(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0160648
(43) 공개일자 2024년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/37* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7034886(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년08월01일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7005859
원출원일자(국제) 2018년08월01일
심사청구일자 2021년07월28일
(85) 번역문제출일자 2024년10월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/044892
(87) 국제공개번호 WO 2019/028192
국제공개일자 2019년02월07일
(30) 우선권주장
62/540,053 2017년08월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
스파크 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 펜실베이니아 필라델피아 스위트 1300 마켓 스트리트 3737 (우: 19104)
(72) 발명자
안구엘라, 자비어
미국 19104 펜실베니아 필라델피아 체스트넛 스트리트 3737 아파트먼트 1404
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

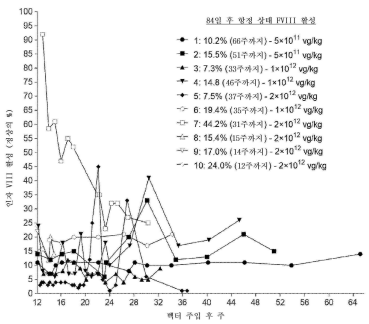
전체 청구항 수 : 총 140 항

(54) 발명의 명칭 **인자 VIII (FVIII) 유전자 요법 방법**

(57) 요 약

FVIII 단백질을 인코딩하는 핵산 및 핵산 변이체를 포함하는 벡터를 사용하는 방법이 개시된다. 특정 구현예에서, 혈우병 A를 갖는 인간을 치료하는 방법은 인자 VIII(FVIII)를 인코딩하는 핵산 또는 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)를 인코딩하는 핵산 변이체를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 핵산 변이체는 SEQ ID NO:7과 95% 이상의 동일성을 갖고/갖거나 핵산 변이체는 2개 이하의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는다. 다른 양태에서, rAAV 벡터는 킬로그램 당 약 $6x10^{12}$개 미만의 벡터 유전체(vg/kg)의 용량으로 인간에게 투여된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 7/02 (2018.01)
C07K 14/755 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/583,890 2017년11월09일 미국(US)
62/596,535 2017년12월08일 미국(US)
62/596,670 2017년12월08일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함하는 혈우병 A를 갖는 인간을 치료하는 방법으로서, 상기 벡터 유전체가 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)를 인코딩하는 핵산 변이체를 포함하고, 상기 핵산 변이체가 SEQ ID NO:7과 95% 이상의 동일성을 갖는, 방법.

청구항 2

재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함하는 혈우병 A를 갖는 인간을 치료하는 방법으로서, 상기 벡터 유전체가 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)를 인코딩하는 핵산 변이체를 포함하고, 상기 핵산 변이체가 2개 이하의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는, 방법.

청구항 3

재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함하는 혈우병 A를 갖는 인간을 치료하는 방법으로서, 상기 벡터 유전체가 인자 VIII(FVIII)를 인코딩하거나 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)를 인코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 킬로그램 당 $6x10^{12}$ 미만의 벡터 유전체(vg/kg)인, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{9}$ 내지 약 $1x10^{14}$ vg/kg인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{13}$ vg/kg인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $1x10^{13}$ vg/kg인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $5x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{11}$ 내지 약 $1x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $2x10^{11}$ 내지 약 $9x10^{11}$ vg/kg인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $8x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $7x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $4x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $5x10^{11}$ vg/kg 또는 약 $1x10^{12}$ vg/kg인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 획득된 데이터를 기초로 하여 예측된 것보다 큰 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 발현보다 1-4배 더 큰 방법.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 2-4배 더 큰 방법.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 2-3배 더 큰 방법.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 1-2배 더 큰 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 영장류가 시노몰로구스(cynomologus) 원숭이(마카카 파스시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 rAAV 벡터 투여 후 14일 이상에서 약 3% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 4% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 5% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 6% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 7% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 28일 이상에서 약 8% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 28일 이상에서 약 9% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 35일 이상에서 약 10% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 35일 이상에서 약 11% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 35일 이상에서 약 12% 이상인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 14일의 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 4주의 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 8주의 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 12주의 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 16주의 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 6개월의 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 14일의 기간에 걸쳐 평균 약 12% 이상인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 4주 기간 동안, 연속 8주 기간 동안, 연속 12주 기간 동안, 연속 16주 기간 동안, 연속 6개월 기간 동안, 또는 연속 1년 기간 동안 평균 약 12% 내지 약 100%인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 연속 4주 기간 동안, 연속 8주 기간 동안, 연속 12주 기간 동안, 연속 16주 기간 동안, 연속 6개월 기간 동안, 또는 연속 1년 기간 동안 평균 약 20% 내지 약 80%인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어

도 약 14일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 21일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 34

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 28일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 35일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 36

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 42일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 37

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 49일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 38

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 56일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 63일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 40

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 70일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 41

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 77일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 42

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 84일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 91일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 98일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 45

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 105일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 46

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 112일의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 47

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 4개월의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 48

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 6개월의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 49

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 7개월의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 50

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 12개월의 기간 동안 존재하는 방법.

청구항 51

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $1x10^{9}$ 내지 약 $1x10^{14}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 52

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $5x10^{9}$ 내지 약 $6x10^{13}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 53

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{13}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 54

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $1x10^{13}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 55

제1항, 제2항 및 제4항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 56

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 $6x10^{12}$ vg/kg 미만의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 57

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $5x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 58

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $1x10^{11}$ 내지 약 $1x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 59

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $2x10^{11}$ 내지 약 $9x10^{11}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 60

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $8x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 61

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $7x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 62

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 63

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 인간에게 약 $4x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 64

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 약 $5x10^{11}$ vg/kg 또는 약 $1x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, 상기 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 또는 hFVIII-BDD가 활성이 4, 6, 8 또는 12주 또는 개월에 걸쳐 5-50%를 초과하는만큼 변하지 않는 항정 상태로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 66

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 또는 hFVIII-BDD가 활성이 4, 6, 8 또는 12주 또는 개월에 걸쳐 25-100%를 초과하는만큼 변하지 않는 항정 상태로 인간에서 생성되는 방법.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서의 AAV 항체가 rAAV 벡터 투여 전에 검출되지 않거나, 상기 인간이 AAV에 대해 혈청 음성인 방법.

청구항 68

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서의 AAV 항체가 rAAV 벡터 투여 전에 1:5 이하로 존재하는 방법.

청구항 69

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서의 AAV 항체가 rAAV 벡터 투여 전에 1:3 이하로 존재하는 방법.

청구항 70

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간이 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11개월 또는 그 초과 동안 FVIII 또는 hFVIII-BDD에 대해 검출 가능한 항체를 생성하지 않는 방법.

청구항 71

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 14일 동안, 또는 적어도 약 21일 동안, 또는 적어도 약 28일 동안, 또는 적어도 약 35일 동안, 또는 적어도 약 42일 동안, 또는 적어도 약 49일 동안, 또는 적어도 약 56일 동안, 또는 적어도 약 63일 동안, 또는 적어도 약 70일 동안, 또는 적어도 약 77일 동안, 또는 적어도 약 84일 동안, 또는 적어도 약 91일 동안, 또는 적어도 약 98일 동안, 또는 적어도 약 105일 동안, 또는 적어도 약 112일 동안, 또는 적어도 약 154일 동안, 또는 적어도 약 168일 동안, 또는 적어도 약 182일 동안, 또는 적어도 약 196일 동안, 또는 적어도 약 210일 동안 rAAV 벡터에 대한 검출 가능한 항체를 생성하지 않는 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간이 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14주 또는 개월 동안 rAAV 벡터에 대한 세포 매개 면역 반응을 생성하지 않는 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 FVIII 또는 hFVIII-BDD 치료 효과를 감소시키거나 차단하기에 충분한 rAAV 벡터에 대한 체액성 면역 반응을 발생시키지 않는 방법.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 동

안 rAAV 벡터에 대해 검출 가능한 항체를 생성하지 않는 방법.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 rAAV 벡터 투여 전, 동안 및/또는 후에 면역억제제가 투여되지 않는 방법.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 면역억제제를 투여하지 않고 달성되는 방법.

청구항 77

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 78

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 투여된 후 면역억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 79

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 투여된 후 1시간 내지 최대 45일 이내의 기간에 면역억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제75항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 스테로이드, 사이클로스포린(예를 들어, 사이클로스포린 A), 미코페놀레이트, 리툭시맙 또는 이들의 유도체를 포함하는 방법.

청구항 81

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 SEQ ID NO:7과 96% 이상의 서열 동일성을 갖는 방법.

청구항 82

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 SEQ ID NO:7과 95%-100%의 서열 동일성을 갖는 방법.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 20개 이하, 15개 이하, 또는 10개 이하의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는 방법.

청구항 84

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 5개 이하의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는 방법.

청구항 85

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 4, 3, 2, 1 또는 0개의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는 방법.

청구항 86

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 1개의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는 방법.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 서열 SFSQNPPVLKRHQR(SEQ ID NO:29)의 하나 이상의 아미노산의 결실, 또는 전체 서열 SFSQNPPVLKRHQR의 결실을 갖는 SEQ ID NO:25를 인코딩하는 방법.

청구항 88

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 SEQ ID NO:25를 인코딩하는 방법.

청구항 89

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, hFVIII-BDD가 SEQ ID NO:19에 의해 인코딩된 hFVIII-BDD와 동일한 방법.

청구항 90

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 또는 핵산 변이체가 서열 SFSQNPPVLKRHQR(SEQ ID NO:29)의 하나 이상의 아미노산의 결실, 또는 전체 서열 SFSQNPPVLKRHQR의 결실을 갖는 SEQ ID NO:25를 인코딩하는 방법.

청구항 91

제1항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터가 AAV 혈청형 또는 AAV 유사형을 포함하고, 상기 AAV 유사형이 ITR 혈청형과 상이한 AAV 캡시드 혈청형을 포함하는 방법.

청구항 92

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 유전체가 인트론, 발현 조절 요소, 하나 이상의 아데노-관련 바이러스(AAV) 역 말단 반복(ITR) 및/또는 충전재 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 인트론이 핵산 변이체 내에 있거나 측접하는 방법.

청구항 94

제92항에 있어서, 발현 조절 요소가 핵산 변이체에 작동 가능하게 연결되는 방법.

청구항 95

제92항에 있어서, AAV ITR(들)이 핵산 변이체의 5' 또는 3' 말단에 측접하는 방법.

청구항 96

제92항에 있어서, 충전재 폴리뉴클레오티드 서열이 핵산 변이체의 5' 또는 3' 말단에 측접하는 방법.

청구항 97

제92항에 있어서, 인트론, 발현 조절 요소, 하나 이상의 아데노-관련 바이러스(AAV) 역 말단 반복(ITR) 및/또는 충전재 폴리뉴클레오티드 서열이 감소된 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖도록 변형된 방법.

청구항 98

제92항에 있어서, 인트론, 발현 조절 요소, 하나 이상의 아데노-관련 바이러스(AAV) 역 말단 반복(ITR) 및/또는 충전재 폴리뉴클레오티드 서열이 20개 이하, 15개 이하, 10개 이하, 5개 이하 또는 0개의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖도록 변형된 방법.

청구항 99

제92항에 있어서, 발현 조절 요소가 항시적 또는 조절 가능한 조절 요소, 또는 조직-특이적 발현 조절 요소 또는 프로모터를 포함하는 방법.

청구항 100

제92항에 있어서, 발현 조절 요소가 간에서 발현을 부여하는 요소를 포함하는 방법.

청구항 101

제92항에 있어서, 발현 조절 요소가 TTR 프로모터 또는 돌연변이체 TTR 프로모터를 포함하는 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 돌연변이체 TTR 프로모터가 SEQ ID NO:22를 포함하는 방법.

청구항 103

제101항에 있어서, ITR이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형, 또는 이들의 조합 중 임의의 것의 하나 이상의 ITR을 포함하는 방법.

청구항 104

제1항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 유전체가 SEQ ID NO:23에 기재된 ITR, 프로모터, 폴리A 신호 및/또는 인트론 서열을 포함하는 방법.

청구항 105

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 변형된 또는 변이체 AAV VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 서열, 또는 야생형 AAV VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 서열을 포함하는 방법.

청구항 106

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 VP1, VP2 및/또는 VP3 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 변형된 또는 변이체 AAV VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 서열을 포함하는 방법.

청구항 107

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형 중 임의의 것으로부터 선택되는 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 서열을 포함하는 방법.

청구항 108

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 LK03 캡시드(SEQ ID NO:27)와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 캡시드를 포함하는 방법.

청구항 109

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 SPK 캡시드(SEQ ID NO:28)와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 캡시드를 포함하는 방법.

청구항 110

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 LK03 캡시드(SEQ ID NO:27)를 포함하는 방법.

청구항 111

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 SPK 캡시드(SEQ ID NO:28)를 포함하는 방법.

청구항 112

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 핵산 변이체 SEQ ID NO:7 및 LK03 캡시드 서열(SEQ ID NO:27)을 포함하는 방법.

청구항 113

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 핵산 변이체 SEQ ID NO:7 및 SPK 캡시드(SEQ ID NO:28)를 포함하는 방법.

청구항 114

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 핵산 변이체 및 SEQ ID NO:23의 돌연변이된 TTR 프로모터(TTRmut), 합성 인트론, 폴리 A 및 ITR 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 115

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 핵산 변이체 및 SEQ ID NO:23의 돌연변이된 TTR 프로모터 (TTRmut), 합성 인트론, 폴리 A 및 ITR 중 하나 이상 및 LK03 캡시드 서열(SEQ ID NO:27) 또는 SPK 캡시드(SEQ ID NO:28)를 포함하는 방법.

청구항 116

제1항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 약학적 조성물을 구성하는 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 약학적 조성물이 생물학적으로 상용성인 담체 또는 부형제를 포함하는 방법.

청구항 118

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 리포솜에 캡슐화되거나 인지질 또는 마이셀과 혼합되는 방법.

청구항 119

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 빈 캡시드 AAV를 투여하는 것을 추가로 포함하고, 선택적으로 빈 캡시드 AAV가 rAAV 벡터와 함께 투여되는 방법.

청구항 120

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및/또는 AAV-Rh74 혈청형의 빈 캡시드를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 121

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 투여되는 AAV 벡터와 동일한 혈청형의 빈 캡시드 AAV를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 122

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, LK03 캡시드(SEQ ID NO:27) 또는 SPK 캡시드(SEQ ID NO:28)를 갖는 빈 캡시드를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 123

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빈 캡시드 대 상기 rAAV 벡터의 비율이 약 2:1 내지 약 50:1인 방법.

청구항 124

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빈 캡시드 대 상기 rAAV 벡터의 비율이 약 2:1 내지 약 25:1인 방법.

청구항 125

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빈 캡시드 대 상기 rAAV 벡터의 비율이 약 2:1 내지 약 20:1인 방법.

청구항 126

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빈 캡시드 대 상기 rAAV 벡터의 비율이 약 2:1 내지 약 15:1인 방법.

청구항 127

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빈 캡시드 대 상기 rAAV 벡터의 비율이 약 2:1 내지 약 10:1인 방법.

청구항 128

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 빈 캡시드 대 상기 rAAV 벡터의 비율이 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 또는 10:1인 방법.

청구항 129

제1항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 변이체에 의해 인코딩되는 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 상기 포유동물의 세포, 조직 또는 기관에서 발현되는 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 세포가 분비 세포를 포함하는 방법.

청구항 131

제129항에 있어서, 세포가 내분비 세포 또는 내피 세포를 포함하는 방법.

청구항 132

제129항에 있어서, 세포가 간세포, 굴모양 내피 세포, 거대핵세포, 혈소판 또는 조혈 줄기 세포를 포함하는 방법.

청구항 133

제129항에 있어서, 상기 포유동물의 조직 또는 기관이 간을 포함하는 방법.

청구항 134

제1항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 벡터가 정맥내, 동맥내, 근내, 피하, 공동내, 또는 삽관에 의해, 또는 카테터를 통해 상기 인간에게 전달되는 방법.

청구항 135

제1항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 또는 hFVIII-BDD가 혈전증의 위험을 실질적으로 증가시키지 않는 수준으로 발현되는 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 혈전증 위험이 피브린 분해 생성물을 측정함으로써 결정되는 방법.

청구항 137

제1항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 또는 hFVIII-BDD의 활성이 적어도 1, 2, 3 또는 4주, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 또는 적어도 1년 동안 검출 가능한 방법.

청구항 138

제1항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 적어도 1, 2, 3 또는 4주, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 또는 적어도 1년 동안 자발적 출혈을 나타내지 않는 방법.

청구항 139

제1항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 인간이 적어도 1, 2, 3 또는 4주, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 또는 적어도 1년 동안 FVIII 단백질 예방을 필요로 하지 않는 방법.

청구항 140

제1항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 항체의 존재 또는 양, AAV, FVIII 또는 hFVIII-BDD 항체에 대한 면역 반응, FVIII 또는 hFVIII-BDD에 대한 면역 반응, FVIII 또는 hFVIII-BDD 양, FVIII 또는 hFVIII-BDD 활성, 하나 이상의 간 효소의 양 또는 수준 또는 빈도, 및/또는 출혈 에피소드의 중증도 또는 지속기간에 대해 인간을 분석하거나 모니터링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 특허 출원은 2017년 8월 1일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/540,053호; 2017년 11월 9일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/583,890호; 2017년 12월 8일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/596,535호; 및 2017년 12월 8일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/596,670호의 이익을 주장한다. 상기 출원의 전체 내용은 모든 본문, 표 및 도면을 포함하여 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 재조합 응고 인자 생성 및 이상 지혈과 관련된 의학적 장애의 치료 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 인자 VIII(FVIII) 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하기 위한 방법, 및 혈우병 A 치료 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0005] **서문**

[0006] 본 발명이 속하는 기술의 상태를 설명하기 위해 명세서 전체에 걸쳐 여러 간행물 및 특허 문헌이 인용된다. 이들 인용 각각은 전체적으로 제시된 바와 같이 본원에 참조로서 포함된다.

[0007] 혈우병은 전 세계 5,000명의 남성 중 1명에 존재하는 X-연관 출혈 장애이다. 정상의 단지 1%를 초과하여 응고 인자 수준을 증가시키는 것을 목표로 하는 요법은 중증 질병 표현형의 실질적인 개선과 관련이 있다. 혈우병 B(HB)에 대한 AAV-매개 유전자 전달에 대한 최근의 임상 시험은 인자 IX(FIX)의 치료 수준의 지속된 장기간의 발현을 입증하였으나, AAV 벡터 용량은 AAV 캡시드에 대한 항-AAV 면역 반응으로 인해 제한될 수 있는 것으로 확립되었다. 이들 데이터는 혈우병 B와 관련이 있지만, 모든 혈우병의 80%는 FVIII 결핍인 혈우병 A(HA)에 기인한다.

[0008] 상기 질병에 대한 현재의 치료는 인자 VIII 단백질의 빈번한 주입을 필요로 하는 단백질 대체 요법이다. 환자가 더 이상 상기 빈번한 단백질 치료를 필요로 하지 않도록 지속적인 치료 수준의 인자 VIII 발현을 달성할 즉각적인 필요가 있다. 실제로, 지속적인 인자 VIII 발현은 출혈 에피소드를 방지하고, 단백질에 대한 면역 내성이 확립되도록 보장할 수 있다.

발명의 내용

[0009] **개요**

[0010] 본 발명에 따르면, 혈우병 A를 갖거나 인자 VIII(FVIII)를 필요로 하는 인간을 치료하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 방법은 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 벡터 유전체는 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)를 인코딩하는 핵산 변이체를 포함하고, 여기서 핵산 변이체는 SEQ ID NO:7과 95% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 방법은 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 벡터 유전체는 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-

BDD)를 인코딩하는 핵산 변이체를 포함하고, 여기서 핵산 변이체는 2개 이하의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpGs)를 갖는다.

[0011] 추가 구현예에서, 혈우병 A를 갖거나 인자 VIII(FVIII)를 필요로 하는 인간을 치료하는 방법은 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 벡터 유전체는 인자 VIII(FVIII)를 인코딩하거나 B 도메인 결실을 갖는 인자 VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)를 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량은 킬로그램 당 $6x10^{12}$ 미만의 벡터 유전체(vg/kg)이다.

[0012] 방법 및 용도의 구현예는 약 $1x10^{9}$ 내지 약 $1x10^{14}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0013] 방법 및 용도의 구현예는 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{13}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0014] 방법 및 용도의 구현예는 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $1x10^{13}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0015] 방법 및 용도의 구현예는 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 방법 및 용도의 구현예는 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $5x10^{12}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0017] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $1x10^{11}$ 내지 약 $1x10^{12}$ vg/kg인 방법.

[0018] 방법 및 용도의 구현예는 약 $2x10^{11}$ 내지 약 $9x10^{11}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0019] 방법 및 용도의 구현예는 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $8x10^{12}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 12. 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간에게 투여되는 rAAV 벡터의 용량이 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $7x10^{12}$ vg/kg인 방법.

[0021] 방법 및 용도의 구현예는 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0022] 방법 및 용도의 구현예는 약 $4x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0023] 방법 및 용도의 구현예는 약 $5x10^{11}$ vg/kg 또는 약 $1x10^{12}$ vg/kg의 용량의 rAAV 벡터를 인간에게 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 방법 및 용도의 구현예는 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 획득된 데이터를 기초로 하여 인간에서 예상량보다 큰 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 제공하는 것을 포함한다. 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은, 예를 들어, rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 클 수 있다.

[0025] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 획득된 데이터를 기초로 하여 예측된 것보다 크다.

[0026] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 발현보다 1-4배 더 크다.

[0027] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 rAAV 벡터가 투

여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 2-4배 더 크다.

[0028] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 2-3배 더 크다.

[0029] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 rAAV 벡터가 투여된 비-인간 영장류 연구로부터 유래된 선형 회귀 곡선을 기초로 하여 예측된 것보다 1-2배 더 크다.

[0030] 비-인간 영장류는 마카카 속을 포함한다. 특정 구현예에서, 비-인간 영장류는 시노몰로구스(cynomologus) 원숭이(마카카 파스시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))이다.

[0031] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 지혈의 단기, 중기 또는 장기 개선을 제공하는 기간 동안 발현된다. 특정 구현예에서, 상기 기간은 지혈을 유지하기 위해 보충적 FVIII 단백질 또는 재조합 FVIII 단백질이 인간에 투여될 필요가 없도록 하는 기간이다.

[0032] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 14일 동안 발현된다.

[0033] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 21일 동안 발현된다.

[0034] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 28일 동안 발현된다.

[0035] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 35일 동안 발현된다.

[0036] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 42일 동안 발현된다.

[0037] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 49일 동안 발현된다.

[0038] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 56일 동안 발현된다.

[0039] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 63일 동안 발현된다.

[0040] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 70일 동안 발현된다.

[0041] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 77일 동안 발현된다.

[0042] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 84일 동안 발현된다.

[0043] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 91일 동안 발현된다.

[0044] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 98일 동안 발현된다.

[0045] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 105일 동안 발현된다.

[0046] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 112일 동안 발현된다.

[0047] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 4개월 동안 발현된다.

[0048] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 적어도 약 154일 동안 발현된다.

[0049] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 적어도 약 210일 동안 발현된다.

[0050] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 6개월 동안 발현된다.

[0051] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 12개월 동안 발현된다.

[0052] FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 일정 기간 동안 특정량으로 발현될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기량은 검출 가능한 FVIII 또는 hFVIII-BDD가 존재하거나 치료적 이점을 제공하는 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양이 되도록 하는 양이다.

[0053] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 rAAV 벡터 투여 후 14일 이상에서 약 3% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 4% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 5% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 6% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 21일 이상에서 약 7% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 28일 이상에서 약 8% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 28일 이상에서 약 9% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 35일 이상에서 약 10% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 35일 이상에서 약 11% 이상이고, rAAV 벡터 투여 후 35일 이상에서 약 12% 이상이다.

[0054] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 14일 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0055] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 4주 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0056] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 8주 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0057] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 12주 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0058] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 16주 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0059] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 6개월 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0060] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 7개월 기간에 걸쳐 평균 약 10% 이상이다.

[0061] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 14일 기간에 걸쳐 평균 약 12% 이상이다.

[0062] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 4주 기간 동안, 연속 8주 기간 동안, 연속 12주 기간 동안, 연속 16주 기간 동안, 연속 6개월 기간 동안, 연속 7개월 기간 동안, 또는 연속 1년 기간 동안 평균 약 12% 내지 약 100%이다.

[0063] 특정 구현예에서, 응고 활성에 의해 반영되는, 인간에서 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 양은 연속 4주 기간 동안, 연속 8주 기간 동안, 연속 12주 기간 동안, 연속 16주 기간 동안, 연속 6개월 기간 동안, 또는 연속 1년 기간 동안 평균 약 20% 내지 약 80%이다.

[0064] 항정-상태 FVIII 발현은 또한 특정 기간 후, 예를 들어, rAAV 벡터 투여 후 4-6, 6-8 또는 6-12주 이상, 예를 들어, 6-12개월 또는 심지어 수년 후에 달성될 수 있다.

[0065] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 FVIII 활성이 4, 6, 8 또는 12주 또는 개월에 걸쳐 5-50%를 초과하는만큼 변하지 않는 항정 상태로 인간에서 생성된다.

[0066] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 FVIII 활성이 4, 6, 8 또는 12주 또는 개월에 걸쳐 25-100%를 초과하는만큼 변하지 않는 항정 상태로 인간에서 생성된다.

[0067] rAAV 벡터는 투여 후 지속적인 발현을 제공하기 위해 특정량 및 특정 기간 동안 FVIII의 발현을 제공할 것으로 예상되는 용량으로 투여될 수 있다.

[0068] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $1x10^{9}$ 내지 약 $1x10^{14}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0069] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $5x10^{9}$ 내지 약 $6x10^{13}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0070] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{13}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0071] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $1x10^{13}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0072] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0073] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 $6x10^{12}$ vg/kg 미만의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0074] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $1x10^{10}$ 내지 약 $5x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0075] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $1x10^{11}$ 내지 약 $1x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0076] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $2x10^{11}$ 내지 약 $9x10^{11}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0077] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $8x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0078] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $7x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0079] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $3x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0080] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인간에게 약 $4x10^{11}$ 내지 약 $6x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0081] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 약 $5x10^{11}$ vg/kg 또는 약 $1x10^{12}$ vg/kg의 용량으로 투여되고, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 주 또는 개월 동안 평균 약 12% 내지 약 100% 활성의 수준으로 인간에서 생성된다.

[0082] 방법 및 용도에 따른 인간은 혈청 음성이거나 검출 가능한 AAV 항체를 갖지 않는 사람을 포함한다.

[0083] 특정 구현예에서, 인간에서의 AAV 항체는 rAAV 벡터 투여 전에 검출되지 않거나, 상기 인간은 AAV에 대해 혈청 음성이다.

[0084] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD에 대한 AAV 항체는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11개월 또는 그 초과 동안 검출되지 않는다.

[0085] 특정 구현예에서, rAAV 벡터에 대한 AAV 항체는 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 14일 동안, 또는 적어도 약 21일 동안, 또는 적어도 약 28일 동안, 또는 적어도 약 35일 동안, 또는 적어도 약 42일 동안, 또는 적어도 약 49일 동안, 또는 적어도 약 56일 동안, 또는 적어도 약 63일 동안, 또는 적어도 약 70일 동안, 또는 적어도 약 77일 동안, 또는 적어도 약 84일 동안, 또는 적어도 약 91일 동안, 또는 적어도 약 98일 동안, 또는 적어도 약 105일 동안, 또는 적어도 약 112일 동안 검출되지 않는다.

[0086] 방법 및 용도에 따른 인간은 검출 가능한 AAV 항체를 갖는 사람을 포함한다.

[0087] 특정 구현예에서, 인간에서의 AAV 항체는 rAAV 벡터 투여 전에 약 1:5 이하로 존재한다.

[0088] 특정 구현예에서, 인간에서의 AAV 항체는 rAAV 벡터 투여 전에 약 1:3 이하로 존재한다.

[0089] 특정 방법 및 용도에서, rAAV 벡터가 투여된 인간은 rAAV 벡터에 대한 세포 매개 면역 반응을 생성하지 않는다.

[0090] 특정 구현예에서, rAAV 벡터가 투여된 인간은 rAAV 벡터 투여 후 적어도 연속 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14주 또는 개월 동안 rAAV 벡터에 대한 세포 매개 면역 반응을 생성하지 않는다.

[0091] 특정 구현예에서, rAAV 벡터가 투여된 인간은 FVIII 또는 hFVIII-BDD 치료 효과를 감소시키거나 차단하기에 충분한 rAAV 벡터에 대한 체액성 면역 반응을 발생시키지 않는다.

[0092] 특정 구현예에서, rAAV 벡터가 투여된 인간은 rAAV 벡터 투여 후 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 동안 rAAV 벡터에 대한 검출 가능한 항체를 생성하지 않는다.

[0093] 특정 구현예에서, rAAV 벡터가 투여된 인간은 rAAV 벡터 투여 전, 동안 및/또는 후에 면역억제제가 투여되지 않는다.

[0094] 특정 구현예에서, rAAV 벡터가 투여된 인간에서, 상기 인간에서 발현된 rAAV 벡터 FVIII 또는 hFVIII-BDD는 면역억제제를 투여하지 않고 달성된다.

[0095] 미리 존재하거나 rAAV 벡터 투여 후 발생하는 면역 반응의 경우, rAAV 벡터 투여 전 또는 후에 면역억제제가 인간에게 투여될 수 있다.

[0096] 특정 구현예에서, 방법 또는 용도는 rAAV 벡터의 투여 전에 면역억제제를 투여하는 것을 포함한다.

[0097] 특정 구현예에서, 방법 또는 용도는 rAAV 벡터의 투여 후에 면역억제제를 투여하는 것을 포함한다.

[0098] 특정 구현예에서, 면역억제제는 rAAV 벡터가 투여된 후 1시간 내지 최대 45일 내의 기간으로부터 투여된다.

[0099] 특정 구현예에서, 면역억제제는 스테로이드, 사이클로스포린(예를 들어, 사이클로스포린 A), 미코페놀레이트, 리툭시맙 또는 이들의 유도체를 포함한다.

[0100] 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 90-95%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 95-100%의 서열 동일성을 갖는다.

[0101] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 변이체는 FVIII를 인코딩하는 야생형 핵산에 비해 감소된 CpG 함량을 갖는다. 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 FVIII(SEQ ID NO:19)를 인코딩하는 야생형 핵산보다 적어도 20개 적은 CpG를 갖는다. 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 10개 이하의 CpG를 갖거나, 9개 이하의 CpG를 갖거나, 8개 이하의 CpG를 갖거나, 7개 이하의 CpG를 갖거나, 6개 이하의 CpG를 갖거나, 5개 이하의 CpG를 갖거나, 4개 이하의 CpG를 갖거나, 3개 이하의 CpG를 갖거나, 2개 이하의 CpG를 갖거나, 1개 이하의 CpG를 갖는다. 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 최대 4개의 CpG, 3개의 CpG, 2개의 CpG, 또는 1개의 CpG를 갖는다. 특정 구현예에서, 핵산 변이체는 CpG를 갖지 않는다. 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 변이체가 20개 이하, 15개 이하, 또는 10개 이하의 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(CpG)를 갖는다.

[0102] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 변이체는 FVIII를 인코딩하는 야생형 핵산에 비해 감소된 CpG 함량을 가지며, 상기 CpG 감소된 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, CpG 감소된 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, CpG 감소된 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 90-95%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, CpG 감소된 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것과 95-100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, FVIII 인코딩 CpG 감소된 핵산 변이체는 SEQ ID NO:1-18 중 임의의 것에 기재되어 있다.

[0103] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 핵산 변이체는 야생형 인간 FVIII 핵산 또는 B 도메인 결실을 포함하는 야생형 인간 FVIII 핵산과 적어도 75% 동일하다. 특정 구현예에서, FVIII 단백질을 인코딩하는 핵산 변이체는 야생형 인간 FVIII 핵산 또는 B 도메인 결실을 포함하는 야생형 인간 FVIII 핵산과 약 75-95% 동일(예를 들어, 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 동일)하다.

[0104] 특정 구현예에서, FVIII 단백질을 인코딩하는 핵산 및 변이체는 포유동물, 예를 들어, 인간 핵산 및 변이체이다. FVIII 단백질을 인코딩하는 상기 포유동물 핵산 및 핵산 변이체는 인간 야생형 FVIII 또는 B 도메인 결실을 포함하는 인간 야생형 FVIII를 기초로 할 수 있는 인간 형태를 포함한다.

[0105] 특정 구현예에서, 재조합 아데노바이러스-관련 바이러스(sAAV) 벡터는 AAV 벡터를 포함하고, AAV 혈청형 또는 AAV 유사형(pseudotype), 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV를 포함한다. 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 SEQ ID No:1-18 중 임의의 것을 포함하거나, SEQ ID NO: 23 또는 24를 포함한다.

[0106] 특정 구현예에서, 발현 조절 요소는 항시적 또는 조절 가능한 조절 요소, 또는 조직-특이적 발현 조절 요소 또는 프로모터를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현 조절 요소는 간에서 발현을 부여하는 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현 조절 요소는 TTR 프로모터 또는 돌연변이체 TTR 프로모터, 예를 들어, SEQ ID NO:22를 포함한다. 추가 특정 양태에서, 발현 조절 요소는 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 PCT 공보 WO 2016/168728호(USSN 62/148,696호; 62/202,133호; 및 62/212,634호)에 제시된 프로모터를 포함한다.

[0107] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV 혈청형 또는 ITR 혈청형과 상이한 AAV 캡시드 혈청형을 포함하는 AAV 유사형을 포함한다. 추가 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형 중 임의의 것과 75% 이상의 서열 동일성(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 등)을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 서열을 포함한다.

[0108] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 임의의 SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:28과 75% 이상의 서열 동일성(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 등)을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:28과 100% 동일한 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드를 포함한다.

[0109] 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 인트론, 발현 조절 요소, 하나 이상의 AAV 역 말단 반복(ITR)(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형 중 임의의 것, 또는 이들의 조합물), 충전재 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 폴리 A 신호를 추가로 포함한다.

[0110] 특정 구현예에서, 인트론은 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체 내에 있거나 측접하고/하거나, 발현 조절 요소는 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체에 작동 가능하게 연결되고/되거나, AAV ITR(들)은 FVIII를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체의 5' 또는 3' 말단에 측접하고/하거나, 충전재 폴리뉴클레오티드 서열은 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체의 5' 또는 3' 말단에 측접한다.

[0111] 특정 구현예에서, 발현 조절 요소는 항시적 또는 조절 가능한 조절 요소, 또는 조직-특이적 발현 조절 요소 또는 프로모터를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현 조절 요소는 간에서 발현을 부여하는 요소(예를 들어, TTR 프로모터 또는 돌연변이체 TTR 프로모터)를 포함한다.

[0112] 특정 구현예에서, rAAV는 약학적 조성물을 구성한다. 상기 약학적 조성물은 선택적으로 빈 캡시드 AAV(예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD 인코딩 핵산 또는 핵산 변이체를 포함하는 벡터 유전체가 결여됨)를 포함한다.

[0113] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체, 벡터, 발현 벡터, 또는 바이러스 또는 AAV 벡터는 리포솜에 캡슐화되거나, 인지질 또는 마이셀과 혼합된다.

[0114] 본 발명의 방법은 또한 FVIII를 필요로 하거나(불충분한 양의 FVIII 단백질 또는 결함이 있거나 이상이 있는 FVIII 단백질을 생성하는 인간), 혈우병 A를 갖는 인간과 같은 포유동물 대상체(예를 들어, 인간)를 치료하는 것을 포함한다.

[0115] 일 구현예에서, 인간은 불충분한 양의 FVIII 단백질, 또는 결합이 있거나 이상이 있는 FVIII 단백질을 생성한다. 또 다른 구현예에서, 인간은 경증, 중등증 또는 중증 혈우병 A를 갖는다.

[0116] 특정 구현예에서, 투여되는 rAAV 벡터를 통해 발현된 FVIII 또는 hFVIII-BDD는 포유동물에 이로운 또는 치료적 효과를 갖는 수준으로 발현된다.

[0117] FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 포함하는 rAAV의 투여(예를 들어, 전달)를 위한 후보 대상체(예를 들어, 환자) 및 포유동물(예를 들어, 인간)은 혈우병 A, 폰 빌레브란트 질병 및 외상, 손상,

혈전증, 혈소판감소증, 뇌졸중, 응고병증, 파종성 혈관내 응고(DIC) 또는 과-항응고 치료 장애와 관련된 출혈과 같은 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 대상체 및 포유동물을 포함한다.

[0118] FVIII를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체의 투여(예를 들어, 전달)를 위한 후보 대상체(예를 들어, 환자) 및 포유동물(예를 들어, 인간)은 AAV 항체에 대해 혈청 음성인 대상체 및 포유동물뿐만 아니라 AAV 항체를 갖거나 (혈청 양성) AAV 항체가 발생할 위험이 있는 대상체 및 포유동물을 포함한다. 상기 대상체(예를 들어, 환자) 및 포유동물(예를 들어, 인간)은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV-Rh10 또는 AAV-Rh74 혈청형에 대해 혈청 음성이거나 혈청 양성일 수 있다.

[0119] 특정 구현예에서, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV-12, AAV-Rh10 및/또는 AAV-Rh74 혈청형의 빈 캡시드는 단독으로 또는 FVIII를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 포함하는 rAAV 벡터와 조합하여 포유동물 또는 환자에 추가로 투여된다.

[0120] 본 발명에 따른 투여(예를 들어, 전달) 방법은 생체 외 또는 생체 내 임의의 접촉 또는 전달 방식을 포함한다. 특정 구현예에서, 투여(예를 들어, 전달)는 정맥내, 동맥내, 근내, 피하, 공동내, 삽관에 의해, 또는 카테터를 통한 것이다.

[0121] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD는 혈전증의 위험을 실질적으로 증가시키지 않는 수준으로 발현된다.

[0122] 특정 구현예에서, 혈전증 위험은 피브린 분해 생성물을 측정함으로써 결정된다.

[0123] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD의 활성은 인간에서 적어도 1, 2, 3 또는 4주, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 또는 적어도 1년 동안 검출 가능하다. 특정 구현예에서 인간은 적어도 1, 2, 3 또는 4주, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 또는 적어도 1년 동안 자발적 출혈을 나타내지 않는다. 특정 구현예에서 인간은 적어도 1, 2, 3 또는 4주, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 또는 적어도 1년 동안 FVIII 단백질 예방을 필요로 하지 않는다.

[0124] 특정 구현예에서, 인간은 AAV 항체의 존재 또는 양, AAV, FVIII 또는 hFVIII-BDD 항체에 대한 면역 반응, FVIII 또는 hFVIII-BDD에 대한 면역 반응, FVIII 또는 hFVIII-BDD 양, FVIII 또는 hFVIII-BDD 활성, 하나 이상의 간 효소의 양 또는 수준 또는 빈도, 및/또는 출혈 에피소드의 중증도 또는 지속기간 중 하나 이상에 대해 추가로 분석되거나 모니터링된다.

도면의 간단한 설명

[0125] **도 1**은 NHP 연구 계획을 제시한다.

도 2A-2C는 $2x10^{12}$ (A), $5x10^{12}$ (B) 또는 $1x10^{13}$ vg/kg (C)의 AAV-SPK-8005의 정맥내 투여 후 NHP에서의 hFVIII 항원 수준을 제시한다. 선은 개별 동물을 나타낸다. 인간 FVIII 혈장 수준이 ELISA에 의해 검정되었고, 연구 과정 동안 동일한 동물 그룹에서 연속적인 출혈에 의해 획득된 반복 측정을 나타낸다(코호트 당 n=2-3 동물). 비히클 처리된 동물에서 측정된 인간 FVIII 수준은 3개 그래프 모두에서 속이 빈 사각형으로 제시된다.

ε = FVIII에 대한 억제제의 발생.

도 3A-3C는 $2x10^{12}$ (A), $5x10^{12}$ (B) 또는 $1x10^{13}$ vg/kg (C)의 AAV-SPK-8005에서 NHP에서의 ALT 수준을 제시한다.

도 4A-4C는 NHP에서의 D-이량체 수준을 제시한다. $2x10^{12}$ (A), $5x10^{12}$ (B) 또는 $1x10^{13}$ vg/kg (C)의 AAV-SPK-8005의 정맥내 투여 후 NHP의 혈장에서의 D-이량체 항원 농도. 점선은 500 ng/ml를 나타내며, 이는 인간에서 D-이량체에 대한 정상의 상한이다.

도 5는 AAV-SPK-8005의 3회 용량에서의 FVIII 수준의 데이터 개요를 제시한다.

도 6A-6D는 $2x10^{12}$ (A), $6x10^{12}$ (B) 또는 $2x10^{13}$ (vg/kg) (C)의 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII의 정맥내 투여 후 시노몰구스 마카쿠의 혈장에서의 hFVIII의 수준을 제시한다(파일럿 연구). 선은 개별 동물을 나타낸다. hFVIII 혈장 수준이 ELISA에 의해 검정되었고, 연구 과정 동안 동일한 동물 그룹에서 연속적인 출혈에 의해 획득된 반복 측정을 나타낸다(코호트 당 n=3 동물). 비히클 처리된 동물에서 측정된 인간 FVIII 수준은 속이 빈 사각형으로 제시된다(n=2). ε = FVIII에 대한 억제제의 발생이 각각의 개별 동물에서 검출된 시간.

도 7은 SPK-8011의 투여 후 시노몰구스 마카쿠에서의 인간 FVIII 발현 수준을 제시한다. 파일럿 연구(사각형)

및 GLP 연구(원).

도 8은 AAV5 및 AAV8 캡시드를 갖는 AAV 벡터를 통해 전달된 FVIII의 보고된 수준에 대한 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII로 달성된 FVIII 수준의 비교를 제시한다. http://www.biomarin.com/pdf/BioMarin_R&D_Day_4_20_2016.pdf, slide 16. AAV8: McIntosh J et al. Blood 2013; 121(17):3335-44.

도 9는 비-인간 영장류, 주로 신장, 비장 및 간(각각의 조직에 대해 세 번째 막대)에서의 AAV-SPK(SEQ ID NO:28) 및 AAV-LK03(SEQ ID NO:27) 조직 생체분포를 제시한다.

도 10은 AAV-SPK-8005의 마우스로의 전신 투여 후 간 및 비장 FVIII 발현을 제시한다.

도 11은 시험관 내 분석된 AAV-LK03 캡시드의 형질도입 효율을 제시한다. X-축, 시노몰구스(좌측 세로 막대), 인간(우측 세로 막대).

도 12는 SPK-8011의 투여 후 시노몰구스 마카쿠에서의 인간 FVIII 발현 수준이 선형 용량 반응을 따르는 것을 제시한다. 패널 A 및 B는 선형 스케일로 SPK-8011 용량을 제시하는 반면, 패널 C 및 D는 대수 X 축을 사용한다.

도 13은 저용량 및 중간 용량 코호트의 데이터만 이용한 선형 회귀의 분석을 제시한다. 패널 A 및 B는 선형 스케일로 SPK-8011 용량을 제시하는 반면, 패널 C 및 D는 대수 X 축을 사용한다.

도 14는 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 3명의 인간 대상체에서의 FVIII 활성을 제시한다. 대상체 1 및 2(다이아몬드, 원)에 $5x10^{11}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입되었다. 대상체 3(삼각형)에 $1x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입되었다.

도 15는 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 동일한 인간 대상체(대상체 1 및 2, 도 14)에서 치료 수준에서 FVIII 활성의 연장된 발현을 제시한다. 대상체 1 및 2(원, 사각형)에 $5x10^{11}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입되었다.

도 16은 치료 수준의 FVIII를 나타내는 10명의 인간 대상체(대상체 1-10)를 제시한다. 대상체 1은 주입 후 6주에서 응급 치과 추출 후 FVIII를 주입하였다. 그 직후, FVIII는 19% 활성 수준을 기록하였고; FVIII 주입 근접성으로 인해 상기 차트에서 제외하였다. FVIII 활성은 지역 연구소로부터의 FVIII:C 값을 나타낸다.

도 17은 $5x10^{11}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 1에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 말초 혈액 단핵세포(PBMC)의 반응에 관한 인터페론-γ 효소 결합 면역흡착 스폿(ELISPOT) 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC 당 스폿 형성 단위(SFU)의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 18은 $5x10^{11}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 2에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 19는 $1x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 3에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 20은 $1x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 4에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 21은 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 5에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에

관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 22는 $1x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 6에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 23은 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 7에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 24는 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 8에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 25는 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 9에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 26은 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 10에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 27은 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 11에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

도 28은 $2x10^{12}$ vg/kg의 AAV-LK03(FVIII) 벡터가 주입된 대상체 12에서의 FVIII의 치료 수준을 제시한다. 하단 그래프는 AAV 캡시드 펩티드(속이 채워진 막대) 및 FVIII 펩티드(속이 빈 원)에 대한 대상체의 PBMC의 반응에 관한 인터페론-γ ELISPOT 검정의 결과를 제시한다. 결과는 1백만 개의 PBMC당 SFU의 수로 제시되고; 50 SFU를 초과하거나, 중간 대조군(점선)보다 3배 위인 값이 양성으로 간주된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0126] 혈우병 A를 갖거나, 인자 VIII(FVIII)를 필요로 하는 인간을 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 상기 방법은 세포 및/또는 인간에서 발현될 수 있는 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 포함하는 유전체를 갖는 rAAV 벡터를 이용하여 달성될 수 있으며, 이는 차례로 증가된 FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질 수준을 생체 내에서 제공할 수 있다. FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 예시적 핵산 변이체는 참조 야생형 포유동물(예를 들어, 인간) FVIII 또는 hFVIII-BDD와 비교하여 감소된 CpG 및/또는 참조 야생형 포유동물(예를 들어, 인간) FVIII 또는 hFVIII-BDD와 100% 미만의 서열 동일성을 가질 수 있다. 상기 방법은 또한 킬로그램 당 $6x10^{12}$ 미만의 vrAAV 벡터 유전체(vg/kg)의 rAAV 벡터 용량을 투여함으로써 달성될 수 있다. 킬로그램 당 $6x10^{12}$ 미만의 vrAAV 벡터 유전체(vg/kg)의 용량으로 투여된 rAAV 벡터는 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 포함하는 벡터 유전체를 포함할 수 있다.

[0127] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)를 포함하는 모든 형태의 핵산, 올리고뉴클레오티드를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 유전체 DNA, cDNA 및 안티센스 DNA, 및 스프라이싱 및 비스플라이싱 mRNA, rRNA, tRNA 및 억제성 DNA 또는 RNA(RNAi, 예를 들어,

작은 또는 짧은 헤어핀(sh)RNA, 마이크로RNA(miRNA), 작은 또는 짧은 간섭 (si)RNA, 트랜스-스플라이싱 RNA, 또는 안티센스 RNA)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 천연 발생, 합성, 및 의도적으로 변형되거나 변경된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 변이체 핵산)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일, 이중, 또는 삼중, 선형 또는 원형일 수 있고, 임의의 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 논의함에 있어서, 특정 폴리뉴클레오티드의 서열 또는 구조는 5'에서 3' 방향으로 서열을 제공하는 협약에 따라 본원에 기재될 수 있다.

[0128] 본원에서 사용되는 용어 "변형하다" 또는 "변이체" 및 이의 문법적 변형은 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 이의 하위서열이 참조 서열에서 벗어난다는 것을 의미한다. 따라서, 변형 및 변이체 서열은 참조 서열과 실질적으로 동일하거나, 더 크거나, 더 작은 발현, 활성 또는 기능을 가질 수 있으나, 적어도 참조 서열의 부분적 활성 또는 기능을 보유한다. 변형 또는 변이체의 특정 예는 FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산 변이체이다.

[0129] "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드" 변이체는 야생형과 비교하여 유전적으로 변경된 변형된 서열을 나타낸다. 서열은 인코딩된 단백질 서열을 변경시키지 않고 유전적으로 변형될 수 있다. 대안적으로, 서열은 변이체 단백질을 인코딩하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 변이체는 또한 야생형 단백질 서열과 같은 참조 서열에 여전히 적어도 부분적인 서열 동일성을 보유하는 단백질을 인코딩하도록 코돈 변형되고, 또한 변이체 단백질을 인코딩하도록 코돈 변형된 조합 서열을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산 변이체의 일부 코돈은 이에 의해 인코딩된 단백질(FVIII)의 아미노산을 변경시키지 않고 변화될 것이고, 핵산 변이체의 일부 코돈은 변화되고, 이는 차례로 이에 의해 인코딩된 단백질(FVIII)의 아미노산을 변화시킬 것이다.

[0130] 용어 "변이체 인자 VIII(FVIII)"는 변형되지 않은 야생형 FVIII(예를 들어, SEQ ID NO:19) 또는 FVIII-BDD와 비교하여 유전적으로 변경된 변형 FVIII를 나타낸다. 상기 변이체는 "인자 VIII(FVIII)를 인코딩하는 핵산 변이체"로 언급될 수 있다. 변이체의 특정 예는 FVIII 또는 FVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 CpG 감소된 핵산이다. 용어 "변이체"는 FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산에 대해 제조된 참조의 각각의 예에서 나타낼 필요는 없다. 마찬가지로, 용어 "CpG 감소된 핵산" 등은 용어 "변이체"를 생략할 수 있으나, "CpG 감소된 핵산"에 대한 언급은 유전적 수준에서의 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.

[0131] 감소된 CpG 함량을 갖는 FVIII 및 hFVIII-BDD 작제물은 CpG 함량이 감소되지 않은 야생형 FVIII 또는 FVIII-BDD와 비교하여 개선을 나타낼 수 있으며, 인코딩된 FVIII 또는 FVIII-BDD 단백질에 대한 아미노산 변화를 발생시키는 핵산에 대한 변형 없이 그렇게 한다. 발현을 비교하는 경우, CpG 감소된 핵산이 B-도메인을 보유하는 FVIII 단백질을 인코딩하는 경우, 이를 야생형 FVIII 발현과 비교하는 것이 적절하고; CpG 감소된 핵산이 B-도메인 없이 FVIII 단백질을 인코딩하는 경우, 이는 B-도메인 결실을 또한 갖는 야생형 FVIII의 발현과 비교된다.

[0132] "변이체 인자 VIII(FVIII)"는 또한 변형된 단백질이 야생형 FVIII와 비교하여 아미노산 변경을 갖도록 변형된 FVIII 단백질을 의미할 수 있다. 또한, 활성 및/또는 안정성을 비교하는 경우, 인코딩된 변이체 FVIII 단백질이 B-도메인을 보유하는 경우, 이를 야생형 FVIII와 비교하는 것이 적절하고; 인코딩된 변이체 FVIII 단백질이 B-도메인 결실을 갖는 경우, 이는 B-도메인을 결실을 또한 갖는 야생형 FVIII와 비교된다.

[0133] 변이체 FVIII는 B-도메인의 일부를 포함할 수 있다. 따라서, FVIII-BDD는 B-도메인의 일부를 포함한다. 전형적으로, FVIII-BDD에서, 대부분의 B-도메인이 결실된다.

[0134] 변이체 FVIII는 SFSQNPPVLKRHQR(SEQ ID NO:29)로 기재된 "SQ" 서열을 포함할 수 있다. 전형적으로, SQ를 갖는 상기 변이체 FVIII(FVIII/SQ)는 BDD를 가지며, 예를 들어, BD의 적어도 일부 또는 전부가 결실된다. FVIII-BDD와 같은 변이체 FVIII는 "SQ" 서열의 전부 또는 일부, 즉, SEQ ID NO:29의 전부 또는 일부를 가질 수 있다. 따라서, 예를 들어, SQ 서열을 갖는 변이체 FVIII-BDD(SFSQNPPVLKRHQR, SEQ ID NO:29)는 아미노산 서열 SFSQNPPVLKRHQR의 전부 또는 단지 일부를 가질 수 있다. 예를 들어, FVIII-BDD는 포함된 SFSQNPPVLKRHQR의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 따라서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 내부 결실뿐만 아니라 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 아미노- 또는 카르복시 말단 결실을 갖는 SFSQNPPVLKRHQR이 본원에 기재된 변이체 FVIII 단백질에 포함된다. 따라서, 14개의 내부 결실뿐만 아니라 14개의 아미노- 또는 카르복시 말단 결실을 갖는 SFSQNPPVLKRHQR이 본원에 기재된 변이체 FVIII 단백질에 포함된다.

[0135] "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드" 서열에 의해 인코딩된 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"는 천연 발생 야생형 단백질과 마찬가지로 전장 고유(FVIII) 서열뿐만 아니라 하위서열, 변형된 형태 또는 변이체가 고유 전장 단백질의 어느 정도의 기능성을 보유하는 한 기능적 하위서열, 변형된 형태 또는 서열 변이체를 포함한다. 예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 CpG 감소된 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 B-도메인 결실

을 가질 수 있고, 응고 기능을 보유할 수 있다. 본 발명의 방법 및 용도에서, 핵산 서열에 의해 인코딩된 상기 폴리펩티드, 단백질 및 펩티드는 처리된 포유동물에서 결함이 있거나, 발현이 불충분하거나, 부족한 내인성 단백질과 동일할 수 있으나, 동일할 필요는 없다.

[0136] 변형의 비제한적인 예는 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 치환(예를 들어, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-500, 500-750, 750-850개 이상의 뉴클레오티드 또는 잔기)을 포함한다. 핵산 변형의 예는 CpG 감소이다. 특정 구현예에서, FVIII, 예를 들어, 인간 FVIII 단백질을 인코딩하는 CpG 감소된 핵산은 인간 인자 FVIII를 인코딩하는 야생형 서열과 비교하여 10개 이하의 CpG를 갖거나; 인간 인자 FVIII를 인코딩하는 야생형 서열과 비교하여 5개 이하의 CpG를 갖거나; FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산에서 5개 이하의 CpG를 갖는다.

[0137] 아미노산 변형의 예는 참조 서열, 예를 들어, FVIII, 예를 들어, B-도메인 결실을 갖는 FVIII의 보존적 아미노산 치환 또는 결실(예를 들어, 하위서열 또는 단편)이다. 특정 구현예에서, 변형 또는 변이체 서열은 변형되지 않은 서열의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 보유한다.

[0138] 공지되거나 공지되지 않은 본원에 개시된 FVIII 및 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산의 다른 포유동물 형태를 포함하는 단백질을 인코딩하는 핵산의 모든 포유동물 및 비-포유동물 형태가 명백히 포함된다. 따라서, 본 발명은 비-포유동물, 인간이 아닌 포유동물 및 인간으로부터의 유전자 및 단백질을 포함하며, 상기 유전자 및 단백질은 본원에 기재된 FVIII(예를 들어, 인간) 유전자 및 단백질과 실질적으로 유사한 방식으로 기능한다.

[0139] 용어 "벡터"는 핵산의 삽입 또는 혼입에 의해 조작될 수 있는 작은 담체 핵산 분자, 플라스미드, 바이러스(예를 들어, AAV 벡터), 또는 다른 비히클을 나타낸다. 상기 벡터는 유전자 조작(즉, "클로닝 벡터")을 위해, 세포에 폴리뉴클레오티드를 도입/전달하고, 세포 내에서 삽입된 폴리뉴클레오티드를 전사시키거나 번역시키기 위해 사용될 수 있다. "발현 벡터"는 숙주 세포에서의 발현에 요구되는 필요한 조절 영역을 갖는 유전자 또는 핵산 서열을 함유하는 전문화된 벡터이다. 벡터 핵산 서열은 일반적으로 적어도 세포에서의 증식을 위한 복제 기점 및 선택적으로 추가 요소, 예를 들어, 이종성 폴리뉴클레오티드 서열, 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서), 인트론, ITR(들), 선택 가능한 마커(예를 들어, 항생제 내성), 아데닐중합체형성 신호를 함유한다. 상기 세포는 분비 세포일 수 있다.

[0140] 바이러스 벡터는 바이러스 유전체를 포함하는 하나 이상의 핵산 요소로부터 유래되거나 이를 기초로 한다. 특정 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 슈도-타입 렌티바이러스 및 파보바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함한다.

[0141] 재조합 바이러스, 예를 들어, 렌티- 또는 파보바이러스(예를 들어, AAV) 벡터와 같은 벡터의 수식 어구, 뿐만 아니라 재조합 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 같은 서열의 수식 어구로서의 용어 "재조합"은 조성물이 자연에서 일반적으로 발생하지 않는 방식으로 조작(즉, 공학처리)된 것을 의미한다. AAV 벡터와 같은 재조합 벡터의 특정 예는 야생형 바이러스(예를 들어, AAV) 유전체 내에 보통 존재하지 않는 폴리뉴클레오티드가 바이러스 유전체 내에 삽입되는 경우일 것이다. 재조합 폴리뉴클레오티드의 예는 FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질을 인코딩하는 CpG 감소된 핵산이 유전자가 바이러스(예를 들어, AAV) 유전체 내에서 일반적으로 연관되는 5', 3' 및/또는 인트론 영역을 갖거나 갖지 않는 벡터로 클로닝되는 경우일 것이다. 용어 "재조합"은 바이러스 및 AAV 벡터와 같은 벡터뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드와 같은 서열과 관련하여 본원에서 항상 사용되지는 않지만, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 형태가 임의의 상기 누락에도 불구하고 명백히 포함된다.

[0142] 재조합 바이러스 "벡터" 또는 "AAV 벡터"는 바이러스(예를 들어, AAV)로부터 야생형 유전체를 제거하는 분자 방법을 이용하고, FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산과 같은 비-고유 핵산으로 대체함으로써 AAV와 같은 바이러스의 야생형 유전체로부터 유래된다. 전형적으로, AAV에 대해, AAV 유전체의 하나 또는 둘 모두의 역 말단 반복(ITR) 서열이 AAV 벡터에서 유지된다. "재조합" 바이러스 벡터(예를 들어, AAV)는 바이러스(예를 들어, AAV) 유전체로부터 구별되는데, 이는 바이러스 유전체의 전부 또는 일부가 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산과 같은 바이러스(예를 들어, AAV) 유전체 핵산과 관련하여 비-고유 서열로 대체되었기 때문이다. 따라서, 비-고유 서열의 혼입은 바이러스 벡터(예를 들어, AAV)를 "재조합" 벡터로 정의하며, 이러한 경우 AAV는 "rAAV 벡터"로 언급될 수 있다.

[0143] 재조합 벡터(예를 들어, 렌티-, 파보-, AAV) 서열은 패키징될 수 있으며, 이는 생체 외, 시험관 내 또는 생체 내에서 세포의 이후의 감염(형질도입)을 위한 "입자"로 본원에서 언급된다. 재조합 벡터 서열이 AAV 입자로 캡시드화되거나 패키징되는 경우, 입자는 또한 "rAAV"로 언급될 수 있다. 상기 입자는 벡터 유전체를 캡시드화하

거나 패키징하는 단백질을 포함한다. 특정 예로는 바이러스 외피 단백질, 및 AAC의 경우 캡시드 단백질을 포함한다.

[0144] 벡터 "유전체"는 바이러스(예를 들어, AAV) 입자를 형성시키기 위해 궁극적으로 패키징되거나 캡시드화되는 재조합 플라스미드 서열의 일부를 나타낸다. 재조합 플라스미드가 재조합 벡터를 작제하거나 제조하기 위해 사용되는 경우, 벡터 유전체는 재조합 플라스미드의 벡터 유전체 서열에 해당하지 않는 "플라스미드"의 부분을 포함하지 않는다. 이러한 재조합 플라스미드의 비 벡터 유전체 부분은 "플라스미드 백본"으로 언급되며, 이는 증식 및 재조합 바이러스 생성에 필요하나, 바이러스(예를 들어, AAV) 입자로 자체 패키징되거나 캡시드화되지 않는 과정인 플라스미드의 클로닝 및 증폭에 중요하다. 따라서, 벡터 "유전체"는 바이러스(예를 들어, AAV)에 의해 패키징되거나 캡시드화되는 핵산을 나타낸다.

[0145] "트랜스진"은 본원에서 세포 또는 유기체로 의도되거나 도입된 핵산을 편리하게 나타내기 위해 사용된다. 트랜스진은 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 유전자(예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산)과 같은 임의의 핵산을 포함한다.

[0146] 트랜스진을 갖는 세포에서, 트랜스진은 세포의 AAV, "형질도입" 또는 "형질감염"과 같이 벡터에 의해 도입/전달되었다. 용어 "형질도입시키다" 및 "형질감염시키다"는 핵산과 같은 분자의 세포 또는 숙주 유기체로의 도입을 나타낸다. 트랜스진은 수용자 세포의 유전체 핵산에 통합되거나 통합되지 않을 수 있다. 도입된 핵산이 수용자 세포 또는 유기체의 핵산(유전체 DNA)에 통합되면, 이는 상기 세포 또는 유기체 내에서 안정적으로 유지될 수 있고, 수용자 세포 또는 유기체의 자손 세포 또는 유기체에 추가로 전달되거나 유전될 수 있다. 최종적으로, 도입된 핵산은 수용자 세포 도는 숙주 유기체에서 염색체 외적으로 또는 단지 일시적으로 존재할 수 있다.

[0147] "형질도입된 세포"는 트랜스진이 도입된 세포이다. 따라서, "형질도입된" 세포(예를 들어, 포유동물에서, 예를 들어, 세포 또는 조직 또는 기관 세포)는 외인성 분자, 예를 들어, 핵산(예를 들어, 트랜스진)의 세포로의 혼입 후에 세포에서의 유전적 변화를 의미한다. 따라서, "형질도입된" 세포는 외인성 핵산이 도입된 세포 또는 이의 자손이다. 세포(들)는 증식되고, 도입된 단백질이 발현되거나, 핵산이 전사될 수 있다. 유전자 요법 용도 및 방법의 경우, 형질도입된 세포는 대상체에 존재할 수 있다.

[0148] "발현 조절 요소"는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현에 영향을 미치는 핵산 서열(들)을 나타낸다. 프로모터 및 인핸서와 같은 본원에 기재된 바와 같은 발현 조절 요소를 포함하는 조절 요소, AAV 벡터를 포함하는 벡터 서열은 하나 이상의 "발현 조절 요소"를 포함할 수 있다. 전형적으로, 적절한 이종성 폴리뉴클레오티드 전사 및 적절한 경우 번역을 촉진하기 위해 상기 요소가 포함된다(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 인트론에 대한 스플라이싱 신호, mRNA의 인-프레임(in-frame) 번역을 가능하게 하는 유전자의 정확한 판독 프레임의 유지 및 정지 코돈 등). 상기 요소는 전형적으로 "시스 작용" 요소로 언급되는 시스로 작용하나, 트랜스로도 작용할 수 있다.

[0149] 발현 조절은 전사, 번역, 스플라이싱, 메시지 안정성 등의 수준으로 이루어질 수 있다. 전형적으로, 전사를 조절하는 발현 조절 요소는 전사되는 핵산의 5' 말단(즉, "업스트림") 근처에 병렬된다. 발현 조절 요소는 또한 전사되는 서열의 3' 말단(즉, "다운스트림") 또는 전사물 내(예를 들어, 인트론 내)에 위치될 수 있다. 발현 조절 요소는 전사되는 서열에 인접하거나, 심지어 상당한 거리로 전사되는 서열과 떨어진 거리(예를 들어, 폴리뉴클레오티드로부터 1-10, 10-25, 25-50, 50-100, 100 내지 500개 이상의 뉴클레오티드)에 위치될 수 있다. 그럼에도 불구하고, rAAV 벡터와 같은 특정 벡터의 길이 제한으로 인해, 발현 조절 요소는 전형적으로 전사되는 핵산으로부터 1 내지 1000개의 뉴클레오티드 내에 있을 것이다.

[0150] 기능적으로, 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현은 요소(예를 들어, 프로모터)가 핵산의 전사 및 적절하게는 전사물의 번역을 조절하도록 요소에 의해 적어도 부분적으로 조절 가능하다. 발현 조절 요소의 특정 예는 일반적으로 전사되는 서열, 예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산의 5'에 위치되는 프로모터이다. 프로모터는 전형적으로 프로모터가 존재하지 않는 경우에 발현되는 양에 비해 작동 가능하게 연결된 핵산으로부터 발현되는 양을 증가시킨다.

[0151] 본원에서 사용되는 "인핸서"는 이종성 폴리뉴클레오티드에 인접하여 위치되는 서열을 나타낼 수 있다. 인핸서 요소는 전형적으로 프로모터 요소의 업스트림에 위치하나 또한 기능하며, 서열(예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산)의 다운스트림 또는 서열 내에 위치할 수 있다. 그러므로, 인핸서 요소는 FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산의 업스트림 또는 다운스트림의 100개의 염기쌍, 200개의 염기쌍, 또는 300개 이상의 염기쌍에 위치할 수 있다. 인핸서 요소는 전형적으로 프로모터 요소에 의해 제공되는 발현 이상으로 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가시킨다.

[0152] 발현 작제물은 특정 세포 또는 조직 유형에서 발현을 유도하는 역할을 하는 조절 요소를 포함할 수 있다. 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터)는 본원에서 "조직-특이적 발현 조절 요소/프로모터"로 언급되는 특정 조직 또는 세포 유형에서 활성인 것을 포함한다. 조직-특이적 발현 조절 요소는 전형적으로 특정 세포 또는 조직(예를 들어, 간)에서 활성이다. 발현 조절 요소는 전형적으로 특정 세포, 조직 또는 기관에서 활성인데, 이는 이들이 특정 세포, 조직 또는 기관 유형에 고유한 전사 활성제 단백질, 또는 전사 조절인자에 의해 인지되기 때문이다. 상기 조절 요소는 당업자에게 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (1989) 및 Ausubel et al. (1992)] 참조).

[0153] 본 발명의 발현 작제물에서 조직 특이적 조절 요소의 혼입은 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산의 발현을 위한 적어도 부분적 조직 향성을 제공한다. 간에서 활성인 프로모터의 예는 무엇보다도 TTR 프로모터, 인간 알파 1-항트립신(hAAT) 프로모터; 알부민, 문헌[Miyatake, et al. *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997)]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, 문헌[Sandig, et al., *Gene Ther.* 3:1002-9 (1996)]; 알파-태아단백질(AFP), 문헌[Arbuthnot, et al., *Hum. Gene. Ther.*, 7:1503-14 (1996)]이다. 간에서 활성인 인핸서의 예는 아포지질단백질 E(apoE) HCR-1 및 HCR-2이다(Allan et al., *J. Biol. Chem.*, 272:29113-19 (1997)).

[0154] 발현 조절 요소는 또한 많은 상이한 세포 유형에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 편재성 또는 뒤섞인(promiscuous) 프로모터/인핸서를 포함한다. 상기 요소는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터/인핸서 서열, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터/인핸서 서열 및 다양한 포유동물 세포 유형에서 활성인 다른 바이러스 프로모터/인핸서, 또는 자연에 존재하지 않는 합성 요소(예를 들어, 문헌[Boshart et al, *Cell*, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, 세포질 β-액틴 프로모터 및 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0155] 발현 조절 요소는 또한 조절 가능한 방식으로, 즉, 신호 또는 자극이 작동 가능하게 연결된 이종성 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키거나 감소시키는 방식으로 발현을 부여할 수 있다. 신호 또는 자극에 반응하여 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키는 조절 가능한 요소는 또한 "유도성 요소"(즉, 신호에 의해 유도됨)로 언급된다. 특정 예는 호르몬(예를 들어, 스테로이드) 유도성 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 전형적으로, 상기 요소에 의해 부여되는 증가 또는 감소의 양은 존재하는 신호 또는 자극의 양에 비례하고; 신호 또는 자극의 양이 클수록, 발현에서의 증가 또는 감소가 크다. 특정한 비제한적인 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터; 스테로이드 호르몬-유도성 마우스 유암 바이러스(MMTV) 프로모터; T7 중합효소 프로모터 시스템(WO 98/10088); 테트라사이클린-억제성 시스템(Gossen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 89:5547-5551 (1992)); 테트라사이클린-유도성 시스템(Gossen, et al., *Science*. 268:1766-1769 (1995); 또한 문헌[Harvey, et al., *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2:512-518 (1998)] 참조); RU486-유도성 시스템(Wang, et al., *Nat. Biotech*. 15:239-243 (1997) 및 Wang, et al., *Gene Ther*. 4:432-441 (1997)]; 및 라파마이신-유도성 시스템(Magari, et al., *J. Clin. Invest*. 100:2865-2872 (1997); Rivera, et al., *Nat. Medicine*. 2:1028-1032 (1996))을 포함한다. 이러한 상황에서 유용할 수 있는 다른 조절 가능한 조절 요소는 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성기, 발달에 의해 조절되는 것이다.

[0156] 발현 조절 요소는 또한 이종성 폴리뉴클레오티드에 대한 고유 요소(들)를 포함한다. 고유 조절 요소(예를 들어, 프로모터)는 이종성 폴리뉴클레오티드의 발현이 고유 발현을 모방해야 하는 것이 요망되는 경우에 사용될 수 있다. 고유 요소는 이종성 폴리뉴클레오티드의 발현이 시간적 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 사용될 수 있다. 다른 고유 발현 조절 요소, 예를 들어, 인트론, 아데닐중합체형성 부위 또는 코작 컨센서스 서열이 또한 사용될 수 있다.

[0157] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 코딩 서열의 발현에 필요한 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 달성하기 위해 코딩 서열에 대해 적절한 위치에 배치되는 것을 의미한다. 이러한 동일한 정의는 종종 발현 벡터에서 코딩 서열 및 전사 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 및 종결 요소)의 배열에 적용된다. 이러한 정의는 또한 때때로 하이브리드 핵산 분자가 생성되는 제1 및 제2 핵산 분자의 핵산 서열의 배열에 적용된다.

[0158] 핵산과 작동 가능하게 연결된 발현 조절 요소의 예에서, 조절 요소가 핵산의 발현을 조절하는 관계가 존재한다. 더욱 특히, 예를 들어, 작동 가능하게 연결된 2개의 DNA 서열은 2개의 DNA가 DNA 서열 중 적어도 하나가 다른 서열에 대해 생리학적 효과를 발휘할 수 있는 관계가 되도록 배열(시스 또는 트랜스)되는 것을 의미한다.

[0159] 따라서, 벡터에 대한 추가 요소는 발현 조절(예를 들어, 프로모터/인핸서) 요소, 전사 종결 신호 또는 정지 코돈, 서열에 측접한 5' 또는 3' 비번역 영역(예를 들어, 아데닐중합체형성(폴리A) 서열), 예를 들어, AAV ITR 서

열의 하나 이상의 카피, 또는 인트론을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0160] 추가 요소는, 예를 들어, 패키징을 개선시키고, 오염 핵산의 존재를 감소시키기 위한, 예를 들어, 충전재(filler) 또는 스터퍼(stuffer) 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. AAV 벡터는 일반적으로 약 4 kb 내지 약 5.2 kb, 또는 약간 더 큰 크기 범위를 갖는 DNA의 삽입물을 전형적으로 수용한다. 따라서, 더 짧은 서열에 대해, 바이러스 입자로의 AAV 벡터 패키징에 대해 허용 가능한 바이러스 유전체 서열의 정상 크기이거나 이에 가까운 길이로 조절하기 위해 스터퍼 또는 충전재를 포함시킨다. 다양한 구현예에서, 충전재/스터퍼 핵산 서열은 핵산의 비번역(비-단백질 인코딩) 세그먼트이다. 4.7 Kb 미만의 핵산 서열에 대해, 충전재 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 서열과 조합(예를 들어, 벡터로 삽입)되는 경우에 약 3.0 내지 5.5Kb, 또는 약 4.0 내지 5.0Kb, 또는 약 4.3 내지 4.8Kb의 전체 길이를 갖는 길이를 갖는다.

[0161] 인트론은 또한 바이러스 입자 내로의 AAV 벡터 패키징을 위한 길이를 달성하기 위해 충전재 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 기능할 수 있다. 충전재 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 기능하는 인트론 및 인트론 단편은 또한 발현을 향상시킬 수 있다.

[0162] 어구 "지혈 관련 장애"는 출혈 장애, 예를 들어, 혈우병 A, 억제 항체, 응고 인자 VII, VIII, IX 및 X, XI, V, XII, II, 폰 빌레브란트 인자의 결핍, 조합된 FV/FVIII 결핍, 비타민 K 에폭시드 환원효소 C1 결핍, 감마-카르복실라제 결핍; 외상, 손상, 혈전증, 혈소판감소증, 뇌졸중, 응고병증, 파종성 혈관내 응고(DIC)와 관련된 출혈; 헤파린, 저분자량 헤파린, 오당류, 와파린, 소분자 항혈전제(즉, FXa 억제제)와 관련된 과-항응고; 및 혈소판 장애, 예를 들어, 버나드 슐리어 증후군(Bernard Soulier syndrome), 글란즈만 혈소판무력증(Glanzman thromblastemia), 및 저장 풀 결핍(storage pool deficiency)을 갖는 혈우병 A 환자를 나타낸다.

[0163] 조성물의 수식어구로 사용되는 경우 용어 "분리된"은 조성물이 사람의 손에 의해 제조되거나, 자연적으로 발생하는 생체 내 환경으로부터 완전히 또는 적어도 부분적으로 분리됨을 의미한다. 일반적으로, 분리된 조성물은 이들이 일반적으로 자연적으로 관련하는 하나 이상의 물질, 예를 들어, 하나 이상의 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 세포막을 실질적으로 비함유한다.

[0164] 본 발명의 핵산과 관련하여, 용어 "분리된"은 핵산 분자가 유래되는 유기체의 자연 발생 유전체(유전체 DNA)에서 바로 인접한(5' 및 3' 방향으로) 하나 이상의 서열로부터 분리된 핵산 분자를 나타낸다. 예를 들어, "분리된 핵산"은 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터에 삽입되거나, 원핵생물 또는 진핵생물의 DNA에 통합된 DNA 또는 cDNA 분자를 포함할 수 있다.

[0165] 본 발명의 RNA 분자와 관련하여, 용어 "분리된"은 주로 상기 정의된 바와 같이 분리된 DNA 분자에 의해 인코딩된 RNA 분자를 나타낸다. 대안적으로, 상기 용어는 "실질적으로 순수한" 형태(용어 "실질적으로 순수한"은 하기에 정의됨)로 존재하도록 고유 상태와 연관된(즉, 세포 또는 조직에서) RNA 분자로부터 충분히 분리된 RNA 분자를 나타낼 수 있다.

[0166] 단백질과 관련하여, 용어 "분리된 단백질" 또는 "분리되고 정제된 단백질"이 때때로 본원에서 사용된다. 이러한 용어는 주로 분리된 핵산 분자의 발현에 의해 생성된 단백질을 나타낸다. 대안적으로, 상기 용어는 "실질적으로 순수한" 형태로 존재하기 위해 자연적으로 연관될 다른 단백질로부터 충분히 분리된 단백질을 나타낼 수 있다.

[0167] 용어 "분리된"은 사람의 손에 의해 생성된 조합, 예를 들어, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 또는 벡터 유전체 및 약학적 제형을 패키징하거나 캡시드화하는 바이러스 입자를 배제하지 않는다. 용어 "분리된"은 또한 하이브리드/키메라, 다량체/올리고머, 변형(예를 들어, 인산화, 당화, 지질화) 또는 유도체화된 형태, 또는 사람의 손에 의해 생성된 숙주 세포에서 발현된 형태와 같은 조성물의 대안적인 물리적 형태를 배제하지 않는다.

[0168] 용어 "실질적으로 순수한"은 관심 화합물(예를 들어, 핵산, 올리고뉴클레오티드, 단백질 등)을 적어도 50-60 중량%로 포함하는 제조물을 나타낸다. 제조물은 적어도 75 중량%, 또는 약 90-99 중량%의 관심 화합물을 포함할 수 있다. 순도는 관심 화합물에 적절한 방법(예를 들어, 크로마토그래피 방법, 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, HPLC 분석 등)에 의해 측정된다.

[0169] 특정 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 언급하는 경우 어구 "~를 필수적으로 포함하는"은 제공된 SEQ ID NO의 특성을 갖는 서열을 의미한다. 예를 들어, 아미노산 서열과 관련하여 사용되는 경우, 상기 어구는 서열 자체 및 서열의 기본 및 신규 특징에 영향을 미치지 않는 분자 변형을 포함한다.

[0170] 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드"는 프라이머 및 프로브를 나타내고, 2개 이상의 리보- 또는 데옥시리보뉴클레오티드, 예를 들어, 3개 초과로 구성된 핵산 분자로서 정의된다. 올리고뉴클레오티드의 정확한 크

기는 다양한 인자 및 올리고뉴클레오티드가 사용되는 특정 적용에 의존할 것이다.

[0171] 본원에서 사용되는 용어 "프로브"는 프로브와 상보적인 서열을 갖는 핵산과 함께 어닐링될 수 있거나 이에 특이적으로 하이브리드화될 수 있는, 정제된 제한 효소 분해물에서와 같이 자연 발생하거나 합성적으로 생성된 RNA 또는 DNA인 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산을 나타낸다. 프로브는 단일-가닥이거나 이중-가닥일 수 있다. 프로브의 정확한 길이는 온도, 프로브 공급원 및 사용 방법을 포함하는 많은 요인에 좌우될 것이다. 예를 들어, 진단 적용의 경우, 표적 서열의 복잡성에 따라, 올리고뉴클레오티드 프로브는 전형적으로 15-25개 이상의 뉴클레오티드를 함유하나, 이는 더 적은 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0172] 본원의 프로브는 특정 표적 핵산 서열의 상이한 가닥에 "실질적으로" 상보적인 것으로 선택된다. 이는 프로브가 일련의 소정의 조건하에서 각각의 표적 가닥과 "특이적으로 하이브리드화"되거나 어닐링될 수 있도록 충분히 상보적이어야 하는 것을 의미한다. 따라서, 프로브 서열은 표적의 정확한 상보적 서열을 반영할 필요는 없다. 예를 들어, 비-상보적인 뉴클레오티드 단편은 프로브의 5' 또는 3' 말단에 부착될 수 있으며, 프로브 서열의 나머지는 표적 가닥에 상보적이다. 대안적으로, 프로브 서열이 표적 핵산과 특이적으로 어닐링되도록 표적 핵산의 서열과 충분한 상보성을 갖는 한, 비-상보적인 염기 또는 더 긴 서열이 프로브에 산재될 수 있다.

[0173] 용어 "특이적으로 하이브리드화되는"은 당 분야에서 일반적으로 사용되는 소정의 조건하에서 상기 하이브리드화를 허용하는 충분히 상보적(때때로, "실질적으로 상보적인"으로 언급됨)인 서열의 2개의 단일 가닥 핵산 분자 사이의 연관을 나타낸다. 특히, 상기 용어는 본 발명의 단일-가닥 DNA 또는 RNA 분자 내에 함유된 실질적으로 상보적인 서열과 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화, 비-상보적 서열의 단일 가닥 핵산과 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화의 실질적 배제를 나타낸다.

[0174] 본원에서 사용되는 용어 "프라이머"는 적절한 환경에 배치되는 경우 주형-의존성 핵산 합성의 개시제로서 기능적으로 작용할 수 있는 생물학적 시스템으로부터 유래되거나, 제한 효소 절단에 의해 생성되거나, 합성에 의해 생성된 단일-가닥 또는 이중-가닥의 RNA 또는 DNA인 올리고뉴클레오티드를 나타낸다. 적절한 핵산 주형, 핵산의 적합한 뉴클레오시드 트리포스페이트 전구체, 중합효소, 적합한 보조인자 및 적합한 온도 및 pH와 같은 조건이 제시되는 경우, 프라이머는 중합효소의 작용 또는 유사한 활성에 의한 뉴클레오티드의 첨가에 의해 이의 3' 말단에서 연장되어 프라이머 연장 생성물을 생성시킬 수 있다.

[0175] 프라이머는 특정 조건 및 적용 요건에 따라 길이가 달라질 수 있다. 예를 들어, 진단 적용에서, 올리고뉴클레오티드 프라이머는 전형적으로 15-25개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 프라이머는 원하는 연장 생성물의 합성을 프라이밍하기 위해, 즉, 중합효소 또는 유사한 효소에 의한 합성의 개시에서 사용하기 위해 적절한 근접위치에서 프라이머의 3' 하이드록실 모이어티를 제공하기에 충분한 방식으로 원하는 주형 가닥과 함께 어닐링될 수 있도록 원하는 주형과 충분한 상보성을 가져야 한다. 프라이머 서열이 원하는 주형의 정확한 상보체를 나타낼 필요는 없다. 예를 들어, 비-상보적 뉴클레오티드 서열은 다른 상보적 프라이머의 5' 말단에 부착될 수 있다. 대안적으로, 비-상보적 염기는 프라이머 서열이 원하는 주형 가닥의 서열과 충분한 상보성을 가져 연장 생성물의 합성을 위한 주형-프라이머 복합체를 기능적으로 제공하는 한 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 내에 산재될 수 있다.

[0176] 용어 "동일성", "상동성" 및 이의 문법적 변형은 2개 이상의 언급된 존재물이 "정렬된" 서열일 때 동일한 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 2개의 폴리펩티드 서열이 동일한 경우, 이들은 적어도 언급된 영역 또는 부분 내에서 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 2개의 폴리뉴클레오티드 서열이 동일한 경우, 이들은 적어도 언급된 영역 또는 부분 내에서 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는다. 동일성은 서열의 정의된 부위(영역 또는 도메인)에 걸쳐 존재할 수 있다. 동일성의 "부위" 또는 "영역"은 동일한 2개 이상의 언급된 존재물의 일부를 나타낸다. 따라서, 2개의 단백질 또는 핵산 서열이 하나 이상의 서열 부위 또는 영역에 걸쳐 동일한 경우, 이들은 그 영역 내에서 동일성을 공유한다. "정렬된" 서열은 참조 서열에 비해 누락되거나 추가의 염기 또는 아미노산(갭)에 대한 보정을 종종 함유하는 다수의 폴리뉴클레오티드 또는 단백질(아미노산) 서열을 나타낸다.

[0177] 동일성은 서열의 전체 길이 또는 일부에 걸쳐 연장될 수 있다. 특정 구현예에서, 동일성 백분율을 공유하는 서열의 길이는 2, 3, 4, 5개 이상의 연속 핵산 또는 아미노산, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 등의 연속 핵산 또는 아미노산이다. 추가 구현예에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 21개 이상의 연속 핵산 또는 아미노산, 예를 들어, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 등의 연속 핵산 또는 아미노산이다. 추가 구현예에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 41개 이상의 연속 핵산 또는 아미노산, 예를 들어, 42, 43, 44, 45, 45, 47, 48, 49, 50개 등의 연속 핵산 또는 아미노산이다. 또 다른 추가 구현예에서, 서열 공유 동일성의 길이는 50개 이상의 연속 핵산 또는 아미

노산, 예를 들어, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-500, 500-1,000개 등의 연속 핵산 또는 아미노산이다.

[0178] 본원에 기재된 바와 같이, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 변이체와 같은 핵산 변이체는 야생형과 구별될 것이나, B-도메인을 갖거나 B-도메인을 갖지 않는 야생형 FVIII 단백질과 서열 동일성을 나타낼 수 있다. FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산 변이체에서, 뉴클레오티드 서열 수준에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산은 전형적으로 야생형 FVIII 인코딩 핵산과 적어도 약 70% 동일하고, 더욱 전형적으로 약 75% 동일하고, 더욱 더 전형적으로 약 80%-85% 동일할 것이다. 따라서, 예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산은 야생형 FVIII 인코딩 유전자, 또는 서로에 대해, 즉, 본원에 기재된 바와 같이 X01 대 X02, X03 대 X04 등에 대해 75%-85% 동일성을 가질 수 있다.

[0179] 아미노산 서열 수준에서, 변이체 FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질과 같은 변이체는 적어도 약 70% 동일하거나, 더욱 전형적으로 약 75% 동일하거나, 80% 동일하거나, 더욱 더 전형적으로 약 85 동일하거나, 90% 이상 동일할 것이다. 다른 구현예에서, 변이체 FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질과 같은 변이체는 참조 서열, 예를 들어, B-도메인을 갖거나 B-도메인을 갖지 않는 야생형 FVIII 단백질과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는다.

[0180] 동일성을 결정하기 위해, FVIII(예를 들어, FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산)가 B-도메인을 보유하는 경우, 동일성을 야생형 FVIII와 비교하는 것이 적절하다. FVIII(예를 들어, hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산)가 B-도메인 결실을 갖는 경우, B-도메인 결실을 또한 갖는 야생형 FVIII와 동일성을 비교하는 것이 적절하다.

[0181] 용어 "상동성의" 또는 "상동성"은 2개 이상의 언급된 존재물이 제공된 영역 또는 부분에 걸쳐 적어도 부분적 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 상동성 또는 동일성의 "부위, 영역 또는 도메인"은 2개 이상의 언급된 존재물의 일부가 상동성을 공유하거나 동일한 것을 의미한다. 따라서, 2개의 서열이 하나 이상의 서열 영역에 걸쳐 동일한 경우, 이들은 이들 영역 내에서 동일성을 공유한다. "실질적인 상동성"은 분자가 상동성을 공유하는 참조 분자, 또는 참조 분자의 관련/상응 영역 또는 부분의 구조 또는 기능(예를 들어, 생물학적 기능 또는 활성) 중 하나 이상의 적어도 부분적 구조 또는 기능을 갖거나, 갖는 것이 예측되도록 구조적 또는 기능적으로 보존되는 것을 의미한다.

[0182] 2개의 서열 사이의 동일성(상동성)의 정도 또는 "동일성 백분율"은 컴퓨터 프로그램 및/또는 수학적 알고리즘을 이용하여 확인될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 핵산 서열의 비교는 위스콘신 매디슨의 유전학 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)으로부터 이용 가능한 GCG 위스콘신 패키지 버전 9.1을 이용하여 수행된다. 편의를 위해, 상기 프로그램에 의해 지정된 디폴트 파라미터(갭 생성 페널티 = 12, 갭 확장 페널티 = 4)가 서열 동일성을 비교하기 위해 본원에서 사용되도록 의도된다. 대안적으로, 디폴트 파라미터를 갖는 갭 정렬을 이용하는 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)(ncbi.nlm.nih.gov/blast/의 월드 와이드 웹; 문헌[Altschul et al., 1990, J Mol Biol 215:403-410]에서 발견됨)에 의해 제공되는 Blastn 2.0 프로그램은 핵산 서열 및 아미노산 서열 사이의 동일성 및 유사성의 수준을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 폴리펩티드 서열 비교를 위해, BLASTP 알고리즘은 전형적으로 PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 또는 BLOSUM 50과 같은 스코어링 매트릭스와 조합하여 사용된다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3) 및 SSEARCH 서열 비교 프로그램이 또한 동일성의 정도를 정량하기 위해 사용된다(Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85:2444 (1988); Pearson, *Methods Mol Biol*. 132:185 (2000); 및 Smith et al., *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). 들로네(Delaunay)-기반 토폴로지 맵핑을 이용하여 단백질 구조 유사성을 정량하기 위한 프로그램이 또한 개발되었다(Bostick et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 304:320 (2003)).

[0183] 본 발명의 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 및 핵산 변이체를 포함하는 핵산 분자, 발현 벡터(예를 들어, 벡터 유전체), 플라스미드는 재조합 DNA 기술 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 뉴클레오티드 서열 정보의 이용 가능성은 다양한 수단에 의한 본 발명의 분리된 핵산 분자의 제조를 가능하게 한다. 예를 들어, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산 변이체는 세포 발현 또는 시험관 내 번역 및 화학적 합성 기술을 통해 다양한 표준 클로닝, 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 순도는 시퀀싱, 젤 전기영동 등을 통해 결정될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 하이브리드화 또는 컴퓨터-기반 데이터베이스 스크리닝 기술을 이용하여 분리될 수 있다. 상기 기술은 (1) 상동성 뉴클레오티드 서열을 검출하기 위한 프로브와 유전체 DNA 또는 cDNA 라이브러리의 하이브리드화; (2) 예를 들어, 발현 라이브러리를 이용하여 공유된 구조적 특징을 갖는 폴리펩티드를 검출하기 위한 항체 스크리닝; (3) 관심 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 프라이머를 이용한

유전체 DNA 또는 cDNA에 대한 중합효소 연쇄 반응(PCR); (4) 관련 서열의 서열 데이터베이스의 컴퓨터 검색; 및 (5) 공제된 핵산 라이브러리의 차별적 스크리닝을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0184] 본 발명의 핵산은 임의의 편리한 클로닝 벡터에서 DNA로서 유지될 수 있다. 일 구현예에서, 클론은 적합한 E. 콜리 숙주 세포에서 증식되는 플라스미드 클로닝/발현 벡터, 예를 들어, pBluescript(Stratagene, La Jolla, CA)에서 유지된다. 대안적으로, 핵산은 포유동물 세포에서의 발현에 적합한 벡터에 유지될 수 있다. 번역 후 변형이 응고 기능에 영향을 미치는 경우, 핵산 분자는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다.

[0185] FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 및 핵산 변이체는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있는 cDNA, 유전체 DNA, RNA 및 이들의 단편을 포함한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 핵산의 적어도 하나의 서열과 하이브리드화될 수 있는 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드(DNA 또는 RNA의 센스 또는 안티센스 가닥)를 제공한다. 상기 올리고뉴클레오티드는 FVIII 또는 hFVIII-BDD 발현을 검출하기 위한 프로브로서 유용하다.

[0186] 본원에 기재된 것과 같은 벡터(rAAV)는 숙주 세포에서 인코딩된 단백질의 발현을 허용하는 방식으로 위치된 숙주 세포에서의 DNA의 발현에 필요한 조절 요소를 선택적으로 포함한다. 발현에 필요한 상기 조절 요소는 본원에 기재되고 당업자에게 공지된 프로모터 서열, 인핸서 서열 및 전사 개시 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0187] 본 발명의 방법 및 용도는 숙주 세포, 예를 들어, 분열 및/또는 비-분열 세포로 핵산(트랜스진)을 전달(형질도입)하는 것을 포함한다. 본 발명의 핵산, rAAV 벡터, 방법, 용도 및 약학적 제형은 치료 방법으로서 FVIII 또는 hFVIII-BDD를 이를 필요로 하는 대상체에 전달하거나, 투여하거나, 제공하는 방법에서 추가로 유용하다. 이러한 방식으로, 핵산은 전사되고, 단백질은 대상체에서 생체 내에서 생성될 수 있다. 대상체는 FVIII 또는 hFVIII-BDD로부터 이익을 얻을 수 있거나 이를 필요로 할 수 있는데, 이는 대상체가 FVIII의 결핍을 갖거나, 대상체에서의 FVIII의 생성이 치료 방법으로서 또는 달리 일부 치료 효과를 부여할 수 있기 때문이다.

[0188] FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 갖는 유전체를 포함하는 rAAV 벡터는 유전학적 질병, 예를 들어, FVIII 결핍의 치료를 허용한다. 결핍 상태 질병의 경우, 유전자 전달을 사용하여 대체 요법을 위해 정상 유전자를 병에 걸린 조직으로 가져올 뿐만 아니라 안티센스 돌연변이를 이용하여 질병에 대한 동물 모델을 생성시키는 데 사용될 수 있다. 불균형 질병 상태인 경우, 유전자 전달을 사용하여 모델 시스템에서 질병 상태를 생성할 수 있으며, 이는 이후 질병 상태에 대응하기 위한 노력에 사용될 수 있다. 결함을 교정하기 위한 핵산 서열의 부위-특이적 통합의 사용이 또한 가능하다.

[0189] 특정 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 갖는 유전체를 포함하는 rAAV 벡터는, 예를 들어, 혈액 응고 캐스케이드를 조절하는 치료제 및/또는 예방제(단백질 또는 핵산)로서 또는 유전자에서 트랜스진으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인코딩된 FVIII 또는 hFVIII-BDD는 향생형 FVIII와 유사한 응고 활성, 또는 야생형 FVIII에 비해 변경된 응고 활성을 가질 수 있다. 세포 기반 전략은 혈우병 A 환자에서 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 지속적인 발현을 가능하게 한다. 본원에 개시된 바와 같이, FVIII 분자(핵산 및 단백질)의 특정 변형은 핵산 수준에서 증가된 발현, 증가된 응고 활성을 발생시켜 지혈을 효과적으로 개선시킨다.

[0190] 환자로의 FVIII 또는 hFVIII-BDD-인코딩 rAAV 벡터의 투여는 응고 캐스케이드를 변경시키는 역할을 하는 FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질의 발현을 발생시킨다. 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 FVIII 또는 hFVIII-BDD 단백질, 또는 기능적 단편의 발현은 지혈을 증가시킨다.

[0191] rAAV 벡터는 단독으로 또는 지혈을 조절하는 데 유용한 다른 분자와 함께 투여될 수 있다. 본 발명에 따르면, rAAV 벡터 또는 치료제의 조합은 환자에게 단독으로 또는 약학적으로 허용되거나 생물학적으로 상용성인 조성물로 투여될 수 있다.

[0192] "아데노-관련 바이러스"(AAV)는 파보바이러스 계열이다. AAV는 이들이 세포를 침투하고, 핵산/유전 물질을 도입시켜, 핵산/유전 물질이 세포에서 안정적으로 유지될 수 있으므로 유전 요법 벡터로서 유용한 바이러스이다. 또한, 이들 바이러스는 핵산/유전 물질을, 예를 들어, 특정 부위에 도입시킬 수 있다. AAV는 인간에서 병원성 질병과 관련되지 않으므로, rAAV 벡터는 실질적인 AAV 발병기전 또는 질병을 야기시키지 않고 인간 환자에 이종성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 치료 단백질 및 제제)을 전달할 수 있다.

[0193] rAAV 벡터는 분열 및 비-분열 세포를 위한 향성을 포함하여 상기 적용에 대한 다수의 바람직한 특징을 갖는다. 이들 벡터에 대한 초기 임상 경험은 또한 지속된 독성이 없는 것을 나타내었으며, 면역 반응은 최소이거나 검출 가능하지 않았다. AAV는 수용체-매개 세포내이입 또는 트랜스사이토시스에 의해 생체 내 및 시험관 내에서 다양한 세포 유형을 감염시키는 것으로 공지되어 있다. 이들 벡터 시스템은 망막 상피, 간, 골격근, 기도, 뇌, 관절

및 조혈 줄기 세포를 표적으로 하여 인간에서 시험되었다.

[0194] 예를 들어, 원하는 유전자의 다수의 카피 및 그로 인해 상기 유전자의 생성물의 더 많은 양을 제공할 수 있는 rAAV 벡터를 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 개선된 rAAV 벡터 및 이들 벡터를 생성시키기 위한 방법은 필라델피아 소아 병원에서 임상 등급 벡터의 생성에 사용되는 기술인 문헌[Wright J.F. (Hum Gene Ther 20:698-706, 2009)]을 포함하는 다수의 참고문헌, 특허 및 특허 출원에 상세히 기재되어 있다.

[0195] 따라서, 본 발명은 rAAV 벡터를 통한 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 전달을 위한 vir 방법(virmethod)을 제공한다. 예를 들어, 재조합 AAV 벡터는 FVIII를 인코딩하는 핵산 변이체를 포함할 수 있으며, 여기서 인코딩된 FVIII 단백질은 선택적으로 B-도메인 결실을 갖는다. 따라서, 대상체(예를 들어, 포유동물)로의 rAAV 벡터 전달 또는 투여는 포유동물(예를 들어, 인간)과 같은 대상체에 FVIII를 제공한다.

[0196] 벡터의 직접 전달 또는 인간 세포의 생체 외 형질도입 후 신체로의 주입은 FVIII 또는 hFVIII-BDD 발현을 발생시켜 지혈에 이로운 치료 효과를 발휘할 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 인자 VIII의 상황에서, 상기 투여는 응고-촉진 활성을 향상시킨다.

[0197] AAV 벡터는 전형적으로 발병기전과 관련된 바이러스 유전자를 포함하지 않는다. 상기 벡터는 전형적으로 전체적으로 또는 부분적으로 결실된 하나 이상의 야생형 AAV 유전자, 예를 들어, rep 및/또는 cap 유전자를 가지나, 재조합 벡터의 구조, 복제, 및 AAV 벡터 입자로의 패키징에 필요한 적어도 하나의 기능성 측접 ITR 서열을 보유한다. 예를 들어, 벡터의 필수 부분, 예를 들어, ITR 요소만이 각각 포함된다. 따라서, AAV 벡터 유전체는 복제 및 패키징을 위해 시스(cis)로 필요한 서열(예를 들어, 기능성 ITR 서열)을 포함한다.

[0198] 재조합 AAV 벡터뿐만 아니라 이의 방법 및 용도는 임의의 바이러스 균주 또는 혈청형을 포함한다. 비제한적인 예로서, 재조합 AAV 벡터는, 예를 들어, AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -rh74, -rh10 또는 AAV-2i8과 같은 임의의 AAV 유전체를 기초로 할 수 있다. 상기 벡터는 동일한 균주 또는 혈청형(또는 서브그룹 또는 변이체)을 기초로 할 수 있거나, 서로 상이할 수 있다. 비제한적인 예로서, 하나의 혈청형 유전체를 기초로 하는 재조합 AAV 벡터는 벡터를 패키징하는 캡시드 단백질 중 하나 이상과 동일할 수 있다. 또한, 재조합 AAV 벡터 유전체는 벡터를 패키징하는 하나 이상의 AAV 캡시드 단백질과 구별되는 AAV(예를 들어, AAV2) 혈청형 유전체에 기초할 수 있다. 예를 들어, AAV 벡터 유전체는 AAV2에 기초할 수 있는 반면, 3개의 캡시드 단백질 중 적어도 하나는, 예를 들어, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 또는 이들의 변이체일 수 있다.

[0199] 특정 구현예에서, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터는, 예를 들어, WO 2013/158879호(국제 출원 PCT/US2013/037170호), WO 2015/013313호(국제 출원 PCT/US2014/047670호) 및 US 2013/0059732호(미국 특허 번호 9,169,299호, LK01, LK02, LK03 등을 개시함)에 기재된 바와 같은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8뿐만 아니라 이들의 변이체(예를 들어, 캡시드 변이체, 예를 들어, 아미노산 삽입, 첨가, 치환 및 결실)를 포함한다.

[0200] AAV 변이체는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8 캡시드의 변이체 및 키메라를 포함한다. 따라서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 포함하는(캡시드화하거나 패키징하는) AAV 벡터 및 AAV 변이체(예를 들어, 캡시드 변이체).

[0201] AAV 및 AAV 변이체(예를 들어, 캡시드 변이체) 혈청형(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)은, 예를 들어, AAV1-AAV12, Rh74 또는 Rh10을 포함하는 다른 AAV 혈청형과 구별되거나 구별되지 않을 수 있다(예를 들어, AAV1-AAV12, Rh74 또는 Rh10 혈청형 중 임의의 것의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열과 구별됨).

[0202] 본원에서 사용되는 용어 "혈청형"은 다른 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되는 캡시드를 갖는 AAV를 나타내는데 사용되는 구별법이다. 혈청학적 특이성은 다른 AAV와 비교하여 하나의 AAV에 대한 항체 사이의 교차반응성의 결여를 기초로 하여 결정된다. 상기 교차반응성 차이는 일반적으로 캡시드 단백질 서열/항원 결정인자에서의 차이(예를 들어, AAV 혈청형의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열 차이로 인함)로 인한 것이다. 캡시드 변이체를 포함하는 AAV 변이체가 참조 AAV 또는 다른 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되지 않을 수 있는 가능성에도 불구하고, 이들은 참조 또는 다른 AAV 혈청형과 비교하여 적어도 하나의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기에 의해 상이하다.

[0203] 전통적 정의 하에서, 혈청형은 관심 바이러스가 중화 활성에 대해 모든 현존하고 특성규명된 혈청형에 특이적인 혈청에 대해 시험되었고, 관심 바이러스를 중화시키는 항체가 발견되지 않았음을 의미한다. 더 많은 자연 발생 바이러스 분리물이 발견되고/되거나 캡시드 돌연변이체가 생성됨에 따라, 현존하는 혈청형 중 임의의 혈청형과 혈청학적 차이가 있을 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 따라서, 새로운 바이러스(예를 들어, AAV)가 혈청학적

차이를 갖지 않는 경우, 이러한 새로운 바이러스(예를 들어, AAV)는 상응하는 혈청형의 서브그룹 또는 변이체일 것이다. 많은 경우에, 중화 활성에 대한 혈청학적 시험은 캡시드 서열 변형을 갖는 돌연변이체 바이러스가 전통적인 혈청형 정의에 따라 다른 혈청형인지 결정하기 위해 이들 돌연변이체 바이러스에 대해 아직 수행되지 않았다. 따라서, 편의성 및 반복 회피를 위해, 용어 "혈청형"은 혈청학적으로 구별되는 바이러스(예를 들어, AAV) 뿐만 아니라 제공된 혈청형의 서브그룹 또는 변이체 내에 존재할 수 있는 혈청학적으로 구별되지 않는 바이러스(예를 들어, AAV) 둘 모두를 광범위하게 나타낸다.

[0204] 따라서, AAV 벡터는 특정 혈청형에 특징적인 유전자/단백질 서열과 동일한 유전자/단백질 서열을 포함한다. 본원에서 사용되는 "AAV1과 관련된 AAV 벡터"는 AAV1을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 나타낸다. 유사하게, "AAV8과 관련된 AAV 벡터"는 AAV8을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 나타낸다. "AAV-Rh74와 관련된 AAV 벡터"는 AAV-Rh74를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 나타낸다. 따라서, 또 다른 혈청형, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8과 관련된 상기 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8로부터의 하나 이상의 별개의 서열을 가질 수 있으나, 하나 이상의 유전자 및/또는 단백질과 실질적인 서열 동일성을 나타낼 수 있고/있거나, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8의 하나 이상의 기능적 특징을 가질 수 있다(예를 들어, 세포/조직 향성). 예시적인 비제한적 AAV 변이체는 VP1, VP2, 및/또는 VP3 중 임의의 것의 캡시드 변이체를 포함한다.

[0205] 다양한 예시적 구현예에서, 참조 혈청형과 관련된 AAV 벡터는 하나 이상의 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8(예를 들어, ITR, 또는 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)과 적어도 80% 또는 그 초과(예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등)의 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 이들의 하위서열을 갖는다.

[0206] 본 발명의 조성물, 방법 및 용도는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10 또는 AAV-2i8과 같은 참조 AAV 혈청형과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내지만, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 유전자 또는 단백질 등과 같은 공지된 AAV 유전자 또는 단백질과 상이하고 동일하지 않은 AAV 서열(폴리펩티드 및 뉴클레오티드) 및 이의 하위서열을 포함한다. 일 구현예에서, AAV 폴리펩티드 또는 이의 하위서열은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8(예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 또는 ITR)과 같은 임의의 참조 AAV 서열 또는 이의 하위서열과 적어도 75% 또는 그 초과로 동일하고, 예를 들어, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 및 최대 100% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 특정 구현예에서, AAV 변이체는 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-15, 15-20개 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0207] AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 및 관련된 변이체, 하이브리드 및 키메라 서열을 포함하는 재조합 AAV 벡터는 하나 이상의 기능적 AAV ITR 서열과 측접된 하나 이상의 핵산 서열(트랜스진)을 포함하도록 당업자에게 공지된 재조합 기술을 이용하여 작제될 수 있다.

[0208] 본 발명의 일 구현예에서, FVIII 또는 hFVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 변이체를 포함하는 rAAV 벡터는 생물학적으로 상용성인 담체에서의 주입, 예를 들어, 정맥내 주사를 통해 환자에 투여될 수 있다. rAAV 벡터는 분자의 안정성을 증가시키기 위해 선택적으로 리포솜으로 캡슐화되거나 다른 인지질 또는 마이셀과 혼합될 수 있다.

[0209] 본 발명에 따르면, rAAV 벡터는 단독으로 또는 지혈을 조절하는 것으로 공지된 다른 제제(예를 들어, 인자 V, 인자 Va 또는 이들의 유도체)와 함께 투여될 수 있다.

[0210] 따라서, rAAV 벡터 및 다른 조성물, 제제, 약물, 생물학적 제제(단백질)가 약학적 조성물에 혼입될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 무엇보다도 생체 내 또는 생체 외에서 대상체에 투여 및 전달하는 데 유용하다.

[0211] 특정 구현예에서, 약학적 조성물은 또한 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유한다. 상기 부형제는 조

성물을 투여받는 개체에게 유해한 면역 반응을 자체적으로 유도하지 않고, 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 임의의 약학적 제제를 포함한다.

[0212] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는"은 생물학적으로 허용되는 제형, 기체, 액체 또는 고체 또는 이들의 혼합물을 의미하며, 이는 하나 이상의 투여 경로, 생체 내 전달 또는 접촉에 적합하다. "약학적으로 허용되는" 또는 "생리학적으로 허용되는" 조성물은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않지 않은 물질이며, 예를 들어, 상기 물질은 실질적인 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않으면서 대상체에 투여될 수 있다. 따라서, 상기 약학적 조성물은, 예를 들어, 대상체에 핵산, 벡터, 바이러스 입자 또는 단백질을 투여하는 데 사용될 수 있다.

[0213] 약학적으로 허용되는 부형제는 액체, 예를 들어, 물, 염수, 글리세롤, 당 및 에탄올을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 약학적으로 허용되는 염은 또한, 예를 들어, 광산염, 예를 들어, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트, 설페이트 등; 및 유기산의 염, 예를 들어, 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등을 그 안에 포함할 수 있다. 또한, 보조 물질, 예를 들어, 습윤제 또는 에멀젼화제, pH 완충 물질 등이 이러한 비히클에 존재할 수 있다.

[0214] 약학적 조성물은 염으로 제공될 수 있으며, 염산, 황산, 아세트산, 락트산, 타르타르산, 말산, 숙신산 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 많은 산으로 형성될 수 있다. 염은 상응하는 자유 염기 형태보다 수성 또는 다른 양성자성 용매에 더 가용성인 경향이 있다. 다른 경우에, 제조물은 4.5 내지 5.5의 pH 범위의 1-50 mM 히스티딘, 0.1%-2% 수크로스, 및 2-7% 만니톨 중 임의의 것 또는 모두를 함유할 수 있는 동결건조된 분말일 수 있으며, 이는 사용 전에 완충액과 조합된다.

[0215] 약학적 조성물은 약학적 투여 또는 생체 내 접촉 또는 전달과 상용성인 용매(수성 또는 비수성), 용액(수성 또는 비수성), 에멀젼(예를 들어, 수중유 또는 유중수), 현탁액, 시럽, 엘릭서, 분산액 및 현탁 매질, 코팅, 등장성 및 흡수 촉진 또는 지연제를 포함한다. 수성 및 비수성 용매, 용액 및 현탁액은 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 정제(코팅되거나 비코팅됨), 캡슐(경질 또는 연질), 마이크로비드, 분말, 과립 및 결정을 포함한다. 보충 활성 화합물(예를 들어, 보존제, 항균제, 항바이러스제 및 항진균제)이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0216] 약학적 조성물은 본원에 기재되거나 당업자에게 공지된 바와 같이 특정 투여 또는 전달 경로와 상용되도록 제형화될 수 있다. 따라서, 약학적 조성물은 다양한 경로에 의한 투여에 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함한다.

[0217] 비경구 투여에 적합한 조성물은 활성 화합물의 수성 및 비수성 용액, 현탁액 또는 에멀젼을 포함하며, 상기 제조물은 전형적으로 멸균되고 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 될 수 있다. 비제한적인 예시적 예는 물, 완충 염수, 행크 용액, 링거액, 덱스트로스, 프룩토스, 에탄올, 동물, 식물성 또는 합성 오일을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예를 들어, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 또는 덱스트란을 함유할 수 있다.

[0218] 또한, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 오일 주입 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어, 참기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트 또는 트리글리세라이드, 또는 리포솜을 포함한다. 선택적으로, 현탁액은 또한 적합한 안정화제 또는 화합물의 용해도를 증가시켜 고도로 농축된 용액의 제조를 허용하는 제제를 함유할 수 있다.

[0219] 공용매 및 애쥬번트가 제형에 첨가될 수 있다. 공용매의 비제한적인 예는 하이드록실기 또는 다른 극성 기, 예를 들어, 알콜, 예를 들어, 이소프로필 알콜; 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 글리콜 에테르; 글리세롤; 폴리옥시에틸렌 알콜 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르를 함유한다. 애쥬번트는, 예를 들어, 계면활성제, 예를 들어, 대두 레시틴 및 올레산; 소르비탄 에스테르, 예를 들어, 소르비탄 트리올레에이트; 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다.

[0220] 약학적 조성물이 제조된 후, 이들은 적절한 용기에 넣고, 치료를 위해 라벨링될 수 있다. 상기 라벨링은 양, 빈도, 및 투여 방법을 포함할 수 있다.

[0221] 본 발명의 조성물, 방법 및 용도에 적절한 약학적 조성물 및 전달 시스템은 당 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The

Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; 및 Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315] 참조).

[0222] "유효량" 또는 "충분한 양"은 단일 또는 다중 용량으로, 단독으로 또는 하나 이상의 다른 조성물(치료제 또는 면역억제제, 예를 들어, 약물), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법제와 조합하여 임의의 지속기간(장기 또는 장기)의 검출 가능한 반응, 임의의 지속 기간(예를 들어, 몇 분, 몇 시간, 수 일, 수 개월, 수년 또는 치료됨) 동안 임의의 측정 가능하거나 검출 가능한 정도의 대상체에서의 예상되거나 원하는 결과 또는 대상체에 대한 이점을 제공하는 양을 나타낸다.

[0223] 용량은 상이할 수 있으며, 치료가 지시되는 질병의 유형, 발병, 진행, 중증도, 빈도, 지속 기간, 또는 확률, 원하는 임상 종점, 이전 또는 동시 치료, 대상체의 전반적 건강, 연령, 성별, 인종 또는 면역학적 적격성 및 당업자에 의해 인지될 다른 요인에 좌우될 수 있다. 임의의 불리한 부작용, 합병증 또는 치료 또는 요법의 다른 위험 인자 및 대상체의 상태에 의해 나타난 바와 같이, 용량, 수, 빈도 또는 지속기간은 비례적으로 증가되거나 감소될 수 있다. 당업자는 치료적 또는 예방적 이점을 제공하기에 충분한 양을 제공하는데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 줄 수 있는 요인을 인지할 것이다.

[0224] 치료 효과를 달성하기 위한 용량, 예를 들어, 체중 킬로그램 당 벡터 유전체(vg/kg)의 용량은 투여 경로, 치료 효과를 달성하는 데 필요한 이종성 폴리뉴클레오티드 발현의 수준, 치료되는 특정 질병, 바이러스 벡터에 대한 임의의 숙주 면역 반응, 이종성 폴리뉴클레오티드 또는 발현 생성물(단백질)에 대한 숙주 면역 반응, 및 발현된 단백질의 안정성을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 여러 요인에 기초하여 상이할 것이다. 당업자는 상기 언급된 요인뿐만 아니라 다른 요인에 기초하여 특정 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료하기 위한 rAAV/벡터 유전체 용량 범위를 결정할 수 있다.

[0225] 일반적으로, 용량은 치료 효과를 달성하기 위해 대상체의 체중 킬로그램 당 적어도 1×10^{8}개 또는 그 초과, 예를 들어, 1×10^{9}, 1×10^{10}, 1×10^{11}, 1×10^{12}, 1×10^{13} 또는 1×10^{14}개 이상의 벡터 유전체(vg/kg)의 범위일 것이다. 마우스에서 1×10^{10}-1×10^{11}, 및 개에서 1×10^{12}-1×10^{13} 범위의 AAV 용량이 효과적이었다. 용량은, 예를 들어, 킬로그램 당 6×10^{12}개 미만의 벡터 유전체(vg/kg)의 용량일 수 있다. 보다 구체적으로, 5×10^{11} vg/kg 또는 1×10^{12} vg/kg의 용량.

[0226] 예로서, 일반적으로 말하면, 혈우병 B를 이용하여, 치료 효과를 달성하기 위해, 정상 개체에서 발견되는 인자 농도의 1% 초과인 혈액 응고 인자 농도가 중증의 질병 표현형을 중등증의 것으로 변화시키는데 필요한 것으로 생각된다. 중증 표현형은 관절 손상 및 생명을 위협하는 출혈을 특징으로 한다. 중등증 질병 표현형을 경증의 것으로 전환시키기 위해, 정상의 5% 초과의 혈액 응고 인자 농도가 필요한 것으로 생각된다.

[0227] 정상 인간의 FVIII 수준은 약 150-200 ng/ml 혈장이지만, 더 적거나(예를 들어, 약 100-150 ng/ml의 범위) 더클 수 있고(예를 들어, 약 200-300 ng/ml의 범위), 이는, 예를 들어, 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 1-단계 응고 검정에 의해 결정되는 기능적 응고로 인해 여전히 정상으로 간주된다. 따라서, 치료 효과는 대상체/인간에서의 FVIII의 전체량이 정상 대상체/인간에 존재하는 FVIII의 1%, 예를 들어, 100-300 ng/ml의 1% 초과이도록 하는 FVIII 또는 hFVIII-BDD의 발현에 의해 달성될 수 있다.

[0228] rAAV 벡터 용량은 FVIII 또는 AAV 벡터에 대한 실질적인 면역 반응이 없도록 전형적으로 용량 스펙트럼의 하단에 있는 수준일 수 있다. 보다 구체적으로, 약 $5x10^{11}$ 내지 약 $5x10^{12}$ vg/kg, 또는 보다 구체적으로 약 $5x10^{11}$ vg/kg 또는 약 $1x10^{12}$ vg/kg과 같은 최대 $6x10^{12}$ vg/kg 미만의 용량.

[0229] 비록 질병의 진행 또는 악화를 감소시키거나, 줄이거나, 억제하거나, 억누르거나, 제한하거나, 제어하는 것이 만족스러운 결과이지만, 치료를 위한 "유효량" 또는 "충분한 양"(예를 들어, 개선을 위하거나, 치료 이점 또는 개선을 제공하기 위함)의 용량은 전형적으로 질병의 하나, 다수 또는 모든 유해한 증상, 결과 또는 합병증, 하나 이상의 유해한 증상, 장애, 질병, 병리, 또는, 예를 들어, 질병에 의해 야기되거나 질병과 관련된 합병증에 대한 반응을 측정 가능한 정도로 제공하는데 효과적이다.

[0230] 유효량 또는 충분한 양은 단일 투여로 제공될 수 있으나 반드시 필요하지는 않고, 다수의 투여를 필요로 할 수

있고, 단독으로 또는 또 다른 조성물(예를 들어, 제제), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법과 함께 투여될 수 있으나 반드시 필요하지는 않을 수 있다. 예를 들어, 양은 대상체의 요구, 치료되는 질병의 유형, 상태 및 중증도 또는 치료의 부작용(존재시)에 의해 지시되는 바와 같이 비례적으로 증가될 수 있다. 또한, 유효량 또는 충분한 양은 제2 조성물(예를 들어, 또 다른 약물 또는 제제), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법 없이 단일 또는 다중 용량으로 제공되는 경우 효과적이거나 충분할 필요는 없는데, 제공된 대상체에서 효과적이거나 충분한 것으로 간주되기 위해 상기 용량 이상의 추가 용량, 양 또는 지속기간, 또는 추가 조성물(예를 들어, 약물 또는 제제), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법이 포함될 수 있기 때문이다. 효과적인 것으로 간주되는 양은 또한 응고 장애(예를 들어, 혈우병 A)의 치료를 위한 재조합 응고 인자 단백질(예를 들어, FVIII)의 투여와 같은 또 다른 치료, 치료 요법 또는 프로토콜의 사용의 감소를 발생시키는 양을 포함한다.

[0231] 따라서, 본 발명의 방법 및 용도는 또한 무엇보다도 또 다른 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정 또는 치료법의 감소된 필요성 또는 사용을 발생시키는 방법 및 용도를 포함한다. 예를 들어, 혈액 응고 질병의 경우, 본 발명의 방법 또는 용도는 대상체에서 결핍이 있거나 결함이 있는(비정상 또는 돌연변이체) 내인성 응고 인자를 보충하기 위해 제공된 대상체에서 재조합 응고 인자 단백질의 덜 빈번하거나 감소된 용량 또는 투여의 제거가 존재하는 경우 치료 이점을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따르면, 또 다른 치료 또는 요법의 필요성 또는 사용을 감소시키는 방법 및 용도가 제공된다.

[0232] 유효량 또는 충분한 양은 치료되는 각각의 대상체 및 모든 대상체, 또는 제공된 그룹 또는 집단의 대다수의 치료되는 대상체에서 효과적일 필요는 없다. 유효량 또는 충분한 양은 그룹 또는 일반 집단이 아닌 특정 대상체에서의 효과 또는 충분함을 의미한다. 상기 방법에 대해 전형적인 바와 같이, 일부 대상체는 제공된 치료 방법 또는 용도에 대한 더 큰 반응, 또는 더 적은 반응 또는 무반응을 나타낼 것이다.

[0233] 용어 "개선시키다"는 대상체의 질병 또는 이의 증상, 또는 근본적인 세포 반응에서 검출 가능하거나 측정 가능한 개선을 의미한다. 검출 가능하거나 측정 가능한 개선은 질병, 또는 질병에 의해 야기되거나 질병과 관련된 합병증의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 지속기간에서의 주관적 또는 객관적 축소, 감소, 저해, 억제, 제한 또는 제어, 또는 질병의 증상 또는 근본 원인 또는 결과에서의 개선, 또는 질병의 역전을 포함한다. HemA의 경우, 유효량은, 예를 들어, 대상체에서 급성 출혈 에피소드의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 양, 또는, 예를 들어, 응고 검정에 의해 측정되는 바와 같은 응고 시간을 감소시키는 양일 것이다.

[0234] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 성분이 의도된 치료 목적을 달성하기 위해 유효량으로 함유된 조성물을 포함한다. 치료적으로 유효한 용량을 결정하는 것은 본 발명에 제공된 기술 및 지침을 이용하여 충분히 숙련된 의사의 능력 내에 있다.

[0235] 치료 용량은 다른 요인 중에서 대상체의 연령 및 일반적 상태, 이상 혈액 응고 표현형의 중증도, 및 FVIII의 발현 수준을 조절하는 조절 서열의 강도에 좌우될 것이다. 따라서, 인간에서의 치료적 유효량은 벡터 기반 FVIII 치료에 대한 개별 환자의 반응에 기초하여 의사에 의해 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위에 속할 것이다. 상기 용량은 단독이거나 면역억제제 또는 약물과 조합될 수 있다.

[0236] 약학적 조성물과 같은 조성물은 인자 VIII(FVIII)의 생성을 가능하게 하도록 대상체에 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 수용자가 치료적 유효량의 FVIII 폴리펩티드를 생성할 수 있도록 충분한 유전 물질을 포함하는 약학적 조성물은 대상체의 지혈에 영향을 줄 수 있다.

[0237] 조성물은 단독으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 재조합 AAV 입자는 면역억제제 없이 치료 효과를 제공한다. FVIII의 치료 효과는 선택적으로 면역억제제를 투여함이 없이 일정 기간, 예를 들어, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-14, 14-20, 20-25, 25-30 또는 30-50일 이상, 예를 들어, 50-75, 75-100, 100-150, 150-200일 이상 동안 지속된다. 따라서, 특정 구현예에서, CpG rAAV 바이러스 입자는 일정 기간 동안 면역억제제를 투여함이 없이 치료 효과를 제공한다.

[0238] 조성물은 적어도 하나의 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, rAAV 벡터는 rAAV 벡터를 투여하기 전, 실질적으로 동시 또는 후에 하나 이상의 면역억제제와 함께 투여된다. 특정 구현예에서, 예를 들어, rAAV 벡터를 투여한 후 1-12, 12-24 또는 24-48시간, 또는 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-14, 14-20, 20-25, 25-30, 30-50일, 또는 50일 초과 후. 일정 기간 동안 초기 발현 수준 후, 예를 들어, rAAV 벡터 후 20-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150, 150-200일 또는 200일 초과 후에 FVIII의 감소가 있는 경우, rAAV 벡터를 투여한 후 일정 지간 후에 면역억제제의 상기 투여.

[0239] 특정 구현예에서, 면역억제제는 항염증제이다. 특정 구현예에서, 면역억제제는 스테로이드이다. 특정 구현예에

서, 면역억제제는 사이클로스포린(예를 들어, 사이클로스포린 A), 미코페놀레이트, 리툭시맙 또는 이들의 유도체이다. 추가 특정 제제는 안정화 화합물을 포함한다.

[0240] 조성물은 염수, 완충 염수, 덱스트로스 및 물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 멸균의 생체적합성 약학적 담체 중에서 투여될 수 있다. 조성물은 환자에게 단독으로 또는 지혈에 영향을 미치는 다른 제제(예를 들어, 보조 인자)와 함께 투여될 수 있다.

[0241] 아데노바이러스 벡터의 생성 및 환자로의 투여를 위한 프로토콜은 미국 특허 번호 5,998,205호; 6,228,646호; 6,093,699호; 6,100,242호; 및 국제 특허 출원 번호 WO 94/17810호 및 WO 94/23744호에 기재되어 있으며, 이들은 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 특히, 예를 들어, AAV 벡터는 CpG 감소된 핵산 변이체에 의해 인코딩된 인자 VIII(FVIII)를 이를 필요로 하는 환자에게 전달하기 위해 이용된다.

[0242] 본 발명의 방법 및 용도는 전신, 국부 또는 국소, 또는 임의의 경로, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 전달 및 투여를 포함한다. 생체 내 약학적 조성물의 전달은 일반적으로 통상적인 주사기를 이용한 주사를 통해 달성될 수 있지만, 대류-강화 전달과 같은 다른 전달 방법이 고려된다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,720,720호 참조). 예를 들어, 조성물은 피하, 표피, 피내, 경막내, 안와내, 점막내, 복막내, 정맥내, 흉막내, 동맥내, 경구, 간내, 문맥 경유, 또는 근내 전달될 수 있다. 다른 투여 방식은 경구 및 폐 투여, 좌약 및 경피 적용을 포함한다. 혈액 응고 장애를 갖는 환자의 치료를 전문으로 하는 임상의는 환자의 상태 및 치료 목적(예를 들어, 향상되거나 감소된 혈액 응고)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 기준에 기초하여 아데노바이러스-관련 벡터의 투여를 위한 최적 경로를 결정할 수 있다.

[0243] 본 발명의 방법 및 용도는 원하는 치료적이거나, 이롭거나, 추가적이거나, 상승작용적이거나, 상보적인 활성 또는 효과를 갖는 임의의 화합물, 제제, 약물, 치료 또는 다른 치료 요법 또는 프로토콜과 조합될 수 있다. 예시적인 조합 조성물 및 치료는 제2 활성제, 예를 들어, 생물학적 제제(단백질), 제제(예를 들어, 면역억제제) 및 약물을 포함한다. 상기 생물학적 제제(단백질), 제제, 약물, 치료 및 요법은 본 발명의 임의의 다른 방법 또는 용도, 예를 들어, HemA와 같은 혈액 응고 질병에 대해 대상체를 치료하는 치료 방법 전, 실질적으로 동시 또는 후에 투여되거나 수행될 수 있다.

[0244] 화합물, 제제, 약물, 치료 또는 다른 치료 요법 또는 프로토콜은 조합 조성물로서 투여되거나, 핵산, 벡터, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 또는 재조합 바이러스 입자의 동시 또는 일련의 또는 순차적(전 또는 후) 전달 또는 투여와 같이 개별적으로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법 또는 용도가 본원에 기재되거나 당업자에게 공지된 임의의 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 공정, 치료제 또는 조성물과 조합된 조합을 제공한다. 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 공정, 치료제 또는 조성물은 본 발명의 핵산, 벡터, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 또는 재조합 바이러스 입자의 대상체로의 투여 전, 실질적으로 동시에 또는 후에 투여되거나 수행될 수 있다.

[0245] 본 발명은 인간 및 수의학 적용을 포함하는 동물에서 유용하다. 따라서, 적합한 대상체는 인간과 같은 포유동물뿐만 아니라 비-인간 포유동물을 포함한다. 용어 "대상체"는 동물, 전형적으로 포유동물, 예를 들어, 인간, 비-인간 영장류(유인원, 긴팔원숭이, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 마카쿠), 가축(개 및 고양이), 농장 동물(가금류, 예를 들어, 닭 및 오리, 말, 소, 염소, 양, 돼지) 및 실험 동물(마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그)를 나타낸다. 인간 대상체는 태아, 신생아, 유아, 청소년 및 성인 대상체를 포함한다. 대상체는 동물 질병 모델, 예를 들어, HemA와 같은 혈액 응고 질병의 마우스 및 다른 동물 모델 및 당업자에게 공지된 다른 동물 모델을 포함한다.

[0246] 본 발명에 따른 치료에 적절한 대상체는 기능성 유전자 생성물(예를 들어, FVIII 단백질)의 불충분한 양을 갖거나 불충분한 양을 생성할 위험이 있거나, 이의 결핍을 갖거나, 비정상적, 부분적 기능성 또는 비-기능성 유전자 생성물(예를 들어, FVIII 단백질)을 생성하여 질병을 초래할 수 있는 대상체를 포함한다. 본 발명에 따른 치료에 적절한 대상체는 또한 질병을 발생시키는 비정상 또는 결함이 있는(돌연변이체) 유전자 생성물(단백질)을 갖거나 이를 생성할 위험이 있는 대상체를 포함하며, 비정상 또는 결함이 있는(돌연변이체) 유전자 생성물(단백질)의 양, 발현 또는 기능을 감소시키는 것은 질병의 치료를 발생시키거나, 하나 이상의 증상을 감소시키거나, 질병을 개선시킬 것이다. 따라서, 표적 대상체는 혈우병환자(예를 들어, 혈우병 A)와 같은 비정상이거나, 불충분하거나, 부재하는 혈액 응고 인자 생성을 갖는 대상체를 포함한다.

[0247] 대상체는 면역 반응, 예를 들어, AAV에 대한 항체에 대해 시험될 수 있다. 따라서, 후보 혈우병 대상체는 본 발명의 방법에 따른 치료 전에 스크리닝될 수 있다. 대상체는 또한 치료 후 AAV에 대한 항체에 대해 시험될 수 있고, 선택적으로 치료 후 일정 기간 동안 모니터링될 수 있다. 항체를 발생시키는 대상체는 면역억제제로 처리될

수 있거나, 하나 이상의 추가량의 AAV 벡터가 투여될 수 있다.

[0248] 본 발명에 따른 치료에 적절한 대상체는 또한 AAV에 대항 항체를 갖거나 이를 생성할 위험이 있는 대상체를 포함한다. rAAV 벡터는 몇몇 기술을 이용하여 상기 대상체에 투여되거나 전달될 수 있다. 예를 들어, 빈 캡시드 AAV(즉, FVIII 핵산이 결여된 AAV)는 대상체에서 AAV 항체에 결합하도록 전달됨으로써 FVIII 및 FVIII-BDD를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 변이체를 갖는 AAV 벡터가 대상체의 세포를 형질전환시키는 것을 가능하게 할 수 있다.

[0249] 빈 캡시드 대 rAAV 벡터의 비율은 약 2:1 내지 약 50:1, 또는 약 2:1 내지 약 25:1, 또는 약 2:1 내지 약 20:1, 또는 약 2:1 내지 약 15:1, 또는 약 2:1 내지 약 10:1일 수 있다. 비율은 또한 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 또는 10:1일 수 있다.

[0250] 투여할 빈 캡시드 AAV의 양은 특정 대상체에서 생성된 AAV 항체의 양(역가)을 기초로 하여 보정될 수 있다. 빈 캡시드는 임의의 AAV 혈청형, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8일 수 있다. 빈 캡시드는 투여되는 AAV 벡터와 동일한 혈청형의 빈 캡시드 AAV를 포함하는 것일 수 있다. 빈 캡시드는 LK03 캡시드 또는 SPK 캡시드를 갖는 것일 수 있다.

[0251] 대안적으로 또는 추가로, AAV 벡터는 직접 근내 주사(예를 들어, 근육의 하나 이상의 느린-연축 섬유)에 의해 전달될 수 있다. 또 다른 대안에서, 대퇴 동맥으로 도입된 카테터는 간 동맥을 통해 간으로 AAV 벡터를 전달하는 데 사용될 수 있다. 내시경 역행 담췌관 조영술(ERCP)과 같은 비-수술적 수단이 또한 이용되어 AAV 벡터를 간에 직접 전달함으로써 혈류 및 AAV 항체를 우회할 수 있다. 턱밑샘의 관과 같은 다른 관 시스템이 또한 기존 항-AAV 항체를 발생시키거나 이를 갖는 대상체에 AAV 벡터를 전달하기 위한 문으로서 사용될 수 있다.

[0252] 대상체로의 투여 또는 생체 내 전달은 질병에 의해 야기되거나 이와 관련된 불리한 증상, 상태, 합병증 등의 발생 전에 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물, 방법 및 용도에 대한 후보로서 상기 대상체를 확인하기 위해 스크린(예를 들어, 유전학적)이 이용될 수 있다. 따라서, 상기 대상체는 기능성 유전자 생성물(예를 들어, FVIII 단백질)에서 불충분한 양 또는 결핍에 대해 양성으로 스크리닝되거나, 이상, 부분적 기능성 또는 비-기능성 유전자 생성물(예를 들어, FVIII 단백질)을 생성하는 대상체를 포함한다.

[0253] 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 방법 및 용도에 따른 대상체로의 투여 또는 생체 내 전달은 대상체가 치료를 위해 표적화된 질병을 갖는 것으로 확인되거나, 질병의 하나 이상의 증상을 갖거나, 대상체가 질병의 하나 이상의 증상을 갖지 않더라도 본원에 기재된 바와 같이 양성으로 스크리닝되거나 확인된 후 1-2, 2-4, 4-12, 12-24 또는 24-72시간 이내에 실시될 수 있다. 물론, 본 발명의 방법 및 용도는 대상체가 치료에 대해 표적화된 질병을 갖는 것으로 확인되거나, 질병의 하나 이상의 증상을 갖거나, 본원에 기재된 바와 같이 양성으로 스크리닝되고 확인된 후 1-7, 7-14, 14-21, 21-48 이상의 일, 개월 또는 년 동안 실시될 수 있다.

[0254] 본원에서 사용되는 "단위 투여 형태"는 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위; 하나 이상의 용량으로 투여되는 경우 원하는 효과(예를 들어, 예방 또는 치료 효과)를 생성하도록 계산되는 선택적으로 약학적 담체(부형제, 희석제, 비히클 또는 충전제)와 회합된 소정량을 함유하는 각각의 단위를 나타낸다. 단위 투여 형태는, 예를 들어, 액체 조성물, 또는 동결 건조되거나 동결건조된 상태의 조성물을 포함할 수 있는 앰풀 및 바이알 내에 존재할 수 있고; 예를 들어, 멸균 액체 담체가 생체 내 투여 또는 전달 전에 첨가될 수 있다. 개별 단위 투여 형태는 다중-용량 키트 또는 용기에 포함될 수 있다. 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 재조합 바이러스 입자 및 이의 약학적 조성물은 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단일 또는 다중 단위 투여 형태로 패키징될 수 있다.

[0255] 대상체는 FVIII 및 FVIII-BDD 양 또는 FVIII 및 FVIII-BDD 활성에 대해 시험되어 상기 대상체가 본 발명의 방법에 따른 치료에 적절한지의 여부를 결정할 수 있다. 후보 혈우병 대상체는 본 발명의 방법에 따른 치료 전에 FVIII 및 FVIII-BDD 양 또는 활성에 대해 시험될 수 있다. 대상체는 또한 본 발명의 방법에 따른 치료 후 FVIII 및 FVIII-BDD의 양 또는 FVIII 및 FVIII-BDD 활성에 대해 시험될 수 있다. 상기 치료된 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 1-4주 또는 1-6개월 마다 FVIII 및 FVIII-BDD 양 또는 FVIII 및 FVIII-BDD 활성에 대해 치료 후에 모니터링될 수 있다.

[0256] 대상체는 부작용에 대해, 또는 상기 대상체가 본 발명의 방법에 따른 치료에 적절한지의 여부를 결정하기 위해 하나 이상의 간 효소에 대해 시험될 수 있다. 따라서, 후보 혈우병 대상체는 본 발명의 방법에 따른 치료 전에 하나 이상의 간 효소의 양에 대해 스크리닝될 수 있다. 대상체는 또한 본 발명의 방법에 따른 치료 후 하나 이상의 간 효소의 양에 대해 시험될 수 있다. 상기 치료된 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 1-4주 또는 1-6개월

마다 상승된 간 효소에 대해 치료 후에 모니터링될 수 있다.

[0257] 예시적인 간 효소는 알라닌 아미노트랜스페라제(ALT), 아스파테이트 아미노트랜스페라제(AST) 및 락테이트 데하이드로게나제(LDH)를 포함하나, 간 손상을 나타내는 다른 효소가 또한 모니터링될 수 있다. 순환에서의 이들 효소의 정상 수준은 전형적으로 상위 수준을 갖는 범위로 정의되며, 이를 초과하는 효소 수준은 상승한 것으로 간주되어 이에 따라 간 손상을 나타낸다. 정상 범위는 검정을 수행하는 임상 실험실에서 사용되는 표준에 부분적으로 의존한다.

[0258] 대상체는 출혈 에피소드에 대해 모니터링되어 상기 대상체가 치료에 적격이거나 치료에 반응하는지의 여부, 및/또는 반응의 양 또는 지속기간을 결정할 수 있다. 대상체는 출혈 에피소드에 대해 모니터링되어 상기 대상체가 추가 치료, 예를 들어, 후속 AAV 벡터 투여 또는 면역억제제의 투여, 또는 더욱 빈번한 모니터링을 필요로 하는지의 여부를 결정할 수 있다. 따라서, 혈우병 대상체는 본 발명의 방법에 따른 치료 전 및 후에 출혈 에피소드에 대해 모니터링될 수 있다. 대상체는 또한 본 발명의 방법에 따른 치료 동안 또는 후에 출혈 에피소드의 빈도 및 중증도에 대해 시험될 수 있다.

[0259] 본 발명은 패키징 물질 및 그 안에 하나 이상의 구성요소를 갖는 키트를 제공한다. 키트는 전형적으로 그 안의 구성요소의 시험관 내, 생체 내, 또는 생체 외 사용을 위한 구성요소의 설명 또는 설명서를 포함하는 라벨 또는 패키징 삽입물을 포함한다. 키트는 상기 구성요소, 예를 들어, 핵산, 재조합 벡터, 바이러스(예를 들어, AAV) 벡터, 또는 바이러스 입자 및 선택적으로 제2 활성물질, 예를 들어, 또 다른 화합물, 제제, 약물 또는 조성물의 수집물을 함유할 수 있다.

[0260] 키트는 키트의 하나 이상의 구성요소를 수용하는 물리적 구조를 나타낸다. 패키징 물질은 구성요소를 멸균 상태로 유지할 수 있고, 상기 목적에 일반적으로 사용되는 물질(예를 들어, 종이, 골판지 섬유, 유리, 플라스틱, 호일, 앰풀, 바이알, 튜브 등)로 제조될 수 있다.

[0261] 라벨 또는 삽입물은 키트 내의 하나 이상의 구성요소, 용량, 작용 메커니즘, 약동학 및 약역학을 포함하는 활성 성분(들)의 임상 약리학의 확인 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체, 로트 번호, 제조 위치 및 날짜, 만료 날짜를 확인하는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체 정보, 로트 번호, 제조업체 위치 및 날짜를 확인하는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 키트 구성요소가 사용될 수 있는 질병에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 방법, 용도, 또는 치료 프로토콜 또는 치료 요법에서 키트 구성요소 중 하나 이상을 사용하기 위한 임상의 또는 대상체에 대한 지시사항을 포함할 수 있다. 설명서는 투여량, 빈도 또는 지속기간, 및 본원에 기재된 임의의 방법, 용도, 치료 프로토콜 또는 예방 또는 치료 요법을 실시하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0262] 라벨 또는 삽입물은 예방적 또는 치료적 이점과 같은 구성요소가 제공할 수 있는 임의의 이점에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 특정 조성물을 사용하는 것이 적절하지 않은 상황에 관한 대상체 또는 임상의에 대한 경고와 같은 잠재적인 불리한 부작용, 합병증 또는 반응에 대한 정보를 포함할 수 있다. 대상체가 조성물과 양립할 수 없는 하나 이상의 다른 약물을 복용했거나, 복용할 것이거나, 현재 복용 중인 경우, 또는 대상체가 조성물과 양립하지 않을 또 다른 치료 프로토콜 또는 치료 요법을 받았거나, 받을 것이거나, 현재 받고 있는 경우에 불리한 부작용 또는 합병증이 또한 발생할 수 있으며, 따라서 설명서는 상기 비양립성에 관한 정보를 포함할 수 있다.

[0263] 라벨 또는 삽입물은 구성요소, 키트 또는 패킹 물질(예를 들어, 박스)와 별개이거나 이에 부착되거나, 키트 구성요소를 함유하는 앰풀, 튜브 또는 바이알에 부착된 "인쇄물", 예를 들어, 종이 또는 판지를 포함한다. 라벨 또는 삽입물은 컴퓨터 판독 가능한 매체, 예를 들어, 바코드 인쇄 라벨, 디스크, 광학 디스크, 예를 들어, CD- 또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 전기 저장 매체, 예를 들어, RAM 및 ROM 또는 이들의 하이브리드, 예를 들어, 자기/광학 저장 매체, FLASH 매체 또는 메모리 유형 카드를 추가로 포함할 수 있다.

[0264] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 이용될 수 있으나, 적합한 방법 및 물질이 본원에 기재된다.

[0265] 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 간행물, 및 다른 참고문헌, GenBank 인용 및 ATCC 인용은 이들의 전체내용이 참조로서 포함된다. 상충의 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다.

[0266] 본 발명의 생물학적 분자와 관련된 다양한 용어가 상기 및 또한 명세서 및 청구항 전체에 걸쳐 사용된다.

[0267] 본원에 개시된 특징 모두는 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 명세서에 개시된 각각의 특징은 동일하거나, 동등하거나, 유사한 목적을 위한 대안적인 특징으로 대체될 수 있다. 따라서, 달리 명백히 언급되지 않는 한, 개시된 특징(예를 들어, FVIII를 인코딩하는 CpG 감소된 핵산 변이체, 벡터, 플라스미드, 발현/재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 또는 재조합 바이러스 입자)은 동등하거나 유사한 특징의 종류의 예이다.

[0268] 본원에서 사용되는 바와 같은 단수 형태는 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "핵산"에 대한 언급은 복수의 상기 핵산을 포함하고, "벡터"에 대한 언급은 복수의 상기 벡터를 포함하고, "바이러스" 또는 "입자"에 대한 언급은 복수의 상기 바이러스/입자를 포함한다.

[0269] 본원에서 사용되는 바와 같은 모든 수치 값 또는 수치 범위는 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한 상기 범위 내의 정수 및 범위 내의 값 또는 정수의 분수를 포함한다. 따라서, 예시를 위해, 80% 이상의 동일성에 대한 언급은 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 등, 뿐만 아니라 81.1%, 81.2%, 81.3%, 81.4%, 81.5% 등, 82.1%, 82.2%, 82.3%, 82.4%, 82.5% 등, 및 기타 등등을 포함한다.

[0270] 초과(더 큰) 또는 미만을 갖는 정수에 대한 언급은 언급된 수보다 크거나 적은 임의의 수를 각각 포함한다. 따라서, 예를 들어, 100 미만의 언급은 숫자 1까지 줄곧 내려가는 99, 98, 97 등을 포함하며; 10 미만은 숫자 1까지 줄곧 내려가는 9, 8, 7 등을 포함한다.

[0271] 본원에서 사용되는 바와 같은, 모든 수치 값 또는 범위는 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한 상기 범위 내의 값 및 정수의 분수 및 상기 범위 내의 정수의 분수를 포함한다. 따라서, 예시를 위해, 1-10과 같은 수치 범위에 대한 언급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 뿐만 아니라 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 등, 및 기타 등등을 포함한다. 따라서, 1-50의 범위에 대한 언급은 50을 포함하여 50까지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 등, 뿐만 아니라 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 등, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 등, 및 기타 등등을 포함한다.

[0272] 일련의 범위에 대한 언급은 시리즈 내의 상이한 범위의 경계 값을 조합하는 범위를 포함한다. 따라서, 예시를 위해, 일련의 범위, 예를 들어, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-850의 범위에 대한 언급은 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 50-75, 50-100, 50-150, 50-200, 50-250, 100-200, 100-250, 100-300, 100-350, 100-400, 100-500, 150-250, 150-300, 150-350, 150-400, 150-450, 150-500 등의 범위를 포함한다.

[0273] 본 발명은 일반적으로 다수의 구현예 및 양태를 기재하기 위해 단언적 언어를 이용하여 본원에 개시된다. 본 발명은 또한 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜, 또는 절차와 같은 특정 주제가 전체적으로 또는 부분적으로 배제된 구현예를 특별히 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 특정 구현예 또는 양태에서, 재료 및/또는 방법 단계가 배제된다. 따라서, 비록 본 발명이 일반적으로 본 발명이 포함하지 않은 것과 관련하여 본원에서 표현되지 않더라도, 본 발명에서 명백히 배제되지 않는 양태가 본원에 개시된다.

[0274] 본 발명의 다수의 구현예가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어남이 없이 당업자는 본 발명을 다양한 용도 및 조건에 적합화시키기 위해 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 가할 수 있다. 따라서, 하기 실시예는 예시하기 위한 것으로, 어떠한 방식으로든 청구된 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0275] **실시예 1**

[0276] *CpG 감소된 인자 VIII DNA 서열 및 특정 벡터 작제물, 플라스미드 작제물 및 AAV 벡터 생성 세포주.*

[0277] FVIII를 인코딩하는 18개의 상이한 CpG 감소된 핵산 변이체(SEQ ID NO:1-18)를 생성시키고, 발현 검정에서 평가하였다. 돌연변이체 트랜스티레틴(TTRmut) 프로모터를 갖는 CpG 감소된 인간 FVIII cDNA 작제물을 생성시켰다(SEQ ID NO:22).

[0278] AAV-SPK-8011 발현 카세트는 CpG 감소된 FVIII-X07 핵산 서열 및 패키징을 위한 LK03 캡시드를 갖는다. LK03 캡시드는 비-병원성의 천연의 복제 결함성인 단일-가닥 DNA 바이러스인 AAV3와 실질적으로 상동성을 갖는다.

[0279] 패키징 플라스미드 pLK03은 AAV2 p5 프로모터의 제어 하에 있는 AAV2 Rep 및 AAV-LK03 Cap 유전자, 박테리아 복제 기점 및 박테리아 세포에서 카나마이신에 대한 내성을 부여하는 유전자를 갖는 7,484 bp의 플라스미드 작제물이다. 이러한 작제물에서, 야생형 또는 유사 야생형 AAV 종의 형성 잠재성을 감소시키고, 벡터의 수율을 증

가시키기 위해 p5 rep 프로모터는 cap 유전자의 3'으로 이동되었다.

[0280] 유전자 전달을 위한 클로닝된 DNA는 간-특이적 프로모터의 제어 하에서 인간 응고 인자 VIII(hFVIII)를 인코딩하는 단일-가닥 유전체로서 AAV-LK03 캡시드로 패키징된 유전자 발현 카세트이다. 발현 플라스미드는 pAAV-TTRmut-hFVIII-X07로 언급된다. 이는 TTR 프로모터에서 4 포인트 돌연변이의 도입에 의해 변형되었고, 코딩 영역은 인간 FVIII의 발현을 증가시키도록 최적화되었다. AAV 발현 카세트는 하기 요소를 함유한다:

[0281] ● AAV2 ITR

[0282] ● 트랜스티레틴(TTR) 프로모터: 야생형 프로모터와 비교하여 유전자 발현을 증가시키는 4 포인트 돌연변이를 갖는 간-특이적 트랜스티레틴(TTR) 프로모터 (Costa et al. 1991)

[0283] ● 합성 인트론: 인간 신장 인자 EF-1 알파 유전자로부터 유래됨

[0284] ● FVIII 코딩 서열: B-도메인 결실되고, 코돈-최적화된 인간 FVIII 코딩 서열.

[0285] ● 토끼 베타 글로빈 폴리 A 신호 서열 (Levitt et al. 1989).

[0286] ● AAV2 ITR

[0287] 헬퍼 바이러스가 없는 과정에 의해 SPK-8011 벡터를 생성하기 위해 인간 배아 신장 293 세포를 형질감염시키기 위해 3개의 DNA 플라스미드 작제물이 사용된다(Matsushita et al. 1998):

[0288] ● 유전자 카세트(hFVIII 코딩 서열 및 관련 조절 요소)는 플라스미드로 클로닝되어 벡터 플라스미드, pAAV-TTRmut-hFVIII-X07을 제공한다.

[0289] ● 바이러스 ITR이 결여된 AAV 바이러스 유전체(rep 및 cap)는 플라스미드로 클로닝되어 AAV 패키징 플라스미드인 pLK03를 제공하여 AAV 벡터 패키징을 위한 트랜스(in trans)의 필요한 AAV2 rep 및 AAV-LK03 cap 유전자를 제공한다. rep 유전자에 대한 바이러스 프로모터(p5)를 비-상동성 재조합에 의한 복제 적격 AAV의 형성을 방지하기 위해 플라스미드에 재배치하였다.

[0290] ● 아데노바이러스-2로부터의 3개의 유전자가 제3 플라스미드(pCCVC-AD2HP)로 클로닝되어 벡터 생성을 위한 필요한 헬퍼 바이러스 유전자를 제공한다. 플라스미드 pCCVC-AD2HPv2는 3개의 아데노바이러스 유전자인 E2A, E4 및 VA RNA를 가져, AAV 벡터의 복제 및 캡시드화에 필요한 '헬퍼' 기능을 제공하는 11,832 bp의 플라스미드 작제물이다. 플라스미드 pCCVC-AD2HPv2는 Amp^R 유전자 및 pUC ori 서열의 일부를 함유하는 DrdI-DrdI 1882bp 제한 단편이 제거되고, 전체 Kan^R 유전자 및 pUC ori 서열의 일부를 함유하는 플라스미드 pAAV2-hRPE65v2로부터의 DrdI-DrdI 단편으로 대체된 pCCVC-AD2HP의 유도체이다.

[0291] AAV 벡터 생성에 사용되는 세포 기질은 1차 인간 배아 신장 세포(HEK) 293의 유도체이다. HEK293 세포주는 전단된 인간 아데노바이러스 유형 5(Ad5) DNA에 의해 형질전환된 영구 계통이다(Graham et al. 1977). Working Cell Bank는 필라델피아 소아 병원(The Children's Hospital of Philadelphia; CHOP)의 세포 및 분자 치료 센터(Center for Cellular and Molecular Therapeutics; CCMT)로부터의 특징적인 HEK293 Master Cell Bank로부터 유래된다.

[0292] **실시예 2**

[0293] *비-인간 영장류(NHP)에서의 AAV-SPK-8005 및 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드, FVIII-X07 (SEQ ID NO:7)) 벡터의 평가.*

[0294] 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터로 패키징된 FVIII 트랜스진 작제물을 비-인간 영장류(NHP)로 전달하였다. 파일럿 연구 및 GLP 연구 둘 모두를 수행하였다.

[0295] 요약하면, AAV-SPK-8005 또는 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)의 단일 정맥 주입이 투여된 수컷 시노몰구스 마카쿠(cynomolgus macaque)에서의 용량-범위 연구를 수행하였다. hFVIII의 발현을 8주에 걸쳐 평가하였다. 각각의 벡터의 동물 그룹 및 용량 수준(파일럿 연구)이 **도 1**에 제시된다.

[0296] NHP는 대략 30분에 걸쳐 교정된 주입 펌프를 사용하여 복재 정맥을 통한 정맥내 주입을 받았다. 마카쿠를 AAV 캡시드에 대한 중화 항체에 대해 사전 스크리닝하였다. 모든 처리된 동물은 벡터 투여 전에 1:3 미만의 역가를 갖는 것으로 초기에 결정되었다. 이는 낮은 역가조차도 전신 전달 후 간 세포에 의한 벡터 흡수를 억제하므로 성공적인 간 형질도입을 보장하기 위해 수행되었다(Jiang et al. 2006). 모든 동물은 또한 유전자 전달 전에

FVIII에 대한 중화 항체의 존재에 대해 음성이었다.

[0297] hFVIII의 혈장 수준을 시노몰구스 내인성 FVIII를 검출하지 않는 인간-특이적 ELISA에 의해 측정하였다. 연구의 모든 동물은 중간 용량 코호트에서 하나의 마카쿠를 제외하고 벡터 전달 후에 hFVIII를 발현한다. 인간 인자 VIII 항원 수준은 벡터 투여 약 1-2주 후에 정점에 이르렀다. 유전자 전달 1주 후, 2 x 10^{12} vg/kg의 AAV-SPK-8005로 형질도입된 NHP는 13.2 ± 3%(평균 ± 평균의 표준 오차)의 hFVIII 항원 수준을 발현하였다. 유전자 전달 1주 후, 다음 처리 코호트(5 x 10^{12} vg/kg)에서 3마리의 동물 중 2마리에서의 평균 hFVIII 수준은 27 ± 0.2%였다. 인간 FVIII는 임의의 시점에서 상기 코호트의 세 번째 마카쿠에서 검출될 수 없었다. 기준선 혈장 샘플의 재시험시, 상기 동물이 항-AAV 항체의 존재에 대해 실제로 양성이고, 1:3 미만의 초기의 결정된 역가가 부정확하다는 것이 결정되었다. 최종적으로, 1 x 10^{13} vg/kg의 가장 높은 시험된 용량에서, AAV 주입 후 54.1 ± 15.6%의 피크 hFVIII 항원 수준이 관찰되었다.

[0298] 인간 FVIII 발현은 약 4주에서 동물의 대략 1/3에서 감소하였고, 이들 3마리의 마카쿠에서 hFVIII에 대한 억제제 항체의 출현을 동반하였다(**도 2**에서 ε 기호로 표지됨). hFVIII에 대한 종-특이적 항체의 발생은 이전에 비-인간 영장류에서 기록되었으며, 인간 트랜스진 생성물과 내인성 시노몰구스 FVIII 사이의 여러 아미노산 잔기의 차이로 인한 것일 수 있다(McIntosh, J. *et al.*, Blood 121:3335-44 (2013)).

[0299] 인간 FVIII의 지속적인 발현으로 인한 잠재적인 혈전형성을 평가하기 위해, 본 연구에서 D-이량체 항원 수준을 측정하였다. 시노몰구스 마카쿠에서의 임상적 관련성 또는 심지어 D-이량체 항원 수준의 정상 값에 대한 보고가 드문 것이 인지되어야 하며; 참조로서, 인간에서의 D-이량체에 대한 정상 범위는 500 ng/ml 미만이다. 동물이 내인성 시노몰구스 FVIII를 발현하므로, 간 유전자 전달의 결과로서의 hFVIII의 생성은 FVIII 활성의 초생리학적 수준을 발생시킬 것이다.

[0300] 5 x 10^{12} vg/kg으로 투여되었으나, 인간 FVIII를 발현하지 않은 동물은 AAV 주입 2주 후 863 ng/ml의 피크를 가졌다. 나머지 동물은 기준선 값과 비교하여 D-이량체 항원 수준에서 임의의 유의한 증가를 나타내지 않았다. 종합하면, 이들 결과는 본 연구에서 표적으로 하는 수준에서 인간 FVIII의 발현이 혈전증의 증가된 위험과 관련되지 않음을 시사한다.

[0301] 벡터 투여 4주 후, 벡터 관련 변화는 명백하지 않았다. 간 기능 시험은 대부분의 경우 투여 이전에 존재했으므로 벡터 용량과 관련되지 않은 것으로 보이는 약간의 변동을 갖는 정상 값을 나타내었다(**도 3**).

[0302] 5주까지의 D-이량체 수준이 **도 4**에 제시되어 있다. 고용량 코호트의 한 마리의 동물은 순환 인간 FVIII가 약 100%에서 정점에 이른 경우 벡터 투여 1주 후 D-이량체 수준에서 약간(577 ng/ml) 일시적으로 상승하였고; 이러한 단일 상승 측정 후에 D-이량체 수준은 신속히 정상으로 복귀하였다. 특히, D-이량체 수준과 hFVIII 항원 수준 사이에는 상관 관계가 없었다(**도 4**, 하부 패널).

[0303] 파일럿 연구에서 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드) 벡터의 경우, 3 코호트의 시노몰구스 마카쿠(n = 3)에 증가하는 용량의 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)(2 x 10^{12}, 6 x 10^{12} 및 2 x 10^{13}(vg/kg); **도 1**)를 처리하였다. GLP 연구에서, 3x10^{12}, 6x10^{12} 및 2x10^{13} vg/kg(AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)) 용량의 벡터를 사용하였다.

[0304] 각각의 연구에 전체 11개의 NHP를 사용하였다. 파일럿 연구는 면역억제의 부재하에서 10주의 관찰 기간을 가졌다. 이어서 12주의 면역억제 단계가 후속되었으며, 이는 연구의 초기 10주 동안 생성된 항-hFVIII 항체를 제거하기 위해 포함되었다. 이후, 동물을 추가 20주 동안 추적하였다.

[0305] 동물을 임상 관찰, 체중 임상 병리(임상 화학, 혈액학, 응고, 소변검사)에 대해 모니터링하였다. 또한, hFVIII 항원 수준, FVIII 억제 항체 및 D-이량체 수준을 연구 전체에 걸쳐 평가하였다.

[0306] hFVIII 항원 파일럿 연구 데이터는 **도 6**에 제시되어 있다. 평균 hFVIII 항원 수준은 100% 정상 hFVIII 항원 수준으로서 150 ng/ml를 이용하여 저용량 코호트에서 관찰된 22.3 ± 6.2% hFVIII 및 중간 용량 및 고용량 코호트에서 각각 관찰된 61.6 ± 15.7% 및 153 ± 58.1%로 약 2-3에서 정점에 달했다(**도 6A-6D**).

[0307] GLP 독성학 연구에서, SPK-8011의 말초 정맥 주입을 통한 간 유전자 전달은 또한 모든 동물에서 hFVIII 발현을 초래하였다. 3x10^{12} vg/kg의 저용량에서, hFVIII 항원 수준은 정상의 5-40% 범위였으며, AAV 투여 약 2주 후 평균 피크 수준은 20.3 ± 11%(평균 ± SEM)였다. 6x10^{12} vg/kg 코호트에서의 평균 hFVIII 항원 수준은 정상의

40.7 ± 4%였다.

[0308] 따라서, LK03 AAV 캡시드 혈청형은 마우스 간과 달리 생체 내에서 NHP 간세포를 효율적으로 형질도입시킨다. 유전자 전달 직후 관찰된 치료적 hFVIII 수준에도 불구하고, 대부분의 동물에서, 수준은 4주 주변에서 감소하기 시작했다.

[0309] 시노몰구스 마카쿠의 혈장에서 hFVIII에 대한 체액 반응을 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)의 투여 후 측정하였다. 기준선 및 표시된 시점에서 ELISA에 의해 항-hFVIII IgG 항체에 대해 동물을 평가하였다.

[0310] 파일럿 및 GLP 연구 둘 모두에서 벡터 처리된 동물 대부분은 전임상 시노몰구스 마카쿠 연구뿐만 아니라 다른 사람들에 의한 보고(McIntosh, J. *et al.*, Blood 121:3335-44 (2013))에 기초한 예견된 결과인 항-FVIII 중화 항체를 발생시켰다. 마카쿠에서 AAV 주입 3주 후에 시작되는 것으로 전형적으로 보이는 인간 FVIII 단백질에 대한 중화 항체는 순환 hFVIII 항원의 검출을 배제한다. 결과로서, 2-3주 주변(즉, hFVIII에 대한 억제 항체의 출현 전)의 피크 hFVIII 항원 수준을 사용하여 인간 대상체에서 적절한 시작 벡터 용량을 추정할 수 있다. 파일럿 및 GLP NHP 연구에서 SPK-8011의 용량-반응 곡선이 **도 7**에 제시되어 있다.

[0311] AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)로 달성된 FVIII 발현 수준을 FVIII의 전달을 위해 AAV5 및 AAV8 캡시드 기반 AAV 벡터로 달성된 FVIII의 보고된 수준과 비교하였다. 비교는 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)로 달성된 FVIII의 수준이 AAV5 및 AAV8 캡시드를 갖는 AAV 벡터를 통해 전달된 FVIII의 보고된 수준보다 크다는 것을 나타내었다(**도 8**).

[0312] **실시예 3**

[0313] *비-인간 영장류(NHP)에서의 AAV-LK03 캡시드의 생체분포.*

[0314] 비-인간 영장류에서 AAV-LK03 캡시드의 생체분포를 비-GLP 연구에서 평가하였다. 인간 응고 인자 IX를 인코딩하는 AAV-LK03-캡시드화된 벡터(AAV-LK03-hFIX)의 정맥내 투여는 2개의 주요 표적 조직이 간 및 비장임을 나타내었다(**도 9**). 비장 향성은 AAV-LK03의 독특한 특징이 아니다. 예를 들어, 강한 안전성 기록을 갖는 여러 간-특이적 유전자 요법 시험(예를 들어, NCT02396342, NCT02082860, NCT02576795)에서 사용된 AAV5 캡시드는 비-인간 영장류의 간을 표적으로 하는 것과 동일하고 그렇지 않으면 더 큰 효능으로 비장을 표적으로 한다(Paneda et al. 2013). SPK-8011 발현 카세트는 간 특이적인 것으로 간주되는 마우스 트랜스티레틴 또는 TTR 프로모터를 사용한다(Costa, 1991). 프로모터의 간-특이적 특성을 추가로 지지하기 위해, PCR 기반 발현 분석은 SPK-8011과 동일한 발현 카세트(즉, AAV-SPK-8005)를 패키징하는 상이한 AAV 벡터의 투여 후 마우스의 간 및 비장에서 벡터 유래 FVIII 발현을 측정하였다. **도 10**에 제시된 바와 같이, 비장에서의 인간 FVIII 발현은 간세포로부터 유래된 것과 비교하여 몇 자릿수 더 낮다.

[0315] 혈우병 B에 대해 여러 개(NCT02396342, NCT01620801 NCT00076557, NCT02484092, NCT02618915, NCT00979238, NCT01687608) 및 혈우병 A에 대해 1개(NCT02576795)를 포함하는 다른 AAV 벡터를 이용하여 연구가 수행되었으나, 이는 AAV-LK03를 사용한 첫 번째 임상 연구이다. 유니버시티 칼리지 런던(University College London)과 협력한 St. 주드 칠드런스 리서치 병원(St. Jude Children's Research Hospital)에 의해 수행된 연구는 코돈 최적화된 인간 인자 IX cDNA, scAAV2/8-LP1-hFIXco를 인코딩하는 자가-상보적 유전체를 갖는 AAV8 벡터를 이용하였다. 벡터를 받은 10명의 대상체는 3.2년의 정중값을 통해 1-6%의 안정적인 인자 IX 수준을 가졌으며, 모든 참가자는 예방 인자 대체의 사용을 중단하거나 줄였다(Nathwani et al. 2014). 혈우병 A에 대한 임상 연구는 인간 FVIII(NCT02576795)를 인코딩하는 AAV5 캡시드화된 벡터를 사용하였다. 2016년에 제시된 예비 데이터는 여러 대상체에서의 유전자 전달 후 최대 16주의 추적 검사와 함께 2-60% 범위의 FVIII 활성에서의 증가를 입증한다(BioMarin, April 2016).

[0316] **실시예 4**

[0317] *시험관 내 환경에서 분석된 AAV-LK03 캡시드의 형질도입 효율.*

[0318] 시노몰구스 마카쿠 및 인간 기원으로부터의 일차 간세포를 4개의 상이한 감염다중도(MOI)로 세포 당 500 내지 62,500개의 벡터 유전체 범위의 루시페라제를 발현하는 AAV-LK03 벡터로 형질도입시켰다. 형질도입 72시간 후, 루시페라제 발현을 분석하였다.

[0319] AAV-LK03 캡시드는 배양물에서 인간 간세포를 형질도입시키는 데 있어서 유의하게 높은 효율을 유일하게 입증하였다. **도 11**에 제시된 대표적 예에서, LK03은 시험관 내 비-인간 영장류 간세포와 비교하여 인간 간세포를 형질도입시키는 데 있어서 약 5배 더 높은 효율을 입증하였다. 중요하게는, 이들 결과는 다수의 MOI 및 복제 연구에

서 일관적이다.

[0320] **실시예 5**

[0321] *인간 임상 시험 용량 계산*

[0322] 비-인간 영장류(NHP)에서 관찰된 hFVIII 수준에 기초하여, 인간에서 $5x10^{11}$ vg/kg의 제안된 시작 용량에서 예상된 FVIII 수준의 추정치를 결정하였다. 상이한 벡터 로트는 약간 상이한 간 형질도입 효능을 가질 수 있으므로, 파일럿 및 GLP 독성학 NHP 연구 둘 모두로부터의 데이터를 사용하여 $5x10^{11}$ vg/kg의 투여 후 FVIII 농도의 범위를 보간하였다. 상기 분석을 위해, 선형 회귀 모델(**도 12**), 즉, AAV 용량과 결과적인 hFVIII 발현 수준 사이의 관계가 사용된 선형성과 유의하게 벗어나는 것으로 밝혀지지 않았다(**표 2**).

[0323] **표 2**

	파일럿	GLP
가장 적합한 값		
기울기	6.099e-012 ± 7.962e-013	5.170e-012 ± 6.421e-013
X=0.0인 경우의 Y-절편	0	0
Y=0.0인 경우의 X-절편	0	0
1/기울기	1.64E+11	1.934E+11
95% 신뢰 구간		
기울기	4.346e-012 내지 7.851e-012	3.756e-012 내지 6.583e-012
적합도		
Sy.x	28.93	15.29
기울기가 유의하게 0이 아닌가?		
t	7.66	8.051
DF	11	11
P 값	< 0.0001	< 0.0001
0으로부터의 편차?	유의함	유의함
데이터		
X 값의 수	4	4
최대 Y 반복 수	3	3
값의 전체 수	12	12
결측값 수	3	3
시험 수행		
선 위의 점	2	2
선 아래의 점	1	1
수행 수	2	2
P 값(시험 수행)	0.6667	0.6667
선형성으로부터의 편차	유의하지 않음	유의하지 않음
방정식	Y = 6.099e-012*X - 0.0	Y = 5.170e-012*X - 0.0

[0324]

[0325] 상기 제시된 선형 회귀 모델을 이용하여, $5x10^{11}$ vg/kg의 용량의 SPK-8011을 주입하는 경우 평균 FVIII 수준은

정상의 약 2.6% 내지 3.0%일 것으로 추정되었다. 그러나, 이러한 선형 회귀 곡선은 표 2의 방정식이 사용되어 $2x10^{12}$ vg/kg, $3x10^{12}$ vg/kg 및 $6x10^{12}$ vg/kg의 예상 FVIII 발현 값을 역계산하는 경우 저용량 및 중간 용량 동물에서 관찰된 실제 값을 과소평가하는 것으로 보인다(**표 3**).

[0326] **표 3**

	파일럿		
용량	FVIII (보간)	FVIII (실제)	보간 대 실제(%)
2E+12	12.2	22.3	54.8
6E+12	36.6	61.6	59.4
2E+13	122.0	113.5	107.5

	GLP		
용량	FVIII (보간)	FVIII (실제)	보간 대 실제(%)
3E+12	15.5	20.3	76.4
6E+12	31.0	40.7	76.2
1.2E+13	62.0	56.0	110.8

[0327]

[0328] hFVIII 발현은 AAV 벡터 부하가 증가함에 따라 포화에 도달하면서 특정 벡터 용량에서 선형 용량 반응을 따를 수 있는 것이 가능하다. 고용량 코호트는 이전 분석으로부터 제거되었고, 선형 회귀 곡선은 결정된 $5x10^{11}$ vg/kg의 SPK-8011 용량에서 예측된 hFVIII 발현 수준을 재계산하고 재평가하였다(**표 4** 및 **도 13**).

[0329] **표 4**

	파일럿	GLP
가장 적합한 값		
기울기	6.099e-012 ± 7.962e-013	5.170e-012 ± 6.421e-013
X=0.0인 경우의 Y-절편	0	0
Y=0.0인 경우의 X-절편	0	0
1/기울기	1.64E+11	1.934E+11
95% 신뢰 구간		
기울기	4.346e-012 내지 7.851e-012	3.756e-012 내지 6.583e-012
적합도		
Sy.x	28.93	15.29
기울기가 유의하게 0이 아닌가?		
t	7.66	8.051
DF	11	11
P 값	< 0.0001	< 0.0001
0으로부터의 편차?	유의함	유의함
데이터		
X 값의 수	4	4
최대 Y 반복 수	3	3
값의 전체 수	12	12
결측값 수	12	12
시험 수행		
선 위의 점	2	2
선 아래의 점	1	1
수행 수	2	2
P 값(시험 수행)	0.6667	0.6667
선형성으로부터의 편차	유의하지 않음	유의하지 않음
방정식	Y = 6.099e-012*X - 0.0	Y = 5.170e-012*X - 0.0

[0330]

[0331] 도 13에 제시된 선형 회귀 곡선으로, $5x10^{11}$ vg/kg의 용량으로 SPK-8011을 주입하는 경우 평균 FVIII 수준은 정상의 대략 3.4% 내지 5.2%인 것으로 추정되었다.

[0332] **실시예 6**

[0333] *인간 임상 시험 계획*

[0334] **적격**

[0335] ● 연구에 적격인 연령: 18세 이상(성인, 노인)

[0336] ● 연구에 적격인 성별: 남성

[0337] ● 건강한 지원자 허용: 아니오

[0338] **기준:** 포함 기준:

[0339] ● 18세 이상의 남성

[0340] ● 정상의 2% 이하의 혈장 FVIII 활성 수준을 갖는 병력에 의해 입증된 혈우병 A의 진단 확인

[0341] ● FVIII 농축액 또는 냉동침전물에 150일 초과의 노출일(ED)을 받음

[0342] ● 온-디멘드(on-demand) 요법을 받고, 정상의 1-2%의 FVIII 기준선 수준을 갖는 경우에만 지난 12개월에 걸쳐 10회 초과의 출혈 사건을 경험함

[0343] ● 임의의 FVIII 제품에 대한 알레르기 반응의 과거 이력이 없음

[0344] ● 중앙 실험실에 의해 평가된 바와 같이 인자 VIII 억제제에 대해 측정 가능한 억제제가 없고, FVIII 단백질에 대한 억제제의 과거 이력이 없음

[0345] ● 확실한 장벽 피임법 사용에 동의

[0346] **기준:** 제외 기준:

[0347] ● 활동성 B형 또는 C형 간염의 증거

[0348] ● 현재 B형 또는 C형 간염에 대한 항바이러스 요법을 받고 있음

[0349] ● 유의한 근본적인 간 질환을 가짐

[0350] ● 200/mm3 이하의 CD4 수를 갖는 HIV-1 또는 HIV-2의 혈청학적 증거*를 가짐(* 200/mm3 초과의 CD4 수 및 검출 가능하지 않은 바이러스 부하를 갖는 HIV+이고 안정적인 참가자는 등록에 자격이 있음)

[0351] ● AAV-Spark200 캡시드와 반응성인 검출 가능한 항체를 가짐

[0352] ● 지난 52주 이내에 유전자 전달 시험에 참여하거나, 지난 12주 이내에 연구 제품으로 임상 시험에 참여함

[0353] **실시예 7**

[0354] *상이한 용량의 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII에서의 예측 FVIII 수준*

[0355] 임상 연구 NCT03003533('혈우병 A에 대한 유전자 전달 연구')은 LK03(SEQ ID NO:27)으로 공지된 AAV 캡시드의 최초 인간 사용이다. 비-인간 영장류에서의 연구는 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII의 증가하는 용량이 적어도 일부 용량 범위에서 선형성으로부터 유의하게 벗어나는 것으로 보이지 않는 용량 의존적 방식으로 순환 인간 FVIII의 수준을 증가시키는 것을 제시한다. 첫 번째 코호트에서의 평균 항정 상태 FVIII 수준(± 평균의 표준 오차)은 정상의 약 11.7 ± 2.3%였다. 이러한 용량 코호트에서 2명의 참가자의 n을 고려하면, 더 많은 참가자가 연구에 포함됨에 따라 관찰된 FVIII 수준에서의 비교적 낮은 변동성이 유지될 지의 여부를 예측하기 어렵다.

[0356] 혈우병 B의 치료를 위한 연구 제품 rAAV-FIX(NCT02484092)을 사용하여 간에서 응고 인자의 발현을 매개하기 위해 rAAV 벡터를 이용한 최근의 경험은 더 큰 코호트의 대상체에서의 변동성을 추정하기 위한 유용한 참조일 수 있다. 항정 상태 FIX 발현은 rAAV-FIX 벡터 주입 후 12주까지 도달하여, 대략 33%의 평균 FIX 활성(FIX:C)을 발생시켰다. 중요하게는, 가장 높은 수준의 FIX:C는 약 79%(대상체 9)였고, 가장 낮은 수준은 약 14%(대상체 7)였다. 주목할 점은, 대상체 7에서의 벡터 효능의 해석은 rAAV-FIX 벡터 캡시드에 대한 면역 반응의 발생에 의해 혼란스러웠고, 이는 짧은 과정의 스테로이드가 개시되기 전에 FIX 발현의 부분적 손실을 발생시켰다. 그러나, 세포성 면역 반응이 검출되지 않은 대상체 6은 대략 18%의 항정 상태 수준을 가졌다. 따라서, 연구 NCT02484092에서 가장 높은 FIX:C 수준과 가장 낮은 FIX:C 수준 사이의 차이는 대략 4배였다. 혈우병 치료를 위한 다른 AAV 임상 시험은 유의하게 더 높은 변동성을 나타내었다. 문헌[Pasi, et al. (2017) Thromb Haemost. 117(3):508-518]. **표 5**는 선형 용량 반응을 가정하여 상이한 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII 용량에서 예측된 평균 FVIII 수준을 제시한다. 혈우병 B 연구에서 관찰된 변동성은 혈우병 A 시험에서의 변동성을 추정하기 위한 보수적인 접근법으로 사용되었다.

[0357] **표 5**

용량 (vg/kg)	추정된 가장 낮은 발현자	추정된 평균*	추정된 가장 높은 발현자
5.00E+11	6	12	24
1.00E+12	12	24	48
2.00E+12	24	48	96
4.00E+12	48	96	192
6.00E+12	96	192	384

[0358] * $5x10^{11}$ vg/kg 코호트에서 관찰된 실제 평균.

[0359] **실시예 8**

[0360] *인간 임상 시험 결과*

[0361] 중증(N = 11) 또는 중등의 중증(N = 1) 혈우병 A를 가진 12명의 남성에서 용량 상승 연구를 수행하였다. 대상체는 18-52세 연령 범위였다. 유전자 요법 전에, 12명의 대상체 중 8명을 예방 치료로, 그리고 12명의 대상체 중 4명을 에피소드 치료로 관리하였다. 대상체를 3개의 투여 코호트 중 하나에 등록하고, 5×10^{11} vg/kg (N=2, 대상체 1 및 2), 1×10^{12} vg/kg (N=3, 대상체 3, 4 및 6), 또는 2×10^{12} vg/kg (N=7, 대상체 5 및 7 - 12)의 용량으로 SPK-8011(AAV-hFVIII, LK03 캡시드)을 주입하였다.

[0362] 도 14-28은 3개의 상이한 용량의 AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII를 투여한 12명의 인간 대상체의 용량 반응 연구 데이터를 제시한다. 대상체에서 결정된 FVIII 활성의 값은 정상 혈장에서의 100% FVIII에 비한 것이다. 전형적으로, 혈장은 많은 수(예: 50 또는 100)의 정상 지원자로부터 푸울링되며, 이러한 "정상 푸울링된 혈장"에서의 FVIII 활성은 100%로 정의된다. 이러한 혈장의 희석액은 FIX 수준을 결정하기 위해 사용되는 어떤 검정과도 비교하여 FVIII 활성의 표준 곡선을 만드는 데 사용된다. 이후, 이러한 표준 곡선은 동일한 검정을 이용하여 환자 샘플에서 FVIII의 양 또는 백분율(%)을 정의하는 데 사용된다.

[0363] 모든 벡터 용량은 출혈을 예방하고 예방의 중단을 허용하기에 충분한 FVIII의 수준의 발현으로 이어졌다. 3개의 용량에서 12명의 대상체에 걸쳐, 연간 출혈률(ABR)이 97% 감소하고, 연간 주입률이 97% 감소하였다. 데이터는 전체 동역학이 FVIII의 지속적인 정점지속으로 점진적으로 증가함을 제시하는 것을 나타낸다.

[0364] 첫 번째 용량 코호트에서, FVIII 수준은 출혈 사건, 상승된 트랜스아미나제 수준 및 스테로이드의 사용 없이 66 및 51주에서 14% 및 15%이다. FVIII 발현은 관찰 기간에 걸쳐 안정적으로 유지되었다. 이러한 저용량 코호트로부터의 데이터는 15% 범위의 소량의 FVIII 수준조차도 최대 66주의 추적 기간에 걸쳐 출혈을 예방하기에 적합할 수 있음을 나타낸다.

[0365] 두 번째 용량 코호트에서, FVIII 수준은 주입 후 33, 46 및 31주에 9%, 26% 및 17%이다. 이러한 용량 코호트의 첫 번째 대상체(대상체 3)는 159일에 자발적인 관절 출혈에 대한 단일 용량의 인자 농축물을 주입하였고, 이러한 용량 코호트의 두 번째 대상체(대상체 4)는 195일에 시작된 외상성 출혈에 대해 다수의 주입을 받았다. 이들 대상체 둘 모두는 벡터 주입 후 12 및 7주째에 수행되는 FVIII 수준의 결과로서 발생된 안정화와 함께 FVIII 수준의 감소에 의해 촉발되는 테이퍼링 스테로이드의 과정을 받았다. 이러한 용량 코호트의 세 번째 대상체(대상체 6)는 출혈이 없었고, 인자 주입을 받지 않았거나 스테로이드가 제공되지 않았다.

[0366] 세 번째 용량 코호트(N=7)에서, 7명의 대상체 중 5명은 현재 12% 이상의 FVIII 수준을 갖고, 16-49%의 범위이고; 이들 대상체에 대해, 벡터 주입 12주 후에 시작하는 평균 FVIII 수준은 30%이고, 중앙값은 22%이다. 벡터 주입 4주 후에 시작하여 이들 대상체에서 출혈은 보고되지 않았다.

[0367] 별도로, $2x10^{12}$ vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 벡터 용량의 7명 중 5명은 FVIII 수준 감소, 대상체 기준선 이상의 ALT 증가, 또는 AAV 캡시드에 대한 상승된 IFN-γ ELISPOT 중 하나 이상에 대해 벡터 주입 6 내지 11주 후 범위의 시점에서 시작하여 스테로이드 과정을 받았다. 스테로이드의 개시는 정상 범위로의 ALT의 감소와 관련되었고,

모든 경우에 ELISPOT 신호를 소멸시키는 것과 관련이 있었다; 7명 중 2명의 대상체는 FVIII 수준의 안정화에 제한된 성공을 나타내었고, 이는 가능하게는 면역 반응으로 인해 5% 미만으로 떨어졌다. 이들 중 1명의 경우, 12주의 추적 검사 전체에 걸쳐 출혈이 보고되지 않았고; 다른 1명은 37주의 관찰로 4번의 출혈이 있었다.

[0368] 전반적으로, 유리한 안전성 프로파일이 관찰되었고, 2명의 대상체만이 정상의 상한 이상의 ALT 상승을 경험하였다. 현재까지 대상체의 91퍼센트(91%)가 벡터 주입 후 1 이하의 ABR을 경험하였다. 모든 대상체는 벡터 주입 후 FVIII 수준의 상승을 경험하였으나, 2명의 대상체에서 FVIII 수준의 감소를 예방하는 데 제한적인 성공은 예방 스테로이드의 첨가가 정당화될 수 있음을 시사한다.

[0369] 비 NHP에서 관찰된 hFVIII 수준을 기초로 하고, 상이한 벡터 로트가 약간 상이한 효능을 가질 수 있다는 것을 고려하여, $5x10^{11}$ vg/kg의 용량으로 SPK-8011을 주입한 인간에서의 평균 FVIII 수준은 선형 외삽을 가정하여 대략적으로 약 3.4% - 5.8%일 수 있는 것으로 추정되었다. 첫 번째 대상체에서의 FVIII 활성은 정상의 대략 9.15 ± 0.53% 및 두 번째 대상체에서 13.50 ± 0.50%에서 정점지속되었다. 따라서, 저용량 코호트에서의 평균 FVIII 활성은 대략 11.3%였으며, 이는 비-인간 영장류에서의 연구에 기초한 예상보다 2-4배 더 높다.

[0370] 마카쿠와 같은 계통발생학적으로 밀접한 종을 이용한 전임상 연구를 기초로 한 예측 FVIII 수준과 인간 대상체에서의 실제 결과 사이의 저용량 코호트에서의 실질적인 2-4배 차이(사용된 선형 회귀 곡선에 따름)는 인간에 대한 AAV 벡터 투여량을 결정하는 데 있어서 현재 동물 모델의 한계를 강조한다. AAV-SPK-8011(LK03 캡시드)-hFVIII를 투여한 NHP에서의 FVIII 활성을 기초로 하여 예측된 것보다 인간에서 훨씬 더 큰 FVIII 활성이 있다는 것을 나타내는 데이터는 예상되지 않았다.

[0371] 인간에서 AAV 투여량을 결정하기 위한 보편적인 전임상 모델은 존재하지 않지만, 응고 인자 IX의 간 유래 발현을 매개하기 위해 AAV2, AAV8 및 AAV-Spk 벡터를 사용한 비-인간 영장류에서의 이전 경험은 마카쿠가 인간에서의 AAV 벡터 효능의 우수한 예측자이나 완벽한 예측자가 아님을 나타낸다. 보다 최근에, 인간 간세포로 부분적으로 재증식된 간을 갖는 키메라 "인간화" 마우스는 상이한 바이러스 캡시드의 간 형질도입 효능을 결정하는 가치 있는 도구가 되었다. 이러한 마우스 모델을 이용하는 인간 간세포에서의 형질도입을 측정하는 2개의 독립적 연구가 보고되었다. LK03와 AAV8 사이에서 형질도입된 인간 간세포의 백분율에서의 대략 10배 차이가 보고되었다(LK03 및 AAV8 벡터 주입으로 각각 43.3 ± 11% 및 3.6 ± 1.1%가 관찰되었다(Lisowski L, et al. *Nature* 506:382-6 (2014)).

[0372] 요약하면, 중증 또는 중등의 중증의 혈우병 A를 갖는 12명의 환자에서의 *SPK-8011*의 주입은 유전자 전달 후 최대 66주의 기간 동안 ABR에서 97% 감소 및 재조합 FVIII 사용에서 97%와 관련된 안전하고, 내구성 있고, 용량 의존적인 FVIII 활성을 발생시켰다.

[0373] **실시예 9**

[0374] *TTR 프로모터*

[0375] 트랜스티레틴(TTR) 프로모터의 특징은 본래 문헌[Costa and Grayson 1991, Nucleic Acids Research 19(15):4139-4145]에 기재되었다. TTR 프로모터 서열은 TATTTGTGTAG에서 TATTGACTTAG로 변형된 서열이었다.

[0376] 4개의 뉴클레오티드 돌연변이를 갖는 TTR 프로모터(TTRmut), SEQ ID NO:22

[0377]
```
GTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATAT
TGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGT
CAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGA
AGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCT
```

[0378] **실시예 10**

[0379] *CpG 감소된 FVIII 인코딩 트랜스진 작제물 및 예시적 AAV 캡시드.*

[0380] CpG 감소된 핵산 변이체 X01을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:1)

```
atgcagattg agctgtctac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttcaat
acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttca ctgatcatct gttcaacatt
gctaaaccca ggcccccctg gatggggctg ctgggcccta ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgatcactct gaagaacatg gctagccatc ctgtgtctct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgatcagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggctctcaca cctatgtctg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgatcct ctgtgtctga cctatagcta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgtagggag
gggagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcattctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcattctgaa accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt caataggtct
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc
accacccctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca ccttcctggt gaggaatcac
agacaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agtttctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaataatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gagatttgat
gatgacaatt ctcccagctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgcccccct ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctataa gagccagtac ctgaataatg gcccccagag gattgggagg
aagtataaga aggtgaggtt catggcctat actgatgaaa ccttcaagac cagagaggcc
atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccctca tggcatcact
gatgtgaggc ctctgtacag cagaaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggacttc
cccattctgc ctggggagat tttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggccca
accaagtctg accctaggtg cctgactagg tactacagca gctttgtgaa tatggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aacaggagct ggtacctgac tgagaacatt cagaggtttc tgcccaaccc tgctggggtg
cagctggagg accctgaatt ccaggcctct aacatcatgc acagcattaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta cattctgagc
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt taagcacaag
atggtgtatg aggataccct gaccctgttt cctttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggg
atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg acatctctgc ctatctgctg agcaagaata atgctattga gcccaggagc
ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag aactactctg
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag
gattttgata tttatgatga ggatgaaaac cagagcccca ggagctttca gaagaagact
aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgtc ttctagcccc
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagttca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca gggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tgggccctta tatcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc
aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttc tactctagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacttat
ttctggaagg tgcagcacca tatggccccc accaaggatg agtttgattg caaagcctgg
```

[0381]

```
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggccccctg
ctggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaatatc cagatggagg accccacctt taaggaaaat
tataggtttc atgccattaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggca gcaatgagaa cattcacagc
atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tataatctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg
gtgtattcta acaagtgtca gacccccctg ggcatggcct ctggccatat cagggacttc
cagatcactg cctctggcca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcattac
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagccattca gctggattaa ggtggacctg
ctggctccaa tgattatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gtttagcagc
ctgtacatct ctcagtttat catcatgtac tctctggatg gcaaaaagtg gcagacctac
aggggcaatt ctactggcac tctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc
aagcacaaca tctttaaccc ccctatcatt gccaggtaca ttaggctgca ccccacccat
tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgcagc
atgcccctgg gcatggagag caaggctatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac
ttcaccaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agagcctgct ggactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc atcagtggac cctgttcttc
cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac
agcctggacc ccccccctgct gaccagatac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggg tgtgaggccc aggacctgta ctga
```

[0382]

[0383] CpG 감소된 핵산 변이체 X02를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:2)

atgcagattg agctgtctac ctgcttttc ctgtgtctgc tgaggttctg cttctctgcc
actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct cccagggtgc ccaagtcttt ccccttcaat
acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttta ctgatcacct gttcaacatt
gccaagccca ggccccttg gatgggcctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gcctctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgataaggt gttccctggg gggagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gcccaatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctattctta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggctctctgg ctaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaaaatg cacactgtga atggctatgt gaataggagc
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtatt ggcatgtgat tggcatgggc
accacccctg aggtgcactc tatcttcctg gagggccata ctttcctggt gaggaatcat
aggcaggcca gcctggagat tagccccatt acctttctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttttgccac atcagctctc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaaa tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaata gcccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcctaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgctcccct ggtgctggcc
cctgatgaca ggtcttacaa gagccagtac ctgaacaatg gcccccagag aattgggagg
aagtataaga aggtgagatt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc
atccagcatg agtctggcat tctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggcctctagg ccctacaata tttaccccca tgggatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcatct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga agatggcccc
accaagtctg accctaggtg cctgaccagg tactactctt cttttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggggaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttgatgag

[0384]

aacaggagct ggtatctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg
tttgattctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggctc agactgattt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacctt taagcataag
atggtgtatg aggacactct gaccctgttt cccttctctg gggagactgt gtttatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaacaggggc
atgactgctc tgctgaaggt gtcttcttgt gacaagaaca ctggggacta ttatgaggac
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga gcccagatct
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gaccaccctg
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagtctccca ggagcttcca gaaaaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgtc ttctagcccc
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagttca ctgatgggag cttcacccag cctctgtaca gggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tgggccctta tattagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgactttc
aggaatcagg cctctaggcc ctatagcttc tacagctctc tgatcagcta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca catggctcct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctactttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccctg
ctggtgtgtc ataccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtactttac tgagaacatg
gagaggaatt gcagagcccc ttgcaacatc cagatggagg acccaacctt caaagagaac
tacaggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct
caggaccaga ggatcaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa tatccatagc
attcacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tataacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgccaagcaa ggctgggatt
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg
gtgtactcca ataagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc
cagatcactg cctctggcca gtatgggcag tgggccccaa agctggccag gctgcactat
tctgggagca tcaatgcttg gagcaccaag gagcctttca gctggattaa ggtggatctg
ctggccccca tgatcattca tggcatcaaa acccaggggg ctagacagaa gttttctagc
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacttac
aggggcaata gcactggcac cctgatggtg ttttttggca atgtggacag ctctggcatc
aagcacaaca tctttaaccc ccccattatt gccaggtata tcaggctgca tcccacccac
tattctatta ggtctactct gagaatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgtagc
atgcccctgg ggatggagag caaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttat
ttcaccaata tgtttgccac ctggtctccc tctaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgctt ggaggcccca ggtgaataac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agtctctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatgggc atcagtggac tctgttcttc
cagaatggca aggtgaaggt cttccagggg aaccaggata gcttcactcc tgtggtgaac
tctctggacc ccccccctgct gactaggtat ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac

[0385] cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ttga

[0386] CpG 감소된 핵산 변이체 X03을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:3)

```
atgcagattg aactgtctac ttgtttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgct
actaggaggt actatctggg ggctgtggag ctgtcttggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc taggtttccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttaac
acctctgtgg tgtataagaa gactctgttt gtggagttca ctgaccatct gttcaacatt
gccaagccaa ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgattactct gaagaacatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac ctctcagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggctctcata cctatgtgtg gcaggtcctg
aaggagaatg ggcccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctactctta tctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ctaaggagaa gacccagact ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
```

[0387]

```
gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacaggagc
ctgccaggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtatt ggcatgtgat tgggatgggg
actacccctg aggtccacag cattttcctg gaggggcata cctttctggt gaggaaccac
aggcaggcct ctctggagat ctctcccatt actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa aaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgataaca gccccagctt catccagatt aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgctcctct ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctacaa gagccagtac ctgaataatg gccccccagag gattggcagg
aagtataaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc
atccagcatg aatctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgattatct ttaagaacca ggctagcagg ccctacaaca tttaccccca tggcattact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggatttc
cccattctgc ctggggagat ctttaagtac aaatggactg tgactgtgga ggatggccct
actaagtctg atcccaggtg tctgaccaga tactacagca gctttgtgaa tatggagagg
gacctggctt ctggcctgat tggcccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaatc agattatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aacagaagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggctagc aatatcatgc acagcattaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctattggta cattctgagc
attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacctt caagcacaag
atggtgtatg aggatactct gaccctgttt cccttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgtcacaact ctgacttcag gaacaggggc
atgactgccc tgctgaaggt gagctcttgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac
tcttatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga gcccaggagc
ttctctcaga atccccctgt gctgaagagg catcagaggg agatcactag gactaccctg
cagtctgacc aggaagagat tgactatgat gacaccatct ctgtggaaat gaagaaggag
gactttgata tctatgatga ggatgaaaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgag ctcttctccc
catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtcccac agttcaagaa ggtggtgttt
caggagttca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca gggggggagct gaatgagcat
ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataacattat ggtgactttc
aggaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacctat
ttctggaagg tgcagcatca catggctccc actaaagatg agtttgactg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccctctg
ctggtctgcc atactaacac cctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tctttaccat ctttgatgag accaagtctt ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgtaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacactc tgcctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg tctatgggct ctaatgagaa cattcattct
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaatctgt accctggggt gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa ggctggcatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg
gtctatagca ataagtgcca gacccccctg gggatggcct ctgggcatat cagagacttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac
tctggcagca ttaatgcctg gagcaccaag gagcccttct cttggatcaa ggtggacctg
ctggctccca tgatcatcca tgggatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaata gcactgggac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctggcatc
aagcacaata tcttcaaccc ccccatcatt gccaggtaca tcagactgca ccccactcat
tacagcatca ggagcactct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa tagctgctct
atgcccctgg gcatggagag caaggccatt tctgatgccc agattactgc ctcttcttac
ttcactaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcatct gcaggggagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatgggc accagtggac cctgtttttc
```

[0388]

```
cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggaca gctttactcc tgtggtgaac
agcctggacc ccccccctgct gactaggtac ctgaggattc acccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga
```

[0389]

[0390] CpG 감소된 핵산 변이체 X04를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:4)

atgcagattg agctgtctac ctgcttcttt ctgtgcctgc tgaggttctg tttctctgcc
actaggaggt attatctggg ggctgtggag ctgtcctggg actacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttccct cccagggtgc ccaagtcttt ccctttcaat
acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttta ctgatcacct gtttaacatt
gccaagccca ggcccccctg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgattactct gaagaatatg gcttctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gcccaatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta tctgagccat
gtggatctgg tgaaggatct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggctctctgg ccaaggagaa gactcagact ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaataggagc
ctgcctgggc tgattgggtg tcacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
accactcctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca cttttctggt gaggaatcac
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gatctgggcc agttcctgct gttttgccat atcagcagcc atcagcatga tgggatggag
gcttatgtga aggtggactc ttgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaataatgaa
gaggctgagg actatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaaca gccccagctt tatccagatt aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc
tgggtgcatt acattgctgc tgaggaagag gattgggact atgccccct ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctacaa gtctcagtac ctgaacaatg gccctcagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
attcagcatg aatctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgattattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tttatcctca tggcattact
gatgtgagac ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg accccaggtg cctgactagg tactactcca gctttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggcccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcctaatcc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggcctct aacattatgc acagcatcaa tgggtatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt taagcataag
atggtgtatg aggacaccct gactctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc caggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaataggggc
atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaaca ctggggacta ttatgaggat
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc
ttcagccaga atcctcctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccacctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagagcccca ggagcttcca gaagaagact
agacactact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctcttctccc
catgtgctga gaaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtcttc
caggagttca ctgatggctc tttcacccag cctctgtata gaggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccctta catcagggct gaggtggagg acaatatcat ggtgaccttc
aggaaccagg ctagcaggcc ctactctttc tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaat tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctactttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctggcctgat tggcccctg
ctggtctgcc acaccaatac tctgaaccct gctcatggga gacaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagtcct ggtactttac tgagaacatg
gagaggaatt gcagggcccc ttgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggaaaat

[0391]

tataggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcaggtg gtatctgctg tctatgggct ctaatgagaa catccacagc
atccatttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggctctg
tacaacctgt accctggggt ctttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatt
tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttcctg
gtgtactcta acaagtgcca gaccccactg ggcatggctt ctggccacat cagggatttc
cagattactg cctctggcca gtatggccag tgggctccca agctggctag gctgcactac
tctgggagca tcaatgcctg gtctactaag gagcctttct cttggatcaa agtggacctg
ctggccccta tgatcatcca tgggatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatct ctcagttcat cattatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctgggatt
aagcacaaca tctttaaccc ccccatcatt gccaggtata tcaggctgca ccctacccac
tacagcatta ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgcagc
atgcccctgg ggatggagag caaggccatt tctgatgctc agatcactgc ttctagctac
ttcactaaca tgtttgccac ctggtctccc agcaaggcta gactgcacct gcaggggagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaataat cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aaaaccatga aggtgactgg ggtgactacc caggggtga agtctctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatgggc atcagtggac cctgttcttt
cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac
agcctggacc ccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga

[0392]

[0393] CpG 감소된 핵산 변이체 X05를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:5)

```
atgcagattg agctgtctac ttgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc
actaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaac
acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttta ctgatcatct gttcaacatt
gccaagccca ggcctccttg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgattaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg gggagccata cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgaccct ctgtgcctga cttatagcta cctgagccat
gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg ggaagtcctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggatagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaataggagc
ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc
accacccctg aggtgcactc tattttcctg gagggccata ctttcctggt gaggaaccat
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac tctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tggcatggag
gcttatgtga aggtggacag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaataatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaact ctccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgccccct ggtgctggcc
ccagatgaca ggagctacaa gtcccagtac ctgaacaatg gcccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttat actgatgaga ctttcaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggccct ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgattatct tcaagaacca ggcttctagg ccctacaata tctaccctca tggcatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggatttc
cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa catggagagg
gatctggctt ctgggctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt tcaggcctct aatatcatgc acagcatcaa tggctatgtg
tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctattggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttttttttctg gctacacctt caagcacaag
```

[0394]

```
atggtgtatg aggatactct gactctgttc ccttttttctg gggagactgt gttcatgtct
atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaatt ctgacttcag gaacagaggc
atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac
tcttatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccagaagc
ttttctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gatactattt ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggtctttcca gaagaagact
aggcactact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgtc tagctctcct
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agtttaaaaa ggtggtgttc
caggaattca ctgatggcag ctttacccag cctctgtaca gggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tggggcctta cattagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc
aggaatcagg ccagcaggcc ctactctttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgaacc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca catggctccc accaaggatg agtttgattg caaggcctgg
gcttacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggcccctg
ctggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca gacaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcactat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaatt gcagggcccc ttgcaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac
tacaggtttc atgccattaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg tctatgggga gcaatgagaa catccacagc
attcacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttcctg
gtgtatagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagagacttt
cagattactg cctctggcca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcactat
tctggctcta ttaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggattaa ggtggacctg
ctggctccca tgatcatcca tggcatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttctcttct
ctgtacatca gccagttcat tatcatgtac tccctggatg gcaagaagtg gcagacctat
aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctggcatc
aagcataata tcttcaatcc ccccatcatt gctaggtaca tcaggctgca ccccacccac
tactctatta ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgcagc
atgcctctgg gcatggagag caaagccatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac
tttaccaaca tgtttgctac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcaggggagg
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagactatga aggtgactgg ggtgaccacc cagggggtga agagcctgct gacctctatg
tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgtttttc
cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggg aaccaggaca gcttcactcc tgtggtgaac
tctctggacc ccccccctgct gaccaggtat ctgaggatcc accctcagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga
```

[0395]

[0396] CpG 감소된 핵산 변이체 X06을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:6)

```
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgcc
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttccct cccagggtgc ccaagtcttt ccccttcaac
acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttta ctgaccacct gttcaacatt
gccaagccca ggcctccctg gatgggcctg ctgggcccca ccattcaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tcatcaccct gaaaaatatg gctagccacc ctgtgtctct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg
aaagagaatg gccccatggc ttctgatccc ctgtgtctga cctatagcta cctgagccat
gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ctaaggagaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggatagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtctatt ggcatgtgat tggcatgggc
actactcctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca ccttcctggt gaggaaccac
aggcaggcca gcctggagat ctctcccatc actttcctga ctgctcagac cctgctgatg
```

[0397]

```
gacctgggcc agttcctgct gttctgtcac atctctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gaaccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaatt ctcctagctt cattcagatc agatctgtgg ccaaaaagca tcctaagact
tgggtgcatt atattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccctt ggtgctggct
cctgatgata ggagctacaa gtctcagtac ctgaataatg ggccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
attcagcatg agtctgggat tctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg
ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccccca tgggattact
gatgtgaggc ccctgtactc taggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggatttt
cctatcctgc ctggggaaat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg atcccaggtg tctgaccagg tattatagct cttttgtgaa catggagagg
gatctggcct ctgggctgat tggccctctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aacaggagct ggtatctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgtctg catgaggtgg cctactggta tatcctgtct
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttttttttctg ggtatacttt taagcacaag
atggtgtatg aggacaccct gactctgttc cccttctctg gggagactgt gtttatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaatt ctgacttcag gaatagggggg
atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaata ctggggacta ctatgaggac
tcttatgagg acatttctgc ctatctgctg tctaagaaca atgccattga acccaggagc
ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg aaatcaccag aactactctg
cagtctgatc aggaggaaat tgactatgat gacactattt ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccaa ggagcttcca gaagaagact
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc
catgtgctga gaaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagttca ctgatgggag cttcacccag cccctgtata ggggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta tattagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc
aggaatcagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgattagcta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgaacc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat
ttctggaagg tgcagcatca catggccccc accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccctg
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gctcatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaatatg
gagaggaatt gcagggcccc ctgcaatatt cagatggaag accccacctt caaggagaat
tacaggttcc atgccattaa tggctacatc atggataccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggca gcaatgagaa catccactct
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggccctg
tacaacctgt accctggggt ctttgagact gtggagatgc tgccttctaa ggctggcatt
tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg
gtgtacagca ataagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctgggcatat cagggatttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccaa agctggctag gctgcactac
tctgggagca tcaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccca tgattatcca tgggattaag actcaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatca gccagttcat tatcatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacctat
aggggcaact ctactgggac cctgatggtg ttctttggga atgtggatag ctctgggatc
aagcacaata tcttcaaccc ccccatcatt gccaggtata tcaggctgca ccccacccac
tacagcatta ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgtagc
atgcctctgg gcatggagtc taaggccatt tctgatgccc agattactgc tagcagctac
ttcaccaaca tgtttgccac ctggtctccc agcaaggcca ggctgcatct gcagggcagg
tctaatgctt ggaggcccca ggtgaacaac ccaaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agtctctgct gacctctatg
tatgtgaagg agttcctgat ctctagcagc caggatggcc atcagtggac cctgttcttc
cagaatggca aggtgaaagt gttccagggc aatcaggata gcttcactcc agtggtgaac
agcctggatc cccctctgct gactaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga
```

[0398]

[0399] CpG 감소된 핵산 변이체 X07을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:7)

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgtctgc tgaggttctg cttctctgcc
accaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc taggttcccc cccagggtgc ccaagagctt ccccctttaac
acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt
gccaagccca ggcccccctg gatggggctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gtttcctggg ggcagccata cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta cctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgtagggag
ggcagcctgg ctaaggaaaa gacccagacc ctgcataagt ttatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggataggggat
gctgcctctg ccagggcttg gcctaagatg cacactgtga atgggtatgt gaataggagc
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc
accacccctg aggtccatag catcttcctg gagggccaca ctttcctggt gaggaaccac
agacaggcct ctctggagat ctctcccatc accttcctga ctgctcagac tctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttttgccat attagcagcc accagcatga tgggatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgaag actatgatga tgacctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaata gccccagctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaaaca ccccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaagag gactgggact atgctccccct ggtgctggcc
cctgatgata ggtcttataa gagccagtac ctgaacaatg ggccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaaa ccttcaaaac cagggaggcc
attcagcatg agtctggcat cctgggccct ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctatcctca tggcatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaagacttc
cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggccct
accaagtctg accccaggtg tctgaccagg tactattcta gctttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tgggcccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag
aataggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aatatcatgc atagcatcaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttttctg gctatacctt caagcacaag
atggtgtatg aggataccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaatc ctgggctgtg gatcctgggg tgccacaact ctgattttag gaacaggggg
atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg acatttctgc ttatctgctg tctaagaata atgccattga gcccagaagc
ttcagccaga atccccctgt gctgaagaga catcagaggg agatcaccag aactaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagctttca gaagaagacc
agacattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggaattca ctgatggcag cttcacccag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tggggcctta tatcagggct gaggtggagg ataatattat ggtgactttc
aggaaccagg ccagcaggcc ctactctttc tatagcagcc tgatctctta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacctac
ttctggaagg tccagcacca catggcccct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctatttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtccatt ctgggctgat tggccccctg
ctggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtccaggag
tttgccctgt tcttcactat ctttgatgag accaagagct ggtactttac tgagaacatg
gagaggaact gcagagctcc ttgcaatatt cagatggagg accccacctt caaggagaat
tacaggttcc atgccattaa tgggtacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa tatccacagc
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tataatctgt accctggggt gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa ggctggcatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg

[0400]

gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactat
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggcccccа tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagctct
ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg ggaagaagtg gcagacctac
aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggga atgtggactc ttctggcatc
aagcacaaca tcttcaatcc ccccatcatt gctaggtata ttaggctgca tcccacccac
tacagcatca ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgcagc
atgcccctgg gcatggagtc taaggccatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac
ttcaccaaca tgtttgccac ctggagcccc tctaaggcca ggctgcatct gcaggggagg
agcaatgcct ggaggcctca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc cagggggtca agagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac tctgttcttt
cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggact ctttcacccc tgtggtgaac
agcctggacc ccccccctgct gaccagatac ctgaggatcc acccccagtc ttgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggctc aggatctgta ctga

[0401]

[0402] CpG 감소된 핵산 변이체 X08을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:8)

atgcagattg agctgagcac ttgctttttt ctgtgcctgc tgaggttttg tttttctgcc
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt tcccttcaac
acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt
gctaagccta ggccccccctg gatgggcctg ctgggcccta ccattcaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtctctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagaga
gagaaggagg atgacaaggt cttccctggg ggctctcaca cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggaaaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta tctgagccat
gtggatctgg tgaaggacct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt ttatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctgggc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
accacccctg aggtgcacag catcttcctg gaaggccaca ctttcctggt gaggaaccat
aggcaggcca gcctggagat cagccctatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gatctggggc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tgggatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgcccagag gagcctcagc tgaggatgaa aaacaatgaa
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gagatttgat
gatgacaata gccctagctt tattcagatc aggtctgtgg ctaagaagca ccccaagacc
tgggtgcatt acattgctgc tgaggaggag gactgggatt atgctcctct ggtgctggcc
cctgatgata ggagctacaa gagccagtac ctgaataatg gccctcagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc
atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggctagcagg ccttacaaca tctatcccca tgggatcact
gatgtgagac ctctgtacag caggaggctg cccaaggggg tcaagcatct gaaagacttc
cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc
accaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa catggagagg
gatctggcct ctgggctgat tggcccctg ctgatctgtt acaaggaatc tgtggatcag
aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggtctt ggtacctgac tgaaaacatc cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtc
cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg
tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgtct
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacctt caagcacaag
atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt ctttatgagc
atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaataggggc
atgactgctc tgctgaaggt gagctcttgt gacaagaaca ctggggatta ctatgaggac
agctatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc
[0403] tttagccaga atcctcctgt cctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg

cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagctctcct
catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa agtggtgttt
caggagttca ctgatggctc tttcacccag cctctgtata ggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tgggccccta tatcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc
aggaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tatagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacttac
ttctggaagg tgcagcatca catggccccc accaaggatg agtttgactg taaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccctg
ctggtgtgcc ataccaatac tctgaaccct gctcatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgctctgt tcttcactat ctttgatgag accaagtctt ggtatttcac tgagaatatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac
tataggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatggggt ctaatgagaa catccacagc
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg agaaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaatctgt accctggggt ctttgagact gtggagatgc tgcctagcaa ggctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggaacat ctgcatgctg ggatgtctac tctgttcctg
gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggctt ctggccatat cagggacttt
cagattactg cctctgggca gtatggccag tgggccccca agctggctag gctgcattat
tctggcagca tcaatgcctg gtctactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggatctg
ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gtttagctct
ctgtacatta gccagttcat catcatgtac agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac
aggggcaatt ctactggcac cctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctggcatc
aagcacaaca tctttaaccc ccctatcatt gctaggtaca tcaggctgca tcccacccat
tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgcagc
atgcccctgg gcatggagag caaggccatt tctgatgccc agattactgc cagcagctac
ttcactaaca tgtttgccac ctggtctccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggtga agagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagctctagc caggatggcc accagtggac tctgtttttc
cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcactcc tgtggtgaac
agcctggacc ccccctgct gaccaggtat ctgaggattc acccccagtc ttgggtgcat
[0404] cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

[0405] CpG 감소된 핵산 변이체 X09를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:9)

```
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgtctgc tgagattttg cttttctgcc
actaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgtcttggg actacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttccca cctagggtgc ctaagagctt tcccttcaat
acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt
gccaagccta ggccccccctg gatgggcctg ctgggcccta ccatccaggc tgaagtgtat
gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg
gagaaggaag atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtctg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctactctta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggatct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgaag ggaagagctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaatagaagc
ctgcctggcc tgattgggtg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc
actacccctg aggtgcatag catcttcctg gaaggccata ccttcctggt gaggaatcat
aggcaggctt ctctggaaat ttctcccatc actttcctga ctgctcagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagctctc accagcatga tgggatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgtcctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt caggtttgat
gatgacaata gcccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagact
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgcccctct ggtgctggcc
```

[0406]

```
cctgatgaca ggagctataa gtctcagtac ctgaataatg gcccccagag gattgggagg
aagtataaga aggtgaggtt tatggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggcctctagg ccctacaata tctaccctca tggcatcact
gatgtgagac ccctgtatag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagct cttttgtgaa catggagagg
gatctggcct ctgggctgat tggcccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgaa
aataggtctt ggtatctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt tcaggcctct aatatcatgc attctatcaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggctc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctatacttt caagcacaag
atggtgtatg aggacactct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgtct
atggaaaatc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaatt ctgacttcag gaataggggg
atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggatta ctatgaggac
tcttatgaag atatctctgc ctatctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccactctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag
gattttgaca tttatgatga ggatgagaac cagtctccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcattact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgag cagctctcct
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagttca ctgatgggag cttcacccag cccctgtata gggggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttc
aggaaccagg ctagcaggcc ttacagcttt tacagcagcc tgatctctta tgaagaagac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaat tttgtgaagc ctaatgagac caagacttat
ttttggaagg tgcagcatca catggctcct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctactttt ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccctctg
ctggtgtgcc atactaacac tctgaaccct gcccatggga ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcactat ttttgatgag accaagtctt ggtatttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggctcc ctgcaacatc cagatggaag accccacctt caaggagaac
tataggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccacagc
atccatttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaacctgt atcctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggagggtgg aatgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgttcctg
gtgtatagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccatat cagggatttc
cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactat
tctggcagca tcaatgcctg gagcactaag gagccttttt cttggatcaa ggtggacctg
ctggccccta tgattattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctctagc
ctgtacatct ctcagttcat cattatgtat agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaata gcactggcac cctgatggtg ttttttggga atgtggactc ttctgggatc
aagcacaaca tctttaaccc ccccatcatt gccaggtata ttaggctgca ccccacccac
tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa ttcttgctct
atgcccctgg gcatggagag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttac
ttcaccaaca tgtttgccac ctggtctcct agcaaggcca ggctgcatct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gacctctatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac tctgttcttc
cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aaccaggata gctttacccc tgtggtgaac
agcctggacc ctcctctgct gaccagatac ctgaggatcc atcctcagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga
```

[0407]

[0408] CpG 감소된 핵산 변이체 X10을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:10)

```
atgcagattg agctgagcac ttgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttttctgct
actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg
ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt tcctttcaac
```

[0409]

acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt
gccaagccca ggccccccctg gatggggctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgattaccct gaagaacatg gctagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg
gaaaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccata cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg ggcccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttacagcta tctgagccat
gtggacctgg tgaaggatct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ctaaggagaa gactcagact ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgaag gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat
gctgcctctg ccagggcttg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattgggtg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
accacccctg aggtgcacag cattttcctg gagggccaca ccttcctggt gaggaatcac
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctggggc agtttctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ttgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaata gccccagctt catccagatt aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccctt ggtgctggct
cctgatgaca ggtcttataa gagccagtac ctgaacaatg ggccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tttaccctca tggcatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggagactg cccaaggggg tgaagcacct gaaggatttt
cccattctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg atcccaggtg cctgactagg tactactctt cttttgtgaa tatggagagg
gatctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggagct ggtacctgac tgagaatatc cagaggttcc tgcctaatcc tgctggggtc
cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacattatgc acagcatcaa tggctatgtg
tttgattctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta catcctgtct
attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caagcataag
atggtgtatg aggataccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgtct
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgtcataact ctgacttcag aaacaggggc
atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg atatctctgc ttatctgctg agcaagaata atgccattga gcccaggagc
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gactaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagtccccca ggtctttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagcccc
catgtgctga ggaacagggc tcagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtcttc
caggagttca ctgatggctc ttttacccag cctctgtaca gaggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttc
agaaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca tatggccctt actaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcttattttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggccccctg
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcactat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagagaaatt gtagggctcc ctgcaatatc cagatggagg accccacctt caaagaaaat
tacagattcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgcctgggct ggtgatggct
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatggggt ctaatgagaa catccactct
atccatttct ctggccatgt gttcactgtg agaaagaagg aggagtataa gatggctctg
tacaacctgt acccaggggt gtttgagact gtggaaatgc tgcccagcaa agctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg
gtgtacagca acaagtgcca gactcccctg ggcatggcct ctgggcacat cagggatttt
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac
tctggcagca ttaatgcttg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggatctg
ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctctagc

[0410]

ctgtacattt ctcagttcat catcatgtac agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac
aggggggaaca gcactgggac cctgatggtg ttctttggca atgtggatag ctctggcatc
aagcacaata tcttcaatcc ccccattatt gccaggtaca ttaggctgca tcctactcac
tactctatta ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgacctgaa cagctgttct
atgcccctgg gcatggagtc taaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac
ttcactaata tgtttgccac ctggagccct agcaaggcca gactgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggtga agagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc
cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcacccc tgtggtgaac
agcctggatc ctcccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac
cagattgctc tgaggatgga agtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

[0411]

[0412] CpG 감소된 핵산 변이체 X11을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:11)

```
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgct
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc taggttccct cccagggtgc ccaagagctt ccccttaat
acctctgtgg tgtacaagaa aaccctgttt gtggagttca ctgaccatct gttcaacatt
gccaagccca ggcccccttg gatgggcctg ctgggcccca ccattcaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tcattaccct gaagaacatg gcttctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctactctta tctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag
ggctctctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt ttattctgct gtttgctgtc
tttgatgagg gcaagagctg gcattctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaaaatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
accacccctg aggtgcacag catcttcctg gagggccaca cctttctggt gaggaatcac
aggcaggcca gcctggagat tagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa aaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaata gccccagctt tattcagatt aggtctgtgg ctaagaagca ccccaagact
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgcccctct ggtcctggcc
cctgatgata ggtcttacaa gagccagtat ctgaacaatg gcccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc
attcagcatg agtctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacactctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccttataaca tctaccctca tgggatcact
gatgtgaggc ccctgtactc tagaaggctg cccaaggggg tcaagcacct gaaggatttt
cccatcctgc ctggggagat tttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg accctaggtg cctgaccagg tactacagct cttttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccctctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag
aacaggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaaccc agctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aatattatgc atagcattaa tggctatgtg
tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcataag
atggtgtatg aggacaccct gactctgttc ccttttctg gggagactgt gtttatgagc
atggagaatc ctggcctgtg gatcctgggc tgccataatt ctgacttcag gaacaggggc
atgactgccc tgctgaaagt gagcagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaagac
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc
ttcagccaga acccccagt gctgaagagg caccagagag agatcaccag gactaccctg
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tttatgatga ggatgagaat cagagcccca ggagcttcca gaagaagact
aggcactatt ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagctctccc
catgtgctga ggaatagggc ccagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc
```

[0413]

```
caggagttca ctgatggcag ctttacccag cccctgtata gggggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta tatcagggct gaggtggagg acaatattat ggtgaccttt
aggaaccagg ccagcaggcc ctactctttc tatagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaat tttgtgaagc ctaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcatca catggccccc accaaggatg agtttgactg caaggcttgg
gcctatttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccctg
ctggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg atcccacctt caaggagaac
tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacactc tgcctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa tatccatagc
atccacttct ctggccatgt gttcactgtc aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tataatctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgtttctg
gtgtactcta acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctgggcacat cagggatttc
cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac
tctggcagca tcaatgcctg gtctaccaag gagccctttt cttggattaa ggtggacctg
ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gcaaaaagtg gcagacctac
aggggcaata gcactgggac tctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc
aagcacaata tcttcaaccc tcccatcatt gctaggtaca tcaggctgca ccccacccac
tatagcatca ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgcagc
atgcccctgg gcatggagtc caaagctatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac
ttcaccaaca tgtttgccac ctggtctccc tctaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aaaactatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agtctctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac tctgttcttc
cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggaca gcttcacccc tgtggtgaac
tctctggatc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggattc atccccagag ctgggtgcac
cagattgctc tgagaatgga ggtgctgggg tgtgaggctc aggacctgta ttga
```

[0414]

[0415] CpG 감소된 핵산 변이체 X12를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:12)

atgcagattg agctgtctac ttgttttttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc
accaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttcaac
acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttca ctgatcatct gtttaacatt
gccaagccca ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccaa ctatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tcatcaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttatagcta cctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt ctgtagggaa
ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt ttattctgct gtttgctgtg
tttgatgaag gcaagagctg gcactctgag accaagaatt ctctgatgca ggatagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg catactgtga atggctatgt gaacagaagc
ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtatt ggcatgtgat tgggatgggc
actacccctg aagtgcacag cattttcctg gagggccaca ctttcctggt gaggaaccac
aggcaggcct ctctggagat cagccccatt actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gatctgggcc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaataatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgataata gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc
tgggtgcact atattgctgc tgaagaggag gactgggact atgcccctct ggtgctggct
cctgatgaca ggagctataa gagccagtat ctgaacaatg ggccccagag gattgggagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat tctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacactctg
ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaata tttacccccа tggcatcact

[0416]

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggccct
accaagtctg accctaggtg tctgactagg tactacagca gctttgtgaa catggagaga
gacctggctt ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaacc agattatgtc tgataagagg aatgtcatcc tgttctctgt gtttgatgag
aacaggagct ggtatctgac tgagaacatt cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc attctattaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg tttttctctg ggtacacctt caagcacaag
atggtctatg aggacaccct gaccctgttc ccctttctg gggaaactgt gtttatgagc
atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgactttag gaatagggggc
atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaata ctggggatta ctatgaggac
agctatgagg atatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgata tttatgatga ggatgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagcccc
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggaattta ctgatggcag ctttacccag cccctgtaca gaggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttt
aggaaccagg cctctaggcc ctattctttt tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttttggaaag tgcagcacca catggccccc actaaggatg agtttgattg caaggcctgg
gcctatttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccctg
ctggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tctttaccat ctttgatgag actaagagct ggtatttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagagcccc ttgcaacatc cagatggagg accctacctt caaggagaac
tataggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgcctggcct ggtgatggct
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggga gcaatgagaa cattcatagc
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggccctg
tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgttcctg
gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc
cagattactg cctctgggca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcactac
tctgggtcta tcaatgcttg gagcaccaag gagcctttca gctggatcaa ggtggatctg
ctggccccca tgatcattca tgggatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtatattt ctcagttcat catcatgtat tctctggatg gcaaaaagtg gcagacctat
agagggaaca gcactgggac cctgatggtg ttttttggca atgtggatag ctctggcatc
aagcacaata tcttcaaccc ccccattatt gccaggtaca tcaggctgca ccccacccac
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgctct
atgcctctgg ggatggaaag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctat
ttcaccaata tgtttgccac ttggagccct agcaaggcta ggctgcatct gcagggcagg
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagactatga aagtgactgg ggtgaccacc caggggggtga aaagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc
cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggata gcttcacccc agtggtgaac
agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac

[0417] cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

[0418] CpG 감소된 핵산 변이체 X13을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:13)

```
atgcagattg agctgagcac ctgctttttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttccc cccagggtgc ccaagtcttt ccccttaac
acctctgtgg tgtataagaa gactctgttt gtggagttca ctgatcacct gttcaatatt
gccaagccca ggcccccttg gatgggcctg ctgggcccca ctatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tcatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
```

[0419]

```
gagaaggagg atgacaaggt gttcccaggg gggtctcaca cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg ggcccatggc ctctgaccct ctgtgcctga cttatagcta cctgtctcat
gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
gggagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaata gcctgatgca ggacagggat
gctgcttctg ctagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattgggtg tcacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggg
actactccag aagtgcacag catcttcctg gaggggcaca ccttcctggt gaggaatcac
aggcaggcca gcctggagat ttctcccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gatctggggc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tgggatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaact ctcccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgctcccct ggtgctggct
cctgatgata ggagctacaa gagccagtat ctgaataatg ggccccagag gattggcagg
aagtataaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggct
attcagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctataaca tctatcccca tgggatcact
gatgtgaggc ccctgtactc taggaggctg cccaaggggg tcaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg accccaggtg cctgactagg tactacagca gctttgtgaa catggagaga
gatctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaagagtc tgtggatcag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aacagaagct ggtacctgac tgagaacatt cagaggtttc tgcccaaccc tgctggggtc
cagctggagg accctgagtt tcaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta tatcctgagc
attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caagcacaag
atggtgtatg aggataccct gaccctgttc cctttctctg gggaaactgt gttcatgagc
atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggg tgccacaatt ctgatttcag gaacagaggc
atgactgctc tgctgaaggt gtctagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga acccaggtct
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gaccaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagact
aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttt
caggagttca ctgatggcag cttcacccag cccctgtaca gggggagct gaatgagcat
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc
agaaatcagg ctagcaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat
ttctggaagg tgcagcacca catggccccc accaaggatg agtttgattg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccctctg
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tctttactat ctttgatgag accaagtctt ggtattttac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac
tacagattcc atgccatcaa tggctacatt atggacactc tgcctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg tctatgggca gcaatgagaa cattcactct
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcctagcaa ggctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg
gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagagatttt
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggctccta agctggccag gctgcactac
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttta gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttctctagc
ctgtacatta gccagttcat catcatgtat agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaaca gcactgggac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctgggatc
aagcacaata tcttcaaccc ccccattatt gccaggtata ttaggctgca ccccactcac
tacagcatta ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgcagc
```

[0420]

```
atgcccctgg gcatggagtc taaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttac
ttcaccaaca tgtttgccac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggtga agagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagctctagc caggatggcc accagtggac cctgttcttt
cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcacccc tgtggtgaat
tctctggacc ctcccctgct gactaggtat ctgaggattc atccccagag ctgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ttga
```

[0421]

[0422] CpG 감소된 핵산 변이체 X14를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:14)

```
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttttctgcc
actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgacctg
ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc ccaagggtgc ccaagtcttt tcccttcaat
acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttta ctgatcatct gtttaacatt
gccaagccca ggccccccctg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat
gatactgtgg tgattaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgtctct gcatgctgtg
ggggtgtctt attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg
gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggctctcaca cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg ggcctatggc ctctgaccca ctgtgcctga cttacagcta tctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggg ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggatagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggtct
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
accacccctg aggtgcatag cattttcctg gagggccaca ccttcctggt gaggaaccac
aggcaggcta gcctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ttgtcctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaaca gcccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccctc ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctataa gtctcagtac ctgaacaatg gcccccagag aattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctat actgatgaga ccttcaaaac cagggaggcc
attcagcatg agtctggcat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggctagcagg ccttacaaca tctaccccca tgggatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttt
cccattctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc
accaagtctg accccaggtg cctgactagg tactactcta gctttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctgggctgat tggccccctg ctgatctgtt acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgataagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aacaggagct ggtacctgac tgagaacatc cagagattcc tgcccaaccc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aacatcatgc attctatcaa tgggtatgtg
tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgtctg catgaggtgg cctactggta cattctgagc
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caaacacaag
atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gtttatgagc
atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaact ctgacttcag aaacaggggc
atgactgccc tgctgaaggt gtcttcttgt gataagaaca ctggggacta ttatgaagac
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaata atgctattga gcccaggtct
ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactattt ctgtggagat gaagaaggaa
gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccta ggagcttcca gaagaagact
aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc
catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc
caggaattca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca gggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tgggccctta catcagggct gaggtggagg acaatatcat ggtgaccttt
aggaaccagg cctctaggcc ttacagcttc tactctagcc tgatctctta tgaagaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacttac
```

[0423]

```
ttctggaagg tgcagcacca catggctccc accaaggatg agtttgactg caaggcttgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tgggcccctg
ctggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca gacaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tttttaccat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg atcccacctt caaggagaac
tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct
caggaccaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa tatccactct
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tataacctgt atcctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggagagtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgtttctg
gtgtatagca acaagtgtca gacccctctg ggcatggcct ctgggcacat tagggacttt
cagatcactg cttctggcca gtatgggcag tgggctccca agctggccag gctgcactat
tctggcagca ttaatgcctg gagcaccaag gagcctttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccca tgatcatcca tgggatcaag acccaggggg ctaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatca gccagtttat catcatgtat tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaatt ctactggcac tctgatggtg ttctttggga atgtggatag ctctgggatc
aagcataata tcttcaatcc ccccattatt gctaggtata tcaggctgca ccccacccac
tatagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgacctgaa cagctgcagc
atgcccctgg gcatggagag caaggctatt tctgatgccc agatcactgc cagcagctac
tttactaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca gactgcacct gcagggcagg
tctaatgcct ggaggcctca ggtgaataac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aaaaccatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agtctctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac cctgttcttt
cagaatggga aggtgaaggt cttccagggc aaccaggata gcttcacccc tgtggtgaat
agcctggatc ctcctctgct gaccaggtat ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggctc aggacctgta ctga
```

[0424]

[0425] CpG 감소된 핵산 변이체 X15를 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:15)

```
atgcagattg agctgagcac ctgtttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg tttctctgcc
actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaat
acttctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttta ctgaccacct gttcaacatt
gctaagccca ggcctccctg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat
gatactgtgg tgattaccct gaagaacatg gcctctcatc cagtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgaaggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gcccaatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttatagcta cctgagccat
gtggatctgg tgaaggacct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagagag
ggctctctgg ctaaggagaa gacccagact ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag actaagaata gcctgatgca ggacagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg catactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattggctg tcacaggaaa tctgtctact ggcatgtgat tgggatgggc
actacccctg aggtgcactc tatcttcctg gagggccata ccttcctggt gaggaaccac
aggcaggcca gcctggagat ctctcccatt accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gatctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tgggatggag
gcttatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaact ctcccagctt tattcagatc aggtctgtgg ctaagaagca ccccaagact
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgcccctct ggtgctggct
cctgatgaca ggtcttacaa gtctcagtac ctgaataatg gccctcagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg
ctgatcatct tcaagaatca ggccagcagg ccctacaaca tctaccccca tggcatcact
gatgtgaggc cactgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggacttc
cccattctgc ctggggagat cttcaagtac aaatggactg tgactgtgga ggatggccct
accaagtctg accccaggtg tctgaccagg tactacagca gctttgtgaa tatggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
```

[0426]

```
aggggcaatc agatcatgtc tgataagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttgatgag
aacaggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aatatcatgc acagcatcaa tggctatgtc
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta tattctgagc
attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttttctg gctatacctt taagcacaag
atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgtct
atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggg
atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggacta ttatgaggac
agctatgagg acatctctgc ttacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggtct
ttcagccaga atcccccctgt gctgaagagg catcagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgattatgat gacactatct ctgtggaaat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggatt atggcatgag cagctctccc
catgtgctga ggaacagagc ccagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtcttc
caggagttca ctgatggctc tttcacccag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tggggcccta cattagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgactttc
agaaaccagg ccagcaggcc ttacagcttt tactcttctc tgattagcta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat
ttctggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgactg caaggcttgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tgggcccctg
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaat
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatt atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcaggtg gtatctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccacagc
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggaatacaa gatggctctg
tataacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttcctg
gtgtatagca ataagtgcca gaccccctg ggcatggctt ctggccacat cagggatttc
cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggctccca agctggctag gctgcattac
tctgggtcta tcaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ctaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatca gccagttcat cattatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacttac
aggggcaata gcactgggac tctgatggtg ttctttggca atgtggactc ttctggcatc
aagcacaaca tcttcaaccc tcccatcatt gccaggtaca ttaggctgca ccctacccac
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgatctgaa ctcttgcagc
atgcctctgg gcatggaaag caaagccatc tctgatgccc agatcactgc ctctagctat
ttcaccaata tgtttgccac ctggagccct agcaaggcca ggctgcacct gcagggcaga
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc
cagaatggca aggtgaaagt gttccagggc aaccaggata gcttcactcc tgtggtgaac
tctctggacc ctcccctgct gactaggtac ctgaggattc atccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga
```

[0427]

[0428] CpG 감소된 핵산 변이체 X16을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:16)

```
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagagctt tcctttcaac
acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaatatt
gctaagccca ggccaccctg gatgggcctg ctgggcccta ccattcaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgattactct gaagaatatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac ttctcagagg
gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggctctcaca cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ttctgatcca ctgtgcctga cctactctta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg
```

[0429]

```
tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaatt ctctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggtct
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
actacccctg aggtgcacag cattttcctg gagggccaca ccttcctggt caggaaccat
aggcaggcct ctctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac attagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ttgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaagctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaaca gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgctccctt ggtgctggct
cctgatgata ggagctacaa gtctcagtac ctgaataatg gcccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagagaggct
atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcaga ccctacaaca tctaccccca tgggatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc
accaagtctg accctaggtg cctgactagg tactactcta gctttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaatcc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt tcaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtg
tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta tatcctgagc
attggggctc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacttt taagcacaag
atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc ccctttctg gggagactgt gttcatgtct
atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgtcacaact ctgacttcag aaacaggggc
atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg acatttctgc ctatctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc
ttttctcaga atcccccctgt gctgaagagg caccagagag agatcaccag gaccactctg
cagtctgatc aggaggagat tgattatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaagag
gactttgata tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagact
agacactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagttca ctgatggcag ctttacccag cccctgtata gggggggagct gaatgagcat
ctgggcctgc tgggccccta tattagggct gaagtggagg acaacatcat ggtgaccttt
aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttt tacagcagcc tgattagcta tgaggaggat
cagagacagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca catggccct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcttacttct ctgatgtgga cctggagaaa gatgtgcact ctggcctgat tgggcccctg
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggga ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt ttttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgtaacatc cagatggagg atcctacttt caaggagaac
tacaggttcc atgccattaa tgggtacatc atggacaccc tgcctgggct ggtgatggcc
caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg tctatgggct ctaatgagaa catccactct
atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaacctgt accctggggt gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa agctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg
gtgtacagca ataagtgcca gactcccctg ggcatggctt ctgggcacat cagggatttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggctag gctgcactac
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttct cttggattaa ggtggacctg
ctggctccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttttctagc
ctgtatatta gccagttcat catcatgtat agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac
aggggaata gcactggcac cctgatggtg ttttttggca atgtggattc ttctggcatc
aagcataaca tcttcaatcc ccctatcatt gccaggtaca ttaggctgca tcccacccat
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgatctgaa cagctgtagc
atgcccctgg gcatggagtc caaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac
ttcaccaaca tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gaccagcatg
```

[0430]

```
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatgggc atcagtggac cctgtttttt
cagaatggca aagtgaaggt gtttcagggg aatcaggaca gctttacccc tgtggtgaac
agcctggatc ctcctctgct gactagatac ctgaggatcc acccccagag ctgggtccac
cagattgctc tgaggatgga ggtgctgggg tgtgaggctc aggacctgta ctga
```

[0431]

[0432] CpG 감소된 핵산 변이체 X17을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:17)

```
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc
accaggaggt actacctggg ggctgtggaa ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt ccccttaac
acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttta ctgaccacct gttcaatatt
gccaagccca ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccaa ccatccaggc tgaggtgtat
gatactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct attggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg gggtctcata cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctattctta cctgagccat
gtggacctgg tcaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagact ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaataggtct
ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
actacccctg aggtgcactc tatcttcctg gaggggcaca ccttcctggt gaggaaccac
aggcaggcca gcctggagat ctctcccatc accttcctga ctgcccagac tctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccat atcagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgcccagag gaaccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaaca gccccagctt tattcagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggatt atgccccct ggtgctggcc
cctgatgaca ggtcttacaa gtctcagtac ctgaacaatg gcccccagag gattgggagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg
ctgattatct tcaagaacca ggctagcagg ccctataaca tctaccccca tggcattact
gatgtgaggc ccctgtactc taggagactg cccaaggggg tgaagcacct gaaagacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa tatggagagg
gatctggctt ctggcctgat tgggcctctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggatcag
agggggaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttgatgag
aacaggagct ggtacctgac tgagaatatc cagaggttcc tgcctaatcc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggctagc aacattatgc acagcatcaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta cattctgtct
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag
atggtgtatg aggacactct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaatc ctgggctgtg gattctgggg tgccacaact ctgatttcag gaacaggggc
atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggatta ttatgaggac
agctatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc
ttcagccaga atccccctgt gctgaagaga caccagaggg agatcactag gaccactctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag
gactttgata tttatgatga ggatgagaac cagagcccca gaagcttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggatt atggcatgtc ttctagcccc
catgtgctga ggaacagggc tcagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagttca ctgatgggag cttcacccag cctctgtaca gggggggagct gaatgaacat
ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgactttc
aggaatcagg cctctaggcc ctacagcttc tactctagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaat tttgtgaaac ccaatgagac caagacctac
ttttggaagg tgcagcacca catggccccct accaaggatg agtttgactg taaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccccctg
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtatttcac tgagaacatg
```

[0433]

```
gagaggaact gtagggctcc ctgcaacatc cagatggagg atccaacttt caaggagaac
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggattaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccactct
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcctagcaa ggctggcatt
tggagagtgg agtgtctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgtctac cctgttcctg
gtgtactcta acaagtgcca gacccccctg gggatggctt ctgggcacat cagagatttt
cagattactg cttctgggca gtatggccag tgggctccca agctggccag actgcattac
tctggctcta ttaatgcttg gagcaccaag gagcctttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggctccca tgatcatcca tggcattaag actcaggggg ctaggcagaa gttcagcagc
ctgtatattt ctcagtttat tatcatgtat tctctggatg gcaagaagtg gcagacttac
aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc
aagcataaca tcttcaaccc ccccattatt gccaggtaca tcaggctgca ccccacccac
tattctatca ggagcactct gaggatggag ctgatggggt gtgacctgaa cagctgctct
atgcccctgg gcatggagag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttat
ttcaccaaca tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcaga
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cctaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagactatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatgggc atcagtggac cctgttcttc
cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac
agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc atccccagag ctgggtgcac
cagattgctc tgagaatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ttga
```

[0434]

[0435] CpG 감소된 핵산 변이체 X18을 인코딩하는 FVIII (SEQ ID NO:18)

atgcagattg agctgtctac ctgtttttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct
accaggaggt attatctggg ggctgtggag ctgagctggg actacatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaac
acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt
gccaagccca ggcccccctg gatggggctg ctgggcccca ctatccaggc tgaggtgtat
gatactgtgg tgattaccct gaagaacatg gcctctcacc ctgtgtctct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac ctctcagagg
gagaaggagg atgacaaggt gtttcctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg ggcccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctacagcta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggaaaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg
tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacagatct
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggg
accacccctg aggtgcatag catcttcctg gaggggcaca ccttcctggt gagaaatcat
aggcaggcca gcctggagat tagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atttctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgaa gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaaca gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgccccccc ggtgctggcc
ccagatgaca ggtcttacaa gagccagtac ctgaataatg gccccccagag gattgggagg
aagtataaga aagtgaggtt catggcttac actgatgaga cctttaagac tagggaggcc
attcagcatg agtctgggat tctgggccct ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctataata tttatcccca tgggattact
gatgtcaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccattctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg atcctaggtg cctgaccagg tactatagca gctttgtgaa catggagagg
gacctggctt ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggaatc tgtggaccag
aggggcaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag
aataggagct ggtatctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggcttct aacatcatgc atagcatcaa tgggtatgtg
tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctattggta catcctgagc

[0436]

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag
atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cctttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gattctgggc tgccataatt ctgacttcag aaacaggggc
atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaggac
tcttatgagg atatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga gcccaggagc
ttcagccaga acccccctgt cctgaagagg catcagaggg agatcactag gaccaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggaaat gaagaaggag
gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggtctttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgtc tagcagcccc
catgtgctga ggaacagagc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttt
caggagttca ctgatgggag cttcactcag cccctgtata gggggggagct gaatgagcat
ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc
aggaaccagg ccagcaggcc ctactctttc tactcttctc tgatcagcta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtcaagc ctaatgagac taagacctac
ttttggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgattg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccccctg
ctggtgtgtc acaccaatac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtcac tgtgcaggag
tttgccctgt ttttcactat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaacatg
gaaaggaatt gcagggctcc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac
tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct
caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa catccacagc
atccactttt ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaatctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc
tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg
gtgtactcta acaagtgcca gactcccctg ggcatggcct ctgggcacat cagggacttc
cagatcactg cctctgggca gtatggccag tgggccccta agctggctag gctgcattac
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccta tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccagacagaa gttctcttct
ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggggaatt ctactggcac tctgatggtg ttctttggga atgtggatag ctctgggatc
aagcataata ttttcaaccc ccccattatt gctaggtaca tcaggctgca cccaacccac
tactctatta ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgtagc
atgcccctgg gcatggagag caaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac
tttaccaaca tgtttgctac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggattttcag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga aaagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agtttctgat cagcagctct caggatggcc atcagtggac cctgttcttc
cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggata gcttcacccc tgtggtgaat
agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc atccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaagccc aggacctgta ctga

[0437]

[0438] 야생형 인자 VIII-BDD cDNA (SEQ ID NO:19)

ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC
ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT
GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG
AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC

[0439] ACCACTCCTG AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT

CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
GATGACAACT CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC
CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG
TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTCATGTCG
ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACT CAGACTTTCG GAACAGAGGC
ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
AGTTATGAAG ATATTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC
TTCTCCCAAA ACCCACCAGT CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
CAGTCAGATC AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCCC GCAGCTTTCA AAAGAAAACA
CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT ATGGGATGAG TAGCTCCCCA
CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC AGTGTCCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTTC
CAGGAATTTA CTGATGGCTC CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT
TTGGGACTCC TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTC
AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC TTATTTCTTA TGAGGAAGAT
CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC CTAATGAAAC CAAAACTTAC
TTTTGGAAAG TGCAACATCA TATGGCACCC ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG
GCTTATTTCT CTGATGTTGA CCTGGAAAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT
CTGGTCTGCC ACACTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC TGAAAATATG
GAAAGAAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG ATCCCACTTT TAAAGAGAAT
TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT
CAGGATCAAA GGATTCGATG GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAAA CATCCATTCT
ATTCATTTCA GTGGACATGT GTTCACCGTA CGAAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT TACCATCCAA AGCTGGAATT
TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG GGATGAGCAC ACTTTTTCTG
GTGTACAGCA ATAAGTGTCA GACTCCCCTG GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT
CAGATTACAG CTTCAGGACA ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
TCCGGATCAA TCAATGCCTG GAGCACCAAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA GTTCTCCAGC
CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
CGAGGAAATT CCACTGGAAC CTTAATGGTC TTCTTTGGCA ATGTGGATTC ATCTGGGATA
AAACACAATA TTTTTAACCC TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCCAACTCAT
TATAGCATTC GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC TTCATCCTAC
TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC GACTTCACCT CCAAGGGAGG
AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGACTTCCAG
AAGACAATGA AAGTCACAGG AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
TATGTGAAGG AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC TGTGGTGAAC
TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC ACCCCCAGAG TTGGGTGCAC

[0440] CAGATTGCCC TGAGGATGGA GGTTCTGGGC TGCGAGGCAC AGGACCTCTA CTGA

[0441] V3 인자 VIII cDNA (SEQ ID NO:20)

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATA
CTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCA
GGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTG
GAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCAT
CCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATG
CTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAG
GAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCAT
GGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTG
GCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAG
TTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCA
GGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCC
TGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAG
GTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAG
CCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCA
GCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGG
ATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTT
TGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGC
ACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGTGCTGGCCCCTGATGACAGGAGCTAC
AAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCATGGCCTA
CACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTATG
GGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCAT
GGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCC
CATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACC
CCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGC
CCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGT
GATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCTGCCCA
ACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTAT
GTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGC
CCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCC
TGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGC
TGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAC
TGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGC
CCAGGAGCTTCAGCCAGAACAGCAGGCACCCCAGCACCAGGCAGAAGCAGTTCAATGCCACCACCATCCCT
GAGAATGACATAGAGAAGACAGACCCATGGTTTGCCCACCGGACCCCCATGCCCAAGATCCAGAATGTGAG
CAGCTCTGACCTGCTGATGCTGCTGAGGCAGAGCCCCACCCCCCATGGCCTGAGCCTGTCTGACCTGCAGG
AGGCCAAGTATGAAACCTTCTCTGATGACCCCAGCCCTGGGGCCATTGACAGCAACAACAGCCTGTCTGAG
ATGACCCACTTCAGGCCCCAGCTGCACCACTCTGGGGACATGGTGTTCACCCCTGAGTCTGGCCTGCAGCT
GAGGCTGAATGAGAAGCTGGGCACCACTGCTGCCACTGAGCTGAAGAAGCTGGACTTCAAAGTCTCCAGCA
CCAGCAACAACCTGATCAGCACCATCCCCTCTGACAACCTGGCTGCTGGCACTGACAACACCAGCAGCCTG
GGCCCCCCCAGCATGCCTGTGCACTATGACAGCCAGCTGGACACCACCCTGTTTGGCAAGAAGAGCAGCCC
CCTGACTGAGTCTGGGGGCCCCCTGAGCCTGTCTGAGGAGAACAATGACAGCAAGCTGCTGGAGTCTGGCC
TGATGAACAGCCAGGAGAGCAGCTGGGGCAAGAATGTGAGCACCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCAC
TACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAG
GGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCC
AGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAG
GACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTA
TGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACT
TCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCT
GATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCT
GAACCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCA
AGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCC
ACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGCCTGGTGAT
GGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACT
TCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGG
GTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCA
CCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCT
CTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGG

[0442]

CTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCT
GGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCC
AGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTG
ATGGTGTTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAG
ATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACC
TGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAGCAGC
TACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGC
CTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTG
GGGTGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATCAGCAGCAGC
CAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAG
CTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCT
GGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGA

[0443]

[0444] CO3 인자 VIII cDNA (SEQ ID NO:21)

```
atgcagattg agctgtcaac ttgcttttc ctgtgcctgc tgagattttg tttttccgct
actagaagat actacctggg ggctgtggaa ctgtcttggg attacatgca gagtgacctg
ggagagctgc cagtggacgc acgatttcca cctagagtcc ctaaatcatt ccccttcaac
accagcgtgg tctataagaa aacactgttc gtggagttta ctgatcacct gttcaacatc
gctaagcctc ggccaccctg gatgggactg ctgggaccaa caatccaggc agaggtgtac
gacaccgtgg tcattacact gaaaaacatg gcctcacacc ccgtgagcct gcatgctgtg
ggcgtcagct actggaaggc ttccgaaggg gcagagtatg acgatcagac ttcccagaga
gaaaaagagg acgataaggt gtttcctggc gggtctcata cctatgtgtg gcaggtcctg
aaagagaatg gccccatggc ttccgaccct ctgtgcctga cctactctta tctgagtcac
gtggacctgg tcaaggatct gaacagcgga ctgatcggag cactgctggt gtgtagggaa
gggagcctgg ctaaggagaa aacccagaca ctgcataagt tcattctgct gttcgccgtg
tttgacgaag gaaaatcatg gcacagcgag acaaagaata gtctgatgca ggaccgggat
gccgcttcag ccagagcttg gcccaaaatg cacactgtga acggctacgt caatcgctca
ctgcctggac tgatcggctg ccaccgaaag agcgtgtatt ggcatgtcat cggaatgggc
accacacctg aagtgcactc cattttcctg gaggggcata cctttctggt ccgcaaccac
cgacaggcct ccctggagat ctctccaatt accttcctga cagctcagac tctgctgatg
gatctgggac agttcctgct gttttgccac atcagctccc accagcatga tggcatggag
gcctacgtga aagtggacag ctgtcccgag gaacctcagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaagctgaag actatgacga tgacctgacc gactccgaga tggatgtggt ccgattcgat
gacgataaca gcccctcctt tatccagatt agatctgtgg ccaagaaaca ccctaagaca
tgggtccatt acatcgcagc cgaggaagag gactgggatt atgcaccact ggtgctggca
ccagacgatc gatcctacaa atctcagtat ctgaacaatg gaccacagcg gattggcaga
aagtacaaga aagtgaggtt catggcttat accgatgaaa ccttcaagac tcgcgaagca
atccagcacg agagcgggat tctgggacca ctgctgtacg gagaagtggg ggacaccctg
ctgatcattt ttaagaacca ggccagcagg ccttacaata tctatccaca tggaattaca
gatgtgcgcc ctctgtacag ccggagactg ccaaagggcg tcaaacacct gaaggacttc
ccaatcctgc ccggggaaat ttttaagtat aaatggactg tcaccgtcga ggatggcccc
actaagagcg accctaggtg cctgacccgc tactattcta gtttcgtgaa tatggaaagg
gatctggcca gcggactgat cggcccactg ctgatttgtt acaaagagag cgtggatcag
agaggcaacc agatcatgtc cgacaagagg aatgtgattc tgttcagtgt ctttgacgaa
aaccggtcat ggtatctgac cgagaacatc cagagattcc tgcctaatcc agccggagtg
cagctggaag atcctgagtt tcaggcttct aacatcatgc atagtattaa tggctacgtg
ttcgacagtc tgcagctgtc agtgtgtctg cacgaggtcg cttactggta tatcctgagc
attggagcac agacagattt cctgagcgtg ttcttttccg gctacacttt taagcataaa
atggtgtatg aggacacact gactctgttc cccttcagcg gcgaaaccgt gtttatgtcc
atggagaatc ccgggctgtg gatcctggga tgccacaaca gcgatttcag gaatcgcggg
atgactgccc tgctgaaagt gtcaagctgt gacaagaaca ccggagacta ctatgaagat
tcatacgagg acatcagcgc atatctgctg tccaaaaaca atgccattga acccaggtct
tttagtcaga atcctccagt gctgaagagg caccagcgcg agatcacccg cactaccctg
cagagtgatc aggaagagat cgactacgac gatacaattt ctgtggaaat gaagaaagag
gacttcgata tctatgacga agatgagaac cagagtcctc gatcattcca gaagaaaacc
cggcattact ttattgctgc agtggagcgc ctgtgggatt atggcatgtc ctctagtcct
cacgtgctgc gaaatcgggc ccagtcaggg agcgtcccac agttcaagaa agtggtcttc
caggagttta cagacggatc ctttactcag ccactgtacc ggggcgaact gaacgagcac
```

[0445]

```
ctggggctgc tgggacccta tatcagagct gaagtggagg ataacattat ggtcaccttc
agaaatcagg catctaggcc ttacagtttt tattcaagcc tgatctctta cgaagaggac
cagaggcagg gagcagaacc acgaaaaaac ttcgtgaagc ctaatgagac caaaacatac
ttttggaagg tgcagcacca tatggcccca acaaaagacg aattcgattg caaggcatgg
gcctattttt ctgacgtgga tctggagaag gacgtccaca gtggcctgat cgggccactg
ctggtgtgtc atactaacac cctgaatccc gcacacggca ggcaggtcac tgtccaggaa
ttcgccctgt tctttaccat ctttgatgag acaaaaagct ggtacttcac cgaaaacatg
gagcgaaatt gccgggctcc atgtaatatt cagatggaag accccacatt caaggagaac
taccgctttc atgccatcaa tgggtatatt atggatactc tgcccggact ggtcatggct
caggaccaga gaatcaggtg gtacctgctg agcatggggt ccaacgagaa tatccactca
attcatttca gcggacacgt gtttactgtc cggaagaaag aagagtataa aatggccctg
tacaacctgt atcccggcgt gttcgaaacc gtcgagatgc tgcctagcaa ggcagggatc
tggagagtgg aatgcctgat tggggagcac ctgcatgccg gaatgtctac cctgtttctg
gtgtacagta ataagtgtca gacacccctg gggatggctt ccggacatat ccgggatttc
cagattaccg catctggaca gtacggccag tgggccccta agctggctag actgcactat
tccgggtcta tcaacgcttg gtccacaaaa gagcctttct cttggattaa ggtggacctg
ctggcaccaa tgatcattca tggcatcaaa actcaggggg ccaggcagaa gttctcctct
ctgtacatct cacagtttat catcatgtac agcctggatg gcaagaaatg gcagacatac
cgcggcaata gcacagggac tctgatggtg ttctttggca acgtggacag ttcagggatc
aagcacaaca ttttcaatcc ccctatcatt gctagataca tcaggctgca cccaacccat
tattctattc gaagtacact gcggatggaa ctgatggggt gcgatctgaa cagttgttca
atgcccctgg gaatggagtc caaggcaatc tctgacgccc agattaccgc tagctcctac
ttcactaata tgtttgctac ctggagcccc tccaaagcac gactgcatct gcagggacga
agcaacgcat ggcgaccaca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt cgattttcag
aaaactatga aggtgaccgg agtcacaact cagggcgtga aaagtctgct gacctcaatg
tacgtcaagg agttcctgat ctctagttca caggacggcc accagtggac actgttcttt
cagaacggaa aggtgaaagt cttccagggc aatcaggatt cctttacacc tgtggtcaac
tctctggacc caccctgct gactcgctac ctgcgaatcc acccacagtc ctgggtgcat
cagattgcac tgagaatgga agtcctgggc tgcgaggccc aggacctgta ttga
```

[0446]

[0447] 돌연변이된 TTR 프로모터(TTRmut), 합성 인트론, CpG 감소된 인자 VIII cDNA, 폴리 A 및 ITR을 포함하는 전장 카세트(SEQ ID NO:23)

[0448]

```
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc
gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
actccatcac taggggttcc tacgcgtgtc tgtctgcaca tttcgtagag cgagtgttcc
gatactctaa tctccctagg caaggttcat attgacttag gttacttatt ctccttttgt
tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttggagtcag cttggcaggg atcagcagcc
tgggttggaa ggaggggggta taaaagcccc ttcaccagga gaagccgtca cacagatcca
caagctcctg ctagcaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg
gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactg acactgacat ccacttttc ttttctcca
caggtttaaa cgccaccatg cagattgagc tgagcacctg cttcttcctg tgtctgctga
ggttctgctt ctctgccacc aggaggtatt acctgggggc tgtggagctg agctgggact
atatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgctag gttccccccc agggtgccca
agagcttccc ctttaacact tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg
accacctgtt caacattgcc aagcccaggc ccccctggat ggggctgctg gggcccacca
tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc agccaccctg
tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcttc tgaggggggct gagtatgatg
accagactag ccagagggag aaggaggatg acaaggtgtt tcctgggggc agccatacct
atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccccctg tgcctgacct
acagctacct gtctcatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggctc
tgctggtgtg tagggagggc agcctggcta aggaaaagac ccagaccctg cataagttta
tcctgctgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgagacc aagaacagcc
tgatgcagga tagggatgct gcctctgcca gggcttggcc taagatgcac actgtgaatg
ggtatgtgaa taggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc
atgtgattgg gatgggcacc acccctgagg tccatagcat cttcctggag ggccacactt
tcctggtgag gaaccacaga caggcctctc tggagatctc tcccatcacc ttcctgactg
ctcagactct gctgatggac ctgggccagt tcctgctgtt ttgccatatt agcagccacc
agcatgatgg gatggaggcc tatgtgaagg tggatagctg ccctgaggag cctcagctga
```

ggatgaagaa caatgaggag gctgaagact atgatgatga cctgactgat tctgagatgg
atgtggtgag gtttgatgat gacaatagcc ccagcttcat tcagatcagg tctgtggcca
agaaacaccc caagacctgg gtgcactaca ttgctgctga ggaagaggac tgggactatg
ctcccctggt gctggcccct gatgataggt cttataagag ccagtacctg aacaatgggc
cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tgaggttcat ggcctacact gatgaaacct
tcaaaaccag ggaggccatt cagcatgagt ctggcatcct gggccctctg ctgtatgggg
aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc tacaacatct
atcctcatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc aaggggggtga
agcacctgaa agacttcccc atcctgcctg gggagatctt taagtataag tggactgtga
ctgtggagga tggccctacc aagtctgacc ccaggtgtct gaccaggtac tattctagct
ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg gcccctgctg atctgctaca
aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt
tttctgtgtt tgatgagaat aggagctggt acctgactga gaacatccag aggtttctgc
ccaatcctgc tggggtgcag ctggaggatc ctgagttcca ggccagcaat atcatgcata
gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat gaggtggcct
actggtacat cctgagcatt ggggcccaga ctgactttct gtctgtgttc ttttctggct
ataccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg ataccctgac cctgttcccc ttctctgggg
agactgtgtt catgagcatg gagaatcctg ggctgtggat cctggggtgc cacaactctg
attttaggaa caggggatg actgccctgc tgaaggtgtc tagctgtgat aagaacactg
gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tttctgctta tctgctgtct aagaataatg
ccattgagcc cagaagcttc agccagaatc cccctgtgct gaagagacat cagagggaga
tcaccagaac taccctgcag tctgatcagg aggagattga ctatgatgac actatctctg
tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct atgatgagga tgagaatcag tctcccagga
gctttcagaa gaagaccaga cattacttca ttgctgctgt ggagaggctg tgggactatg
gcatgagctc tagccctcat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt
tcaagaaggt ggtgttccag gaattcactg atggcagctt cacccagccc ctgtacaggg
gggagctgaa tgagcacctg ggcctgctgg ggccttatat cagggctgag gtggaggata
atattatggt gactttcagg aaccaggcca gcaggcccta ctctttctat agcagcctga
tctcttatga ggaggatcag aggcaggggg ctgagcctag gaagaacttt gtgaagccca
atgagactaa gacctacttc tggaaggtcc agcaccacat ggcccctacc aaggatgagt
ttgactgcaa ggcctgggcc tatttctctg atgtggatct ggagaaggat gtccattctg
ggctgattgg ccccctgctg gtgtgccaca ctaacactct gaatcctgcc catggcaggc
aggtgactgt ccaggagttt gccctgttct tcactatctt tgatgagacc aagagctggt
actttactga gaacatggag aggaactgca gagctccttg caatattcag atggaggacc
ccaccttcaa ggagaattac aggttccatg ccattaatgg gtacatcatg gacaccctgc
ctggcctggt gatggctcag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc atgggctcta
atgagaatat ccacagcatc cacttctctg ggcatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg
agtacaagat ggctctgtat aatctgtacc ctggggtgtt tgaaactgtg gagatgctgc
cctctaaggc tggcatctgg agggtggagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca
tgagcaccct gttcctggtg tacagcaaca agtgccagac ccccctgggc atggcctctg
gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gccccaagc
tggccaggct gcactattct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag cccttcagct
ggatcaaggt ggacctgctg gcccccatga tcattcatgg catcaagacc caggggggca
ggcagaagtt cagctctctg tacatctctc agttcatcat catgtactct ctggatggga
agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcaccct gatggtgttc tttgggaatg
tggactcttc tggcatcaag cacaacatct tcaatccccc catcattgct aggtatatta
ggctgcatcc cacccactac agcatcaggt ctaccctgag gatggagctg atgggctgtg
acctgaactc ttgcagcatg cccctgggca tggagtctaa ggccatctct gatgcccaga
ttactgccag cagctacttc accaacatgt ttgccacctg gagcccctct aaggccaggc
tgcatctgca ggggaggagc aatgcctgga ggcctcaggt gaacaacccc aaggagtggc
tgcaggtgga tttccagaag accatgaagg tgactggggt gaccacccag ggggtcaaga
gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc
agtggactct gttctttcag aatgggaagg tgaaggtgtt tcagggcaat caggactctt
tcacccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatacctg aggatccacc
cccagtcttg ggtgcatcag attgccctga ggatggaggt gctgggctgt gaggctcagg
[0449] atctgtactg agcggccgca ataaaagatc agagctctag agatctgtgt gttggttttt

tgtgtaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac
tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag
[0450] cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagg

[0451] 돌연변이된 TTR 프로모터(TTRmut), 합성 인트론, CpG 감소된 인자 VIII cDNA, 폴리 A 및 ITR을 포함하는 전장 플라스미드 (SEQ ID NO:24)

[0452]

```
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc
gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
actccatcac taggggttcc tacgcgtgtc tgtctgcaca tttcgtagag cgagtgttcc
gatactctaa tctccctagg caaggttcat attgacttag gttacttatt ctccttttgt
tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttggagtcag cttggcaggg atcagcagcc
tgggttggaa ggaggggggta taaaagcccc ttcaccagga gaagccgtca cacagatcca
caagctcctg ctagcaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg
gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactg acactgacat ccacttttc ttttctccca
caggtttaaa cgccaccatg cagattgagc tgagcacctg cttcttcctg tgtctgctga
ggttctgctt ctctgccacc aggaggtatt acctgggggc tgtggagctg agctgggact
atatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgctag gttccccccc agggtgccca
agagcttccc ctttaacact tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg
accacctgtt caacattgcc aagcccaggc ccccctggat ggggctgctg gggcccacca
tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc agccaccctg
tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcttc tgaggggggct gagtatgatg
accagactag ccagagggag aaggaggatg acaaggtgtt tcctgggggc agccatacct
atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccccctg tgcctgacct
acagctacct gtctcatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggctc
tgctggtgtg tagggagggc agcctggcta aggaaaagac ccagaccctg cataagttta
tcctgctgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgagacc aagaacagcc
tgatgcagga tagggatgct gcctctgcca gggcttggcc taagatgcac actgtgaatg
ggtatgtgaa taggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc
atgtgattgg gatgggcacc acccctgagg tccatagcat cttcctggag ggccacactt
tcctggtgag gaaccacaga caggcctctc tggagatctc tcccatcacc ttcctgactg
ctcagactct gctgatggac ctgggccagt tcctgctgtt ttgccatatt agcagccacc
agcatgatgg gatggaggcc tatgtgaagg tggatagctg ccctgaggag cctcagctga
ggatgaagaa caatgaggag gctgaagact atgatgatga cctgactgat tctgagatgg
atgtggtgag gtttgatgat gacaatagcc ccagcttcat tcagatcagg tctgtggcca
agaaacaccc caagacctgg gtgcactaca ttgctgctga ggaagaggac tgggactatg
ctcccctggt gctggcccct gatgataggt cttataagag ccagtacctg aacaatgggc
cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tgaggttcat ggcctacact gatgaaacct
tcaaaaccag ggaggccatt cagcatgagt ctggcatcct gggccctctg ctgtatgggg
aggtgggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc tacaacatct
atcctcatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc aaggggtga
agcacctgaa agacttcccc atcctgcctg gggagatctt taagtataag tggactgtga
ctgtggagga tggccctacc aagtctgacc ccaggtgtct gaccaggtac tattctagct
ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg gcccctgctg atctgctaca
aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt
tttctgtgtt tgatgagaat aggagctggt acctgactga gaacatccag aggtttctgc
ccaatcctgc tggggtgcag ctggaggatc ctgagttcca ggccagcaat atcatgcata
gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat gaggtggcct
actggtacat cctgagcatt ggggcccaga ctgactttct gtctgtgttc ttttctggct
ataccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg ataccctgac cctgttcccc ttctctgggg
agactgtgtt catgagcatg gagaatcctg ggctgtggat cctggggtgc cacaactctg
attttaggaa caggggatg actgccctgc tgaaggtgtc tagctgtgat aagaacactg
gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tttctgctta tctgctgtct aagaataatg
ccattgagcc cagaagcttc agccagaatc cccctgtgct gaagagacat cagagggaga
tcaccagaac taccctgcag tctgatcagg aggagattga ctatgatgac actatctctg
tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct atgatgagga tgagaatcag tctcccagga
gctttcagaa gaagaccaga cattacttca ttgctgctgt ggagaggctg tgggactatg
gcatgagctc tagccctcat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt
tcaagaaggt ggtgttccag gaattcactg atggcagctt cacccagccc ctgtacaggg
```

[0453]

```
gggagctgaa tgagcacctg ggcctgctgg ggccttatat cagggctgag gtggaggata
atattatggt gactttcagg aaccaggcca gcaggcccta ctctttctat agcagcctga
tctcttatga ggaggatcag aggcaggggg ctgagcctag gaagaacttt gtgaagccca
atgagactaa gacctacttc tggaaggtcc agcaccacat ggcccctacc aaggatgagt
ttgactgcaa ggcctgggcc tatttctctg atgtggatct ggagaaggat gtccattctg
ggctgattgg ccccctgctg gtgtgccaca ctaacactct gaatcctgcc catggcaggc
aggtgactgt ccaggagttt gccctgttct tcactatctt tgatgagacc aagagctggt
actttactga gaacatggag aggaactgca gagctccttg caatattcag atggaggacc
ccaccttcaa ggagaattac aggttccatg ccattaatgg gtacatcatg gacaccctgc
ctggcctggt gatggctcag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc atgggctcta
atgagaatat ccacagcatc cacttctctg ggcatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg
agtacaagat ggctctgtat aatctgtacc ctggggtgtt tgaaactgtg gagatgctgc
cctctaaggc tggcatctgg agggtggagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca
tgagcaccct gttcctggtg tacagcaaca agtgccagac ccccctgggc atggcctctg
gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gcccccaagc
tggccaggct gcactattct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag cccttcagct
ggatcaaggt ggacctgctg gcccccatga tcattcatgg catcaagacc caggggggca
ggcagaagtt cagctctctg tacatctctc agttcatcat catgtactct ctggatggga
agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcaccct gatggtgttc tttgggaatg
tggactcttc tggcatcaag cacaacatct tcaatccccc catcattgct aggtatatta
ggctgcatcc cacccactac agcatcaggt ctaccctgag gatggagctg atgggctgtg
acctgaactc ttgcagcatg cccctgggca tggagtctaa ggccatctct gatgcccaga
ttactgccag cagctacttc accaacatgt ttgccacctg gagcccctct aaggccaggc
tgcatctgca ggggaggagc aatgcctgga ggcctcaggt gaacaacccc aaggagtggc
tgcaggtgga tttccagaag accatgaagg tgactggggt gaccacccag ggggtcaaga
gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc
agtggactct gttctttcag aatgggaagg tgaaggtgtt tcagggcaat caggactctt
tcacccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatacctg aggatccacc
cccagtcttg ggtgcatcag attgccctga ggatggaggt gctgggctgt gaggctcagg
atctgtactg agcggccgca ataaaagatc agagctctag agatctgtgt gttggttttt
tgtgtaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac
tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag
cgagcgagcg cgcagctgcc tgcaggggca gcttgaagga aatactaagg caaaggtact
gcaagtgctc gcaacattcg cttatgcgga ttattgccgt agtgccgcga cgccgggggc
aagatgcaga gattgccatg gtacaggccg tgcggttgat attgccaaaa cagagctgtg
ggggagagtt gtcgagaaag agtgcggaag atgcaaaggc gtcggctatt caaggatgcc
agcaagcgca gcatatcgcg ctgtgacgat gctaatccca aaccttaccc aacccacctg
gtcacgcact gttaagccgc tgtatgacgc tctggtggtg caatgccaca aagaagagtc
aatcgcagac aacattttga atgcggtcac acgttagcag catgattgcc acggatggca
acatattaac ggcatgatat tgacttattg aataaaattg ggtaaatttg actcaacgat
gggttaattc gctcgttgtg gtagtgagat gaaaagaggc ggcgcttact accgattccg
cctagttggt cacttcgacg tatcgtctgg aactccaacc atcgcaggca gagaggtctg
caaaatgcaa tcccgaaaca gttcgcaggt aatagttaga gcctgcataa cggtttcggg
atttttata tctgcacaac aggtaagagc attgagtcga taatcgtgaa gagtcggcga
gcctggttag ccagtgctct ttccgttgtg ctgaattaag cgaataccgg aagcagaacc
ggatcaccaa atgcgtacag gcgtcatcgc cgcccagcaa cagcacaacc caaactgagc
cgtagccact gtctgtcctg aattcattag taatagttac gctgcggcct tttacacatg
accttcgtga aagcgggtgg caggaggtcg cgctaacaac ctcctgccgt tttgcccgtg
catatcggtc acgaacaaat ctgattacta aacacagtag cctggatttg ttctatcagt
aatcgacctt attcctaatt aaatagagca aatcccctta ttgggggtaa gacatgaaga
tgccagaaaa acatgacctg ttggccgcca ttctcgcggc aaaggaacaa ggcatcgggg
caatccttgc gtttgcaatg gcgtaccttc gcggcagata taatggcggt gcgtttacaa
aaacagtaat cgacgcaacg atgtgcgcca ttatcgccta gttcattcgt gaccttctcg
acttcgccgg actaagtagc aatctcgctt atataacgag cgtgtttatc ggctacatcg
gtactgactc gattggttcg cttatcaaac gcttcgctgc taaaaaagcc ggagtagaag
atggtagaaa tcaataatca acgtaaggcg ttcctcgata tgctggcgtg gtcggaggga
actgataacg gacgtcagaa aaccagaaat catggttatg acgtcattgt aggcggagag
ctatttactg attactccga tcaccctcgc aaacttgtca cgctaaaccc aaaactcaaa
```

[0454]

tcaacaggcg ccggacgcta ccagcttctt tcccgttggt gggatgccta ccgcaagcag
cttggcctga aagacttctc tccgaaaagt caggacgctg tggcattgca gcagattaag
gagcgtggcg ctttacctat gattgatcgt ggtgatatcc gtcaggcaat cgaccgttgc
agcaatatct gggcttcact gccgggcgct ggttatggtc agttcgagca taaggctgac
agcctgattg caaaattcaa agaagcgggc ggaacggtca gagagattga tgtatgagca
gagtcaccgc gattatctcc gctctggtta tctgcatcat cgtctgcctg tcatgggctg
ttaatcatta ccgtgataac gccattacct acaaagccca gcgcgacaaa aatgccagag
aactgaagct ggcgaacgcg gcaattactg acatgcagat gcgtcagcgt gatgttgctg
cgctcgatgc aaaatacacg aaggagttag ctgatgctaa agctgaaaat gatgctctgc
gtgatgatgt tgccgctggt cgtcgtcggt tgcacatcaa agcagtctgt cagtcagtgc
gtgaagccac caccgcctcc ggcgtggata atgcagcctc cccccgactg gcagacaccg
ctgaacggga ttatttcacc ctcagagaga ggctgatcac tatgcaaaaa caactggaag
gaacccagaa gtatattaat gagcagtgca gatagagttg cccatatcga tgggcaactc
atgcaattat tgtgagcaat acacacgcgc ttccagcgga gtataaatgc ctaaagtaat
aaaaccgagc aatccattta cgaatgtttg ctgggtttct gttttaacaa cattttctgc
gccgccacaa attttggctg catcgacagt tttcttctgc ccaattccag aaacgaagaa
atgatgggtg atggtttcct ttggtgctac tgctgccggt ttgttttgaa cagtaaacgt
ctgttgagca catcctgtaa taagcagggc cagcgcagta gcgagtagca ttttttttcat
ggtgttattc ccgatgcttt ttgaagttcg cagaatcgta tgtgtagaaa attaaacaaa
ccctaaacaa tgagttgaaa tttcatattg ttaatattta ttaatgtatg tcaggtgcga
tgaatcgtca ttgtattccc ggattaacta tgtccacagc cctgacgggg aacttctctg
cgggagtgtc cgggaataat taaaacgatg cacacagggt ttagcgcgta cacgtattgc
attatgccaa cgccccggtg ctgacacgga agaaaccgga cgttatgatt tagcgtggaa
agatttgtgt agtgttctga atgctctcag taaatagtaa tgaattatca aaggtatagt
aatatctttt atgttcatgg atatttgtaa cccatcggaa aactcctgct ttagcaagat
tttccctgta ttgctgaaat gtgatttctc ttgatttcaa cctatcatag gacgtttcta
taagatgcgt gtttcttgag aatttaacat ttacaacctt tttaagtcct tttattaaca
cggtgttatc gttttctaac acgatgtgaa tattatctgt ggctagatag taaatataat
gtgagacgtt gtgacgtttt agttcagaat aaaacaattc acagtctaaa tcttttcgca
cttgatcgaa tatttcttta aaaatggcaa cctgagccat tggtaaaacc ttccatgtga
tacgagggcg cgtagtttgc attatcgttt ttatcgtttc aatctggtct gacctccttg
tgttttgttg atgatttatg tcaaatatta ggaatgtttt cacttaatag tattggttgc
gtaacaaagt gcggtcctgc tggcattctg gagggaaata caaccgacag atgtatgtaa
ggccaacgtg ctcaaatctt catacagaaa gatttgaagt aatattttaa ccgctagatg
aagagcaagc gcatggagcg acaaaatgaa taaagaacaa tctgctgatg atccctccgt
ggatctgatt cgtgtaaaaa atatgcttaa tagcaccatt tctatgagtt accctgatgt
tgtaattgca tgtatagaac ataaggtgtc tctggaagca ttcagagcaa ttgaggcagc
gttggtgaag cacgataata atatgaagga ttattccctg gtggttgact gatcaccata
actgctaatc attcaaacta tttagtctgt gacagagcca acacgcagtc tgtcactgtc
aggaaagtgg taaaactgca actcaattac tgcaatgccc tcgtaattaa gtgaatttac
aatatcgtcc tgttcggagg gaagaacgcg ggatgttcat tcttcatcac ttttaattga
tgtatatgct ctcttttctg acgttagtct ccgacggcag gcttcaatga cccaggctga
gaaattcccg gacccttttt gctcaagagc gatgttaatt tgttcaatca tttggttagg
aaagcggatg ttgcgggttg ttgttctgcg ggttctgttc ttcgttgaca tgaggttgcc
ccgtattcag tgtcgctgat ttgtattgtc tgaagttgtt tttacgttaa gttgatgcag
atcaattaat acgatacctg cgtcataatt gattatttga cgtggtttga tggcctccac
gcacgttgtg atatgtagat gataatcatt atcactttac gggtcctttc cggtgatccg
acaggttacg gggcggcgac ctgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt
atttcacacc gcatacgtca aagcaaccat agtacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ttagcgcccg
ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc
taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa
aacttgattt gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc
ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac
tcaactctat ctcgggctat tcttttgatt tagacctgca ggcatgcaag cttggcactg
gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgcctt
gcagcacatc ccccttccgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct
tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgcgatttat tcaacaaagc cgccgtcccg

tcaagtcagc gtaatgctct gccagtgtta caaccaatta accaattctg attagaaaaa
ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt
ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc
aagatcctgg tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt
cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgacga ctgaatccgg
tgagaatggc aaaagcttat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg
ctcgtcatca aaatcactcg catcaaccaa accgttattc attcgtgatt gcgcctgagc
gagacgaaat acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg
gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa
tacctggaat gctgttttcc cggggatcgc agtggtgagt aaccatgcat catcaggagt
acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac
catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcca tgtttcagaa acaactctgg
cgcatcgggc ttcccataca atcgatagat tgtcgcacct gattgcccga cattatcgcg
agcccattta tacccatata aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gcttcgagca
agacgtttcc cgttgaatat ggctcataac acccttgtta ttactgttta tgtaagcaga
cagttttatt gttcatgatg atatattttt atcttgtgca atgtaacatc agagattttg
agacacaacg tggctttgtt gaataaatcg aacttttgct gagttgaagg atcagatcac
gcatcttccc gacaacgcag accgttccgt ggcaaagcaa aagttcaaaa tcaccaactg
gtccacctac aacaaagctc tcatcaaccg tggctccctc actttctggc tggatgatgg
ggcgattcag gcctggtatg agtcagcaac accttcttca cgaggcagac ctctcgacgg
agttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt
tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga
taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag
caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga
gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccaggggaa
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt
tgtgatgctc gtcaggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgt

[0455]

[0456] X01-X18 핵산 서열에 의해 인코딩된 FVIII-BDD. 굵은 글씨/밑줄이 있는 SQ 서열 (SEQ ID NO:25)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTS
VVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSY
WKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKD
LNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWP
KMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI
TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDS
EMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG
PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYP
HGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNM
ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGV
QLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMV
YEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYED
ISAYLLSKNNAIEPR**SFSQNPPVLKRHQR**EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYD
EDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSF
TQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKN
FVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH
GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL
PGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS
KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL
HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY
RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP
LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMK
VTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL
LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0457]

[0458] BDD를 갖는 야생형 FVIII (SEQ ID NO:26)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSF
PFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV
DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAAS
ARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASL
EISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDD
DLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQ
YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRP
YNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS
SFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLP
NPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTF
KHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKI
QNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHS
GDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGP
PSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTE
SGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQ
NILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNP
DMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGK
GEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHT
VTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLE
GLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQW
SKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPI
YLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGT
SATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLL
QGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPE
KTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREI
TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMS
SSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT
FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWA
YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERN
CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSG
HVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQ
TPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGI
KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA
RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA
RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQ
WTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0459]

[0460] AAV-LK03 VP1 캡시드 (SEQ ID NO:27)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKG
EPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKR
LLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQ
PLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWA
LPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKK
LSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMV
PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLM
NPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDN
NNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNV
MITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWA
KIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVE
IEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRPL

[0461]

[0462] AAV-SPK-8005 및 AAV-SPK-hFIX에서 사용된 AAV-SPK VP1 캡시드 (SEQ ID NO:28)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAA
ALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGK
KRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPA**A**PSG**V**G**PN**TMAAGGGAPMA
DNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGY
FDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPY
VLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSS
YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQ
NNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEI
KTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGG
FGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKS
TNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

[0463]

[0464] **hFVIII 벡터(WT, C03, X09, X02, X06, X08, X15, X05, X18, X14, X01, X12, X04, X11, X07, X03, X16, X13, X17 및 X10)의 동일성 백분율 매트릭스**

	hFVIII WT	hFVIII CO3	hFVIII X09	hFVIII X02	hFVIII X06	hFVIII X08	hFVIII X15	hFVIII X05	hFVIII X18	hFVIII X14	hFVIII X01	hFVIII X12	hFVIII X04	hFVIII X11	hFVIII X07	hFVIII X03	hFVIII X16	hFVIII X13	hFVIII X17	hFVIII X10
hFVIII WT		77.2	79.5	79.1	79.3	79.2	79.3	79.1	79	79.6	79.6	79.4	79.4	79.4	79.2	79.4	79.1	79	79.6	79.3
hFVIII CO3	77.2		81.9	81.9	81.5	81.3	81.6	81.6	81.2	81.4	81.1	81.1	81.3	81.7	81.8	81.6	81.9	81.8	82.1	82.2
hFVIII X09	79.5	81.9		91.5	91.4	91.8	92	91.8	91	91.4	91.5	91.5	91.7	91.7	92.2	91.5	92.1	91.8	91.1	91.6
hFVIII X02	79.1	81.9	91.5		91.4	91.3	92	92.1	92.2	91.7	92	91.9	91.9	92	91.5	91	91.5	92.3	91.9	92.1
hFVIII X06	79.3	81.5	91.4	91.4		91.8	91.9	91.8	91.5	91.8	92.3	91.7	91.8	92	91.5	91.4	91.7	92.4	91.6	91.8
hFVIII X08	79.2	81.3	91.8	91.3	91.8		91.8	91.5	91.5	91.8	92.2	91.5	92.3	92.5	92	91.7	91.4	92.3	91.6	91.9
hFVIII X15	79.3	81.6	92	92	91.9	91.8		92.2	91.6	91.7	92.3	92.1	92.2	92.5	92	92.1	92.2	92.3	92.5	92
hFVIII X05	79.1	81.6	91.8	92.1	91.8	91.5	92.2		92.5	91.9	92.7	92.4	92.1	91.5	92.1	91.6	91.7	92.3	91.9	92
hFVIII X18	79	81.2	91	92.2	91.5	91.5	91.6	92.5		91.6	93	92.1	91.8	91.7	92.2	91.4	91.1	91.8	91.8	92
hFVIII X14	79.6	81.4	91.4	91.7	91.8	91.8	91.7	91.9	91.6		93	92	91.6	93.4	92.2	92.5	92.6	92.2	92.4	92.1
hFVIII X01	79.6	81.1	91.5	92	92.3	92.2	92.3	92.7	93	93		93.4	92.3	92.5	92.6	92.4	92.2	92.6	92.4	92.6
hFVIII X12	79.4	81.1	91.5	91.9	91.7	91.5	92.1	92.4	92.1	92	93.4		92	92	92.4	92.4	91.7	92.4	92.6	92.5
hFVIII X04	79.4	81.3	91.7	91.9	91.8	92.3	92.2	92.1	91.5	91.6	92.3	92		92.6	92	91.5	91.5	92	91.9	91.9
hFVIII X11	79.4	81.7	91.8	92	92.3	92.5	92.5	91.5	91.8	91.8	92.5	92	92.6		92.6	92	91.9	92.3	91.8	92.5
hFVIII X07	79.2	81.8	91.5	91.5	92	92.5	92	92.1	91.7	91.9	92.6	92.4	92.6	92.6		92.1	92	92.4	92.7	92.8
hFVIII X03	79.4	81.6	91.5	91	91.7	92.5	92.1	92.7	92.6	92.6	92.5	92.4	92.6	92.6	92.1		92.4	92.4	92.8	92.9
hFVIII X16	79.1	81.9	92.1	91.5	91.4	91.7	91.9	92.4	92.6	92.2	92.6	92.4	92.4	92.6	92.1	92		92.4	92.6	92.9
hFVIII X13	79	81.8	92.3	92.4	92.3	92.4	92.3	92.4	92.7	92.7	92.6	92.4	92.4	92.4	92.7	92.4	92.4		92.8	92.9
hFVIII X17	79.6	82.1	91.1	91.9	91.6	91.6	92.5	91.9	91.8	91.8	92.4	92.6	91.9	91.8	91.9	92.1	92	92.4		92.9
hFVIII X10	79.3	82.2	91.6	92.1	91.8	91.9	92	92	92	92	92.1	92.6	92.5	91.9	92.7	91.6	92.8	92.8	92.9	

[0465]

[0466] *사용된 특정 정의/약어*

[0467] BDD: B 도메인(BD)의 전부 또는 적어도 일부가 결실됨

[0468] FVIII-BDD: B 도메인 결실을 갖는 FVIII

[0469] SQ: SFSQNPPVLKRHQR (SEQ ID NO:29)

[0470] FVIII/SQ: SQ를 갖는 FVIII

[0471] FVIIIX01-X18: SEQ ID No:1-18에 각각 기재된 CpG 감소된 FVIII 인코딩 핵산 변이체.

[0472] TTRmut: TAmGTGTAG로부터 TATTGACTTAG로의 4개의 돌연변이를 갖는 TTR 프로모터

[0473] CO3: SEQ ID NO:21로 기재된 코돈 최적화된 FVIII 핵산 변이체

[0474] NHP: 비 인간 영장류

[0475] ALT: 알라닌 아미노트랜스페라제

[0476] D-이량체: 혈액 응고의 분해로부터의 단백질 단편

[0477] SPK-8005: AAV-SPK-8005로도 언급되는, AAV 캡시드(SEQ ID NO:28) + TTRmut-hFVIII-X07

[0478] SPK-8011: AAV-SPK-8011로도 언급되는 AAV LK03 캡시드(SEQ ID NO:27) + TTRmut-hFVIII-X07

[0479] 본 발명의 특정 구현예가 상기 기재되고 구체적으로 예시되었으나, 본 발명이 상기 구현예로 제한되는 것으로 의도되지는 않는다. 하기 청구범위에 기재된 바와 같은 본 발명의 범위 및 사상으로부터 벗어남이 없이 다양한 변형이 거기에 대해 이루어질 수 있다.

도면

도면1

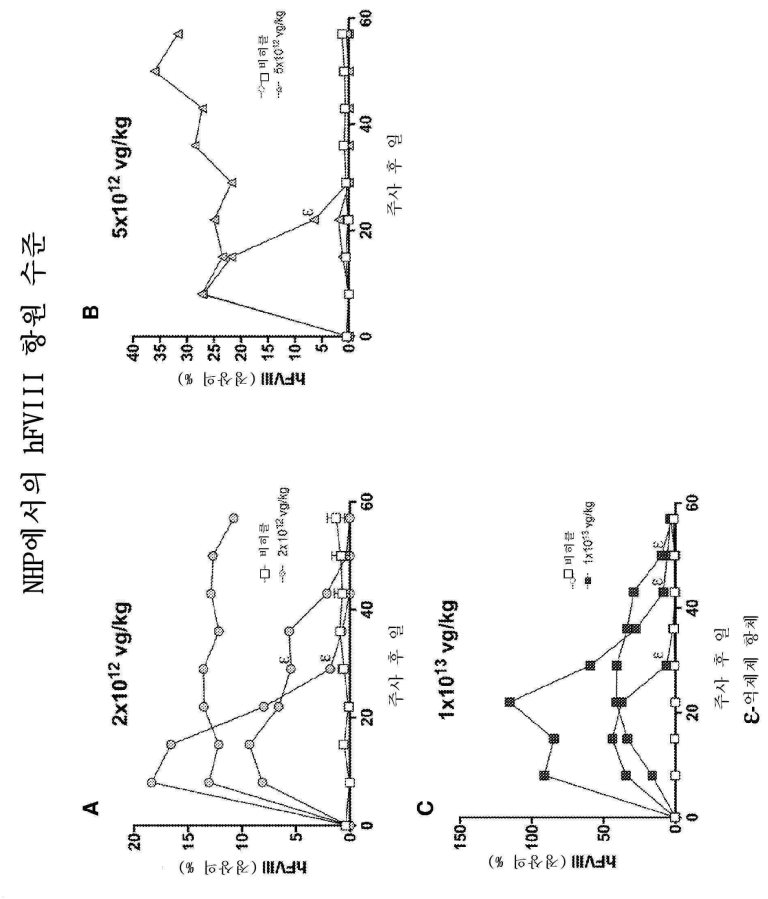
비-인간 영장류 (NHP) 연구 계획

종	식도물구수 원숭이 (마카크 파스시쿨라리스)
시험 항목	SPK-8005 또는 SPK-8011 (LK03 캡시드)
연령	2 내지 3세
체중	2 내지 4 kg
지속기간	8주

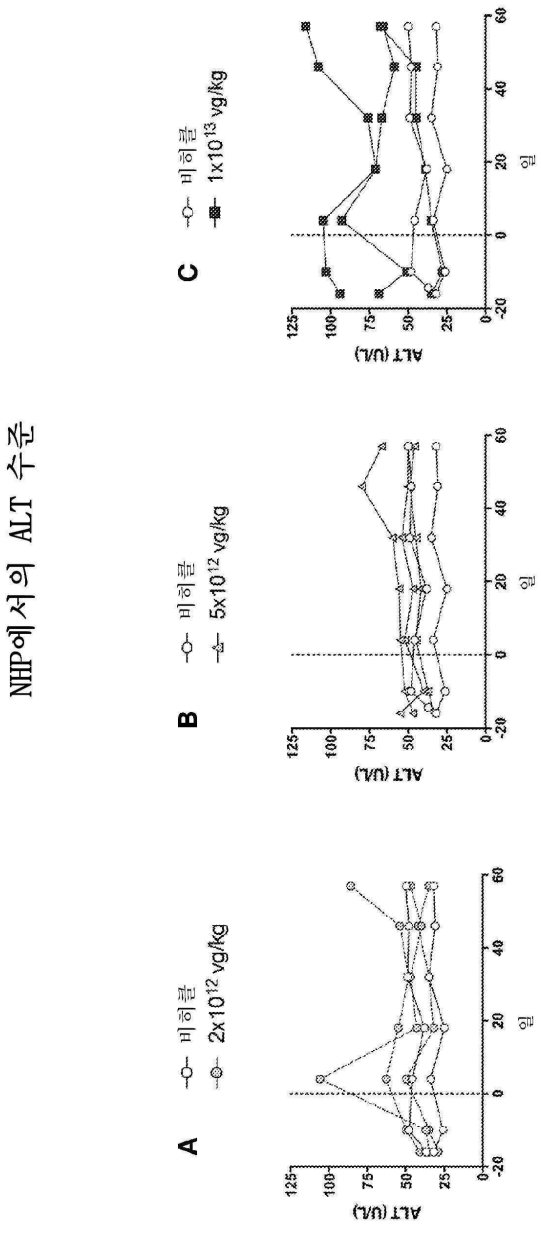
AAV-SPK-8005			
그룹	NHP의 # 수컷	용량 수준 vg/kg	
1 (대조군)	2	0	
2 (낮음)	3	$2x10^{12}$	
3 (중간)	3	$5x10^{12}$	
4 (높음)	3	$1x10^{13}$	

AAV-SPK-8011 (LK03 캡시드)			
그룹	NHP의 # 수컷	용량 수준 vg/kg	
1 (대조군)	2	0	
2 (낮음)	3	$2x10^{12}$	
3 (중간)	3	$6x10^{12}$	
4 (높음)	3	$2x10^{13}$	

도면2

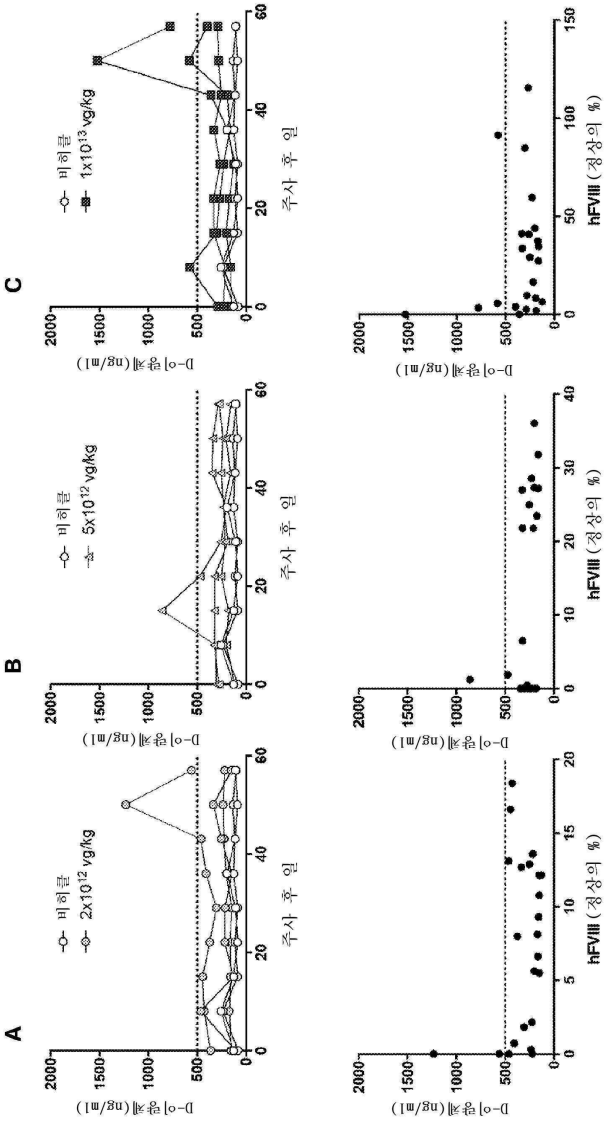

NHP에서의 hFVIII 항원 수준
A
2x10^12 vg/kg
B
5x10^12 vg/kg
C
1x10^13 vg/kg
hFVIII (정상의 %)
주사 후 일
비히클
ε-인계계 항계

도면3


NHP에서의 ALT 수준
A
비히클
2x10^12 vg/kg
B
비히클
5x10^12 vg/kg
C
비히클
1x10^13 vg/kg
ALT (U/L)
일

도면4

NHP에서의 D-이량체 수준



도면5

개요

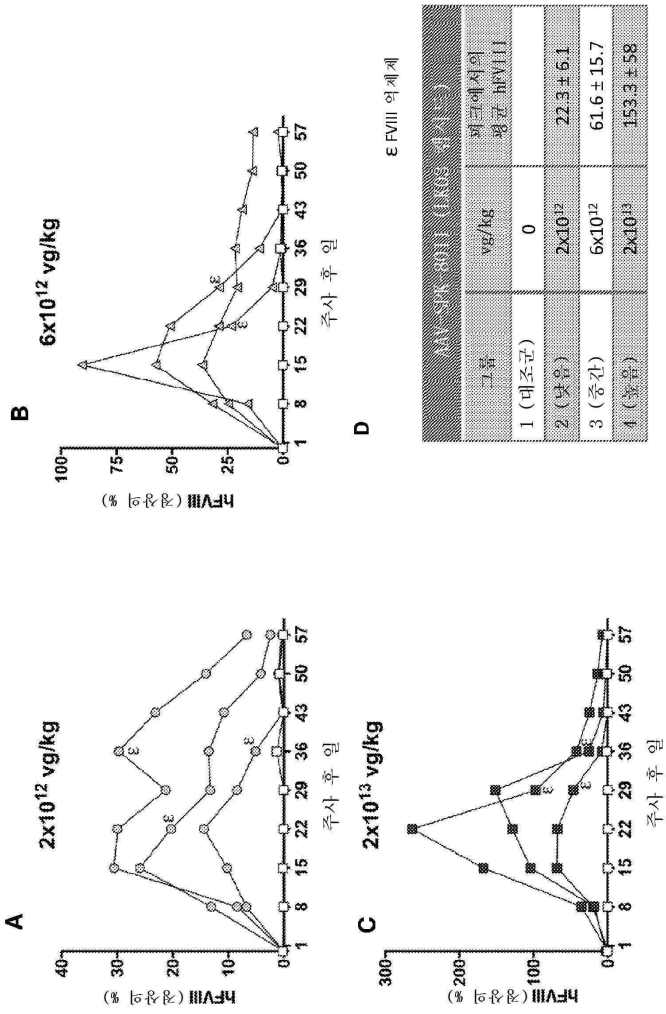
- SPK-8005의 3개 모두의 용량에서 달성된 hFVIII의 치료 수준

용량	보든 동물에서의 평균 피크 hFVIII (정상의 %)	억제제가 없는 NHP에서의 평균 "안정적" hFVIII (정상의 %)
$2x10^{12}$ vg/kg	13.2	10.8
$5x10^{12}$ vg/kg	27.1	31.8
$1x10^{13}$ vg/kg	54.1	N/A

- 예상된 바와 같은 6/8 동물에서 관찰된 인간 FVIII에 대한 중화 Ab
- 안전성 문제 없음

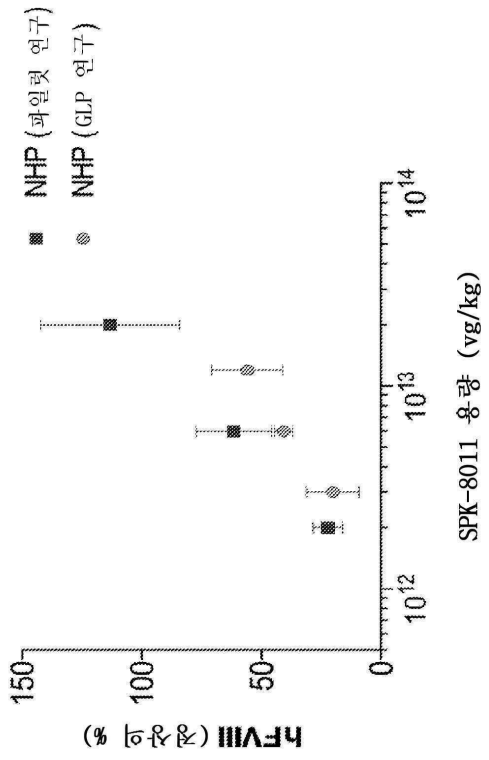
도면6

AAV-SPK-8011 (LK03): 시노몰구스
마카쿠에서의 hFVIII 항원 수준



AAV-SPK-8011 (LK03) 용량		
그룹	vg/kg	피크에서의 평균 hFVIII
1 (대조군)	0	
2 (낮음)	$2x10^{12}$	22.3 ± 6.1
3 (중간)	$6x10^{12}$	61.6 ± 15.7
4 (높음)	$2x10^{13}$	153.3 ± 58

도면7


NHP (파일럿 연구)
NHP (GLP 연구)
hFVIII (정상의 %)
150
100
50
0
10^{12}
10^{13}
10^{14}
SPK-8011 용량 (vg/kg)

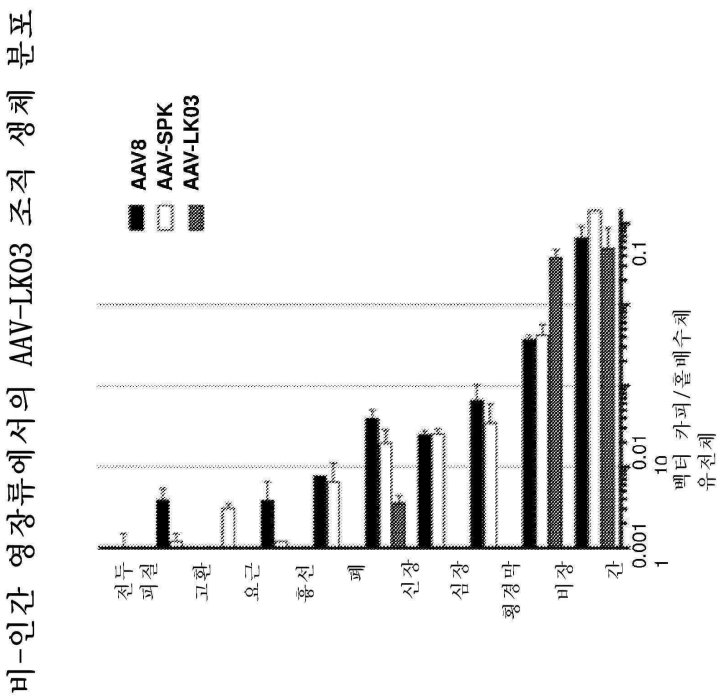
도면8

AAV-SPK-8011 (LK03 캡시드) 대 AAV5 대 AAV8:
마카쿠에서의 hFVIII 항원 수준

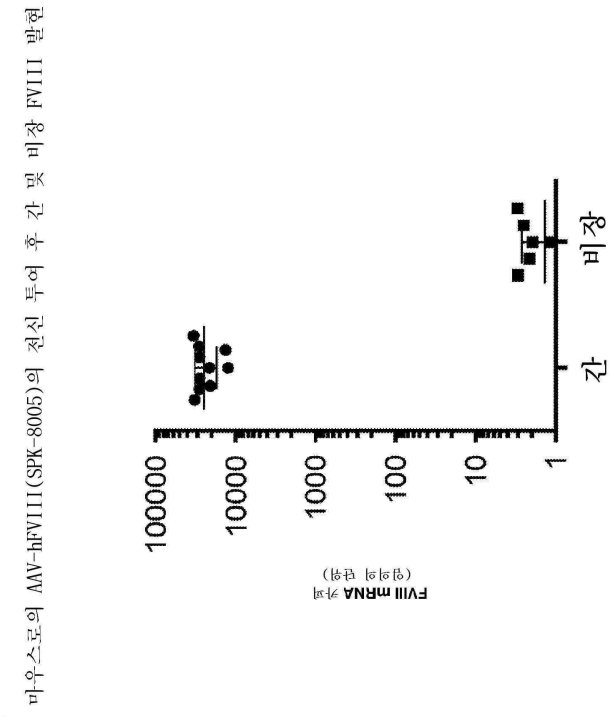
vg/kg	AAV-SPK-8011 (LK03)	AAV5	AAV8
	피크에서의 최대 hFVIII (정상의 %)		
$2x10^{12}$	31		
$6x10^{12}$	91		
$1x10^{13}$		~3	
$2x10^{13}$	264		~120
$2.4x10^{13}$		~15	
$3.6x10^{13}$		~23	
$6.3x10^{13}$		~45	

AAV-SPK-8011 (LK03 캡시드)	AAV5
정상 hFVIII의 50%를 달성하기 위한 예측 용량	
$3.2x10^{12}$ vg/kg	$69.5x10^{12}$ vg/kg

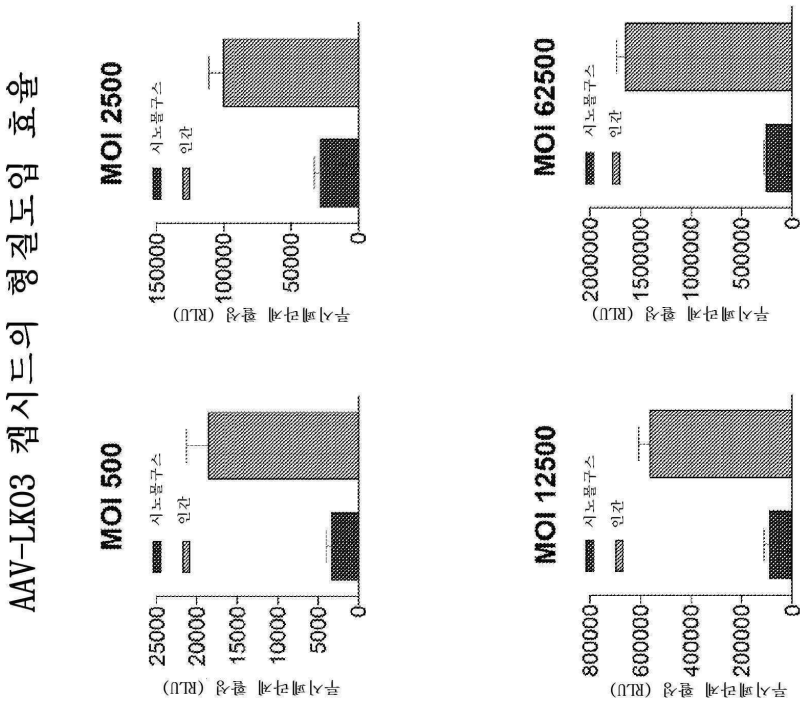
도면9


비-인간 영장류에서의 AAV-LK03 조직 생체 분포
AAV8
AAV-SPK
AAV-LK03
전두 피질
고환
요근
흉선
폐
신장
심장
횡경막
비장
간
0.001
0.01
0.1
1
10
백터 카피/홀배수체
유전체

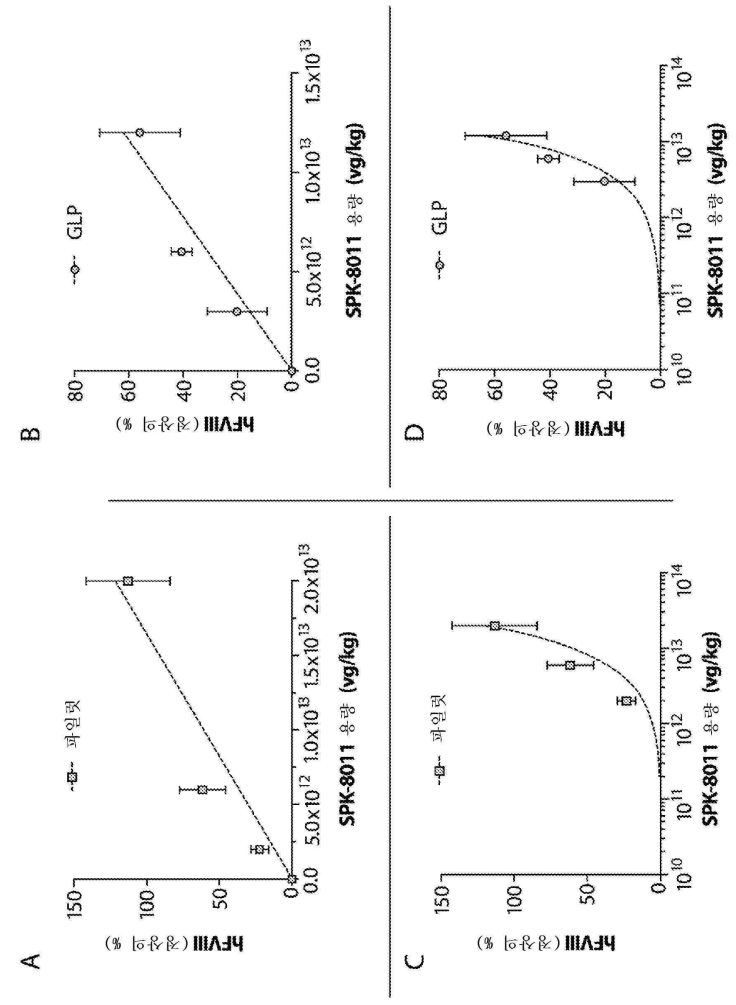
도면10


마우스로의 AAV-hFVIII(SPK-8005)의 전신 투여 후 간 및 비장 FVIII 발현
FVIII mRNA 카피
(양의 단위)
100000
10000
1000
100
10
1
간
비장

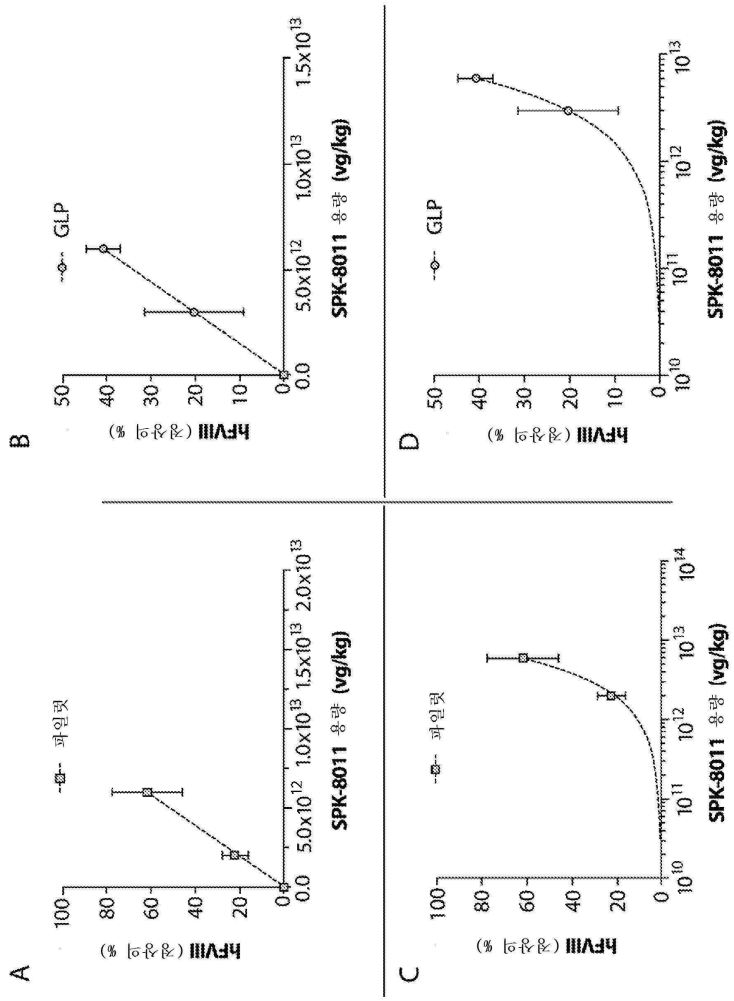
도면11


AAV-LK03 캡시드의 형질도입 효율
MOI 500
MOI 2500
MOI 12500
MOI 62500
시노몰구스
인간
루시페라제 활성 (RLU)
25000
20000
15000
10000
5000
0
150000
100000
50000
800000
600000
400000
200000
2000000
1500000
1000000
500000

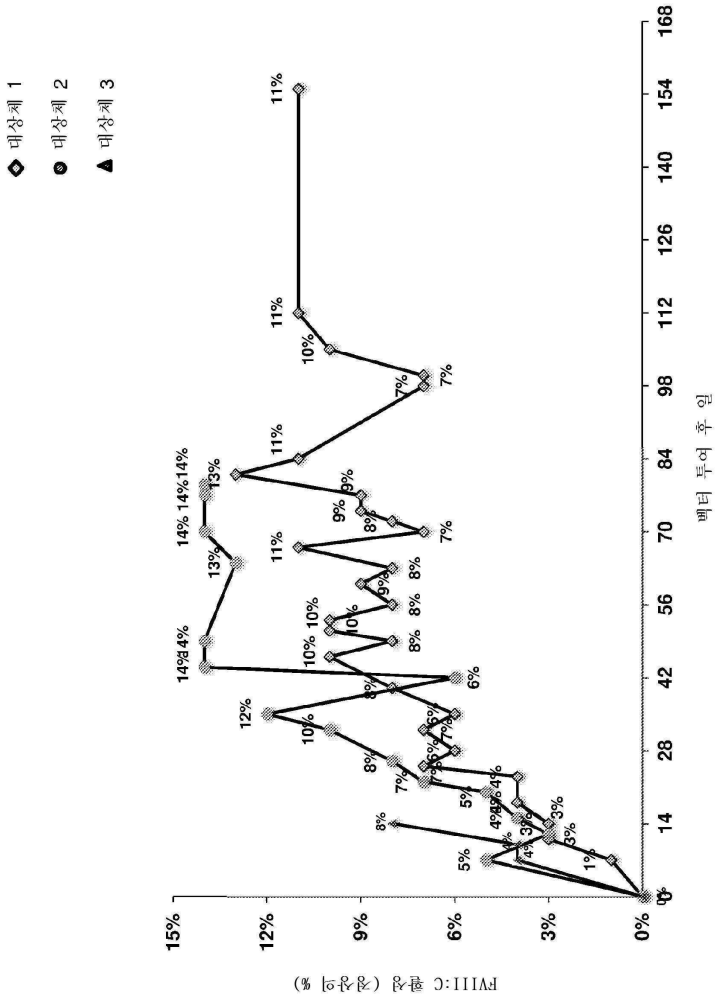
도면12


A
B
C
D
FVIII (정상의 %)
파일럿
GLP
SPK-8011 용량 (vg/kg)
0
50
100
150
20
40
60
80
0.0
5.0x10^12
1.0x10^13
1.5x10^13
2.0x10^13
10^10
10^11
10^12
10^13
10^14

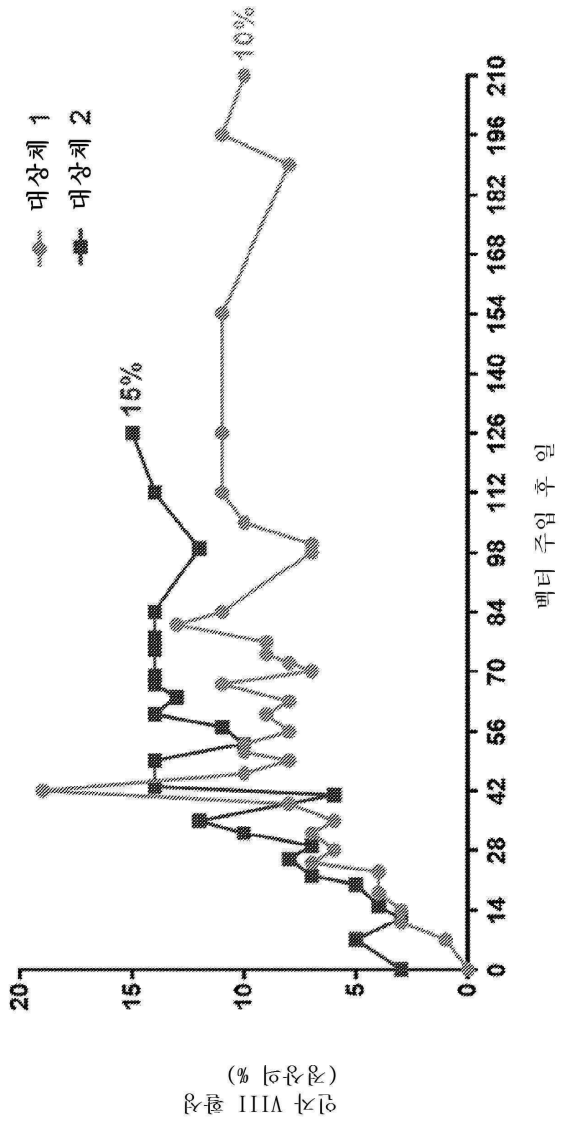
도면13



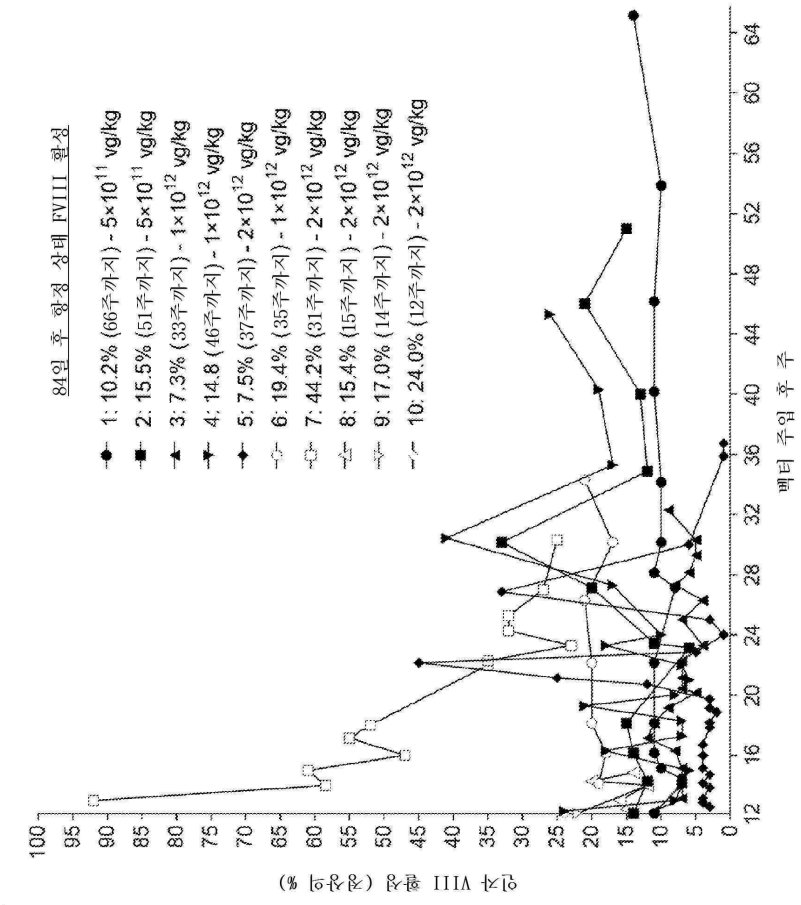
도면14


대상체 1
대상체 2
대상체 3
FVIII:C 활성 (정상의 %)
15%
12%
9%
6%
3%
0%
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
140
154
168
베타 투여 후 일

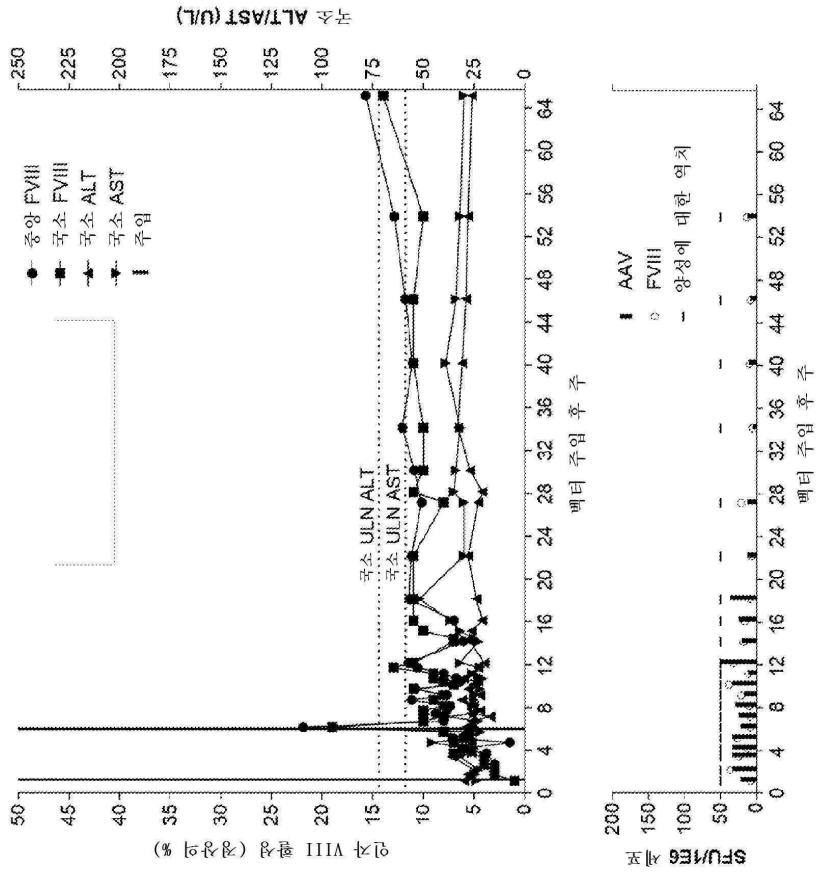
도면15


대상체 1
대상체 2
15%
10%
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
140
154
168
182
196
210
5
10
15
20
백터 주입 후 일
인자 VIII 활성
(정상의 %)

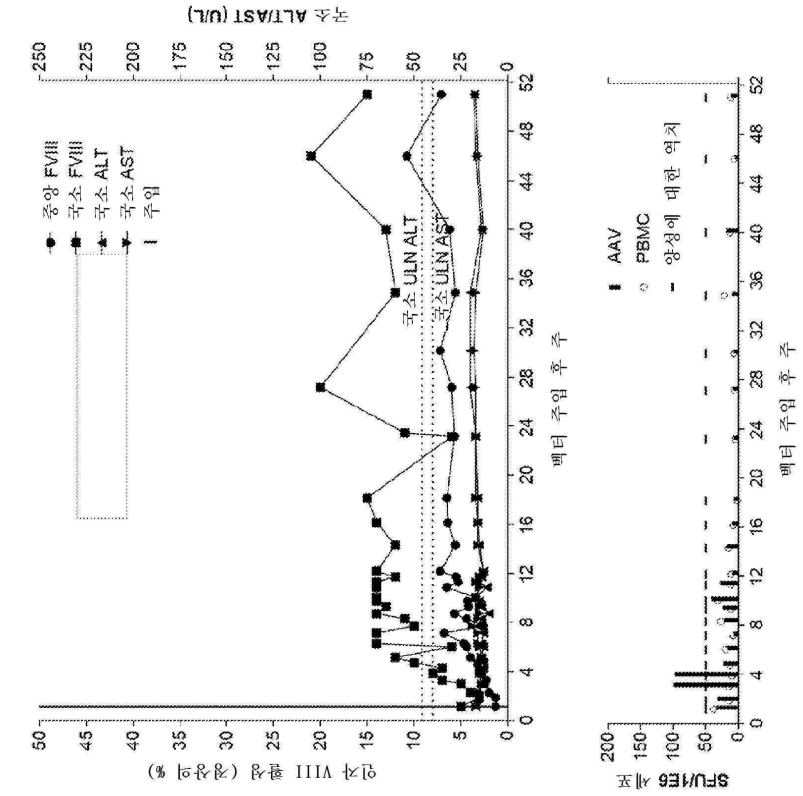
도면16


84일 후 항정 상태 FVIII 활성
1: 10.2% (66주까지) - 5×10^11 vg/kg
2: 15.5% (51주까지) - 5×10^11 vg/kg
3: 7.3% (33주까지) - 1×10^12 vg/kg
4: 14.8 (46주까지) - 1×10^12 vg/kg
5: 7.5% (37주까지) - 2×10^12 vg/kg
6: 19.4% (35주까지) - 1×10^12 vg/kg
7: 44.2% (31주까지) - 2×10^12 vg/kg
8: 15.4% (15주까지) - 2×10^12 vg/kg
9: 17.0% (14주까지) - 2×10^12 vg/kg
10: 24.0% (12주까지) - 2×10^12 vg/kg
인자 VIII 활성 (정상의 %)
베터 주입 후 주

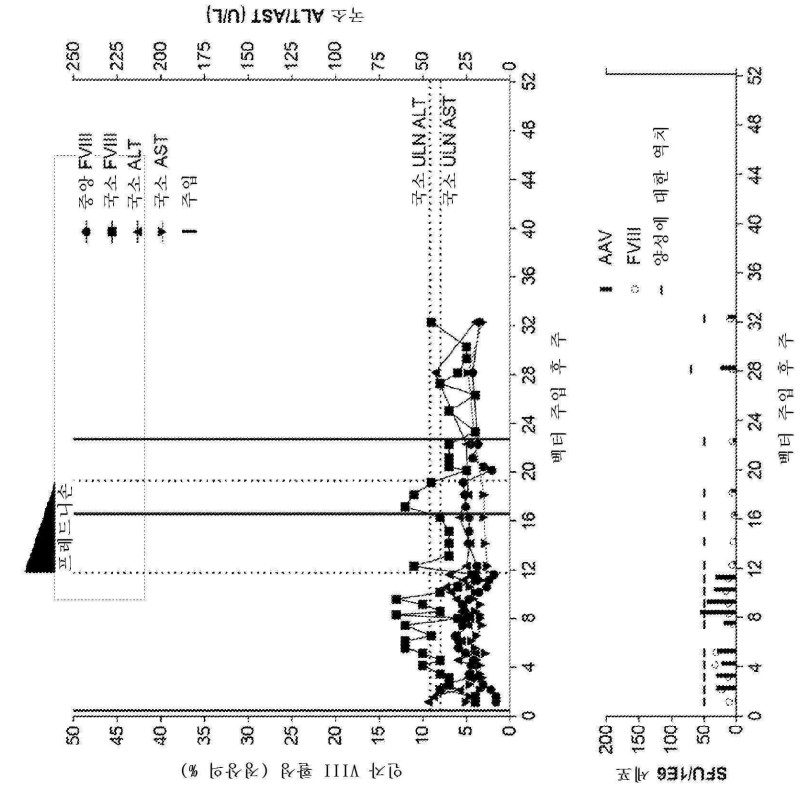
도면17


혈중 ALT/AST (U/L)
인자 VIII 활성 (정상의 %)
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
주입
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
베터 주입 후 주
AAV
FVIII
양성에 대한 역치
SFU/1E6 세포
베터 주입 후 주

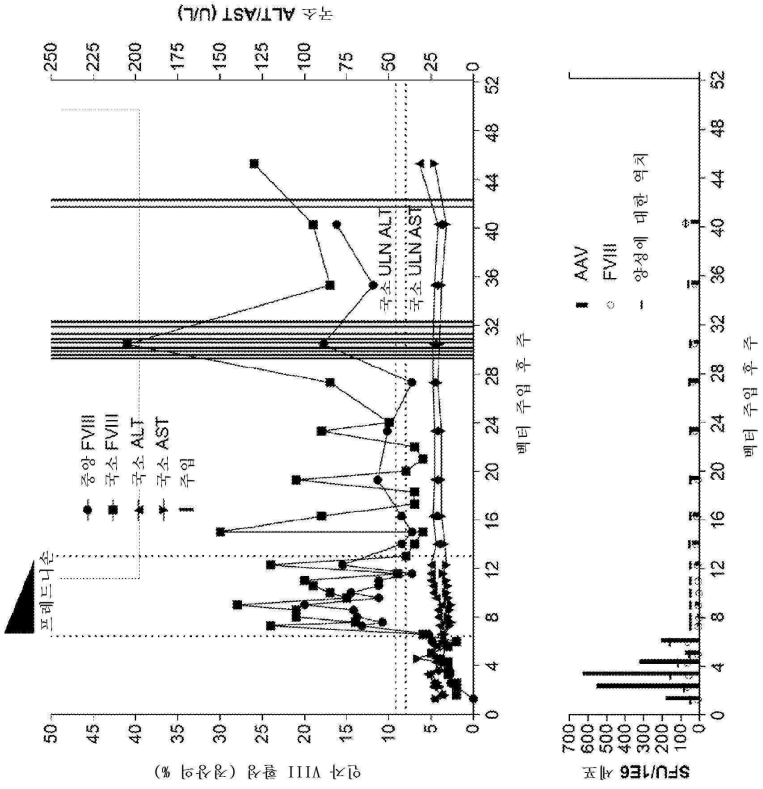
도면18


중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
주입
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
인자 VIII 활성 (정상의 %)
국소 ALT/AST (U/L)
베터 주입 후 주
AAV
PBMC
양성에 대한 역치
SFU/1E6 세포

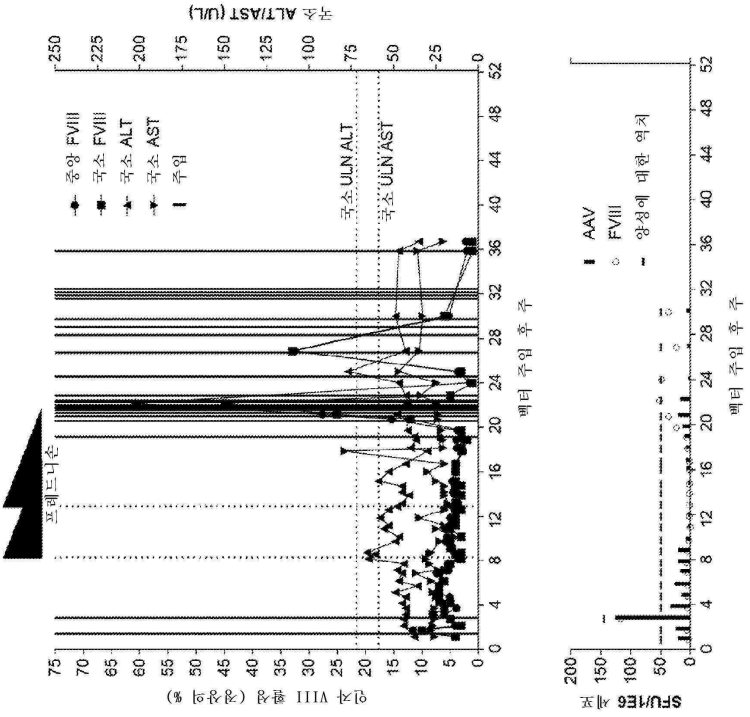
도면19


중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
주입
프레드니손
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
인자 VIII 활성 (정상의 %)
국소 ALT/AST (U/L)
베터 주입 후 주
AAV
FVIII
양성에 대한 역치
SFU/1E6 세포

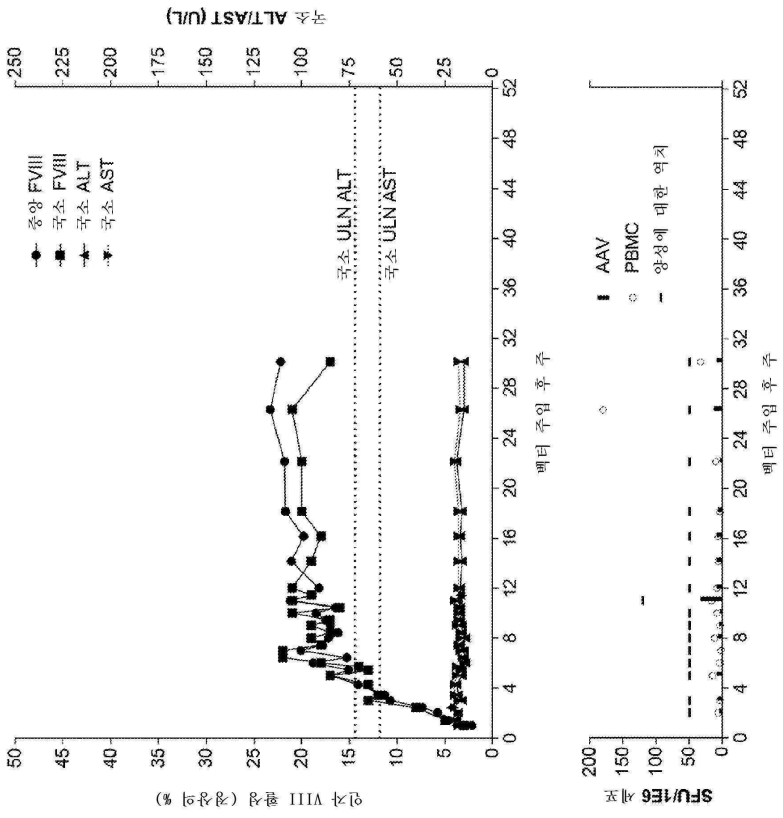
도면20


혈장 VIII 인자 활성 (정상의 %)
베터 주입 후 주
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
주입
프레드니손
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
국소 ALT/AST (U/L)
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치

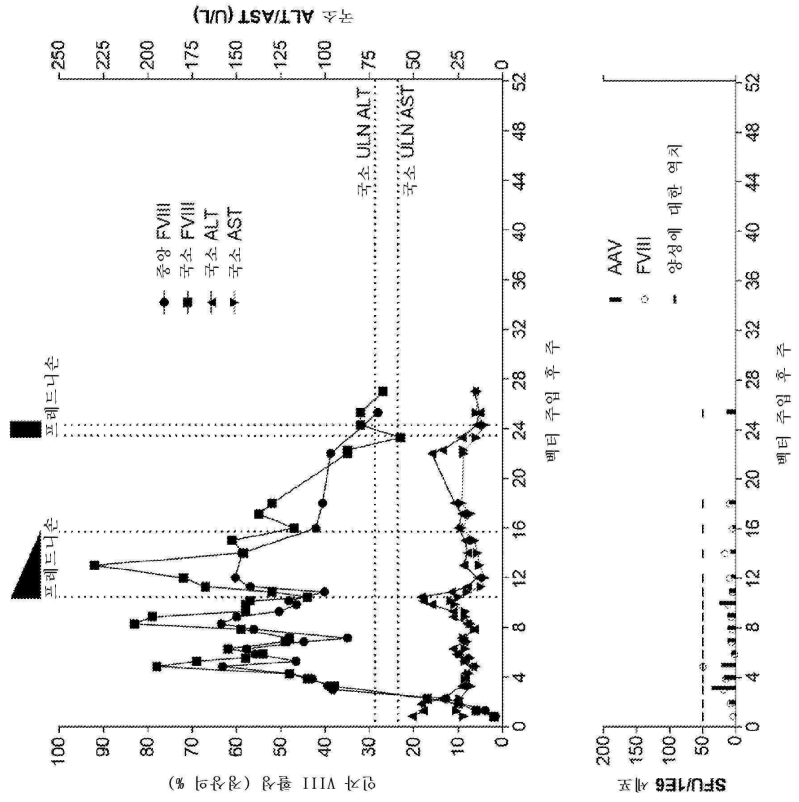
도면21


혈장 VIII 인자 활성 (정상의 %)
베터 주입 후 주
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
주입
프레드니손
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
국소 ALT/AST (U/L)
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치

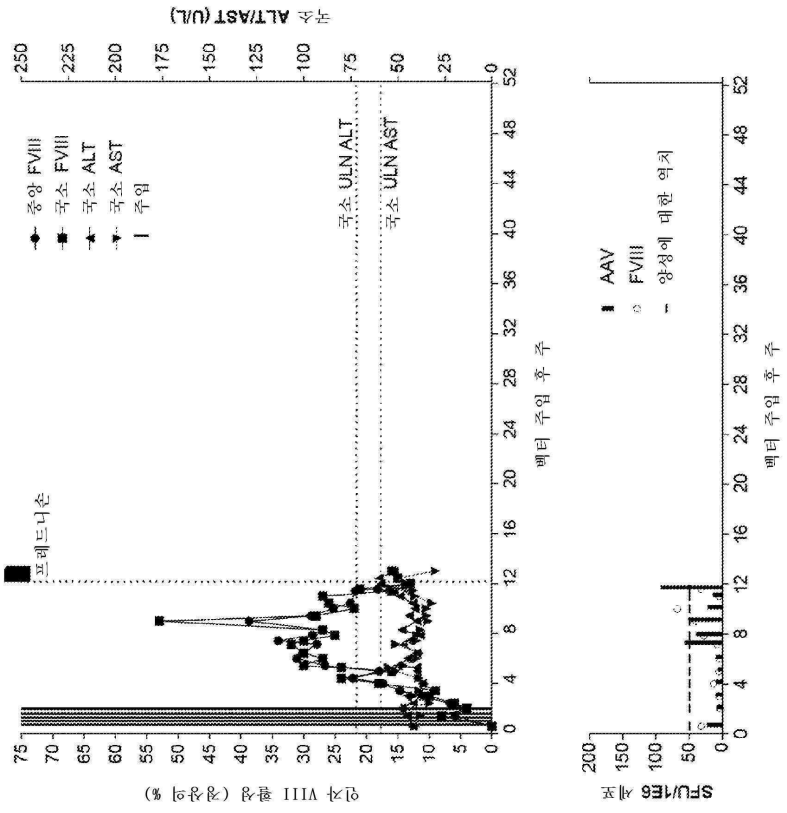
도면22


간 ALT/AST (U/L)
인자 VIII 활성 (정상의 %)
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
베터 주입 후 주
SFU/1E6 세포
AAV
PBMC
양성에 대한 역치

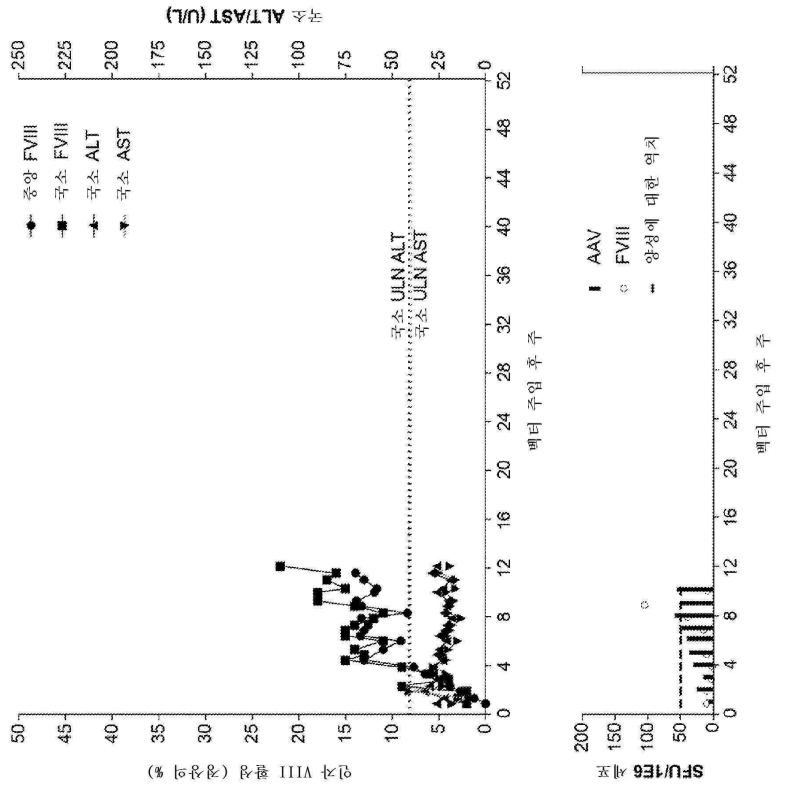
도면23


간 ALT/AST (U/L)
인자 VIII 활성 (정상의 %)
프레드니손
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
베터 주입 후 주
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치

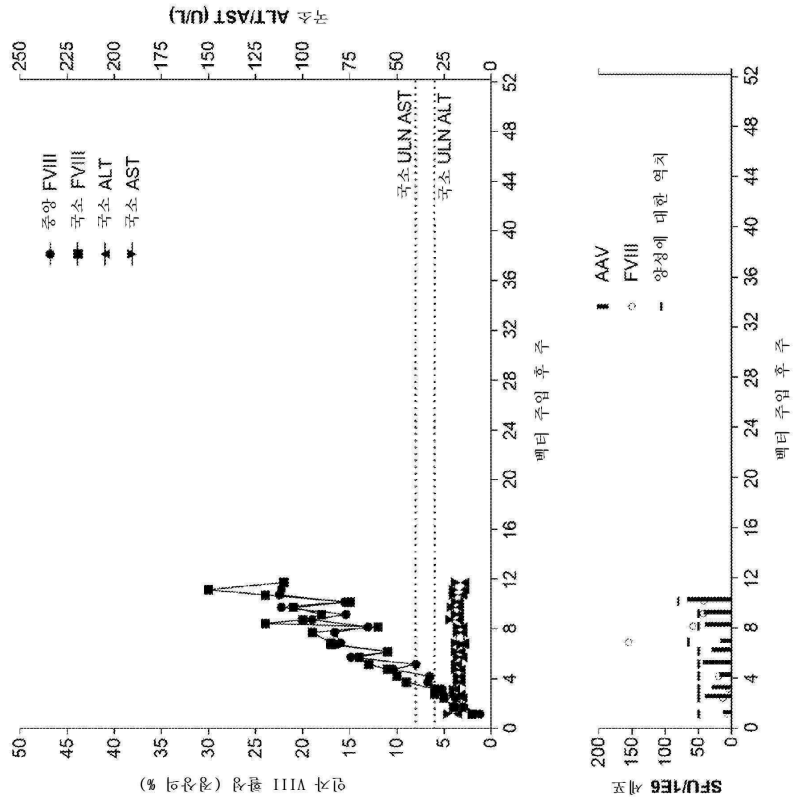
도면24


인자 VIII 활성 (정상의 %)
벡터 주입 후 주
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
주입
프레드니손
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
국소 ALT/AST (U/L)
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치

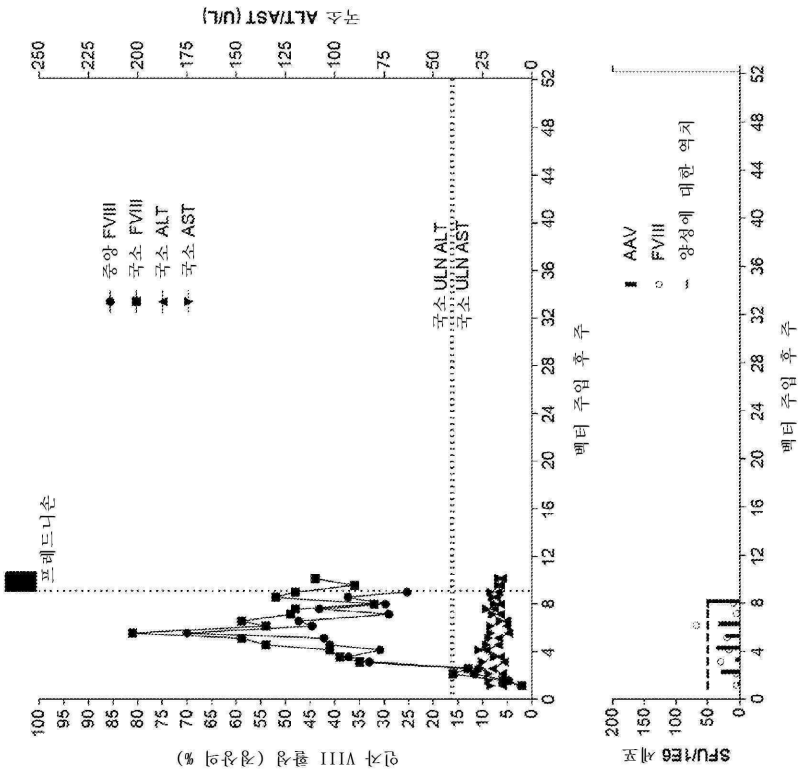
도면25


인자 VIII 활성 (정상의 %)
벡터 주입 후 주
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
국소 ALT/AST (U/L)
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치

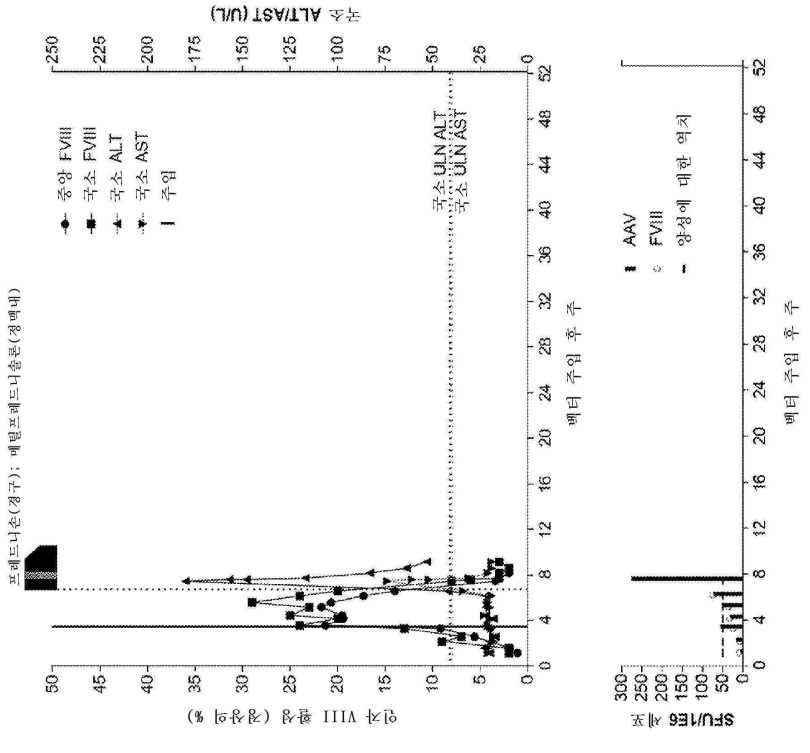
도면26


인자 VIII 활성 (정상의 %)
혈장 ALT/AST (U/L)
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
국소 ULN AST
국소 ULN ALT
베터 주입 후 주
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치
베터 주입 후 주

도면27


인자 VIII 활성 (정상의 %)
혈장 ALT/AST (U/L)
프레드니손
중앙 FVIII
국소 FVIII
국소 ALT
국소 AST
국소 ULN ALT
국소 ULN AST
베터 주입 후 주
SFU/1E6 세포
AAV
FVIII
양성에 대한 역치
베터 주입 후 주

도면28



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SPARK THERAPEUTICS, INC.

ANGUELA , Xavier

<120> FACTOR VIII (FVIII) GENE THERAPY METHODS

<130> 023637-0460703

<140> PCT/US2018/044892

<141> 2018-08-01

<150> 62/540,053

<151> 2017-08-01

<150> 62/583,890

<151> 2017-11-09

<150> 62/596,535

<151> 2017-12-08

<150> 62/596,670

<151> 2017-12-08

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 1

atgcagattg agctgtctac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct 60

accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggtttccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttcaat 180

acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttca ctgatcatct gttcaacatt 240

gctaaaccca ggcccccctg gatggggctg ctgggcccta ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgatcactct gaagaacatg gctagccatc ctgtgtctct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgatcagac tagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggctctcaca cctatgtctg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgatcct ctgtgtctga cctatagcta cctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgtagggag 600

gggagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcattctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcattctgaa accaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt caataggtct 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc 840

accacccctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca ccttcctggt gaggaatcac 900

agacaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agtttctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggactc ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaataatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gagatttgat 1140

gatgacaatt ctcccagctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgccccct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggagctataa gagccagtac ctgaataatg gcccccagag gattgggagg 1320

aagtataaga aggtgaggtt catggcctat actgatgaaa ccttcaagac cagagaggcc 1380

atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccctca tggcatcact 1500

gatgtgaggc ctctgtacag cagaaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggacttc 1560

cccattctgc ctggggagat tttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggccca 1620

accaagtctg accctaggtg cctgactagg tactacagca gctttgtgaa tatggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtacctgac tgagaacatt cagaggtttc tgcccaaccc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgaatt ccaggcctct aacatcatgc acagcattaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta cattctgagc 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt taagcacaag 2040

atggtgtatg aggataccct gaccctgttt cctttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100

atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggg 2160

atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220

agctatgagg acatctctgc ctatctgctg agcaagaata atgctattga gcccaggagc 2280

ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag aactactctg 2340

cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gattttgata tttatgatga ggatgaaaac cagagcccca ggagctttca gaagaagact 2460

aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgtc ttctagcccc 2520

catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580

caggagttca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca gggggggagct gaatgagcac 2640

ctggggctgc tgggccctta tatcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc 2700

aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttc tactctagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacttat 2820

ttctggaagg tgcagcacca tatggccccc accaaggatg agtttgattg caaagcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggcccctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgcaatatc cagatggagg accccacctt taaggaaaat 3120

tataggtttc atgccattaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggca gcaatgagaa cattcacagc 3240

atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300

tataatctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg 3420

gtgtattcta acaagtgtca gacccccctg ggcatggcct ctggccatat cagggacttc 3480

cagatcactg cctctggcca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcattac 3540

tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagccattca gctggattaa ggtggacctg 3600

ctggctccaa tgattatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gtttagcagc 3660

ctgtacatct ctcagtttat catcatgtac tctctggatg gcaaaaagtg gcagacctac 3720

aggggcaatt ctactggcac tctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc 3780

aagcacaaca tctttaaccc ccctatcatt gccaggtaca ttaggctgca ccccacccat 3840

tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgcagc 3900

atgcccctgg gcatggagag caaggctatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac 3960

ttcaccaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020

tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agagcctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc atcagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccagatac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggg tgtgaggccc aggacctgta ctga 4374

<210> 2

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 2

atgcagattg agctgtctac ctgcttttttc ctgtgtctgc tgaggttctg cttctctgcc 60

actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgatctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct cccagggtgc ccaagtcttt ccccttcaat 180

acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttta ctgatcacct gttcaacatt 240

gccaagccca ggcccccttg gatgggcctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gcctctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgataaggt gttccctggg gggagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gcccaatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctattctta cctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggctctctgg ctaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaaaatg cacactgtga atggctatgt gaataggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtatt ggcatgtgat tggcatgggc 840

accacccctg aggtgcactc tatcttcctg gagggccata ctttcctggt gaggaatcat 900

aggcaggcca gcctggagat tagccccatt acctttctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttttgccac atcagctctc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaaa tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaata gcccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcctaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgctcccct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggtcttacaa gagccagtac ctgaacaatg gcccccagag aattgggagg 1320

aagtataaga aggtgagatt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat tctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggcctctagg ccctacaata tttaccccca tgggatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcatct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga agatggcccc 1620

accaagtctg accctaggtg cctgaccagg tactactctt cttttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

agggggaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtatctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg 1920

tttgattctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggctc agactgattt cctgtctgtg ttctttttctg gctacacctt taagcataag 2040

atggtgtatg aggacactct gaccctgttt cccttctctg gggagactgt gtttatgagc 2100

atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaacaggggc 2160

atgactgctc tgctgaaggt gtcttcttgt gacaagaaca ctggggacta ttatgaggac 2220

agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga gcccagatct 2280

ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gaccaccctg 2340
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag 2400
gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagtctccca ggagcttcca gaaaaagacc 2460
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgtc ttctagcccc 2520
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580
caggagttca ctgatgggag cttcacccag cctctgtaca ggggggagct gaatgagcac 2640
ctggggctgc tgggccctta tattagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgactttc 2700

aggaatcagg cctctaggcc ctatagcttc tacagctctc tgatcagcta tgaggaggat 2760
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac 2820
ttctggaagg tgcagcacca catggctcct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880
gcctactttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccccctg 2940
ctggtgtgtc ataccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtactttac tgagaacatg 3060
gagaggaatt gcagagcccc ttgcaacatc cagatggagg acccaacctt caaagagaac 3120

tacaggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct 3180
caggaccaga ggatcaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa tatccatagc 3240
attcacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300
tataacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgccaagcaa ggctgggatt 3360
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg 3420
gtgtactcca ataagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc 3480
cagatcactg cctctggcca gtatgggcag tgggccccaa agctggccag gctgcactat 3540

tctgggagca tcaatgcttg gagcaccaag gagcctttca gctggattaa ggtggatctg 3600
ctggccccca tgatcattca tggcatcaaa acccaggggg ctagacagaa gttttctagc 3660
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacttac 3720
aggggcaata gcactggcac cctgatggtg ttttttggca atgtggacag ctctggcatc 3780
aagcacaaca tctttaaccc ccccattatt gccaggtata tcaggctgca tcccacccac 3840
tattctatta ggtctactct gagaatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgtagc 3900
atgcccctgg ggatggagag caaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttat 3960

ttcaccaata tgtttgccac ctggtctccc tctaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020

agcaatgctt ggaggcccca ggtgaataac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agtctctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatgggc atcagtggac tctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaggt cttccagggg aaccaggata gcttcactcc tgtggtgaac 4260

tctctggacc ccccccctgct gactaggtat ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ttga 4374

<210> 3

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 3

atgcagattg aactgtctac ttgtttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgct 60

actaggaggt actatctggg ggctgtggag ctgtcttggg actatatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc taggtttccc cccagggtgc ccaagagctt ccccctttaac 180

acctctgtgg tgtataagaa gactctgttt gtggagttca ctgaccatct gttcaacatt 240

gccaagccaa ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgattactct gaagaacatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac ctctcagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggctctcata cctatgtgtg gcaggtcctg 480

aaggagaatg ggcccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctactctta tctgtctcat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ctaaggagaa gacccagact ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacaggagc 780

ctgccaggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtatt ggcatgtgat tgggatgggg 840

actacccctg aggtccacag cattttcctg gaggggcata cctttctggt gaggaaccac 900

aggcaggcct ctctggagat ctctcccatt actttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa aaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgacctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgataaca gccccagctt catccagatt aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgctcctct ggtgctggcc 1260
cctgatgaca ggagctacaa gagccagtac ctgaataatg gccccccagag gattggcagg 1320
aagtataaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc 1380
atccagcatg aatctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440
ctgattatct ttaagaacca ggctagcagg ccctacaaca tttaccccca tggcattact 1500
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggatttc 1560
cccattctgc ctggggagat ctttaagtac aaatggactg tgactgtgga ggatggccct 1620

actaagtctg atcccaggtg tctgaccaga tactacagca gctttgtgaa tatggagagg 1680
gacctggctt ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740
aggggcaatc agattatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800
aacagaagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtg 1860
cagctggagg accctgagtt ccaggctagc aatatcatgc acagcattaa tggctatgtg 1920
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctattggta cattctgagc 1980
attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggatactct gaccctgttt cccttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgtcacaact ctgacttcag gaacaggggc 2160
atgactgccc tgctgaaggt gagctcttgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220
tcttatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga gcccaggagc 2280
ttctctcaga atccccctgt gctgaagagg catcagaggg agatcactag gactaccctg 2340
cagtctgacc aggaagagat tgactatgat gacaccatct ctgtggaaat gaagaaggag 2400
gactttgata tctatgatga ggatgaaaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc 2460

aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgag ctcttctccc 2520
catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtcccac agttcaagaa ggtggtgttt 2580
caggagttca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcat 2640
ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataacattat ggtgactttc 2700
aggaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacctat 2820
ttctggaagg tgcagcatca catggctccc actaaagatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccctctg 2940

ctggtctgcc atactaacac cctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tctttaccat ctttgatgag accaagtctt ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgtaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac 3120

tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacactc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg tctatgggct ctaatgagaa cattcattct 3240

atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300

tacaatctgt accctggggt gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa ggctggcatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg 3420

gtctatagca ataagtgcca gacccccctg gggatggcct ctgggcatat cagagacttc 3480

cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac 3540

tctggcagca ttaatgcctg gagcaccaag gagcccttct cttggatcaa ggtggacctg 3600

ctggctccca tgatcatcca tgggatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaata gcactgggac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctggcatc 3780

aagcacaata tcttcaaccc ccccatcatt gccaggtaca tcagactgca ccccactcat 3840

tacagcatca ggagcactct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa tagctgctct 3900

atgcccctgg gcatggagag caaggccatt tctgatgccc agattactgc ctcttcttac 3960

ttcactaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcatct gcaggggagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatgggc accagtggac cctgtttttc 4200

cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggaca gctttactcc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gactaggtac ctgaggattc acccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 4

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 4

atgcagattg agctgtctac ctgcttcttt ctgtgcctgc tgaggttctg tttctctgcc 60

actaggaggt attatctggg ggctgtggag ctgtcctggg actacatgca gtctgatctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttccct cccagggtgc ccaagtcttt ccctttcaat 180

acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttta ctgatcacct gtttaacatt 240

gccaagccca ggcccccctg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgattactct gaagaatatg gcttctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gcccaatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta tctgagccat 540

gtggatctgg tgaaggatct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggctctctgg ccaaggagaa gactcagact ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat 720

gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaataggagc 780

ctgcctgggc tgattgggtg tcacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

accactcctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca cttttctggt gaggaatcac 900

aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gatctgggcc agttcctgct gttttgccat atcagcagcc atcagcatga tgggatggag 1020

gcttatgtga aggtggactc ttgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaataatgaa 1080

gaggctgagg actatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaaca gccccagctt tatccagatt aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcatt acattgctgc tgaggaagag gattgggact atgccccccct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggagctacaa gtctcagtac ctgaacaatg gccctcagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc 1380

attcagcatg aatctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgattattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tttatcctca tggcattact 1500

gatgtgagac ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

actaagtctg accccaggtg cctgactagg tactactcca gctttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggcccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aataggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcctaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggcctct aacattatgc acagcatcaa tgggtatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt taagcataag 2040

atggtgtatg aggacaccct gactctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100

atggagaacc caggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaataggggc 2160

atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaaca ctggggacta ttatgaggat 2220

agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc 2280

ttcagccaga atcctcctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagagcccca ggagcttcca gaagaagact 2460

agacactact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctcttctccc 2520

catgtgctga gaaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtcttc 2580

caggagttca ctgatggctc tttcacccag cctctgtata gaggggagct gaatgagcac 2640

ctgggcctgc tgggccctta catcagggct gaggtggagg acaatatcat ggtgaccttc 2700

aggaaccagg ctagcaggcc ctactctttc tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760

cagaggcagg gggctgagcc taggaagaat tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac 2820

ttctggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcctactttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctggcctgat tggccccctg 2940

ctggtctgcc acaccaatac tctgaaccct gctcatggga gacaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagtcct ggtactttac tgagaacatg 3060

gagaggaatt gcagggcccc ttgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggaaaat 3120

tataggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtatctgctg tctatgggct ctaatgagaa catccacagc 3240

atccatttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggctctg 3300

tacaacctgt accctggggt ctttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatt 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttcctg 3420

gtgtactcta acaagtgcca gaccccactg ggcatggctt ctggccacat cagggatttc 3480

cagattactg cctctggcca gtatggccag tgggctccca agctggctag gctgcactac 3540

tctgggagca tcaatgcctg gtctactaag gagcctttct cttggatcaa agtggacctg 3600

ctggccccta tgatcatcca tgggatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatct ctcagttcat cattatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctgggatt 3780

aagcacaaca tctttaaccc ccccatcatt gccaggtata tcaggctgca ccctacccac 3840

tacagcatta ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgcagc 3900

atgcccctgg ggatggagag caaggccatt tctgatgctc agatcactgc ttctagctac 3960

ttcactaaca tgtttgccac ctggtctccc agcaaggcta gactgcacct gcaggggagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaataat cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aaaaccatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agtctctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatgggc atcagtggac cctgttcttt 4200

cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga 4374

<210> 5

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 5

atgcagattg agctgtctac ttgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc 60

actaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaac 180

acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttta ctgatcatct gttcaacatt 240

gccaagccca ggcctccttg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgattaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac tagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg gggagccata cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgaccct ctgtgcctga cttatagcta cctgagccat 540

gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg ggaagtcctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggatagggat 720

gctgcttctg ccagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaataggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc 840

accacccctg aggtgcactc tattttcctg gagggccata ctttcctggt gaggaaccat 900

aggcaggcca gcctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac tctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tggcatggag 1020

gcttatgtga aggtggacag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaataatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaact ctccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgccccccc ggtgctggcc 1260

ccagatgaca ggagctacaa gtcccagtac ctgaacaatg gcccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcttat actgatgaga ctttcaagac cagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat cctgggccct ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgattatct tcaagaacca ggcttctagg ccctacaata tctaccctca tggcatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggatttc 1560

cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

actaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa catggagagg 1680

gatctggctt ctgggctgat tggcccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aataggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt tcaggcctct aatatcatgc acagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctattggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttttttttctg gctacacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggatactct gactctgttc ccttttttctg gggagactgt gttcatgtct 2100

atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaatt ctgacttcag gaacagaggc 2160

atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220

tcttatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccagaagc 2280

ttttctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg 2340

cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gatactattt ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggtctttcca gaagaagact 2460

aggcactact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgtc tagctctcct 2520

catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agtttaaaaa ggtggtgttc 2580

caggaattca ctgatggcag ctttacccag cctctgtaca ggggggagct gaatgagcac 2640

ctggggctgc tggggcctta cattagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc 2700

aggaatcagg ccagcaggcc ctactctttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggac 2760

cagaggcagg gggctgaacc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac 2820

ttctggaagg tgcagcacca catggctccc accaaggatg agtttgattg caaggcctgg 2880

gcttacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggccccctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca gacaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcactat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaatt gcagggcccc ttgcaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac 3120

tacaggtttc atgccattaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg tctatgggga gcaatgagaa catccacagc 3240

attcacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300

tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttcctg 3420

gtgtatagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagagacttt 3480

cagattactg cctctggcca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcactat 3540

tctggctcta ttaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggattaa ggtggacctg 3600

ctggctccca tgatcatcca tggcatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttctcttct 3660

ctgtacatca gccagttcat tatcatgtac tccctggatg gcaagaagtg gcagacctat 3720

aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctggcatc 3780

aagcataata tcttcaatcc ccccatcatt gctaggtaca tcaggctgca ccccacccac 3840

tactctatta ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgcagc 3900

atgcctctgg gcatggagag caaagccatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac 3960

tttaccaaca tgtttgctac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcaggggagg 4020

tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagactatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agagcctgct gacctctatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgtttttc 4200

cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggg aaccaggaca gcttcactcc tgtggtgaac 4260

tctctggacc ccccccctgct gaccaggtat ctgaggatcc accctcagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga 4374

<210> 6

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 6

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgcc 60

accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttccct cccagggtgc ccaagtcttt ccccttcaac 180

acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttta ctgaccacct gttcaacatt 240

gccaagccca ggcctccctg gatgggcctg ctgggcccca ccattcaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tcatcaccct gaaaaatatg gctagccacc ctgtgtctct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg 480

aaagagaatg gccccatggc ttctgatccc ctgtgtctga cctatagcta cctgagccat 540

gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ctaaggagaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggatagggat 720

gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacaggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtctatt ggcatgtgat tggcatgggc 840

actactcctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca ccttcctggt gaggaaccac 900

aggcaggcca gcctggagat ctctcccatc actttcctga ctgctcagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgtcac atctctagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gaaccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaatt ctcctagctt cattcagatc agatctgtgg ccaaaaagca tcctaagact 1200

tgggtgcatt atattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccctc ggtgctggct 1260

cctgatgata ggagctacaa gtctcagtac ctgaataatg ggccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc 1380

attcagcatg agtctgggat tctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg 1440

ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccccca tgggattact 1500

gatgtgaggc ccctgtactc taggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggatttt 1560

cctatcctgc ctggggaaat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

actaagtctg atcccaggtg tctgaccagg tattatagct cttttgtgaa catggagagg 1680

gatctggcct ctgggctgat tggccctctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtatctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgtctg catgaggtgg cctactggta tatcctgtct 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttttttttctg ggtatacttt taagcacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gactctgttc cccttctctg gggagactgt gtttatgagc 2100

atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaatt ctgacttcag gaataggggg 2160

atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaata ctggggacta ctatgaggac 2220

tcttatgagg acatttctgc ctatctgctg tctaagaaca atgccattga acccaggagc 2280

ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg aaatcaccag aactactctg 2340

cagtctgatc aggaggaaat tgactatgat gacactattt ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccaa ggagcttcca gaagaagact 2460

aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc 2520

catgtgctga gaaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580

caggagttca ctgatgggag cttcacccag cccctgtata gggggggagct gaatgagcac 2640

ctgggcctgc tgggccccta tattagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc 2700

aggaatcagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgattagcta tgaggaggat 2760

cagaggcagg gggctgaacc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat 2820

ttctggaagg tgcagcatca catggccccc accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccccctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gctcatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaatatg 3060

gagaggaatt gcagggcccc ctgcaatatt cagatggaag accccacctt caaggagaat 3120

tacaggttcc atgccattaa tggctacatc atggataccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggatcaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggca gcaatgagaa catccactct 3240

atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggccctg 3300

tacaacctgt accctggggt ctttgagact gtggagatgc tgccttctaa ggctggcatt 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg 3420

gtgtacagca ataagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctgggcatat cagggatttc 3480

cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccaa agctggctag gctgcactac 3540

tctgggagca tcaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccca tgattatcca tgggattaag actcaggggg ccaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatca gccagttcat tatcatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacctat 3720

aggggcaact ctactgggac cctgatggtg ttctttggga atgtggatag ctctgggatc 3780

aagcacaata tcttcaaccc ccccatcatt gccaggtata tcaggctgca ccccacccac 3840

tacagcatta ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgtagc 3900

atgcctctgg gcatggagtc taaggccatt tctgatgccc agattactgc tagcagctac 3960

ttcaccaaca tgtttgccac ctggtctccc agcaaggcca ggctgcatct gcagggcagg 4020

tctaatgctt ggaggcccca ggtgaacaac ccaaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aagactatga aggtgactgg ggtgaccact cagggggtga agtctctgct gacctctatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat ctctagcagc caggatggcc atcagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaagt gttccagggc aatcaggata gcttcactcc agtggtgaac 4260

agcctggatc cccctctgct gactaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga 4374

<210> 7

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 7

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgtctgc tgaggttctg cttctctgcc 60

accaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc taggttcccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttaac 180

acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt 240

gccaagccca ggccccccctg gatggggctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gtttcctggg ggcagccata cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta cctgtctcat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgtagggag 600

ggcagcctgg ctaaggaaaa gacccagacc ctgcataagt ttatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggatagggat 720

gctgcctctg ccagggcttg gcctaagatg cacactgtga atgggtatgt gaataggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc 840

accacccctg aggtccatag catcttcctg gagggccaca ctttcctggt gaggaaccac 900

agacaggcct ctctggagat ctctcccatc accttcctga ctgctcagac tctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttttgccat attagcagcc accagcatga tgggatggag 1020

gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgaag actatgatga tgacctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaata gccccagctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaaaca ccccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaagag gactgggact atgctcccct ggtgctggcc 1260

cctgatgata ggtcttataa gagccagtac ctgaacaatg ggccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaaa ccttcaaaac cagggaggcc 1380

attcagcatg agtctggcat cctgggccct ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctatcctca tggcatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaagacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggccct 1620

accaagtctg accccaggtg tctgaccagg tactattcta gctttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tgggcccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag 1800

aataggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aatatcatgc atagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttttctg gctatacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggataccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100

atggagaatc ctgggctgtg gatcctgggg tgccacaact ctgattttag gaacaggggg 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220

agctatgagg acatttctgc ttatctgctg tctaagaata atgccattga gcccagaagc 2280

ttcagccaga atccccctgt gctgaagaga catcagaggg agatcaccag aactaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag 2400
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagctttca gaagaagacc 2460
agacattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct 2520
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580
caggaattca ctgatggcag cttcacccag cccctgtaca gggggggagct gaatgagcac 2640
ctgggcctgc tggggcctta tatcagggct gaggtggagg ataatattat ggtgactttc 2700
aggaaccagg ccagcaggcc ctactctttc tatagcagcc tgatctctta tgaggaggat 2760

cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacctac 2820
ttctggaagg tccagcacca catggcccct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880
gcctatttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtccatt ctgggctgat tggccccctg 2940
ctggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtccaggag 3000
tttgccctgt tcttcactat ctttgatgag accaagagct ggtactttac tgagaacatg 3060
gagaggaact gcagagctcc ttgcaatatt cagatggagg accccacctt caaggagaat 3120
tacaggttcc atgccattaa tgggtacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa tatccacagc 3240
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg 3300
tataatctgt accctggggt gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa ggctggcatc 3360
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg 3420
gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc 3480
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactat 3540
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagctct 3660
ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg ggaagaagtg gcagacctac 3720
aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggga atgtggactc ttctggcatc 3780
aagcacaaca tcttcaatcc ccccatcatt gctaggtata ttaggctgca tcccacccac 3840
tacagcatca ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgcagc 3900
atgcccctgg gcatggagtc taaggccatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac 3960
ttcaccaaca tgtttgccac ctggagcccc tctaaggcca ggctgcatct gcaggggagg 4020

agcaatgcct ggaggcctca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc cagggggtca agagcctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac tctgttcttt 4200

cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggact ctttcacccc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccagatac ctgaggatcc acccccagtc ttgggtgcat 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggctc aggatctgta ctga 4374

<210> 8

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 8

atgcagattg agctgagcac ttgctttttt ctgtgcctgc tgaggttttg tttttctgcc 60

accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgatctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt tcccttcaac 180

acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt 240

gctaagccta ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccta ccattcaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtctctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagaga 420

gagaaggagg atgacaaggt cttccctggg ggctctcaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggaaaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta tctgagccat 540

gtggatctgg tgaaggacct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt ttatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc 780

ctgcctgggc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

accacccctg aggtgcacag catcttcctg gaaggccaca ctttcctggt gaggaaccat 900

aggcaggcca gcctggagat cagccctatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gatctggggc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tgggatggag 1020

gcctatgtga aggtggacag ctgcccagag gagcctcagc tgaggatgaa aaacaatgaa 1080

gaggctgagg attatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gagatttgat 1140

gatgacaata gccctagctt tattcagatc aggtctgtgg ctaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcatt acattgctgc tgaggaggag gactgggatt atgctcctct ggtgctggcc 1260

cctgatgata ggagctacaa gagccagtac ctgaataatg gccctcagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc 1380

atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggctagcagg ccttacaaca tctatcccca tgggatcact 1500

gatgtgagac ctctgtacag caggaggctg cccaaggggg tcaagcatct gaaagacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc 1620

accaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa catggagagg 1680

gatctggcct ctgggctgat tggccccctg ctgatctgtt acaaggaatc tgtggatcag 1740

aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aataggtctt ggtacctgac tgaaaacatc cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtc 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg 1920

tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgtct 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt ctttatgagc 2100

atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaataggggc 2160

atgactgctc tgctgaaggt gagctcttgt gacaagaaca ctggggatta ctatgaggac 2220

agctatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc 2280

tttagccaga atcctcctgt cctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg 2340

cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagacc 2460

aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagctctcct 2520

catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa agtggtgttt 2580

caggagttca ctgatggctc tttcacccag cctctgtata ggggggagct gaatgagcac 2640

ctggggctgc tgggccccta tatcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc 2700

aggaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tatagcagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacttac 2820

ttctggaagg tgcagcatca catggccccc accaaggatg agtttgactg taaggcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccccctg 2940

ctggtgtgcc ataccaatac tctgaaccct gctcatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgctctgt tcttcactat ctttgatgag accaagtctt ggtatttcac tgagaatatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac 3120

tataggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggatcaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatggggt ctaatgagaa catccacagc 3240

atccacttct ctggccatgt gtttactgtg agaaagaagg aggagtacaa gatggctctg 3300

tacaatctgt accctggggt ctttgagact gtggagatgc tgcctagcaa ggctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggaacat ctgcatgctg ggatgtctac tctgttcctg 3420

gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggctt ctggccatat cagggacttt 3480

cagattactg cctctgggca gtatggccag tgggccccca agctggctag gctgcattat 3540

tctggcagca tcaatgcctg gtctactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggatctg 3600

ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gtttagctct 3660

ctgtacatta gccagttcat catcatgtac agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaatt ctactggcac cctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctggcatc 3780

aagcacaaca tctttaaccc ccctatcatt gctaggtaca tcaggctgca tcccacccat 3840

tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgcagc 3900

atgcccctgg gcatggagag caaggccatt tctgatgccc agattactgc cagcagctac 3960

ttcactaaca tgtttgccac ctggtctccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agagcctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagctctagc caggatggcc accagtggac tctgtttttc 4200

cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcactcc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccaggtat ctgaggattc acccccagtc ttgggtgcat 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 9

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 9

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgtctgc tgagattttg cttttctgcc 60

actaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgtcttggg actacatgca gtctgatctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttccca cctagggtgc ctaagagctt tcccttcaat 180

acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt 240

gccaagccta ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccta ccatccaggc tgaagtgtat 300

gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg 420

gagaaggaag atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtctg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctactctta cctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggatct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgaag ggaagagctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaatagaagc 780

ctgcctggcc tgattgggtg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc 840

actacccctg aggtgcatag catcttcctg gaaggccata ccttcctggt gaggaatcat 900

aggcaggctt ctctggaaat ttctcccatc actttcctga ctgctcagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagctctc accagcatga tgggatggag 1020

gcctatgtga aggtggacag ctgtcctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt caggtttgat 1140

gatgacaata gcccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagact 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgcccctct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggagctataa gtctcagtac ctgaataatg gcccccagag gattgggagg 1320

aagtataaga aggtgaggtt tatggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggcctctagg ccctacaata tctaccctca tggcatcact 1500

gatgtgagac ccctgtatag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

accaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagct cttttgtgaa catggagagg 1680

gatctggcct ctgggctgat tggcccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag 1740

aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgaa 1800

aataggtctt ggtatctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt tcaggcctct aatatcatgc attctatcaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggctc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctatacttt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggacactct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgtct 2100

atggaaaatc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaatt ctgacttcag gaataggggg 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggatta ctatgaggac 2220

tcttatgaag atatctctgc ctatctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc 2280

ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccactctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gattttgaca tttatgatga ggatgagaac cagtctccca ggagcttcca gaagaagacc 2460

aggcattact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgag cagctctcct 2520

catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580

caggagttca ctgatgggag cttcacccag cccctgtata ggggggagct gaatgagcac 2640

ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttc 2700

aggaaccagg ctagcaggcc ttacagcttt tacagcagcc tgatctctta tgaagaagac 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaat tttgtgaagc ctaatgagac caagacttat 2820

ttttggaagg tgcagcatca catggctcct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcctactttt ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccctctg 2940

ctggtgtgcc atactaacac tctgaaccct gcccatggga ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcactat ttttgatgag accaagtctt ggtatttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggctcc ctgcaacatc cagatggaag accccacctt caaggagaac 3120

tataggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccacagc 3240

atccatttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg 3300

tacaacctgt atcctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc 3360

tggagggtgg aatgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgttcctg 3420

gtgtatagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccatat cagggatttc 3480

cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactat 3540

tctggcagca tcaatgcctg gagcactaag gagccttttt cttggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccta tgattattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctctagc 3660

ctgtacatct ctcagttcat cattatgtat agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaata gcactggcac cctgatggtg ttttttggga atgtggactc ttctgggatc 3780

aagcacaaca tctttaaccc ccccatcatt gccaggtata ttaggctgca ccccacccac 3840

tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa ttcttgctct 3900

atgcccctgg gcatggagag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttac 3960

ttcaccaaca tgtttgccac ctggtctcct agcaaggcca ggctgcatct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact cagggggtga agagcctgct gacctctatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac tctgttcttc 4200

cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aaccaggata gctttacccc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ctcctctgct gaccagatac ctgaggatcc atcctcagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 10

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 10

atgcagattg agctgagcac ttgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttttctgct 60

actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt tcctttcaac 180

acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt 240

gccaagccca ggccccccctg gatggggctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgattaccct gaagaacatg gctagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg 420

gaaaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccata cttatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg ggcccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttacagcta tctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggatct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ctaaggagaa gactcagact ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgaag gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat 720

gctgcctctg ccagggcttg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc 780

ctgcctggcc tgattgggtg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

accacccctg aggtgcacag cattttcctg gagggccaca ccttcctggt gaggaatcac 900

aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctggggc agtttctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggactc ttgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaata gccccagctt catccagatt aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccct ggtgctggct 1260

cctgatgaca ggtcttataa gagccagtac ctgaacaatg ggccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tttaccctca tggcatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggagactg cccaaggggg tgaagcacct gaaggatttt 1560

cccattctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

accaagtctg atcccaggtg cctgactagg tactactctt ctttgtgaa tatggagagg 1680

gatctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aataggagct ggtacctgac tgagaatatc cagaggttcc tgcctaatcc tgctggggtc 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacattatgc acagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgattctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta catcctgtct 1980

attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caagcataag 2040

atggtgtatg aggataccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgtct 2100

atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgtcataact ctgacttcag aaacaggggc 2160

atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220

agctatgagg atatctctgc ttatctgctg agcaagaata atgccattga gcccaggagc 2280

ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gactaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagtccccca ggtctttcca gaagaagacc 2460

aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagcccc 2520

catgtgctga ggaacagggc tcagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtcttc 2580

caggagttca ctgatggctc ttttacccag cctctgtaca gaggggagct gaatgagcac 2640

ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttc 2700

agaaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggat 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac 2820

ttctggaagg tgcagcacca tatggcccct actaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcttattttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggcccctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcactat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagagaaatt gtagggctcc ctgcaatatc cagatggagg accccacctt caaagaaaat 3120

tacagattcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgcctgggct ggtgatggct 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatggggt ctaatgagaa catccactct 3240

atccatttct ctggccatgt gttcactgtg agaaagaagg aggagtataa gatggctctg 3300

tacaacctgt acccaggggt gtttgagact gtggaaatgc tgcccagcaa agctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg 3420

gtgtacagca acaagtgcca gactcccctg ggcatggcct ctgggcacat cagggatttt 3480

cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac 3540

tctggcagca ttaatgcttg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggatctg 3600

ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctctagc 3660

ctgtacattt ctcagttcat catcatgtac agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac 3720

aggggggaaca gcactgggac cctgatggtg ttctttggca atgtggatag ctctggcatc 3780

aagcacaata tcttcaatcc ccccattatt gccaggtaca ttaggctgca tcctactcac 3840

tactctatta ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgacctgaa cagctgttct 3900

atgcccctgg gcatggagtc taaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac 3960

ttcactaata tgtttgccac ctggagccct agcaaggcca gactgcacct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcacccc tgtggtgaac 4260

agcctggatc ctcccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgctc tgaggatgga agtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 11

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 11

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgct 60

accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc taggttccct cccagggtgc ccaagagctt ccccttaat 180

acctctgtgg tgtacaagaa aaccctgttt gtggagttca ctgaccatct gttcaacatt 240

gccaagccca ggcccccttg gatgggcctg ctgggcccca ccattcaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tcattaccct gaagaacatg gcttctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctactctta tctgtctcat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag 600

ggctctctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt ttattctgct gtttgctgtc 660

tttgatgagg gcaagagctg gcattctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaaaatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

accacccctg aggtgcacag catcttcctg gagggccaca cctttctggt gaggaatcac 900

aggcaggcca gcctggagat tagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa aaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaata gccccagctt tattcagatt aggtctgtgg ctaagaagca ccccaagact 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgcccctct ggtcctggcc 1260

cctgatgata ggtcttacaa gagccagtat ctgaacaatg gcccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc 1380

attcagcatg agtctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacactctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccttataaca tctaccctca tgggatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtactc tagaaggctg cccaaggggg tcaagcacct gaaggatttt 1560

cccatcctgc ctggggagat tttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

accaagtctg accctaggtg cctgaccagg tactacagct cttttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggccctctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag 1800

aacaggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaaccc agctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aatattatgc atagcattaa tggctatgtg 1920

tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcataag 2040

atggtgtatg aggacaccct gactctgttc ccttttttctg gggagactgt gtttatgagc 2100

atggagaatc ctggcctgtg gatcctgggc tgccataatt ctgacttcag gaacaggggc 2160

atgactgccc tgctgaaagt gagcagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaagac 2220

agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc 2280

ttcagccaga acccccccagt gctgaagagg caccagagag agatcaccag gactaccctg 2340

cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tttatgatga ggatgagaat cagagcccca ggagcttcca gaagaagact 2460

aggcactatt ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagctctccc 2520

catgtgctga ggaatagggc ccagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc 2580

caggagttca ctgatggcag ctttacccag cccctgtata ggggggagct gaatgagcac 2640

ctgggcctgc tgggccccta tatcagggct gaggtggagg acaatattat ggtgaccttt 2700

aggaaccagg ccagcaggcc ctactctttc tatagcagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaat tttgtgaagc ctaatgagac caagacctac 2820

ttctggaagg tgcagcatca catggccccc accaaggatg agtttgactg caaggcttgg 2880

gcctatttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccccctg 2940

ctggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg atcccacctt caaggagaac 3120

tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacactc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggatcaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa tatccatagc 3240

atccacttct ctggccatgt gttcactgtc aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg 3300

tataatctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgtttctg 3420

gtgtactcta acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctgggcacat cagggatttc 3480

cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac 3540

tctggcagca tcaatgcctg gtctaccaag gagccctttt cttggattaa ggtggacctg 3600

ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gcaaaaagtg gcagacctac 3720

aggggcaata gcactgggac tctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc 3780

aagcacaata tcttcaaccc tcccatcatt gctaggtaca tcaggctgca ccccacccac 3840

tatagcatca ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgcagc 3900

atgcccctgg gcatggagtc caaagctatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac 3960

ttcaccaaca tgtttgccac ctggtctccc tctaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aaaactatga aggtgactgg ggtgaccacc cagggggtga agtctctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac tctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggaca gcttcacccc tgtggtgaac 4260

tctctggatc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggattc atccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgctc tgagaatgga ggtgctgggg tgtgaggctc aggacctgta ttga 4374

<210> 12

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 12

atgcagattg agctgtctac ttgtttttttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc 60

accaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgatctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttcaac 180

acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagttca ctgatcatct gtttaacatt 240

gccaagccca ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccaa ctatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tcatcaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttatagcta cctgtctcat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt ctgtagggaa 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt ttattctgct gtttgctgtg 660

tttgatgaag gcaagagctg gcactctgag accaagaatt ctctgatgca ggatagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg catactgtga atggctatgt gaacagaagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtatt ggcatgtgat tgggatgggc 840

actacccctg aagtgcacag cattttcctg gagggccaca ctttcctggt gaggaaccac 900

aggcaggcct ctctggagat cagccccatt actttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gatctgggcc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaataatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgataata gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc 1200

tgggtgcact atattgctgc tgaagaggag gactgggact atgcccctct ggtgctggct 1260

cctgatgaca ggagctataa gagccagtat ctgaacaatg ggccccagag gattgggagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat tctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacactctg 1440

ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaata tttaccccca tggcatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggccct 1620

accaagtctg accctaggtg tctgactagg tactacagca gctttgtgaa catggagaga 1680

gacctggctt ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag 1740

aggggcaacc agattatgtc tgataagagg aatgtcatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtatctgac tgagaacatt cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc attctattaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt tctgtctgtg tttttctctg ggtacacctt caagcacaag 2040

atggtctatg aggacaccct gaccctgttc ccctttttctg gggaaactgt gtttatgagc 2100

atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgactttag gaataggggc 2160

atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaata ctggggatta ctatgaggac 2220

agctatgagg atatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc 2280

ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgata tttatgatga ggatgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc 2460
aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagcccc 2520
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580
caggaattta ctgatggcag ctttacccag cccctgtaca gaggggagct gaatgagcac 2640
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttt 2700
aggaaccagg cctctaggcc ctattctttt tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac 2820

ttttggaaag tgcagcacca catggccccc actaaggatg agtttgattg caaggcctgg 2880
gcctatttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggccccctg 2940
ctggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000
tttgccctgt tctttaccat ctttgatgag actaagagct ggtatttcac tgagaacatg 3060
gagaggaact gcagagcccc ttgcaacatc cagatggagg accctacctt caaggagaac 3120
tataggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgcctggcct ggtgatggct 3180
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggga gcaatgagaa cattcatagc 3240

atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggccctg 3300
tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc 3360
tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgttcctg 3420
gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc 3480
cagattactg cctctgggca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcactac 3540
tctgggtcta tcaatgcttg gagcaccaag gagcctttca gctggatcaa ggtggatctg 3600
ctggccccca tgatcattca tgggatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtatattt ctcagttcat catcatgtat tctctggatg gcaaaaagtg gcagacctat 3720
agagggaaca gcactgggac cctgatggtg ttttttggca atgtggatag ctctggcatc 3780
aagcacaata tcttcaaccc ccccattatt gccaggtaca tcaggctgca ccccacccac 3840
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgctct 3900
atgcctctgg ggatggaaag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctat 3960
ttcaccaata tgtttgccac ttggagccct agcaaggcta ggctgcatct gcagggcagg 4020
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagactatga aagtgactgg ggtgaccacc cagggggtga aaagcctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggga aggtgaaggt gtttcagggc aatcaggata gcttcacccc agtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 13

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 13

atgcagattg agctgagcac ctgctttttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct 60

accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggtttccc cccagggtgc ccaagtcttt ccccttaac 180

acctctgtgg tgtataagaa gactctgttt gtggagttca ctgatcacct gttcaatatt 240

gccaagccca ggcccccttg gatgggcctg ctgggcccca ctatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tcatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttcccaggg gggtctcaca cttatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg ggcccatggc ctctgaccct ctgtgcctga cttatagcta cctgtctcat 540

gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

gggagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaata gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcttctg ctagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc 780

ctgcctggcc tgattgggtg tcacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggg 840

actactccag aagtgcacag catcttcctg gaggggcaca ccttcctggt gaggaatcac 900

aggcaggcca gcctggagat ttctcccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gatctggggc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tgggatggag 1020

gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaact ctcccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgctcccct ggtgctggct 1260

cctgatgata ggagctacaa gagccagtat ctgaataatg ggccccagag gattggcagg 1320

aagtataaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggct 1380

attcagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctataaca tctatcccca tgggatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtactc taggaggctg cccaaggggg tcaagcacct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

actaagtctg accccaggtg cctgactagg tactacagca gctttgtgaa catggagaga 1680

gatctggcct ctggcctgat tggcccccctg ctgatctgct acaaagagtc tgtggatcag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacagaagct ggtacctgac tgagaacatt cagaggtttc tgcccaaccc tgctggggtc 1860

cagctggagg accctgagtt tcaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta tatcctgagc 1980

attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggataccct gaccctgttc cctttctctg gggaaactgt gttcatgagc 2100

atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggg tgccacaatt ctgatttcag gaacagaggc 2160

atgactgctc tgctgaaggt gtctagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220

agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga acccaggtct 2280

ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gaccaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagact 2460

aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct 2520

catgtgctga ggaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttt 2580

caggagttca ctgatggcag cttcacccag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcat 2640

ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc 2700

agaaatcagg ctagcaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggac 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat 2820

ttctggaagg tgcagcacca catggccccc accaaggatg agtttgattg caaggcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccctctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac cctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tctttactat ctttgatgag accaagtctt ggtattttac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac 3120

tacagattcc atgccatcaa tggctacatt atggacactc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg tctatgggca gcaatgagaa cattcactct 3240

atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300

tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcctagcaa ggctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg 3420

gtgtacagca acaagtgcca gacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagagatttt 3480

cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggctccta agctggccag gctgcactac 3540

tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttta gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttctctagc 3660

ctgtacatta gccagttcat catcatgtat agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaaca gcactgggac cctgatggtg ttctttggga atgtggacag ctctgggatc 3780

aagcacaata tcttcaaccc ccccattatt gccaggtata ttaggctgca ccccactcac 3840

tacagcatta ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgcagc 3900

atgcccctgg gcatggagtc taaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttac 3960

ttcaccaaca tgtttgccac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aagactatga aggtgactgg ggtgaccact cagggggtga agagcctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagctctagc caggatggcc accagtggac cctgttcttt 4200

cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcacccc tgtggtgaat 4260

tctctggacc ctcccctgct gactaggtat ctgaggattc atccccagag ctgggtgcat 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ttga 4374

<210> 14

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 14

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttttctgcc 60

actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc ccaagggtgc ccaagtcttt tcccttcaat 180

acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttta ctgatcatct gtttaacatt 240

gccaagccca ggccccccctg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gatactgtgg tgattaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgtctct gcatgctgtg 360

ggggtgtctt attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggctctcaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg ggcctatggc ctctgaccca ctgtgcctga cttacagcta tctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggg ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggatagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggtct 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

accacccctg aggtgcatag cattttcctg gagggccaca ccttcctggt gaggaaccac 900

aggcaggcta gcctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggactc ttgtcctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaaca gcccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggagctataa gtctcagtac ctgaacaatg gcccccagag aattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctat actgatgaga ccttcaaaac cagggaggcc 1380

attcagcatg agtctggcat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggctagcagg ccttacaaca tctaccccca tgggatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttt 1560

cccattctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc 1620

accaagtctg accccaggtg cctgactagg tactactcta gctttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctgggctgat tggcccccctg ctgatctgtt acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgataagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtacctgac tgagaacatc cagagattcc tgcccaaccc tgctggggtg 1860

cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aacatcatgc attctatcaa tgggtatgtg 1920

tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgtctg catgaggtgg cctactggta cattctgagc 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caaacacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gtttatgagc 2100

atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaact ctgacttcag aaacaggggc 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtcttcttgt gataagaaca ctggggacta ttatgaagac 2220

agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaata atgctattga gcccaggtct 2280

ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactattt ctgtggagat gaagaaggaa 2400

gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccta ggagcttcca gaagaagact 2460

aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc 2520

catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc 2580

caggaattca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcac 2640

ctggggctgc tgggccctta catcagggct gaggtggagg acaatatcat ggtgaccttt 2700

aggaaccagg cctctaggcc ttacagcttc tactctagcc tgatctctta tgaagaggac 2760

cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacttac 2820

ttctggaagg tgcagcacca catggctccc accaaggatg agtttgactg caaggcttgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tgggcccctg 2940

ctggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca gacaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tttttaccat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg atcccacctt caaggagaac 3120

tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct 3180

caggaccaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa tatccactct 3240

atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300

tataacctgt atcctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc 3360

tggagagtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgtttctg 3420

gtgtatagca acaagtgtca gacccctctg ggcatggcct ctgggcacat tagggacttt 3480

cagatcactg cttctggcca gtatgggcag tgggctccca agctggccag gctgcactat 3540

tctggcagca ttaatgcctg gagcaccaag gagcctttca gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccca tgatcatcca tgggatcaag acccaggggg ctaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatca gccagtttat catcatgtat tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

aggggcaatt ctactggcac tctgatggtg ttctttggga atgtggatag ctctgggatc 3780

aagcataata tcttcaatcc ccccattatt gctaggtata tcaggctgca ccccacccac 3840

tatagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgacctgaa cagctgcagc 3900

atgcccctgg gcatggagag caaggctatt tctgatgccc agatcactgc cagcagctac 3960

tttactaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca gactgcacct gcagggcagg 4020

tctaatgcct ggaggcctca ggtgaataac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aaaaccatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agtctctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac cctgttcttt 4200

cagaatggga aggtgaaggt cttccagggc aaccaggata gcttcacccc tgtggtgaat 4260

agcctggatc ctcctctgct gaccaggtat ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggctc aggacctgta ctga 4374

<210> 15

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 15

atgcagattg agctgagcac ctgtttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg tttctctgcc 60

actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaat 180

acttctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttta ctgaccacct gttcaacatt 240

gctaagccca ggcctccctg gatggggctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gatactgtgg tgattaccct gaagaacatg gcctctcatc cagtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgaaggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gcccaatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttatagcta cctgagccat 540

gtggatctgg tgaaggacct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagagag 600

ggctctctgg ctaaggagaa gacccagact ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag actaagaata gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg catactgtga atggctatgt gaacaggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg tcacaggaaa tctgtctact ggcatgtgat tgggatgggc 840

actacccctg aggtgcactc tatcttcctg gagggccata ccttcctggt gaggaaccac 900

aggcaggcca gcctggagat ctctcccatt accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gatctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tgggatggag 1020

gcttatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaact ctcccagctt tattcagatc aggtctgtgg ctaagaagca ccccaagact 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgcccctct ggtgctggct 1260

cctgatgaca ggtcttacaa gtctcagtac ctgaataatg gccctcagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg 1440

ctgatcatct tcaagaatca ggccagcagg ccctacaaca tctaccccca tggcatcact 1500

gatgtgaggc cactgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggacttc 1560

cccattctgc ctggggagat cttcaagtac aaatggactg tgactgtgga ggatggccct 1620

accaagtctg accccaggtg tctgaccagg tactacagca gctttgtgaa tatggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaatc agatcatgtc tgataagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aatatcatgc acagcatcaa tggctatgtc 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta tattctgagc 1980

attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttttctg gctatacctt taagcacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgtct 2100

atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggg 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggacta ttatgaggac 2220

agctatgagg acatctctgc ttacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggtct 2280

ttcagccaga atccccctgt gctgaagagg catcagaggg agatcaccag gaccaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgattatgat gacactatct ctgtggaaat gaagaaggag 2400

gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc 2460

aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggatt atggcatgag cagctctccc 2520

catgtgctga ggaacagagc ccagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtcttc 2580

caggagttca ctgatggctc tttcacccag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcac 2640

ctgggcctgc tggggcccta cattagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgactttc 2700

agaaaccagg ccagcaggcc ttacagcttt tactcttctc tgattagcta tgaggaggat 2760

cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat 2820

ttctggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgactg caaggcttgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tgggcccctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaat 3120

tacaggttcc atgccatcaa tggctacatt atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180

caggatcaga ggatcaggtg gtatctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccacagc 3240

atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggaatacaa gatggctctg 3300

tataacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttcctg 3420

gtgtatagca ataagtgcca gacccccctg ggcatggctt ctggccacat cagggatttc 3480

cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggctccca agctggctag gctgcattac 3540

tctgggtcta tcaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ctaggcagaa gttcagcagc 3660

ctgtacatca gccagttcat cattatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacttac 3720

aggggcaata gcactgggac tctgatggtg ttctttggca atgtggactc ttctggcatc 3780

aagcacaaca tcttcaaccc tcccatcatt gccaggtaca ttaggctgca ccctacccac 3840

tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgatctgaa ctcttgcagc 3900

atgcctctgg gcatggaaag caaagccatc tctgatgccc agatcactgc ctctagctat 3960

ttcaccaata tgtttgccac ctggagccct agcaaggcca ggctgcacct gcagggcaga 4020

tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaagt gttccagggc aaccaggata gcttcactcc tgtggtgaac 4260

tctctggacc ctcccctgct gactaggtac ctgaggattc atccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 16

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 16

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc 60

accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg actatatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagagctt tcctttcaac 180

acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaatatt 240

gctaagccca ggccaccctg gatgggcctg ctgggcccta ccattcaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgattactct gaagaatatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac ttctcagagg 420

gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggctctcaca cttatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ttctgatcca ctgtgcctga cctactctta cctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaatt ctctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggtct 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

actacccctg aggtgcacag cattttcctg gagggccaca ccttcctggt caggaaccat 900

aggcaggcct ctctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac attagcagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggactc ttgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaagctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaaca gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgctcccct ggtgctggct 1260

cctgatgata ggagctacaa gtctcagtac ctgaataatg gcccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagagaggct 1380

atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggccagcaga ccctacaaca tctaccccca tgggatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc 1620

accaagtctg accctaggtg cctgactagg tactactcta gctttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggcccccctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggatcag 1740

aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aataggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt tcaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta tatcctgagc 1980

attggggctc agactgactt cctgtctgtg ttctttttctg gctacacttt taagcacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc ccctttttctg gggagactgt gttcatgtct 2100

atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgtcacaact ctgacttcag aaacaggggc 2160

atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaggac 2220

agctatgagg acatttctgc ctatctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc 2280

ttttctcaga atccccctgt gctgaagagg caccagagag agatcaccag gaccactctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgattatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaagag 2400

gactttgata tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagact 2460

agacactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct 2520

catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc 2580

caggagttca ctgatggcag ctttacccag cccctgtata ggggggagct gaatgagcat 2640

ctgggcctgc tgggccccta tattagggct gaagtggagg acaacatcat ggtgaccttt 2700

aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttt tacagcagcc tgattagcta tgaggaggat 2760

cagagacagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac 2820

ttctggaagg tgcagcacca catggcccct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg 2880

gcttacttct ctgatgtgga cctggagaaa gatgtgcact ctggcctgat tgggcccctg 2940

ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggga ggcaggtgac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt ttttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg 3060

gagaggaact gcagggcccc ctgtaacatc cagatggagg atcctacttt caaggagaac 3120

tacaggttcc atgccattaa tgggtacatc atggacaccc tgcctgggct ggtgatggcc 3180

caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg tctatgggct ctaatgagaa catccactct 3240

atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg 3300

tacaacctgt accctggggt gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa agctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcctg 3420

gtgtacagca ataagtgcca gactcccctg ggcatggctt ctgggcacat cagggatttc 3480

cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggctag gctgcactac 3540

tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttct cttggattaa ggtggacctg 3600
ctggctccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttttctagc 3660
ctgtatatta gccagttcat catcatgtat agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac 3720
agggggaata gcactggcac cctgatggtg ttttttggca atgtggattc ttctggcatc 3780
aagcataaca tcttcaatcc ccctatcatt gccaggtaca ttaggctgca tcccacccat 3840
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgatctgaa cagctgtagc 3900
atgcccctgg gcatggagtc caaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac 3960

ttcaccaaca tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020
tctaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080
aagactatga aggtgactgg ggtgaccact cagggggtga agagcctgct gaccagcatg 4140
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatgggc atcagtggac cctgtttttt 4200
cagaatggca aagtgaaggt gtttcagggg aatcaggaca gctttacccc tgtggtgaac 4260
agcctggatc ctcctctgct gactagatac ctgaggatcc acccccagag ctgggtccac 4320
cagattgctc tgaggatgga ggtgctgggg tgtgaggctc aggacctgta ctga 4374

<210> 17
<211> 4374
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FVIII Variant
<400> 17
atgcagattg agctgagcac ctgcttcttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc 60
accaggaggt actacctggg ggctgtggaa ctgagctggg actatatgca gtctgacctg 120
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt ccccttaac 180
acttctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttta ctgaccacct gttcaatatt 240
gccaagccca ggccccccctg gatgggcctg ctgggcccaa ccatccaggc tgaggtgtat 300
gatactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct attggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg 420
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg gggtctcata cctatgtgtg gcaggtgctg 480
aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctattctta cctgagccat 540
gtggacctgg tcaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagact ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaataggtct 780

ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

actacccctg aggtgcactc tatcttcctg gaggggcaca ccttcctggt gaggaaccac 900

aggcaggcca gcctggagat ctctcccatc accttcctga ctgcccagac tctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccat atcagcagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggacag ctgcccagag gaaccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaaca gccccagctt tattcagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggatt atgccccct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggtcttacaa gtctcagtac ctgaacaatg gccccagag gattgggagg 1320

aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat cctggggccc ctgctgtatg gggaggtggg ggataccctg 1440

ctgattatct tcaagaacca ggctagcagg ccctataaca tctaccccca tggcattact 1500

gatgtgaggc ccctgtactc taggagactg cccaaggggg tgaagcacct gaaagacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

actaagtctg accccaggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa tatggagagg 1680

gatctggctt ctggcctgat tgggcctctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggatcag 1740

agggggaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtacctgac tgagaatatc cagaggttcc tgcctaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt ccaggctagc aacattatgc acagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta cattctgtct 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggacactct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100

atggagaatc ctgggctgtg gattctgggg tgccacaact ctgatttcag gaacaggggc 2160

atgactgccc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggatta ttatgaggac 2220

agctatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc 2280

ttcagccaga atccccctgt gctgaagaga caccagaggg agatcactag gaccactctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag 2400

gactttgata tttatgatga ggatgagaac cagagcccca gaagcttcca gaagaagacc 2460

aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggatt atggcatgtc ttctagcccc 2520
catgtgctga ggaacagggc tcagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc 2580
caggagttca ctgatgggag cttcacccag cctctgtaca ggggggagct gaatgaacat 2640
ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgactttc 2700
aggaatcagg cctctaggcc ctacagcttc tactctagcc tgatcagcta tgaggaggac 2760
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaat tttgtgaaac ccaatgagac caagacctac 2820
ttttggaagg tgcagcacca catggcccct accaaggatg agtttgactg taaggcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccccctg 2940
ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag 3000
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtatttcac tgagaacatg 3060
gagaggaact gtagggctcc ctgcaacatc cagatggagg atccaacttt caaggagaac 3120
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggcc 3180
caggaccaga ggattaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccactct 3240
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg 3300

tacaacctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcctagcaa ggctggcatt 3360
tggagagtgg agtgtctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgtctac cctgttcctg 3420
gtgtactcta acaagtgcca gacccccctg gggatggctt ctgggcacat cagagatttt 3480
cagattactg cttctgggca gtatggccag tgggctccca agctggccag actgcattac 3540
tctggctcta ttaatgcttg gagcaccaag gagcctttca gctggatcaa ggtggacctg 3600
ctggctccca tgatcatcca tggcattaag actcaggggg ctaggcagaa gttcagcagc 3660
ctgtatattt ctcagtttat tatcatgtat tctctggatg gcaagaagtg gcagacttac 3720

aggggcaaca gcactggcac cctgatggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc 3780
aagcataaca tcttcaaccc ccccattatt gccaggtaca tcaggctgca ccccacccac 3840
tattctatca ggagcactct gaggatggag ctgatggggt gtgacctgaa cagctgctct 3900
atgcccctgg gcatggagag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttat 3960
ttcaccaaca tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcaga 4020
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaat cctaaggagt ggctgcaggt ggacttccag 4080
aagactatga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agagcctgct gaccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatgggc atcagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc atccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgctc tgagaatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ttga 4374

<210> 18

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII Variant

<400> 18

atgcagattg agctgtctac ctgtttttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct 60

accaggaggt attatctggg ggctgtggag ctgagctggg actacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaac 180

acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt 240

gccaagccca ggcccccctg gatggggctg ctgggcccca ctatccaggc tgaggtgtat 300

gatactgtgg tgattaccct gaagaacatg gcctctcacc ctgtgtctct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac ctctcagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gtttcctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg ggcccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctacagcta cctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggaaaa gacccagacc ctgcataagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacagatct 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggg 840

accacccctg aggtgcatag catcttcctg gaggggcaca ccttcctggt gagaaatcat 900

aggcaggcca gcctggagat tagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atttctagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggatag ctgccctgaa gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg attatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaaca gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgcccccct ggtgctggcc 1260

ccagatgaca ggtcttacaa gagccagtac ctgaataatg gcccccagag gattgggagg 1320

aagtataaga aagtgaggtt catggcttac actgatgaga cctttaagac tagggaggcc 1380

attcagcatg agtctgggat tctgggccct ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctataata tttatcccca tgggattact 1500

gatgtcaggc ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc 1560

cccattctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

accaagtctg atcctaggtg cctgaccagg tactatagca gctttgtgaa catggagagg 1680

gacctggctt ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggaatc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag 1800

aataggagct ggtatctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaatcc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt ccaggcttct aacatcatgc atagcatcaa tgggtatgtg 1920

tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctattggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cctttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100

atggagaacc ctggcctgtg gattctgggc tgccataatt ctgacttcag aaacaggggc 2160

atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaggac 2220

tcttatgagg atatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgctattga gcccaggagc 2280

ttcagccaga acccccctgt cctgaagagg catcagaggg agatcactag gaccaccctg 2340

cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggaaat gaagaaggag 2400

gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggtctttcca gaagaagacc 2460

aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgtc tagcagcccc 2520

catgtgctga ggaacagagc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttt 2580

caggagttca ctgatgggag cttcactcag cccctgtata gggggggagct gaatgagcat 2640

ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc 2700

aggaaccagg ccagcaggcc ctactctttc tactcttctc tgatcagcta tgaggaggat 2760

cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtcaagc ctaatgagac taagacctac 2820

ttttggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgattg caaggcctgg 2880

gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccctg 2940

ctggtgtgtc acaccaatac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtcac tgtgcaggag 3000

tttgccctgt ttttcactat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaacatg 3060

gaaaggaatt gcagggctcc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac 3120

tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgcctggcct ggtgatggct 3180

caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa catccacagc 3240

atccactttt ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg 3300

tacaatctgt accctggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc 3360

tggagggtgg agtgcctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttcctg 3420

gtgtactcta acaagtgcca gactcccctg ggcatggcct ctgggcacat cagggacttc 3480

cagatcactg cctctgggca gtatggccag tgggccccta agctggctag gctgcattac 3540

tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg 3600

ctggccccta tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccagacagaa gttctcttct 3660

ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac 3720

agggggaatt ctactggcac tctgatggtg ttctttggga atgtggatag ctctgggatc 3780

aagcataata ttttcaaccc ccccattatt gctaggtaca tcaggctgca cccaacccac 3840

tactctatta ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgtagc 3900

atgcccctgg gcatggagag caaggctatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctac 3960

tttaccaaca tgtttgctac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg 4020

agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggattttcag 4080

aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga aaagcctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agtttctgat cagcagctct caggatggcc atcagtggac cctgttcttc 4200

cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggata gcttcacccc tgtggtgaat 4260

agcctggacc ccccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc atccccagag ctgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaagccc aggacctgta ctga 4374

<210> 19

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wild-type factor VIII-BDD

<400> 19

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300

gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420

gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480

aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgtagagaa 600

gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660

tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720

gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780

ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840

accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900

cgccaggcgt ccttggaaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960

gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080

gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140

gatgacaact ctccttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200

tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260

cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320

aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380

attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg 1440

ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500

gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt 1560

ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620

actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680

gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740

agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860

cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920

tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980

attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040

atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160

atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220

agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280

ttctcccaaa acccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt 2340

cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa 2400

gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca 2460

cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca 2520

catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc 2580

caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat 2640

ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc 2700

agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat 2760

cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac 2820

ttttggaaag tgcaacatca tatggcaccc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg 2880

gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggacccctt 2940

ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgac agtacaggaa 3000

tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg 3060

gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatatc cagatggaag atcccacttt taaagagaat 3120

tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180

caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240

attcatttca gtggacatgt gttcaccgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300

tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt 3360

tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac acttttctg 3420

gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480

cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat 3540

tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600

ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660

ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720

cgaggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780

aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840

tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc 3900

atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatcctac 3960

tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg 4020

agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttccag 4080

aagacaatga aagtcacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt 4200

cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260

tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta ctga 4374

<210> 20

<211> 4890

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V3 factor VIII

<400> 20

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc 60

accaggagat actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actacatgca gtctgacctg 120

ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagagtgc ccaagagctt ccccttcaac 180

acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt 240

gccaagccca ggcccccctg gatgggcctg ctgggcccca ccatccaggc tgaggtgtat 300

gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg 360

ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg 420

gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtgctg 480

aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta cctgagccat 540

gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag 600

ggcagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgctgtg 660

tttgatgagg gcaagagctg gcactctgaa accaagaaca gcctgatgca ggacagggat 720

gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc 780

ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc 840

accacccctg aggtgcacag catcttcctg gagggccaca ccttcctggt caggaaccac 900

aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttcctga ctgcccagac cctgctgatg 960

gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag 1020

gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat 1140

gatgacaaca gccccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca ccccaagacc 1200

tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgccccccct ggtgctggcc 1260

cctgatgaca ggagctacaa gagccagtac ctgaacaatg gccccccagag gattggcagg 1320

aagtacaaga aggtcaggtt catggcctac actgatgaaa ccttcaagac cagggaggcc 1380

atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg 1440

ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccccca tggcatcact 1500

gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggacttc 1560

cccatcctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc 1620

accaagtctg accccaggtg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagagg 1680

gacctggcct ctggcctgat tggcccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag 1740

aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag 1800

aacaggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaaccc tgctggggtg 1860

cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtg 1920

tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc 1980

attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag 2040

atggtgtatg aggacaccct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc 2100

atggagaacc ctggcctgtg gattctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggc 2160

atgactgccc tgctgaaagt ctccagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac 2220

agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc 2280

ttcagccaga acagcaggca ccccagcacc aggcagaagc agttcaatgc caccaccatc 2340

cctgagaatg acatagagaa gacagaccca tggtttgccc accggacccc catgcccaag 2400

atccagaatg tgagcagctc tgacctgctg atgctgctga ggcagagccc cacccccat 2460

ggcctgagcc tgtctgacct gcaggaggcc aagtatgaaa ccttctctga tgaccccagc 2520

cctggggcca ttgacagcaa caacagcctg tctgagatga cccacttcag gccccagctg 2580

caccactctg gggacatggt gttcacccct gagtctggcc tgcagctgag gctgaatgag 2640

aagctgggca ccactgctgc cactgagctg aagaagctgg acttcaaagt ctccagcacc 2700

agcaacaacc tgatcagcac catcccctct gacaacctgg ctgctggcac tgacaacacc 2760

agcagcctgg gccccccccag catgcctgtg cactatgaca gccagctgga caccaccctg 2820

tttggcaaga agagcagccc cctgactgag tctgggggcc ccctgagcct gtctgaggag 2880

aacaatgaca gcaagctgct ggagtctggc ctgatgaaca gccaggagag cagctggggc 2940

aagaatgtga gcaccaggag cttccagaag aagaccaggc actacttcat tgctgctgtg 3000

gagaggctgt gggactatgg catgagcagc agcccccatg tgctgaggaa cagggcccag 3060

tctggctctg tgccccagtt caagaaggtg gtgttccagg agttcactga tggcagcttc 3120

acccagcccc tgtacagagg ggagctgaat gagcacctgg gcctgctggg cccctacatc 3180

agggctgagg tggaggacaa catcatggtg accttcagga accaggccag caggccctac 3240

agcttctaca gcagcctgat cagctatgag gaggaccaga ggcaggggggc tgagcccagg 3300

aagaactttg tgaagcccaa tgaaaccaag acctacttct ggaaggtgca gcaccacatg 3360

gcccccacca aggatgagtt tgactgcaag gcctgggcct acttctctga tgtggacctg 3420

gagaaggatg tgcactctgg cctgattggc cccctgctgg tgtgccacac caacaccctg 3480

aaccctgccc atggcaggca ggtgactgtg caggagtttg ccctgttctt caccatcttt 3540

gatgaaacca agagctggta cttcactgag aacatggaga ggaactgcag ggccccctgc 3600

aacatccaga tggaggaccc caccttcaag gagaactaca ggttccatgc catcaatggc 3660

tacatcatgg acaccctgcc tggcctggtg atggcccagg accagaggat caggtggtac 3720

ctgctgagca tgggcagcaa tgagaacatc cacagcatcc acttctctgg ccatgtgttc 3780

actgtgagga agaaggagga gtacaagatg gccctgtaca acctgtaccc tggggtgttt 3840

gagactgtgg agatgctgcc cagcaaggct ggcatctgga gggtggagtg cctgattggg 3900

gagcacctgc atgctggcat gagcaccctg ttcctggtgt acagcaacaa gtgccagacc 3960

cccctgggca tggcctctgg ccacatcagg gacttccaga tcactgcctc tggccagtat 4020

ggccagtggg cccccaagct ggccaggctg cactactctg gcagcatcaa tgcctggagc 4080

accaaggagc ccttcagctg gatcaaggtg gacctgctgg cccccatgat catccatggc 4140

atcaagaccc agggggccag gcagaagttc agcagcctgt acatcagcca gttcatcatc 4200

atgtacagcc tggatggcaa gaagtggcag acctacaggg gcaacagcac tggcaccctg 4260

atggtgttct ttggcaatgt ggacagctct ggcatcaagc acaacatctt caacccccccc 4320

atcattgcca gatacatcag gctgcacccc acccactaca gcatcaggag caccctgagg 4380

atggagctga tgggctgtga cctgaacagc tgcagcatgc ccctgggcat ggagagcaag 4440

gccatctctg atgcccagat cactgccagc agctacttca ccaacatgtt tgccacctgg 4500

agccccagca aggccaggct gcacctgcag ggcaggagca atgcctggag gccccaggtc 4560

aacaacccca aggagtggct gcaggtggac ttccagaaga ccatgaaggt gactggggtg 4620

accacccagg gggtgaagag cctgctgacc agcatgtatg tgaaggagtt cctgatcagc 4680

agcagccagg atggccacca gtggaccctg ttcttccaga atggcaaggt gaaggtgttc 4740

cagggcaacc aggacagctt cacccctgtg gtgaacagcc tggacccccc cctgctgacc 4800

agatacctga ggattcaccc ccagagctgg gtgcaccaga ttgccctgag gatggaggtg 4860

ctgggctgtg aggcccagga cctgtactga 4890

<210> 21

<211> 4374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CO3 factor VIII

<400> 21

atgcagattg agctgtcaac ttgctttttc ctgtgcctgc tgagattttg tttttccgct 60

actagaagat actacctggg ggctgtggaa ctgtcttggg attacatgca gagtgacctg 120

ggagagctgc cagtggacgc acgatttcca cctagagtcc ctaaatcatt ccccttcaac 180

accagcgtgg tctataagaa aacactgttc gtggagttta ctgatcacct gttcaacatc 240

gctaagcctc ggccaccctg gatgggactg ctgggaccaa caatccaggc agaggtgtac 300

gacaccgtgg tcattacact gaaaaacatg gcctcacacc ccgtgagcct gcatgctgtg 360

ggcgtcagct actggaaggc ttccgaaggg gcagagtatg acgatcagac ttcccagaga 420

gaaaaagagg acgataaggt gtttcctggc gggtctcata cctatgtgtg gcaggtcctg 480

aaagagaatg gccccatggc ttccgaccct ctgtgcctga cctactctta tctgagtcac 540

gtggacctgg tcaaggatct gaacagcgga ctgatcggag cactgctggt gtgtagggaa 600

gggagcctgg ctaaggagaa aacccagaca ctgcataagt tcattctgct gttcgccgtg 660

tttgacgaag gaaaatcatg gcacagcgag acaaagaata gtctgatgca ggaccgggat 720

gccgcttcag ccagagcttg gcccaaaatg cacactgtga acggctacgt caatcgctca 780

ctgcctggac tgatcggctg ccaccgaaag agcgtgtatt ggcatgtcat cggaatgggc 840

accacacctg aagtgcactc cattttcctg gaggggcata cctttctggt ccgcaaccac 900

cgacaggcct ccctggagat ctctccaatt accttcctga cagctcagac tctgctgatg 960

gatctgggac agttcctgct gttttgccac atcagctccc accagcatga tggcatggag 1020

gcctacgtga aagtggacag ctgtcccgag gaacctcagc tgaggatgaa gaacaatgag 1080

gaagctgaag actatgacga tgacctgacc gactccgaga tggatgtggt ccgattcgat 1140

gacgataaca gcccctcctt tatccagatt agatctgtgg ccaagaaaca ccctaagaca 1200

tgggtccatt acatcgcagc cgaggaagag gactgggatt atgcaccact ggtgctggca 1260

ccagacgatc gatcctacaa atctcagtat ctgaacaatg gaccacagcg gattggcaga 1320

aagtacaaga aagtgaggtt catggcttat accgatgaaa ccttcaagac tcgcgaagca 1380

atccagcacg agagcgggat tctgggacca ctgctgtacg gagaagtggg ggacaccctg 1440

ctgatcattt ttaagaacca ggccagcagg ccttacaata tctatccaca tggaattaca 1500

gatgtgcgcc ctctgtacag ccggagactg ccaaagggcg tcaaacacct gaaggacttc 1560

ccaatcctgc ccggggaaat ttttaagtat aaatggactg tcaccgtcga ggatggcccc 1620

actaagagcg accctaggtg cctgacccgc tactattcta gtttcgtgaa tatggaaagg 1680

gatctggcca gcggactgat cggcccactg ctgatttgtt acaaagagag cgtggatcag 1740

agaggcaacc agatcatgtc cgacaagagg aatgtgattc tgttcagtgt ctttgacgaa 1800

aaccggtcat ggtatctgac cgagaacatc cagagattcc tgcctaatcc agccggagtg 1860

cagctggaag atcctgagtt tcaggcttct aacatcatgc atagtattaa tggctacgtg 1920

ttcgacagtc tgcagctgtc agtgtgtctg cacgaggtcg cttactggta tatcctgagc 1980

attggagcac agacagattt cctgagcgtg ttcttttccg gctacacttt taagcataaa 2040

atggtgtatg aggacacact gactctgttc cccttcagcg gcgaaaccgt gtttatgtcc 2100

atggagaatc ccgggctgtg gatcctggga tgccacaaca gcgatttcag gaatcgcggg 2160

atgactgccc tgctgaaagt gtcaagctgt gacaagaaca ccggagacta ctatgaagat 2220

tcatacgagg acatcagcgc atatctgctg tccaaaaaca atgccattga acccaggtct 2280

tttagtcaga atcctccagt gctgaagagg caccagcgcg agatcacccg cactaccctg 2340

cagagtgatc aggaagagat cgactacgac gatacaattt ctgtggaaat gaagaaagag 2400

gacttcgata tctatgacga agatgagaac cagagtcctc gatcattcca gaagaaaacc 2460

cggcattact ttattgctgc agtggagcgc ctgtgggatt atggcatgtc ctctagtcct 2520

cacgtgctgc gaaatcgggc ccagtcaggg agcgtcccac agttcaagaa agtggtcttc 2580

caggagttta cagacggatc ctttactcag ccactgtacc ggggcgaact gaacgagcac 2640

ctggggctgc tgggacccta tatcagagct gaagtggagg ataacattat ggtcaccttc 2700

agaaatcagg catctaggcc ttacagtttt tattcaagcc tgatctctta cgaagaggac 2760

cagaggcagg gagcagaacc acgaaaaaac ttcgtgaagc ctaatgagac caaaacatac 2820

ttttggaagg tgcagcacca tatggcccca acaaaagacg aattcgattg caaggcatgg 2880

gcctattttt ctgacgtgga tctggagaag gacgtccaca gtggcctgat cgggccactg 2940

ctggtgtgtc atactaacac cctgaatccc gcacacggca ggcaggtcac tgtccaggaa 3000

ttcgccctgt tctttaccat ctttgatgag acaaaaagct ggtacttcac cgaaaacatg 3060

gagcgaaatt gccgggctcc atgtaatatt cagatggaag accccacatt caaggagaac 3120

taccgctttc atgccatcaa tgggtatatt atggatactc tgcccggact ggtcatggct 3180

caggaccaga gaatcaggtg gtacctgctg agcatggggt ccaacgagaa tatccactca 3240

attcatttca gcggacacgt gtttactgtc cggaagaaag aagagtataa aatggccctg 3300

tacaacctgt atcccggcgt gttcgaaacc gtcgagatgc tgcctagcaa ggcagggatc 3360

tggagagtgg aatgcctgat tggggagcac ctgcatgccg gaatgtctac cctgtttctg 3420

gtgtacagta ataagtgtca gacacccctg gggatggctt ccggacatat ccgggatttc 3480

cagattaccg catctggaca gtacggccag tgggccccta agctggctag actgcactat 3540

tccgggtcta tcaacgcttg gtccacaaaa gagcctttct cttggattaa ggtggacctg 3600

ctggcaccaa tgatcattca tggcatcaaa actcaggggg ccaggcagaa gttctcctct 3660

ctgtacatct cacagtttat catcatgtac agcctggatg gcaagaaatg gcagacatac 3720

cgcggcaata gcacagggac tctgatggtg ttctttggca acgtggacag ttcagggatc 3780

aagcacaaca ttttcaatcc ccctatcatt gctagataca tcaggctgca cccaacccat 3840

tattctattc gaagtacact gcggatggaa ctgatggggt gcgatctgaa cagttgttca 3900

atgcccctgg gaatggagtc caaggcaatc tctgacgccc agattaccgc tagctcctac 3960

ttcactaata tgtttgctac ctggagcccc tccaaagcac gactgcatct gcagggacga 4020

agcaacgcat ggcgaccaca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt cgattttcag 4080

aaaactatga aggtgaccgg agtcacaact cagggcgtga aaagtctgct gacctcaatg 4140

tacgtcaagg agttcctgat ctctagttca caggacggcc accagtggac actgttcttt 4200

cagaacggaa aggtgaaagt cttccagggc aatcaggatt cctttacacc tgtggtcaac 4260

tctctggacc caccctgct gactcgctac ctgcgaatcc acccacagtc ctgggtgcat 4320

cagattgcac tgagaatgga agtcctgggc tgcgaggccc aggacctgta ttga 4374

<210> 22

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transthyretin promoter

<400> 22

gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaaggtt 60

catattgact taggttactt attctccttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca 120

ggtttggagt cagcttggca gggatcagca gcctgggttg gaaggagggg gtataaaagc 180

cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ct 222

<210> 23

<211> 5066

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length cassette sequence

<400> 23

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc tacgcgtgtc tgtctgcaca tttcgtagag cgagtgttcc 180

gatactctaa tctccctagg caaggttcat attgacttag gttacttatt ctccttttgt 240

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttggagtcag cttggcaggg atcagcagcc 300

tgggttggaa ggagggggta taaaagcccc ttcaccagga gaagccgtca cacagatcca 360

caagctcctg ctagcaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg 420

gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactg acactgacat ccacttttc ttttctcca 480

caggtttaaa cgccaccatg cagattgagc tgagcacctg cttcttcctg tgtctgctga 540

ggttctgctt ctctgccacc aggaggtatt acctgggggc tgtggagctg agctgggact 600

atatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgctag gttcccccc agggtgccca 660

agagcttccc ctttaacact tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg 720

accacctgtt caacattgcc aagcccaggc ccccctggat ggggctgctg gggcccacca 780

tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc agccaccctg 840

tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcttc tgaggggct gagtatgatg 900

accagactag ccagagggag aaggaggatg acaaggtgtt tcctgggggc agccatacct 960

atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccctg tgcctgacct 1020

acagctacct gtctcatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggctc 1080

tgctggtgtg tagggagggc agcctggcta aggaaaagac ccagaccctg cataagttta 1140

tcctgctgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgagacc aagaacagcc 1200

tgatgcagga tagggatgct gcctctgcca gggcttggcc taagatgcac actgtgaatg 1260

ggtatgtgaa taggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc 1320

atgtgattgg gatgggcacc acccctgagg tccatagcat cttcctggag ggccacactt 1380

tcctggtgag gaaccacaga caggcctctc tggagatctc tcccatcacc ttcctgactg 1440

ctcagactct gctgatggac ctgggccagt tcctgctgtt ttgccatatt agcagccacc 1500

agcatgatgg gatggaggcc tatgtgaagg tggatagctg ccctgaggag cctcagctga 1560

ggatgaagaa caatgaggag gctgaagact atgatgatga cctgactgat tctgagatgg 1620

atgtggtgag gtttgatgat gacaatagcc ccagcttcat tcagatcagg tctgtggcca 1680

agaaacaccc caagacctgg gtgcactaca ttgctgctga ggaagaggac tgggactatg 1740

ctcccctggt gctggcccct gatgataggt cttataagag ccagtacctg aacaatgggc 1800

cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tgaggttcat ggcctacact gatgaaacct 1860

tcaaaaccag ggaggccatt cagcatgagt ctggcatcct gggccctctg ctgtatgggg 1920

aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc tacaacatct 1980

atcctcatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc aaaggggtga 2040

agcacctgaa agacttcccc atcctgcctg gggagatctt taagtataag tggactgtga 2100

ctgtggagga tggccctacc aagtctgacc ccaggtgtct gaccaggtac tattctagct 2160

ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg gcccctgctg atctgctaca 2220

aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt 2280

tttctgtgtt tgatgagaat aggagctggt acctgactga gaacatccag aggtttctgc 2340

ccaatcctgc tggggtgcag ctggaggatc ctgagttcca ggccagcaat atcatgcata 2400

gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat gaggtggcct 2460

actggtacat cctgagcatt ggggcccaga ctgactttct gtctgtgttc ttttctggct 2520

ataccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg ataccctgac cctgttcccc ttctctgggg 2580

agactgtgtt catgagcatg gagaatcctg ggctgtggat cctggggtgc cacaactctg 2640

attttaggaa caggggggatg actgccctgc tgaaggtgtc tagctgtgat aagaacactg 2700

gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tttctgctta tctgctgtct aagaataatg 2760

ccattgagcc cagaagcttc agccagaatc cccctgtgct gaagagacat cagagggaga 2820

tcaccagaac taccctgcag tctgatcagg aggagattga ctatgatgac actatctctg 2880

tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct atgatgagga tgagaatcag tctcccagga 2940

gctttcagaa gaagaccaga cattacttca ttgctgctgt ggagaggctg tgggactatg 3000

gcatgagctc tagccctcat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt 3060

tcaagaaggt ggtgttccag gaattcactg atggcagctt cacccagccc ctgtacaggg 3120

gggagctgaa tgagcacctg ggcctgctgg ggccttatat cagggctgag gtggaggata 3180

atattatggt gactttcagg aaccaggcca gcaggcccta ctctttctat agcagcctga 3240

tctcttatga ggaggatcag aggcaggggg ctgagcctag gaagaacttt gtgaagccca 3300

atgagactaa gacctacttc tggaaggtcc agcaccacat ggcccctacc aaggatgagt 3360
ttgactgcaa ggcctgggcc tatttctctg atgtggatct ggagaaggat gtccattctg 3420
ggctgattgg ccccctgctg gtgtgccaca ctaacactct gaatcctgcc catggcaggc 3480
aggtgactgt ccaggagttt gccctgttct tcactatctt tgatgagacc aagagctggt 3540
actttactga gaacatggag aggaactgca gagctccttg caatattcag atggaggacc 3600
ccaccttcaa ggagaattac aggttccatg ccattaatgg gtacatcatg gacaccctgc 3660
ctggcctggt gatggctcag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc atgggctcta 3720

atgagaatat ccacagcatc cacttctctg ggcatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg 3780
agtacaagat ggctctgtat aatctgtacc ctggggtgtt tgaaactgtg gagatgctgc 3840
cctctaaggc tggcatctgg agggtggagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca 3900
tgagcaccct gttcctggtg tacagcaaca agtgccagac ccccctgggc atggcctctg 3960
gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gccccccaagc 4020
tggccaggct gcactattct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag cccttcagct 4080
ggatcaaggt ggacctgctg gcccccatga tcattcatgg catcaagacc cagggggcca 4140

ggcagaagtt cagctctctg tacatctctc agttcatcat catgtactct ctggatggga 4200
agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcaccct gatggtgttc tttgggaatg 4260
tggactcttc tggcatcaag cacaacatct tcaatccccc catcattgct aggtatatta 4320
ggctgcatcc cacccactac agcatcaggt ctaccctgag gatggagctg atgggctgtg 4380
acctgaactc ttgcagcatg cccctgggca tggagtctaa ggccatctct gatgcccaga 4440
ttactgccag cagctacttc accaacatgt ttgccacctg gagcccctct aaggccaggc 4500
tgcatctgca ggggaggagc aatgcctgga ggcctcaggt gaacaacccc aaggagtggc 4560

tgcaggtgga tttccagaag accatgaagg tgactggggt gaccacccag ggggtcaaga 4620
gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc 4680
agtggactct gttctttcag aatgggaagg tgaaggtgtt tcagggcaat caggactctt 4740
tcacccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatacctg aggatccacc 4800
cccagtcttg ggtgcatcag attgccctga ggatggaggt gctgggctgt gaggctcagg 4860
atctgtactg agcggccgca ataaaagatc agagctctag agatctgtgt gttggttttt 4920
tgtgtaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac 4980

tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag 5040

cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagg 5066

<210> 24

<211> 11976

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length plasmid sequence

<400> 24

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc tacgcgtgtc tgtctgcaca tttcgtagag cgagtgttcc 180

gatactctaa tctccctagg caaggttcat attgacttag gttacttatt ctccttttgt 240

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttggagtcag cttggcaggg atcagcagcc 300

tgggttggaa ggagggggta taaaagcccc ttcaccagga gaagccgtca cacagatcca 360

caagctcctg ctagcaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg 420

gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactg acactgacat ccacttttc tttttctcca 480

caggtttaaa cgccaccatg cagattgagc tgagcacctg cttcttcctg tgtctgctga 540

ggttctgctt ctctgccacc aggaggtatt acctgggggc tgtggagctg agctgggact 600

atatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgctag gttccccccc agggtgccca 660

agagcttccc ctttaacact tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg 720

accacctgtt caacattgcc aagcccaggc ccccctggat ggggctgctg gggcccacca 780

tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc agccaccctg 840

tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcttc tgagggggct gagtatgatg 900

accagactag ccagagggag aaggaggatg acaaggtgtt tcctgggggc agccatacct 960

atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccccctg tgcctgacct 1020

acagctacct gtctcatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggctc 1080

tgctggtgtg tagggagggc agcctggcta aggaaaagac ccagaccctg cataagttta 1140

tcctgctgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgagacc aagaacagcc 1200

tgatgcagga tagggatgct gcctctgcca gggcttggcc taagatgcac actgtgaatg 1260

ggtatgtgaa taggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc 1320

atgtgattgg gatgggcacc acccctgagg tccatagcat cttcctggag ggccacactt 1380

tcctggtgag gaaccacaga caggcctctc tggagatctc tcccatcacc ttcctgactg 1440

ctcagactct gctgatggac ctgggccagt tcctgctgtt ttgccatatt agcagccacc 1500

agcatgatgg gatggaggcc tatgtgaagg tggatagctg ccctgaggag cctcagctga 1560
ggatgaagaa caatgaggag gctgaagact atgatgatga cctgactgat tctgagatgg 1620
atgtggtgag gtttgatgat gacaatagcc ccagcttcat tcagatcagg tctgtggcca 1680
agaaacaccc caagacctgg gtgcactaca ttgctgctga ggaagaggac tgggactatg 1740
ctcccctggt gctggcccct gatgataggt cttataagag ccagtacctg aacaatgggc 1800
cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tgaggttcat ggcctacact gatgaaacct 1860
tcaaaaccag ggaggccatt cagcatgagt ctggcatcct gggccctctg ctgtatgggg 1920

aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc tacaacatct 1980
atcctcatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc aaggggggtga 2040
agcacctgaa agacttcccc atcctgcctg gggagatctt taagtataag tggactgtga 2100
ctgtggagga tggccctacc aagtctgacc ccaggtgtct gaccaggtac tattctagct 2160
ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg gcccctgctg atctgctaca 2220
aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt 2280
tttctgtgtt tgatgagaat aggagctggt acctgactga gaacatccag aggtttctgc 2340

ccaatcctgc tggggtgcag ctggaggatc ctgagttcca ggccagcaat atcatgcata 2400
gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat gaggtggcct 2460
actggtacat cctgagcatt ggggcccaga ctgactttct gtctgtgttc ttttctggct 2520
ataccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg ataccctgac cctgttcccc ttctctgggg 2580
agactgtgtt catgagcatg gagaatcctg ggctgtggat cctggggtgc cacaactctg 2640
attttaggaa caggggggatg actgccctgc tgaaggtgtc tagctgtgat aagaacactg 2700
gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tttctgctta tctgctgtct aagaataatg 2760

ccattgagcc cagaagcttc agccagaatc cccctgtgct gaagagacat cagagggaga 2820
tcaccagaac taccctgcag tctgatcagg aggagattga ctatgatgac actatctctg 2880
tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct atgatgagga tgagaatcag tctcccagga 2940
gctttcagaa gaagaccaga cattacttca ttgctgctgt ggagaggctg tgggactatg 3000
gcatgagctc tagccctcat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt 3060
tcaagaaggt ggtgttccag gaattcactg atggcagctt cacccagccc ctgtacaggg 3120
gggagctgaa tgagcacctg ggcctgctgg ggccttatat cagggctgag gtggaggata 3180

atattatggt gactttcagg aaccaggcca gcaggcccta ctctttctat agcagcctga 3240

tctcttatga ggaggatcag aggcaggggg ctgagcctag gaagaacttt gtgaagccca 3300

atgagactaa gacctacttc tggaaggtcc agcaccacat ggcccctacc aaggatgagt 3360

ttgactgcaa ggcctgggcc tatttctctg atgtggatct ggagaaggat gtccattctg 3420

ggctgattgg ccccctgctg gtgtgccaca ctaacactct gaatcctgcc catggcaggc 3480

aggtgactgt ccaggagttt gccctgttct tcactatctt tgatgagacc aagagctggt 3540

actttactga gaacatggag aggaactgca gagctccttg caatattcag atggaggacc 3600

ccaccttcaa ggagaattac aggttccatg ccattaatgg gtacatcatg gacaccctgc 3660

ctggcctggt gatggctcag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc atgggctcta 3720

atgagaatat ccacagcatc cacttctctg ggcatgtgtt cactgtgagg aagaaggagg 3780

agtacaagat ggctctgtat aatctgtacc ctggggtgtt tgaaactgtg gagatgctgc 3840

cctctaaggc tggcatctgg agggtggagt gcctgattgg ggagcacctg catgctggca 3900

tgagcaccct gttcctggtg tacagcaaca agtgccagac ccccctgggc atggcctctg 3960

gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg gccccccaagc 4020

tggccaggct gcactattct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag cccttcagct 4080

ggatcaaggt ggacctgctg gcccccatga tcattcatgg catcaagacc cagggggcca 4140

ggcagaagtt cagctctctg tacatctctc agttcatcat catgtactct ctggatggga 4200

agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcaccct gatggtgttc tttgggaatg 4260

tggactcttc tggcatcaag cacaacatct tcaatccccc catcattgct aggtatatta 4320

ggctgcatcc cacccactac agcatcaggt ctaccctgag gatggagctg atgggctgtg 4380

acctgaactc ttgcagcatg cccctgggca tggagtctaa ggccatctct gatgcccaga 4440

ttactgccag cagctacttc accaacatgt ttgccacctg gagcccctct aaggccaggc 4500

tgcatctgca ggggaggagc aatgcctgga ggcctcaggt gaacaacccc aaggagtggc 4560

tgcaggtgga tttccagaag accatgaagg tgactggggt gaccacccag ggggtcaaga 4620

gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc 4680

agtggactct gttctttcag aatgggaagg tgaaggtgtt tcagggcaat caggactctt 4740

tcacccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatacctg aggatccacc 4800

cccagtcttg ggtgcatcag attgccctga ggatggaggt gctgggctgt gaggctcagg 4860

atctgtactg agcggccgca ataaaagatc agagctctag agatctgtgt gttggttttt 4920

tgtgtaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac 4980

tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag 5040

cgagcgagcg cgcagctgcc tgcaggggca gcttgaagga aatactaagg caaaggtact 5100

gcaagtgctc gcaacattcg cttatgcgga ttattgccgt agtgccgcga cgccgggggc 5160

aagatgcaga gattgccatg gtacaggccg tgcggttgat attgccaaaa cagagctgtg 5220

ggggagagtt gtcgagaaag agtgcggaag atgcaaaggc gtcggctatt caaggatgcc 5280

agcaagcgca gcatatcgcg ctgtgacgat gctaatccca aaccttaccc aacccacctg 5340

gtcacgcact gttaagccgc tgtatgacgc tctggtggtg caatgccaca aagaagagtc 5400

aatcgcagac aacattttga atgcggtcac acgttagcag catgattgcc acggatggca 5460

acatattaac ggcatgatat tgacttattg aataaaattg ggtaaatttg actcaacgat 5520

gggttaattc gctcgttgtg gtagtgagat gaaaagaggc ggcgcttact accgattccg 5580

cctagttggt cacttcgacg tatcgtctgg aactccaacc atcgcaggca gagaggtctg 5640

caaaatgcaa tcccgaaaca gttcgcaggt aatagttaga gcctgcataa cggtttcggg 5700

atttttttata tctgcacaac aggtaagagc attgagtcga taatcgtgaa gagtcggcga 5760

gcctggttag ccagtgctct ttccgttgtg ctgaattaag cgaataccgg aagcagaacc 5820

ggatcaccaa atgcgtacag gcgtcatcgc cgcccagcaa cagcacaacc caaactgagc 5880

cgtagccact gtctgtcctg aattcattag taatagttac gctgcggcct tttacacatg 5940

accttcgtga aagcgggtgg caggaggtcg cgctaacaac ctcctgccgt tttgcccgtg 6000

catatcggtc acgaacaaat ctgattacta aacacagtag cctggatttg ttctatcagt 6060

aatcgacctt attcctaatt aaatagagca aatcccctta ttgggggtaa gacatgaaga 6120

tgccagaaaa acatgacctg ttggccgcca ttctcgcggc aaaggaacaa ggcatcgggg 6180

caatccttgc gtttgcaatg gcgtaccttc gcggcagata taatggcggt gcgtttacaa 6240

aaacagtaat cgacgcaacg atgtgcgcca ttatcgccta gttcattcgt gaccttctcg 6300

acttcgccgg actaagtagc aatctcgctt atataacgag cgtgtttatc ggctacatcg 6360

gtactgactc gattggttcg cttatcaaac gcttcgctgc taaaaaagcc ggagtagaag 6420

atggtagaaa tcaataatca acgtaaggcg ttcctcgata tgctggcgtg gtcggaggga 6480

actgataacg gacgtcagaa aaccagaaat catggttatg acgtcattgt aggcggagag 6540

ctatttactg attactccga tcaccctcgc aaacttgtca cgctaaaccc aaaactcaaa 6600

tcaacaggcg ccggacgcta ccagcttctt tcccgttggt gggatgccta ccgcaagcag 6660

cttggcctga aagacttctc tccgaaaagt caggacgctg tggcattgca gcagattaag 6720

gagcgtggcg ctttacctat gattgatcgt ggtgatatcc gtcaggcaat cgaccgttgc 6780

agcaatatct gggcttcact gccgggcgct ggttatggtc agttcgagca taaggctgac 6840

agcctgattg caaaattcaa agaagcgggc ggaacggtca gagagattga tgtatgagca 6900

gagtcaccgc gattatctcc gctctggtta tctgcatcat cgtctgcctg tcatgggctg 6960

ttaatcatta ccgtgataac gccattacct acaaagccca gcgcgacaaa aatgccagag 7020
aactgaagct ggcgaacgcg gcaattactg acatgcagat gcgtcagcgt gatgttgctg 7080
cgctcgatgc aaaatacacg aaggagttag ctgatgctaa agctgaaaat gatgctctgc 7140
gtgatgatgt tgccgctggt cgtcgtcggt tgcacatcaa agcagtctgt cagtcagtgc 7200
gtgaagccac caccgcctcc ggcgtggata atgcagcctc cccccgactg gcagacaccg 7260
ctgaacggga ttatttcacc ctcagagaga ggctgatcac tatgcaaaaa caactggaag 7320
gaacccagaa gtatattaat gagcagtgca gatagagttg cccatatcga tgggcaactc 7380

atgcaattat tgtgagcaat acacacgcgc ttccagcgga gtataaatgc ctaaagtaat 7440
aaaaccgagc aatccattta cgaatgtttg ctgggtttct gttttaacaa cattttctgc 7500
gccgccacaa attttggctg catcgacagt tttcttctgc ccaattccag aaacgaagaa 7560
atgatgggtg atggtttcct ttggtgctac tgctgccggt ttgttttgaa cagtaaacgt 7620
ctgttgagca catcctgtaa taagcagggc cagcgcagta gcgagtagca ttttttttcat 7680
ggtgttattc ccgatgcttt ttgaagttcg cagaatcgta tgtgtagaaa attaaacaaa 7740
ccctaaacaa tgagttgaaa tttcatattg ttaatattta ttaatgtatg tcaggtgcga 7800

tgaatcgtca ttgtattccc ggattaacta tgtccacagc cctgacgggg aacttctctg 7860
cgggagtgtc cgggaataat taaaacgatg cacacagggt ttagcgcgta cacgtattgc 7920
attatgccaa cgccccggtg ctgacacgga agaaaccgga cgttatgatt tagcgtggaa 7980
agatttgtgt agtgttctga atgctctcag taaatagtaa tgaattatca aaggtatagt 8040
aatatctttt atgttcatgg atatttgtaa cccatcggaa aactcctgct ttagcaagat 8100
tttccctgta ttgctgaaat gtgatttctc ttgatttcaa cctatcatag gacgtttcta 8160
taagatgcgt gtttcttgag aatttaacat ttacaacctt tttaagtcct tttattaaca 8220

cggtgttatc gttttctaac acgatgtgaa tattatctgt ggctagatag taaatataat 8280
gtgagacgtt gtgacgtttt agttcagaat aaaacaattc acagtctaaa tcttttcgca 8340
cttgatcgaa tatttcttta aaaatggcaa cctgagccat tggtaaaacc ttccatgtga 8400
tacgagggcg cgtagtttgc attatcgttt ttatcgtttc aatctggtct gacctccttg 8460
tgttttgttg atgatttatg tcaaatatta ggaatgtttt cacttaatag tattggttgc 8520
gtaacaaagt gcggtcctgc tggcattctg gagggaaata caaccgacag atgtatgtaa 8580
ggccaacgtg ctcaaatctt catacagaaa gatttgaagt aatattttaa ccgctagatg 8640

aagagcaagc gcatggagcg acaaaatgaa taaagaacaa tctgctgatg atccctccgt 8700

ggatctgatt cgtgtaaaaa atatgcttaa tagcaccatt tctatgagtt accctgatgt 8760

tgtaattgca tgtatagaac ataaggtgtc tctggaagca ttcagagcaa ttgaggcagc 8820

gttggtgaag cacgataata atatgaagga ttattccctg gtggttgact gatcaccata 8880

actgctaatc attcaaacta tttagtctgt gacagagcca acacgcagtc tgtcactgtc 8940

aggaaagtgg taaaactgca actcaattac tgcaatgccc tcgtaattaa gtgaatttac 9000

aatatcgtcc tgttcggagg gaagaacgcg ggatgttcat tcttcatcac ttttaattga 9060

tgtatatgct ctcttttctg acgttagtct ccgacggcag gcttcaatga cccaggctga 9120

gaaattcccg gacccttttt gctcaagagc gatgttaatt tgttcaatca tttggttagg 9180

aaagcggatg ttgcgggttg ttgttctgcg ggttctgttc ttcgttgaca tgaggttgcc 9240

ccgtattcag tgtcgctgat ttgtattgtc tgaagttgtt tttacgttaa gttgatgcag 9300

atcaattaat acgatacctg cgtcataatt gattatttga cgtggtttga tggcctccac 9360

gcacgttgtg atatgtagat gataatcatt atcactttac gggtcctttc cggtgatccg 9420

acaggttacg gggcggcgac ctgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt 9480

atttcacacc gcatacgtca aagcaaccat agtacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg 9540

cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ttagcgcccg 9600

ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 9660

taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa 9720

aacttgattt gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc 9780

ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac 9840

tcaactctat ctcgggctat tcttttgatt tagacctgca ggcatgcaag cttggcactg 9900

gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgcctt 9960

gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct 10020

tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgcgatttat tcaacaaagc cgccgtcccg 10080

tcaagtcagc gtaatgctct gccagtgtta caaccaatta accaattctg attagaaaaa 10140

ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt 10200

ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc 10260

aagatcctgg tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt 10320

cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgacga ctgaatccgg 10380

tgagaatggc aaaagcttat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg 10440

ctcgtcatca aaatcactcg catcaaccaa accgttattc attcgtgatt gcgcctgagc 10500

gagacgaaat acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg 10560

gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa 10620

tacctggaat gctgttttcc cggggatcgc agtggtgagt aaccatgcat catcaggagt 10680

acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac 10740

catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcca tgtttcagaa acaactctgg 10800

cgcatcgggc ttcccataca atcgatagat tgtcgcacct gattgcccga cattatcgcg 10860

agcccattta tacccatata aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gcttcgagca 10920

agacgtttcc cgttgaatat ggctcataac acccttgta ttactgttta tgtaagcaga 10980

cagttttatt gttcatgatg atatatttttt atcttgtgca atgtaacatc agagattttg 11040

agacacaacg tggctttgtt gaataaatcg aacttttgct gagttgaagg atcagatcac 11100

gcatcttccc gacaacgcag accgttccgt ggcaaagcaa aagttcaaaa tcaccaactg 11160

gtccacctac aacaaagctc tcatcaaccg tggctccctc actttctggc tggatgatgg 11220

ggcgattcag gcctggtatg agtcagcaac accttcttca cgaggcagac ctctcgacgg 11280

agttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 11340

ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 11400

tgccggatca agagctacca actcttttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 11460

taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 11520

caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 11580

agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 11640

gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 11700

gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 11760

ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 11820

acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 11880

tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac 11940

ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgt 11976

<210> 25

<211> 1457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII-BDD variant

<400> 25

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15
Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30
Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45
Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

50 55 60
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser

115 120 125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160
Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175
Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile

180 185 190
Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205
Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220
Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr

245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val

260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile

275 280 285

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

290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met

305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His

325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro

340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp

355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser

370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr

385 390 395 400

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

405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn

420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro

485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys

500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe

515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp

530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg

545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu

565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val

580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu

595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp

610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val

625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp

645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe

660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr

675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro

690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly

705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp

725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys

740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu

755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln

770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu

785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr

850 855 860

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His

865 870 875 880

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile

885 890 895

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser

900 905 910

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

915 920 925

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val

930 935 940

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp

945 950 955 960

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu

965 970 975

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His

980 985 990

```
Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu  Phe Ala Leu Phe Phe  Thr Ile Phe
        995                 1000                1005
Asp Glu  Thr Lys Ser Trp Tyr  Phe Thr Glu Asn Met  Glu Arg Asn

    1010                1015                1020
Cys Arg  Ala Pro Cys Asn Ile  Gln Met Glu Asp Pro  Thr Phe Lys
    1025                1030                1035
Glu Asn  Tyr Arg Phe His Ala  Ile Asn Gly Tyr Ile  Met Asp Thr
    1040                1045                1050
Leu Pro  Gly Leu Val Met Ala  Gln Asp Gln Arg Ile  Arg Trp Tyr
    1055                1060                1065
Leu Leu  Ser Met Gly Ser Asn  Glu Asn Ile His Ser  Ile His Phe

    1070                1075                1080
Ser Gly  His Val Phe Thr Val  Arg Lys Lys Glu Glu  Tyr Lys Met
    1085                1090                1095
Ala Leu  Tyr Asn Leu Tyr Pro  Gly Val Phe Glu Thr  Val Glu Met
    1100                1105                1110
Leu Pro  Ser Lys Ala Gly Ile  Trp Arg Val Glu Cys  Leu Ile Gly
    1115                1120                1125
Glu His  Leu His Ala Gly Met  Ser Thr Leu Phe Leu  Val Tyr Ser

    1130                1135                1140
Asn Lys  Cys Gln Thr Pro Leu  Gly Met Ala Ser Gly  His Ile Arg
    1145                1150                1155
Asp Phe  Gln Ile Thr Ala Ser  Gly Gln Tyr Gly Gln  Trp Ala Pro
    1160                1165                1170
Lys Leu  Ala Arg Leu His Tyr  Ser Gly Ser Ile Asn  Ala Trp Ser
    1175                1180                1185
Thr Lys  Glu Pro Phe Ser Trp  Ile Lys Val Asp Leu  Leu Ala Pro

    1190                1195                1200
Met Ile  Ile His Gly Ile Lys  Thr Gln Gly Ala Arg  Gln Lys Phe
    1205                1210                1215
Ser Ser  Leu Tyr Ile Ser Gln  Phe Ile Ile Met Tyr  Ser Leu Asp
```

1220 1225 1230

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu

1235 1240 1245

Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn

1250 1255 1260

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro

1265 1270 1275

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly

1280 1285 1290

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

1295 1300 1305

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn

1310 1315 1320

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln

1325 1330 1335

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu

1340 1345 1350

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val

1355 1360 1365

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys

1370 1375 1380

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu

1385 1390 1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp

1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr

1415 1420 1425

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala

1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1445 1450 1455

<210> 26

<211> 2351

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wild-type FVIII with BDD

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255
Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270
Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300
Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365
Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro

485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys

500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe

515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp

530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg

545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu

565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val

580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu

595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp

610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val

625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp

645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe

660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr

675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro

690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720
Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750
Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
755 760 765
Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
770 775 780
Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
785 790 795 800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
805 810 815
Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
820 825 830
Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
835 840 845
Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
865 870 875 880
Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
885 890 895
Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
900 905 910
Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
915 920 925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
930 935 940
Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu

945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu

965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe

980 985 990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala

995 1000 1005

Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser

1010 1015 1020

Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser

1025 1030 1035

Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu

1040 1045 1050

Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg

1055 1060 1065

Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met

1070 1075 1080

Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln

1085 1090 1095

Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met

1100 1105 1110

Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile

1115 1120 1125

Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro

1130 1135 1140

Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu

1145 1150 1155

Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys

1160 1165 1170

Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro

1175 1180 1185

Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu
1190 1195 1200
Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu
1205 1210 1215
Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile
1220 1225 1230

His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu
1235 1240 1245
Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr
1250 1255 1260
Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn
1265 1270 1275
Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu
1280 1285 1290

Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu
1295 1300 1305
Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln
1310 1315 1320
Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg
1325 1330 1335
Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp
1340 1345 1350

Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro
1355 1360 1365
Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala
1370 1375 1380
Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser
1385 1390 1395
Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser
1400 1405 1410

Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe

1415 1420 1425

Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys

1430 1435 1440

Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys

1445 1450 1455

Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly

1460 1465 1470

Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser

1475 1480 1485

Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp

1490 1495 1500

Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His

1505 1510 1515

Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser

1520 1525 1530

Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr

1535 1540 1545

Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val

1550 1555 1560

Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser

1565 1570 1575

Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln

1580 1585 1590

Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys

1595 1600 1605

Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys

1610 1615 1620

Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys

1625 1630 1635

Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg

1640 1645 1650

Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu
1655 1660 1665
Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
1670 1675 1680
Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile
1685 1690 1695
Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
1700 1705 1710

Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
1715 1720 1725
Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
1730 1735 1740
Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
1745 1750 1755
Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu
1760 1765 1770

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
1775 1780 1785
Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1790 1795 1800
Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
1805 1810 1815
Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
1820 1825 1830

Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
1835 1840 1845
Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
1850 1855 1860
Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
1865 1870 1875
Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln

1880 1885 1890

Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
1895 1900 1905
Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
1910 1915 1920
Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
1925 1930 1935
Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
1940 1945 1950

Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
1955 1960 1965
Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
1970 1975 1980
Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
1985 1990 1995
Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
2000 2005 2010

Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
2015 2020 2025
Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
2030 2035 2040
Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
2045 2050 2055
Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
2060 2065 2070

Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
2075 2080 2085
Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
2090 2095 2100
Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
2105 2110 2115

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
2120 2125 2130

Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
2135 2140 2145
Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
2150 2155 2160
Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
2165 2170 2175
Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
2180 2185 2190

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
2195 2200 2205
Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
2210 2215 2220
Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
2225 2230 2235
Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
2240 2245 2250

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
2255 2260 2265
Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
2270 2275 2280
Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
2285 2290 2295
Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
2300 2305 2310

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
2315 2320 2325
Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
2330 2335 2340
Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

2345 2350

<210> 27

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV-LK03 VP1 capsid

<400> 27

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

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

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

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

180 185 190

Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr

260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His

275 280 285

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

290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val

305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu

325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr

340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp

355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser

370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser

385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu

405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg

420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr

435 440 445

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser

450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro

465 470 475 480

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

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile

545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln

565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu

625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

645 650 655

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr

660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700

Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val

705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu

725 730 735

<210> 28

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV-SPK VP1 capsid

<400> 28

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile

145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
180 185 190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
260 265 270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
290 295 300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385 390 395 400

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

Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
435 440 445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
450 455 460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
485 490 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
500 505 510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
515 520 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545 550 555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
580 585 590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val

645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe

660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

675 680 685

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

690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu

705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725 730 735

Asn Leu

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant FVIII-BDD

<400> 29

Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg

1 5 10