒載體包含編碼CD47蛋白的異源多核苷酸，其中編碼CD47的異源多核苷酸係被表現。在一些實施例中，慢病毒載體進一步包含編碼CD47蛋白的異源多核苷酸，其中編碼CD47的異源多核苷酸係被表現。

【0118】 在一些實施例中，慢病毒載體具有較高量的CD47蛋白，因為所述慢病毒載體是在具有CD47的高表現位準的細胞株中所產生的。在某些實施例中，慢病毒載體在CD47^高細胞中產生，其中所述細胞在細胞膜上具有CD47的高表現。在特定實施例中，慢病毒載體在CD47^高 HEK 293T細胞中產生，其中相對於未修飾的HEK293T細胞中的CD47表現情況，該HEK 293T係經修飾以具有增加的CD47表現。在一些實施例中，相對於未修飾的HEK 293T細胞，該HEK 293T細胞係經修飾以過表現內源性CD47。在一些實施例中，通過用表現異源CD47的載體轉導HEK293T細胞來修飾HEK 293T細胞。在一些實施例中，表現異源CD47的載體包括逆轉錄病毒載體。在某些實施例中，逆轉錄病毒載體是 γ -逆轉錄病毒載體。在一些實施例中，表現異源CD47的載體不能被慢病毒載體交叉包裝。

【0119】 在某些態樣，本文涉及在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予有效劑量的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列，其中相較於HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體，所述慢病毒載體包含有更高表面表現量的CD47蛋白，並且其中相對於誘發與所述慢病毒載體相同的FIX活性所需的對照慢病毒載體的對照劑量，有效劑量降低。不受

任何機制的束縛，認為慢病毒載體表面上的CD47表現保護慢病毒載體免於受試者免疫系統的降解和/或去除，並防止和/或降低對慢病毒載體的免疫反應。

【0120】 在一些實施例中，CD47是人類CD47(NCBI登錄號NP_001768.1)。在某些實施例中，CD47包含與SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列至少60%、至少約70%、至少70%、至少約80%、至少85%、至少約90%、至少95%、至少約96%、至少97%、至少約98%、至少99%、或約100%相同的胺基酸序列。在特定實施例中，人類CD47包含SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列。

【0121】 在一些實施例中，CD47是由慢病毒載體表現。在其他實施例中，CD47不是由慢病毒載體表現。在某些實施例中，慢病毒載體在宿主細胞中表現，其中宿主細胞被修飾以表現CD47。在一些實施例中，所述宿主細胞經修飾以過表現CD47。在某些實施例中，慢病毒載體是在與HEK293細胞(ATCC® CRL-1573™)相比表現高濃度CD47的宿主細胞中產生的。在特定實施例中，慢病毒載體是在被修飾以相對於未修飾的HEK293T細胞為過表現CD47的HEK293T細胞中產生的。

【0122】 在一些實施例中，相較於對照慢病毒載體，該慢病毒載體包含更高表面表現量的CD47蛋白。在某些實施例中，對照慢病毒載體是在HEK293細胞(ATCC® CRL-1573™)中產生的，已知所述HEK293細胞產生19個分子/ μm^2 (參見例如，Sosale等人, *Methods & Clinical Development* 3:16080 (2016)，圖S1(d))。在一些實施例中，所述對照慢病毒載體在所述對照慢病毒載體的表面上包含少於20個分子/ μm^2 的CD47。

【0123】 在某些實施例中，相較於在HEK293細胞(ATCC® CRL-1573™)中產生的對照慢病毒載體之表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含多至少約2倍至至少約100倍、至少約2倍至至少約75倍、至少約2倍至至少約50倍、至少約2倍至至少約40倍、至少約2倍至至少約30倍、至少約2倍至至少約20倍、至少約2倍至至少約10倍、至少約10倍至至少約100倍、至

少約10倍至至少約75倍、至少約10倍至至少約50倍、至少約10倍至至少約40倍、至少約10倍至至少約30倍、至少約10倍至至少約20倍、至少約20倍至至少約100倍、至少約20倍至至少約75倍、至少約20倍至至少約50倍、至少約20倍至至少約40倍、或至少約20倍至至少約30倍的CD47蛋白。在特定實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面包含多至少約10倍至至少約30倍的CD47蛋白。在一些實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面包含多至少約1.5倍、至少約2.0倍、至少約2.5倍、至少約3.0倍、至少約3.5倍、至少約4.0倍、至少約4.5倍、至少約5.0倍、至少約5.5倍、至少約6.0倍、至少約6.5倍、至少約7.0倍、至少約7.5倍、至少約8.0倍、至少約8.5倍、至少約9.0倍、至少約9.5倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍、至少約45倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、或至少約100倍的CD47蛋白。

【0124】 在某些實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面包含多至少約10倍的CD47蛋白。在某些實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面包含多至少約15倍的CD47蛋白。在某些實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面包含多至少約20倍的CD47蛋白。在某些實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面包含多至少約25倍的CD47蛋白。在某些實施例中，相較於在HEK293細胞（ATCC®

CRL-1573™) 中產生的對照慢病毒載體的表面，該慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含多至少約30倍的CD47蛋白。

【0125】 在一些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少20個分子/ μm^2 、至少約25個分子/ μm^2 、至少約30個分子/ μm^2 、至少約35個分子/ μm^2 、至少約40個分子/ μm^2 、至少約45個分子/ μm^2 、至少約50個分子/ μm^2 、至少約55個分子/ μm^2 、至少約60個分子/ μm^2 、至少約65個分子/ μm^2 、至少約70個分子/ μm^2 、至少約75個分子/ μm^2 、至少約80個分子/ μm^2 、至少約85個分子/ μm^2 、至少約90個分子/ μm^2 、至少約95個分子/ μm^2 、至少約100個分子/ μm^2 、至少約125個分子/ μm^2 、至少約150個分子/ μm^2 、至少約175個分子/ μm^2 、至少約200個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在一些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約225個分子/ μm^2 、至少約250個分子/ μm^2 、至少約275個分子/ μm^2 、至少約300個分子/ μm^2 、至少約325個分子/ μm^2 、至少約350個分子/ μm^2 、至少約375個分子/ μm^2 、至少約400個分子/ μm^2 、至少約425個分子/ μm^2 、至少約450個分子/ μm^2 、至少約475個分子/ μm^2 、至少約500個分子/ μm^2 、至少約525個分子/ μm^2 、至少約550個分子/ μm^2 、至少約575個分子/ μm^2 、至少約600個分子/ μm^2 、至少約625個分子/ μm^2 、至少約650個分子/ μm^2 、至少約675個分子/ μm^2 、至少約700個分子/ μm^2 、至少約725個分子/ μm^2 、至少約750個分子/ μm^2 、至少約800個分子/ μm^2 、至少約850個分子/ μm^2 、至少約900個分子/ μm^2 、至少約950個分子/ μm^2 、或至少約1000個分子/ μm^2 的CD47蛋白。

【0126】 在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約400個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約450個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約500個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約600個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約

約700個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約800個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約900個分子/ μm^2 的CD47蛋白。在某些實施例中，慢病毒載體在慢病毒載體的表面上包含至少約1000個分子/ μm^2 的CD47蛋白。

【0127】 在一些實施例中，慢病毒載體在宿主細胞中表現，所述宿主細胞被進一步修飾以降低所得慢病毒載體的免疫原性。在一些實施例中，慢病毒載體具有很少或沒有表面暴露的主要組織相容性複合物I類(MHC-I)。表面暴露的MHC-I展示來自細胞內部的「非自體」蛋白的胜肽片段，如代表感染的蛋白質片段，從而促進針對細胞的免疫反應。在一些實施例中，慢病毒載體是在MHC-I^低細胞中產生的，其中所述細胞在細胞膜上具有減少的表面暴露的MHC-I。在一些實施例中，慢病毒載體是在MHC-I(或「MHC-I^無」、「MHC-I^{陰性}」或「MHC-陰性」)細胞中產生的，其中所述細胞不具有表面暴露的MHC-I。

【0128】 MHC-I或MHC-I^低細胞可以使用本領域已知的任何手段產生。在一些實施例中，通過破壞編碼MHC中一種或多種蛋白質的一種或多種基因的表現，來產生MHC-I或MHC-I^低細胞。在一些實施例中，通過破壞編碼 β -2-微球蛋白(B2M; Ensembl ENSG00000166710; NCBI蛋白質登錄號ABB01003)的基因的表現來產生MHC-I或MHC-I^低細胞。在一些實施例中，通過永久地破壞編碼 β -2-微球蛋白(B2M)的基因的表現，來產生MHC-I或MHC-I^低細胞。在一些實施例中，通過阻斷編碼 β -2-微球蛋白(B2M)的基因的表現，來產生MHC-I或MHC-I^低細胞。在一些實施例中，通過在編碼 β -2-微球蛋白(B2M)的基因中引入突變，來產生MHC-I或MHC-I^低細胞，其中所述突變導致編碼B2M的基因的表現喪失。在一些實施例中，通過敲除編碼 β -2-微球蛋白(B2M)的基因來產生MHC-I或MHC-I^低細胞。在某些實施例中，通過修飾HECK 293T細胞以阻斷或減少表面暴露的MHC-I，來產生MHC-I或

MHC-I^低細胞。未修飾的HEK293-T細胞具有表面暴露的MHC-I。參見例如，Dellgren等人, *PLoS One* 10(8):e0135385 (2015)。

【0129】 在一些實施例中，細胞是MHC-I^低 HEK293T細胞，其中所述細胞不具有表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，相對於未修飾的HEK293T細胞，MHC-I^低細胞具有少於1%表面暴露的MHC-I。在一些實施例中，細胞是MHC-I^低 HEK293T細胞，其中相對於未修飾的HEK293T細胞，所述HEK293T細胞係經修飾以具有少於約90%、少於約85%、少於約80%、少於約75%、少於約70%、少於約65%、少於約60%、少於約55%、少於約50%、少於約45%、少於約40%、少於約35%、少於約30%、少於約25%、少於約20%、少於約15%、少於約10%、少於約9%、少於約8%、少於約7%、少於約6%、少於約5%、少於約4%、少於約3%、少於約2%、少於約1%表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，相對於未修飾的HEK293T細胞，MHC-I^低細胞具有少於5%表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，相對於未修飾的HEK293T細胞，MHC-I^低細胞具有少於4%表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，相對於未修飾的HEK293T細胞，MHC-I^低細胞具有少於3%表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，相對於未修飾的HEK293T細胞，MHC-I^低細胞具有少於2%表面暴露的MHC-I。

【0130】 在特定實施例中，慢病毒載體包含脂質外套，所述脂質外套包含高濃度的CD47多肽並且缺乏表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，慢病毒載體是在CD47^高/MHC-I^低細胞株，例如CD47^高/MHC-I^低 HEK 293T細胞株中產生的。在一些實施例中，慢病毒載體是在CD47^高/MHC-I細胞株，例如CD47^高/MHC-I HEK 293T細胞株中產生的。

【0131】 在另一個實施例中，本文公開的慢病毒載體的投予和/或FIX蛋白轉基因的后續表現在受試者中不誘發免疫反應。在一些實施例中，免疫反應包括產生針對FIX的抗體。在一些實施例中，免疫反應包括細胞激素分泌。在一些實施例中，免疫反應包括啟動B細胞、T細胞或B細胞和T細胞二

者。在一些實施例中，免疫反應是抑制性免疫反應，其中相對於未產生免疫反應的受試者的FIX的活性，受試者的免疫反應降低FIX蛋白的活性。在某些實施例中，通過投予本文的慢病毒載體來表現FIX蛋白預防針對FIX蛋白或從經分離的核酸分子或慢病毒載體表現的FIX蛋白的抑制性免疫反應。

B. 給藥

【0132】 相較於在HEK293細胞（ATCC® CRL-1573™）中產生的對照慢病毒載體，本文的慢病毒載體、慢病毒載體顆粒及其使用方法允許使用更低劑量的慢病毒載體來預防和/或治療血友病。在一些實施例中，相對於對照慢病毒載體的對照劑量，本文的慢病毒載體在減低劑量下是有效的，所述對照劑量是誘發與該慢病毒載體相同的FIX活性所必需的。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量是對照慢病毒載體的對照劑量的至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、或至少約25%。在一些實施例中，劑量是對照慢病毒載體的對照劑量的至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、或至少約50%。在一些實施例中，劑量是對照慢病毒載體的對照劑量的至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、或至少約75%。在一些實施例中，劑量是對照慢病毒載體的對照劑量的至少約80%、至少約85%、至少約90%、或至少約95%。

【0133】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 5.0×10^{10} TU/kg、約 4.9×10^{10} TU/kg、約 4.8×10^{10} TU/kg、約 4.7×10^{10} TU/kg、約 4.6×10^{10} TU/kg、約 4.5×10^{10} TU/kg、約 4.4×10^{10} TU/kg、約 4.3×10^{10} TU/kg、約 4.2×10^{10} TU/kg、約 4.1×10^{10} TU/kg、約 4.0×10^{10} TU/kg、約 3.9×10^{10} TU/kg、約 3.8×10^{10} TU/kg、約 3.7×10^{10} TU/kg、約 3.6×10^{10} TU/kg、約 3.5×10^{10} TU/kg、約 3.4×10^{10} TU/kg、約 3.3×10^{10} TU/kg、約 3.2×10^{10} TU/kg、約 3.1×10^{10} TU/kg、約 3.0×10^{10} TU/kg、約 2.9×10^{10} TU/kg、約 2.8×10^{10} TU/kg、約 2.7×10^{10} TU/kg、約 2.6×10^{10} TU/kg、

約 2.5×10^{10} TU/kg、約 2.4×10^{10} TU/kg、約 2.3×10^{10} TU/kg、約 2.2×10^{10} TU/kg、約 2.1×10^{10} TU/kg、約 2.0×10^{10} TU/kg、約 1.9×10^{10} TU/kg、約 1.8×10^{10} TU/kg、約 1.7×10^{10} TU/kg、約 1.6×10^{10} TU/kg、約 1.5×10^{10} TU/kg、約 1.4×10^{10} TU/kg、約 1.3×10^{10} TU/kg、約 1.2×10^{10} TU/kg、約 1.1×10^{10} TU/kg、或約 1.0×10^{10} TU/kg。

【0134】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 9.9×10^9 TU/kg、約 9.8×10^9 TU/kg、約 9.7×10^9 TU/kg、約 9.6×10^9 TU/kg、約 9.5×10^9 TU/kg、約 9.4×10^9 TU/kg、約 9.3×10^9 TU/kg、約 9.2×10^9 TU/kg、約 9.1×10^9 TU/kg、約 9.0×10^9 TU/kg、約 8.9×10^9 TU/kg、約 8.8×10^9 TU/kg、約 8.7×10^9 TU/kg、約 8.6×10^9 TU/kg、約 8.5×10^9 TU/kg、約 8.4×10^9 TU/kg、約 8.3×10^9 TU/kg、約 8.2×10^9 TU/kg、約 8.1×10^9 TU/kg、約 8.0×10^9 TU/kg、約 7.9×10^9 TU/kg、約 7.8×10^9 TU/kg、約 7.7×10^9 TU/kg、約 7.6×10^9 TU/kg、約 7.5×10^9 TU/kg、約 7.4×10^9 TU/kg、約 7.3×10^9 TU/kg、約 7.2×10^9 TU/kg、約 7.1×10^9 TU/kg、約 7.0×10^9 TU/kg、約 6.9×10^9 TU/kg、約 6.8×10^9 TU/kg、約 6.7×10^9 TU/kg、約 6.6×10^9 TU/kg、約 6.5×10^9 TU/kg、約 6.4×10^9 TU/kg、約 6.3×10^9 TU/kg、約 6.2×10^9 TU/kg、約 6.1×10^9 TU/kg、約 6.0×10^9 TU/kg、約 5.9×10^9 TU/kg、約 5.8×10^9 TU/kg、約 5.7×10^9 TU/kg、約 5.6×10^9 TU/kg、約 5.5×10^9 TU/kg、約 5.4×10^9 TU/kg、約 5.3×10^9 TU/kg、約 5.2×10^9 TU/kg、約 5.1×10^9 TU/kg、約 5.0×10^9 TU/kg、約 4.9×10^9 TU/kg、約 4.8×10^9 TU/kg、約 4.7×10^9 TU/kg、約 4.6×10^9 TU/kg、約 4.5×10^9 TU/kg、約 4.4×10^9 TU/kg、約 4.3×10^9 TU/kg、約 4.2×10^9 TU/kg、約 4.1×10^9 TU/kg、約 4.0×10^9 TU/kg、約 3.9×10^9 TU/kg、約 3.8×10^9 TU/kg、約 3.7×10^9 TU/kg、約 3.6×10^9 TU/kg、約 3.5×10^9 TU/kg、約 3.4×10^9 TU/kg、約 3.3×10^9 TU/kg、約 3.2×10^9 TU/kg、約 3.1×10^9 TU/kg、約 3.0×10^9 TU/kg、約 2.9×10^9 TU/kg、約 2.8×10^9 TU/kg、約 2.7×10^9 TU/kg、約 2.6×10^9 TU/kg、約 2.5×10^9 TU/kg、約 2.4×10^9 TU/kg、約 2.3×10^9 TU/kg、約 2.2×10^9 TU/kg、約 2.1×10^9 TU/kg、約 2.0×10^9 TU/kg、約 1.9×10^9 TU/kg、約 1.8×10^9 TU/kg、約 1.7×10^9 TU/kg、約 1.6×10^9 TU/kg、約 1.5×10^9 TU/kg、約

1.4×10^9 TU/kg、約 1.3×10^9 TU/kg、約 1.2×10^9 TU/kg、約 1.1×10^9 TU/kg、或約 1.0×10^9 TU/kg。

【0135】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 9.9×10^8 TU/kg、約 9.8×10^8 TU/kg、約 9.7×10^8 TU/kg、約 9.6×10^8 TU/kg、約 9.5×10^8 TU/kg、約 9.4×10^8 TU/kg、約 9.3×10^8 TU/kg、約 9.2×10^8 TU/kg、約 9.1×10^8 TU/kg、約 9.0×10^8 TU/kg、約 8.9×10^8 TU/kg、約 8.8×10^8 TU/kg、約 8.7×10^8 TU/kg、約 8.6×10^8 TU/kg、約 8.5×10^8 TU/kg、約 8.4×10^8 TU/kg、約 8.3×10^8 TU/kg、約 8.2×10^8 TU/kg、約 8.1×10^8 TU/kg、約 8.0×10^8 TU/kg、約 7.9×10^8 TU/kg、約 7.8×10^8 TU/kg、約 7.7×10^8 TU/kg、約 7.6×10^8 TU/kg、約 7.5×10^8 TU/kg、約 7.4×10^8 TU/kg、約 7.3×10^8 TU/kg、約 7.2×10^8 TU/kg、約 7.1×10^8 TU/kg、約 7.0×10^8 TU/kg、約 6.9×10^8 TU/kg、約 6.8×10^8 TU/kg、約 6.7×10^8 TU/kg、約 6.6×10^8 TU/kg、約 6.5×10^8 TU/kg、約 6.4×10^8 TU/kg、約 6.3×10^8 TU/kg、約 6.2×10^8 TU/kg、約 6.1×10^8 TU/kg、約 6.0×10^8 TU/kg、約 5.9×10^8 TU/kg、約 5.8×10^8 TU/kg、約 5.7×10^8 TU/kg、約 5.6×10^8 TU/kg、約 5.5×10^8 TU/kg、約 5.4×10^8 TU/kg、約 5.3×10^8 TU/kg、約 5.2×10^8 TU/kg、約 5.1×10^8 TU/kg、約 5.0×10^8 TU/kg、約 4.9×10^8 TU/kg、約 4.8×10^8 TU/kg、約 4.7×10^8 TU/kg、約 4.6×10^8 TU/kg、約 4.5×10^8 TU/kg、約 4.4×10^8 TU/kg、約 4.3×10^8 TU/kg、約 4.2×10^8 TU/kg、約 4.1×10^8 TU/kg、約 4.0×10^8 TU/kg、約 3.9×10^8 TU/kg、約 3.8×10^8 TU/kg、約 3.7×10^8 TU/kg、約 3.6×10^8 TU/kg、約 3.5×10^8 TU/kg、約 3.4×10^8 TU/kg、約 3.3×10^8 TU/kg、約 3.2×10^8 TU/kg、約 3.1×10^8 TU/kg、約 3.0×10^8 TU/kg、約 2.9×10^8 TU/kg、約 2.8×10^8 TU/kg、約 2.7×10^8 TU/kg、約 2.6×10^8 TU/kg、約 2.5×10^8 TU/kg、約 2.4×10^8 TU/kg、約 2.3×10^8 TU/kg、約 2.2×10^8 TU/kg、約 2.1×10^8 TU/kg、約 2.0×10^8 TU/kg、約 1.9×10^8 TU/kg、約 1.8×10^8 TU/kg、約 1.7×10^8 TU/kg、約 1.6×10^8 TU/kg、約 1.5×10^8 TU/kg、約 1.4×10^8 TU/kg、約 1.3×10^8 TU/kg、約 1.2×10^8 TU/kg、約 1.1×10^8 TU/kg、或約 1.0×10^8 TU/kg。

【0136】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量少於約 5.0×10^{10} TU/kg、少於約 4.9×10^{10} TU/kg、少於約 4.8×10^{10} TU/kg、少於約 4.7×10^{10} TU/kg、少於約 4.6×10^{10} TU/kg、少於約 4.5×10^{10} TU/kg、少於約 4.4×10^{10} TU/kg、少於約 4.3×10^{10} TU/kg、少於約 4.2×10^{10} TU/kg、少於約 4.1×10^{10} TU/kg、少於約 4.0×10^{10} TU/kg、少於約 3.9×10^{10} TU/kg、少於約 3.8×10^{10} TU/kg、少於約 3.7×10^{10} TU/kg、少於約 3.6×10^{10} TU/kg、少於約 3.5×10^{10} TU/kg、少於約 3.4×10^{10} TU/kg、少於約 3.3×10^{10} TU/kg、少於約 3.2×10^{10} TU/kg、少於約 3.1×10^{10} TU/kg、少於約 3.0×10^{10} TU/kg、少於約 2.9×10^{10} TU/kg、少於約 2.8×10^{10} TU/kg、少於約 2.7×10^{10} TU/kg、少於約 2.6×10^{10} TU/kg、少於約 2.5×10^{10} TU/kg、少於約 2.4×10^{10} TU/kg、少於約 2.3×10^{10} TU/kg、少於約 2.2×10^{10} TU/kg、少於約 2.1×10^{10} TU/kg、少於約 2.0×10^{10} TU/kg、少於約 1.9×10^{10} TU/kg、少於約 1.8×10^{10} TU/kg、少於約 1.7×10^{10} TU/kg、少於約 1.6×10^{10} TU/kg、少於約 1.5×10^{10} TU/kg、少於約 1.4×10^{10} TU/kg、少於約 1.3×10^{10} TU/kg、少於約 1.2×10^{10} TU/kg、少於約 1.1×10^{10} TU/kg、或少於約 1.0×10^{10} TU/kg。

【0137】 在一些實施中，慢病毒載體的劑量少於約 9.9×10^9 TU/kg、少於約 9.8×10^9 TU/kg、少於約 9.7×10^9 TU/kg、少於約 9.6×10^9 TU/kg、少於約 9.5×10^9 TU/kg、少於約 9.4×10^9 TU/kg、少於約 9.3×10^9 TU/kg、少於約 9.2×10^9 TU/kg、少於約 9.1×10^9 TU/kg、少於約 9.0×10^9 TU/kg、少於約 8.9×10^9 TU/kg、少於約 8.8×10^9 TU/kg、少於約 8.7×10^9 TU/kg、少於約 8.6×10^9 TU/kg、少於約 8.5×10^9 TU/kg、少於約 8.4×10^9 TU/kg、少於約 8.3×10^9 TU/kg、少於約 8.2×10^9 TU/kg、少於約 8.1×10^9 TU/kg、少於約 8.0×10^9 TU/kg、少於約 7.9×10^9 TU/kg、少於約 7.8×10^9 TU/kg、少於約 7.7×10^9 TU/kg、少於約 7.6×10^9 TU/kg、少於約 7.5×10^9 TU/kg、少於約 7.4×10^9 TU/kg、少於約 7.3×10^9 TU/kg、少於約 7.2×10^9 TU/kg、少於約 7.1×10^9 TU/kg、少於約 7.0×10^9 TU/kg、少於約 6.9×10^9 TU/kg、少於約 6.8×10^9 TU/kg、少於約 6.7×10^9 TU/kg、少於約 6.6×10^9 TU/kg、或少於約 6.5×10^9 TU/kg。

TU/kg、少於約 6.4×10^9 TU/kg、少於約 6.3×10^9 TU/kg、少於約 6.2×10^9 TU/kg、少於約 6.1×10^9 TU/kg、少於約 6.0×10^9 TU/kg、少於約 5.9×10^9 TU/kg、少於約 5.8×10^9 TU/kg、少於約 5.7×10^9 TU/kg、少於約 5.6×10^9 TU/kg、少於約 5.5×10^9 TU/kg、少於約 5.4×10^9 TU/kg、少於約 5.3×10^9 TU/kg、少於約 5.2×10^9 TU/kg、少於約 5.1×10^9 TU/kg、少於約 5.0×10^9 TU/kg、少於約 4.9×10^9 TU/kg、少於約 4.8×10^9 TU/kg、少於約 4.7×10^9 TU/kg、少於約 4.6×10^9 TU/kg、少於約 4.5×10^9 TU/kg、少於約 4.4×10^9 TU/kg、少於約 4.3×10^9 TU/kg、少於約 4.2×10^9 TU/kg、少於約 4.1×10^9 TU/kg、少於約 4.0×10^9 TU/kg、少於約 3.9×10^9 TU/kg、少於約 3.8×10^9 TU/kg、少於約 3.7×10^9 TU/kg、少於約 3.6×10^9 TU/kg、少於約 3.5×10^9 TU/kg、少於約 3.4×10^9 TU/kg、少於約 3.3×10^9 TU/kg、少於約 3.2×10^9 TU/kg、少於約 3.1×10^9 TU/kg、少於約 3.0×10^9 TU/kg、少於約 2.9×10^9 TU/kg、少於約 2.8×10^9 TU/kg、少於約 2.7×10^9 TU/kg、少於約 2.6×10^9 TU/kg、少於約 2.5×10^9 TU/kg、少於約 2.4×10^9 TU/kg、少於約 2.3×10^9 TU/kg、少於約 2.2×10^9 TU/kg、少於約 2.1×10^9 TU/kg、少於約 2.0×10^9 TU/kg、少於約 1.9×10^9 TU/kg、少於約 1.8×10^9 TU/kg、少於約 1.7×10^9 TU/kg、少於約 1.6×10^9 TU/kg、少於約 1.5×10^9 TU/kg、少於約 1.4×10^9 TU/kg、少於約 1.3×10^9 TU/kg、少於約 1.2×10^9 TU/kg、少於約 1.1×10^9 TU/kg、或少於約 1.0×10^9 TU/kg。

【0138】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量少於約 9.9×10^8 TU/kg、少於約 9.8×10^8 TU/kg、少於約 9.7×10^8 TU/kg、少於約 9.6×10^8 TU/kg、少於約 9.5×10^8 TU/kg、少於約 9.4×10^8 TU/kg、少於約 9.3×10^8 TU/kg、少於約 9.2×10^8 TU/kg、少於約 9.1×10^8 TU/kg、少於約 9.0×10^8 TU/kg、少於約 8.9×10^8 TU/kg、少於約 8.8×10^8 TU/kg、少於約 8.7×10^8 TU/kg、少於約 8.6×10^8 TU/kg、少於約 8.5×10^8 TU/kg、少於約 8.4×10^8 TU/kg、少於約 8.3×10^8 TU/kg、少於約 8.2×10^8 TU/kg、少於約 8.1×10^8 TU/kg、少於約 8.0×10^8 TU/kg、少於約 7.9×10^8 TU/kg、少於約 7.8×10^8 TU/kg、少於約 7.7×10^8 TU/kg、少於約 7.6×10^8 TU/kg、少於約 7.5×10^8 TU/kg、少於約 7.4×10^8 TU/kg、少於約 7.3×10^8 TU/kg、少於約 7.2×10^8 TU/kg、

TU/kg、少於約 7.1×10^8 TU/kg、少於約 7.0×10^8 TU/kg、少於約 6.9×10^8 TU/kg、少於約 6.8×10^8 TU/kg、少於約 6.7×10^8 TU/kg、少於約 6.6×10^8 TU/kg、少於約 6.5×10^8 TU/kg、少於約 6.4×10^8 TU/kg、少於約 6.3×10^8 TU/kg、少於約 6.2×10^8 TU/kg、少於約 6.1×10^8 TU/kg、少於約 6.0×10^8 TU/kg、少於約 5.9×10^8 TU/kg、少於約 5.8×10^8 TU/kg、少於約 5.7×10^8 TU/kg、少於約 5.6×10^8 TU/kg、少於約 5.5×10^8 TU/kg、少於約 5.4×10^8 TU/kg、少於約 5.3×10^8 TU/kg、少於約 5.2×10^8 TU/kg、少於約 5.1×10^8 TU/kg、少於約 5.0×10^8 TU/kg、少於約 4.9×10^8 TU/kg、少於約 4.8×10^8 TU/kg、少於約 4.7×10^8 TU/kg、少於約 4.6×10^8 TU/kg、少於約 4.5×10^8 TU/kg、少於約 4.4×10^8 TU/kg、少於約 4.3×10^8 TU/kg、少於約 4.2×10^8 TU/kg、少於約 4.1×10^8 TU/kg、少於約 4.0×10^8 TU/kg、少於約 3.9×10^8 TU/kg、少於約 3.8×10^8 TU/kg、少於約 3.7×10^8 TU/kg、少於約 3.6×10^8 TU/kg、少於約 3.5×10^8 TU/kg、少於約 3.4×10^8 TU/kg、少於約 3.3×10^8 TU/kg、少於約 3.2×10^8 TU/kg、少於約 3.1×10^8 TU/kg、少於約 3.0×10^8 TU/kg、少於約 2.9×10^8 TU/kg、少於約 2.8×10^8 TU/kg、少於約 2.7×10^8 TU/kg、少於約 2.6×10^8 TU/kg、少於約 2.5×10^8 TU/kg、少於約 2.4×10^8 TU/kg、少於約 2.3×10^8 TU/kg、少於約 2.2×10^8 TU/kg、少於約 2.1×10^8 TU/kg、少於約 2.0×10^8 TU/kg、少於約 1.9×10^8 TU/kg、少於約 1.8×10^8 TU/kg、少於約 1.7×10^8 TU/kg、少於約 1.6×10^8 TU/kg、少於約 1.5×10^8 TU/kg、少於約 1.4×10^8 TU/kg、少於約 1.3×10^8 TU/kg、少於約 1.2×10^8 TU/kg、少於約 1.1×10^8 TU/kg、或少於約 1.0×10^8 TU/kg。

【0139】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量在約 1×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 1.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 2×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 2.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 3×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 3.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 4×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 4.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 5.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 6×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 6.5×10^8

TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 7×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 7.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 8×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 8.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 9×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 9.5×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 1.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 2×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 2.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 3×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 3.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 4×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 4.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 5.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 6×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 6.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 7×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 7.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 8×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 8.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 9×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 9.5×10^9 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^9 與約 6×10^9 TU/kg之間、在約 2×10^9 與約 6×10^9 TU/kg之間、在約 3×10^9 與約 6×10^9 TU/kg之間、在約 4×10^9 與約 6×10^9 TU/kg之間、在約 5×10^9 與約 6×10^9 TU/kg之間、在約 10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 1.5×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 2×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 2.5×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 3×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 3.5×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 4×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、或在約 4.5×10^{10} TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間。

【0140】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量在約 1×10^8 TU/kg與約 5×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 4.5×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 4×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 3.5×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 3×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 2.5×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 2×10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 1.5×10^{10} TU/kg之間。

TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 10^{10} TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 9×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 8.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 8×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 7.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 7×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 6.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 6×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 5.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 4.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 4×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 3.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 3×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 2.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 2×10^9 之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 1.5×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 1×10^9 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 9.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 9×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 8.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 8×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 7.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 7×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 6.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 6×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 5.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 4.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 4×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 3.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 3×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 2.5×10^8 TU/kg之間、在約 1×10^8 TU/kg與約 2×10^8 之間、或在約 1×10^8 TU/kg與約 1.5×10^8 TU/kg之間。

【0141】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量在約 1×10^{10} TU/kg與約 2×10^{10} TU/kg之間、在約 1.1×10^{10} TU/kg與約 1.9×10^{10} TU/kg之間、在約 1.2×10^{10} TU/kg與約 1.8×10^{10} TU/kg之間、在約 1.3×10^{10} TU/kg與約 1.7×10^{10} TU/kg、或在約 1.4×10^{10} TU/kg與約 1.6×10^{10} TU/kg之間。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 1.5×10^{10} TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 2×10^{10} TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 2×10^{10} TU/kg。在一些實施

例中，慢病毒載體的劑量為約 6×10^{10} TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 6×10^{10} TU/kg。

【0142】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量在約 1×10^9 TU/kg與約 2×10^9 TU/kg之間、在約 1.1×10^9 TU/kg與約 1.9×10^9 TU/kg之間、在約 1.2×10^9 TU/kg與約 1.8×10^9 TU/kg之間、在約 1.3×10^9 TU/kg與約 1.7×10^9 TU/kg、或在約 1.4×10^9 TU/kg與約 1.6×10^9 TU/kg之間。在某些實施例中，慢病毒載體的劑量在約 4×10^9 與約 6×10^9 TU/kg之間。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 1.5×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 4×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 4.5×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 5×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 5.5×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 6×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 6×10^9 TU/kg。

【0143】 在某些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 2.5×10^9 TU/kg。在某些實施例中，慢病毒載體的劑量為 2.5×10^9 TU/kg。在某些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 3.0×10^9 TU/kg。在某些實施例中，慢病毒載體的劑量為 3.0×10^9 TU/kg。在某些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 7.5×10^9 TU/kg。在某些實施例中，慢病毒載體的劑量為 7.5×10^9 TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 2×10^{10} TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 2×10^{10} TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為約 6×10^{10} TU/kg。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量為 6×10^{10} TU/kg。

【0144】 在一些實施例中，所述慢病毒載體以單劑量或多劑量投予。在一些實施例中，慢病毒載體劑量是一次投予或被分成多個子劑量(sub-dose)，例如兩個子劑量、三個子劑量、四個子劑量、五個子劑量、六個子劑量或多於六個子劑量。在一些實施例中，投予多於一種慢病毒載體。

【0145】 在一些實施例中，慢病毒載體的劑量是投予至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次、

或至少十次。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量是約每週投予一次、約每兩周投予一次、約每三周投予一次、或約每四周投予一次。在一些實施例中，慢病毒載體的劑量是約每10天投予一次、約每14天投予一次、約每兩周投予一次、約每15天投予一次、約每三周投予一次、約每20天投予一次、約每四周投予一次、約每個月投予一次、約每個月投予兩次、約每5周投予一次、約每6周投予一次、約每7周投予一次、約每8周投予一次、約每2個月投予一次、約每9周投予一次、約每10周投予一次、約每11周投予一次、約每12周投予一次、約每3個月投予一次、約每13周投予一次、約每14周投予一次、約每15周投予一次、約每16周投予一次、約每4個月投予一次、約每17周投予一次、約每18周投予一次、約每19周投予一次、約每20周投予一次、約每5個月投予一次、約每21周投予一次、約每22周投予一次、約每23周投予一次、約每24周投予一次、約每25周投予一次、約每26周投予一次、或約每6個月投予一次。

【0146】 在一些實施例中，投予第一劑量的慢病毒載體，監測受試者的轉基因表現，並且如果受試者具有低於預定閾值的轉基因表現，則向受試者投予第二劑量。在某些實施例中，如果少於約100%、少於約95%、少於約90%、少於約85%、少於約80%、少於約75%、少於約70%、少於約65%、少於約60%、少於約55%、少於約50%、少於約45%、少於約40%、少於約35%、少於約30%、少於約25%、少於約20%、少於約15%、少於約10%、少於約5%、少於約4%、少於約3%、少於約3%、或少於約1%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約50%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約25%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，

如果少於約10%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約5%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約4%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約3%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約2%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。在一些實施例中，如果少於約1%的目標細胞表現轉基因，則向受試者投予第二（第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、或第十）劑量的慢病毒載體。

【0147】 在一些實施例中，所述慢病毒載體經由靜脈內注射投予。在一些實施例中，慢病毒載體經由非靜脈內注射（例如皮下或皮內）投予。

【0148】 在一些實施例中，受試者是兒科受試者，而在其他態樣，受試者是成年受試者。在一些實施例中，受試者是男性。在其他實施例中，受試者是女性。

【0149】 本文公開的慢病毒載體可以在體內以低或減低的劑量（例如， 10^{10} TU/kg或更低、 10^9 TU/kg或更低、或 10^8 TU/kg或更低）在哺乳動物例如人患者中使用，使用基因治療方法對於選自以下的出血性疾病或障礙的治療將是治療上有益的：出血凝結障礙、關節積血、肌肉出血、口腔出血、出血症、出血至肌肉中、口腔出血症、創傷、頭部創傷、胃腸出血、顱內出血、腹內出血、胸腔內出血、骨折、中樞神經系統出血、咽後間隙出血、腹膜後間隙出血和髂腰肌鞘出血。在一個實施例中，出血性疾病或障礙是血友病。在另一個實施例中，出血性疾病或障礙是A型血友病。

【0150】 在一些實施例中，在投予至患者之前，用低劑量（例如， 10^{10} TU/kg或更低、 10^9 TU/kg或更低、或 10^8 TU/kg或更低）的本文公開的慢病毒載體在體外處理目標細胞。在某些實施例中，在投予至患者之前，用約 3.0×10^9 TU/kg的本文公開的慢病毒載體在體外處理目標細胞（例如，肝細胞）。在又另一個實施例中，在投予至患者之前，用低劑量（例如， 10^{10} TU/kg或更低、 10^9 TU/kg或更低、或 10^8 TU/kg或更低）的本文公開的慢病毒載體離體處理來自患者的細胞（例如，肝細胞）。

【0151】 在一些實施例中，投予（例如以 10^{10} TU/kg或更低、 10^9 TU/kg或更低、或 10^8 TU/kg或更低投予的）本文公開的慢病毒載體後的血漿FIX活性相對於生理學上正常的循環性FIX位準增加至少約100%、至少約110%、至少約120%、至少約130%、至少約140%、至少約150%、至少約160%、至少約170%、至少約180%、至少約190%、至少約200%、至少約210%、至少約220%、至少約230%、至少約240%、至少約250%、至少約260%、至少約270%、至少約280%、至少約290%、或至少約300%。

【0152】 在一個實施例中，投予本文的慢病毒載體後的血漿FIX活性相對於生理學上正常的循環性FIX位準增加至少約3,000%至約5,000%。在一些實施例中，在投予本文所述的包含編碼具有FIX活性的多肽最佳化且經密碼子最佳化基因的慢病毒載體後21天，相對於投予包含參考核酸分子（含有SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9）的相應慢病毒載體的受試者，血漿FIX活性增加至少約10倍、至少約20倍、至少約30倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、或至少約200倍。

【0153】 本文還提供了治療、預防或改善有需要的受試者中止血障礙（例如，出血性障礙，如A型血友病）的方法，所述方法包括向受試者投予治療有效量的包含經分離的核酸分子的慢病毒載體，所述經分離的核酸分子含

有編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列，其中慢病毒載體作為 5×10^{10} TU/kg或更少、 10^9 TU/kg或更少、或 10^8 TU/kg或更少的至少一個劑量投予。

【0154】 通過本文的慢病毒載體進行的治療、改善和預防可以是旁路療法（bypass therapy）。接受旁路療法的受試者可能已經產生針對凝血因子（例如，FIX）的抑制劑，或者正在產生凝血因子抑制劑。

【0155】 本文的慢病毒載體通過促進纖維蛋白凝塊的形成來治療或預防止血障礙。由本文的核酸分子編碼的具有FIX活性的多肽可以啟動凝結級聯的成員。凝血因子可以是外部路徑、內部路徑或二者的參與者。

【0156】 本文的慢病毒載體可以用於治療已知可用FIX治療的止血障礙。可以使用本文的方法治療的止血障礙包括但不限於A型血友病、B型血友病、溫韋伯氏疾病、因子XI缺乏（PTA缺乏）、因子XII缺乏、以及纖維蛋白原、凝血酶原、因子V、因子VII、因子X或因子XIII的缺乏或結構異常、關節積血、肌肉出血、口腔出血、出血症、出血至肌肉中、口腔出血症、創傷、頭部創傷、胃腸出血、顱內出血、腹內出血、胸腔內出血、骨折、中樞神經系統出血、咽後間隙出血、腹膜後間隙出血和髂腰肌鞘出血。

【0157】 在一些實施例中，止血障礙是遺傳性障礙。在一個實施例中，受試者患有A型血友病。在其他實施例中，止血障礙是缺乏FIX的結果。在其他實施例中，止血障礙可能是缺陷性FIX凝血因子的結果。

【0158】 在另一個實施例中，止血障礙可以是後天型障礙（acquired disorder）。後天型障礙可能源自潛在的繼發性疾病或病症。無關病症可以是（作為例子但不限於）癌症、自身免疫疾病或妊娠。後天型障礙可能源自衰老或源自治療潛在繼發性障礙的藥物療法（例如，癌症化學療法）。

【0159】 本文還涉及治療未患止血障礙或導致獲得止血障礙的繼發性疾病或病症的受試者的方法。因此，本文涉及治療需要一般止血劑的受試者的方法，所述方法包括投予治療有效量的本文的慢病毒載體。例如，在一個實施例中，需要一般止血劑的受試者正在進行或即將進行手術。本文的

慢病毒載體可以在手術之前或之後作為預防劑投予。

【0160】 本文的慢病毒載體可以在手術期間或之後投予以控制急性出血發作。手術可以包括但不限於肝移植、肝切除或幹細胞移植。

【0161】 在另一個實施例中，本文的慢病毒載體可以用於治療患有急性出血發作但未患止血障礙的受試者。急性出血發作可能源自嚴重創傷（例如，手術）、車禍、傷口、槍擊撕裂傷（laceration gun shot）或導致不受控制的出血的任何其他創傷性事件。

【0162】 慢病毒載體可以用於預防性治療患有止血障礙的受試者。慢病毒載體還可以用於治療患有止血障礙的受試者的急性出血發作。

【0163】 在一些實施例中，本文的慢病毒載體與促進止血的至少一種其他藥劑組合投予。促進止血的所述其他藥劑是具有已證實的凝血活性的治療劑。作為例子但未以此為限，止血劑可以包括因子V、因子VII、因子VIII、因子X、因子XI、因子XII、因子XIII、凝血酶原、或纖維蛋白原或前述任一種的活化形式。凝血因子或止血劑還可以包括抗溶纖維蛋白藥，例如ε-胺基己酸、氨甲環酸（tranexamic acid）。

【0164】 在本文的一個實施例中，組合物（例如，慢病毒載體）是其中FIX以在投予至受試者時可活化的形式存在的組合物。這種可活化的分子可以在投予受試者後在體內於凝血位點被活化。

【0165】 本文的慢病毒載體可以靜脈內、皮下、肌肉內或經由任何粘膜表面（例如，口服、舌下、頰、舌下、鼻、直腸、陰道）或經由肺途徑投予。可以將慢病毒載體植入生物聚合物固體支援物（biopolymer solid support）內或與所述生物聚合物固體支援物連接，從而允許將所述載體緩慢釋放至所需位點。

【0166】 在一個實施例中，慢病毒載體的投予途徑是腸胃外的。如本文所用的術語腸胃外包括靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、直腸或陰道投予。腸胃外投予的靜脈內形式是較佳的。雖然所有這些投予形式都

被明確視為在本文的範圍內，但是投予形式可以是注射用溶液，特別是用於靜脈內或動脈內注射或滴注的溶液。通常，適於注射的醫藥組合物可以包含緩衝液（例如乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、表面活性劑（例如聚山梨醇酯）、視情況存在地穩定劑（例如人類白蛋白）等。然而，在與本文的所教示者相容的其他方法中，可以將慢病毒載體直接遞送至不良細胞群的位點，由此增加患病組織對治療劑的暴露。

C. 慢病毒載體

【0167】 本文的某些態樣涉及慢病毒載體、慢病毒載體顆粒和/或其使用方法，其中所述慢病毒載體包含編碼具有因子IX（FIX）活性的多肽的核苷酸序列。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽包含與SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽是人類FIX。在一些實施例中，具有FIX活性的多肽是人類FIX的變異體。在某些實施例中，具有FIX活性的多肽是人類FIX的R338L變異體。在某些實施例中，具有FIX活性的多肽是帕多瓦（Padua）變異體。

【0168】 在一些實施例中，具有FIX活性的多肽是包含FIX的單體-二聚體雜合分子。本文所用的術語「單體-二聚體雜合物」是指包含通過二硫鍵相互締合的第一多肽鏈和第二多肽鏈的嵌合蛋白，其中第一鏈包含FIX和第一Fc區，並且第二鏈包含無FIX的第二Fc區、基本上由所述第二Fc區組成、或由所述第二Fc區組成。因此，單體-二聚體雜合構築體是包含僅具有一種凝血因子的單體態樣和具有兩個Fc區的二聚體態樣的複合體（hybrid）。

C.1. 編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列

【0169】 在一些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列是密碼子最佳化的。在某些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列包含與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核酸序列。

【0170】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列相同。

【0171】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷

酸序列的核苷酸139至1386具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386相同。

【0172】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與

SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386相同。

【0173】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述

核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386相同。

【0174】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約92%序列同一性。在一些實施

例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386相同。

【0175】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約94%序列同一性。

在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386相同。

【0176】 在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約85%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約96%

序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386相同。

【0177】 在某些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列進一步包含編碼訊息胜肽的核酸序列。在一些實施例中，編碼訊息胜肽的核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸1至84；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸1至84；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸1至84；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸1至84；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸1至84；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸1至84。在一些實施例中，編碼訊息胜肽的核酸序列包含以下各項所示的核苷酸序列：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸1至84；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸1至84；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸1至84；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸1至84；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸1至84；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸1至84。

【0178】 在某些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列進一步包含編碼前肽的核酸序列。在一些實施例中，編碼前肽的核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸85至138；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸85至138；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸85至138；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸85至138；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸85至138；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸85至138。在一些實施例中，編碼前肽的核酸序列包含以下各項所示的核苷酸序列：(i) SEQ ID NO: 2的

核苷酸85至138；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸85至138；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸85至138；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸85至138；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸85至138；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸85至138。

C.1.a.異源部分

【0179】 在一些實施例中，編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸分子進一步包含編碼至少一個異源部分的核酸序列。在一些實施例中，異源部分融合至具有FIX活性的多肽的C末端或N末端，其中多肽具有促凝血活性。在一些實施例中，將異源部分插入至具有FIX活性的多肽內的一個或多個位點，其中多肽具有促凝血活性。在一些實施例中，異源部分是異源多肽。在某些態樣，異源部分是XTEN。在一些態樣，異源部分包含至少一個XTEN，該至少一個XTEN被插入具有FIX活性的多肽內的一個或多個位點中。在其他態樣，異源部分是半衰期延長部分（例如，體內半衰期延長部分），其被插入具有FIX活性的多肽內。在一些實施例中，異源部分被插入具有FIX活性的多肽內的插入位點，該插入位點如國際申請公開號WO 2017/024060中所揭露者，所述申請案通過引用以其整體併入本文。在某些實施例中，將所述異源部分插入具有FIX活性的多肽內，緊接對應於以下胺基酸的胺基酸的下流：SEQ ID NO: 2的胺基酸103、SEQ ID NO: 2的胺基酸105、SEQ ID NO: 2的胺基酸142、SEQ ID NO: 2的胺基酸149、SEQ ID NO: 2的胺基酸162、SEQ ID NO: 2的胺基酸166、SEQ ID NO: 2的胺基酸174、SEQ ID NO: 2的胺基酸224、SEQ ID NO: 2的胺基酸226、SEQ ID NO: 2的胺基酸228、SEQ ID NO: 2的胺基酸413、或其任何組合。

【0180】 在一些實施例中，異源部分是FcRn結合配偶體（例如，Fc和白蛋白或其片段）。在一些實施例中，異源部分是FcRn結合配偶體，其融合至具有FIX活性的多肽的C末端或N末端。

【0181】 異源部分（例如，半衰期延長部分）的非限制性例子包括白蛋

白、白蛋白片段、免疫球蛋白的Fc片段、FcRn結合配偶體、人類絨毛膜促性腺激素β次單元的C末端肽（CTP）、HAP序列、轉鐵蛋白、美國專利申請號20100292130的PAS多肽、聚甘胺酸連接子、聚絲胺酸連接子，選自甘胺酸（G）、丙胺酸（A）、絲胺酸（S）、蘇胺酸（T）、麩胺酸（E）和脯胺酸（P）的兩種類型的胺基酸的6至40個胺基酸的肽或短多肽（其具有從小於50%到大於50%的不同程度的二級結構）。

【0182】 在某些態樣，異源部分增加了從本文的慢病毒載體產生的具有FIX活性的多肽的體內或體外半衰期。在其他態樣，異源部分促進從本文的慢病毒載體產生的具有FIX活性的多肽的視覺化或定位。具有FIX活性的多肽的視覺化和/或定位可以是體內、體外、離體或其組合。在其他態樣，異源部分增加從本文的慢病毒載體產生的具有FIX活性的多肽的穩定性。如本文所用，術語「穩定性」是指本領域公認的回應於環境條件（例如，升高或降低的溫度），維持具有FIX活性的多肽的一或多種物理特性的量度。在某些態樣中，所述物理特性是具有FIX活性多肽的共價結構維持（例如不存在蛋白水解切割、不需要的氧化或脫醯胺）。在其他態樣中，所述物理特性也可以是處於適當折疊狀態下存在有具有FIX活性的多肽（例如，不存在可溶性或不溶性聚集體或沈澱物）。

【0183】 在某些態樣，增加本文的FIX融合蛋白的半衰期的異源部分，包括但不限於異源多肽，如白蛋白、免疫球蛋白Fc區、XTEN序列、人類絨毛膜促性腺激素β次單元的C末端肽（CTP）、PAS序列、HAP序列、CTP肽序列、轉鐵蛋白、白蛋白結合部分，或這些多肽的任何片段、衍生物、變異體或組合。在其他相關態樣中，異源部分可包括非多肽部分的附接位點，所述非多肽部分如聚乙二醇（PEG）、羥乙基澱粉（HES）、聚唾液酸，或這些部分的任何衍生物、變異體或組合。

【0184】 在某些態樣中，本文的具有FIX活性的多肽包含一個、兩個、三個或更多個異源部分，所述異源部分可以各自是相同或不同的分子。在一

些實施例中，慢病毒載體包含編碼XTEN的一個或多個核苷酸序列。在其他實施例中，慢病毒載體包含編碼XTEN和一個或多個Fc結構域的一個或多個核苷酸序列。在一個特定實施例中，慢病毒載體包含插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內的編碼XTEN的核苷酸序列和與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合的編碼Fc的核苷酸序列。

C.1.a.i. XTEN

【0185】 在一些實施例中，所述至少一個異源部分是XTEN。如本文所用，「XTEN序列」是指延伸長度的多肽，其具有非天然存在且基本上不重複的序列，所述序列主要由小親水胺基酸構成，並且所述序列在生理條件下具有較低程度的或不具有二級或三級結構。作為融合蛋白配偶體，XTEN可以作為載體，當與本文的FIX序列連接以產生融合蛋白時，賦予某些期望的藥代動力學（pharmacokinetic）、物理和藥學特性。這些期望的特性，包括但不限於增強的藥代動力學參數和溶解度特徵。如本文所用，「XTEN」明確排除抗體或抗體片段，如單鏈抗體或者輕鏈或重鏈的Fc片段。

【0186】 在某些態樣，本文的慢病毒載體包含編碼XTEN或其片段、變異體或衍生物的至少一個核苷酸序列，其中將編碼XTEN的核苷酸序列插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列中，其中所得的融合多肽具有促凝血活性。在某些態樣，異源部分的兩個是XTEN序列。在一些態樣，異源部分的三個是XTEN序列。在一些態樣，異源部分的四個是XTEN序列。在一些態樣，異源部分的五個是XTEN序列。在一些態樣，異源部分的六個或更多個是XTEN序列。

【0187】 在一些實施例中，XTEN序列是具有大於約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或2000個胺基酸殘基的肽或多肽。在某些實施例中，XTEN是具有大於約20

至約3000個胺基酸殘基、大於30至約2500個殘基、大於40至約2000個殘基、大於50至約1500個殘基、大於60至約1000個殘基、大於70至約900個殘基、大於80至約800個殘基、大於90至約700個殘基、大於100至約600個殘基、大於110至約500個殘基、或大於120個至大約400個殘基的肽或多肽。在一個特定實施例中，所述XTEN包含長度長於42個胺基酸且短於144個胺基酸的胺基酸序列。

【0188】 XTEN序列可包含5至14個（例如9至14個）胺基酸殘基的一個或多個序列基序或與所述序列基序至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的胺基酸序列，其中所述基序包含選自甘胺酸（G）、丙胺酸（A）、絲胺酸（S）、蘇胺酸（T）、麩胺酸（E）和脯胺酸（P）的4至6種類型的胺基酸（例如5種胺基酸）、基本上由上述胺基酸組成，或者由上述胺基酸所組成。參見US 2010-0239554 A1。

【0189】 可以根據本文所使用的XTEN序列的例子，揭露在以下文獻中：美國專利公開號2010/0239554 A1、2010/0323956 A1、2011/0046060 A1、2011/0046061 A1、2011/0077199 A1、或2011/0172146 A1，或者國際專利公開號WO 2010091122 A1、WO 2010144502 A2、WO 2010144508 A1、WO 2011028228 A1、WO 2011028229 A1、WO 2011028344 A2、WO 2014/011819 A2、WO 2015/023891、或WO 2017/024060，其每一篇均通過引用以其整體併入本文。

C.1.a.ii. Fc區或FcRn結合配偶體

【0190】 在一些實施例中，所述至少一個異源部分是Fc區（例如FcRn結合配偶體）或其片段。在某些態樣，本文的慢病毒載體包含編碼Fc區（例如，FcRn結合配偶體）的至少一個核苷酸序列，所述核苷酸序列被插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之，其中所得的融合多

肽具有促凝血活性。除非另有說明，否則本文使用的「Fc」或「Fc區」可以是包含Fc結構域的功能性新生兒Fc受體（unctional neonatal Fc receptor，FcRn）結合配偶體、其變異體或片段。FcRn結合配偶體是可以被FcRn受體特異性結合並隨後被所述FcRn結合配偶體（包括但不限於白蛋白）的FcRn受體主動轉運的任何分子。因此，術語Fc包括IgG Fc的任何功能性變異體。已經基於X射線晶體學描述了IgG的Fc部分中與FcRn受體結合的區域（Burmeister等人, *Nature* 372:379 (1994)，通過引用以其整體併入本文）。Fc與FcRn的主要接觸區域接近CH2和CH3結構域的接合處。Fc-FcRn觸點全部位於單一Ig重鏈內。FcRn結合配偶體包括但不限於整個IgG、IgG的Fc片段和IgG的其他片段（包含FcRn的完整結合區）。Fc可以包含免疫球蛋白的CH2和CH3結構域，所述Fc含有或不含有免疫球蛋白的鉸鏈區。還包括Fc片段、變異體或衍生物，它們維持融合蛋白中Fc區的所需特性，例如半衰期（例如體內半衰期）的增加。眾多種突變體、片段、變異體和衍生物描述於例如以下文獻中：PCT公開號WO 2011/069164 A2、WO 2012/006623 A2、WO 2012/006635 A2或WO 2012/006633 A2，所有這些文獻都通過引用以其整體併入本文。

【0191】 可以將編碼一個或多個Fc結構域的核苷酸序列插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之。在一些實施例中，將編碼Fc結構域的核苷酸序列與編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列的5'端融合。在一些實施例中，將編碼Fc結構域的核苷酸序列與編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列的3'端融合。在一些實施例中，將編碼Fc結構域的核苷酸序列與插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內的編碼另一個異源部分（如XTEN）的核苷酸序列融合，或與編碼XTEN編碼核苷酸序列的C末端的核苷酸序列的一部分融合。在一些實施例中，慢病毒載體包含編碼第二Fc結構域的核苷酸序列。表現的第二Fc結構域可以例如通過一個或多個共價鍵

與第一Fc結構域締合。

C.1.a.iii. 白蛋白

【0192】 在一些實施例中，所述至少一個異源部分是白蛋白、白蛋白結合結構域、或白蛋白結合小分子，或其變異體、衍生物或片段。在某些態樣，本文的慢病毒載體包含編碼白蛋白多肽或其片段、變異體或衍生物的至少一個核苷酸序列，所述至少一個核苷酸序列被插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之，其中所得的融合多肽具有促凝血活性。人類血清白蛋白（HSA，或HA）是一種全長形式有609個胺基酸的蛋白質，負責大部分血清滲透壓，並且還起到內源和外源配位體的載體的作用。本文所用的術語「白蛋白」包括全長白蛋白或其功能性片段、變異體、衍生物或類似物。白蛋白或其片段或變異體的例子披露於以下文獻中：美國專利公開號2008/0194481A1、2008/0004206 A1、2008/0161243 A1、2008/0261877 A1、或2008/0153751 A1，或者PCT申請公開號2008/033413 A2、2009/058322 A1、或2007/021494 A2，這些文獻通過引用以其整體併入本文。

【0193】 白蛋白結合多肽（ABP）可以包含但不限於，細菌白蛋白結合結構域、白蛋白結合肽或可與白蛋白結合的白蛋白結合抗體片段。如Kraulis等人, FEBS Lett. 378:190-194 (1996)和Linhult等人, Protein Sci. 11:206-213 (2002)所揭露之，來自鏈球菌蛋白G的結構域3是細菌白蛋白結合結構域的例子。白蛋白結合肽的例子包括具有核心序列DICLPWGCLW（SEQ ID NO: 15）的一系列肽。參見例如，Dennis等人, J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002)。白蛋白結合抗體片段的例子揭露於以下文獻中：Muller和Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:319-326 (2007)；Roovers等人, *Cancer Immunol. Immunother.* 56:303-317 (2007)，以及Holt等人, *Prot. Eng. Design Sci.*,

21:283-288 (2008)，這些文獻通過引用以其整體併入本文。

【0194】 在某些態樣中，本文的慢病毒載體包含編碼可與白蛋白結合的非多肽小分子、其變異體或衍生物（例如，結合白蛋白的小分子）的附接位點的至少一個核苷酸序列，所述至少一個核苷酸序列被插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之，其中所得的融合多肽具有促凝血活性。此類白蛋白結合部分的例子是如Trussel等人, *Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009)所揭露的2-(3-馬來醯亞胺基丙醯胺基)-6-(4-(4-碘苯基)丁醯胺基)己酸酯（「Albu」標籤）。

【0195】 在一些實施例中，表現的多肽中的白蛋白結合多肽序列在C末端、N末端或兩個末端被Gly-Ser肽連接子序列側接。在一些實施例中，Gly-Ser肽連接子是Gly₄Ser（SEQ ID NO: 16）。在其他實施例中，Gly-Ser肽連接子是(Gly₄Ser)₂（SEQ ID NO: 17）。

C.1.a.iv. CTP

【0196】 在一些實施例中，所述至少一個異源部分是人類絨毛膜促性腺激素β次單元的C末端肽（CTP）或其片段、變異體或衍生物。在某些態樣，本文的慢病毒載體包含編碼CTP或其片段、變異體或衍生物的至少一個核苷酸序列，所述至少一個核苷酸序列被插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之，其中所得的融合多肽具有促凝血活性。已知將一個或多個CTP肽插入重組蛋白質中會增加該蛋白質的半衰期。舉例來說，參見美國專利號5,712,122，其通過引用以其整體併入本文。示例性CTP肽包括DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL（SEQ ID NO: 18）或SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 19）。參見例如，美國專利申請公開號US 2009/0087411 A1，其通過引用併入本文。在一些實施

例中，表現的多肽中的CTP序列在C末端、N末端或兩個末端被Gly-Ser肽連接子序列側接。在一些實施例中，Gly-Ser肽連接子是Gly₄Ser（SEQ ID NO: 16）。在其他實施例中，Gly-Ser肽連接子是(Gly₄Ser)₂（SEQ ID NO: 17）。

C.1.a.v. PAS

【0197】 在一些實施例中，所述至少一個異源部分是PAS肽。在某些態樣，本文的慢病毒載體包含編碼PAS肽或其片段、變異體或衍生物的至少一個核苷酸序列，所述至少一個核苷酸序列被插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之，其中所得的融合多肽具有促凝血活性。本文所用的「PAS肽」或「PAS序列」是指主要包含丙胺酸和絲胺酸殘基，或主要包含丙胺酸、絲胺酸和脯胺酸殘基的胺基酸序列，所述胺基酸序列在生理條件下形成無規捲曲構形（random coil conformation）。因此，所述PAS序列是包含丙胺酸、絲胺酸和脯胺酸，基本上由所述胺基酸組成或由所述胺基酸組成的構造塊、胺基酸聚合物或序列盒，所述PAS序列可用作融合蛋白中異源部分的一部分。當添加除了丙胺酸、絲胺酸和脯胺酸以外的殘基作為PAS序列中的次要成分時，胺基酸聚合物也可以形成無規捲曲構形。「次要成分」是指可以在PAS序列中添加除了丙胺酸、絲胺酸和脯胺酸以外的胺基酸到一定程度，例如，高達約12%（即PAS序列的100個胺基酸中約12個胺基酸）、高達約10%、高達約9%、高達約8%、約6%、約5%、約4%、約3%、即約2%、或約1%的胺基酸。不同於丙胺酸、絲胺酸和脯胺酸的胺基酸可選自Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、和Val。在生理條件下，PAS肽形成無規捲曲構形，由此可以介導增加的體內和/或體外穩定性。

【0198】 PAS肽的非限制性例子包括ASPAAPAPASPAAPAPSAPA（SEQ ID NO: 20）、AAPASPAPAAPSAPAPAAPS（SEQ ID NO: 21）、

APSSPSPSPAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 22)、APSSPSPSPAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 23)、SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO: 24)、AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 25)、ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 26)，或其任何變異體、衍生物、片段或組合。PAS序列的另外的例子可從例如美國專利公開號2010/0292130 A1和PCT申請公開號WO 2008/155134 A1瞭解到。歐洲公告專利EP2173890。

【0199】 在一些實施例中，表現的多肽中的PAS序列在C末端、N末端或兩個末端被Gly-Ser肽連接子序列側接。在一些實施例中，Gly-Ser肽連接子是Gly₄Ser (SEQ ID NO: 16)。在其他實施例中，Gly-Ser肽連接子是(Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 17)。

C.1.a.vi. HAP

【0200】 在一些實施例中，所述至少一個異源部分是同型胺基酸聚合物 (HAP) 肽或其片段、變異體或衍生物。在某些態樣，本文的慢病毒載體包含編碼同型胺基酸聚合物 (HAP) 肽或其片段、變異體或衍生物的至少一個核苷酸序列，所述至少一個核苷酸序列被插入編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列內，與編碼具有FIX活性的多肽的C末端的核苷酸序列的一部分融合，或者兩種情況兼而有之，其中所得的融合多肽具有促凝血活性。HAP肽可包含重複的甘胺酸序列，其具有至少50個胺基酸、至少100個胺基酸、120個胺基酸、140個胺基酸、160個胺基酸、180個胺基酸、200個胺基酸、250個胺基酸、300個胺基酸、350個胺基酸、400個胺基酸、450個胺基酸或500個胺基酸的長度。HAP序列能夠延長與HAP序列融合或連接的部分的半衰期。HAP序列的非限制性例子包括但不限於(Gly)_n、(Gly₄Ser)_n或S(Gly₄Ser)_n，其中n為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在一個實施例中，n為20、21、22、23、24、25、

26、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40。在另一個實施例中，n為50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200。參見例如，Schlampschy M等人, *Protein Eng. Design Selection*, 20: 273-284 (2007)。

C.2. 調控元件

【0201】 在一些實施例中，慢病毒載體包含基因表現控制元件。基因表現控制序列可以是例如哺乳動物或病毒啟動子，如持續型或誘導型啟動子。組成型哺乳動物啟動子包括但不限於以下基因的啟動子：次黃嘌呤磷酸核糖轉移酶（HPRT）、腺苷脫氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌動蛋白啟動子和其他持續型（constitutive）啟動子。在真核細胞中持續性地發揮作用的示例性病毒啟動子，包括例如來自以下病毒的啟動子：巨細胞病毒（CMV）、猿猴病毒（例如，SV40）、乳頭狀瘤病毒、腺病毒、人免疫缺陷病毒（HIV）、勞斯肉瘤病毒、巨細胞病毒、莫洛尼白血病病毒的長末端重複（LTR）和其他逆轉錄病毒、以及單純疱疹病毒的胸苷激酶啟動子。

【0202】 也可以使用其他持續型（constitutive）啟動子。可用作本文的基因表現序列的啟動子還包括誘導型啟動子。誘導型啟動子是在誘導劑存在下表現。例如，在某些金屬離子存在下誘導金屬硫蛋白啟動子以促進轉錄和轉譯。可以使用其他誘導型。

【0203】 在一個實施例中，本文包括在組織特異性啟動子和/或增強子控制下的轉基因表現。在另一個實施例中，啟動子或其他表現控制序列選擇性地增強轉基因在肝細胞中的表現。肝臟特異性啟動子的例子包括但不限於小鼠甲狀腺素啟動子（mTTR）、內生性人類因子VIII啟動子（F8）、人類 α -1-抗胰蛋白酶啟動子（hAAT）、人類白蛋白最小啟動子和小鼠白蛋白啟動子。在特定實施例中，啟動子包括mTTR啟動子。mTTR啟動子描述於R. H. Costa等人, 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6:4697中。F8啟動子描述於Figueiredo

和Brownlee, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:11828-11838中。在一些實施例中，慢病毒載體包含至少一個組織特異性啟動子，即調控具有FIX活性的多肽在特定組織或細胞類型中的表現的啟動子。在一些實施例中，慢病毒載體中的組織特異性啟動子選擇性地增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現。在一些實施例中，選擇性增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現的組織特異性啟動子包括APOA2啟動子、SERPINA1 (hAAT) 啟動子、mTTR啟動子、MIR122啟動子、ET啟動子 (GenBank編號AY661265；也參見Vigna等人, *Molecular Therapy* 11(5):763 (2005)) 或其任何組合。在一些實施例中，所述目標肝細胞是肝細胞。

【0204】 可以使用一種或多種增強子進一步增強表現量以實現治療功效。一種或多種增強子可以單獨提供，或與一種或多種啟動子元件一起提供。通常，表現控制序列包含多個增強子元件和組織特異性啟動子。在一個實施例中，增強子包含 α -1-微球蛋白/bikunin增強子的一個或多個拷貝 (Rouet等人, 1992, *J. Biol. Chem.* 267:20765-20773；Rouet等人, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:395-404；Rouet等人, 1998, *Biochem. J.* 334:577-584；Ill等人, 1997, *Blood Coagulation Fibrinolysis* 8:S23-S30)。在另一個實施例中，增強子衍生自肝臟特異性轉錄因子結合位點，如EBP、DBP、HNF1、HNF3、HNF4、HNF6和Enh1，包含HNF1、(有義)-HNF3、(有義)-HNF4、(反義)-HNF1、(反義)-HNF6、(有義)-EBP、(反義)-HNF4 (反義)。

【0205】 其他合適的載體和基因調控元件的例子描述於以下文獻中：WO 02/092134、EP1395293或美國專利號6,808,905、7,745,179或7,179,903，所述文獻通過引用以其整體併入本文。

【0206】 一般而言，表現控制序列應視需要包括分別參與轉錄和轉譯起始的5'非轉錄序列和5'非轉譯序列，如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。特別地，此類5'非轉錄序列將包括啟動子區域，所述啟動子區域包括用於對可操作連接的編碼核酸進行轉錄控制的啟動子序列。基因表現序列視需要

任選地包括增強子序列或上游啟動子序列。

【0207】 由於慢病毒載體可以轉導所有肝細胞類型，因此可以通過使用慢病毒載體中的不同啟動子來控制轉基因（例如，FIX）在不同細胞類型中的表現。因此，慢病毒載體可包含特異性啟動子，其將控制FIX轉基因在不同組織或細胞類型，如不同肝組織或細胞類型中的表現。因此，在一些實施例中，慢病毒載體可包含將控制FIX轉基因在肝內皮組織中表現的內皮特異性啟動子，或將控制FIX轉基因在肝細胞中表現的肝細胞特異性啟動子，或兩者。

【0208】 在一些實施例中，慢病毒載體包含控制FIX轉基因在除肝以外的組織中表現的一種或多種組織特異性啟動子。在一些實施例中，將經分離的核酸分子穩定地整合到目標細胞或目標組織的基因組中，例如肝細胞的基因組中或肝內皮細胞的基因組中。

【0209】 在一些實施例中，慢病毒載體包含至少一個剪接供體位點。在一些實施例中，慢病毒載體包含至少一個剪接受體位點。

【0210】 在一些實施例中，所述慢病毒載體包含gag序列、pol序列、rev序列、rev反應元件（RRE）或其任何組合。在某些實施例中，慢病毒載體包含全長gag序列。在一些實施例中，慢病毒載體包含截斷的gag序列。在某些實施例中，慢病毒載體包含全長pol序列。在一些實施例中，慢病毒載體包含截斷的pol序列。在某些實施例中，慢病毒載體包含全長rev序列。在一些實施例中，慢病毒載體包含截斷的rev序列。在某些實施例中，慢病毒載體包含全長RRE序列。在一些實施例中，慢病毒載體包含截斷的RRE序列。

【0211】 在一些實施例中，慢病毒載體包含增強子、啟動子、微小RNA（miRNA）的目標序列、轉錄後調控元件、包裝訊號、多聚A序列、內含子序列或其任何組合。在某些實施例中，慢病毒載體包含促進核苷酸序列在肝細胞中表現的增強子。

【0212】 在某些實施例中，在慢病毒載體內包括例如與FIX轉基因可操作

地連接的一個或多個miRNA目標序列將是有用的。因此，本文還提供了與FIX核苷酸序列可操作地連接或以其他方式插入慢病毒載體內的至少一個miRNA序列靶標。慢病毒載體中包括的多於一個拷貝的miRNA目標序列可以增加系統的有效性。

【0213】 還包括不同的miRNA目標序列。例如，表現多於一種轉基因的慢病毒載體可以具有在多於一個miRNA目標序列控制下的轉基因，所述miRNA目標序列可以是相同或不同的。miRNA目標序列可以是串聯的，但是也包括其他排列。含有miRNA目標序列的轉基因表現盒也可以以反義定向插入慢病毒載體內。反義定向可用於產生病毒顆粒，以避免原本可能對生產細胞有毒的基因產物的表現。

【0214】 在其他實施例中，慢病毒載體包含1、2、3、4、5、6、7或8個拷貝且相同或不同的miRNA目標序列。然而，在某些其他實施例中，慢病毒載體將不包括任何miRNA目標序列。是否要包括miRNA目標序列（以及數量）的選擇將通過諸如預期的組織目標、所需的表現量等參數來指引。

【0215】 在一個實施例中，目標序列是miR-223目標，已經報導所述miR-223目標在骨髓定向祖細胞中最有效地阻斷表現並且在更早期的HSPC中至少部分地阻斷表現。miR-223目標可以在分化的髓樣細胞（包括粒細胞、單核細胞、巨噬細胞、髓樣樹突細胞）中阻斷表現。miR-223目標還可以適於依賴於淋巴譜系或紅細胞譜系中的穩健轉基因表現的基因療法應用。miR-223目標還可以在人類HSC中非常有效地阻斷表現。

【0216】 在另一個實施例中，目標序列是miR142目標（tccataaagt aggaacact aca(SEQ ID NO: 27)）。在一個實施例中，慢病毒載體包含miR-142目標序列的至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、或至少六個拷貝。在一些實施例中，慢病毒載體包含miR-142目標序列的四個拷貝。在某些實施例中，將造血特異性微小RNA（如miR-142（142T）或「142-3pT」）的互補序列併入慢病毒載體的3'非轉譯區中，使得編碼轉基

因的轉錄物易發生miRNA介導的下調。通過這種方法，可以在造血譜系抗原呈現細胞（APC）中防止轉基因表現，同時在非造血細胞中維持所述轉基因表現（Brown等人, Nat Med 2006）。這種策略可以對轉基因表現施加嚴格的轉錄後控制，並且由此使得能夠穩定遞送和長期表現轉基因。在一些實施例中，miR-142調控防止經轉導細胞的免疫介導的清除和/或誘導抗原特異性調控T細胞(T reg)，並且介導對轉基因編碼抗原的穩健的免疫耐受。

【0217】 在一些實施例中，目標序列是miR181目標。Chen C-Z和Lodish H, Seminars in Immunology (2005) 17(2):155-165披露了miR-181，它是在小鼠骨髓內的B細胞中特異性表現的miRNA（Chen和Lodish, 2005）。所述文獻還揭露，一些人類miRNA與白血病相關。

【0218】 目標序列可以與miRNA完全或部分互補。術語「完全互補」意指，目標序列的核酸序列與識別所述目標序列的miRNA的序列100%互補。術語「部分互補」意指，目標序列與識別所述目標序列的miRNA的序列僅部分互補，借此部分互補的序列仍然被miRNA識別。換句話說，在本文的情況下，部分互補的目標序列有效識別相應miRNA，並且實現在表現該miRNA的細胞中防止或減少轉基因表現。miRNA目標序列的例子描述於以下文獻中：WO2007/000668、WO2004/094642、WO2010/055413或WO2010/125471，上述文獻通過引用以其整體併入本文。

【0219】 在其他實施例中，在本文的慢病毒載體中的編碼具有FIX活性的多肽的核苷酸序列包含含有coFIX-1-R338L(SEQ ID NO: 1)的慢病毒載體，由其組成或基本上由其組成。

C.3. 慢病毒載體

【0220】 慢病毒包括牛慢病毒組、馬慢病毒組、貓慢病毒組、綿羊山羊慢病毒組和靈長類動物慢病毒組的成員。用於基因療法的慢病毒載體的開發已經綜述於Klimatcheva等人 (1999) Frontiers in Bioscience 4:481-496中。

適用於基因療法的慢病毒載體的設計和使用描述於例如美國專利號 6,207,455 和 6,615,782 中。慢病毒的例子包括但不限於 HIV-1、HIV-2、HIV-1/HIV-2 假型、HIV-1/SIV、FIV、山羊關節炎腦炎病毒 (CAEV)，馬傳染性貧血病毒、和牛免疫缺陷病毒。

【0221】 本文的慢病毒載體的示意圖示於圖1中。在一些實施例中，本文的慢病毒載體是「第三代」慢病毒載體。如本文所用，術語「第三代」慢病毒載體是指具有第二代載體系統的特徵並且進一步缺乏功能性tat基因的慢病毒包裝系統，如已經使tat基因從其缺失或失活的慢病毒包裝系統。通常，在單獨的表現構築體上提供編碼rev的基因。參見例如，Dull等人 (1998) J. Virol. 72: 8463-8471。如本文所用，「第二代」慢病毒載體系統是指缺乏功能性輔助基因的慢病毒包裝系統，如已經使輔助基因vif、vpr、vpu和nef從其缺失或失活的慢病毒包裝系統。參見例如，Zufferey等人 (1997) Nat. Biotechnol. 15:871-875。如本文所用，「包裝系統」是指一組病毒構築體，其包含編碼包裝重組病毒中所涉及的病毒蛋白的基因。通常，包裝系統的構築體最終將被併入包裝細胞中。

【0222】 在一些實施例中，本文的第三代慢病毒載體是自失活的慢病毒載體。在一些實施例中，慢病毒載體是VSV.G假型慢病毒載體。在一些實施例中，慢病毒載體包含用於轉基因表現的哺乳動物特異性啟動子。在一些實施例中，哺乳動物特異性啟動子是巨細胞病毒 (CMV) 啟動子。在一些實施例中，慢病毒載體包含用於轉基因表現的肝細胞特異性啟動子。在一些實施例中，肝細胞特異性啟動子是增強的轉甲狀腺素蛋白啟動子。在一些實施例中，慢病毒載體包含miR-142的一個或多個目標序列，以減少對轉基因產物的免疫反應。在一些實施例中，將miR-142的一個或多個目標序列併入本文的慢病毒載體中允許所需的轉基因表現譜。例如，併入miR-142的一個或多個目標序列可以抑制血管內和血管外造血譜系中的轉基因表現，而在非造血細胞中維持轉基因表現。在用本文的慢病毒載體系統治療的易

患腫瘤的小鼠中未偵檢到腫瘤發生。參見Brown等人 (2007) *Blood* 110:4144-52, Brown等人 (2006) *Nat. Med.* 12:585-91, 以及Cantore等人 (2015) *Sci. Transl. Med.* 7(277):277ra28。

【0223】 本文的慢病毒載體包括編碼本文所述具有FIX活性的多肽的多核苷酸。在一個實施例中, 具有FIX活性的多肽與表現控制序列可操作地連接。如本文所用, 當兩個核酸序列以允許每個組成核酸序列保留其功能性的方式共價連接時, 所述兩個核酸序列是可操作地連接的。當編碼序列和基因表現控制序列以將編碼序列的表現或轉錄和/或轉譯置於基因表現控制序列的影響或控制下的方式共價連接時, 將所述編碼序列和基因表現控制序列稱為可操作地連接的。如果誘發5'基因表現序列中的啟動子導致編碼序列的轉錄, 並且如果兩個DNA序列之間的連接的性質不會 (1) 導致引入移碼突變, (2) 干擾啟動子區引導編碼序列轉錄的能力, 或 (3) 干擾相應的RNA轉錄物轉譯成蛋白質的能力, 則這兩個DNA序列被認為是可操作地連接的。因此, 如果基因表現序列能夠實現編碼核酸序列的轉錄, 使得所得的轉錄物被轉譯成所需的蛋白質或多肽, 則所述基因表現序列與該編碼核酸序列是可操作地連接的。

【0224】 在某些實施例中, 慢病毒載體是能夠轉導非分裂細胞的重組慢病毒的載體。在某些實施例中, 慢病毒載體是能夠轉導肝細胞 (liver cell) (例如, 肝細胞 (hepatocyte)) 的重組慢病毒的載體。慢病毒基因組和前病毒DNA通常具有在逆轉錄病毒中發現的三個基因: gag、pol和env, 這些基因側接有兩個長末端重複 (LTR) 序列。gag基因編碼內部結構 (基質、衣殼和核衣殼) 蛋白; pol基因編碼RNA引導的DNA聚合酶 (逆轉錄酶)、蛋白酶和整合酶; 並且env基因編碼病毒包膜糖蛋白。5'和3' LTR用於促進病毒顆粒RNA的轉錄和聚腺苷酸化。LTR含有病毒複製所需的所有其他順式作用序列。慢病毒具有另外的基因, 包括vif、vpr、tat、rev、vpu、nef和vpx (在HIV-1、HIV-2和/或SIV中)。

【0225】 與5' LTR相鄰的是基因組逆轉錄（tRNA引子結合位點）和將病毒RNA有效衣殼化至顆粒中（Psi位點）所需的序列。如果病毒基因組中缺少衣殼化（或將逆轉錄病毒RNA包裝至感染性病毒顆粒中）所需的序列，則順式缺陷會阻止基因組RNA的衣殼化。

【0226】 然而，所得的突變體仍然能夠引導所有病毒顆粒蛋白的合成。本文提供了一種產生能夠轉導非分裂細胞的重組慢病毒載體的方法，所述方法包括用攜帶包裝功能（即gag、pol和env，以及rev和tat）的兩種或更多種載體轉染合適的宿主細胞。如下文將公開的，缺乏功能性tat基因的載體對於某些應用是所期望的。因此，例如，第一載體可提供編碼病毒gag和病毒pol的核酸，並且另一載體可提供編碼病毒env的核酸以產生包裝細胞。將提供異源基因的載體（在本文中被鑒定為轉移載體）引入該包裝細胞中，得到生產細胞，所述生產細胞釋放攜帶目的外源基因的感染性病毒顆粒。

【0227】 根據上文所指示的載體和外源基因的配置，第二載體可以提供編碼病毒包膜（env）基因的核酸。env基因幾乎可以源自幾乎任何合適的病毒，包括逆轉錄病毒。在一些實施例中，env蛋白是雙嗜性包膜蛋白，其允許轉導人和其他物種的細胞。

【0228】 逆轉錄病毒來源的env基因的例子包括但不限於：莫洛尼鼠白血病病毒（MoMuLV或MMLV）、哈威鼠肉瘤病毒（HaMuSV或HSV）、鼠乳腺腫瘤病毒（MuMTV或MMTV）、長臂猿白血病病毒（GaLV或GALV）、人類免疫缺陷病毒（HIV）和勞斯肉瘤病毒（RSV）。也可以使用其他env基因，如水疱性口炎病毒（VSV）蛋白G（VSV G）、肝炎病毒和流感病毒的env基因。在一些實施例中，病毒env核酸序列與本文其他地方描述的調控序列可操作地締合。

【0229】 在某些實施例中，慢病毒載體缺失HIV毒力基因env、vif、vpr、vpu和nef，卻沒有損害所述載體轉導非分裂細胞的能力。在一些實施例中，慢病毒載體包含3' LTR的U3區的缺失。U3區的缺失可以是完全缺失或部分

缺失。

【0230】 在一些實施例中，可以在細胞中將本文所述的包含具有FIX活性的多肽核苷酸序列的本文的慢病毒載體與 (a) 包含gag、pol或gag和pol基因的第一核苷酸序列和 (b) 包含異源env基因的第二核苷酸序列一起轉染；其中所述慢病毒載體缺乏功能性tat基因。在其他實施例中，進一步用包含rev基因的第四核苷酸序列轉染細胞。在某些實施例中，慢病毒載體缺乏選自vif、vpr、vpu、vpx和nef或其組合的功能基因。

【0231】 在某些實施例中，本文的慢病毒載體包含編碼gag蛋白、Rev反應元件、中樞聚嘌呤軌道(cPPT)或其任何組合的一個或多個核苷酸序列。

【0232】 在一些實施例中，慢病毒載體在其表面上含有一種或多種多肽，所述一種或多種多肽係改善慢病毒載體之或者編碼的具有FIX活性的多肽之靶向和/或活性。所述一種或多種多肽可以在慢病毒載體從宿主細胞出芽的過程中併入。在慢病毒產生的過程中，病毒顆粒從生產宿主細胞出芽離開。在出芽過程中，病毒顆粒帶有脂質外套，所述脂質外套源自宿主細胞的脂質膜。作為結果，病毒顆粒的脂質外套可以包括先前存在於宿主細胞表面上的膜結合多肽。

【0233】 在一些實施例中，慢病毒載體在其表面上表現一種或多種多肽，在投予至人類受試者後所述一種或多種多肽抑制對慢病毒載體的免疫反應。在一些實施例中，慢病毒載體的表面包含一種或多種CD47分子。CD47是「自體標記」蛋白，其在人類細胞上廣泛表現。CD47的表面表現通過CD47與巨噬細胞表現的SIRP α 的相互作用抑制巨噬細胞誘發的內源性細胞的吞噬作用。表現高量CD47的細胞，在體內不太可能被人巨噬細胞靶向和破壞。

【0234】 在一些實施例中，慢病毒載體在其表面上包含高濃度的CD47多肽分子。在一些實施例中，慢病毒載體是在具有高CD47表現量的細胞株中產生的。在某些實施例中，慢病毒載體在CD47^高細胞中產生，其中所述細胞在細胞膜上具有CD47的高表現。在特定實施例中，慢病毒載體是在CD47^高

HEK 293T細胞中產生的，其中HEK 293T在細胞膜上具有高表現的CD47。在一些實施例中，HEK 293T細胞被修飾以具有相對於未修飾的HEK 293T細胞為增加的CD47表現。在某些實施例中，CD47是人類CD47。

【0235】 在一些實施例中，慢病毒載體包含人類CD47，所述人類CD47含有與SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%相同的胺基酸序列。

【0236】 在一些實施例中，慢病毒載體具有很少或沒有主要組織相容性複合物I類（MHC-I）的表面表現。表面表現的MHC-I展示來自細胞內部的「非自體」蛋白的胜肽片段，如代表感染的蛋白質片段，從而促進針對細胞的免疫反應。在一些實施例中，慢病毒載體是在MHC-I^低細胞中產生的，其中所述細胞在細胞膜上具有減少的MHC-I的表現。在一些實施例中，慢病毒載體是在MHC-I-（或「MHC-I^無」、「MHC-I^{陰性}」或「MHC-陰性」）細胞中產生的，其中所述細胞缺乏MHC-I的表現。

【0237】 在特定實施例中，慢病毒載體包含脂質外套，所述脂質外套含有高濃度的CD47多肽並且缺乏MHC-I多肽。在某些實施例中，慢病毒載體是在CD47^高/MHC-I^低細胞株，例如CD47^高/MHC-I^低 HEK 293T細胞株中產生的。在一些實施例中，慢病毒載體是在CD47^高/MHC-I^無細胞株，例如CD47^高/MHC-I^無 HEK 293T細胞株中產生的。慢病毒載體的例子揭露於以下文獻中：美國專利號9,050,269和國際公開號WO9931251、WO9712622、WO9817815、WO9817816和WO9818934，這些文獻通過引用以其整體併入本文。

III. 醫藥組合物

【0238】 含有本文的慢病毒載體、核酸分子、所述核酸分子編碼的多肽或宿主細胞的組合物可以含有合適的醫藥上可接受的載劑。例如，所述組合物可以含有有助於將活性化合物加工成設計用於遞送至作用位點的製劑

的賦形劑和/或助劑。

【0239】 在一個實施例中，本文涉及醫藥組合物，其包含 (a) 本文所公開的核酸分子、慢病毒載體、多肽或宿主細胞；和 (b) 醫藥上可接受的賦形劑。

【0240】 可以將醫藥組合物配製用於通過推注注射的腸胃外投予（即靜脈內、皮下或肌肉內）。注射用配製品可以以單位劑型存在，例如在添加有防腐劑的安瓿中或多劑量容器中存在。組合物可以採取諸如於油性或水性媒劑中的懸浮液、溶液或乳液等形式，並且含有諸如懸浮劑、穩定劑和/或分散劑等配製劑。可替代地，活性成分可以呈粉末形式，用於用合適的載具（vehicle，例如無熱原水）來構造。

【0241】 在一個實施例中，慢病毒載體的投予途徑是腸胃外的。如本文所用的術語腸胃外包括靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、直腸或陰道投予。腸胃外投予的靜脈內形式是較佳的。雖然所有這些投予形式都被明確視為在本文的範圍內，但是投予形式可以是注射用溶液，特別是用於靜脈內或動脈內注射或滴注的溶液。通常，適於注射的醫藥組合物可以包含緩衝液（例如乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、表面活性劑（例如聚山梨醇酯）、視情況存在的穩定劑（例如人類白蛋白）等。然而，在與本文所教示者相容的其他方法中，可以將慢病毒載體直接遞送至不良細胞群的位點，由此增加患病組織對治療劑的暴露。

【0242】 用於腸胃外投予的製劑包括無菌的水性或非水性溶液、懸浮液和乳液。非水性溶劑的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄欖油、以及可注射的有機酯如油酸乙酯。水性載劑包括水、醇性/水性溶液、乳液或懸浮液，包括鹽水和緩衝介質。在本文中，醫藥上可接受的載劑包括但不限於0.01至0.1 M且較佳地為0.05 M磷酸鹽緩衝液或0.8%鹽水。其他常見腸胃外媒劑包括磷酸鈉溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化鈉、乳酸林格氏液或不揮發油。靜脈內媒劑包括體液和營養補充劑、電解質補充劑（如基於林格氏右旋糖的那些）等。也可以存在防腐劑和其他添加劑，如例如抗微

生物劑、抗氧化劑、螯合劑和惰性氣體等。

【0243】 更具體地，適用於注射使用的醫藥組合物包括無菌的水性溶液（在水溶性的情況下）或分散液，以及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。在此類情況下，組合物必須是無菌的並且應當是易於注射的程度的流體。所述組合物在製造和儲存條件下應當穩定，並且將較佳地抵抗微生物（如細菌和真菌）的污染作用而保存。載劑可以是溶劑或分散介質，所述溶劑或分散介質含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液體聚乙二醇等）及其合適的混合物。例如，通過使用包衣如卵磷脂，通過在分散液的情況下維持所需的粒徑以及通過使用表面活性劑，可以維持適當的流動性。防止微生物的作用可以通過各種抗細菌以及抗真菌劑，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞等來實現。在許多情況下，較佳在組合物中包括等滲劑，例如糖、多元醇（如甘露糖醇、山梨糖醇）或氯化鈉。通過在所述組合物中包括延遲吸收的試劑例如單硬脂酸鋁和明膠，可以實現可注射組合物的延長吸收。

【0244】 在任何情況下，可以通過將活性化合物（例如，多肽自身或與其他活性劑組合）以所需的量併入適當的溶劑中，隨後過濾滅菌來製備無菌可注射溶液，所述溶劑根據需要具有本文所列舉成分中的一種或組合。通常，通過將所述活性化合物摻入無菌媒劑中來製備分散液，所述無菌媒劑含有鹼性分散介質和來自上文所列舉的那些成分的所需其他成分。在用於製備無菌可注射溶液的無菌粉末的情況下，較佳製備方法為真空乾燥和冷凍乾燥，這些方法由先前無菌過濾的溶液產生活性成分和任何其他所需成分的粉末。將注射用製劑加工，填充至容器如安瓿、袋子、瓶子、注射器或小瓶中，並根據本領域已知的方法在無菌條件下密封。此外，製劑可以以試劑盒的形式包裝和出售。此類製品將較佳具有標籤或包裝說明書，所述標籤或包裝說明書指示相關組合物可用於治療患有或易患凝血障礙的受試者。

【0245】 可注射長效配製品可以通過以下方式來製備：形成藥物於生物可降解聚合物（如聚丙交酯-聚乙交酯）中的微包封基質。根據藥物與聚合物的比率以及所採用聚合物的性質，可以控制藥物釋放速率。其他示例性生物可降解聚合物是聚原酸酯和聚酐。可注射長效配製品還可以通過將藥物捕集於脂質體或微乳液中來製備。

【0246】 醫藥組合物還可以經配製為例如含有常規栓劑基質（如可哥脂或其他甘油酯）的栓劑或保留灌腸劑經直腸投予。

【0247】 可以將補充性活性化合物併入組合物中。在一個實施例中，用凝血因子或其變異體、片段、類似物或衍生物配製本文的核酸分子。例如，凝血因子包括但不限於因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、因子XII、因子XIII、凝血酶原、纖維蛋白原、溫韋伯氏疾病因子或重組可溶性組織因子（rsTF）或前述任一種的活化形式。止血劑的凝血因子還可以包括抗溶纖維蛋白藥，例如 ϵ -胺基己酸、氨甲環酸。

【0248】 可以調節劑量方案以提供最佳所需反應。例如，可以投予單次推注，可以隨時間投予若干次分開劑量，或者可以如治療情況的緊迫性所示成比例地減少或增加劑量。有利的是以劑量單位形式配製腸胃外組合物，以便於劑量的投予和一致性。參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences（Mack Pub. Co.，賓夕法尼亞州伊斯頓市，1980）。

【0249】 在上述範圍中間的劑量也意圖落入本文的範圍內。可以每日、隔日、每週或根據實證分析確定的任何其他期程向受試者投予此類劑量。示例性治療使得需要在例如至少六個月的延長時期內投予多個劑量。

【0250】 可以在不同的發育階段將本文的慢病毒載體投予至受試者。例如，在人類中，不同發育階段可分類為新生兒（例如，年齡小於1個月）、嬰兒（年齡為1個月至2歲）、兒童（年齡為2歲至12歲）、青少年（年齡為12歲至小於16歲）或成年（年齡為超過16歲）。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至人類新生兒。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體

投予至年齡小於約1個月的人類受試者。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至人類嬰兒。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至年齡為約1個月至約2歲之間的人類受試者。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至人類兒童。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至年齡為約2歲至約12歲之間的人類受試者。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至人類青少年。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至年齡為約12歲至約16歲之間的人類受試者。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至人類成年人。在一些實施例中，將本文的慢病毒載體投予至年齡大於約16歲的人類受試者。熟習此項技術者將能夠確定其他生物的發育階段。例如，熟習此項技術者將理解兩周齡的小鼠是青少年。

【0251】 本文的慢病毒載體的劑量和頻率可以根據熟習此項技術者已知的多種因素而變化。

【0252】 本文的慢病毒載體可視情況地與有效治療需要治療（例如，預防性或治療性）的障礙或病症的其他藥劑組合投予。

【0253】 如本文所用，與輔助療法結合或組合的本文的慢病毒載體的投予意指依序、同時、同延、並行、伴隨或同期投予或施用所述療法和所公開多肽。熟習此項技術者應瞭解，組合治療方案中各種組分的投予或施用可以定時以增強治療的整體有效性。基於所選輔助療法和本說明書的傳授內容，一般技術者（例如，醫師）在不進行過度實驗的情況下便能夠容易地辨別有效的組合治療方案。

【0254】 應進一步理解，本文的慢病毒載體可以與一種或多種藥劑結合或組合使用（例如，以提供組合治療方案）。可以與本文的慢病毒載體組合的示例性藥劑，包括表示用於所治療的特定障礙的當前護理標準的藥劑。此類藥劑在本質上可以是化學性的或生物性的。術語「生物性的(biologic)」或「生物製劑(biologic agent)」是指意圖用作治療劑而從活生物體和/或其產物所製備的任何醫藥活性劑。

【0255】 要與本文的慢病毒載體組合使用的藥劑量可以隨受試者變化，或者可以根據本領域的知識來投予。參見例如，Bruce A Chabner等人, Antineoplastic Agents, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman等人, 編輯, 第9版 1996)。在另一個實施例中，投予符合護理標準的量的這種藥劑。

【0256】 在某些實施例中，本文的慢病毒載體與免疫抑制劑、抗過敏劑或抗炎劑結合投予。這些藥劑通常是指用於抑制或遮罩本文所治療的受試者的免疫系統的物質。這些藥劑包括抑制細胞激素產生、下調或抑制自體抗原表現或遮罩MHC抗原的物質。此類藥劑的例子包括2-胺基-6-芳基-5-取代的嘧啶；硫唑嘌呤；環磷醯胺；溴隱亭；達那唑；氨苯砒；戊二醛；針對MHC抗原和MHC片段的抗獨特型抗體；環孢菌素A；類固醇，如糖皮質激素，例如潑尼松，甲潑尼松龍和地塞米松；細胞激素或細胞激素受體拮抗劑（包括抗干擾素- γ 抗體、抗干擾素- β 抗體或抗干擾素- α 抗體，抗腫瘤壞死因子- α 抗體，抗腫瘤壞死因子- β 抗體，抗介白素-2抗體和抗IL-2受體抗體）；抗LFA-1抗體，包括抗CD11a抗體和抗CD18抗體；抗L3T4抗體；異源抗淋巴細胞球蛋白；全T抗體；含有LFA-3結合結構域的可溶性肽；鏈激酶；TGF- β ；鏈道酶（streptodornase）；FK506；RS-61443；去氧精肌菌素；和雷帕黴素。在某些實施例中，藥劑是抗組胺劑。如本文所用，「抗組胺劑」是拮抗組胺的生理作用的藥劑。抗組胺劑的例子是氯苯那敏、苯海拉明、異丙嗪、色甘酸鈉、阿司咪唑、馬來酸阿紮他定、馬來酸溴苯那敏、馬來酸卡比沙明、鹽酸西替利嗪、富馬酸氯馬斯汀、鹽酸賽庚啶、馬來酸右溴苯那敏、馬來酸右氯苯那敏、茶苯海明、鹽酸苯海拉明、琥珀酸多西拉敏、鹽酸非索非那定、鹽酸特非那定、鹽酸羥嗪、氯雷他定、鹽酸美克洛嗪、檸檬酸曲吡那敏、鹽酸曲吡那敏和鹽酸曲普利啶。

【0257】 可以將免疫抑制劑、抗過敏劑或抗炎劑併入慢病毒載體投予方

案中。例如，免疫抑制劑或抗炎劑的投予可以在所公開的慢病毒載體的投予之前開始，並且之後可以繼續一個或多個劑量。在某些實施例中，將免疫抑制劑或抗炎劑作為慢病毒載體的前驅給藥進行投予。

【0258】 如前所述，本文的慢病毒載體可以以醫藥有效量投予，以用於凝血障礙的體內治療。在這一方面，應當理解，本文的慢病毒載體可以被配製以有利於投予和促進活性劑的穩定性。較佳地，根據本文的醫藥組合物包含醫藥上可接受的、無毒的、無菌載體，如生理鹽水、無毒緩衝液、防腐劑等。當然，本文的醫藥組合物可以以單劑量或多劑量投予，以提供醫藥有效量的多肽。

【0259】 除了活性化合物以外，液體劑型還可以含有惰性成分，如水、乙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯。

【0260】 合適的藥物載劑的非限制性例子也描述於E. W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中。賦形劑的一些例子包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、水稻、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。組合物還可以含有pH緩衝試劑以及潤濕劑或乳化劑。

【0261】 在一些實施例中，組合物是通過選自以下的途徑來投予：局部投予、眼內投予、鞘內投予和硬膜下投予。腸胃外投予可以是靜脈內或皮下投予。

【0262】 在一些實施例中，組合物用於治療有需要的受試者中的出血性疾病或病症。出血性疾病或病症選自出血凝結障礙、關節積血、肌肉出血、口腔出血、出血症、出血至肌肉中、口腔出血症、創傷、頭部創傷、胃腸出血、顱內出血、腹內出血、胸腔內出血、骨折、中樞神經系統出血、咽後間隙出血、腹膜後間隙出血、髂腰肌鞘出血及其任何組合。在仍其他實施例中，受試者預定要進行手術。在又其他實施例中，治療是預防性的或

按需的。

【0263】 多種測試可用於評估凝結系統的功能：活化部分促凝血酶原激酶時間（aPTT）測試、呈色測定、ROTEM®測定、凝血酶原時間（PT）測試（也用於確定INR）、纖維蛋白原測試（通常通過克勞斯法進行）、血小板計數、血小板功能測試（通常通過PFA-100進行）、TCT、出血時間、混合測試（如果將患者的血漿與正常血漿混合，是否矯正異常）、凝血因子測定、抗磷脂抗體、D-二聚體、遺傳測試（例如，因子V Leiden、凝血酶原突變G20210A）、稀釋魯塞爾蝰蛇毒時間（dRVVT）、雜項血小板功能測試、凝血彈性描記法（TEG或Sonoclot）、血栓彈性測定（TEM®，例如ROTEM®）或優球蛋白溶解時間（ELT）。

【0264】 aPTT測試是量測「內源性」（也稱為接觸啟動路徑）和常見凝血路徑二者的功效的表現指示物。這個測試一般用於量測市售重組凝血因子（例如，FVIII或FIX）的凝血活性。它與量測外部路徑的凝血酶原時間（PT）結合使用。

【0265】 ROTEM®分析提供關於止血的整體動力學的資訊：凝血時間、凝塊形成、凝塊穩定性和溶解。血栓彈性測定中的不同參數依賴於血漿凝結系統的活性、血小板功能、纖維蛋白溶解或影響這些相互作用的許多因素。該測定可以提供次級止血的全面見解。

IV. 核酸分子

【0266】 本文還提供了編碼具有FIX活性的多肽的經分離的核酸分子。在某些實施例中，經分離的核酸分子包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核酸序列。

【0267】 在一些實施例中，經分離的核酸分子包含與SEQ ID NO: 1所示

的核苷酸序列具有至少約85%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約90%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約91%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約92%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約93%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約94%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約95%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約96%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約97%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約98%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約99%序列同一性。在一些實施例中，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列相同。

【0268】 在某些實施例中，經分離的核酸分子還包含編碼訊息胜肽的核酸序列。在一些實施例中，編碼訊息胜肽的核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸1至84；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸1至84；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸1至84；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸1至84；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸1至84；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸1至84。在一些實施例中，編碼訊息胜肽的核酸序列包含以下各項所示的核苷酸序列：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸1至84；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸1至84；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸1至84；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸1至84；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸1至84；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸1至84。

酸1至84。

【0269】 在某些實施例中，經分離的核酸分子還包含編碼前肽的核酸序列。在一些實施例中，編碼前肽的核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸85至138；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸85至138；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸85至138；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸85至138；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸85至138；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸85至138。在一些實施例中，編碼前肽的核酸序列包含以下各項所示的核苷酸序列：(i) SEQ ID NO: 2的核苷酸85至138；(ii) SEQ ID NO: 3的核苷酸85至138；(iii) SEQ ID NO: 4的核苷酸85至138；(iv) SEQ ID NO: 5的核苷酸85至138；(v) SEQ ID NO: 6的核苷酸85至138；或(vi) SEQ ID NO: 7的核苷酸85至138。

【0270】 本文還提供了包含本文描述的核酸分子的載體。在一些實施例中，載體是慢病毒載體，例如本文公開的任何慢病毒載體。在某些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核酸序列。

【0271】 在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約85%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約90%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序

列具有至少約91%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約92%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約93%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約94%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約95%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約96%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約97%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約98%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少約99%序列同一性的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列相同的核苷酸序列。

【0272】 在一些實施例中，載體還包含本文所述的一種或多種調控元件。在某些實施例中，載體包含組織特異性啟動子。在某些實施例中，所述組織特異性啟動子選擇性地增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現。在某些實施例中，選擇性增強具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現的組織特異性啟動子包括APOA2啟動子、SERPINA1 (hAAT) 啟動子、mTTR 啟動子、MIR122啟動子或其任何組合。在一些實施例中，所述目標肝細胞是肝細胞。

V. 組織特異性表現

【0273】 在某些實施例中，在慢病毒載體內包括例如與最佳化的FIX轉基因可操作地連接的一個或多個miRNA目標序列是有用的。因此，本文還提供了與最佳化的FIX核苷酸序列可操作地連接或以其他方式插入慢病毒載體內的至少一個miRNA序列靶標。慢病毒載體中包括的多於一個拷貝的

miRNA目標序列可以增加系統的有效性。

【0274】 還包括不同的miRNA目標序列。例如，表現多於一種轉基因的慢病毒載體可以具有在多於一個miRNA目標序列控制下的轉基因，所述miRNA目標序列可以是相同或不同的。miRNA目標序列可以是串聯的，但是也包括其他排列。含有miRNA目標序列的轉基因表現盒也可以以反義定向插入慢病毒載體內。反義定向可用於產生病毒顆粒，以避免原本可能對生產細胞有毒的基因產物的表現。

【0275】 在其他實施例中，慢病毒載體包含1、2、3、4、5、6、7或8個拷貝且相同或不同的miRNA目標序列。然而，在某些其他實施例中，慢病毒載體將不包括任何miRNA目標序列。是否要包括miRNA目標序列（以及數量）的選擇將通過諸如預期的組織目標、所需的表現量等已知參數來指引。

【0276】 在一個實施例中，目標序列是miR-223目標，已經報導所述miR-223目標在骨髓定向祖細胞中最有效地阻斷表現並且在更早期的HSPC中至少部分地阻斷表現。miR-223目標可以在分化的髓樣細胞（包括粒細胞、單核細胞、巨噬細胞、髓樣樹突細胞）中阻斷表現。miR-223目標還可以適於依賴於淋巴譜系或紅細胞譜系中的穩健轉基因表現的基因療法應用。miR-223目標還可以在人類HSC中非常有效地阻斷表現。

【0277】 在另一個實施例中，目標序列是miR142目標（例如，tccataaagt aggaaacact aca（SEQ ID NO: 27））。在一個實施例中，慢病毒載體包含4個拷貝的miR-142目標序列。在某些實施例中，將造血特異性微小RNA（如miR-142（142T））的互補序列併入慢病毒載體的3'非轉譯區中，使得編碼轉基因的轉錄物易發生miRNA介導的下調。通過這種方法，可以在造血譜系抗原呈現細胞（APC）中防止轉基因表現，同時在非造血細胞中維持所述轉基因表現（Brown等人, Nat Med 2006）。這種策略可以對轉基因表現施加嚴格的轉錄後控制，並且由此使得能夠穩定遞送和長期表現轉基因。

在一些實施例中，miR-142調控防止經轉導細胞的免疫介導的清除和/或誘導抗原特異性調控T細胞（T reg），並且介導對轉基因編碼抗原的穩健的免疫耐受。

【0278】 在一些實施例中，目標序列是miR181目標。Chen C-Z和Lodish H, *Seminars in Immunology* (2005) 17(2):155-16揭露了miR-181，它是在小鼠骨髓內的B細胞中特異性表現的miRNA（Chen和Lodish, 2005）。所述文獻還揭露，一些人類miRNA與白血病相關。

【0279】 目標序列可以與miRNA完全或部分互補。術語「完全互補」意指，目標序列的核酸序列與識別所述目標序列的miRNA的序列100%互補。術語「部分互補」意指，目標序列與識別所述目標序列的miRNA的序列僅部分互補，借此部分互補的序列仍然被miRNA識別。換句話說，在本文的情況下，部分互補的目標序列有效識別相應miRNA，並且實現在表現該miRNA的細胞中防止或減少轉基因表現。miRNA目標序列的例子描述於以下文獻中：WO2007/000668、WO2004/094642、WO2010/055413或WO2010/125471，上述文獻通過引用以其整體併入本文。

VI. 宿主細胞及製備方法

【0280】 本文還提供了包含本文的核酸分子或慢病毒載體的宿主細胞。本文的某些態樣涉及製備或產生慢病毒載體，其包括用本文公開的慢病毒載體轉染和/或轉化宿主細胞。如本文所用，術語「轉化」應在廣義上使用，是指將DNA引入受體宿主細胞中，從而改變基因型並因此導致受體細胞的變化。

【0281】 「宿主細胞」是指已經用本文公開的慢病毒載體轉化的細胞。本文的宿主細胞較佳地具有哺乳動物來源；最佳地具有人或小鼠來源。相信熟習此項技術者有能力優先地確定最適合於其目的的特定宿主細胞株。示例性宿主細胞株包括但不限於CHO、DG44和DUXB11（中國倉鼠卵巢系，

DHFR-)、HELA (人宮頸癌)、CVI (猴腎系)、COS (具有SV40 T抗原的CVI的衍生物)、R1610 (中國倉鼠成纖維細胞)、BALBC/3T3 (小鼠成纖維細胞)、HAK (倉鼠腎系)、SP2/O (小鼠骨髓瘤)、P3x63-Ag3.653 (小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT (牛內皮細胞)、RAJI (人淋巴細胞)、PER.C6[®]、NS0、CAP、BHK21和HEK 293 (人腎)。在一個特定實施例中，宿主細胞選自：CHO細胞、HEK293細胞 (例如，HEK293T細胞)、BHK21細胞、PER.C6[®]細胞、NS0細胞、CAP細胞及其任何組合。在一些實施例中，本文的宿主細胞具有昆蟲來源。在一個特定實施例中，宿主細胞是SF9細胞。宿主細胞株通常可從商業服務、美國組織培養物保藏中心 (American Tissue Culture Collection) 或公開的文獻中獲得。

【0282】 將本文的核酸分子或載體引入宿主細胞中可以通過熟習此項技術者熟知的多種技術來完成。這些技術包括但不限於轉染 (包括電泳和電穿孔)、原生質體融合、磷酸鈣沈澱、與包膜DNA的細胞融合、顯微注射和用完整病毒感染。參見Ridgway, A. A. G. “*Mammalian Expression Vectors*” 第24.2章, 第470-472頁 Vectors, Rodriguez和Denhardt編輯 (Butterworths, 波士頓, 麻薩諸塞州 1988)。最佳地，通過電穿孔將質體引入宿主中。使轉化的細胞在適於產生輕鏈和重鏈的條件下生長，並測定重鏈和/或輕鏈蛋白質合成。示例性測定技術包括酶聯免疫吸附測定 (ELISA)、放射免疫測定 (RIA) 或螢光啟動細胞分選儀分析 (FACS)、免疫組織化學等。

【0283】 使包含本文的經分離的核酸分子或慢病毒載體的宿主細胞在適當生長培養基中生長。如本文所用，術語「適當生長培養基」是指含有細胞生長所需的營養素的培養基。細胞生長所需的營養素可以包括碳源、氮源、必需胺基酸、維生素、礦物質和生長因子。任選地，培養基可含有一種或多種選擇因子。任選地，培養基可含有小牛血清或胎牛血清 (FCS)。在一個實施例中，培養基基本上不含IgG。生長培養基通常通過例如藥物選擇或必需營養素的缺乏來選擇含有DNA構築體的細胞，所述必需營養素由

DNA構築體上或與DNA構築體共轉染的可選標記補充。培養的哺乳動物細胞通常在市售的含血清或無血清培養基(例如MEM、DMEM、DMEM/F12)中生長。在一個實施例中，培養基是CDoptiCHO (Invitrogen，加利福尼亞州卡爾斯巴德)。在另一個實施例中，培養基是CD17 (Invitrogen，加利福尼亞州卡爾斯巴德)。適合於所用具體細胞株的培養基的選擇在一般技術者的水準內。

【0284】 在一些實施例中，如本文所述係進一步修飾宿主細胞。例如，如本文所述，可以修飾宿主細胞以過表現CD47。在一些實施例中，宿主細胞被修飾而缺乏表面暴露的MHC-I。在一些實施例中，宿主細胞被修飾以具有相對於未修飾的宿主細胞降低的表面暴露的MHC-I。在某些實施例中，宿主細胞是CD47^高/MHC-I^低 HEK 293T細胞。

【0285】 本文的某些態樣涉及產生慢病毒載體的方法，所述方法包括在合適的條件下培養本文所述的宿主細胞並分離慢病毒載體。在某些態樣，本文涉及產生本文公開的慢病毒載體的方法，所述方法包括在合適的條件下培養本文所述的宿主細胞並分離慢病毒載體。

【0286】 本文所述的所有各個態樣、實施例和選擇都能以任何和所有變化組合。

【0287】 本說明書中所提到的所有出版物、專利和專利申請案都通過引用併入本文，併入程度如同明確且單獨地指示每個單獨出版物、專利或專利申請案通過引用併入一般。

【0288】 已經概括描述了本文，通過參考本文所提供的實例可以獲得進一步的理解。這些實例僅用於說明的目的，而不意圖加以限制。

實例

實例1：成年HemB小鼠中LV-coFIX-1-R338L介導的長期FIX表現和劑量反應

【0289】 將編碼具有R338L（「帕多瓦」）取代的人類FIX變異體且經密碼子最佳化的核苷酸序列（coFIX-1-R338L；SEQ ID NO: 1）轉殖到慢病毒載體中，以產生LV-coFIX-1-R338L（圖1）。為了確定動物模型中LV-FIX的劑量反應情況，在成年HemB小鼠中評價293T細胞中產生的LV-coFIX-1-R338L。將八周齡的HemB小鼠用LV-coFIX-1-R338L以 $3E9$ 、 $7.5E9$ 、 $2E10$ 或 $6E10$ TU/kg的劑量經由尾靜脈注射法進行治療（ $n=2$ 至10隻動物/劑量位準）。LV-FIX介導的血漿FIX活性和抗原位準通過FIX呈色測定和ELISA測定進行監測。每隻動物的穩態FIX血漿位準在圖2A中示出，並且LV-coFIX-1-R338L的劑量反應曲線在圖2B中示出。在HemB小鼠模型中，LV-coFIX-1-R338L已展示出Log-Log劑量反應情況，並且在HemB小鼠中達到正常循環性FIX活性的10%至200%所需的LV-coFIX-1-R338L劑量位準確定為在 $5E9$ 至 $2E10$ TU/kg之間的範圍。

【0290】 在LV治療後6個月內，監測3個較高劑量位準組別中經LV-coFIX-1-R338L治療的動物其長期FIX表現情況。繪製了循環性FIX活性（圖3A）和抗原（圖3B）的位準。觀察到在所有實驗動物中LV介導的FIX表現量一致，在研究期間未偵檢到FIX表現的損失，這證明了整合基因療法治療的長期穩定性。另外，觀察到與FIX活性的百分比（圖3B）相比，正常FIX抗原位準的百分比比較低（圖3A），這反映了在FIX轉基因中功能R338L突變的增益的用途。

實例2：LV-coFIX-1-R338L在成年和新生兒動物中具有相似的轉導效率

【0291】 慢病毒載體可以整合到宿主基因組中以介導長期的（long-lived）轉基因表現，因此，與新生兒治療後AAV介導的轉基因表現迅速喪失不同，預期慢病毒介導的轉基因表現不僅在用LV-FIX治療的成年動物中而且還在用LV-FIX治療的新生兒動物中維持持久的轉基因表現情況。為了評估新生兒治療後慢病毒FIX的轉導效率和轉基因表現情況，將兩日齡的HemB幼崽

用LV-coFIX-1-R338L以7.5E9、2E10和6E10 TU/kg經由顱靜脈注射法進行治療。與成年階段的治療（在8周時投予）相比，全身投予的LV-coFIX-1-R338L在每個劑量位準下在六個月的整個研究時期內，係介導持久且相似的FIX表現位準，這表明慢病毒FIX投予可以有效地治療成年和兒科患者。還評估了用LV-coFIX-1-R338L以3E9、7.5E9或2E10 TU/kg劑量經由顱靜脈注射法對青少年小鼠的治療（在兩周時投予）。在每個劑量位準下其FIX表現量均高於在8周或兩天時投予治療的小鼠中的相當劑量（ $n = 6$ 隻動物/劑量位準/年齡；圖4A）。

量測FIX活性以確定在8周和兩天時以7.5E9、2E10和6E10 TU/kg劑量經由顱靜脈注射法以及在兩周時以3E9、7.5E9或2E10 TU/kg劑量投予的HemB小鼠中LV-coFIX-1-R338L的劑量反應。與圖4A中的遠端資料一致，與在兩天或八周時投予治療的小鼠相比，在兩周時投予治療的小鼠（青少年小鼠）展現出更高的FIX活性（圖4B）。

實例3：在非人類靈長類動物中評價CD47^高 LV-coFIX-1-R338L

【0292】 產生過表現人類CD47的HEK293T細胞株，以調節慢病毒載體的免疫特性。具有高表面位準的人類CD47的慢病毒載體顆粒在NOD小鼠（NOD小鼠可以識別人類CD47）中顯示出較低的Kupffer細胞攝取和較高的肝細胞轉導。另外，相對於沒有過表現CD47的對照慢病毒載體，具有高表面人類CD47表現的慢病毒載體顆粒較不會被巨噬細胞吸收（圖5）。

【0293】 為了進一步評價高表面位準的人類CD47對體內肝轉導的影響，在以7.5E9 TU/kg劑量靜脈內投予後在非人靈長類動物（NHP）中比較CD47^高 LV-coFIX-1-R338L與LV-coFIX-1-R338L， $n = 3$ /治療組。使用豚尾猴以避免治療後NHP中的慢病毒載體限制。

【0294】 慢病毒載體治療後的循環性人類FIX水準通過人類FIX特異性活性（圖6A）和抗原測定（圖6B）來量測。與LV-coFIX-1-R338L相比，CD47

^高LV-coFIX-1-R338L在慢病毒載體治療後賦予了三倍高的人類FIX表現，分別為正常FIX活性的50%至150%和200%至300%（圖6A）。使用CD47^高LV-coFIX-1-R338L可能潛在地降低LV-FIX並降低與慢病毒載體治療相關的急毒性。

【0295】 除人類FIX表現量外，還通過APTT測定來監測治療動物的止血（圖6C）。儘管經載具治療的動物其APTT時間保持在相同範圍內，但是對於所有經LV-FIX治療的動物都觀察到APTT時間顯著縮短（圖6C），這表明由慢病毒載體治療產生的人類FIX蛋白具有功能活性。

實例4：在非人類靈長類動物中的CD47^高 LV-coFIX-1-R338L劑量反應

【0296】 為了確定NHP中CD47^高 LV-coFIX-1-R338L的劑量反應譜，以1.5E9和3E9 TU/kg測試了兩種較低劑量的CD47^高 LV-coFIX-1-R338L（n = 3/劑量位準）。通過分析穩態循環性的人類FIX特異性活性（圖7A）和抗原位準（圖7B）來監測慢病毒載體介導的人類FIX表現。

【0297】 與在HemB小鼠中觀察到的結果一致，在NHP中也觀察到LV-coFIX-1-R338L的log/log劑量反應曲線。達到正常循環性FIX位準的10%-100%所需的CD47^高 LV-coFIX-1-R338L的劑量範圍為3.5-6E9 TU/kg，低於HemB小鼠中的所述劑量範圍。治療劑量範圍的變化是由於與相同劑量水準下的HemB小鼠相比，在NHP中人類FIX表現水準高5至10倍，這可能歸因於動物物種的變化和人類CD47的識別（人類CD47在HemB小鼠中不被識別）。

【0298】 投予LV-coFIX-1-R338L的動物展現出非常輕微的急性免疫反應，如在投予後的ALT位準（圖8A）、AST位準（圖8B）、淋巴位準（圖8C）和體溫（圖8D）所指示。相對於LV對照載體，在投予CD47^高LV-coFIX-1-R338L後觀察到細胞激素反應降低（圖9A至圖9C）。儘管在投予對照LV後觀察到MIP-1a、MIP-1b和MCP-1的輕微增加，但在投予CD47^高

LV-coFIX-1-R338L後MIP-1a、MIP-1b和MCP-1表現降低並且在一些情況下偵檢不到。正如所預期的，LV-coFIX-1-R338L主要定位於肝和脾，在肝和脾中的載體拷貝數（VCN）比其他器官高超過100倍（圖10）。這些資料表明，CD47^高 LV-coFIX-1-R338L誘導降低的同種特異性免疫反應，對吞噬作用的抵抗力增強並且肝細胞基因轉移得到改善。

實例5：在非人類靈長類動物中對CD47^高 LV-coFIX-1-R338L劑量反應的額外測試

【0299】 用CD47^高 LV-coFIX-1-R338L以2.5E9 TU/kg劑量經由靜脈內投予對另外的豚尾猴進行治療。通過分析穩態循環性的人類FIX比活性（圖11A）和抗原水準（圖11B）來監測慢病毒載體介導的人類FIX表現。LV治療後，穩態循環性的人類FIX活性為正常值的約33%，並且循環性人類FIX抗原量為700 ng/mL，其與正常FIX抗原位準的14%相當。

【0300】 上文對特定實施例的描述將如此充分地揭示本文的一般性質，其他人可以通過應用本領域技術範圍內的知識，無需過度實驗即可針對各種應用容易地修改和/或調整此類特定實施例，不會背離本文的一般概念。因此，基於本文給出的傳授內容和指導，這些調整和修改意圖在所公開實施例的等效方案的含義和範圍內。應理解，本文中的措辭或術語是出於描述而非限制的目的，因此本說明書的術語或措辭將由熟習此項技術者根據傳授內容和指導來解釋。

【0301】 考慮到本文公開的公開文本的說明書和實踐，本文的其他實施例對於熟習此項技術者而言是顯而易見的。說明書和實例旨在被視為僅是示例性的，本文的真實範圍和精神是通過以下申請專利範圍來指示。

【0302】 本文引用的所有專利和出版物均通過引用以其整體併入本文。

【符號說明】

【0303】 無

序列表

<110> 美商百歐維拉提夫治療公司 (BIOVERATIV THERAPEUTICS INC.)

<120> 表現因子 IX 之慢病毒載體的用途

<130> SA9-468TW

<150> US 62/776,393

<151> 2018-12-06

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1248

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> coFIX-1-R338L

<400> 1

tacaatagtg ggaagctgga ggaatttgtg cagggcaacc tggagagaga atgcatggag	60
gaaaagtgta gcttcgagga agcccgcgag gtgtttgaaa atacagagcg aaccacagag	120
ttctggaagc agtatgtgga cggcgatcag tgcgagagca acccctgtct gaatggcgga	180
agttgcaaag acgatatcaa ctcatagcaa tgctggtgtc ctttcgggtt tgaaggcaaa	240
aattgcgagc tggacgtgac atgtaacatt aagaatggac ggtgcgagca gttttgtaaa	300
aactctgccg ataataaggt ggtgtgcagc tgtactgaag gatatcgctt ggctgagaac	360
cagaagtcct gcgaaccagc agtgcccttc ctttgtggga gggtgagcgt ctcccagact	420

tcaaaactga ccagagcaga gacagtggtt cccgacgtgg attacgtcaa cagcactgag	480
gccgaaacca tcctggacaa cattactcag tctacccaga gtttcaatga ctttactcgg	540
gtggtcgggg gcgaggatgc taaaccaggc cagttccctt ggcagggtgt cctgaacgga	600
aagggtgatg cattttgcgg agggctctatc gtgaatgaga aatggattgt caccgccgt	660
cactgcgtgg aaaccggagt caagatcaca gtggtcgctg gggagcacia cattgaggaa	720
acagaacata ctgagcagaa gcggaatgtg atccgcatca ttcttcacca taactacaat	780
gcagccatca acaaatacaa tcatgacatt gccctgctgg aactggatga gcctctggtg	840
ctgaacagct acgtcactcc aatctgcatt gctgacaaag agtataccaa tatcttcctg	900
aagtttggat cagggtacgt gagcggctgg ggaagagtct tccacaaggg caggagcgcc	960
ctgggtgctcc agtatctgcg agtgcctctg gtcgatcgag ctacctgtct gctctctacc	1020
aagttttaca tctacaacia catgttctgc gctgggtttc acgagggagg acgagactcc	1080
tgtcagggcg attctggggg cccacatgtg acagaggctg aaggcaccag cticctgact	1140
ggcatcatth cctggggaga ggaatgtgca atgaaggga aatacgggat ctacacaaa	1200
gtgagccgct atgtgaactg gatcaaggaa aaaaccaaac tgacctaa	1248

<210> 2
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> coFIX-1b-R338L

<400> 2

atgcagagag tcaacatgat tatggctgag tcacctgggc tgattactat ttgcctgctg	60
ggctacctgc tgtccgccga gtgtaccgtg ttcctggacc atgagaacgc aaataagatc	120
ctgaacaggc ccaaaagata caatagtggg aagctggagg aatttgtgca gggcaacctg	180
gagagagaat gcatggagga aaagtgtagc ttcgaggaag cccgcgaggt gtttgaaaat	240
acagagcgaa ccacagagtt ctggaagcag tatgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac	300
ccctgtctga atggcggaag ttgcaaagac gatatcaact catacgaatg ctggtgtcct	360
ttcgggtttg aaggcaaaaa ttgcgagctg gacgtgacat gtaacattaa gaatggacgg	420
tgcgagcagt ttigtaaaaa ctctgccgat aataaggtagg tgtgcagctg tactgaagga	480
tatcgccctgg ctgagaacca gaagtcctgc gaaccagcag tgcccttccc ttgtgggagg	540
gtgagcgtct cccagacttc aaaactgacc agagcagaga cagtgtttcc cgacgtggat	600
tacgtcaaca gcactgaggc cgaaaccatc ctggacaaca ttactcagtc taccagagt	660
ttcaatgact ttactcgggt ggtcgggggc gaggatgcta aaccaggcca gttcccctgg	720
caggtggtcc tgaacggaaa ggtggatgca ttttgcggag ggtctatcgt gaatgagaaa	780
tggattgtca ccgccgctca ctgcgtggaa accggagtca agatcacagt ggtcgctggg	840
gagcacaaca ttgaggaaac agaacatact gagcagaagc ggaatgtgat ccgcatcatt	900
cctcaccata actacaatgc agccatcaac aaatacaatc atgacattgc cctgctggaa	960
ctggatgagc ctctggtgct gaacagctac gtcactcaa tctgcattgc tgacaaagag	1020
tataccaata tcttcctgaa gtttggatca gggtagtga gcggctgggg aagagtcttc	1080
cacaagggca ggagcgccct ggtgctccag tatctgcgag tgcctctggt cgategagct	1140

acctgtctgc tgtctaccaa gtttacaatc tacaacaaca tgttctgcgc tgggtttcac	1200
gagggaggac gagactcctg tcagggcgat tctgggggcc cacatgtgac agaggtcgaa	1260
ggcaccagct tcctgactgg catcatttcc tggggagagg aatgtgcaat gaagggaaaa	1320
tacgggatct acaccaaagt gagccgctat gtgaactgga tcaaggaaaa aaccaaactg	1380
acctaa	1386

- <210> 3
- <211> 1386
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> coFIX-2-R338L

<400> 3	
atgcagaggg tgaacatgat catggccgag agccccggcc tgatcaccat ctgcctgctg	60
ggctacctgc tgagcgccga gtgcaccgtg ttcctggacc acgagaacgc caacaagatc	120
ctgaacaggc ccaagaggta caacagcggc aagctggagg agttcgtgca gggcaacctg	180
gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg ccagggaggt gttcgagaac	240
accgagagga ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagagcaac	300
ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc	360
ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggcagg	420
tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaaggctg tgtgcagctg caccgagggc	480
tacaggctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccgccg tgcccttccc ctgcggcagg	540

gtgagcgtga gccagaccag caagctgacc agggccgaga ccgtgttccc cgacgtggac	600
tacgtgaaca gcaccgaggc cgagaccatc ctggacaaca tcacccagag cacccagagc	660
ttcaacgact tcaccagagt ggtggggggc gaggacgcca agcccggcca gttcccctgg	720
caggtcgtgc tgaatggcaa agtcgatgcc ttctgcgggg gcagcatcgt caacgagaag	780
tggattgtga ctgccgcccc ttgcgtggaa accgggggtga agatcactgt ggtggctggg	840
gagcacaaca tcgaggaaac cgagcacacc gagcagaaga ggaacgtgat caggattatc	900
ccccatcaca actacaatgc cgccatcaat aagtacaacc atgatattgc cctgctggag	960
ctggatgaac ccctggtcct gaacagctat gtgactccca tctgcattgc cgacaaggag	1020
tataccaaca tcttcctgaa atttggcagc ggctatgtct ctggctgggg cagggtgttc	1080
cataagggga ggagcgccct ggtcctgcag tacctgagag tgcccctggt ggacagggcc	1140
acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaata tgttttgcgc tggcttccat	1200
gaggggggca gggacagctg ccagggggac agcgggggcc cccatgtgac tgaggtggag	1260
ggcaccagct tcctgaccgg catcatcagc tggggggagg agtgcgccat gaagggaag	1320
tatggcatct acaccaaagt ctccagatac gtcaactgga tcaaggagaa gaccaagctg	1380
acctaa	1386

<210> 4
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> coFIX-3-R338L

<400> 4	
atgcagaggg tgaacatgat catggccgag agccccggcc tgatcaccat ctgcctgctg	60
ggctacctgc tgagcgccga gtgcaccgtg ttcctggacc acgagaacgc caacaagatc	120
ctgaacaggc ccaagaggta caacagcggc aagctggagg agttcgtgca gggcaacctg	180
gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg ccagggaggt gttcgagaac	240
accgagagga ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagagcaac	300
ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc	360
ttcggtttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggcagg	420
tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaagggtg tgtgcagctg caccgagggc	480
tacaggctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccgcg tgcccttccc ctgcggcagg	540
gtgagcgtga gccagaccag caagctgacc agggccgaga ccgtgttccc cgacgtggac	600
tacgtgaaca gcaccgaggc cgagaccatc ctggacaaca tcacccagag caccagagc	660
ttcaacgact tcaccagggt ggtgggcggc gaggacgcca agcccggcca gtttccctgg	720
caggtggtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcggcg gcagcatcgt gaacgagaag	780
tggatcgtga ccgctgcccc ttgcgtggaa accggcgtga agatcaccgt ggtggccggc	840
gagcacaaca tcgaagagac cgagcacacc gaacagaaaa ggaacgtgat caggatcatc	900
cctcaccata actacaatgc cgccattaac aagtacaatc acgacatcgc tctgctggaa	960
ctggatgaac ccctgggtgct gaacagctac gtgaccccta tctgcatcgc cgacaaggag	1020
tatactaaca tctttctgaa gtttggcagc ggctatgtga gcggctgggg cagggtgttc	1080

cacaaaggca ggagcgccct ggtgctgcag tacctgaggg tgcccctggt ggatagggct 1140

acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgtgc cggcttccac 1200

gaaggcggca gggactcttg ccagggcgac agcggcggcc cccatgtgac cgaggtggaa 1260

ggcactagct ttctgaccgg catcatcagc tggggcgagg agtgcgccat gaagggaag 1320

tacggcatct acactaaggt gagcaggtag gtgaactgga tcaaagaaaa gaccaagctg 1380

acctaa 1386

<210> 5

<211> 1386

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> coFIX-4-R338L

<400> 5

atgcagaggg tgaacatgat catggccgag agccccggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgagcgccga gtgcaccgtg ttccctggacc acgagaacgc caacaagatc 120

ctgaacaggc ccaagaggta caacagcggc aagctggagg agttcgtgca gggcaacctg 180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg ccagggaggt gttcgagaac 240

accgagagga ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagagcaac 300

ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc 360

ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggcagg 420

tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaaggtgg tgtgcagctg caccgagggc 480

tacaggctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccgccg tgcccttccc ctgcggcagg	540
gtgagcgtga gccagaccag caagctgacc agggccgaga ccgtgttccc cgacgtggac	600
tacgtgaaca gcaccgaggc cgagaccatc ctggacaaca tcacccagag caccagagc	660
ttcaacgact tcaccagggt ggtgggcggc gaggacgcca agcccggccca gttcccctgg	720
caggtgggtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcggcg gcagcatcgt gaacgagaag	780
tggatcgtga ccgccgccca ctgcgtggag accggcgtga agatcacctg gttggccggc	840
gagcacaaca tcgaggagac cgagcacacc gagcagaaga ggaacgtgat caggatcatc	900
ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgacatcgc cctgctggag	960
ctggacgagc ccctggtgct gaacagctac gtgaccccca tctgcatcgc cgacaaggag	1020
tacaccaaca tcttcctgaa gttcggcagc ggctacgtga gcggctgggg cagggtgttc	1080
cacaagggca ggagcgccct ggtgctgcag tacctgaggg tgcccctggt ggacagggcc	1140
acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac	1200
gagggcggca gggacagctg ccagggcgac agcggcggcc cccacgtgac cgaggtggag	1260
ggcaccagct tcctgaccgg catcatcagc tggggcgagg agtgcgccat gaagggcaag	1320
tacggcatct acaccaaggt gagcaggtac gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg	1380
acctaa	1386

<210> 6
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> coFIX-5-R338L

<400> 6

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tctcctggcc tgatcaccat ctgcctgctg	60
ggctatctgc tgtccgctga gtgcactgtc ttcctggacc acgagaacgc caacaagatc	120
ctgaacaggc ccaagaggta taactctggc aagctggagg agtttgtgca ggggaacctg	180
gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg ccagggaggt gtttgagaac	240
actgagagga ccaccgagtt ctggaagcag tatgtggacg gggaccagtg cgagtctaac	300
ccttgcctga acggggggcag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgccct	360
ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaacggcagg	420
tgcgagcagt tctgcaagaa ctctgccgac aacaaggtag tgtgcagctg cactgagggc	480
tataggctgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgccttccc ctgcggcaga	540
gtgtctgtga gccagaccag caagctgacc agagctgaga ctgtcttccc cgacgtggac	600
tatgtgaaca gcaccgaggc tgagaccatc ctggacaaca tcaccagtc taccagttc	660
ttcaacgact tcaccagagt ggtggggggc gaggacgcca agcctggcca gttcccctgg	720
caggtcgtgc tgaacggcaa agtggacgcc ttctgcgggg gcagcatcgt caacgagaag	780
tggatcgtga ctgctgcica ctgcgtggaa accgggggtga agatcacctg ggtggccggc	840
gagcacaaca tcgaggagac cgagcacacc gagcagaaga ggaacgtgat caggatcatc	900
ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgacatcgc cctgctggag	960
ctggacgagc ccctggtgct gaacagctac gtgaccccca tctgcatcgc cgacaaggag	1020

tacaccaaca tcttcctgaa gttcggcagc ggctacgtga gcggctgggg cagggtgttc 1080

cacaagggca ggagcgccct ggtgctgcag tacctgaggg tgcccctggt ggacagggcc 1140

acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac 1200

gagggcggca gggacagctg ccagggcgac agcggcggcc cccacgtgac cgaggtggag 1260

ggcaccagct tcctgaccgg catcatcagc tggggcgagg agtgcgccat gaagggcaag 1320

tacggcatct acaccaaggt gagcaggtac gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg 1380

acctaa 1386

<210> 7

<211> 1386

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> coFIX-6-R338L

<400> 7

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tctcctggcc tgatcactat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgagcgccga gtgcactgtc ttcctggacc acgagaacgc caacaagatc 120

ctgaacaggc ccaagagata caactctggc aagctggagg agtttgtgca ggggaacctg 180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg ccagggaggt gtttgagaac 240

actgagagga ccactgagtt ctggaagcag tatgtggacg gggaccagtg cgagtctaac 300

ccttgccctga acgggggcag ctgcaaggat gacatcaaca gctacgagtg ctggtgccct 360

ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gatgtgactt gcaacatcaa gaacggcagg 420

tgcgagcagt tctgcaagaa ctctgccgac aacaaagtcg tgtgcagctg cactgagggc	480
tacagactgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgcccttccc ctgcggcaga	540
gtgtctgtga gccagaccag caagctgacc agagccgaaa ccgtgttccc cgacgtggac	600
tatgtgaaca gcactgaggc tgagaccatc ctggacaaca tcactcagtc taccagttct	660
ttcaacgact tcaccagagt ggtggggggc gaggaccca agcctggcca gtccccctgg	720
caggtcgtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcgggg gcagcatcgt caacgagaag	780
tggatcgtga ctgccgccc ctgcgtggag actgggggtga agatcactgt ggtggctggg	840
gagcacaaca tcgaggaaac cgagcacact gagcagaaga ggaacgtgat caggattatc	900
ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgacatcgc cctgctggag	960
ctggatgaac ccctgggtgt gaacagctac gtgacccta tctgcatcgc cgacaaggag	1020
tacactaaca tcttcctgaa gttcggcagc ggctacgtga gcggctgggg caggggtgtc	1080
cacaagggca ggagcgccct ggtgctgcag tacctgaggg tgcccctggt ggacagggcc	1140
acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac	1200
gagggcggca gggacagctg ccagggcgac agcggcggcc cccacgtgac cgaggtggag	1260
ggcaccagct tcctgaccgg catcatcagc tggggcgagg agtgcgccat gaagggaag	1320
tacggcatct acaccaaggt gagcaggtac gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg	1380
acctaa	1386

<210> 8
<211> 1389
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子 IX 核苷酸序列

<400> 8

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta	60
ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt ttctttgatc atgaaaacgc caacaaaatt	120
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaatcta	180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt ttigaagaag cacgagaagt ttttgaaaac	240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat	300
ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc	360
tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga	420
tgcgagcagt ttigtataaa tagtgctgat aacaagggtg ttgtctctg tactgaggga	480
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga	540
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac	600
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca	660
tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccagggtca attcccttgg	720
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa	780
tggattgtaa ctgctgccca ctgtgttgaa actgggtgta aaattacagt tgtcgcaggt	840
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt	900
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa	960

ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa	1020
tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc	1080
cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc	1140
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat	1200
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa	1260
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa	1320
tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc	1380
acttgataa	1389

<210> 9
<211> 1389
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> coFIX-1

<400> 9	
atgcagagag tcaacatgat tatggctgag tcacctgggc tgattactat ttgcctgctg	60
ggctacctgc tgtccgccga gtgtaccgtg ttccctggacc atgagaacgc aaataagatc	120
ctgaacaggc ccaaaagata caatagtggg aagctggagg aatttgtgca gggcaacctg	180
gagagagaat gcatggagga aaagtgtagc ttcgaggaag cccgcgaggt gtttgaaaat	240
acagagcgaa ccacagagtt ctggaagcag tatgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac	300
ccctgtctga atggcggaag ttgcaaagac gatatcaact catacgaatg ctggtgtcct	360

ttcgggtttg aaggcaaaaa ttgcgagctg gacgtgacat gtaacattaa gaatggacgg	420
tgcgagcagt tttgtaaaaa ctctgccgat aataaggtgg tgtgcagctg tactgaagga	480
tatcgccctgg ctgagaacca gaagtcctgc gaaccagcag tgcccttccc ttgtgggagg	540
gtgagcgtct cccagacttc aaaactgacc agagcagaga cagtgtttcc cgacgtggat	600
tacgtcaaca gcactgaggc cgaaaccatc ctggacaaca ttactcagtc taccagagt	660
ttcaatgact ttactcgggt ggtcgggggc gaggatgcta aaccaggcca gtccccctgg	720
caggtgggcc tgaacggaaa ggtggatgca ttttgcggag ggtctatcgt gaatgagaaa	780
tggattgica ccgccgctca ctgcgtggaa accggagtca agatcacagt ggtcgtggg	840
gagcacaaca ttgaggaaac agaacatact gagcagaagc ggaatgtgat ccgcatcatt	900
cctcaccata actacaatgc agccatcaac aaatacaatc atgacattgc cctgctggaa	960
ctggatgagc ctctggtgct gaacagctac gtcactccaa tctgcattgc tgacaaagag	1020
tataccaata tcttcctgaa gtttggatca ggggtacgtga gcggctgggg aagagtcttc	1080
cacaagggca ggagcgccct ggtgctccag tatctgcgag tgccctctgt cgatcgagct	1140
acctgtctga ggtctacca gtttacaatc tacaacaaca tgttctgcgc tgggtttcac	1200
gagggaggac gagactcctg tcagggcgat tctggggggcc cacatgtgac agaggtcgaa	1260
ggcaccagct tcctgactgg catcatttcc tggggagagg aatgtgcaat gaagggaaaa	1320
tacgggatct acaccaaagt gagccgctat gtgaactgga tcaaggaaaa aaccaaactg	1380
acctaataga	1389

<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX 訊息胜肽

<400> 10

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys
20 25

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX 前肽

<400> 11

Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 12
<211> 415
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FIX R338L

<400> 12

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile

285

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

Leu Leu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14
<211> 323
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD47

<400> 14

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 白蛋白結合肽核心序列

<400> 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP 肽

<400> 18

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

<210> 19
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP 肽

<400> 19

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 20

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala
20

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 21

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser
20

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 22

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser
20

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 23

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ser

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PAS 肽

<400> 24

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala
20

<210> 25
<211> 24

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Pas 肽

<400> 25

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Pas 肽

<400> 26

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala
20

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR142 目標

<400> 27
tccataaagt aggaaacact aca

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予有效劑量的慢病毒載體，所述慢病毒載體包含編碼具有因子IX（FIX）活性多肽的核苷酸序列，其中所述慢病毒載體被包裝在過表現CD47的HEK293T細胞中，相較於在未修飾的HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）中產生的對照慢病毒載體，所述慢病毒載體具有更高的CD47蛋白表面表現量，並且其中相對於誘導與所述慢病毒載體相同的FIX活性所需的對照慢病毒載體的對照劑量，有效劑量降低。

【請求項2】 如請求項1的方法，其中所述對照慢病毒載體在所述對照慢病毒載體的表面上包含19個分子/ μm^2 的CD47。

【請求項3】 如請求項1或2的方法，其中所述慢病毒載體在所述慢病毒載體的表面上包含比所述對照慢病毒載體在HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）中產生者多至少約1.5倍、至少約2.0倍、至少約2.5倍、至少約3.0倍、至少約3.5倍、至少約4.0倍、至少約4.5倍、至少約5.0倍、至少約5.5倍、至少約6.0倍、至少約6.5倍、至少約7.0倍、至少約7.5倍、至少約8.0倍、至少約8.5倍、至少約9.0倍、至少約9.5倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍的CD47蛋白。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項的方法，其中所述有效劑量少於約 5×10^{10} 轉導單位/kg（TU/kg）、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、或少於約 8×10^8 TU/kg。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項的方法，其中所述受試者在所述投予後展現出一種或多種以下特性：

- (a) 相對於所述對照慢病毒載體，所述慢病毒載體的巨噬細胞轉導減少；
- (b) 相對於所述對照慢病毒載體，對所述慢病毒載體的同種特異性免疫反應降低；
- (c) 在投予至少 3 周後，相對於正常 FIX 活性為至少 30% 的 FIX 活性；
- (d) 所述慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中的組織特異性表現；和
- (e) (a)至(d)的任何組合。

【請求項6】 如請求項5的方法，其中所述同種特異性免疫反應包括回應於所述慢病毒載體的細胞激素的釋放。

【請求項7】 如請求項6的方法，其中所述細胞激素選自MIP-1a、MIP-1b、MCP-1及其任何組合。

【請求項8】 如請求項1至7中任一項的方法，其中相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MIP-1a表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MIP-1a表現。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項的方法，其中相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MIP-1b表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MIP-1b表現。

【請求項10】 如請求項1至9中任一項的方法，其中相對於在投予所述對照慢病毒載體之後的MCP-1表現，所述受試者在投予所述慢病毒載體之後展現出較低位準的MCP-1表現。

【請求項11】 如請求項1至10中任一項的方法，其中所述受試者在投予所述慢病毒載體之後至少三周，展現出相對於正常FIX活性至少約75%、至少約100%、至少約125%、至少約150%、至少約175%、至少約200%、至少約225%、至少約250%、至少約275%、或至少約300%的FIX活性。

【請求項12】 如請求項1至11中任一項的方法，其中所述受試者在投予所述慢病毒載體之後至少三周，展現出相對於正常FIX活性至少約150%的FIX活性。

【請求項13】 如請求項1至12的方法，其中相對於投予所述對照慢病毒載體的對照劑量的受試者，在投予所述慢病毒載體24小時至48小時後其血漿FIX活性增加。

【請求項14】 如請求項13的方法，其中相對於投予所述對照慢病毒載體的對照劑量的受試者，所述血漿FIX活性在所述投予後增加了至少約2倍、至少約3倍、至少約4倍、至少約5倍、至少約6倍、至少約7倍、至少約8倍、至少約9倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、或至少約200倍。

【請求項15】 如請求項1至14中任一項的方法，其中在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，所述受試者展現出所述慢病毒載體在肝、脾或肝和脾二者中定位增加。

【請求項16】 如請求項15的方法，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的載體拷貝數（VCN）高至少約2倍、至少約3倍、至少約4倍、至少約5倍、至少約6倍、至少約7倍、至少約8倍、至少約9倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、至少約180倍、至少約190倍、或至少約200倍。

【請求項17】 如請求項15或16的方法，其中所述定位增加的特徵在於，在

投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少10倍。

【請求項18】 如請求項15至16中任一項的方法，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少50倍。

【請求項19】 如請求項15至18中任一項的方法，其中所述定位增加的特徵在於，在投予所述慢病毒載體後，相對於所述受試者中除肝和脾之外的器官，在肝、脾或肝和脾二者中，所述慢病毒載體的VCN高至少100倍。

【請求項20】 如請求項1至19中任一項的方法，其中所述CD47是人類CD47。

【請求項21】 如請求項20的方法，其中所述人類CD47包含與SEQ ID NO: 14所示的胺基酸序列為至少60%、至少約70%、至少70%、至少約80%、至少85%、至少約90%、至少95%、至少約96%、至少97%、至少約98%、至少99%、或約100%相同的胺基酸序列。

【請求項22】 如請求項1至21中任一項的方法，其中所述慢病毒載體不包含MHC-I多肽。

【請求項23】 如請求項1至22中任一項的方法，其中所述慢病毒載體是在與所述HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）相比表現高濃度CD47的宿主細胞中產生的。

【請求項24】 如請求項1至23中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性。

【請求項25】 一種在有需要的受試者中預防或治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予低於 5×10^{10} 轉導單位/kg（TU/kg）的慢病毒載體，

所述慢病毒載體包含編碼具有因子IX (FIX) 活性多肽的核苷酸序列，其中所述慢病毒載體包含與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核苷酸序列。

【請求項26】 如請求項1至25中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列具有至少85%序列同一性。

【請求項27】 如請求項1至26中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【請求項28】 如請求項1至27中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【請求項29】 如請求項1至28中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【請求項30】 如請求項1至29中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【請求項31】 如請求項1至30中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【請求項32】 如請求項1至31中任一項的方法，其中所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列的核苷酸139至1386具有至少85%序列同一性。

【請求項33】 如請求項1至32中任一項的方法，其中所述劑量為約 5×10^{10} TU/kg、約 4.5×10^{10} TU/kg、約 4×10^{10} TU/kg、約 3.5×10^{10} TU/kg、約 3×10^{10} TU/kg、約 2.5×10^{10} TU/kg、約 2×10^{10} TU/kg、約 1.5×10^{10} TU/kg、約 1×10^{10} TU/kg、約 9.5×10^9 TU/kg、約 9×10^9 TU/kg、約 8.5×10^9 TU/kg、約 8×10^9 TU/kg、約 7.5×10^9 TU/kg、約 7×10^9 TU/kg、約 6.5×10^9 TU/kg、約 6×10^9 TU/kg、約 5.5×10^9 TU/kg、約 5×10^9 TU/kg、約 4.5×10^9 TU/kg、約 4×10^9 TU/kg、約 3.5×10^9 TU/kg、約 3×10^9 TU/kg。

TU/kg、約 2.5×10^9 TU/kg、約 2×10^9 TU/kg、約 1.5×10^9 TU/kg、約 1×10^9 TU/kg、約 9.5×10^8 TU/kg、約 9×10^8 TU/kg、約 8.5×10^8 TU/kg、約 8×10^8 TU/kg、約 7.5×10^8 TU/kg、約 7×10^8 TU/kg、約 6.5×10^8 TU/kg、約 6×10^8 TU/kg、約 5.5×10^8 TU/kg、約 5×10^8 TU/kg、約 4.5×10^8 TU/kg、約 4×10^8 TU/kg、約 3.5×10^8 TU/kg、約 3×10^8 TU/kg、約 2.5×10^8 TU/kg、約 2×10^8 TU/kg、約 1.5×10^8 TU/kg、或約 1×10^8 TU/kg。

【請求項34】 如請求項1至32中任一項的方法，其中所述劑量少於 5×10^{10} TU/kg、少於 4.5×10^{10} TU/kg、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3.5×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2.5×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1.5×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9.5×10^9 TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8.5×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7.5×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6.5×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5.5×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4.5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3.5×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2.5×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1.5×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9.5×10^8 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、少於約 8.5×10^8 TU/kg、少於約 8×10^8 TU/kg、少於約 7.5×10^8 TU/kg、少於約 7×10^8 TU/kg、少於約 6.5×10^8 TU/kg、少於約 6×10^8 TU/kg、少於約 5.5×10^8 TU/kg、少於約 5×10^8 TU/kg、少於約 4.5×10^8 TU/kg、少於約 4×10^8 TU/kg、少於約 3.5×10^8 TU/kg、少於約 3×10^8 TU/kg、少於約 2.5×10^8 TU/kg、少於約 2×10^8 TU/kg、少於約 1.5×10^8 TU/kg、或少於約 1×10^8 TU/kg。

【請求項35】 如請求項1至32中任一項的方法，其中所述劑量在 1×10^8 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^8 與 5×10^9 TU/kg之間、在 1×10^8 與 1×10^9 TU/kg之間、在 1×10^8 與 1×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 4×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 5×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 2×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 3×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 4×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 5×10^9

與 6×10^9 TU/kg之間、在 6×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 7×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 8×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 9×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 4×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、或在 4.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間。

【請求項36】如請求項1至32中任一項的方法，其中所述劑量在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 4.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 4×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 3.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 3×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 2.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 2×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 1.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 9×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 8×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 7×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 5×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 4×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 3×10^9 TU/kg之間、和在 1×10^9 與 2×10^9 TU/kg之間。

【請求項37】如請求項1至32中任一項的方法，其中所述劑量在 1×10^{10} 與 2×10^{10} TU/kg之間、在 1.1×10^{10} 與 1.9×10^{10} TU/kg之間、在 1.2×10^{10} 與 1.8×10^{10} TU/kg之間、在 1.3×10^{10} 與 1.7×10^{10} TU/kg之間、或在 1.4×10^{10} 與 1.6×10^{10} TU/kg之間。

【請求項38】如請求項1至37中任一項的方法，其中所述劑量為約 4×10^9 TU/kg至約 6×10^9 TU/kg。

【請求項39】如請求項1至38中任一項的方法，其中所述慢病毒載體以單劑量或多劑量投予。

【請求項40】如請求項1至39中任一項的方法，其中所述慢病毒載體經由靜脈內注射投予。

【請求項41】如請求項1至40中任一項的方法，其中所述受試者是兒科受試者。

【請求項42】 如請求項1至40中任一項的方法，其中所述受試者是成年受試者。

【請求項43】 如請求項1至40中任一項的方法，其中所述受試者是青少年受試者。

【請求項44】 如請求項1至43中任一項的方法，其中所述具有FIX活性的多肽包含與SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列具有至少90%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項45】 如請求項1至44中任一項的方法，其中所述具有FIX活性的多肽包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。

【請求項46】 如請求項1至45中任一項的方法，其中所述慢病毒載體包含組織特異性啟動子。

【請求項47】 如請求項46的方法，其中所述組織特異性啟動子選擇性地增強所述具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現。

【請求項48】 如請求項47的方法，其中選擇性增強所述具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中表現的所述組織特異性啟動子，包括APOA2啟動子、SERPINA1 (hAAT) 啟動子、mTTR啟動子、MIR122啟動子或其任何組合。

【請求項49】 如請求項47或48的方法，其中所述目標肝細胞是肝細胞。

【請求項50】 如請求項49的方法，其中將所述經分離的核酸分子穩定地整合到所述肝細胞的基因組中。

【請求項51】 如請求項1至50中任一項的方法，其中慢病毒載體包含剪接供體位點。

【請求項52】 如請求項1至51中任一項的方法，其中所述慢病毒載體包含剪接受體位點。

【請求項53】 如請求項1至52中任一項的方法，其中所述慢病毒載體包含gag序列、pol序列、rev序列、rev反應元件（RRE）或其任何組合。

【請求項54】 如請求項53的方法，其中所述gag序列是全長或截斷的gag序

列。

【請求項55】 如請求項1至54中任一項的方法，其中所述慢病毒載體包含增強子、微小RNA的目標序列、轉錄後調控元件、包裝訊號、多聚A序列、內含子序列或其任何組合。

【請求項56】 如請求項1至55中任一項的方法，其中所述慢病毒載體的劑量係以一次投予或分成至少兩個子劑量來投予。

【請求項57】 如請求項1至55中任一項的方法，其中所述慢病毒載體的劑量係重複至少兩次。

【請求項58】 如請求項1至57中任一項的方法，其中編碼具有FIX活性多肽的所述核苷酸序列進一步包含編碼訊息胜肽的核酸序列。

【請求項59】 如請求項58的方法，其中編碼訊息胜肽的所述核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性：

- (i) SEQ ID NO: 2 的核苷酸 1 至 84；
- (ii) SEQ ID NO: 3 的核苷酸 1 至 84；
- (iii) SEQ ID NO: 4 的核苷酸 1 至 84；
- (iv) SEQ ID NO: 5 的核苷酸 1 至 84；
- (v) SEQ ID NO: 6 的核苷酸 1 至 84；或
- (vi) SEQ ID NO: 7 的核苷酸 1 至 84。

【請求項60】 如請求項1至59中任一項的方法，其中編碼具有FIX活性多肽的所述核苷酸序列進一步包含編碼前肽的核酸序列。

【請求項61】 如請求項60的方法，其中編碼前肽的所述核酸序列與以下各項具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性：

- (i) SEQ ID NO: 2 的核苷酸 85 至 138；
- (ii) SEQ ID NO: 3 的核苷酸 85 至 138；

- (iii) SEQ ID NO: 4 的核苷酸 85 至 138 ；
- (iv) SEQ ID NO: 5 的核苷酸 85 至 138 ；
- (v) SEQ ID NO: 6 的核苷酸 85 至 138 ；或
- (vi) SEQ ID NO: 7 的核苷酸 85 至 138 。

【請求項62】 如請求項1至61中任一項的方法，其中編碼具有FIX活性的多肽的所述核苷酸序列進一步包含編碼異源胺基酸序列的異源核苷酸序列。

【請求項63】 如請求項62的方法，其中所述異源胺基酸序列是白蛋白、免疫球蛋白Fc區、XTEN序列、人類絨毛膜促性腺激素的 β 次單元的C末端肽（CTP）、PAS序列、HAP序列、CTP肽序列、轉鐵蛋白、白蛋白結合部分，或這些多肽的任何片段、衍生物、變異體或組合。

【請求項64】 如請求項62或63的方法，其中係連接至胺基酸序列的N末端或C末端，所述胺基酸序列係由編碼具有FIX活性多肽的核苷酸序列所編碼，或者所述異源胺基酸序列係插入在所述胺基酸序列的兩個胺基酸之間。

【請求項65】 如請求項62至64中任一項的方法，其中將所述異源部分插入在具有FIX活性的所述多肽內，緊接對應於以下胺基酸之胺基酸的下流：SEQ ID NO: 2的胺基酸103、SEQ ID NO: 2的胺基酸105、SEQ ID NO: 2的胺基酸142、SEQ ID NO: 2的胺基酸149、SEQ ID NO: 2的胺基酸162、SEQ ID NO: 2的胺基酸166、SEQ ID NO: 2的胺基酸174、SEQ ID NO: 2的胺基酸224、SEQ ID NO: 2的胺基酸226、SEQ ID NO: 2的胺基酸228、SEQ ID NO: 2的胺基酸413、或其任何組合。

【請求項66】 如請求項1至65中任一項的方法，其中所述FIX多肽是R338L變異體FIX多肽。

【請求項67】 如請求項1至66中任一項的方法，其中所述慢病毒載體是在宿主細胞中產生的。

【請求項68】 如請求項67的方法，其中所述宿主細胞表現CD47。

【請求項69】 如請求項68的方法，其中所述宿主細胞經修飾以過表現

CD47。

【請求項70】 如請求項67至69中任一項的方法，其中所述宿主細胞不表現MHC-I。

【請求項71】 如請求項67至70中任一項的方法，其中所述宿主細胞是CD47^高/MHC-I⁻。

【請求項72】 如請求項69至71中任一項的方法，其中所述宿主細胞是CD47^高/MHC-I⁻ HEK 293T細胞。

【請求項73】 一種包含核苷酸序列的慢病毒載體，所述核苷酸序列包含 (i) 組織特異性啟動子，和 (ii) SEQ ID NO: 1所示的核酸序列，其中所述組織特異性啟動子驅動所述核酸序列在肝細胞中的表現。

【請求項74】 一種包含核苷酸序列的慢病毒載體，所述核苷酸序列包含 (i) 剪接供體位點；(ii) 剪接受體位點；(iii) gag序列；(iv) Rev反應元件；(v) 增強子；(vi) 轉錄後調控元件；(vii) 與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%序列同一性的核酸序列；和 (viii) 微小RNA的目標序列。

【請求項75】 如請求項73或74的慢病毒載體，其中所述核酸序列編碼具有FIX活性的多肽，所述多肽包含與SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列具有至少90%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項76】 如請求項75的慢病毒載體，其中所述具有FIX活性的多肽包含SEQ ID NO: 12所示的胺基酸序列。

【請求項77】 如請求項74至76中任一項的慢病毒載體，其中相較於在HEK293T細胞（ATCC® CRL-11268™）中產生的對照慢病毒載體，所述慢病毒載體的表面包含更高位準的CD47蛋白。

【請求項78】 如請求項77的慢病毒載體，其中所述慢病毒載體的表面不包

含MHC-I。

【請求項79】 一種在有需要的受試者中治療血友病的方法，所述方法包括向所述受試者投予有效劑量的請求項73至78中任一項所述的慢病毒載體。

【請求項80】 如請求項79的方法，其中所述有效劑量少於約 5×10^{10} 轉導單位/kg (TU/kg)、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、或少於約 8×10^8 TU/kg。

【請求項81】 如請求項79或80的方法，其中所述有效劑量為約 5×10^{10} TU/kg、約 4.5×10^{10} TU/kg、約 4×10^{10} TU/kg、約 3.5×10^{10} TU/kg、約 3×10^{10} TU/kg、約 2.5×10^{10} TU/kg、約 2×10^{10} TU/kg、約 1.5×10^{10} TU/kg、約 1×10^{10} TU/kg、約 9.5×10^9 TU/kg、約 9×10^9 TU/kg、約 8.5×10^9 TU/kg、約 8×10^9 TU/kg、約 7.5×10^9 TU/kg、約 7×10^9 TU/kg、約 6.5×10^9 TU/kg、約 6×10^9 TU/kg、約 5.5×10^9 TU/kg、約 5×10^9 TU/kg、約 4.5×10^9 TU/kg、約 4×10^9 TU/kg、約 3.5×10^9 TU/kg、約 3×10^9 TU/kg、約 2.5×10^9 TU/kg、約 2×10^9 TU/kg、約 1.5×10^9 TU/kg、約 1×10^9 TU/kg、約 9.5×10^8 TU/kg、約 9×10^8 TU/kg、約 8.5×10^8 TU/kg、約 8×10^8 TU/kg、約 7.5×10^8 TU/kg、約 7×10^8 TU/kg、約 6.5×10^8 TU/kg、約 6×10^8 TU/kg、約 5.5×10^8 TU/kg、約 5×10^8 TU/kg、約 4.5×10^8 TU/kg、約 4×10^8 TU/kg、約 3.5×10^8 TU/kg、約 3×10^8 TU/kg、約 2.5×10^8 TU/kg、約 2×10^8 TU/kg、約 1.5×10^8 TU/kg、或約 1×10^8 TU/kg。

【請求項82】 如請求項79或80的方法，其中所述有效劑量少於 5×10^{10} TU/kg、少於 4.5×10^{10} TU/kg、少於 4×10^{10} TU/kg、少於 3.5×10^{10} TU/kg、少於 3×10^{10} TU/kg、少於 2.5×10^{10} TU/kg、少於 2×10^{10} TU/kg、少於 1.5×10^{10} TU/kg、少於 1×10^{10} TU/kg、少於 9.5×10^9 TU/kg、少於 9×10^9 TU/kg、少於 8.5×10^9 TU/kg、少於 8×10^9 TU/kg、少於 7.5×10^9 TU/kg、少於 7×10^9 TU/kg、少於 6.5×10^9 TU/kg、少於 6×10^9 TU/kg、少於 5.5×10^9 TU/kg、少於 5×10^9 TU/kg、少於 4.5×10^9 TU/kg、

少於 4×10^9 TU/kg、少於 3.5×10^9 TU/kg、少於 3×10^9 TU/kg、少於 2.5×10^9 TU/kg、少於 2×10^9 TU/kg、少於 1.5×10^9 TU/kg、少於 1×10^9 TU/kg、少於約 9.5×10^8 TU/kg、少於約 9×10^8 TU/kg、少於約 8.5×10^8 TU/kg、少於約 8×10^8 TU/kg、少於約 7.5×10^8 TU/kg、少於約 7×10^8 TU/kg、少於約 6.5×10^8 TU/kg、少於約 6×10^8 TU/kg、少於約 5.5×10^8 TU/kg、少於約 5×10^8 TU/kg、少於約 4.5×10^8 TU/kg、少於約 4×10^8 TU/kg、少於約 3.5×10^8 TU/kg、少於約 3×10^8 TU/kg、少於約 2.5×10^8 TU/kg、少於約 2×10^8 TU/kg、少於約 1.5×10^8 TU/kg、或少於約 1×10^8 TU/kg。

【請求項83】 如請求項79或80的方法，其中所述有效劑量在 1×10^8 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^8 與 5×10^9 TU/kg之間、在 1×10^8 與 1×10^9 TU/kg之間、在 1×10^8 與 1×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 4×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 5×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 2×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 3×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 4×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 5×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 6×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 7×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 8×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 9×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 2.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 3.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 4×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間、或在 4.5×10^{10} 與 5×10^{10} TU/kg之間。

【請求項84】 如請求項79或80的方法，其中所述有效劑量在 1×10^9 與 5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 4.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 4×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 3.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 3×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 2.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 2×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 1.5×10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 10^{10} TU/kg之間、在 1×10^9 與 9×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 8×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 7×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 6×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9

與 5×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 4×10^9 TU/kg之間、在 1×10^9 與 3×10^9 TU/kg之間、和在 1×10^9 與 2×10^9 TU/kg之間。

【請求項85】如請求項79或80的方法，其中所述有效劑量在 1×10^{10} 與 2×10^{10} TU/kg之間、在 1.1×10^{10} 與 1.9×10^{10} TU/kg之間、在 1.2×10^{10} 與 1.8×10^{10} TU/kg之間、在 1.3×10^{10} 與 1.7×10^{10} TU/kg之間、或在 1.4×10^{10} 與 1.6×10^{10} TU/kg之間。

【請求項86】如請求項79至85中任一項的方法，其中所述有效劑量為約 4×10^9 TU/kg至約 6×10^9 TU/kg。

【請求項87】如請求項79至86中任一項的方法，其中所述慢病毒載體以單劑量或多劑量投予。

【請求項88】如請求項79至87中任一項的方法，其中所述慢病毒載體經由靜脈內注射投予。

【請求項89】如請求項79至88中任一項的方法，其中所述受試者是兒科受試者。

【請求項90】如請求項79至88中任一項的方法，其中所述受試者是成年受試者。

【請求項91】一種核酸序列，其包含SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列。

【請求項92】一種載體，其包含請求項91的核酸序列。

【請求項93】如請求項92的載體，其包含組織特異性啟動子。

【請求項94】如請求項93的載體，其中所述組織特異性啟動子選擇性地增強所述具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中的表現。

【請求項95】如請求項94的載體，其中選擇性增強所述具有FIX活性的多肽在目標肝細胞中表現的所述組織特異性啟動子，包括APOA2啟動子、SERPINA1 (hAAT) 啟動子、mTTR啟動子、MIR122啟動子或其任何組合。

【請求項96】如請求項94或95的載體，其中所述目標肝細胞是肝細胞。

【請求項97】如請求項94至96中任一項的載體，其包含剪接供體位點。

【請求項98】如請求項94至97中任一項的載體，其包含剪接受體位點。

【請求項99】 如請求項94至98中任一項的載體，其包含gag序列、pol序列、rev序列、rev反應元件（RRE）或其任何組合。

【請求項100】 如請求項99的載體，其中所述gag序列是全長或截斷的gag序列。

【請求項101】 如請求項92至100中任一項的載體，其包含增強子、微小RNA的目標序列、轉錄後調控元件、包裝訊號、多聚A序列、內含子序列或其任何組合。

【請求項102】 一種細胞，所述細胞包含請求項91的核酸序列或請求項92至101中任一項的載體。

【請求項103】 如請求項102的細胞，其是哺乳動物細胞。

【請求項104】 如請求項102的細胞，其是CHO細胞、HEK293細胞、BHK21細胞、PER.C6®細胞、NS0細胞和CAP細胞。

【請求項105】 如請求項102或103的細胞，其中所述細胞是人類細胞。

【請求項106】 如請求項102至105中任一項的細胞，其中所述細胞表現CD47蛋白。

【請求項107】 如請求項106的細胞，其中所述細胞經修飾以過表現CD47。

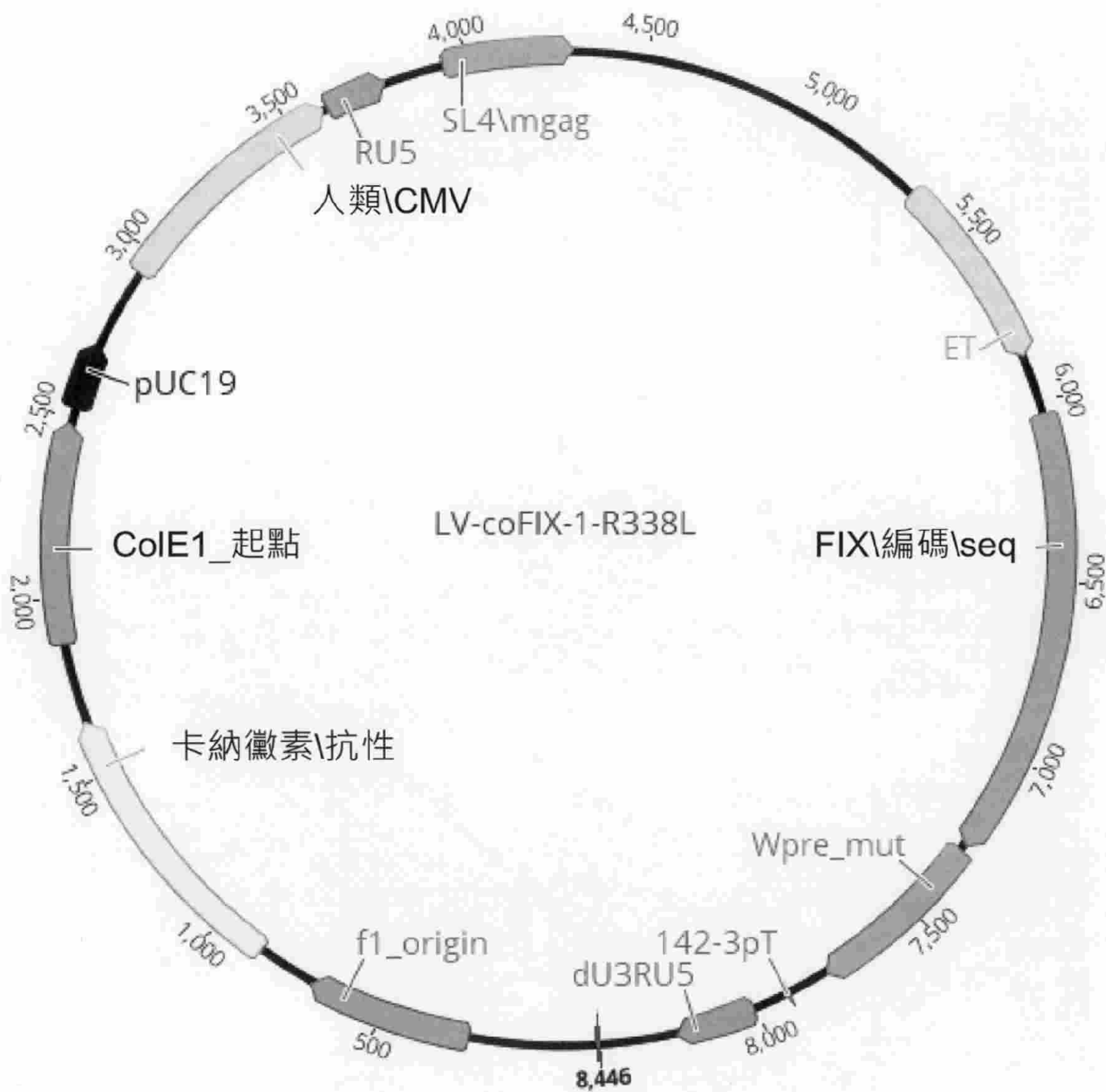
【請求項108】 如請求項107的細胞，其中與未修飾以過表現CD47的對照細胞相比，所述細胞在所述細胞的表面上包含多至少約1.5倍、至少約2.0倍、至少約2.5倍、至少約3.0倍、至少約3.5倍、至少約4.0倍、至少約4.5倍、至少約5.0倍、至少約5.5倍、至少約6.0倍、至少約6.5倍、至少約7.0倍、至少約7.5倍、至少約8.0倍、至少約8.5倍、至少約9.0倍、至少約9.5倍、至少約10倍、至少約11倍、至少約12倍、至少約13倍、至少約14倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約35倍、至少約40倍的CD47蛋白。

【請求項109】 如請求項106至108中任一項的細胞，其中所述CD47是人類CD47。

【請求項110】 如請求項102至109中任一項的細胞，其中所述細胞不表現MHC-I。

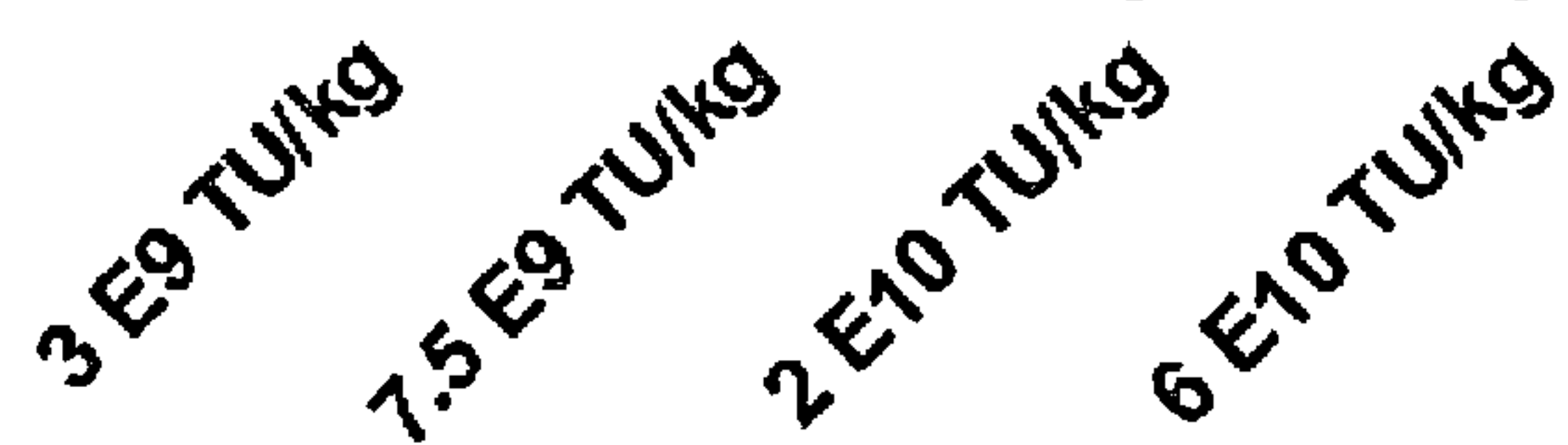
【請求項111】 一種產生慢病毒載體的方法，所述方法包括在合適的條件下培養請求項102至110中任一項的細胞。

【發明圖式】



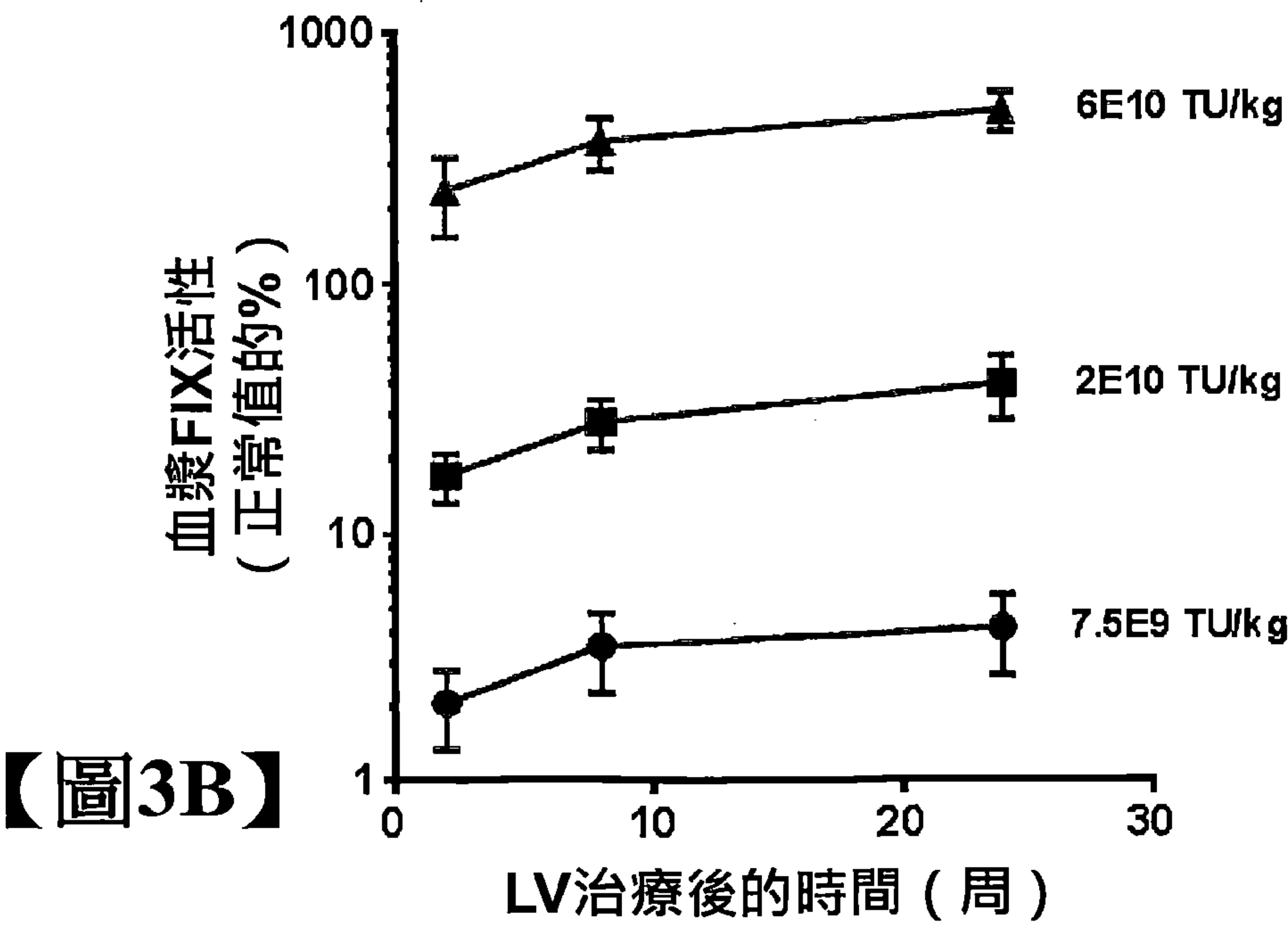
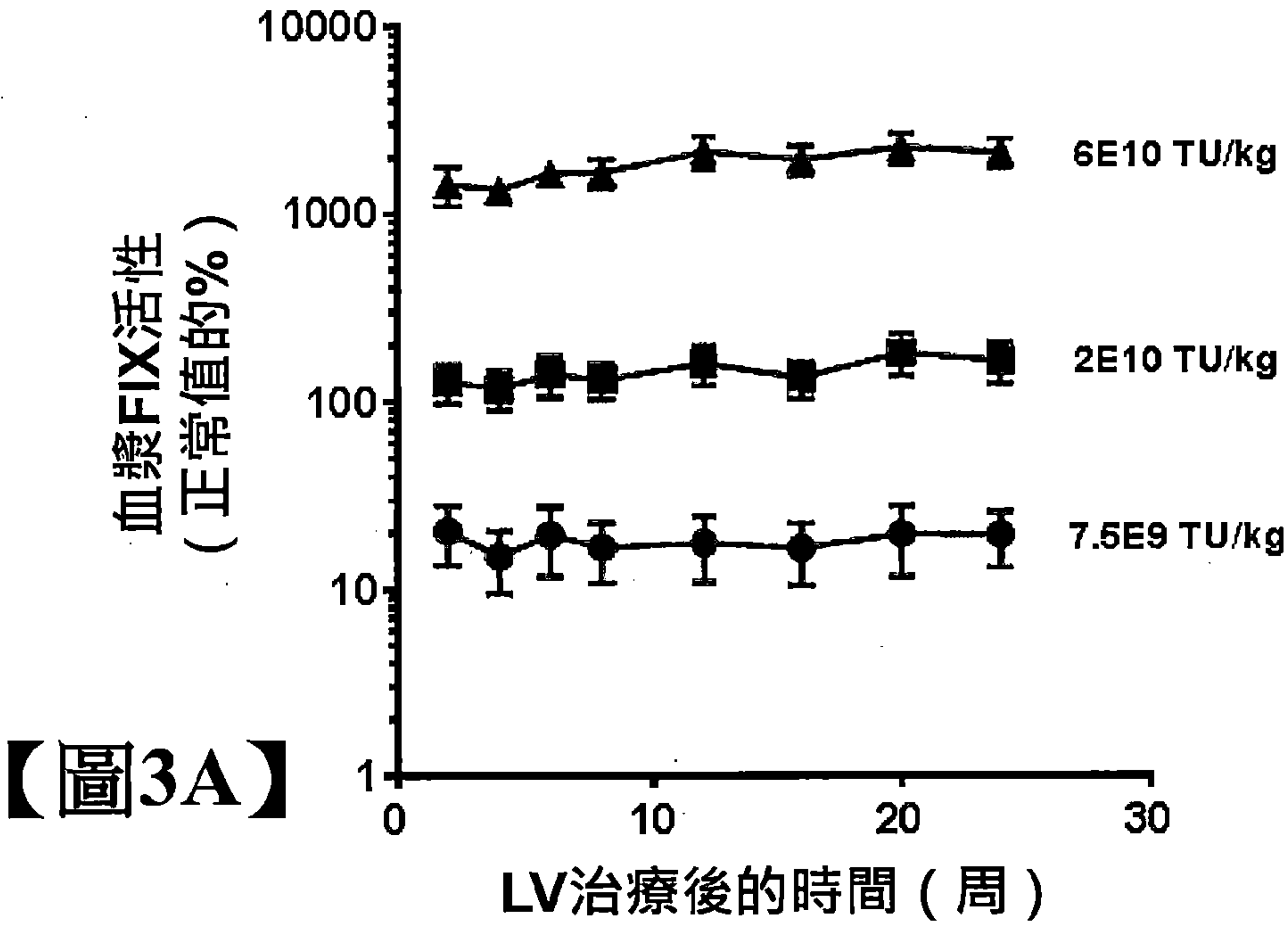
【圖1】

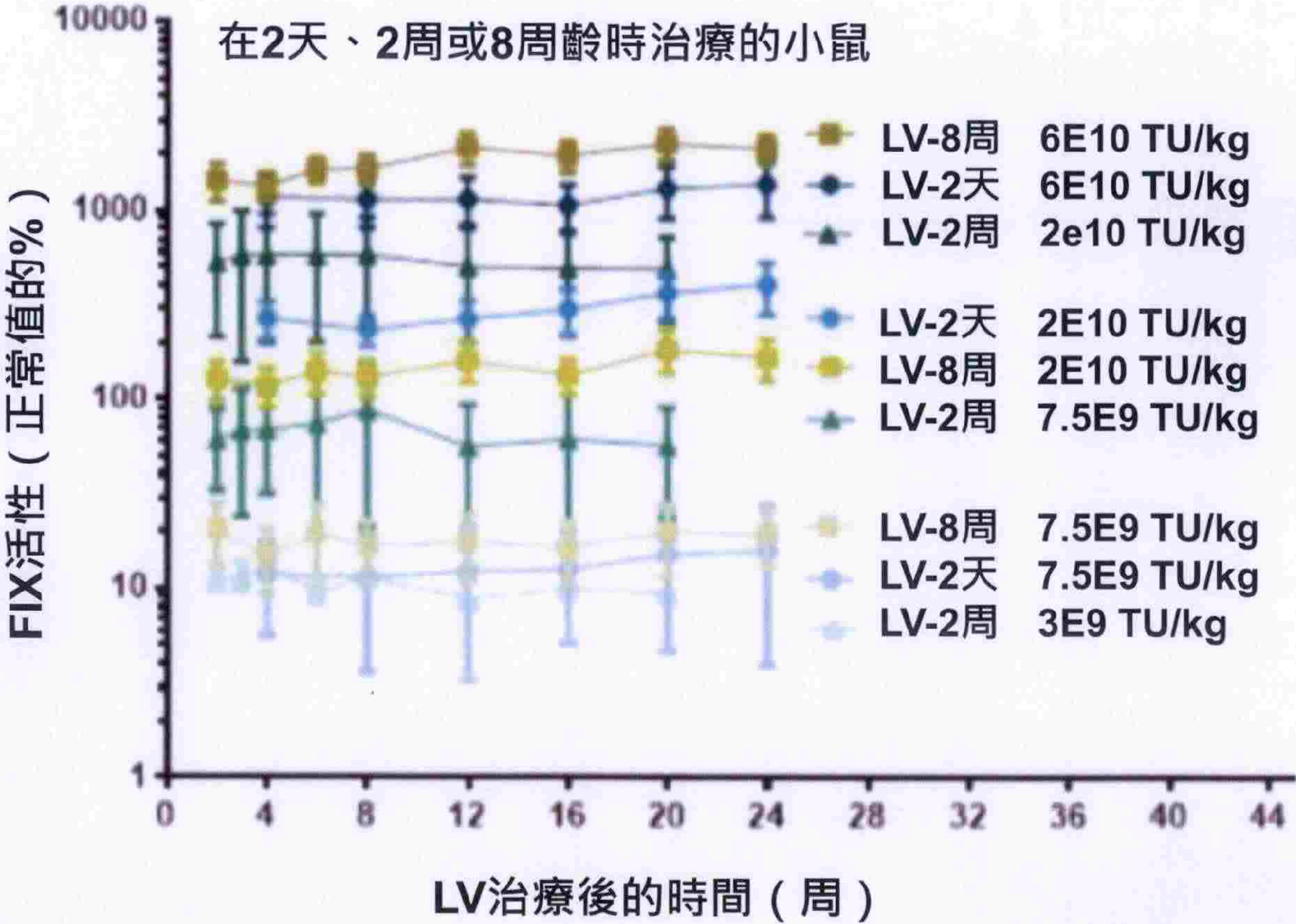
血漿FIX活性
(正常值的%)



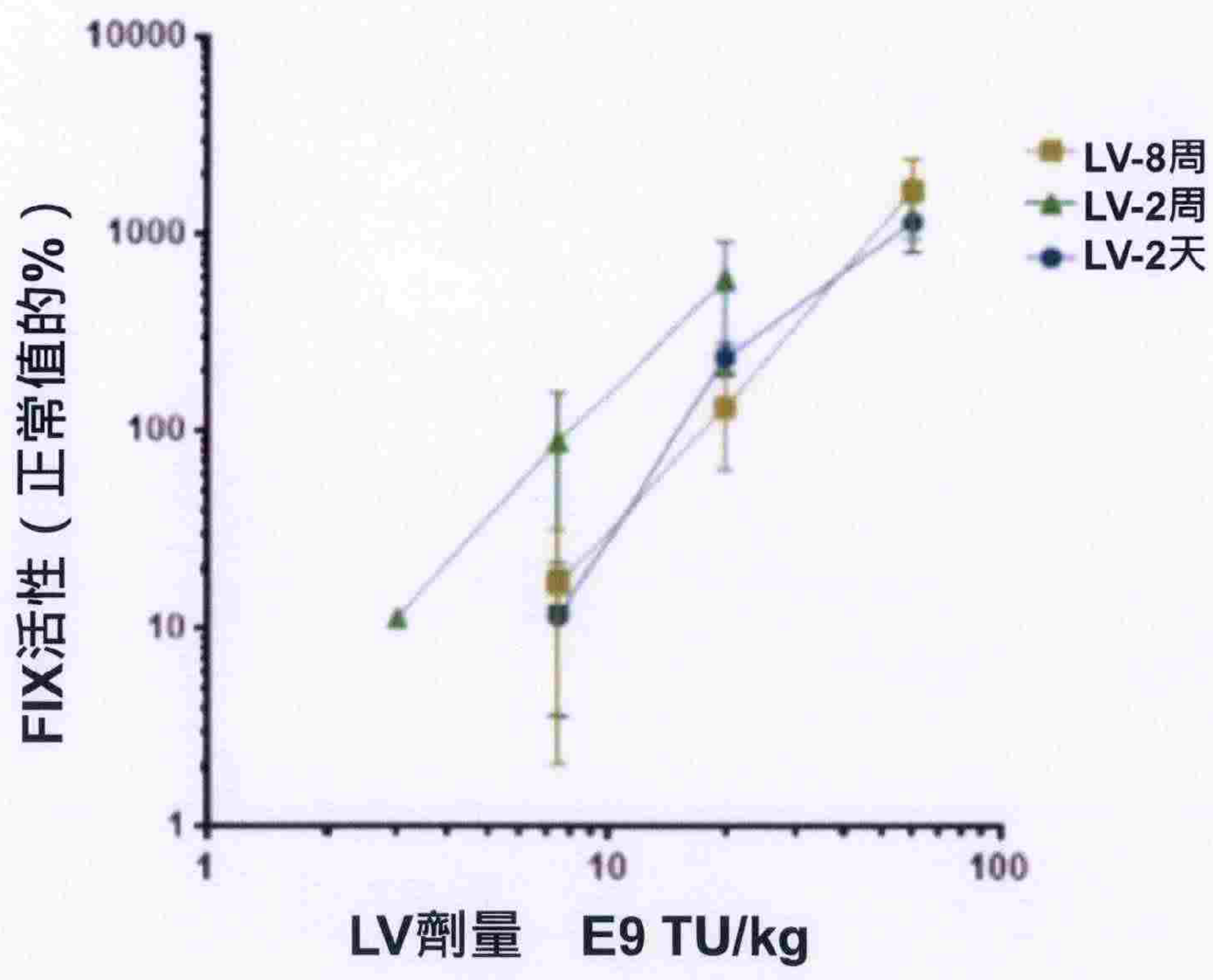
**血漿FIX活性
(正常值的%)**



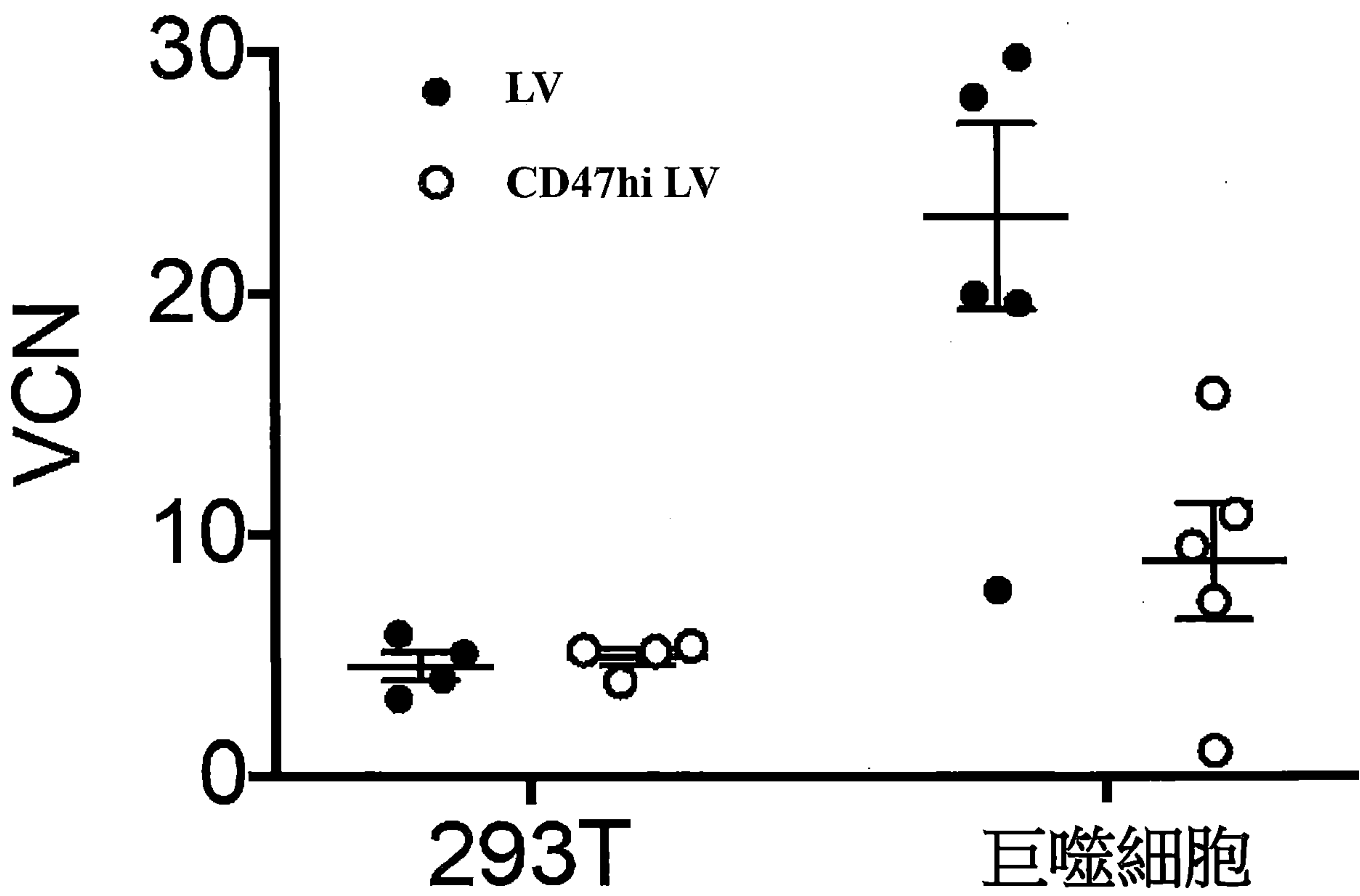




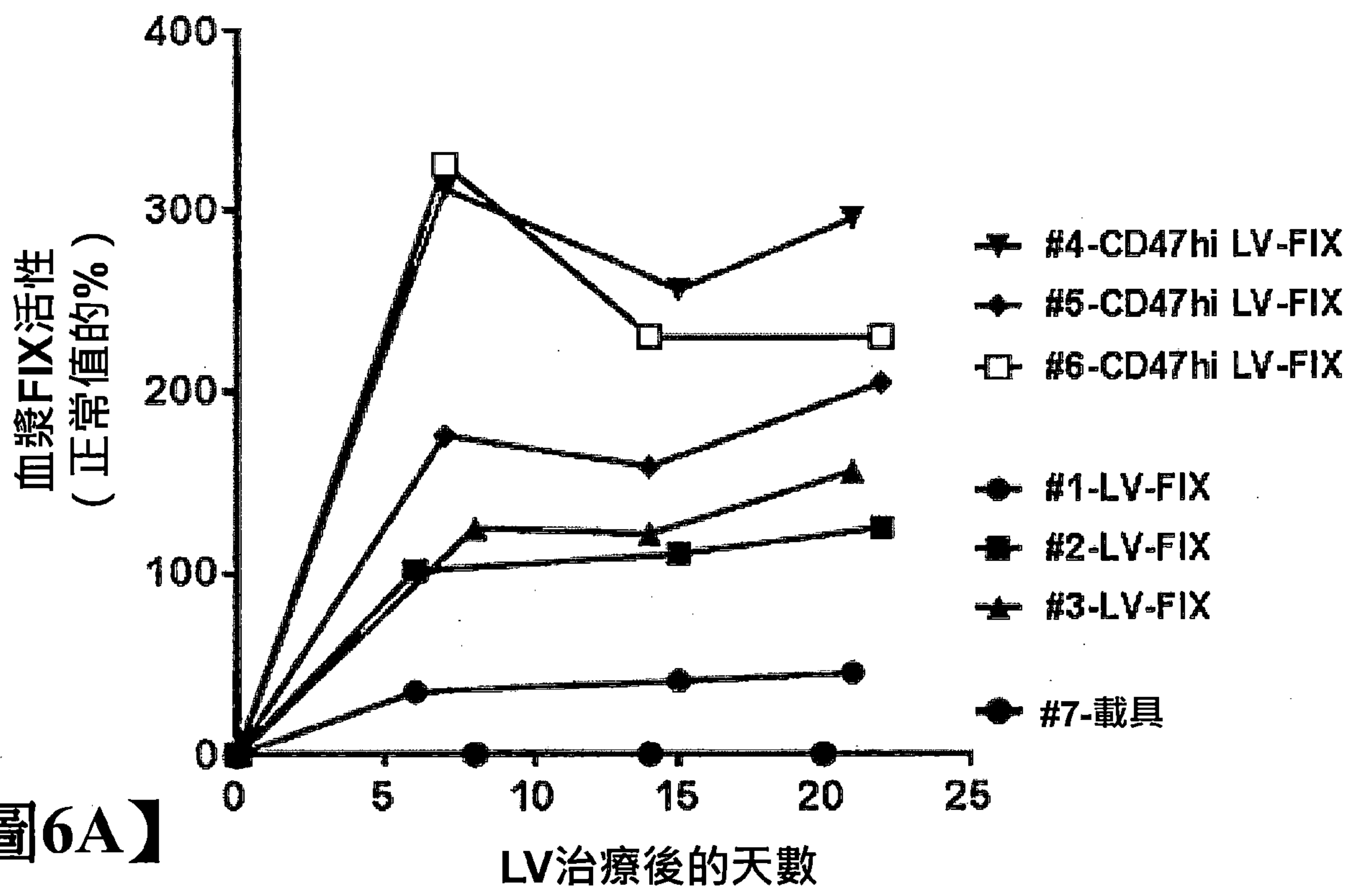
【圖4A】



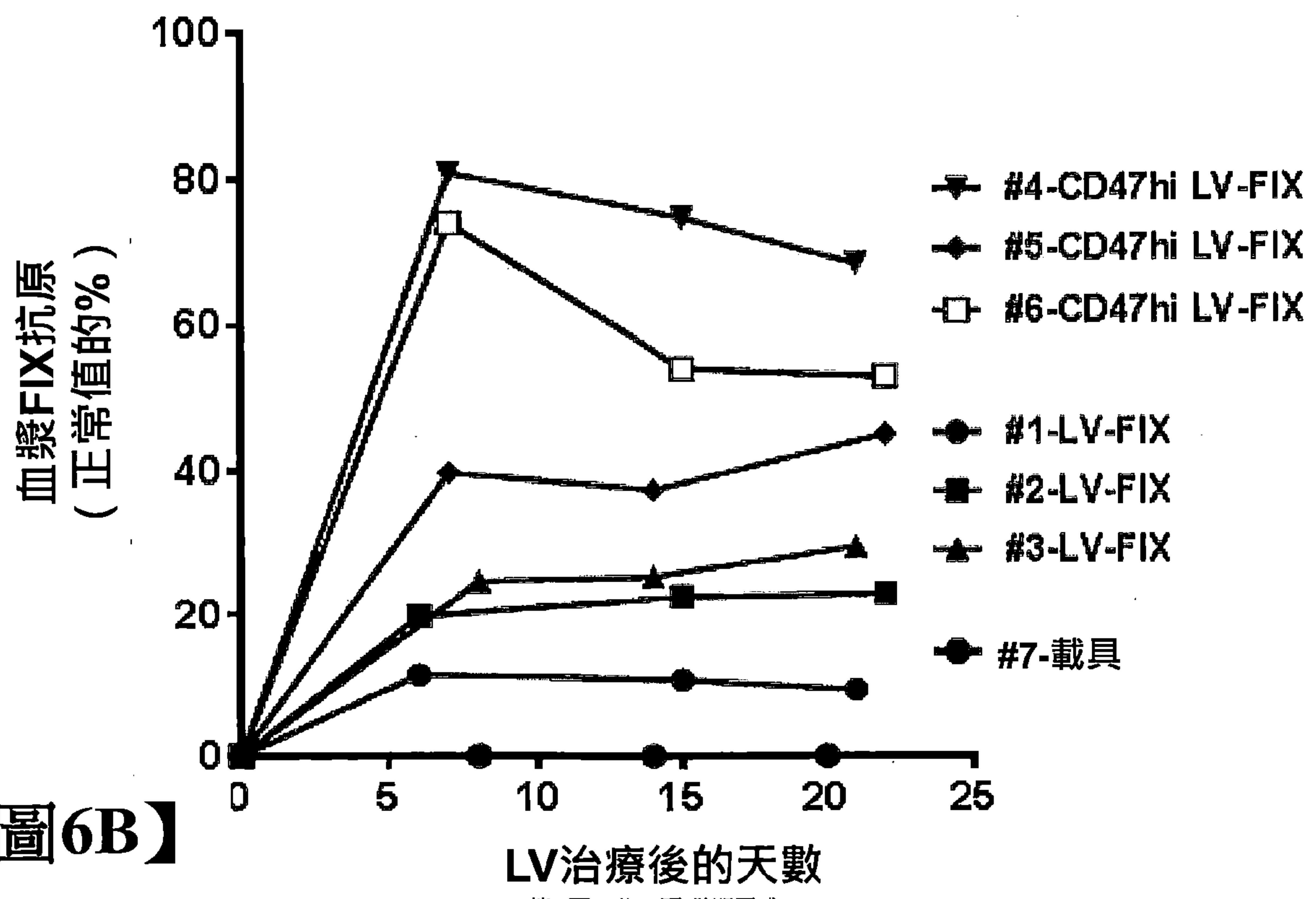
【圖4B】



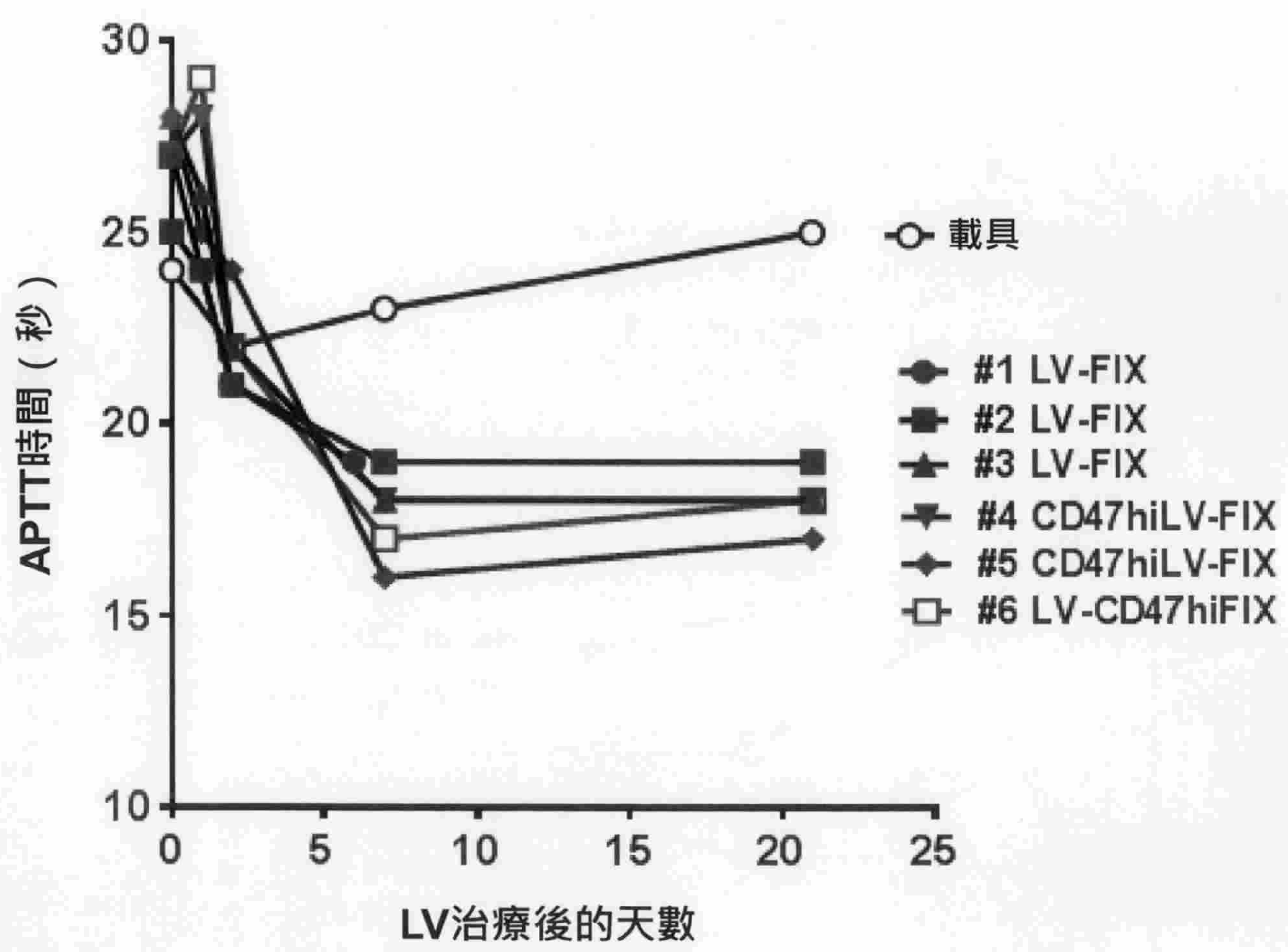
【圖5】



【圖6A】

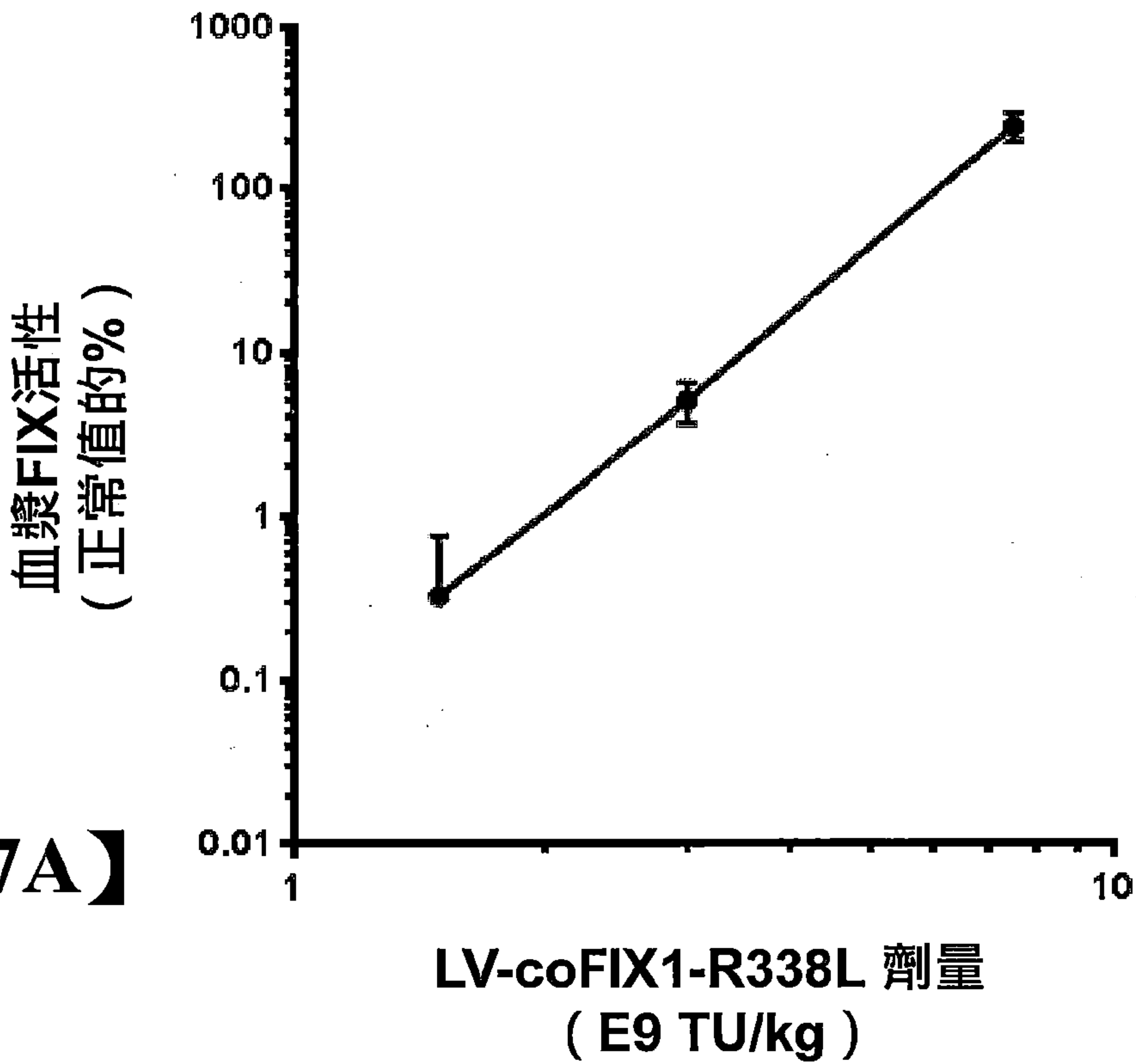


【圖6B】

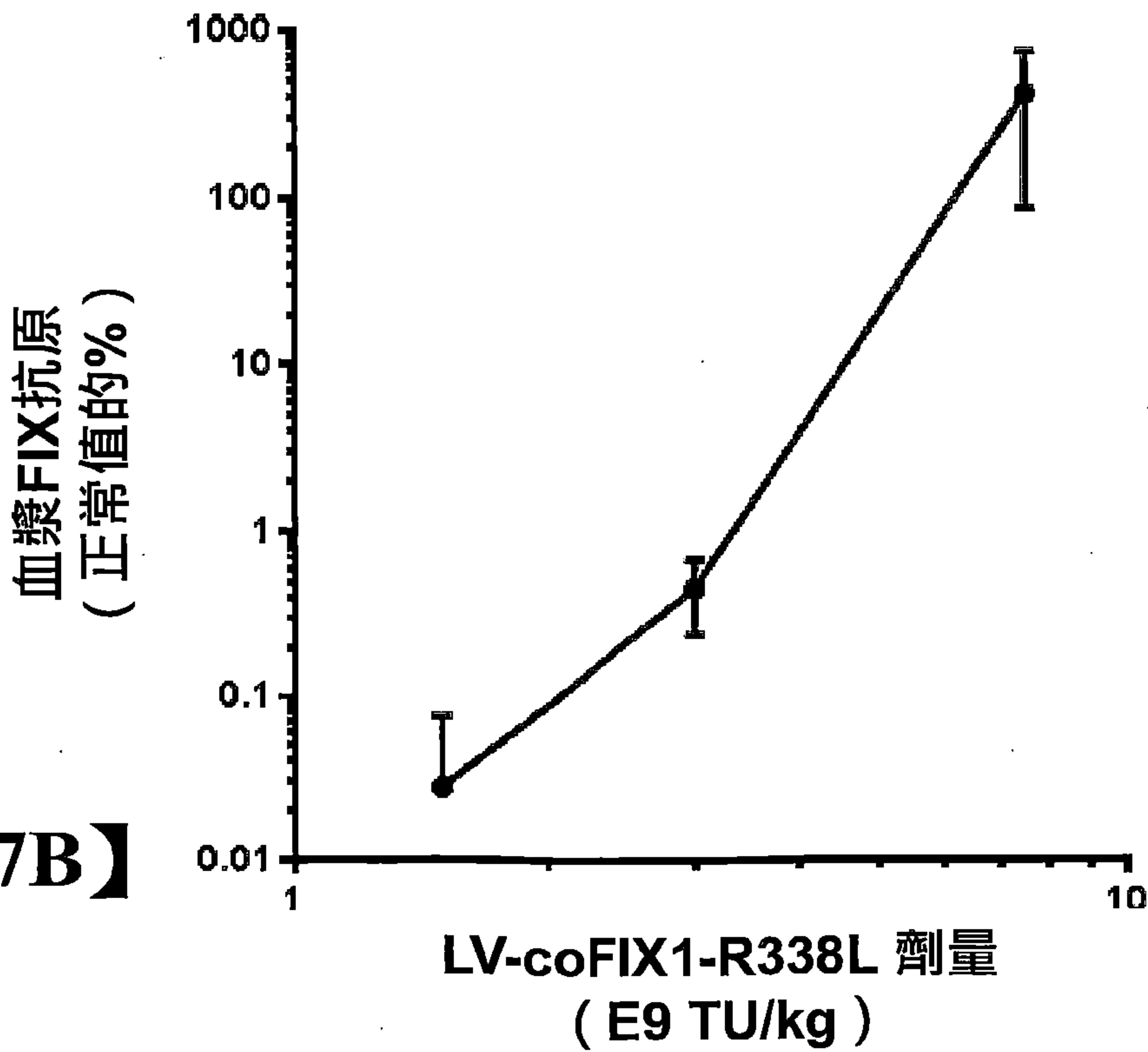


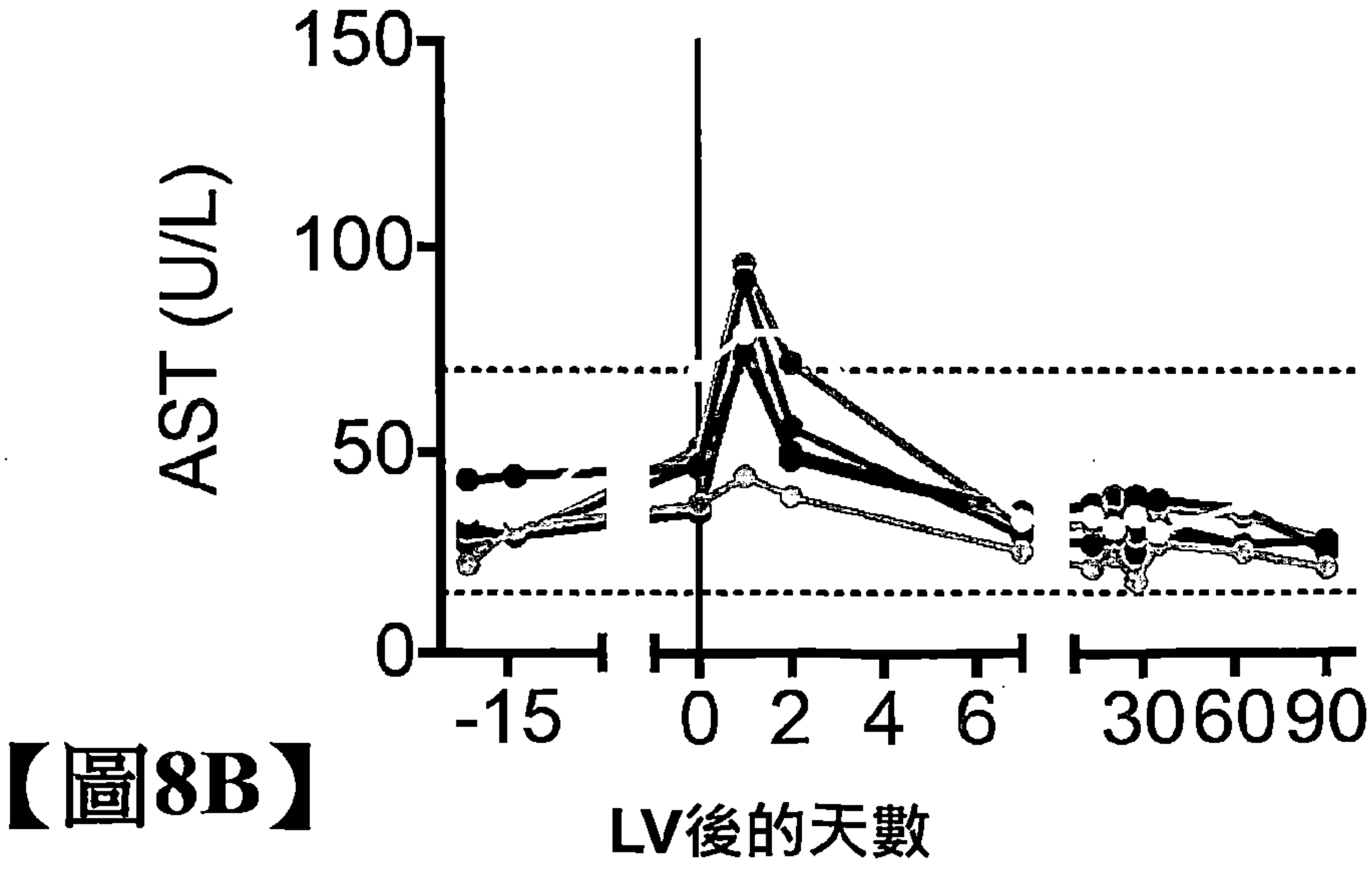
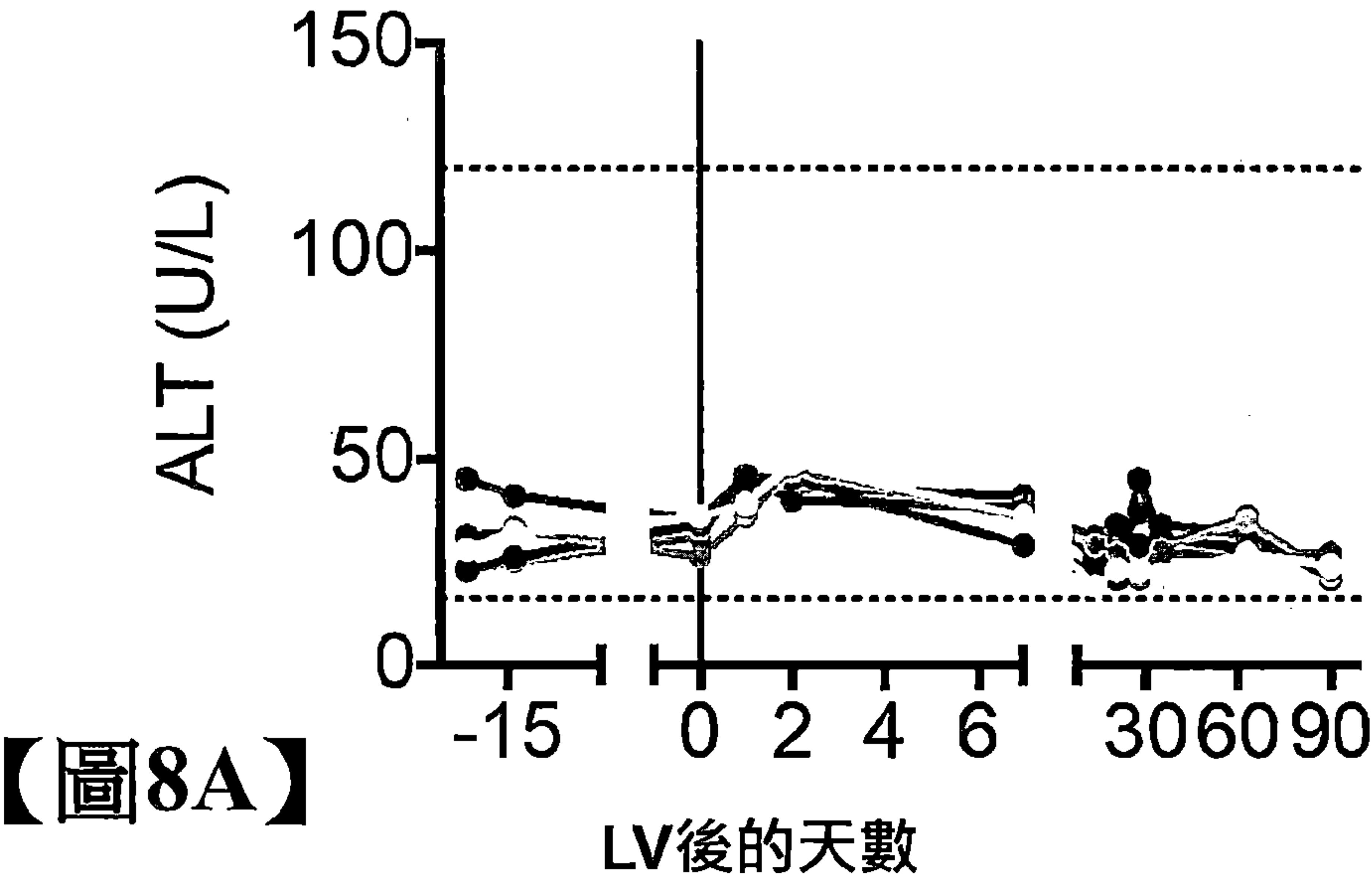
【圖6C】

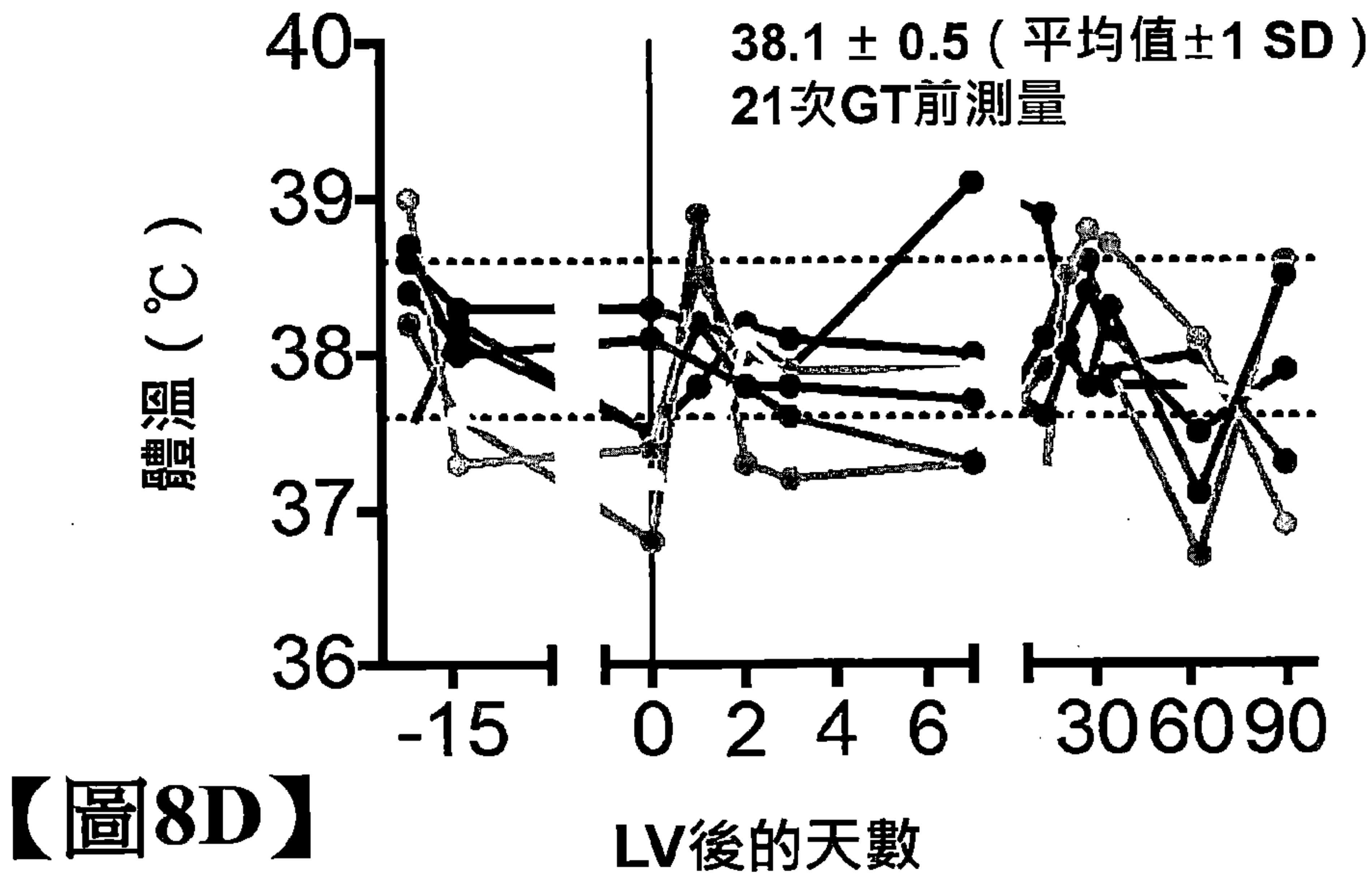
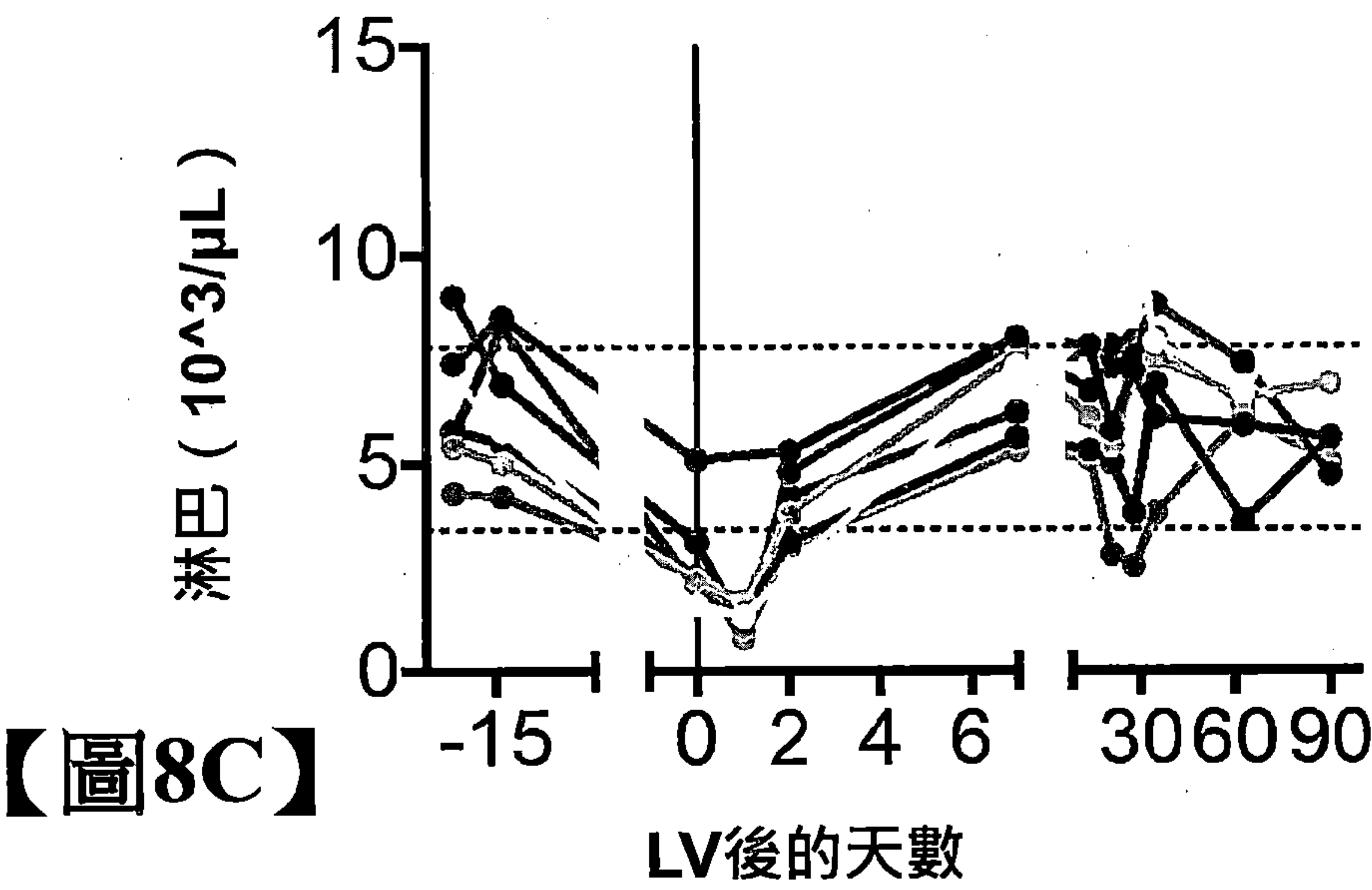
【圖7A】

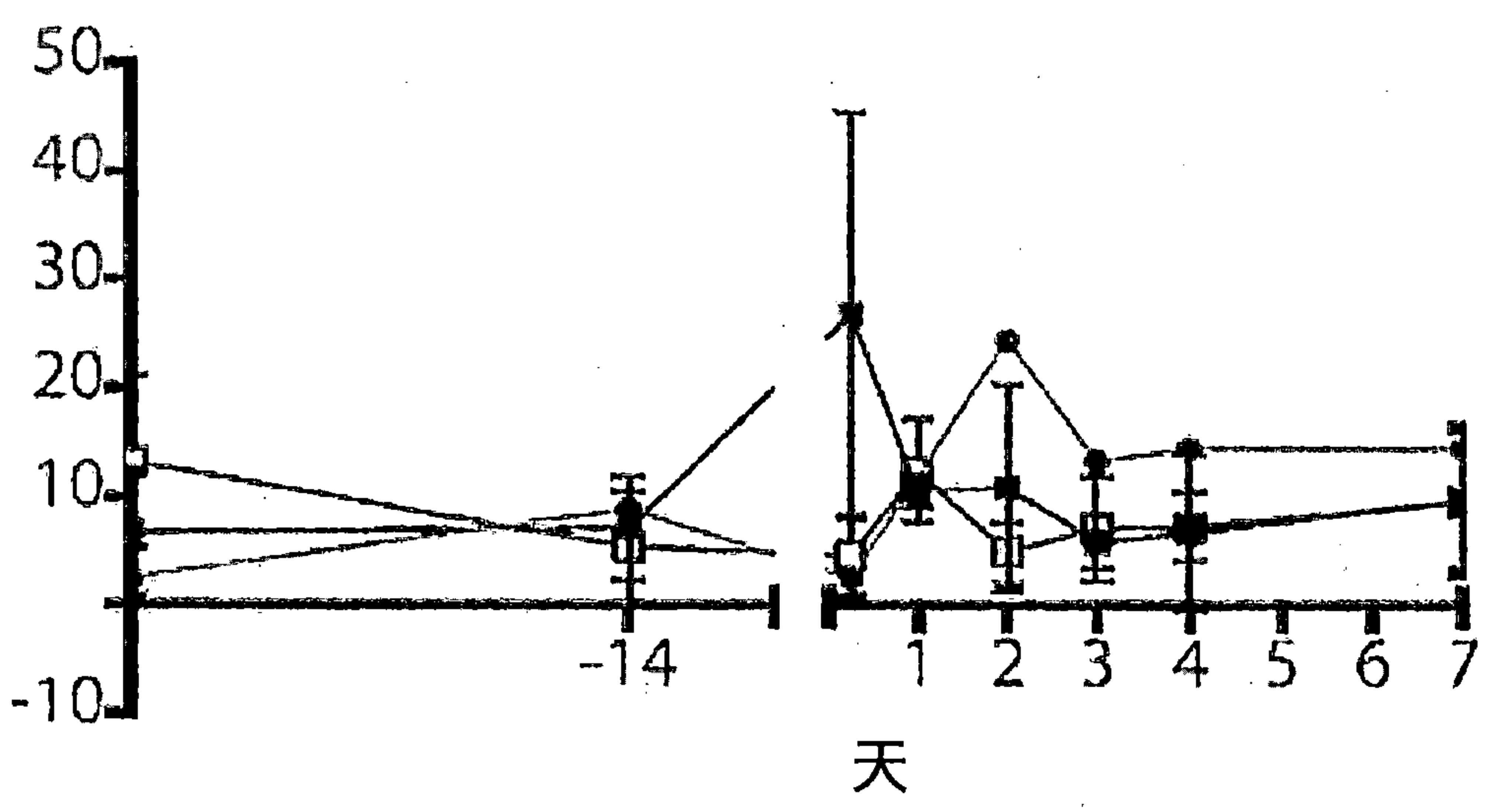


【圖7B】

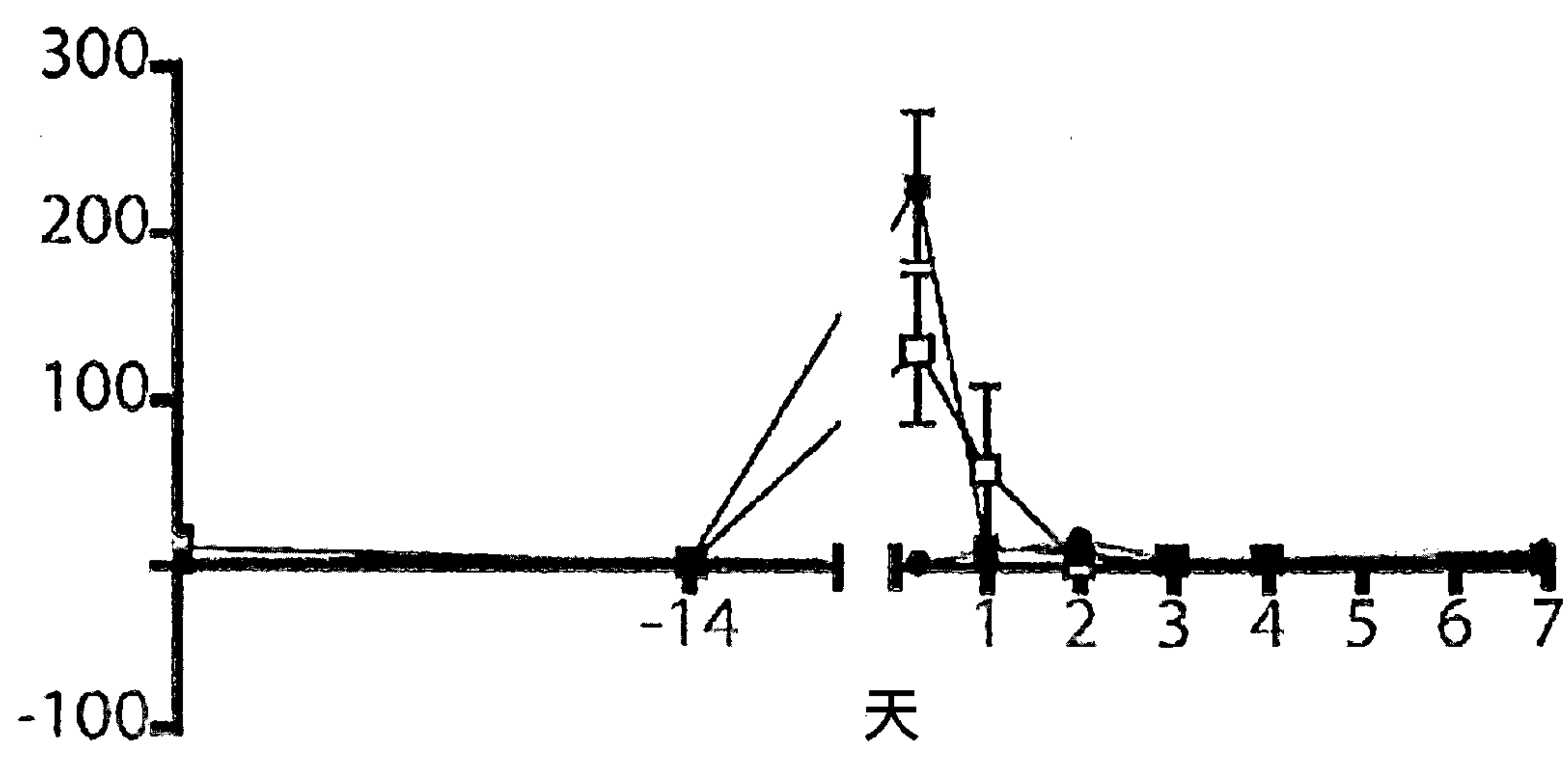




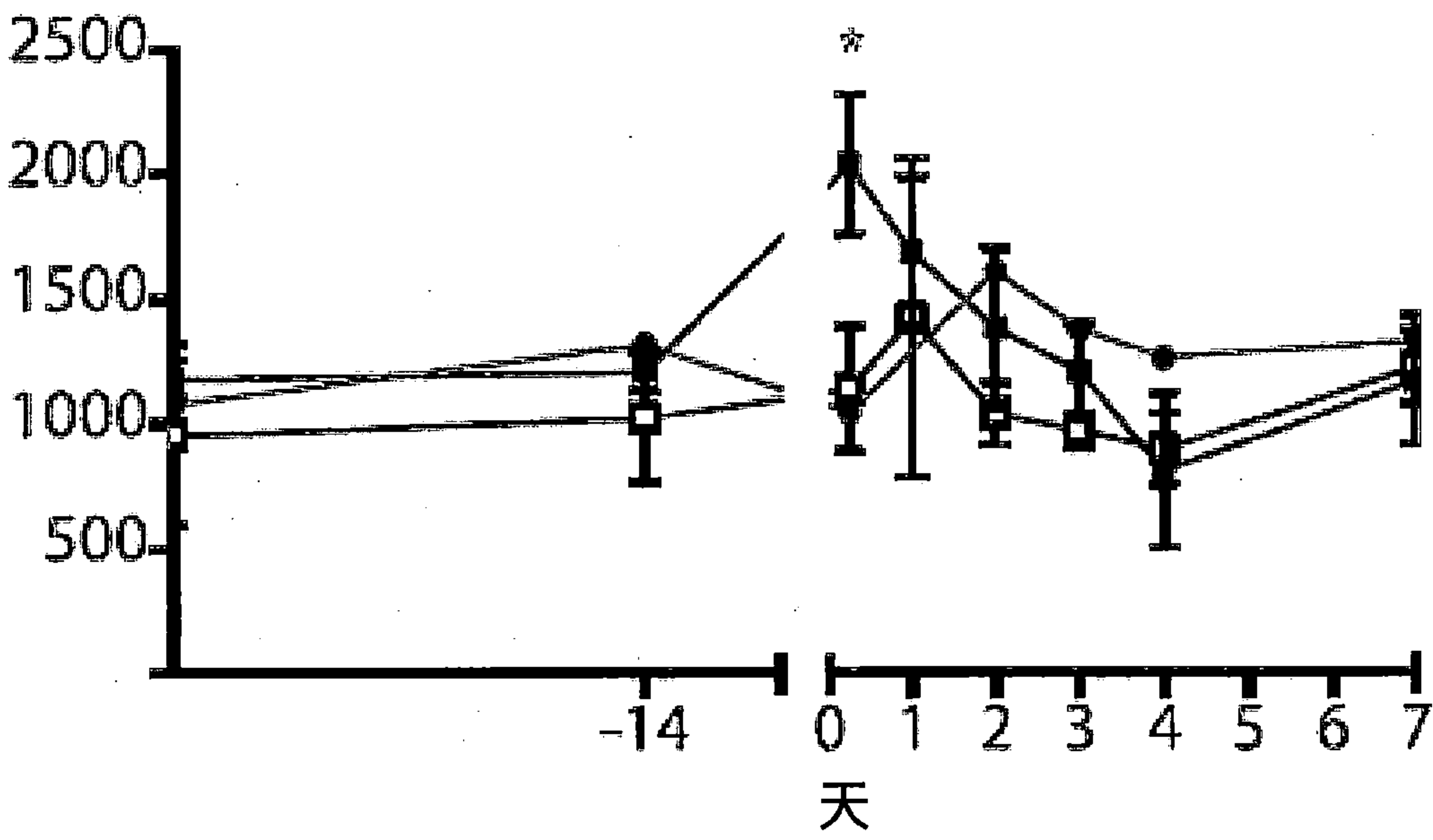




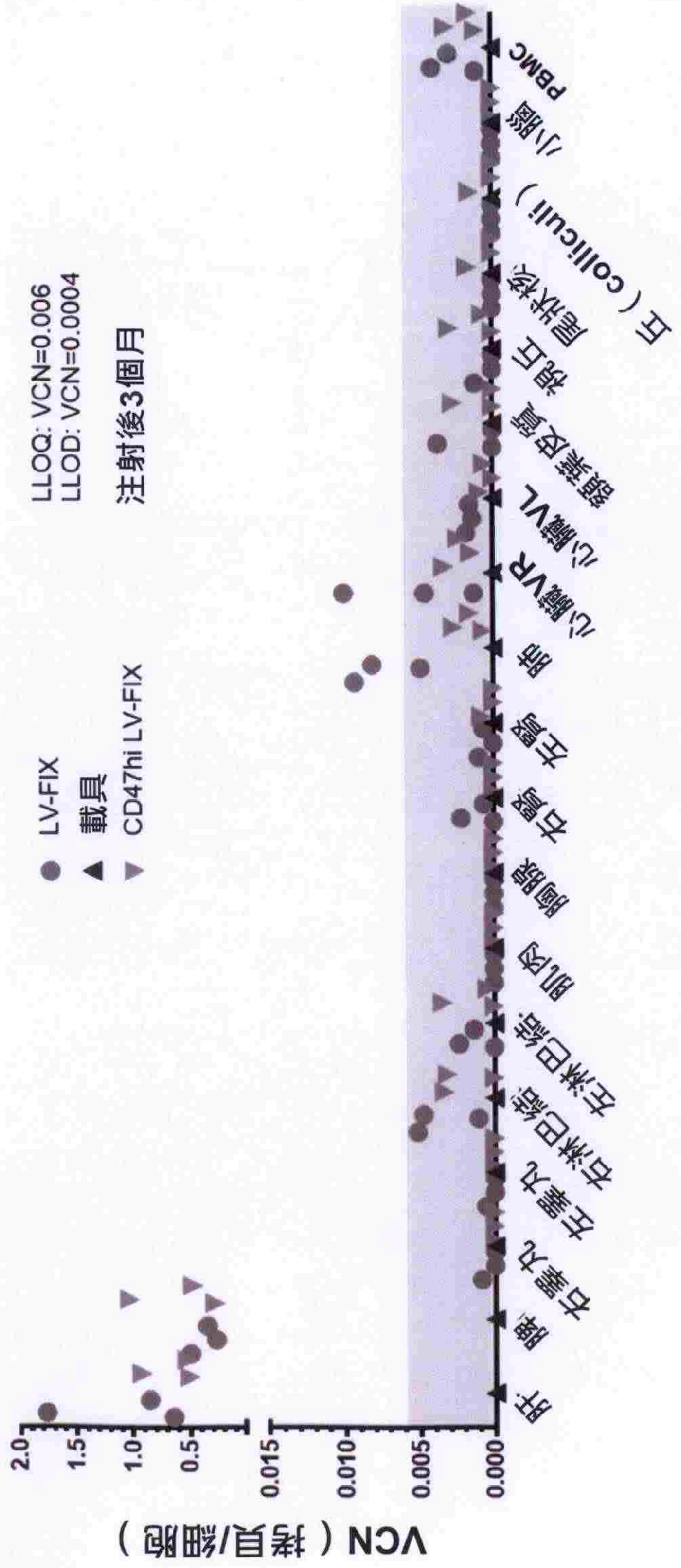
【圖9A】



【圖9B】

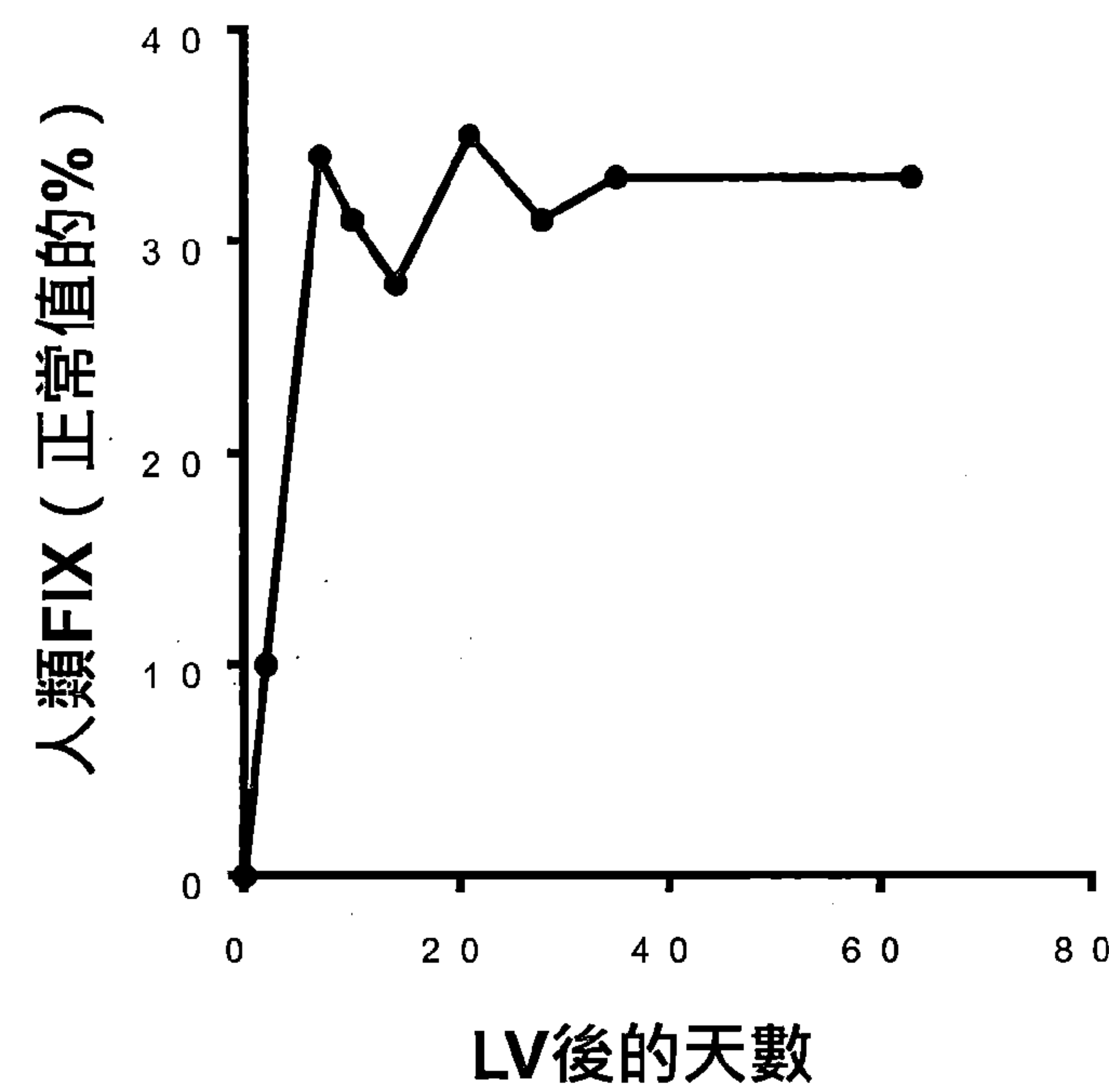


【圖9C】



【圖10】

【圖11A】



【圖11B】

