



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111163796 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880064058.9

(72)发明人 泽维尔·安谷拉

(22)申请日 2018.08.01

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 樊英如 邱晓敏

(30)优先权数据

62/540,053 2017.08.01 US

62/583,890 2017.11.09 US

62/596,535 2017.12.08 US

62/596,670 2017.12.08 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/37(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

C07K 14/755(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/044892 2018.08.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/028192 EN 2019.02.07

(71)申请人 星火治疗有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

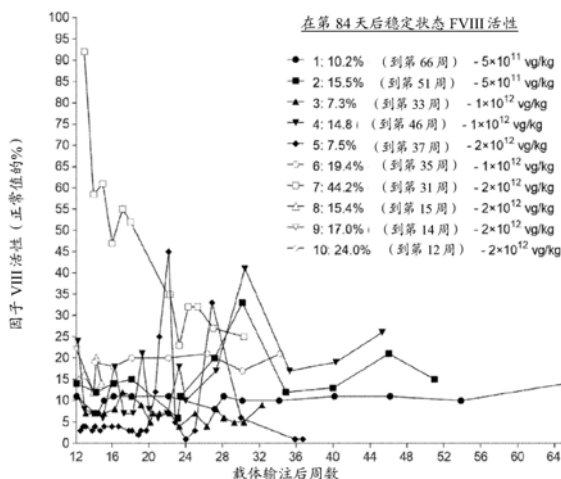
权利要求书9页 说明书77页 附图26页

(54)发明名称

因子VIII(FVIII)基因治疗方法

(57)摘要

公开了使用包含编码FVIII蛋白的核酸和核酸变体的载体的方法。在特定实施方案中,治疗患有血友病A的人的方法包括施用重组腺相关病毒(rAAV)载体,所述载体包含编码因子VIII(FVIII)的核酸或编码具有B结构域缺失的因子VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)的核酸变体。在一些方面,核酸变体与SEQ ID NO:7具有95%或更高的同一性和/或具有不超过2个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)的核酸变体。在其他方面,以小于约6×10¹²载体基因组/千克(vg/kg)的剂量向所述人施用rAAV载体。



1. 一种治疗患有血友病A的人的方法,其包括施用重组腺相关病毒(rAAV)载体,其中所述载体基因组包含编码具有B结构域缺失的因子VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)的核酸变体,其中所述核酸变体与SEQ ID NO:7具有95%或更高的同一性。

2. 一种治疗患有血友病A的人的方法,包括施用重组腺相关病毒(rAAV)载体,其中所述载体基因组包含编码具有B结构域缺失的因子VIII(FVIII)(hFVIII-BDD)的核酸变体,其中所述核酸变体具有不超过2个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

3. 一种治疗患有血友病A的人的方法,包括施用重组腺相关病毒(rAAV)载体,其中所述载体基因组包含编码因子VIII(FVIII)或编码具有B结构域缺失(hFVIII-BDD)的因子VIII(FVIII)的核酸,其中向该患有血友病A的人施用的rAAV载体的剂量小于 6×10^{12} 载体基因组/千克(vg/kg)。

4. 根据权利要求1或2的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 1×10^9 至约 1×10^{14} vg/kg之间,包括端点值。

5. 根据权利要求1或2的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 1×10^{10} 至约 6×10^{13} vg/kg之间,包括端点值。

6. 根据权利要求1或2的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/kg之间,包括端点值。

7. 根据权利要求1或2的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 1×10^{10} 至约 6×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 1×10^{10} 至约 5×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 1×10^{11} 至约 1×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 2×10^{11} 至约 9×10^{11} vg/kg之间,包括端点值。

11. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 3×10^{11} 至约 8×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

12. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 3×10^{11} 至约 7×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

13. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 3×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

14. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量在约 4×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg之间,包括端点值。

15. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量为约 5×10^{11} vg/kg或约 1×10^{12} vg/kg。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中如通过凝结活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量大于基于从施用所述rAAV载体的非人灵长类动物研究获得的数据预测的量。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用所述rAAV载体的非人类灵长类动物研究获

得的线性回归曲线预测的表达的量高1-4倍。

18. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用所述rAAV载体的非人类灵长类动物研究获得的线性回归曲线预测的表达的量高2-4倍。

19. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用所述rAAV载体的非人类灵长类动物研究获得的线性回归曲线预测的表达的量高2-3倍。

20. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用所述rAAV载体的非人类灵长类动物研究获得的线性回归曲线预测的表达的量高1-2倍。

21. 根据权利要求16-20中任一项所述的方法,其中所述非人灵长类动物是食蟹猴(猕猴)。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在施用rAAV载体之后14天或更多天,在所述人中表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约3%或更高,在施用rAAV载体之后21天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约4%或更高,在施用rAAV载体之后21天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约5%或更高,在施用rAAV载体之后21天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约6%或更高,在施用rAAV载体之后21天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约7%或更高,在施用rAAV载体之后28天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约8%或更高,在施用rAAV载体之后28天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约9%或更高,在施用rAAV载体之后35天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约10%或更高,在施用rAAV载体之后35天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约11%或更高,在施用rAAV载体之后35天或更多天的表达FVIII或hFVIII-BDD的量为约12%或更高。

23. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续14天内平均为约10%或更高。

24. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续4周的时间段内平均为约10%或更高。

25. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续8周的时间段内平均为约10%或更高。

26. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续12周的时间段内平均为约10%或更高。

27. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续16周的时间段内平均为约10%或更高。

28. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续6个月的时间段内平均约10%或更高。

29. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续14天的时间段内平均为约12%或更高。

30. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续4周、连续8周、连续12周、连续16周、连续6个月或

连续1年的时间段内平均为约12%至约100%。

31. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续4周、连续8周、连续12周、连续16周、连续6个月或连续1年的时间段内平均为约20%至约80%。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约14天。

33. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约21天。

34. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约28天。

35. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约35天。

36. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约42天。

37. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约49天。

38. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约56天。

39. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约63天。

40. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约70天。

41. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约77天。

42. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约84天。

43. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约91天。

44. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约98天。

45. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约105天。

46. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约112天。

47. 权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约4个月的时间。

48. 权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约6个月的时间。

49. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或

hFVIII-BDD在所述人中表达至少约7个月的时间。

50. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后所述FVIII或hFVIII-BDD在所述人中表达至少约12个月的时间。

51. 根据权利要求1、2和4-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 1×10^9 至约 1×10^{14} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

52. 根据权利要求1、2和4-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 5×10^9 至约 6×10^{13} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

53. 根据权利要求1、2和4-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 6×10^{13} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

54. 根据权利要求1、2和4-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

55. 根据权利要求1、2和4-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 6×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

56. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以小于 6×10^{12} vg/kg的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

57. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 5×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

58. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 1×10^{11} 至约 1×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

59. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 2×10^{11} 至约 9×10^{11} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

60. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 3×10^{11} 至约 8×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

61. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 3×10^{11} 至约 7×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

62. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 3×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

63. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 4×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

64. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体以约 5×10^{11} 至约 1×10^{12} vg/kg (包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述FVIII或hFVIII-BDD以稳定状态在所述人中产生,其中在4、6、8或12周或数月内活性变化不超过5-50%。

66. 根据权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述FVIII或hFVIII-BDD以稳定状态在所述人中产生,其中在4、6、8或12周或数月内活性变化不超过25-100%。

67. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之前在所述人中未检测到AAV抗体,或者其中所述人对于AAV是血清阴性的。

68. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之前,在所述人中的AAV抗体等于或小于1:5。

69. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之前,在所述人中的AAV抗体为等于或小于1:3。

70. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个月或更长时间所述人不产生针对所述FVIII或hFVIII-BDD的可检测抗体。

71. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后至少约14天、或至少约21天、或至少约28天、或至少约35天、或至少约42天、或至少约49天、或至少约56天、或至少约63天、或至少约70天、或至少约77天、或至少约84天、或至少约91天、或至少约98天、或至少约105天、或至少约112天、或至少约154天、或至少约168天、或至少约182天、或至少约196天、或至少约210天,所述人不产生针对所述rAAV载体的可检测抗体。

72. 根据权利要求1-71中任一项所述的方法,其中在施用rAAV载体之后至少连续1、2、

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或月所述人不会产生针对rAAV载体的细胞介导的免疫应答。

73. 根据权利要求1-72中任一项所述的方法,其中所述人没有针对所述rAAV载体产生足以降低或阻断FVIII或hFVIII-BDD治疗作用的体液免疫应答。

74. 根据权利要求1-73中任一项所述的方法,其中所述人在施用rAAV载体之后至少约1、2、3、4、5或6个月不产生针对所述rAAV载体的可检测抗体。

75. 根据权利要求1-74中任一项所述的方法,其中在rAAV载体施用之前、期间和/或之后,不向所述人施用免疫抑制剂。

76. 根据权利要求1-75中任一项所述的方法,其中实现在所述人中表达所述FVIII或hFVIII-BDD,而无需施用免疫抑制剂。

77. 根据权利要求1-75中任一项所述的方法,其进一步包括施用免疫抑制剂。

78. 根据权利要求1-76中任一项所述的方法,其进一步包括在施用所述rAAV载体之后施用免疫抑制剂。

79. 根据权利要求1-75中任一项所述的方法,其进一步包括在施用所述rAAV载体之后1小时至至多45天的时间段内施用免疫抑制剂。

80. 根据权利要求75-79中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制剂包括类固醇,环孢菌素(例如,环孢菌素A),霉酚酸酯,利妥昔单抗或其衍生物。

81. 根据权利要求1-80中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体与SEQ ID NO:7具有96%或更高的序列同一性。

82. 根据权利要求1-80中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体与SEQ ID NO:7具有95%-100%的序列同一性。

83. 根据权利要求1-82中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体具有20个或更少,15个或更少,或10个或更少的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

84. 根据权利要求1-82中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体具有不超过5个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

85. 根据权利要求1-82中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体具有4、3、2、1或0个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

86. 根据权利要求1-82中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体具有1个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

87. 根据权利要求1-86中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体编码具有序列SFSQNPPVLKRHRQ(SEQ ID NO:29)的一个或多个氨基酸缺失的或者整个序列SFSQNPPVLKRHRQ缺失的SEQ ID NO:25。

88. 根据权利要求1至86中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体编码SEQ ID NO:25。

89. 权利要求1-86中任一项所述的方法,其中所述hFVIII-BDD与由SEQ ID NO:19编码的hFVIII-BDD相同。

90. 根据权利要求1-86中任一项所述的方法,其中所述核酸或核酸变体编码具有序列SFSQNPPVLKRHRQ(SEQ ID NO:29)的一个或多个氨基酸缺失的或整个序列SFSQNPPVLKRHRQ缺失的SEQ ID NO:25。

91. 根据权利要求1-90中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包括AAV血清型或AAV假型,其中所述AAV假型包括不同于ITR血清型的AAV衣壳血清型。

92. 根据权利要求1-91中任一项所述的方法,其中所述载体基因组进一步包含内含子,表达控制元件,一个或多个腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)和/或填充物多核苷酸序列。

93. 根据权利要求92所述的方法,其中所述内含子在所述核酸变体之内或侧接所述核酸变体。

94. 根据权利要求92所述的方法,其中所述表达控制元件可操作地连接所述核酸变体。

95. 根据权利要求92所述的方法,其中所述AAV ITR侧接所述核酸变体的5'或3'末端。

96. 根据权利要求92所述的方法,其中所述填充物多核苷酸序列侧接所述核酸变体的5'或3'末端。

97. 根据权利要求92所述的方法,其中所述内含子,表达控制元件,一个或多个腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)和/或填充物多核苷酸序列已被修饰为具有减少的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

98. 根据权利要求92的方法,其中所述内含子,表达控制元件,一个或多个腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)和/或填充物多核苷酸序列已被修饰为具有20个或更少,15个或更少,10个或更少,5个或更少或0个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)。

99. 根据权利要求92所述的方法,其中所述表达控制元件包括组成型或可调节控制元件,或组织特异性表达控制元件或启动子。

100. 根据权利要求92所述的方法,其中所述表达控制元件包括赋予在肝脏中表达的元件。

101. 根据权利要求92所述的方法,其中所述表达控制元件包括TTR启动子或突变TTR启动子。

102. 根据权利要求101所述的方法,其中所述突变体TTR启动子包含SEQ ID NO:22。

103. 根据权利要求101所述的方法,其中,所述ITR包括以下任一个的一个或多个ITR: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8 AAV血清型或其组合。

104. 根据权利要求1-103中任一项所述的方法,其中所述载体基因组包含如SEQ ID NO:23中所示的ITR、启动子、聚腺苷酸化信号和/或内含子序列。

105. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含修饰的或变体的AAV VP1、VP2和/或VP3衣壳序列,或野生型AAV VP1、VP2和/或VP3衣壳序列。

106. 根据权利要求1-105中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含与AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8 VP1、VP2和/或VP3序列具有90%或更高同一性的修饰的或变体AAV VP1、VP2和/或VP3衣壳序列。

107. 根据权利要求1-105中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含选自以下中的任一个的VP1、VP2或VP3衣壳序列: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8 AAV血清型。

108. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含与LK03衣壳(SEQ ID NO:27)具有90%或更高的序列同一性的衣壳。

109. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含与SPK衣壳(SEQ ID NO:28)具有90%或更高的序列同一性的衣壳。

110. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含LK03衣壳(SEQ ID NO:27)。

111. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含SPK衣壳(SEQ ID NO:28)。

112. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含所述核酸变体SEQ ID NO:7和LK03衣壳序列(SEQ ID NO:27)。

113. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含所述核酸变体SEQ ID NO:7和SPK衣壳(SEQ ID NO:28)。

114. 根据权利要求1-113中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含所述核酸变体和SEQ ID NO:23中的突变的TTR启动子(TTRmut)、合成内含子、多聚腺苷酸和ITR中的一个或多个。

115. 根据权利要求1-113中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含所述核酸变体,和SEQ ID NO:23中的突变的TTR启动子(TTRmut)、合成内含子、多聚腺苷酸和ITR中的一个或多个,和LK03衣壳序列(SEQ ID NO:27)或SPK衣壳(SEQ ID NO:28)。

116. 根据权利要求1-115中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体包含药物组合物。

117. 根据权利要求116所述的方法,其中所述药物组合物包含生物相容性载体或赋形剂。

118. 根据权利要求1-117中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体被封装在脂质体中或与磷脂或胶束混合。

119. 根据权利要求1-118中任一项所述的方法,其进一步包括施用空衣壳AAV,任选地其中所述空衣壳AAV与所述rAAV载体一起施用。

120. 根据权利要求1-118中任一项所述的方法,其进一步包括施用AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和/或AAV-Rh74血清型的空衣壳。

121. 根据权利要求1-118中任一项所述的方法,其进一步包括施用与所施用的AAV载体相同血清型的空衣壳AAV。

122. 根据权利要求1-118中任一项所述的方法,其进一步包括施用具有LK03衣壳(SEQ ID NO:27)或SPK衣壳(SEQ ID NO:28)的空衣壳。

123. 根据权利要求118-122中任一项所述的方法,其中所述空衣壳与所述rAAV载体的比例在约2:1至约50:1之间。

124. 根据权利要求118-122中任一项所述的方法,其中所述空衣壳与所述rAAV载体的比例在约2:1至约25:1之间。

125. 根据权利要求118-122中任一项所述的方法,其中所述空衣壳与所述rAAV载体的比例在约2:1至约20:1之间。

126. 根据权利要求118-122中任一项所述的方法,其中所述空衣壳与所述rAAV载体的比例在约2:1至约15:1之间。

127. 根据权利要求118-122中任一项所述的方法,其中所述空衣壳与所述rAAV载体的比例在约2:1至约10:1之间。

128. 根据权利要求118-122中任一项所述的方法,其中所述空衣壳与所述rAAV载体的比例为约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

129. 根据权利要求1-128中任一项所述的方法,其中由所述核酸变体编码的FVIII或hFVIII-BDD在所述哺乳动物的细胞、组织或器官中表达。

130. 根据权利要求129所述的方法,其中所述细胞包括分泌细胞。

131. 根据权利要求129所述的方法,其中所述细胞包括内分泌细胞或内皮细胞。

132. 根据权利要求129所述的方法,其中所述细胞包括肝细胞,窦内皮细胞,巨核细胞,血小板或造血干细胞。

133. 根据权利要求129所述的方法,其中所述哺乳动物的组织或器官包括肝脏。

134. 根据权利要求1-133中任一项所述的方法,其中所述rAAV载体通过静脉内,动脉内,肌内,皮下,腔内,或通过插管或通过导管递送至所述人。

135. 根据权利要求1-134中任一项所述的方法,其中所述FVIII或hFVIII-BDD以不显著增加血栓形成风险的水平表达。

136. 根据权利要求135的方法,其中所述血栓形成风险通过测定纤维蛋白降解产物来确定。

137. 根据权利要求1-136中任一项所述的方法,其中至少1、2、3或4周内,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月内,或至少1年内可检测到所述FVIII或hFVIII-BDD的活性。

138. 根据权利要求1-137中任一项所述的方法,其中在至少1、2、3或4周内,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月内,或至少1年内所述人未表现出自发性出血。

139. 根据权利要求1-138中任一项所述的方法,其中在至少1、2、3或4周内,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月内,或至少1年内所述人不需要FVIII蛋白预防法。

140. 根据权利要求1-139中任一项所述的方法,其进一步包括分析或监测所述人的AAV抗体的存在或数量,针对AAV、FVIII或hFVIII-BDD抗体的免疫应答,针对FVIII或hFVIII-BDD的免疫应答,FVIII或hFVIII-BDD的数量,FVIII或hFVIII-BDD的活性,一种或多种肝酶的数量或水平,或出血发作的频率和/或严重程度或持续时间。

因子VIII (FVIII) 基因治疗方法

相关应用

[0001] 本专利申请要求2017年8月1日提交的美国临时专利申请第62/540,053号、2017年11月9日提交的美国临时专利申请第62/583,890号、2017年12月8日提交的美国临时专利申请第62/596,535号、以及2017年12月8日提交的美国临时专利申请第62/596,670号的权益。上述申请的全部内容(包括所有文本,表格和附图)通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及重组凝血因子产生和与异常止血有关的医学疾病的治疗领域。更具体地,本发明提供了施用编码因子VIII (FVIII) 蛋白的核酸的方法,以及血友病A的治疗方法。

背景技术

[0003] 在整个说明书中引用了多个出版物和专利文件,以描述本发明所属领域的技术水平。这些引用中的每一个都通过全文引用并入本文。

[0004] 血友病是一种X连锁的出血性疾病,全世界每5,000名男性中就有1名。旨在将凝血因子水平提高到正常水平的1%以上的疗法与严重疾病表型的显著改善有关。血友病B (HB) 的AAV介导的基因转移的最新临床试验表明,治疗水平的因子IX (FIX) 可以长期持续表达,但证实了AAV载体剂量可能因对AAV衣壳的抗AAV免疫应答而受到限制。尽管这些数据与血友病B有关,但所有血友病中有80%是由于FVIII缺乏症,即血友病A (HA)。

[0005] 该疾病的当前治疗是蛋白质替代疗法,该蛋白质替代疗法需要经常输注因子VIII 蛋白质。迫切需要达到持续治疗水平的因子VIII表达,以使患者不再需要这种频繁的蛋白质治疗。实际上,因子VIII的连续表达将防止出血发作,并确保建立对该蛋白的免疫耐受性。

发明概述

[0006] 根据本发明,提供了治疗患有血友病A或需要因子VIII (FVIII) 的人的方法。在一实施方案中,一种方法包括施用重组腺相关病毒 (rAAV) 载体,其中所述载体基因组包含编码具有B结构域缺失的因子VIII (FVIII) (hFVIII-BDD) 的核酸变体,其中所述核酸变体与SEQ ID NO:7具有95%或更高的同一性。在另一实施方案中,一种方法包括施用重组腺相关病毒 (rAAV) 载体,其中所述载体基因组包含编码具有B结构域缺失的因子VIII (FVIII) (hFVIII-BDD) 的核酸变体,其中所述核酸变体具有不超过2个胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸 (CpG)。

[0007] 在进一步的实施方案中,一种治疗患有血友病A或需要因子VIII (FVIII) 的人的方法,其包括施用重组腺相关病毒 (rAAV) 载体,其中该载体基因组包含编码因子VIII (FVIII) 的核酸或编码具有B结构域缺失的因子VIII (FVIII) (hFVIII-BDD) 的核酸,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量小于 6×10^{12} 载体基因组/千克 (vg/kg)。

[0008] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 1×10^9 至约 1×10^{14} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0009] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 1×10^{10} 至约 6×10^{13} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0010] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0011] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 1×10^{10} 至约 6×10^{12} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0012] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 1×10^{10} 至约 5×10^{12} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0013] 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,向所述人施用的rAAV载体的剂量为约 1×10^{11} 至约 1×10^{12} vg/kg,包括端点值。

[0014] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 2×10^{11} 至约 9×10^{11} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0015] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 3×10^{11} 至约 8×10^{12} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0016] 12. 权利要求1-3中任一项所述的方法,其中向所述人施用的rAAV载体的剂量为约 3×10^{11} 至约 7×10^{12} vg/kg,包括端点值。

[0017] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 3×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0018] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用介于约 4×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg之间的(包括端点值)剂量的rAAV载体。

[0019] 所述方法和用途的实施方案包括向所述人施用约 5×10^{11} vg/kg或约 1×10^{12} vg/kg的剂量的rAAV载体。

[0020] 所述方法和用途的实施方案包括基于从施用rAAV载体的非人灵长类动物研究获得的数据,在人体内提供大于预期量的FVIII或hFVIII-BDD。例如,通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量可能大于基于从施用rAAV载体的非人灵长类动物研究获得的线性回归曲线预测的值。

[0021] 在某些实施方案中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量大于基于从施用rAAV载体的非人灵长类动物研究获得的数据预测的量。

[0022] 在某些实施方案中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用rAAV载体的非人灵长类动物研究获得的线性回归曲线预测的表的量高1-4倍。

[0023] 在某些实施方案中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用rAAV的非人灵长类动物研究获得的线性回归曲线所预测的表的量高2-4倍。

[0024] 在某些实施方案中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用rAAV的非人灵长类动物研究获得的线性回归曲线所预测的表的量高2-3倍。

[0025] 在某些实施方案中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量比基于从施用rAAV的非人灵长类动物研究获得的线性回归曲线所预测的

表达的量高1-2倍。

[0026] 非人灵长类动物包括猕猴属。在一特定的实施方案中,非人灵长类是食蟹猴(猕猴)。

[0027] 在某些实施方案中,FVIII或hFVIII-BDD被表达一段时间,提供短期、中期或长期的止血改善。在某些实施方案中,该时间段使得不需要向所述人施用补充的FVIII蛋白或重组FVIII蛋白以维持止血。

[0028] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约14天。

[0029] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约21天。

[0030] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约28天。

[0031] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约35天。

[0032] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约42天。

[0033] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约49天。

[0034] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约56天。

[0035] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约63天。

[0036] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约70天。

[0037] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约77天。

[0038] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约84天。

[0039] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约91天。

[0040] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约98天。

[0041] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约105天。

[0042] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约112天。

[0043] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后FVIII或hFVIII-BDD表达至少约4个月。

[0044] 在某些实施方案中,FVIII或hFVIII-BDD表达至少约154天。

[0045] 在某些实施方案中,FVIII或hFVIII-BDD表达至少约210天。

[0046] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后,FVIII或hFVIII-BDD表达至少约6个月。

[0047] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后,FVIII或hFVIII-BDD表达至少约12个月。

[0048] 在施用rAAV载体之后的一段时间内,FVIII或hFVIII-BDD可以一定量表达。在某些实施方案中,该量使得存在可检测的FVIII或hFVIII-BDD或存在一定量的提供治疗益处的FVIII或hFVIII-BDD。

[0049] 在某些实施方案中,如通过凝血活性所反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在施用rAAV载体后14天或更多天为约3%或更高,在施用rAAV载体后21天或更多天为约4%或更高,在施用rAAV载体后21天或更多天为约5%或更高,在施用rAAV载体后21天或更多天为约6%或更高,在施用rAAV载体后21天或更多天为约7%或更高,在施用rAAV载体之后28天或更多天为约8%或更高,在施用rAAV载体之后28天或更多天为约9%或更高,在施用rAAV载体之后35天或更多天为约10%或更高,在施用rAAV载体之后35天或更多天为约11%或更高,在施用rAAV载体之后35天或更多天为约12%或更高。

[0050] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续14天内平均为约10%或更高。

[0051] 在某些实施方案中,如通过凝结活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续4周内平均为约10%或更高。

[0052] 在某些实施方案中,如通过凝结活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续8周内平均为约10%或更高。

[0053] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续12周内平均为约10%或更高。

[0054] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续16周内平均为约10%或更高。

[0055] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续6个月内平均为约10%或更高。

[0056] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续7个月内平均为约10%或更高。

[0057] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续14天内平均为约12%或更高。

[0058] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续4周、连续8周、连续12周、连续16周、连续6个月、连续7个月或连续1年的时间段内平均为约12%至约100%。

[0059] 在某些实施方案中,如通过凝血活性反映的,在所述人中表达的FVIII或hFVIII-BDD的量在连续4周、连续8周、连续12周、连续16周、连续6个月或连续1年的时间段内平均为约20%至约80%。

[0060] 在施用rAAV载体之后的一定时间段,例如4-6、6-8或6-12周或更长,例如6-12个月或甚至若干年,也可以实现稳态FVIII表达。

[0061] 在某些实施方案中,FVIII或hFVIII-BDD以稳定状态在所述人中产生,其中FVIII活性在4、6、8或12周或月内变化不超过5-50%。

[0062] 在某些实施方案中,FVIII或hFVIII-BDD以稳定状态在所述人中产生,其中FVIII活性在4、6、8或12周或月内变化不超过25-100%。

[0063] 可以以预期提供表达FVIII一定量和一定时间段的剂量施用rAAV载体,以在施用后提供持续表达。

[0064] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 1×10^9 至约 1×10^{14} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生FVIII或hFVIII-BDD。

[0065] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 5×10^9 至约 6×10^{13} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0066] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 6×10^{13} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0067] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 1×10^{13} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0068] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 6×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0069] 在某些实施方案中,rAAV载体以小于 6×10^{12} vg/kg的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0070] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 1×10^{10} 至约 5×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0071] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 1×10^{11} 至约 1×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0072] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 2×10^{11} 至约 9×10^{11} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0073] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 3×10^{11} 至约 8×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0074] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 3×10^{11} 至约 7×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0075] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 3×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0076] 在某些实施方案中,rAAV载体以约 4×10^{11} 至约 6×10^{12} vg/kg(包括端点值)的剂量施用至所述人,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0077] 在某些实施方案中,以约 5×10^{11} vg/kg或约 1×10^{12} vg/kg的剂量施用rAAV载体,并且在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、周或月,在所述人中以平均为约12%至约100%活性的水平产生所述FVIII或hFVIII-BDD。

[0078] 根据所述方法和用途的人包括那些对于AAV抗体是血清阴性或不具有可检测的AAV抗体的人。

[0079] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之前在所述人中未检测到AAV抗体,或者其中所述人对于AAV是血清阴性的。

[0080] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个月或更长时间未检测到针对FVIII或hFVIII-BDD的AAV抗体。

[0081] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后至少约14天、或至少约21天、或至少约28天、或至少约35天、或至少约42天、或至少约49天、或至少约56天、或至少约63天、或至少约70天、或至少约77天、或至少约84天、或至少约91天、或至少约98天、或至少约105天、或至少约112天,未检测到针对所述rAAV载体的AAV抗体。

[0082] 根据所述方法和用途的人包括具有可检测的AAV抗体的人。

[0083] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之前,在所述人中的AAV抗体等于或小于约1:5。

[0084] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之前,在所述人中的AAV抗体等于或小于约1:3。

[0085] 在某些方法和用途中,施用了rAAV载体的人不产生针对rAAV载体的细胞介导的免疫应答。

[0086] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后至少连续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或月,施用了rAAV载体的人不会产生针对rAAV载体的细胞介导的免疫应答。

[0087] 在某些实施方案中,施用了rAAV载体的人未产生足以降低或阻断FVIII或hFVIII-BDD治疗作用的针对rAAV载体的体液免疫应答。

[0088] 在某些实施方案中,施用了rAAV载体的人在施用rAAV载体之后至少约1、2、3、4、5或6个月不产生针对rAAV载体的可检测抗体。

[0089] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之前、期间和/或之后,未向施用了rAAV载体的人施用免疫抑制剂。

[0090] 在某些实施方案中,在不施用免疫抑制剂的情况下实现了在施用rAAV载体的所述人中表达FVIII或hFVIII-BDD。

[0091] 在预先存在免疫应答或施用rAAV载体后产生免疫应答的情况下,可以在施用rAAV载体之前或之后向人施用免疫抑制剂。

[0092] 在某些实施方案中,方法或用途包括在施用rAAV载体之前施用免疫抑制剂。

[0093] 在某些实施方案中,方法或用途包括在施用rAAV载体之后施用免疫抑制剂。

[0094] 在某些实施方案中,在施用rAAV载体之后的1小时至最多45天的时间段内施用免疫抑制剂。

[0095] 在某些实施方案中,免疫抑制剂包含类固醇,环孢菌素(例如,环孢菌素A),霉酚酸酯,利妥昔单抗或其衍生物。

[0096] 在某些实施方案中,核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有90%,91%,

92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.5%或更高的序列同一性。在某些实施方案中,核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有90-95%的序列同一性。在某些实施方案中,核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有95%-100%的序列同一性。

[0097] 在某些实施方案中,与编码FVⅢ的野生型核酸相比,编码FVⅢ或hFVⅢ-BDD的核酸变体具有降低的CpG含量。在某些实施方案中,核酸变体具有比编码FVⅢ的野生型核酸(SEQ ID NO:19)少至少20个CpG。在某些实施方案中,核酸变体具有不超过10个CpG,不超过9个CpG,不超过8个CpG,不超过7个CpG,不超过6个CPG,不超过5个CpG,不超过4个CpG,不超过3个CpG,不超过2个CpG,或不超过1个CpG。在某些实施方案中,核酸变体具有至多4个CpG,3个CpG,2个CpG,或1个CpG。在某些实施方案中,核酸变体不具有CpG。

[0098] 在某些实施方案中,与编码FVⅢ的野生型核酸相比,编码FVⅢ或hFVⅢ-BDD的核酸变体具有降低的CpG含量,并且此类CpG减少的核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有90%或更高的序列同一性。在某些实施方案中,CpG减少的核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.5%或更高的序列同一性。在某些实施方案中,CpG减少的核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有90-95%的序列同一性。在某些实施方案中,CpG减少的核酸变体与SEQ ID NO:1-18中的任一个具有95%-100%的序列同一性。在某些实施方案中,编码FVⅢ的CpG减少的核酸变体如在SEQ ID NO:1-18中的任一个中所示。

[0099] 在某些实施方案中,编码FVⅢ或hFVⅢ-BDD蛋白的核酸变体与野生型人FVⅢ核酸或包含B结构域缺失的野生型人FVⅢ核酸是至少75%相同。在某些实施方案中,编码FVⅢ蛋白的核酸变体与野生型人FVⅢ核酸或包含B结构域缺失的野生型人FVⅢ核酸是约75-95%相同(例如,约75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%相同)。

[0100] 在某些实施方案中,编码FVⅢ蛋白的核酸和变体是哺乳动物的,例如人的。这样的编码FVⅢ蛋白的哺乳动物核酸和核酸变体包括人形式,其可以基于人野生型FVⅢ或包含B结构域缺失的人野生型FVⅢ。

[0101] 在某些实施方案中,重组腺病毒相关病毒(sAAV)载体包含AAV载体,所述AAV载体包含AAV血清型或AAV假型,例如AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,Rh10,Rh74或AAV-2i8AAV。在某些实施方案中,rAAV载体包含SEQ ID Nos:1-18中的任一个,或包含SEQ ID NO:23或24。

[0102] 在某些实施方案中,表达控制元件包括组成型控制元件或可调节控制元件,或组织特异性表达控制元件或启动子。在某些实施方案中,表达控制元件包括赋予在肝脏中表达的元件。在某些实施方案中,表达控制元件包含TTR启动子或突变TTR启动子,例如SEQ ID NO:22。在另外的特定方面,表达控制元件包含PCT公开号W0 2016/168728 (USSN 62/148,696;62/202,133;和62/212,634)中列出的启动子,其通过引用整体并入本文。

[0103] 在某些实施方案中,rAAV载体包含AAV血清型或包含与ITR血清型不同的AAV衣壳血清型的AAV假型。在另外的实施方案中,rAAV载体包含VP1、VP2和/或VP3衣壳序列,其与AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,Rh10,Rh74或AAV-2i8AAV血清型中的任一个具有75%或更高的序列同一性(例如80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%

等)。

[0104] 在某些实施方案中,rAAV载体包含VP1、VP2和/或VP3衣壳序列,其与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28具有75%或更高的序列同一性(例如80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%等)。在某些实施方案中,rAAV载体包含与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28具有100%同一性的VP1、VP2和/或VP3衣壳。

[0105] 在某些实施方案中,rAAV载体还包括内含子,表达控制元件,一个或多个AAV反向末端重复序列(ITR)(例如,AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,Rh10,Rh74或AAV-2i8AAV血清型中的任一个,或其组合),填充物多核苷酸序列(filler polynucleotide sequence)和/或多聚腺苷酸化信号(poly A signal)。

[0106] 在某些实施方案中,内含子在编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体内或侧接(flank)编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体,和/或表达控制元件可操作地连接至编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体,和/或AAV ITR侧接编码FVIII的核酸或核酸变体的5'或3'末端,和/或填充物多核苷酸序列侧接编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体的5'或3'末端。

[0107] 在特定实施方案中,表达控制元件包括组成型控制元件或可调节控制元件,或组织特异性表达控制元件或启动子。在某些实施方案中,表达控制元件包括在赋予肝脏中表达的元件(例如,TTR启动子或突变体TTR启动子)。

[0108] 在某些实施方案中,rAAV包含药物组合物。这样的药物组合物任选地包括空衣壳AAV(例如,缺少包含编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体的载体基因组)。

[0109] 在某些实施方案中,将编码FVIII或hFVIII-BDD蛋白的核酸或核酸变体,载体,表达载体或病毒或AAV载体封装在脂质体内或与磷脂或胶束(micelles)混合。

[0110] 本发明的方法还包括治疗哺乳动物受试者(例如人),例如需要FVIII的人(该人产生不足量的FVIII蛋白,缺陷或异常的FVIII蛋白)或患有血友病A的人。

[0111] 在一实施方案中,人产生不足量的FVIII蛋白,或者缺陷或异常的FVIII蛋白。在另一实施方案中,人患有轻度,中度或重度血友病A。

[0112] 在某些实施方案中,通过施用rAAV载体的方式表达的FVIII或hFVIII-BDD以对哺乳动物具有有益或治疗作用的水平表达。

[0113] 用于施用(例如,递送)的包含编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体的rAAV的候选受试者(例如,患者)和哺乳动物(例如,人类)包括患有以下疾病的或处于罹患以下疾病的风险的受试者,疾病例如为:血友病A,血管性血友病(von Willebrand)疾病以及与创伤、损伤、血栓形成、血小板减少症、中风、凝血病、弥散性血管内凝血(DIC)或过度抗凝治疗障碍相关的出血。

[0114] 用于施用(例如递送)的编码FVIII的核酸或核酸变体的候选受试者(例如患者)和哺乳动物(例如人类)包括那些对AAV抗体为血清阴性的候选受试者和哺乳动物,以及那些具有(血清学反应阳性)或处于发展AAV抗体风险的候选受试者和哺乳动物。这样的受试者(例如患者)和哺乳动物(例如人类)对于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10或AAV-Rh74血清型可以是血清阴性或血清阳性的。

[0115] 在某些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、

AAV11、AAV-12、AAV-Rh10和/或AAV-Rh74血清型的空衣壳单独或与包含编码FVIII的核酸或核酸变体的rAAV载体联合进一步施用于哺乳动物或患者。

[0116] 根据本发明的施用(例如递送)方法包括离体或体内的任何接触或递送方式。在特定实施方案中,施用(例如,递送)是:静脉内,动脉内,肌内,皮下,腔内,插管或通过导管。

[0117] 在某些实施方案中,FVIII或hFVIII-BDD以基本上不增加血栓形成风险的水平表达。

[0118] 在某些实施方案中,通过测定纤维蛋白降解产物来确定血栓形成风险。

[0119] 在某些实施方案中,在至少1、2、3或4周内,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月内,或至少1年内在所述人中可检测到所述FVIII或hFVIII-BDD的活性。

[0120] 在某些实施方案中,进一步分析或监测所述人的以下的一种或多种:AAV抗体的存在或数量,针对AAV、FVIII或hFVIII-BDD抗体的免疫应答,针对FVIII或hFVIII-BDD的免疫应答,FVIII或hFVIII-BDD的数量,FVIII或hFVIII-BDD的活性,一种或多种肝酶的数量或水平,和/或出血发作的频率和/或严重程度或持续时间。

附图说明

[0121] 图1显示了NHP研究设计。

[0122] 图2A-2C显示了在静脉内施用 2×10^{12} (A), 5×10^{12} (B) 或 1×10^{13} vg/kg (C) 的AAV-SPK-8005后,NHP中的hFVIII抗原水平。线代表个体动物。人FVIII血浆水平通过ELISA测定,并代表在研究过程中对同一组动物通过连续出血获得的重复测量值(每组n=2-3只动物)。在所有三幅曲线图中的空心正方形表示在溶媒(vehicle)处理的动物中测得的人FVIII水平。

ε = 针对FVIII的抑制剂的开发。

[0123] 图3A-3C显示了在 2×10^{12} (A), 5×10^{12} (B) 或 1×10^{13} vg/kg (C) 的AAV-SPK-8005时NHP中的ALT水平。

[0124] 图4A-4C示出了NHP中的D-二聚体水平。静脉内施用 2×10^{12} (A), 5×10^{12} (B) 或 1×10^{13} vg/kg (C) 的AAV-SPK-8005后,NHP血浆中D-二聚体抗原浓度。虚线表示500ng/ml,是人体内D-二聚体的正常上限。

[0125] 图5显示了三种剂量的AAV-SPK-8005中FVIII水平的数据汇总。

[0126] 图6A-6D显示了在静脉内施用 2×10^{12} (A), 6×10^{12} (B) 或 2×10^{13} (vg/kg) (C) 的AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII(试验研究)之后,食蟹猕猴(cynomolgus macaques)血浆中的hFVIII水平。线代表个体动物。hFVIII血浆水平通过ELISA进行了测定,并代表了在研究过程中对同一组动物通过连续出血获得的重复测量值(每组n=3只动物)。以空心正方形表示在溶媒处理的动物中测得的人FVIII水平(n=2)。 ε = 在每只动物中检测到针对FVIII的抑制剂产生的时间。

[0127] 图7显示了在施用SPK-8011后食蟹猕猴中的人FVIII表达水平。试点研究(Pilot study)(正方形)和GLP研究(圆形)。

[0128] 图8显示了用AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII达到的FVIII水平与通过具有AAV5和AAV8衣壳的AAV载体递送的FVIII的报道水平的比较。http://www.biomin.com/pdf/BioMarin_R&D_Day_4_20_2016.pdf,幻灯片16.AAV8:McIntosh J等人.Blood 2013;121

(17):3335-44。

[0129] 图9显示了AAV-SPK (SEQ ID NO:28) 和AAV-LK03 (SEQ ID NO:27) 在非人灵长类动物中,主要是在肾脏、脾脏和肝脏中的组织生物分布(每个组织的第三个柱形)。

[0130] 图10显示了在将AAV-SPK-8005全身施用给小鼠后肝和脾FVIII表达。

[0131] 图11显示了在体外分析的AAV-LK03衣壳的转导效率。X轴,食蟹猴(左竖直柱形),人(右竖直柱形)。

[0132] 图12显示了在线性剂量反应后,SPK-8011施用后食蟹猴中的人FVIII表达水平。图片A和图片B以线性比例显示SPK-8011剂量,而图片C和图片D使用对数X轴。

[0133] 图13显示仅使用来自低剂量和中剂量组的数据的线性回归分析。图片A和图片B以线性比例显示SPK-8011剂量,而图片C和图片D使用对数X轴。

[0134] 图14显示了在3名接受AAV-LK03 (FVIII) 载体输注的人类受试者中的FVIII活性。受试者1和2(菱形,圆形)被注入 5×10^{11} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体。受试者3(三角形)被注入 1×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体。

[0135] 图15显示了在输注AAV-LK03 (FVIII) 载体的相同人受试者(受试者1和2,图14)中治疗水平的FVIII活性的扩展表达。受试者1和2(圆形,正方形)被注入 5×10^{11} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体。

[0136] 图16显示了表现出治疗水平的FVIII的10个人类受试者(受试者1-10)。受试者1在输注后第6周紧急拔牙后输注了FVIII。此后不久,FVIII记录了19%的活性水平;由于接近FVIII输注而被排除在此图表之外。FVIII活性是指来自本地实验室的FVIII:C值。

[0137] 图17显示了在输注 5×10^{11} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者1中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ 酶联免疫吸附斑点 (ELISPOT) 分析的结果,该结果与受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 与AAV衣壳肽 (实心柱形) 和FVIII肽 (空心圆) 的反应有关。结果以每100万个PBMC的斑点形成单位 (SFU) 数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照 (虚线) 高三倍的值视为正值。

[0138] 图18显示了在输注 5×10^{11} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者2中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽 (实心柱形) 和FVIII肽 (空心圆) 的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照 (虚线) 高三倍的值视为正值。

[0139] 图19显示了在输注 1×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者3中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽 (实心柱形) 和FVIII肽 (空心圆) 的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照 (虚线) 高三倍的值视为正值。

[0140] 图20显示了在输注 1×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者4中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽 (实心柱形) 和FVIII肽 (空心圆) 的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照 (虚线) 高三倍的值视为正值。

[0141] 图21显示了在输注 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者5中的FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽 (实心柱形) 和FVIII肽 (空心圆) 的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于

50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0142] 图22显示了在输注 1×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者6中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0143] 图23显示了在输注 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者7中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC中的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0144] 图24显示了在输注 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者8中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0145] 图25显示了在注入 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者9中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0146] 图26显示了在注入 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者10中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0147] 图27显示了在注入 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者11中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

[0148] 图28显示了在注入 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体的受试者12中FVIII的治疗水平。底图显示了干扰素- γ ELISPOT分析的结果,该结果与受试者的PBMC与AAV衣壳肽(实心柱形)和FVIII肽(空心圆)的反应有关。结果以每100万个PBMC的SFU数量表示;大于50SFU的值或比媒介对照(虚线)高三倍的值视为正值。

具体实施方案

[0149] 本文公开了治疗患有血友病A或需要因子VIII (FVIII) 的人的方法。可以使用具有基因组的rAAV载体实现此类方法,该基因组包含可以在细胞和/或人类中表达的编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体,从而可以在体内提供增加的FVIII或hFVIII-BDD蛋白水平。编码FVIII或hFVIII-BDD的示例性核酸变体可具有与参考野生型哺乳动物(例如人类)FVIII或hFVIII-BDD相比降低的CpG和/或可具有与参考野生型哺乳动物(例如人类)FVIII或hFVIII-BDD小于100%的序列同一性。此类方法也可以通过施用小于 6×10^{12} vrAAV载体基因组/公斤(vg/kg)的rAAV载体剂量来实现。以小于 6×10^{12} vrAAV载体基因组/千克(vg/kg)的剂量施用的rAAV载体可以包含载体基因组,该载体基因组包含编码FVIII或hFVIII-BDD

的核酸或核酸变体。

[0150] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文可互换使用,是指所有形式的核酸,寡核苷酸,包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。多核苷酸包括基因组DNA,cDNA和反义DNA,以及剪接或未剪接的mRNA,rRNA tRNA和抑制性DNA或RNA(RNAi,例如,小或短发夹(sh)RNA,微小RNA(miRNA),小或短干扰(si)RNA,反式剪接RNA或反义RNA)。多核苷酸包括天然存在的、合成的和有意修饰或改变的多核苷酸(例如,变体核酸)。多核苷酸可以是单,双或三链,线性或环状,并且可以具有任何长度。在讨论多核苷酸时,本文中可以根据在5'至3'方向上提供序列的惯例描述特定多核苷酸的序列或结构。

[0151] 如本文所用,术语“修饰”或“变体”及其语法变体是指核酸,多肽或其不同于参考序列的亚序列(subsequence)。因此,修饰序列和变体序列可以具有与参考序列基本相同、更大或更小的表达,活性或功能,但是至少保留了参考序列的部分活性或功能。修饰或变体的特定实例是编码FVIII的CpG减少的核酸变体。

[0152] “核酸”或“多核苷酸”变体是指与野生型相比已被遗传改变的修饰序列。该序列可以被遗传修饰而不改变编码的蛋白质序列。或者,可以对该序列进行遗传修饰以编码变体蛋白。核酸或多核苷酸变体也可以是指一种组合序列,其已被密码子修饰以编码仍保留与参考序列(例如野生型蛋白质序列)具有至少部分序列同一性的蛋白质,以及也已被密码子修饰以编码变体蛋白。例如,将改变此类核酸变体的一些密码子,而无需改变由此编码的蛋白质(FVIII)的氨基酸,以及将改变该核酸变体的一些密码子,从而又改变由此编码的蛋白质的氨基酸(FVIII)。

[0153] 术语“变体因子VIII(FVIII)”是指修饰的FVIII,其与未修饰的野生型FVIII(例如,SEQ ID NO:19)或FVIII-BDD相比已被遗传修饰。这样的变体可以被称为“编码因子VIII(FVIII)的核酸变体”。变体的特定实例是编码FVIII或FVIII-BDD蛋白的CpG减少的核酸。术语“变体”不必在提及编码FVIII的CpG减少的核酸的每种情况下出现。同样地,术语“CpG减少的核酸”等可以省略术语“变体”,但是旨在提及“CpG减少的核酸”包括遗传水平的变体。

[0154] 与未减少CpG含量的野生型FVIII或FVIII-BDD相比,具有减少的CpG含量的FVIII和hFVIII-BDD构建体可表现出改善,并且无需对该核酸进行修饰,所述修饰导致氨基酸改变为编码的FVIII或FVIII-BDD蛋白。在比较表达时,如果CpG减少的核酸编码保留B结构域的FVIII蛋白,则将其与野生型FVIII表达进行比较是合适的;并且如果CpG减少的核酸编码没有B结构域的FVIII蛋白,则将其与也具有B结构域缺失的野生型FVIII的表达进行比较。

[0155] “变体因子VIII(FVIII)”也可以是指修饰的FVIII蛋白,使得与野生型FVIII相比,修饰的蛋白具有氨基酸改变。同样,在比较活性和/或稳定性时,如果编码的变体FVIII蛋白保留了B结构域,则将其与野生型FVIII进行比较是合适的;并且如果编码的变体FVIII蛋白具有B结构域缺失,则将其与也具有B结构域缺失的野生型FVIII进行比较。

[0156] 变体FVIII可包含B结构域的一部分。因此,FVIII-BDD包括B结构域的一部分。通常,在FVIII-BDD中,大多数B结构域都被删除。

[0157] 变体FVIII可包含表示如SFSQNPPVLRHQR(SEQ ID NO:29)所示的“SQ”序列。通常,具有SQ的这种变体FVIII(FVIII/SQ)具有BDD,例如,删除了BD的至少全部或部分。变体FVIII,例如FVIII-BDD可以具有“SQ”序列的全部或部分,即SEQ ID NO:29的全部或部分。因此,例如,具有SQ序列(SFSQNPPVLRHQR,SEQ ID NO:29)的变体FVIII-BDD可以具有全部或

仅部分的氨基酸序列SFSQNPVLRHQR。例如，FVIII-BDD可以具有SFSQNPVLRHQR (包括在内)的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个氨基酸残基。因此，具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个内部缺失以及1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个氨基-或羧基末端缺失的SFSQNPVLRHQR被包含在如本文所述的变体FVIII蛋白。

[0158] 由“核酸”或“多核苷酸”序列编码的“多肽”、“蛋白质”和“肽”包括全长天然(FVIII)序列,(与天然存在的野生型蛋白质一样),以及功能亚序列、修饰形式或序列变体,只要所述亚序列、修饰形式或变体保留了天然全长蛋白质的一定程度的功能。例如,编码FVIII或hFVIII-BDD蛋白的CpG减少的核酸可具有如本文所述的B结构域缺失并保留凝血功能。在本发明的方法和用途中,由所述核酸序列编码的此类多肽、蛋白质和肽可以但不必须与在治疗的哺乳动物中有缺陷或表达不足或缺乏的内源蛋白质相同。

[0159] 修饰的非限制性实例包括一个或多个核苷酸或氨基酸取代(例如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、750-850或更多个核苷酸或残基)。核酸修饰的一个实例是CpG减少。在某些实施方案中,编码FVIII的CpG减少的核酸(例如人FVIII蛋白)与编码人因子FVIII的野生型序列相比具有10个或更少的CpG;或与编码人因子FVIII的野生型序列相比具有5个或更少的CpG;或在编码FVIII的CpG减少的核酸中不超过5个CpG。

[0160] 氨基酸修饰的一个实例是参考序列(例如,FVIII,例如具有B结构域缺失的FVIII)的保守氨基酸替代或缺失(例如,亚序列或片段)。在特定实施方案中,修饰或变体序列保留未修饰序列的功能或活性的至少一部分。

[0161] 明确地包括已知或未知的编码蛋白的核酸的所有哺乳动物和非哺乳动物形式,包括本文公开的编码FVIII和hFVIII-BDD的CpG减少的核酸的其他哺乳动物形式。因此,本发明包括来自非哺乳动物、除人类以外的哺乳动物和人类的基因和蛋白质,这些基因和蛋白质的功能与本文所述的FVIII(例如人类)基因和蛋白质基本相似。

[0162] 术语“载体”是指可以通过插入或掺入核酸来操纵的小载体核酸分子,质粒,病毒(例如,AAV载体)或其他载体。这样的载体可以用于遗传操纵(即“克隆载体”),以将多核苷酸引入/转移到细胞中,以及在细胞中转录或翻译插入的多核苷酸。“表达载体”是专门的载体,其包含具有在宿主细胞中表达所需的必需调控区的基因或核酸序列。载体核酸序列通常至少包含用于在细胞中繁殖的复制起点和任选的其他元件,例如异源多核苷酸序列,表达控制元件(例如启动子,增强子),内含子,ITR,可选标记(例如,抗生素抗性),聚腺苷酸化信号。

[0163] 病毒载体衍生自或基于一种或多种包含病毒基因组的核酸元件。特定的病毒载体包括慢病毒,假型慢病毒和细小病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。

[0164] 术语“重组”,作为载体的修饰物,例如重组病毒(例如慢病毒或细小病毒(例如,AAV))载体,以及序列(例如重组多核苷酸和多肽)的修饰物,是指组合物已经以自然界中通常不会发生的方式被操纵(即工程化)。重组载体的一个具体实例,例如AAV载体,是将野生型病毒(例如,AAV)基因组中通常不存在的多核苷酸插入在病毒基因组内的情形。重组多核苷酸的一个实例是将编码FVIII或hFVIII-BDD蛋白的CpG减少的核酸克隆到基因通常缔合(associated)在病毒(例如,AAV)基因组内的具有或不具有5',3'和/或内含子区域的载体中。尽管术语“重组”在本文中的使用并不总是与诸如病毒和AAV载体之类的载体以及诸如

多核苷酸之类的序列相关,仍明确包括包括多核苷酸在内的重组形式,尽管有任何此类省略。

[0165] 重组病毒“载体”或“AAV载体”源自病毒的野生型基因组,例如AAV,其通过使用分子方法从病毒(例如,AAV)中去除野生型基因组并替换为非天然核酸,例如编码FV1111的CpG减少的核酸。通常,对于AAV,AAV基因组的一个或两个反向末端重复(ITR)序列保留在AAV载体中。“重组”病毒载体(例如AAV)与病毒(例如AAV)基因组有所区别,因为全部或部分病毒基因组已被相对于病毒(例如AAV)基因组核酸的非天然序列(例如编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸)取代。因此,非天然序列的掺入将病毒载体(例如,AAV)定义为“重组”载体,在AAV的情况下,其可以称为“rAAV载体”。

[0166] 重组载体(例如,慢病毒,细小病毒,AAV)序列可以被包装——在本文中称为“颗粒”,用于细胞、离体、体外或体内的随后感染(转导)。当重组载体序列被衣壳化或包装到AAV颗粒中时,该颗粒也可以称为“rAAV”。这样的颗粒包括衣壳化或包装载体基因组的蛋白质。具体实例包括病毒包膜蛋白,在AAV的情况下是衣壳蛋白。

[0167] 载体“基因组”是指重组质粒序列的最终被包装或衣壳化以形成病毒(例如,AAV)颗粒的部分。在重组质粒用于构建或制备重组载体的情况下,载体基因组不包括“质粒”中与重组质粒的载体基因组序列不对应的部分。重组质粒的这一非载体基因组部分被称为“质粒骨架”,对于克隆和扩增质粒很重要(这是繁殖和重组病毒生产所必需的过程),但本身并没有被包装或衣壳化入病毒(例如AAV)颗粒。因此,载体“基因组”是指被病毒(例如,AAV)包装或衣壳化的核酸。

[0168] 本文使用“转基因”来方便地指预期或已被引入细胞或生物体的核酸。转基因包括任何核酸,例如编码多肽或蛋白质的基因(例如,编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸)。

[0169] 在具有转基因的细胞中,转基因已经通过载体(例如AAV)“转导”或“转染”细胞而被引入/转移。术语“转导”和“转染”是指将诸如核酸的分子引入细胞或宿主生物中。转基因可以或不整合到受体细胞的基因组核酸中。如果引入的核酸整合入受体细胞或生物体的核酸(基因组DNA)中,则可以将其稳定地保持在该细胞或生物体中,并进一步传递至受体细胞或生物体的后代细胞或生物体或由其遗传。最后,引入的核酸可以染色体外或仅瞬时地存在于受体细胞或宿主生物中。

[0170] “转导的细胞”是其中已导入转基因的细胞。因此,“转导的”细胞(例如,在哺乳动物中,例如细胞,组织或器官细胞中)是指在外源分子例如核酸(例如,转基因)掺入细胞后细胞中的遗传变化。因此,“转导的”细胞是其中已引入外源核酸的细胞或其后代。细胞可以繁殖并表达导入的蛋白质,或转录核酸。对于基因疗法的用途和方法,转导的细胞可以在受试者体内。

[0171] “表达控制元件”是指影响可操作连接核酸的表达的核酸序列。控制元件,包括本文所述的表达控制元件,例如启动子和增强子。包含AAV载体的载体序列可以包含一个或多个“表达控制元件”。通常,包括这样的元件以促进适当的异源多核苷酸转录,并且如果有的话,翻译(例如,启动子,增强子,内含子的剪接信号,基因的正确阅读框架的维持以允许mRNA的框架内翻译以及终止密码子等等)。这样的元件通常以顺式作用,称为“顺式作用”元件,但是也可以以反式作用。

[0172] 表达控制可以处于转录,翻译,剪接,信息稳定等水平。通常,调节转录的表达控制元件并置(juxtaposed)在转录的核酸的5'末端附近(即“上游”)。表达控制元件也可以位于转录序列的3'末端(即“下游”)或在转录本内(例如在内含子中)。表达控制元件可以位于转录的序列附近或与其相距一定距离处(例如,距所述多核苷酸1-10、10-25、25-50、50-100、100-500或更多个核苷酸),甚至相距相当长的距离。然而,由于某些载体(例如AAV载体)的长度限制,表达控制元件通常将在距转录的核酸1至1000个核苷酸内。

[0173] 在功能上,可操作连接的核酸的表达至少部分地可被元件(例如,启动子)控制,使得元件调节核酸的转录以及视情况而定的转录物的翻译。表达控制元件的一个具体实例是启动子,其通常位于转录序列(例如编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸)的5'末端。与不存在启动子时表达的量相比,启动子通常增加了从可操作连接的核酸表达的量。

[0174] 如本文所用的“增强子”可以指位于异源多核苷酸附近的序列。增强子元件通常位于启动子元件的上游,但也起作用,并且可以位于序列(例如,编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸)的下游或序列内。因此,增强子元件可以位于编码FV1111的CpG减少的核酸的上游或下游100个碱基对,200个碱基对或300个或更多个碱基对处。增强子元件通常使可操作连接的核酸的表达增加到由启动子元件提供的表达之上。

[0175] 表达构建体可包含用于驱动特定细胞或组织类型中表达的调节元件。表达控制元件(例如,启动子)包括在特定组织或细胞类型中活跃的那些,在本文中称为“组织特异性表达控制元件/启动子”。组织特异性表达控制元件通常在特异性细胞或组织(例如,肝脏)中活跃。表达控制元件通常在特定的细胞,组织或器官中活跃,因为它们被特定细胞、组织或器官类型所特有的转录激活蛋白或其他转录调节因子所识别。这样的调节元件是本领域技术人员已知的(参见,例如,Sambrook等人(1989)和Ausubel等人(1992))。

[0176] 在本发明的表达构建体中掺入组织特异性调节元件为编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸表达提供了至少部分组织嗜性。在肝中活跃的启动子的实例是TTR启动子,人 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子;白蛋白,Miyatake等人,J.Virol.,71:5124-32(1997);乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,Gene Ther.3:1002-9(1996); α -甲胎蛋白(AFP),Arbuthnot等人,Hum.Gene.Ther.,7:1503-14(1996)]等。在肝脏中活跃的增强子的实例是载脂蛋白E(apoE)HCR-1和HCR-2(Allan等人,J.Biol.Chem.,272:29113-19(1997))。

[0177] 表达控制元件还包括能够在许多不同细胞类型中驱动多核苷酸表达的普遍存在的或混杂的(promiscuous)启动子/增强子。此类元件包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子/增强子序列,劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子/增强子序列以及在多种哺乳动物细胞类型中其他活跃的病毒启动子/增强子,或自然界中不存在的合成元件(参见,例如,Boshart等人,Cell,41:521-530(1985)),SV40启动子,二氢叶酸还原酶启动子,细胞质 β -肌动蛋白启动子和磷酸甘油激酶(PGK)启动子。

[0178] 表达控制元件还可以以可调节的方式赋予表达,即信号或刺激增加或减少可操作连接的异源多核苷酸的表达。响应于信号或刺激而增加可操作连接的多核苷酸的表达的可调节元件也被称为“可诱导元件”(即,由信号诱导)。具体实例包括但不限于激素(例如,类固醇)诱导型启动子。通常,这些元件赋予的增加或减少的量与存在的信号或刺激的量成正比;信号或刺激的量越大,表达的增加或减少越大。特别的非限制性实例包括锌诱导的绵羊金属硫蛋白(MT)启动子;类固醇激素诱导的小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子;T7聚合酶启

动子系统(WO 98/10088);四环素可抑制系统(Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992));四环素诱导系统(Gossen等人,Science.268:1766-1769(1995));也参见Harvey等人,Curr.Opin.Chem.Biol.2:512-518(1998));RU486-可诱导系统(Wang等人,Nat.Biotech.15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.4:432-441(1997));和雷帕霉素可诱导系统(Magari等人,J.Clin.Invest.100:2865-2872(1997);Rivera等人,Nat.Medicine.2:1028-1032(1996))。在本文中可能是有用的其他可调节的控制元件是那些通过特定的生理状态例如温度,急性期,发育来调节的元件。

[0179] 表达控制元件还包括异源多核苷酸的天然元件。当希望异源多核苷酸的表达应模仿天然表达时,可以使用天然控制元件(例如启动子)。当异源多核苷酸的表达将在时间或发育上,或以组织特异性方式或响应于特异性转录刺激而受到调节时,可以使用天然元件。也可以使用其他天然表达控制元件,例如内含子,聚腺苷酸化位点或Kozak共有序列。

[0180] 术语“可操作地连接”是指表达编码序列所必需的调节序列被置于相对于编码序列的适当位置,以实现编码序列的表达。有时将该相同定义应用于编码序列和转录控制元件(例如启动子,增强子和终止元件)在表达载体中的布置。该定义有时还应用于其中产生杂合核酸分子的第一和第二核酸分子的核酸序列的布置。

[0181] 在与核酸可操作连接的表达控制元件的实例中,该关系使得控制元件调节核酸的表达。更具体地,例如,两个DNA序列可操作地连接是指两个DNA以这样的关系(顺式或反式)布置,使得至少一个DNA序列能够对另一序列发挥生理作用。

[0182] 因此,用于载体的其他元件包括但不限于表达控制(例如,启动子/增强子)元件,转录终止信号或终止密码子,侧接于序列的5'或3'非翻译区(例如,聚腺苷酸化(polyA)序列),例如AAV ITR序列的一个或多个拷贝,或内含子。

[0183] 其他元件包括例如填充物多核苷酸序列或填充多核苷酸序列(filler or stuffer polynucleotide sequence),例如以改善包装并减少污染性核酸的存在。AAV载体通常接受DNA插入物,该DNA插入物的大小范围通常为约4kb至约5.2kb,或稍大。因此,对于较短的序列,包括所述填充或填充物以将长度调节至接近或处于AAV载体包装入病毒颗粒所可接受的病毒基因组序列的正常大小。在各种实施方案中,填充物/填充核酸序列是核酸的非翻译(非蛋白质编码)区段。对于小于4.7Kb的核酸序列,填充物或填充多核苷酸序列的长度是当与该序列组合(例如插入载体中)时的总长度在约3.0-5.5Kb之间,或在约4.0-5.0Kb之间,或在约4.3-4.8Kb之间。

[0184] 内含子还可以充当填充物或填充多核苷酸序列,以便获得将AAV载体包装到病毒颗粒中的长度。用作填充物或填充多核苷酸序列的内含子和内含子片段也可以增强表达。

[0185] 短语“止血相关病症”是指出血病症,例如血友病A,具有抑制性抗体的血友病A患者,凝血因子VII、VIII、IX和X、XI、V、XII、II、血管性血友病因子缺乏,FV/FVIII合并缺乏,维生素K环氧还原酶C1缺乏, γ -羧化酶缺乏;与创伤,损伤,血栓形成,血小板减少症,中风,凝血病,弥散性血管内凝血(DIC)相关的出血;与肝素,低分子量肝素,戊糖(pentasaccharide),华法林,小分子抗血栓形成剂(即FXa抑制剂)相关的过度抗凝;以及血小板疾病,例如巨大血小板综合征,血小板无力症(Glanzman thrombasthenia)和贮存库不足症。

[0186] 术语“分离的”当用作组合物的修饰语时,是指所述组合物是由人工制备的,或者

与它们的天然存在的体内环境完全或至少部分地分离。通常,分离的组合物基本上不含它们通常与自然界相关的一种或多种材料,例如一种或多种蛋白质,核酸,脂质,碳水化合物,细胞膜。

[0187] 关于本发明的核酸,术语“分离的”是指与一个或多个序列分离的核酸分子,其与所述序列在其起源的生物体的天然存在基因组(基因组DNA)中(在5'和3'方向上)直接相邻。例如,“分离的核酸”可以包含插入载体(例如质粒或病毒载体)或整合到原核生物或真核生物的DNA中的DNA或cDNA分子。

[0188] 关于本发明的RNA分子,术语“分离的”主要是指由如上定义的分离的DNA分子编码的RNA分子。替代地,该术语可以指已经与在其天然状态下(即在细胞或组织中)与其缔合的RNA分子充分分离的RNA分子,从而以“基本上纯的”形式存在(即术语“基本上纯的”定义如下)。

[0189] 关于蛋白质,本文有时使用术语“分离的蛋白质”或“分离和纯化的蛋白质”。该术语主要是指通过表达分离的核酸分子产生的蛋白质。替代地,该术语可以指已经与天然与其缔合的其他蛋白质充分分离的蛋白质,从而以“基本上纯的”形式存在。

[0190] 术语“分离的”不排除人工制备的制品(combination),例如,重组载体(例如,rAAV)序列,或包装或衣壳化载体基因组的病毒颗粒和药物制剂。术语“分离的”也不排除组合物的替代物理形式,例如杂合体/嵌合体,多聚体/低聚物,修饰(例如,磷酸化,糖基化,脂化)或衍生化形式,或在人工制备的宿主细胞中表达的形式。

[0191] 术语“基本上纯的”是指包含至少50-60wt%的目标化合物(例如,核酸,寡核苷酸,蛋白质等)的制剂。该制剂可包含至少75wt%,或约90-99wt%的目标化合物。通过适用于目标化合物的方法(例如色谱法,琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,HPLC分析等)来测定纯度。

[0192] 当提及特定核苷酸序列或氨基酸序列时,短语“基本上由...组成”是指具有给定SEQ ID NO的特性的序列。例如,当用于氨基酸序列时,该短语包括该序列本身和不会影响该序列的基本和新颖特征的分子修饰。

[0193] 如本文所用的术语“寡核苷酸”是指引物和探针,并且被定义为由两个或更多个核糖或脱氧核糖核苷酸(例如三个以上)组成的核酸分子。寡核苷酸的确切大小将取决于各种因素以及寡核苷酸使用的特定应用。

[0194] 本文所用的术语“探针”是指寡核苷酸,多核苷酸或核酸,无论是RNA或DNA,无论是天然存在于纯化的限制性酶消化物中还是合成产生,均能够与具有与探针互补的序列的核酸退火或特异性杂交。探针可以是单链或双链的。探针的确切长度将取决于许多因素,包括温度,探针来源和使用方法。例如,对于诊断应用,取决于靶序列的复杂性,寡核苷酸探针通常包含15-25个或更多个核苷酸,尽管它可以包含较少的核苷酸。

[0195] 本文中的探针被选择为与特定靶核酸序列的不同链“基本上”互补。这意味着探针必须充分互补,以便能够在预定条件下与其各自的靶链“特异性杂交”或退火。因此,探针序列不必反映靶标的确切互补序列。例如,非互补核苷酸片段可以连接至探针的5'或3'末端,而探针序列的其余部分与靶链互补。替代地,可以将非互补碱基或更长的序列散置在探针中,条件是该探针序列与靶核酸的序列具有足够的互补性以进行特异性退火。

[0196] 术语“特异性杂交”是指具有充分互补序列的两个单链核酸分子之间的缔合,以允许在本领域通常使用的预定条件下进行这种杂交(有时称为“基本上互补”)。特别地,该术

语是指寡核苷酸与包含在本发明的单链DNA或RNA分子中的基本互补序列的杂交,实质上排除了寡核苷酸与非互补序列的单链核酸的杂交。

[0197] 如本文所用的术语“引物”是指寡核苷酸, RNA或DNA, 单链或双链, 其源自生物系统, 通过限制性内切酶消化产生, 或合成产生, 当放置在适当的环境中时, 它能够在功能上充当模板依赖性核酸合成的引发剂。当提供合适的核酸模板时, 合适的核酸的核苷三磷酸前体, 聚合酶, 合适的辅酶因子和条件(如合适的温度和pH)时, 通过在聚合酶的作用或类似活性下添加核苷酸, 可以在其3'末端延伸引物, 以产生引物延伸产物。

[0198] 引物的长度可以根据特定条件和应用要求而变化。例如, 在诊断应用中, 寡核苷酸引物的长度通常为15-25个或更多个核苷酸。引物必须与所期望的模板充分互补, 以引发所需延伸产物的合成, 也就是说, 能够以足以以适当的并置方式提供引物的3'羟基部分的方式与所期望的模板链退火, 以用于通过聚合酶或类似酶引发的合成。不需要引物序列表现与所期望的模板的精确互补。例如, 可以将非互补核苷酸序列连接至其他互补引物的5'末端。替代地, 可将非互补碱基散置(interspersed)在寡核苷酸引物序列内, 条件是引物序列与所期望的模板链的序列具有充分的互补性, 以在功能上提供用于合成延伸产物的模板-引物复合物。

[0199] 术语“同一性”, “同源性”及其语法变化形式是指当两个或多个参考的实体是“比对”序列时它们是相同的。因此, 举例来说, 当两个多肽序列相同时, 它们至少在参考区域或部分内具有相同的氨基酸序列。当两个多核苷酸序列相同时, 它们至少在参考区域或部分内具有相同的多核苷酸序列。同一性可以在序列的定义区(区域或结构域)上。同一性的“区”或“区域”是指两个或更多个相同参考实体的一部分。因此, 当两个蛋白质或核酸序列在一个或多个序列区或区域上相同时, 它们在该区域内共享同一性。“比对”序列是指多个多核苷酸或蛋白质(氨基酸)序列, 与参考序列相比, 通常包含针对缺失的校正或额外的碱基或氨基酸(缺口(gap))。

[0200] 同一性可以在序列的整个长度或一部分上延伸。在某些实施方案中, 共享同一性百分比的序列的长度是2、3、4、5或更多个连续的核酸或氨基酸, 例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等个连续的核酸或氨基酸。在其他实施方案中, 共享同一性的序列长度是21个或更多个连续的核酸或氨基酸, 例如21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40等个连续的核酸或氨基酸。在进一步的实施方案中, 共享同一性的序列的长度是41个或更多个连续的核酸或氨基酸, 例如42、43、44、45、46、47、48、49、50等个连续的核酸或氨基酸。在其他实施方案中, 共享同一性的序列的长度是50个或更多个连续的核酸或氨基酸, 例如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、500-1000等个连续的核酸或氨基酸。

[0201] 如本文所述, 核酸变体, 例如编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的变体将不同于野生型, 但是可以显示与具有或没有B-结构域的野生型FV1111蛋白具有序列同一性。在编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸变体中, 在核苷酸序列水平上, 编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸通常将与编码野生型FV1111的核酸具有至少约70%同一性, 更通常约75%同一性, 甚至更通常约80%-85%同一性。因此, 例如, 编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸可以与编码野生型FV1111的基因或彼此(即X01对比X02, X03对比X04等)具有75%-

85%的同一性,如本文所述。

[0202] 在氨基酸序列水平上,诸如变体FV1111或hFV1111-BDD蛋白的变体将具有至少约70%的同一性,更典型地约75%的同一性,或80%的同一性,甚至更典型地约85%的同一性,或90%或更高的同一性。在其他实施方案中,诸如变体FV1111或hFV1111-BDD蛋白的变体与参考序列(例如具有或不具有B-结构域的野生型FV1111蛋白)具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的同一性。

[0203] 为了确定同一性,如果FV1111(例如,编码FV1111的CpG减少的核酸)保留了B-结构域,则比较与野生型FV1111的同一性是合适的。如果FV1111(例如,编码hFV1111-BDD的CpG减少的核酸)具有B-结构域缺失,则比较与也具有B结构域缺失的野生型FV1111的同一性是合适的。

[0204] 术语“同源的”或“同源性”是指两个或更多个参考实体在给定区域或部分上共享至少部分同一性。同源性或同一性的“区,区域或结构域”是指两个或多个参考实体的一部分共享同源性或相同。因此,当两个序列在一个或多个序列区域上相同时,它们在这些区域中共享同一性。“基本同源性”是指分子在结构或功能上是保守的,从而使其具有或被预测具有参考分子的一种或多种结构或功能(例如生物学功能或活性)的至少部分结构或功能,或与其共享同源性的参考分子的相关/相应区域或部分。

[0205] 两个序列之间的同一性(同源性)程度或“同一性百分比”可以使用计算机程序和/或数学算法来确定。为了本发明的目的,使用可从威斯康星州麦迪逊市的Genetics Computer Group获得的GCG Wisconsin Package 9.1版进行核酸序列的比较。为方便起见,该程序指定的默认参数(空位产生罚分=12,空位延伸罚分=4)旨在用于比较序列同一性。或者,由美国国家生物技术信息中心提供的Blastn 2.0程序(可在ncbi.nlm.nih.gov/blast/的万维网上找到;Altschul等人,1990,J Mol Biol 215:403-410)使用具有默认参数的缺口比对,可用于确定核酸序列和氨基酸序列之间的同一性和相似性水平。对于多肽序列比较,通常将BLASTP算法与评分矩阵(例如PAM100,PAM 250,BLOSUM 62或BLOSUM 50)结合使用。FASTA(例如FASTA2和FASTA3)和SSEARCH序列比较程序也用于量化同一性程度(Pearson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988);Pearson,Methods Mol Biol.132:185(2000);以及Smith等人,J.Mol.Biol.147:195(1981))。还已经开发了使用基于Delaunay的拓扑图映射定量蛋白质结构相似性的程序(Bostick等人,Biochem Biophys Res Commun.304:320(2003))。

[0206] 可通过使用重组DNA技术方法来制备核酸分子,表达载体(例如,载体基因组),质粒,包括本发明的编码FV1111或hFV1111-BDD的核酸和核酸变体。核苷酸序列信息的可获得性使得能够通过多种手段制备本发明的分离的核酸分子。例如,可以使用各种标准克隆,重组DNA技术,经由细胞表达或体外翻译和化学合成技术来制备编码FV1111或hFV1111-BDD的CpG减少的核酸变体。多核苷酸的纯度可以通过测序,凝胶电泳等来确定。例如,可以使用杂交或基于计算机的数据库筛选技术分离核酸。这些技术包括但不限于:(1)基因组DNA或cDNA文库与探针的杂交以检测同源核苷酸序列;(2)抗体筛选,例如使用表达文库筛选具有共同结构特征的多肽;(3)使用能够退火至目的核酸序列的引物对基因组DNA或cDNA进行聚合酶链反应(PCR);(4)计算机在序列数据库中搜索相关序列;(5)差异筛选减去的核酸文库。

[0207] 本发明的核酸可以在任何方便的克隆载体中保持为DNA。在一实施方案中,将克隆

保持在质粒克隆/表达载体中,例如pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA),其在合适的大肠杆菌宿主细胞中繁殖。或者,可以将核酸保持在适于在哺乳动物细胞中表达的载体中。在翻译后修饰影响凝血功能的情况下,核酸分子可以在哺乳动物细胞中表达。

[0208] 编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸和核酸变体包括cDNA,基因组DNA, RNA及其片段,其可以是单链或双链的。因此,本发明提供了具有能够与本发明的核酸的至少一个序列杂交的序列的寡核苷酸(DNA或RNA的有义或反义链)。这样的寡核苷酸可用作检测FVIII或hFVIII-BDD表达的探针。

[0209] 诸如本文所述的那些载体(rAAV)任选地包含在宿主细胞中表达DNA所必需的调节元件,其定位方式允许编码的蛋白质在宿主细胞中表达。表达所需的此类调节元件包括但不限于如本文所述且为本领域技术人员已知的启动子序列,增强子序列和转录起始序列。

[0210] 本发明的方法和用途包括将核酸(转基因)递送(转导)到宿主细胞中,所述宿主细胞包括分裂和/或非分裂细胞。本发明的核酸,rAAV载体,方法,用途和药物制剂还可以用于将FVIII或hFVIII-BDD递送,施用或提供给需要其的受试者的方法,作为治疗方法。以这种方式,核酸被转录并且蛋白质可以在受试者体内产生。受试者可以从FVIII或hFVIII-BDD中受益或需要FVIII或hFVIII-BDD,因为该受试者缺乏FVIII,或者因为受试者中FVIII的产生可以赋予一些治疗效果,作为治疗方法或其他方式。

[0211] 包含具有编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体的基因组的rAAV载体可以治疗遗传病,例如FVIII缺乏症。对于缺乏状态的疾病,可以使用基因转移将正常基因带入受影响的组织中进行替代治疗,以及使用反义突变为该疾病创建动物模型。对于不平衡的疾病状态,基因转移可用于在模型系统中创建疾病状态,然后可用于抵消疾病状态。还可以使用核酸序列的位点特异性整合来纠正缺陷。

[0212] 在特定的实施方案中,包含具有编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体的基因组的rAAV载体可以用作为例如调节凝血级联的治疗剂和/或预防剂(蛋白质或核酸)或作为基因中的转基因。例如,编码的FVIII或hFVIII-BDD可以具有与野生型FVIII相似的凝血活性,或者与野生型FVIII相比改变的凝血活性。基于细胞的策略允许在血友病A患者中连续表达FVIII或hFVIII-BDD。如本文所公开的,FVIII分子(核酸和蛋白质)的某些修饰导致在核酸水平的表达增加,凝血活性增加,从而有效地改善了止血作用。

[0213] 向患者施用编码FVIII或hFVIII-BDD的rAAV载体导致FVIII或hFVIII-BDD蛋白的表达,其用于改变凝血级联。根据本发明,如本文所述的FVIII或hFVIII-BDD蛋白或功能片段的表达增加止血作用。

[0214] rAAV载体可以单独施用,或与其他可用于调节日止血的分子联合施用。根据本发明,可以将rAAV载体或治疗剂的组合单独或以药学上可接受的或生物学上相容的组合物施用于所述患者。

[0215] 腺相关病毒”(AAV)属于细小病毒家族。AAV是可用作基因治疗载体的病毒,因为它们可以穿透细胞并引入核酸/遗传物质,从而可以将核酸/遗传物质稳定地维持在细胞中。另外,这些病毒可以例如将核酸/遗传物质引入特定位点。由于AAV与人类的致病性疾病无关,因此rAAV载体能够将异源多核苷酸序列(例如治疗性蛋白质和治疗剂)传递给人类患者,而不会引起实质性AAV发病机理或疾病。

[0216] rAAV载体具有用于此类应用的许多期望特征,包括用于分裂和非分裂细胞的趋向

性。这些载体的早期临床经验也表明没有持续的毒性，而且免疫应答最低或无法检测到。已知AAV通过受体介导的内吞作用或通过转胞吞作用在体内和体外感染多种细胞类型。这些载体系统已经在针对视网膜上皮，肝脏，骨骼肌，气道，脑，关节和造血干细胞的人类中进行了测试。

[0217] 可能需要引入一种rAAV载体，其可以提供例如所期望基因的多个拷贝，并因此提供该基因产物的更多量。在许多参考文献，专利和专利申请中详细描述了改进的rAAV载体和产生这些载体的方法，包括：Wright JF (Hum Gene Ther 20:698-706, 2009) 一种用于生产临床级载体的技术，费城儿童医院。

[0218] 因此，本发明提供了通过rAAV载体递送FVIII或hFVIII-BDD的病毒方法。例如，重组AAV载体可以包括编码FVIII的核酸变体，其中编码的FVIII蛋白任选地具有B结构域缺失。向受试者（例如哺乳动物）递送或施用rAAV载体因此向受试者例如哺乳动物（例如人）提供了FVIII。

[0219] 载体的直接递送或人细胞的离体转导，然后输注到体内将导致FVIII或hFVIII-BDD表达，从而对止血产生有益的治疗作用。在本文所述的发明因子VIII的情况下，这种施用增强了促凝血活性。

[0220] AAV载体通常不包括与发病机理相关的病毒基因。这样的载体通常具有全部或部分缺失的一种或多种野生型AAV基因，例如rep和/或cap基因，但是保留了至少一种功能性侧翼ITR序列，这对于拯救 (rescue)、复制和包装重组载体入AAV载体颗粒是必需的。例如，仅分别包括载体的基本部分，例如ITR元件。因此，AAV载体基因组将包含用于复制和包装的要求顺式的序列（例如功能性ITR序列）

[0221] 重组AAV载体及其方法和用途包括任何病毒株或血清型。作为非限制性实例，重组AAV载体可以基于任何AAV基因组，例如AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -rh74, -rh10或AAV-2i8。这样的载体可以基于相同的病毒株或血清型（或亚组或变体），或彼此不同。作为非限制性实例，基于一种血清型基因组的重组AAV载体可以与包装该载体的一种或多种衣壳蛋白相同。另外，重组AAV载体基因组可以基于不同于包装载体的一种或多种AAV衣壳蛋白的AAV（例如，AAV2）血清型基因组。例如，AAV载体基因组可以基于AAV2，而三个衣壳蛋白中的至少一个可以是例如AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74或AAV-2i8或其变体。

[0222] 在特定的实施方案中，腺相关病毒 (AAV) 载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74和AAV-2i8，以及其变体（例如衣壳变体，例如氨基酸插入，添加，替代和缺失），例如如WO 2013/158879（国际申请号PCT/US2013/037170），WO 2015/013313（国际申请号PCT/US2014/047670）和US 2013/0059732（美国专利号9,169,299，公开了LK01, LK02, LK03等）中所描述的。

[0223] AAV变体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74和AAV-2i8衣壳的变体和嵌合体。因此，AAV载体和AAV变体（例如衣壳变体）包括（衣壳化或包装）编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或核酸变体。

[0224] AAV和AAV变体（例如衣壳变体）血清型（例如VP1, VP2和/或VP3序列）可以与或可以与其他AAV血清型不同，包括例如AAV1-AAV12, Rh74或Rh10（例如，不同于AAV1-AAV12, Rh74或Rh10血清型的任一种的VP1, VP2和/或VP3序列）。

[0225] 如本文所用,术语“血清型”是一种区分,其用于指具有在血清学上不同于其他AAV血清型的衣壳的AAV。基于针对一种AAV的抗体与另一种AAV的抗体之间缺乏交叉反应性来确定血清学独特性(Serologic distinctiveness)。这样的交叉反应性差异通常是由于衣壳蛋白序列/抗原决定簇的差异(例如,由于AAV血清型的VP1,VP2和/或VP3序列差异)。尽管包括衣壳变体的AAV变体可能在血清学上与参考AAV或其他AAV血清型没有区别,但与参考或其他AAV血清型相比,它们至少相差一个核苷酸或氨基酸残基。

[0226] 在传统定义下,血清型是指目标病毒已经针对所有现有和特征性血清型的血清进行中和活性测试,并且未发现能中和目标病毒的抗体。由于更多天然存在的病毒分离株的发现和/或衣壳突变体的产生,因此与任何目前存在的血清型可能存在血清学差异,也可能没有血清学差异。因此,在新病毒(例如,AAV)没有血清学差异的情况下,该新病毒(例如,AAV)将是相应血清型的亚组或变体。在许多情况下,尚未对具有衣壳序列修饰的突变病毒进行中和活性的血清学测试,以根据传统的血清型定义确定它们是否属于另一种血清型。因此,为方便起见和避免重复,术语“血清型”广义上既是指血清学上不同的病毒(例如AAV),也是指可能在给定血清型的亚组或变体内的血清学上不同的病毒(例如AAV)。

[0227] 因此,AAV载体包括与特定血清型特征性的基因/蛋白质序列相同的基因/蛋白质序列。如本文所用,“与AAV1有关的AAV载体”是指一种或多种与包含AAV1的一个或多个多核苷酸或多肽序列具有实质序列同一性的AAV蛋白(例如,VP1,VP2和/或VP3序列)。类似地,“与AAV8有关的AAV载体”是指一种或多种与包含AAV8的一个或多个多核苷酸或多肽序列具有实质序列同一性的AAV蛋白(例如,VP1,VP2和/或VP3序列)。“与AAV-Rh74有关的AAV载体”是指一种或多种与包含AAV-Rh74的一个或多个多核苷酸或多肽序列具有实质序列同一性的AAV蛋白(例如,VP1,VP2和/或VP3序列)。因此,与另一种血清型(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74或AAV-2i8)有关的此类AAV载体可以具有一个或多个与AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74和AAV-2i8不同的序列,但可以表现出与一种或多种基因和/或蛋白质的实质序列同一性,和/或具有AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74或AAV-2i8的一个或多个功能特征(例如,细胞/组织趋向性)。示例性非限制性AAV变体包括VP1,VP2和/或VP3中的任一个的衣壳变体。

[0228] 在各种示例性实施方案中,与参考血清型有关的AAV载体具有多核苷酸,多肽或其亚序列,其包括以下或由以下组成:与一个或多个AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,AAV12,Rh10,Rh74或AAV-2i8(例如,ITR,或VP1,VP2和/或VP3序列)具有至少80%或更高(例如85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%等)同一性的序列。

[0229] 本发明的组合物、方法和用途包括AAV序列(多肽和核苷酸)和其亚序列,其与参考AAV血清型(例如AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,AAV12,Rh10或AAV-2i8)具有小于100%序列同一性,但区别于和不同于已知的AAV基因或蛋白(例如AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,AAV12,Rh10,Rh74或AAV-2i8,基因或蛋白等)。在一实施方案中,AAV多肽或其亚序列包含以下或由以下组成:与任何参考AAV序列或其亚序列(例如AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,AAV12,Rh10,Rh74或AAV-2i8(例如VP1,VP2和/或VP3衣壳或ITR))具有至少

75%或更高的同一性(例如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%等,最高可达100%同一性)的序列。在某些实施方案中,AAV变体具有1、2、3、4、5、5-10、10-15、15-20或更多个氨基酸替代。

[0230] 重组AAV载体,包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74或AAV-2i8及其变体,相关的,杂合的和嵌合序列,可以使用本领域技术人员已知的重组技术来构建,以包括侧接一个或多个功能性AAV ITR序列的一个或多个核酸序列(转基因)。

[0231] 在本发明的一实施方案中,可以通过输注生物相容性载体,例如通过静脉内注射,向患者施用包含编码FVIII或hFVIII-BDD的核酸或变体的rAAV载体。rAAV载体可以任选地被包裹在脂质体中或与其他磷脂或胶束(micelle)混合以增加分子的稳定性。

[0232] 根据本发明,rAAV载体可单独施用或与已知可调节止血的其他药剂(例如,因子V,因子Va或其衍生物)组合施用。

[0233] 因此,可以将rAAV载体和其他组合物,药剂,药物,生物制剂(蛋白质)掺入药物组合物中。此类药物组合物尤其可用于体内或离体给药和递送至受试者。

[0234] 在特定的实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。此类赋形剂包括本身不会诱导对接受该组合物的个体有害的免疫应答,并且可以在没有过度毒性的情况下给药的任何药剂。

[0235] 如本文所用,术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”是指适合于一种或多种施用途径、体内递送或接触的生物学上可接受的制剂,气态,液体或固体或其混合物。“药学上可接受的”或“生理上可接受的”组合物是不是生物学上或其他方面不期望的物质,例如,可以将该物质施用于受试者而不会引起实质的不期望的生物学作用。因此,这样的药物组合物可以用于例如向受试者施用核酸,载体,病毒颗粒或蛋白质。

[0236] 药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体,例如水,盐水,甘油,糖和乙醇。药学上可接受的盐也可以包括在其中,例如,无机酸盐,例如盐酸盐,氢溴酸盐,磷酸盐,硫酸盐等;以及有机酸的盐,例如乙酸盐,丙酸盐,丙二酸盐,苯甲酸盐等。另外,在这类溶媒(vehicle)中可以存在辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,pH缓冲物质等。

[0237] 药物组合物可以作为盐提供,并且可以利用许多酸形成,酸包括但不限于盐酸,硫酸,乙酸,乳酸,酒石酸,苹果酸,琥珀酸等。盐相比于相应的游离碱形式倾向于更易溶于水或其他质子溶剂。在其他情况下,制剂可以是冻干粉末,其可以包含以下任意一种或全部:pH范围为4.5至5.5的1-50mM组氨酸,0.1%-2%蔗糖和2-7%甘露醇,在使用前与缓冲液组合使用。

[0238] 药物组合物包括溶剂(含水或非水的),溶液(含水或非水的),乳剂(例如水包油或油包水),混悬剂,糖浆,酏剂(elixir),分散剂和混悬媒介,包衣,等渗和吸收促进或延迟剂,其与药物施用或体内接触或递送相容。含水和非水溶剂,溶液和混悬液可包括混悬剂和增稠剂。此类药学上可接受的载体包括片剂(包衣的或未包衣的),胶囊(硬或软的),微珠,粉末,颗粒和晶体。补充的活性化合物(例如防腐剂,抗菌剂,抗病毒剂和抗真菌剂)也可以掺入组合物中。

[0239] 可以将药物组合物配制成与本文所述或本领域技术人员已知的特定施用或递送

途径相容。因此,药物组合物包括适合通过各种途径给药的载体,稀释剂或赋形剂。

[0240] 适用于肠胃外给药的组合物包括活性化合物的水溶液和非水溶液,混悬液或乳剂,这些制剂通常是无菌的并且可以与预期接受者的血液等渗。非限制性说明性实例包括水,缓冲盐水,汉克斯溶液,林格氏溶液,右旋糖,果糖,乙醇,动物油,植物油或合成油。含水注射混悬剂可包含增加混悬剂粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇或葡聚糖。

[0241] 另外,可以将活性化合物的混悬液制备为合适的油注射用混悬液。合适的亲脂性溶剂或溶媒(vehicle)包括脂肪油(例如芝麻油),或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酸酯),或脂质体。任选地,混悬液还可包含合适的稳定剂或增加化合物的溶解度以允许制备高浓度溶液的试剂。

[0242] 助溶剂和助剂(adjutant)可以添加到制剂中。助溶剂的非限制性实例包含羟基或其他极性基团,例如醇,例如异丙醇;二醇,例如丙二醇,聚乙二醇,聚丙二醇,乙二醇醚;甘油;聚氧乙烯醇和聚氧乙烯脂肪酸酯。助剂包括,例如,表面活性剂,例如大豆卵磷脂和油酸;和脱水山梨糖醇酯,例如脱水山梨糖醇三油酸酯;和聚乙烯吡咯烷酮。

[0243] 在制备药物组合物之后,可以将它们放置在适当的容器中并贴上用于治疗标签。这种标签可以包括给药数量、频率和方法。

[0244] 适用于本发明的组合物、所述方法和用途的药物组合物和递送系统是本领域已知的(参见,例如,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),Technic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,Pa.;Ansel和Stoklosa,Pharmaceutical Calculations(2001) 11th ed.,Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,MD;和Poznansky等人,Drug Delivery Systems(1980),R.L.Juliano,ed.,Oxford,N.Y.,pp.253-315)。

[0245] “有效量”或“足够量”是指一定数量,其以单剂量或多剂量,单独或与一种或多种其他组合物(治疗或免疫抑制剂,例如药物)、治疗、试验方案或治疗方案药剂组合,在受试者中或向受试者提供任何持续时间(长期或短期)的可检测到的反应,提供任何可测量或可检测的程度或任何持续时间内(例如,分钟,小时,天,月,年或已治愈)预期或期望的结果或益处。

[0246] 剂量可以变化并且取决于治疗所针对的疾病的类型,发作,进展,严重程度,频率,持续时间或可能性,期望的临床终点,受试者的既往或同时治疗、总体健康、年龄、性别、种族或免疫能力以及本领域技术人员应理解的其他因素。剂量,数量,频率或持续时间可按比例增加或减少,如治疗或疗法的任何不良副作用、并发症或其他危险因素以及受试者的状况所指示。本领域技术人员将理解可提供足以提供治疗或预防益处的量所需的剂量和时间的因素。

[0247] 获得治疗效果的剂量,例如以载体基因组/千克体重(vg/kg)表示的剂量,将基于若干个因素而变化,这些因素包括但不限于:给药途径,达到治疗效果所需的异源多核苷酸表达的水平,治疗的特定疾病,对病毒载体的任何宿主免疫应答,对异源多核苷酸或表达产物(蛋白质)的宿主免疫应答以及表达的蛋白质的稳定性。本领域技术人员可以基于上述因

素以及其他因素来确定用于治疗患有特定疾病或病症的患者的rAAV/载体基因组剂量范围。

[0248] 通常,剂量将在至少 1×10^8 或更高的载体基因组/千克受试者体重(vg/kg)的范围内(例如 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 或 1×10^{14} 或更高的载体基因组/千克受试者体重(vg/kg)),以达到治疗效果。小鼠的AAV剂量在 1×10^{10} - 1×10^{11} 范围内有效,狗的AAV剂量在 1×10^{12} - 1×10^{13} 范围内有效。剂量可以更少,例如剂量为小于 6×10^{12} 个载体基因组/千克(vg/kg)。更特别地,剂量为 5×10^{11} vg/kg或 1×10^{12} vg/kg。

[0249] 以血友病B为例,通常来说,认为为了达到治疗效果,需要凝血因子浓度大于正常个体中发现的凝血因子浓度的1%,以改变重症的疾病表型为中度疾病表型。严重的表型以关节损伤和威胁生命的出血为特征。为了将中度疾病表型转化为轻度疾病表型,据信需要大于正常值的5%的凝血因子浓度。例如通过活化的部分凝血活酶时间(aPTT)一阶段凝血测定法确定的。

[0250] 正常人中的FVIII水平为约150-200ng/ml血浆,但可能更低(例如,约100-150ng/ml的范围)或更高(例如,约200-300ng/ml的范围)并且由于如例如通过活化的部分凝血活酶时间(aPTT)一阶段凝血测定法确定的功能性凝血而仍然被认为是正常的。因此,可以通过表达FVIII或hFVIII-BDD来实现治疗效果,使得受试者/人中FVIII的总量大于正常受试者/人中存在的FVIII的1%,例如100-300ng/ml中的1%。

[0251] rAAV载体的剂量可以处于一定水平,通常在剂量谱的较低端,从而没有针对FVIII或AAV载体的实质性免疫应答。更特别地,剂量高达但小于 6×10^{12} vg/kg,例如约 5×10^{11} 至约 5×10^{12} vg/kg,或更特别地,约 5×10^{11} vg/kg或约 1×10^{12} vg/kg。

[0252] 用于治疗(例如,改善或提供治疗益处或改进)的“有效量”或“足够量”的剂量通常有效地提供可测量程度的针对一种、多种或所有不良症状,疾病的后果或并发症,一种或多种例如由疾病引起或与之相关的不良症状、病症、疾病、病状或并发症的反应,虽然疾病的进展或恶化的降低、减少、抑制、制止、限制或控制是令人满意的结果。

[0253] 有效量或足够的量可以但不必在单次给药中提供,可以需要多次给药,并且可以但不必单独给药或与另一种组合物(例如药剂)、治疗、试验方案或治疗方案组合给药。例如,该量可以根据受试者的需要,所治疗疾病的类型,状态和严重性或治疗的副作用(如果有的话)所指示来按比例增加。另外,如果以单剂量或多剂量施用而没有第二种组合物(例如另一种药物或药剂)、治疗、试验方案或治疗方案,则有效量或足够的量不必有效或充足,因为可以包括大于或超过所述剂量的额外的剂量、数量或持续时间,或额外的组合物(例如,药物或药剂),治疗,试验方案或治疗方案,以便被认为在给定的受试者中有效或足够。认为有效的量还包括导致减少使用另一种治疗、治疗方案或试验方案(例如施用用于治疗凝血障碍(例如,血友病A)的重组凝血因子蛋白(例如,FVIII))的量。

[0254] 因此,本发明的方法和用途还包括其中导致减少对另一种化合物,药剂,药物,治疗方案,治疗试验方案,方法或疗法的需要或使用的的方法和用途。例如,对于血液凝固疾病,如果在给定的受试者中为补充该受试者中缺乏或有缺陷的(异常或突变的)内源性凝血因子而施用重组凝固因子蛋白的频率较少或剂量减少或消除施用,则本发明的方法或用途具有治疗益处。因此,根据本发明,提供了减少另一种治疗或疗法的需求或使用的的方法和用途。

[0255] 有效量或足够量不必对每个治疗的受试者有效,也不必对在给定的队列(cohort)或群体中大多数治疗的受试者有效。有效量或足够量是指在特定受试者而非群组或普遍群体中有效或充分。如此类方法的典型情况,一些受试者对给定的治疗方法或用途表现出更大的反应,或更少或没有反应。

[0256] 术语“改善”是指受试者的疾病或其症状或潜在的细胞反应的可检测或可测量的改善。可检测或可测量的改善包括主观或客观上减少,降低,抑制,制止,限制或控制疾病的发生,频率,严重程度,进展或持续时间,或由疾病引起或与之相关的并发症,或改善疾病的症状,根本病因或后果,或疾病的逆转。对于血友病A,有效量将是例如减少受试者中急性出血发作的频率或严重性的量,或例如减少通过例如凝血测定法测量的凝血时间的量。

[0257] 因此,本发明的药物组合物包括其中包含有效量的活性成分以实现预期的治疗目的的组合物。使用本发明提供的技术和指导,确定治疗有效剂量完全在熟练医师的能力范围内。

[0258] 治疗剂量将取决于,除其他因素外,受试者的年龄和一般状况,异常凝血表型的严重性以及调节FVIII表达水平的控制序列的强度。因此,对人类的治疗有效量将落入一个相对宽的范围,该范围可以由医师根据单个患者对基于载体的FVIII治疗的反应来确定。这样的剂量可以是单独的或与免疫抑制剂或药物组合。

[0259] 可以将诸如药物组合物的组合物递送至受试者,以允许产生因子VIII(FVIII)。在一具体的实施方案中,包含足以使接受者能够产生治疗有效量的FVIII多肽的遗传物质的药物组合物可以影响受试者的止血。

[0260] 所述组合物可以单独施用。在某些实施方案中,重组AAV颗粒在没有免疫抑制剂的情况下提供治疗效果。FVIII的治疗效果可选地持续一段时间,例如2-4、4-6、6-8、8-10、10-14、14-20、20-25、25-30或30-50天或更长时间,例如50-75天,75-100天,100-150天,150-200天或更长时间,而无需施用免疫抑制剂。因此,在某些实施方案中,CpG rAAV病毒颗粒提供治疗效果而无需在一段时间内施用免疫抑制剂。

[0261] 所述组合物可以与至少一种其他药剂组合施用。在某些实施方案中,在施用rAAV载体之前、实质上同时或之后,将rAAV载体与一种或多种免疫抑制剂联合施用。在某些实施方案中,在施用rAAV载体后例如1-12、12-24或24-48小时,或2-4、4-6、6-8、8-10、10-14、14-20、20-25、25-30、30-50或超过50天。如果rAAV载体之后,在初始表达水平一段时间(例如20-25、25-30、30-50、50-75、75-100、100-150、150-200或超过200天内)后FVIII降低,则在施用rAAV载体之后一段时间后,施用免疫抑制剂。

[0262] 在某些实施方案中,免疫抑制剂是抗炎剂。在某些实施方案中,免疫抑制剂是类固醇。在某些实施方案中,免疫抑制剂是环孢菌素(例如,环孢菌素A),霉酚酸酯,利妥昔单抗或其衍生物。其他特定试剂包括稳定化化合物。

[0263] 可以施用在任何无菌的、生物相容的药物载体中的组合物,所述载体包括但不限于生理盐水,缓冲盐水,右旋糖和水。所述组合物可以单独或与影响止血的其他药剂(例如,辅因子)组合施用至患者。

[0264] 在美国专利号5,998,205;6,228,646;6,093,699;6,100,242;以及国际专利申请号WO 94/17810和WO 94/23744中描述了用于产生腺病毒载体和向患者给药的设计方案,其全部内容通过引用并入本文。特别地,例如,使用AAV载体将由CpG减少的核酸变体编码的因

子VIII (FVIII) 递送至需要其的患者。

[0265] 本发明的方法和用途包括全身地、区域性地或局部地或通过任何途径,例如通过注射或输注,进行递送和给药。药物组合物在体内的递送通常可以通过使用常规注射器的注射来完成,尽管设想了其他递送方法,例如对流增强给药(参见例如美国专利号5,720,720)。例如,组合物可以通过皮下,表皮,皮内,鞘内,眶内,粘膜内,腹膜内,静脉内,胸膜内,动脉内,口服,肝内,经由门静脉内或肌内递送。其他给药方式包括口服和肺部给药,栓剂和透皮应用。专门治疗凝血功能障碍患者的临床医生可以根据许多标准(包括但不限于:患者的状况和治疗目的(例如,增强或减少血液凝固)),确定施用腺病毒相关载体的最佳途径。

[0266] 本发明的方法和用途可以与具有期望的治疗、益处、叠加、协同或互补活性或效果的任何化合物,药剂,药物,治疗或其他治疗方案或设计方案组合。示例性的组合的组合物和治疗包括第二活性物质,例如生物制剂(蛋白),药剂(例如免疫抑制剂)和药物。可以在与本发明的任何其他方法或用途(例如,治疗受试者的血液凝固性疾病例如Hem A的治疗方法)之前,基本上同时或之后,施用或进行此类生物制剂(蛋白),药剂,药物,治疗和疗法。

[0267] 化合物,药剂,药物,治疗或其他治疗方案或设计方案可作为组合组合物施用,或分开施用,例如与核酸、载体、重组载体(例如rAAV)或重组病毒颗粒的递送或施用同时或连续地或顺序地(之前或之后)施用。因此,本发明提供了组合,其中本发明的方法或用途与本文所述或本领域技术人员已知的任何化合物,药剂,药物,治疗方案,治疗设计方案,方法,补救或组合物联合使用。所述化合物,药剂,药物,治疗方案,治疗设计方案,方法,补救或组合物可以在本发明的核酸、载体、重组载体(例如rAAV)或重组病毒颗粒施用至患者之前、基本上同时或之后施用或进行。

[0268] 本发明可用于包括人和兽医医学应用的动物。因此,合适的受试者包括哺乳动物,例如人类,以及非人类哺乳动物。术语“受试者”是指动物,通常是哺乳动物,例如人,非人灵长类动物(猿,长臂猿,大猩猩(gorilla),黑猩猩(chimpanzee),猩猩(orangutan),猕猴),家畜(狗和猫),农场动物(家禽,例如鸡和鸭,马,牛,山羊,绵羊,猪)和实验动物(小鼠,大鼠,兔子,豚鼠)。人类受试者包括胎儿,新生儿,婴儿,少年和成人受试者。受试者包括动物疾病模型,例如小鼠和血液凝固疾病(例如HemA和本领域技术人员已知的其他疾病)的其他动物模型。

[0269] 适用于根据本发明的治疗的受试者包括具有或处于产生不足量的或具有不足的功能基因产物(例如FVIII蛋白)的风险,或产生可能导致疾病的异常的、部分功能或非功能的基因产物(例如FVIII蛋白)的那些受试者。适用于根据本发明的治疗的受试者还包括那些具有或处于产生导致疾病的异常或缺陷(突变)基因产物(蛋白)的风险的受试者,使得降低该异常或缺陷(突变)基因产物(蛋白)的数量、表达或功能将导致疾病的治疗,或减轻一种或多种症状或改善疾病。因此,目标受试者包括凝血因子产生异常、不足或缺乏的受试者,例如血友病患者(例如,血友病A)。

[0270] 可以测试受试者的免疫应答,例如抗AAV的抗体。因此,根据本发明的方法治疗之前,可以筛选候选血友病受试者。在治疗后还可以测试受试者的抗AAV抗体,并任选在治疗后监测一段时间。产生抗体的受试者可以用免疫抑制剂治疗,或者可以施用一种或多种额外量的AAV载体。

[0271] 适用于根据本发明的治疗的受试者还包括具有或处于产生抗AAV抗体的风险的那

些受试者。可以使用若干种技术将rAAV载体施用或递送给此类受试者。例如,空衣壳AAV(即,缺乏FVIII核酸的AAV)可以被递送以与受试者中的AAV抗体结合,从而允许带有编码FVIII和FVIII-BDD的核酸或核酸变体的AAV载体转化该受试者的细胞。

[0272] 空衣壳与rAAV载体的比例可以在约2:1至约50:1之间,或在约2:1至约25:1之间,或在约2:1至约20:1之间,或约在2:1至约15:1之间,或在约2:1至约10:1之间。比例也可以是大约2:1,3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,8:1,9:1或10:1。

[0273] 可以基于在特定受试者中产生的AAV抗体的量(滴度)来校准要施用的空衣壳AAV的量。空衣壳可以是任何AAV血清型,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74或AAV-2i8。

[0274] 作为替代或补充,可以通过直接肌肉注射(例如,一条或多条肌肉的慢肌纤维)递送AAV载体。在另一替代方案中,引入股动脉的导管可用于将AAV载体经由肝动脉递送至肝脏。还可以采用非手术方式,例如内窥镜逆行胰胆管造影术(ERCP),将AAV载体直接递送至肝脏,从而绕过血液和AAV抗体。其他导管系统,例如下颌下腺的导管,也可用作将AAV载体递送至已发展或具有预先存在的抗AAV抗体的受试者的门(portal)。

[0275] 可以在由疾病引起或与疾病相关的不良症状,病状,并发症等发生之前进行给药或体内递送至受试者。例如,可以使用筛选(例如遗传)来将这样的受试者识别为本发明组合、方法和用途的候选者。因此,这样的受试者包括针对功能基因产物(例如,FVIII蛋白)数量不足或缺乏呈阳性而筛选的那些受试者,或产生异常、部分功能或非功能基因产物(例如,FVIII蛋白)的受试者。

[0276] 可以在受试者已被鉴定为患有治疗目标疾病,或具有该疾病的一种或多种症状,或即使该受试者不具有一种或多种疾病症状但如本文所述已经被筛选并鉴定为阳性之后1-2、2-4、4-12、12-24或24-72小时内实施根据本文公开的本发明的所述方法和用途的向受试者的施用或体内递送。当然,可以在受试者已被鉴定为患有治疗目标疾病、或具有该疾病的一种或多种症状、或如本文所述已经被筛选并鉴定为阳性之后1-7、7-14、14-21、21-48或更多天,数月或数年实施本发明的方法和用途。

[0277] 如本文所用,“单元型制剂”(unit dosage form)是指适于作为用于待治疗受试者的单位剂量的物理上独立(discrete)的单元;每个单元含有任选地与药物载体(赋形剂,稀释剂,溶媒或填充剂)相关的预定数量,其在以一或多个剂量施用,被计算为产生预期的效果(例如预防或治疗效果)。单元型制剂可以在例如安瓿(ampule)和小瓶内,其可以包括液体组合物,或处于冷冻干燥或冻干状态的组合物;无菌液体载体,例如,可以在体内给药或递送之前添加。个体单元型制剂可包含在多剂量试剂盒(kit)或容器中。重组载体(例如,rAAV)序列,重组病毒颗粒及其药物组合物可以包装为单一单元型制剂或多单元型制剂,以易于施用和给药剂量一致。

[0278] 可以测试受试者的FVIII和FVIII-BDD数量或FVIII和FVIII-BDD活性,以确定此类受试者是否适合根据本发明的方法进行治疗。可以在根据本发明的方法进行治疗之前测试候选血友病受试者的FVIII和FVIII-BDD数量或活性。在根据本发明的方法进行治疗之后还可以测试受试者的FVIII和FVIII-BDD的数量或FVIII和FVIII-BDD活性。在治疗之后,可以定期(例如每1-4周或每1-6个月)监测所述治疗的受试者的FVIII和FVIII-BDD的数量或FVIII和FVIII-BDD的活性。

[0279] 可以测试受试者的一种或多种肝酶的不良反应或确定这些受试者是否适合根据本发明的方法进行治疗。因此,在根据本发明的方法进行治疗之前,可以对候选血友病受试者筛选一种或多种肝酶的量。根据本发明的方法进行治疗之后还可以测试受试者的一种或多种肝酶的量。可以在治疗之后,定期(例如每1-4周或每1-6个月)监测此类治疗的受试者的肝酶升高。

[0280] 示例性的肝酶包括丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH),但是也可以监测指示肝损害的其他酶。这些酶在循环中的正常水平通常被定义为具有较高水平的范围,高于该水平则认为该酶水平升高,因此表明肝损害。正常范围部分取决于进行检测的临床实验室使用的标准。

[0281] 可以监测受试者的出血发作,以确定此类受试者是否适合治疗或对治疗有反应,和/或反应的量或持续时间。可以监测受试者的出血发作以确定这些受试者是否需要额外的治疗,例如随后的AAV载体施用或免疫抑制剂的施用,或更频繁的监测。因此,可以在根据本发明的方法进行治疗之前和之后监测血友病受试者的出血发作。还可以在根据本发明的方法进行治疗期间或之后测试受试者的出血发作的频率和严重性。

[0282] 本发明提供其中具有包装材料和一种或多种组分的试剂盒。试剂盒通常包括标签或包装插页,该标签或包装插页包括组分的描述或其中的组分在体外、体内或离体使用的说明。试剂盒可包含此类组分(例如核酸,重组载体,病毒(例如,AAV)载体或病毒颗粒)以及任意的第二活性物质(例如另一种化合物,试剂,药物或组合物)的集合。

[0283] 试剂盒是指容纳试剂盒的一个或多个组分的物理结构。包装材料可以无菌地保持组分,并且可以由通常用于这种目的的材料(例如,纸,波纹纤维,玻璃,塑料,箔,安瓿,小瓶,管等)制成。

[0284] 标签或插页可包括其中一种或多种组分的识别信息,剂量,有效成分的临床药理,包括作用机理,药代动力学和药效学。标签或插页可以包含标识制造商,批号,制造地点和日期,有效期的信息。标签或插页可包含标识制造商信息,批号,制造商地址和日期的信息。标签或插页可包含有关可能使用试剂盒组分的疾病的信息。标签或插页可包括针对临床医生或受试者在方法、用途或治疗设计方案或治疗方案中使用一种或多种试剂盒组分的说明。所述说明可以包括剂量,频率或持续时间,以及用于实施本文所述的任何方法,用途,治疗设计方案或预防或治疗方案的说明书。

[0285] 标签或插页可包括关于组分可提供的任何益处(例如预防或治疗益处)的信息。标签或插页可以包括有关潜在的不良反应,并发症或反应的信息,例如关于不适用于特定组合物的情况而对受试者或临床医生的警告信息。当受试者已经、将要或正在服用一种或多种可能与所述组合物不相容的其他药物时,或者当受试者已经、将要或正在接受另一种可能与所述组合物不相容的治疗设计方案或治疗方案时,也可能发生不良的副作用或并发症,因此,所述说明中可包含有关此类不相容的信息。

[0286] 标签或插页包括“印刷品”,例如纸或纸板,或单独或附着于组分、试剂盒或包装材料(例如盒子),或附于包含试剂盒组分的安瓿、试管或小瓶。标签或插页可以额外包括计算机可读介质,例如条形码打印的标签,磁盘,光盘(例如CD-或DVD-ROM/RAM,DVD,MP3,磁带)或电子存储介质,例如RAM和ROM或它们的混合体,例如磁/光存储介质,FLASH介质或存储类型卡。

[0287] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实施或测试中,但是本文描述了合适的方法和材料。

[0288] 本文引用的所有专利,专利申请,出版物和其他参考文献,GenBank引用和ATCC引用均通过引用整体并入本文。如有冲突,以规范(包括定义)为准。

[0289] 上文以及整个说明书和权利要求书中使用了与本发明的生物分子有关的各种术语。

[0290] 本文公开的所有特征可以以任何组合进行组合。说明书中公开的每个特征可以由具有相同、等同或相似目的的替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则公开的特征(例如,编码FVIII的CpG减少的核酸变体,载体,质粒,表达/重组载体(例如,rAAV)序列或重组病毒颗粒)是等同或相似特征的一个类别的实例。

[0291] 如本文使用的,单数形式的“一”,“和”和“该”包括复数对象,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一个核酸”包括多个这样的核酸,提及“一个载体”包括多个这样的载体,并且提及“一种病毒”或“颗粒”包括多种这样的病毒/颗粒。

[0292] 如本文所使用的,除非上下文另外明确指出,否则所有数值或数值范围均包括该范围内的整数以及该范围内该数值或整数的分数。因此,举例来说,提及80%或更高的同一性,包括81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%等,以及81.1%,81.2%,81.3%,81.4%,81.5%等,82.1%,82.2%,82.3%,82.4%,82.5%等,依此类推。

[0293] 提及大于(大于)或小于整数时分别包括大于或小于该参考数字的任何数字。因此,例如,提及小于100时包括99、98、97等,一直到数字1(1);并且提及小于10时包括9、8、7等,一直到数字1(1)。

[0294] 如本文所使用的,除非上下文另外明确指出,否则所有数值或范围均包括在该范围内的数值和整数的分数以及在该范围内的整数的分数。因此,举例来说,提及的数值范围(例如1-10)包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等等,依此类推。因此,提及1-50的范围时包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等,最多不超过50,以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等,2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等,依此类推。

[0295] 提及一系列范围时包括组合该系列内不同范围的边界的值的范围。因此,对一系列范围的提及示例是,例如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、750-850,包括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等。

[0296] 本文一般使用肯定性语言来公开本发明,以描述众多实施例和方面。本发明还具体包括其中全部或部分地排除特定主题的实施方案,特定主题例如物质或材料,方法步骤和条件,设计方案或程序。例如,在本发明的某些实施方案或方面中,排除了材料和/或方法步骤。因此,即使本发明在本文中通常并未就本发明不包括的内容进行表述,但是本文中公开了未在本发明中明确排除的方面。

[0297] 已经描述了本发明的多个实施方案。然而,在不脱离本发明的精神和范围的情况

下,本领域技术人员可以对本发明进行各种改变和修饰以使其适应各种用途和条件。因此,以下实施例旨在说明而非以任何方式限制本发明的范围。

[0298] 实施例1

[0299] CpG减少的因子VIII DNA序列和某些载体构建体,质粒构建体和AAV载体产生细胞系。

[0300] 产生了18种不同的编码FVIII的CpG减少的核酸变体(SEQ ID NO:1-18),并在表达测定中进行了评估。用突变运甲状腺素蛋白(TTRmut)启动子(SEQ ID NO:22)产生CpG减少的人FVIII cDNA构建体。

[0301] AAV-SPK-8011表达盒具有CpG减少的FVIII-X07核酸序列和用于包装的LK03衣壳。LK03衣壳与AAV3(一种非致病性,天然复制缺陷的单链DNA病毒)具有实质同源性。

[0302] 包装质粒pLK03是7,484bp的质粒构建体,其携带受到AAV2p5启动子、细菌复制起点和赋予细菌细胞对卡那霉素抗性的基因的控制的AAV2Rep和AAV-LK03Cap基因。在该构建体中,p5rep启动子已移至cap基因的3'末端,以减少形成野生型或假野生型AAV物种的可能性,并提高载体的产量。

[0303] 用于基因转移的克隆的DNA是基因表达盒,其包装到AAV-LK03衣壳中作为单链基因组,在肝特异性启动子的控制下编码人凝血因子VIII(hFVIII)。该表达质粒称为pAAV-TTRmut-hFVIII-X07。通过在TTR启动子中引入4点突变来对其进行修饰,并优化编码区以增加人FVIII的表达。AAV表达盒包含以下元素:

- AAV2ITR
- 运甲状腺素蛋白(TTR)启动子:一种具有肝脏特异性的运甲状腺素蛋白(TTR)启动子,具有4点突变,与野生型启动子相比,可增加基因表达(Costa等人,1991)
- 合成内含子:源自人类延伸因子EF-1 α 基因
- FVIII编码序列:B结构域缺失,密码子优化的人FVIII编码序列。
- 兔 β 球蛋白多聚腺苷酸信号序列(Levitt等人,1989)。
- AAV2ITR

[0304] 三种DNA质粒构建体用于通过无辅助病毒的过程转染人胚胎肾293细胞以产生SPK-8011载体(Matsushita等人,1998):

- 将基因盒(hFVIII编码序列和相关调节元件)克隆到质粒中,得到载体质粒pAAV-TTRmut-hFVIII-X07。

- 将缺少病毒ITR的AAV病毒基因组(rep和cap)克隆到质粒中,得到AAV包装质粒pLK03,提供用于AAV2包装的反式的所需的AAV2 rep和AAV-LK03cap基因。将rep基因的病毒启动子(p5)重新定位在质粒中,以防止通过非同源重组形成具有复制能力的AAV。

- 将来自腺病毒2的三个基因克隆到第三质粒(pCCVC-AD2HP)中,提供了产生载体所需的辅助病毒基因。质粒pCCVC-AD2HPv2是一个11,832bp的质粒构建体,带有3个腺病毒基因E2A,E4和VA RNA,以提供AAV载体复制和衣壳化所需的“辅助”功能。质粒pCCVC-AD2HPv2是pCCVC-AD2HP的衍生物,其中包含Amp^R基因和部分pUC ori序列的DrdI-DrdI 1882bp限制性片段已被去除,并替换为包含整个Kan^R基因和pUC ori序列的一部分的来自质粒pAAV2-hRPE65v2的DrdI-DrdI片段。

[0305] 用于生产AAV载体的细胞底物是原代人胚胎肾细胞(HEK)293的衍生物。HEK293细

胞系是经剪切的5型人腺病毒 (Ad5) DNA转化的永久细胞系 (Graham等人,1977年)。工作细胞库来自费城儿童医院 (CHOP) 细胞与分子治疗中心 (CCMT) 的特征性HEK293主细胞库。

[0306] 实施例2

[0307] 在非人灵长类动物 (NHP) 中评估AAV-SPK-8005和AAV-SPK-8011 (LK03衣壳, FVIII-X07 (SEQ ID NO:7)) 载体。

[0308] 包装到腺相关病毒 (AAV) 载体中的FVIII转基因构建体被递送至非人灵长类动物 (NHP)。进行了试点研究 (Pilot study) 和GLP研究。

[0309] 简而言之,在单次静脉内输注AAV-SPK-8005或AAV-SPK-8011 (LK03衣壳) 的雄性食蟹猴中进行了剂量范围研究。在8周内评估hFVIII的表达。每个载体的动物组和剂量水平 (试点研究) 如图1所示。

[0310] NHP在大约30分钟内使用校准的输液泵经由隐静脉接受静脉输液。针对抗AAV衣壳的中和抗体预先筛选猕猴。最初确定所有治疗的动物在施用载体之前具有<1:3的滴度。这样做是为了确保成功地进行肝转导,因为即使滴度很低也可以抑制全身递送后肝细胞摄取的载体 (Jiang等人,2006)。在基因转移之前,对于抗FVIII的中和抗体的存在所有动物也均为阴性。

[0311] 通过不检测猕猴内源性FVIII的人特异性ELISA来测定hFVIII的血浆水平。除中间剂量组中的一只猕猴外,研究中的所有动物均在载体递送后表达hFVIII。施用载体后人因子VIII抗原水平在1-2周左右达到峰值。基因转移后第一周,用 2×10^{12} vg/kg AAV-SPK-8005转导的NHP表达的hFVIII抗原水平为 $13.2 \pm 3\%$ (平均值 \pm 平均值的标准误差)。基因转移后第一周,在下一个治疗队列 (cohort) (5×10^{12} vg/kg) 中,三只动物中有两只的平均hFVIII水平为 $27 \pm 0.2\%$ 。在任何时间点,该队列的第三只猕猴均未检测到人类FVIII。重新测试基线血浆样品后,确定该动物实际上对抗AAV抗体呈阳性,最初确定的<1:3滴度不正确。最后,在最高测试剂量为 1×10^{13} vg/kg时,AAV输注后观察到hFVIII抗原水平峰值为 $54.1 \pm 15.6\%$ 。

[0312] 在第4周左右,约三分之一的动物中人FVIII表达下降,同时在这3只猕猴中出现了针对hFVIII的抑制剂抗体 (在图2中用 ϵ 符号标记)。先前已经在非人灵长类动物中报道了针对hFVIII的物种特异性抗体的开发,这很可能是由于人类转基因产物与内源性食蟹猴FVIII之间的几个氨基酸残基的差异所导致 (McIntosh, J. 等人, Blood 121:3335-44 (2013))。

[0313] 为了评估由于人FVIII的持续表达引起的潜在血栓形成,在这项研究中测定了D-二聚体抗原水平。应当指出,关于食蟹猴的D-二聚体抗原水平的临床相关性或甚至其正常值的报道很少;作为参考,人类D-二聚体的正常范围低于500ng/ml。由于动物表达内源性食蟹猴FVIII,由于肝基因转移而产生hFVIII将导致FVIII活性超生理水平。

[0314] 在AAV输注后两周,剂量为 5×10^{12} vg/kg但不表达人FVIII的动物的峰值为863ng/ml。与基线值相比,其余动物没有显示D-二聚体抗原水平的任何显著增加。综上所述,这些结果表明,以该研究目标水平表达的人FVIII与血栓形成的风险增加无关。

[0315] 载体施用后四周,没有明显的与载体相关的变化。肝功能测试显示正常值,伴随有似乎与载体剂量无关的轻微波动,因为在大多数情况下它们出现在给药前 (图3)。

[0316] 直到第5周的D-二聚体水平显示在图4中。当循环人FVIII达到约100%的峰值时,

高剂量队列中的一只动物在施用载体后一周,其D-二聚体水平有轻微的短暂升高(577ng/ml);在该单次升高测量后,D-二聚体水平迅速恢复正常。值得注意的是,D-二聚体水平与hFVIII抗原水平之间没有相关性(图4,下图)。

[0317] 在试点研究中,对于AAV-SPK-8011(LK03衣壳)载体,使用增加剂量的AAV-SPK-8011(LK03衣壳)(2×10^{12} , 6×10^{12} 和 2×10^{13} (vg/kg)治疗了三个食蟹猕猴队列($n=3$);图1)。在GLP研究中,使用了 3×10^{12} 、 6×10^{12} 和 2×10^{13} vg/kg的剂量(AAV-SPK-8011(LK03衣壳))的载体。

[0318] 在每个研究中总共使用了11个NHP。试点研究的观察期为10周,没有免疫抑制。随后是12周的免疫抑制阶段,将其合并入以根除在研究的最初10周内产生的抗hFVIII抗体。随后,再跟踪动物20周。

[0319] 监测动物的临床观察,体重,临床病理(临床化学,血液学,凝血,尿液分析)。此外,在整个研究过程中评估了hFVIII抗原水平,FVIII抑制性抗体和D-二聚体水平。

[0320] hFVIII抗原试点研究数据如图6所示。平均hFVIII抗原水平在2-3周左右达到峰值,使用150ng/ml作为100%正常hFVIII抗原水平,分别在低剂量队列中观察到 $22.3 \pm 6.2\%$ hFVIII,在中等剂量队列和高剂量队列中观察到 $61.6 \pm 15.7\%$ 和 $153 \pm 58.1\%$ (图6A-6D)。

[0321] 在GLP毒理学研究中,通过外周静脉输注SPK-8011进行的肝基因转移也导致了hFVIII在所有动物中表达。在 3×10^{12} vg/kg的低剂量下,hFVIII抗原水平介于正常水平的5-40%之间,AAV给药后第2周左右的平均峰值水平为 $20.3 \pm 11\%$ (平均 \pm SEM)。在 6×10^{12} vg/kg队列中,平均hFVIII抗原水平为正常值的 $40.7 \pm 4\%$ 。

[0322] 因此,与小鼠肝脏不同,LK03AAV衣壳血清型在体内有效转导NHP肝细胞。尽管在基因转移后不久就观察到了治疗性hFVIII的水平,但大多数动物的水平在第4周左右开始下降。

[0323] 在施用AAV-SPK-8011(LK03衣壳)后,测定食蟹猕猴血浆中对hFVIII的体液应答。在基线和指示的时间点通过ELISA评估动物的抗hFVIII IgG抗体。

[0324] 在试点研究和GLP研究中,大多数经载体治疗的动物均产生了抗FVIII中和抗体,这是基于临床前食蟹猕猴研究以及其他报告的预期结果(McIntosh,J.等人,Blood 121:3335-44(2013))。抗人FVIII蛋白的中和抗体通常会在AAV输注猕猴后三周开始出现,因此无法检测到循环中的hFVIII抗原。结果,大约2-3周(即在出现针对hFVIII的抑制性抗体之前)的hFVIII抗原峰值可用于估计人受试者中足够的起始载体剂量。SPK-8011在试点研究和GLP NHP研究中的剂量反应曲线如图7所示。

[0325] 将AAV-SPK-8011(LK03衣壳)达到的FVIII表达水平与已报道的用于递送FVIII的基于AAV5衣壳和基于AAV8衣壳的AAV载体达到的FVIII表达水平进行比较。对比显示,用AAV-SPK-8011(LK03衣壳)获得的FVIII水平高于已报道的通过具有AAV5衣壳和AAV8衣壳的AAV载体递送的FVIII水平(图8)。

[0326] 实施例3

[0327] AAV-LK03衣壳在非人灵长类动物(NHP)中的生物分布。

[0328] 在非GLP研究中评估了AAV-LK03衣壳在非人灵长类动物中的生物分布。静脉内注射编码人凝血因子IX的AAV-LK03衣壳化载体(AAV-LK03-hFIX)显示,两个主要靶组织是肝

脏和脾脏(图9)。脾趋向性不是AAV-LK03的独特特征。例如,已被用于多项肝定向基因治疗试验(例如NCT02396342,NCT02082860,NCT02576795)的AAV5衣壳,具有很强的安全记录,其靶向脾脏的功效与靶向非人灵长类动物肝脏的功效相同或更高(Paneda等人,2013)。SPK-8011表达盒使用被认为是肝特异性的小鼠运甲状腺素蛋白或TTR启动子(Costa,1991)。为了进一步支持启动子的肝脏特异性,基于PCR的表达分析测定了在施用包装与SPK-8011相同表达盒的不同AAV载体(即AAV-SPK-8005)后小鼠肝脏和脾脏中源自载体的FVIII表达。如图10所示,人FVIII在脾脏中的表达与源自肝细胞的表达相比要低几个数量级。

[0329] 这是第一项使用AAV-LK03的临床研究,尽管已经使用其他AAV载体进行了研究,其他AAV载体包括若干种针对血友病B的载体(NCT02396342,NCT01620801,NCT00076557,NCT02484092,NCT02618915,NCT00979238,NCT01687608)和一种针对血友病A的载体(NCT02576795)。圣裘德儿童研究医院与伦敦大学学院合作进行的一项研究使用了AAV8载体,该载体带有自身互补基因组,该基因组编码密码子优化的人因子IX cDNA,scAAV2/8-LP1-hFIXco。接受该载体的十名受试者在中位数3.2年内,其因子IX水平稳定在1-6%,所有参与者都已终止或减少了预防性因子替代的使用(Nathwani等人,2014)。血友病A的临床研究使用了编码人FVIII的AAV5衣壳化载体(NCT02576795)。2016年提供的初步数据表明,基因转移后FVIII活性在多个受试者中升高了,范围在2-60%之间,随访时间长达16周(BioMarin,2016年4月)。

[0330] 实施例4

[0331] 在体外环境中分析了AAV-LK03衣壳的转导效率。

[0332] 以范围是500至62,500个载体基因组/个细胞的四种不同的感染复数(MOI),用表达荧光素酶的AAV-LK03载体转导来自食蟹猕猴和人类来源的原代肝细胞。转导后72小时,分析荧光素酶表达。

[0333] AAV-LK03衣壳独特地展示了在培养中转导人肝细胞的显著更高的效率。在图11显示的代表性实例中,与非人灵长类肝细胞相比,LK03在体外转导人肝细胞方面显示出高约5倍的效率。重要的是,这些结果在多个MOI和重复研究中都是一致的。

[0334] 实施例5

[0335] 人临床试验剂量计算

[0336] 基于在非人灵长类动物(NHP)中观察到的hFVIII水平,确定了在人中的 5×10^{11} vg/kg的建议起始剂量下预期的FVIII水平的估计。由于不同的载体批次可能具有略微不同的肝转导功效,因此在施用 5×10^{11} vg/kg后,来自所述试点和GLP毒理学NHP研究的数据均用于内插(interpolate)一系列FVIII浓度。对于该分析,使用线性回归模型(图12),即未发现AAV剂量与所得hFVIII表达水平之间的关系明显偏离线性(表2)。

表2

	试点 (Pilot)	GLP
最佳拟合数值 (Best-fit values)		
斜率	6.099e-012 ± 7.962e-013	5.170e-012 ± 6.421e-013
Y 轴截距, 在 X=0.0 时	0	0
X 轴截距, 在 Y=0.0 时	0	0
1/斜率	1.64E+11	1.934E+11
95% 置信区间		
斜率	4.346e-012 至 7.851e-012	3.756e-012 至 6.583e-012
拟合度		
Sy.x	28.93	15.29
斜率是否显著非零?		
t	7.66	8.051
DF	11	11
P 值	< 0.0001	< 0.0001
零偏差 (Deviation from zero?)	显著	显著
数据		
X 值数量	4	4
Y 重复的最大数量	3	3
数值的总数量	12	12
缺失数值的数量	3	3
运行测试		
线以上点	2	2
线以下点	1	1
运行次数	2	2
P 数值 (运行测试)	0.6667	0.6667
线性偏差	无显著性	无显著性
方程式	Y=6.099e-012*X - 0.0	Y=5.170e-012*X - 0.0

[0337] 使用上述线性回归模型,估计以 5×10^{11} vg/kg的剂量注入SPK-8011时的平均FVIII水平约为正常值的2.6%至3.0%。但是,当使用表2中的方程式反向计算(back calculate) 2×10^{12} vg/kg、 3×10^{12} vg/kg和 6×10^{12} vg的预期FVIII表达值时,此线性回归曲线似乎低估了在低剂量和中等剂量动物中观察到的实际值(表3)。

表3

剂量	试点			剂量	GLP		
	FVIII (内插的)	FVIII (实际的)	内插对比实际 (%)		FVIII (内插的)	FVIII (实际的)	内插对比实际(%)
2E+12	12.2	22.3	54.8	3E+12	15.5	20.3	76.4
6E+12	36.6	61.6	59.4	6E+12	31.0	40.7	76.2
2E+13	122.0	113.5	107.5	1.2E+13	62.0	56.0	110.8

[0338] 随着AAV载体载量的增加,hFVIII表达可能在某些载体剂量下遵循线性剂量响应,同时达到饱和。从先前的分析中删除了高剂量队列,重新计算了线性回归曲线,并重新评估了在确定的SPK-8011剂量为 5×10^{11} vg/kg的情况下预测的hFVIII表达水平(表4和图13)。

表4

	试点	GLP
最佳拟合数值		
斜率	6.099e-012 ± 7.962e-013	5.170e-012 ± 6.421e-013
Y 轴截距, 在 X=0.0 时	0	0
X 轴截距, 在 Y=0.0 时	0	0
1/斜率	1.64E+11	1.934E+11
95%置信区间		
斜率	4.346e-012 至 7.851e-012	3.756e-012 至 6.583e-012
拟合度		
Sy.x	28.93	15.29
斜率是否显著非零?		
t	7.66	8.051
DF	11	11
P 值	< 0.0001	< 0.0001
零偏差?	显著	显著
数据		
X 值数量	4	4
Y 重复的最大数量	3	3
数值的总数量	12	12
缺失数值的数量	12	12
运行测试		
线以上点	2	2
线以下点	1	1
运行次数	2	2
P 数值 (运行测试)	0.6667	0.6667
线性偏差	无显著性	无显著性
方程式	Y=6.099e-012*X - 0.0	Y=5.170e-012*X - 0.0

[0339] 利用图13中所示的线性回归曲线,当以 5×10^{11} vg/kg的剂量注入SPK-8011时,平均FVIII水平估计约为正常值的3.4%至5.2%。

[0340] 实施例6

[0341] 人临床试验设计

[0342] 资格

- 符合研究条件的年龄:18岁以上(成人,老人)
- 符合研究条件的性别:男性
- 接受健康志愿者:否

[0343] 标准:纳入标准:

- 18岁或以上的男性
- 血友病A的病史证实其血友病A的确诊,血浆FVIII活性水平小于或等于正常水平的2%
- 已接受超过150天的FVIII浓缩物或冷沉淀物暴露(ED)

- 仅在接受按需治疗且FVIII基线水平为正常水平的1-2%时,在过去12个月中经历了>10次出血事件
- 对任何FVIII产品均无过敏反应史
- 没有中央实验室评估的可测量的抗因子VIII抑制剂,也没有FVIII蛋白抑制剂的既往史
- 同意使用可靠的屏障避孕

[0344] 标准:排除标准:

- 活动性乙型肝炎或丙型肝炎的证据
- 目前正在针对乙肝或丙肝进行抗病毒治疗
- 有明显的潜在肝病
- 具有CD4计数 $\leq 200/\text{mm}^3$ 的HIV-1或HIV-2的血清学证据* (*HIV+且CD4计数 $> 200/\text{mm}^3$ 稳定且病毒载量无法检测的参与者有资格参加)
- 具有可与AAV-Spark200衣壳反应的可检测抗体
- 在过去52周内参加了基因转移试验,或在过去12周内参加了使用研究产品的临床试验

[0345] 实施例7

[0346] 不同剂量AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII的FVIII预测水平

[0347] 临床研究NCT03003533 (“针对血友病A的基因转移研究”)是被称为LK03 (SEQ ID NO:27)的AAV衣壳在人类中的首次使用。在非人灵长类动物中的研究表明,增加AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII的剂量会导致剂量依赖性的循环人类FVIII的水平增加,至少在某些剂量范围内,这种变化似乎并不明显偏离线性。第一队列的平均稳态FVIII水平(\pm 平均值的标准误)约为正常值的 $11.7 \pm 2.3\%$ 。给定此剂量队列中两名参与者中的n名,很难预测随着更多的参与者纳入此研究中,所观察到的FVIII水平的相对较低的变异性是否将得以维持。

[0348] 使用rAAV载体介导肝脏中凝血因子表达的最新经验,使用研究产品rAAV-FIX治疗B型血友病(NCT02484092),可能是评估较大受试者队列变异性的有用参考。输注rAAV-FIX载体后12周达到稳态FIX表达,导致平均FIX活性(FIX:C)约为33%。重要的是,FIX:C的最高水平约为79%(受试者9),最低水平为约14%(受试者7)。值得注意的是,对受试者7中载体效力的解释被针对rAAV-FIX载体衣壳的免疫应答的出现所混淆,这导致在短疗程的类固醇启动之前FIX表达的部分丧失。然而,没有检测到细胞免疫应答的受试者6的稳态水平约为18%。因此,研究NCT02484092中FIX:C的最高和最低水平之间的差异约为4倍。治疗血友病A的其他AAV临床试验显示显著更高的变异性。Pasi, 等人. (2017) *Thromb Haemost.* 117 (3) : 508-518。表5显示了假定线性剂量反应的不同AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII剂量下的预测平均FVIII水平。在血友病B研究中观察到的变异性被用作保守的方法来评估血友病A试验中的变异性。

表5

剂量 (vg/kg)	预估的最低 表达者 (expresser)	预估的平 均值*	预估的最 高表达者
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

*在 5×10^{11} vg/kg队列中观察到的实际平均值。

[0349] 实施例8

[0350] 人临床试验结果

[0351] 在12名患有严重 (N=11) 或中度严重 (N=1) 血友病A的男性中进行了剂量递增研究。受试者的年龄范围为18-52。在基因治疗之前,对12名受试者中的8名进行了预防性治疗,对12名受试者中的4名进行了情节性治疗 (episodic treatment)。将受试者纳入三个给药队列之一,并以 5×10^{11} vg/kg (N=2, 受试者1和2), 1×10^{12} vg/kg (N=3, 受试者3、4和6) 或 2×10^{12} vg/kg (N=7, 受试者5和7-12) 的剂量注入SPK-8011 (AAV-hFVIII, LK03衣壳)。

[0352] 图14-28显示了施用三种不同剂量的AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII的12名人类受试者的剂量反应研究数据。在受试者中确定的FVIII活性值相对于正常血浆中的100% FVIII。通常,从大量 (例如50或100) 正常志愿者那里收集血浆,并将这种“正常合并血浆”中的FVIII活性定义为100%。将该血浆的稀释液用于绘制FVIII活性对比用于测定FIX水平的任何测定法的标准曲线。然后,使用相同的测定法,将该标准曲线用于定义患者样品中FVIII的含量或百分比 (%)。

[0353] 所有载体剂量均导致足以防止出血并停止预防的FVIII水平表达。在12名受试者中,使用3种剂量后,年出血率 (ABR) 降低了97%,年输注率降低了97%。数据表明总体动力学显示出逐渐上升至FVIII的持续稳定期。

[0354] 在第一个剂量队列中,在66周和51周时,FVIII水平分别为14%和15%,没有出血事件,转氨酶水平没有升高,也没有使用类固醇。在观察期间,FVIII表达保持稳定。来自该低剂量队列的数据表明,即使适度FVIII水平在15%的范围内,也可能足以在长达66周的随访期内预防出血。

[0355] 在第二剂量队列中,输注后33、46和31周的FVIII水平分别为9%,26%和17%。此剂量队列中的第一位受试者 (受试者3) 在第159天输注了单剂量因子浓缩液用于自发性关节出血,此剂量队列中的第二位受试者 (受试者4) 在第195天开始接受了多次输注用于创伤性出血。受试者均接受了逐渐减量的类固醇疗程,该疗程是在载体输注后第12周和第7周开始的,这是由FVIII水平下降引起的,从而导致FVIII水平稳定。该剂量队列中的第三位受试者 (受试者6) 没有出血,也没有接受因子输注,也没有施用给定的类固醇激素。

[0356] 在第三个剂量队列中 (N=7), 目前七名受试者中有五名的FVIII水平 $\geq 12\%$, 范围为16-49%; 对于这些受试者,载体输注后12周开始的平均FVIII水平为30%, 中位数为22%。在载体输注后4周开始,这些受试者中没有出血的报道。

[0357] 在 2×10^{12} vg/kg AAV-LK03 (FVIII) 载体剂量下,7名中有5名分别在接受载体输注

后6至11周范围内的时间点开始接受了一个疗程的类固醇治疗,用于以下的一种或多种:FVIII水平下降,ALT升高至受试者基线以上,或IFN- γ ELISPOTs升高至AAV衣壳。在所有情况下,类固醇的启动与ALT降低至正常范围以及ELISPOT信号消失有关。七名中有2名受试者在稳定FVIII水平方面显示有限的成功,可能由于免疫应答而下降至<5%。对于其中一名,在12周的随访中没有出血的报道;经过37周的观察,其他人有4处出血。

[0358] 总体而言,观察到良好的安全性,只有两名受试者的ALT升高超过正常上限。自载体输注以来,迄今有91% (91%) 的受试者的ABR为 ≤ 1 。所有受试者在载体输注后均经历FVIII水平升高,但是在防止两名受试者中FVIII水平下降方面取得的成功有限,这表明可能需要添加预防性类固醇。

[0359] 根据在非NHP中观察到的hFVIII水平,并考虑到不同载体批次的效力可能略有不同,估计以 5×10^{11} vg/kg剂量注入SPK-8011的人的平均FVIII水平可能约为3.4%-5.8%,假设线性外推法。第一个受试者中的FVIII活性稳定在正常水平的约 $9.15 \pm 0.53\%$,第二个受试者中则为 $13.50 \pm 0.50\%$ 。因此,低剂量队列的平均FVIII活性约为11.3%,比非人灵长类动物的研究预期高出2-4倍。

[0360] 根据使用系统发育上接近的物种(例如猕猴)的临床前研究和人类受试者的实际结果,在预测的FVIII水平之间在低剂量队列中的实质性2-4倍差异(取决于所使用的线性回归曲线)强调了当前动物模型在确定用于人类的AAV载体剂量方面的局限性。数据表明,人类中的FVIII活性远高于根据AAV-SPK-8011 (LK03衣壳)-hFVIII给药的NHP中的FVIII活性预测的数据。

[0361] 虽然尚不存在确定人类中AAV剂量的通用临床前模型,但先前使用AAV2,AAV8和AAV-Spk载体介导肝脏衍生的凝血因子IX表达的非人灵长类动物的经验表明,猕猴是一种很好的但不是人类AAV载体疗效的完美预测指标。最近,嵌合的“人源化”小鼠的肝脏被人类肝细胞部分重新填充,已成为确定不同病毒衣壳的肝转导效率的重要工具。已有两项独立的研究报道,利用这种小鼠模型可测量人肝细胞的转导。据报道,LK03和AAV8之间的人类肝细胞转导百分比差异约为10倍(LK03和AAV8载体输注分别观察到 $43.3 \pm 11\%$ 和 $3.6 \pm 1.1\%$ (Lisowski L,等人.Nature 506:382-6 (2014))。

[0362] 总之,在12名重度或中重度血友病A患者中输注SPK-8011可在基因转移后长达66周的时间内导致安全,持久,剂量依赖性的FVIII活性,与ABR降低97%和重组FVIII的使用降低97%有关。

[0363] 实施例9

[0364] TTR启动子

[0365] 运甲状腺素蛋白(TTR)启动子的表征最初在Costa和Grayson 1991,Nucleic Acids Research 19(15):4139-4145中描述。TTR启动子序列是从TATTTGTGTAG到TATTGACTTAG的修饰的序列。

[0366] 具有4个核苷酸突变的TTR启动子(TTRmut),SEQ ID NO:22GTCTGTCTGCACATTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTGACTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGCTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCT

[0367] 实施例10

[0368] CpG减少的编码FVIII的转基因构建体和示例性AAV衣壳。

[0369] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X01 (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 ggccccctg gatggggctg ctgggcccta ccatccaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tgatcactct gaagaacatg gctagccatc ctgtgtctct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgatcagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaaggt gttccctggg ggctctcaca cctatgtctg gcaggtgctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgactct ctgtgtctga cctatagcta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg cctgctggtg gtgtagggag
gggagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcattctgct gtttctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcattctgaa accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt caataggtct
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc
accaccctg aggtgcacag catctttctg gagggccaca ccttctggtg gaggaatcac
agacaggcca gcctggagat cagccccatc accttctga ctgccagac cctgctgatg
gacctgggcc agtttctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaataatgag
gaggtgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gagatttgat
gatgacaatt ctcccagctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcccaagacc
tgggtgcaact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgccccctt ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctataa gagccagtac ctgaataatg gccccagag gattgggagg
aagtataaga aggtgaggtt catggcctat actgatgaaa ccttcaagac cagagaggcc
atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggagggtgg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccctca tggcatcact
gatgtgagge 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 tgcccaacc tgctgggggtg
cagctggagg accctgaatt ccaggcctct aacatcatgc acagcattaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgectg catgaggtgg cctactggta cattctgagc
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt taagcacaag
atgggtgatg aggataccct gaccctgttt cctttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggg
atgactgctc tgctgaaggt gagcagctgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac
```

```

agctatgagg acatctctgc ctatctgctg agcaagaata atgctattga gccaggagc
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
caggagtcca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tgggccccta tatcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgacctc
aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttc tactctagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacttat
ttctggaagg tgcagcacca tatggcccc accaaggatg agtttgattg caaagcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggccccctg
ctgggtgtgcc acaccaacac tctgaacct gcccattggca ggcagggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcacat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaatate cagatggagg accccacctt taaggaaaat
tataggtttc atgccattaa tggctacate atggacaccc tgccctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcagggtg gtacctgctg agcatgggca gcaatgagaa cattcacagc
atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tataatctgt accctggggg gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggaggggtg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttctctg
gtgtatttcta 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 tctgatgggtg ttctttggca atgtggacag ctctgggatc
aagcacaaca tctttaacc ccctatcatt gccaggtaca ttaggctgca ccccacccat
tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgcagc
atgccctgg gcatggagag caaggctatc tctgatgcc agattactgc cagcagctac
ttaccaata tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
tctaattgct ggaggcccc ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcagg gacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc atcagtggac cctgttcttc
cagaatggca aggtgaagg gttccagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtggtgaac
agcctggacc cccccctgct gaccagatac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggg tgtgaggccc aggacctgta ctga

```

[0370] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X02 (SEQ ID NO:2)

```

atgcagattg agctgtctac ctgcttttct ctgtgtctgc tgaggttctg cttctctgcc
actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttcct ccagggtgc ccaagtctt ccccttcaat
acctctgtgg tgtataagaa gaccctgttt gtggagtta ctgatcacct gttcaacatt
gccaagcca ggcccccttg gatggcctg ctggggcccc ccatccaggc tgagggtgat
gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gcctctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgataagg gttccctggg gggagccaca ctatgtgtg gcagggtctg
aaggagaatg gcccaatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctattctta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg cctgctggt gtgcaggag
ggctctctgg ctaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttctgtg
tttgatgagg ggaagagctg gcaactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gtgcctctg ccagggcctg gcccaaatg cacactgtga atggctatgt gaataggagc
ctgcctggcc tgattggetg ccacaggaag tetgtgtatt ggcattgtgat tggcatgggc
accaccctg aggtgactc tatcttctg gagggccata ctttctggt gaggaatcat
aggcaggcca gcctggagat tagccccatt acctttctga ctgccagac cctgctgatg
gacctgggac agttcctgct gttttgccac atcagctctc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gattctgaaa tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaata gccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca tcctaagacc

```

tgggtgca	acattgctgc	tgaggaggag	gactgggact	atgctcccct	ggtgctggcc
cctgatgaca	ggtcttacia	gagccagtac	ctgaacaatg	gccccagag	aattgggagg
aagtataaga	aggtgagatt	catggcttac	actgatgaga	ccttcaagac	tagggaggcc
atccagcatg	agtctggcat	tctgggcccc	ctgctgtatg	gggagggtgg	ggacaccctg
ctgatcatct	tcaagaacca	ggcctctagg	ccctacaata	tttaccocca	tgggatcact
gatgtgaggc	ccctgtacag	caggaggctg	cctaaggggg	tgaagcatct	gaaggacttc
cccatcctgc	ctggggagat	cttcaagtat	aagtggactg	tgactgtgga	agatggcccc
accaagtctg	accctaggtg	cctgaccagg	tactactctt	ctttttgtgaa	catggagagg
gacctggcct	ctggcctgat	tggccccctg	ctgatctgct	acaaggagtc	tgtggaccag
agggggaaacc	agattatgtc	tgacaagagg	aatgtgattc	tgttctctgt	gtttgatgag
aacaggagct	ggtatctgac	tgagaacatc	cagaggttcc	tgcccaatcc	tgctggggtg
cagctggagg	accctgagtt	ccaggccagc	aacatcatgc	acagcatcaa	tgggtatgtg
tttgattctc	tgcagctgtc	tgtgtgcctg	catgagggtg	cctactggta	catcctgagc
attggggctc	agactgattt	cctgtctgtg	ttcttttctg	gctacacctt	taagcataag
atgggtgatg	aggacactct	gaccctgttt	cccttctctg	gggagactgt	gtttatgagc
atggagaacc	ctggcctgtg	gatcctgggc	tgccacaact	ctgatttcag	gaacaggggc
atgactgctc	tgctgaaggt	gtcttcttgt	gacaagaaca	ctggggacta	ttatgaggac
agctatgagg	acatctctgc	ctacctgctg	agcaagaaca	atgctattga	gccagatct
ttcagccaga	acccccctgt	gctgaagagg	caccagaggg	agatcaactag	gaccaccctg
cagtctgacc	aggaggagat	tgactatgat	gacactatct	ctgtggagat	gaagaaggag
gactttgata	tctatgatga	ggatgagaac	cagtctccca	ggagcttcca	gaaaaagacc
aggcactact	tcattgctgc	tgtggagagg	ctgtgggact	atggcatgtc	ttctagcccc
catgtgctga	ggaacagggc	ccagtctggg	tctgtgcccc	agttcaagaa	ggtgggtgtc
caggagtcca	ctgatgggag	cttcaccag	cctctgtaca	ggggggagct	gaatgagcac
ctggggctgc	tgggccccca	tattagggct	gagggtggagg	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	tggccccctg
ctgggtgtgc	ataccaacac	cctgaacctt	gccccatggca	ggcagggtgac	tgtgcaggag
tttgccccgt	tcttcaccat	ctttgatgag	accaagagct	ggtactttac	tgagaacatg
gagaggaatt	gcagagcccc	ttgcaacatc	cagatggagg	acccaacctt	caaagagaac
tacaggttcc	atgccatcaa	tgggtacatc	atggacaccc	tgccctggcct	ggtgatggct
caggaccaga	ggatcagggtg	gtatctgctg	agcatgggca	gcaatgagaa	tatccatagc
attcacttct	ctggccatgt	gttcaactgtg	aggaagaagg	aggagtacaa	gatggccccg
tataacctgt	accctggggg	gtttgagact	gtggagatgc	tgccaagcaa	ggctgggatt
tggaggggtg	agtgcctgat	tggggagcac	ctgcatgctg	gcatgtctac	cctgttctctg
gtgtactcca	ataagtgcc	gacccccctg	ggcatggcct	ctggccacat	cagggacttc
cagatcactg	cctctggcca	gtatgggcag	tgggccccaa	agctggccag	gctgcactat
tctgggagca	tcaatgcttg	gagcaccag	gagcctttca	gctggattaa	ggtggatctg
ctggccccca	tgatcattca	tggcatcaaa	accagggggg	ctagacagaa	gttttctagc
ctgtacatca	gccagttcat	catcatgtac	agcctggatg	gcaagaagtg	gcagacttac
aggggcaata	gcactggcac	cctgatgggtg	ttttttggca	atgtggacag	ctctggcatc
aagcacaaca	tctttaacc	ccccattatt	gccagggtata	tcaggctgca	tcccaccac
tattctatta	ggtctactct	gagaatggag	ctgatgggct	gtgacctgaa	cagctgtagc
atgccctg	ggatggagag	caaggctatc	tctgatgcc	agatcaactgc	cagctcttat
ttaccaata	tgtttgccac	ctggctctcc	tctaaggcca	ggctgcacct	gcagggcagg
agcaatgctt	ggaggcccca	ggtgaataac	cccaaggagt	ggctgcagg	ggacttccag
aagaccatga	aggtgactgg	ggtgactacc	caggggggtga	agtctctgct	gactagcatg
tatgtgaagg	agttcctgat	cagcagcagc	caggatgggc	atcagtggac	tctgttcttc
cagaatggca	aggtgaaggt	cttccagggg	aaccaggata	gcttcaactcc	tgtgggtgac
tctctggacc	ccccctgct	gactaggtat	ctgaggatcc	acccccagag	ctgggtgcac
cagattgccc	tgaggatgga	ggtgctgggc	tgtgaggccc	aggacctgta	ttga

[0371] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X03 (SEQ ID NO:3)

atgcagattg	aactgtctac	ttgtttcttc	ctgtgcctgc	tgaggttttg	cttctctgct
actaggaggt	actatctggg	ggctgtggag	ctgtcttggg	actatatgca	gtctgacctg
ggggagctgc	ctgtggatgc	taggtttccc	cccaggggtgc	ccaagagctt	cccccttaac

acctctgtgg tgtataagaa gactctgttt gtggagtcca ctgaccatct gttcaacatt
gccaaagccaa ggccccctg gatgggcctg ctgggccccca ccatccaggc tgagggtgat
gacactgtgg tgattactct gaagaacatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
gggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac ctctcagagg
gagaaggagg atgacaagggt gtccctggg ggctctcata cctatgtgtg gcaggctctg
aaggagaatg ggccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctactctta tctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggg gtgcagggag
ggcagcctgg ctaaggagaa gaccagact ctgcacaagt tcctctgct gtttgcctgtg
tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
getgcctctg ctagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaacaggagc
ctgccaggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtatt ggcattgtgat tgggatgggg
actaccctg aggtccacag cattttcctg gaggggcata cttttctggg gaggaccac
aggcaggcct ctctggagat ctctcccatt actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa aaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gattctgaga tggatgtggg gaggtttgat
gatgataaca gccccagctt catccagatt aggtctgtgg ccaagaagca tccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgctcctct ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctacaa gagccagtac ctgaataatg gccccagag gattggcagg
aagtataaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac caggaggcc
atccagcatg aatctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggagggtggg ggacaccctg
ctgattatct ttaagaacca ggctagcagg ccctacaaca tttaccacca tggcattact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggatttc
cccattctgc ctggggagat ctttaagtac aaatggactg tgactgtgga ggatggcct
actaagtctg atcccagggtg tctgaccaga tactacagca gctttgtgaa tatggagagg
gacctggctt ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaatc agattatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gttgatgag
aacagaagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcccaacc tgcctgggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggctagc aatatcatgc acagcattaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgctg catgagggtg cctattggta cattctgagc
attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacctt caagcacaag
atgggtgatg aggatactct gaccctgttt cccttctctg ggggagactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgtcacaact ctgacttcag gaacaggggc
atgactgccc tgctgaagggt gagctcttgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac
tcttatgagg acatctctgc ctacctgtg agcaagaaca atgctattga gccaggagc
ttctctcaga atccccctgt gctgaagagg catcagaggg agatcactag gactaccctg
cagtctgacc aggaagagat tgactatgat gacaccatct ctgtggaatg gaagaaggag
gactttgata tctatgatga ggatgaaac cagagcccca ggagctcca gaagaagacc
aggcattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atgggatgag ctcttctccc
catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtcccac agttcaagaa ggtggtgttt
caggagtcca ctgatggcag cttcactcag cccctgtaca ggggggagct 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
ctggctctgcc atactaacac cctgaatcct gcccatggca ggcagggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tctttaccat ctttgatgag accaagtctt ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgtaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacactc tgccctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcagggtg gtacctgctg tctatgggct ctaatgagaa cattcattct
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaatctgt accctggggg gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa ggctggcctc
tggaggggtg agtgectgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttctctg
gtctatagca ataagtgcc gacccccctg gggatggcct ctgggcatat cagagacttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgactac
tctggcagca ttaatgectg gagaccaag gagcccttct ctggatcaa ggtggacctg
ctggctccca tgatcatcca tgggatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac

```

aggggcaata gcaactgggac cctgatgggtg ttctttggga atgtggacag ctctggcatc
aagcacaata tcttcaaccc ccccatcatt gccaggtaca tcagactgca cccactcat
tacagcatca ggagcactct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa tagctgctct
atgccctgg 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 ctcttctage caggatgggc accagtggac cctgttttctc
cagaatggga aggtgaagggt gtttcagggc aatcaggaca gctttactcc tgtgggtgaac
agcctggacc cccccctgct gactaggtac ctgaggattc acccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

```

[0372] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X04 (SEQ ID NO:4)

```

atgcagattg agctgtctac ctgcttcttt ctgtgcctgc tgaggttctg tttctctgcc
actaggaggt attatctggg ggctgtggag ctgtcctggg actacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttccct cccaggggtgc ccaagtcttt ccttttcaat
acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagtta ctgatcacct gtttaacatt
gccaaagcca ggccccctg gatggggctg ctgggcccc ccatccaggc tgaggtgat
gacactgtgg tgattactct gaagaatatg gcttctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgacaagggt gtccctggg ggcaagccaca cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg gcccaatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta tctgagccat
gtggatctgg tgaaggatct gaactctggc ctgattgggg cctgctgggt gtgcagggag
ggctctctgg ccaaggagaa gactcagact ctgcacaagt tcactcctgct gtttctctg
tttgatgagg gcaagagctg gcaactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atgggtatgt gaataggagc
ctgctgggc tgattgggtg tcacaggaag tctgtgtact ggcattgtgat tggcatgggc
accactcctg aggtgcacag catcttctctg gagggccaca ctttctctggg gaggaatcac
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttctga ctgccagac cctgctgatg
gatctgggce agttcctgct gttttgccat atcagcagcc atcagcatga tgggatggag
gcttatgtga aggtggactc ttgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaataatgaa
gaggctgagg actatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggg gaggtttgat
gatgacaaca gccccagctt tatccagatt aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc
tgggtgcatt acattgctgc tgaggaagag gattgggact atgccccct ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctacaa gtctcagtac ctgaacaatg gccctcagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
atcagcatg aatctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctgattattt tcaagaacca ggccagcagg cctacaaca tttatcctca tggcattact
gatgtgagac ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggactc
cccactctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg accccagggtg cctgactagg tactactcca gctttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttcatgag
aataggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaatacc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggcctct catgaggtgg cctactggta catcctgagc
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg ctgaggtgg ttcttctctg gctacacctt taagcataag
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ccttctctg gggagactgt gttcatgagc
atgggtgatg aggacaccct gactctgttc cccttctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc caggcctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaataggggc
atgactgccc tgctgaagggt gagcagctgt gataagaaca ctggggacta ttatgaggat
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc
ttcagccaga atcctcctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgatc aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagagcccca ggagctcca gaagaagact
agacactact ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctcttctccc
catgtgctga gaaacagggc ccagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtcttc
caggagttca ctgatggctc tttcaccag cctctgtata gaggggagct gaatgagcac
ctgggcccctg tgggcccctta catcagggtc gaggtggagg acaatatcat ggtgaccttc

```

```

aggaaccagg ctagcagggc ctactctttc tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaat tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctactttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctggcctgat tggccccctg
ctgggtctgcc acaccaatac tctgaaccct gctcatggga gacaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcacccat ctttgatgag accaagtccct ggtactttac tgagaacatg
gagaggaatt gcagggcccc tgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggaaaat
tataggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgccctggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcagggtg gtatctgctg tctatgggct ctaatgagaa catccacagc
atccatttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggctctg
tacaacctgt accctggggg ctttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatt
tgagggtgg agtgccctgat tggggaacac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttctctg
gtgtactcta acaagtgcc aacccccacty ggcatggcct ctggccacat cagggatttc
cagattactg cctctggcca gtatggccag tgggctccca agctggctag gctgcactac
tctggggagca tcaatgcctg gtctactaag gagcctttct cttggatcaa agtggacctg
ctggcccccta tgatcatcca tgggatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatct ctcagttcat cattatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaaca gcactggcac cctgatgggtg ttctttggga atgtggacag ctctgggatt
aagcacaaca tctttaacc ccccatcatt gccaggtata tcaggctgca cctaccac
tacagcatta ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa cagctgcagc
atgccctgg ggatggagag caaggccatt tctgatgctc agatcactgc ttctagctac
ttactaaca tgtttgccac ctgggtctccc agcaaggcta gactgcacct gcaggggagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaataat cccaaggagt ggctgcaggg ggatttccag
aaaacctga aggtgactgg ggtgactacc caggggggtga agtctctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatgggc atcagtggac cctgttcttt
cagaatggga aggtgaagg gtttcagggc aatcaggaca gcttcacccc tgtgggtgaa
agcctggacc cccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga

```

[0373] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X05 (SEQ ID NO:5)

```

atgcagattg agctgtctac ttgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgce
actaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttctt cccagggtgc ctaagagctt ccccttcaac
acctctgtgg tgtacaagaa gactctgttt gtggagtta ctgatcatct gttcaacatt
gccaaagcca ggctcctctg gatggggctg ctgggcccc ccatccaggc tgagggtgat
gacactgtgg tgattaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac tagccagagg
gagaaggagg atgacaagg gttccctggg gggagccata cctatgtgtg gcagggtctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgaccct ctgtgcctga cttatagcta cctgagccat
gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg cctgctgggt gtgcaggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttctgtg
tttgatgagg ggaagtcctg gcactctgag actaagaaca gcctgatgca ggatagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaataggagc
ctgctggccc tgattggctg ccataggaag tctgtgtact ggcattgtgat tgggatgggc
accaccctg aggtgcactc tatttctctg gagggccata ctttctgggt gaggaacct
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac tctgctgatg
gacctgggce agttcctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tggcatggag
gcttatgtga aggtggacag ctgccctgag gaggctcagc tgaggatgaa gaataatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggg gaggtttgat
gatgacaact ctccctcttt catccagatc aggtctgtgg gattgggact ccaagaagca ccctaagacc
tggtgact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgccccctt ggtgctggcc
ccagatgaca ggagctaaa gtcccagtac ctgaacaatg gccccagag gatggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttat actgatgaga ctttcaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggccc ctgctgtatg gggagggtggg ggacaccctg
ctgattatct tcaagaacca ggcttctagg cctacaata tctaccctca tggcatcact
gatgtgagge cctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcatct gaaggatttc
cccactctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
actaagtctg accccagggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa catggagagg

```

gatctggcct	ctgggctgat	tggccccctg	ctgatctgct	acaaggagtc	tgtggaccag
aggggcaacc	agatcatgtc	tgacaagagg	aatgtgatcc	tgttctctgt	gtttgatgag
aataggagct	ggtacctgac	tgagaacatc	cagaggttcc	tgcccaatcc	tgctggggtg
cagctggagg	atcctgagtt	tcaggcctct	aatatcatgc	acagcatcaa	tggctatgtg
tttgactctc	tgcagctgtc	tgtgtgcctg	catgaggtgg	cctattggta	catcctgagc
attggggccc	agactgactt	tctgtctgtg	ttttttctg	gctacacctt	caagcacaag
atgggtgatg	aggatactct	gactctgttc	cctttttctg	gggagactgt	gttcatgtct
atggagaacc	ctgggctgtg	gattctgggc	tgccacaatt	ctgacttcag	gaacagaggc
atgactgctc	tgctgaaggt	gagcagctgt	gacaagaaca	ctggggacta	ctatgaggac
tcttatgagg	acattttctg	ctacctgctg	agcaagaaca	atgccattga	gcccagaagc
ttttctcaga	acccccctgt	gctgaagagg	caccagaggg	agatcaccag	gaccacctg
cagtctgacc	aggaggagat	tgactatgat	gatactatth	ctgtggagat	gaagaaggag
gactttgaca	tctatgatga	ggatgagaac	cagagcccca	ggtctttcca	gaagaagact
aggcactact	ttattgctgc	tgtggagagg	ctgtgggact	atgggatgtc	tagctctcct
catgtgctga	ggaacagggc	ccagtctggc	tctgtgcccc	agtttaaaaa	ggtggtgttc
caggaattca	ctgatggcag	ctttaccag	cctctgtaca	ggggggagct	gaatgagcac
ctggggctgc	tggggcctta	cattagggct	gagggtggagg	acaacatcat	ggtgaccttc
aggaatcagg	ccagcaggcc	ctactcttcc	tacagcagcc	tgatctctta	tgaggaggac
cagaggcagg	gggctgaacc	caggaagaac	tttgtgaagc	ccaatgagac	caagacctac
ttctggaagg	tgcagcacca	catggctccc	accaaggatg	agtttgattg	caaggcctgg
gcttacttct	ctgatgtgga	tctggagaag	gatgtgcact	ctgggctgat	tggccccctg
ctgggtgtgcc	acaccaacac	tctgaacctt	gccccatggca	gacaggtgac	tgtgcaggag
tttgccctgt	tcttcaactat	ctttgatgag	actaagagct	ggtacttcac	tgagaacatg
gagaggaatt	gcagggcccc	ttgcaacatc	cagatggagg	acccccctt	taaggagaac
tacaggtttc	atgccattaa	tggtacatc	atggacaccc	tgccctggcct	ggtgatggcc
caggaccaga	ggatcagggtg	gtacctgctg	tctatgggga	gcaatgagaa	catccacagc
attcacttct	ctggccatgt	gttcaactgtg	aggaagaagg	aggagtacaa	gatggccctg
tacaacctgt	accctggggg	gtttgagact	gtggagatgc	tgcccagcaa	ggctgggatc
tggaggggtg	agtgcctgat	tggggagcac	ctgcatgctg	ggatgagcac	cctgttctctg
gtgtatagca	acaagtgcc	gacccccctg	ggcatggcct	ctggccacat	cagagacttt
cagattactg	cctctggcca	gtatgggcag	tgggccccca	agctggccag	gctgcaactat
tctggctcta	ttaatgcctg	gagcactaag	gagcccttca	gctggattaa	ggtggacctg
ctggctccca	tgatcatcca	tggcatcaag	actcaggggg	ccaggcagaa	gttctcttct
ctgtacatca	gccagttcat	tatcatgtac	tccctggatg	gcaagaagtg	gcagacctat
aggggcaaca	gcactggcac	cctgatgggtg	ttctttggga	atgtggacag	ctctggcatc
aagcataata	tcttcaatcc	ccccatcatt	gctaggtaca	tcaggctgca	ccccaccac
tactctatta	ggtctaccct	gaggatggag	ctgatgggct	gtgacctgaa	cagctgcagc
atgcctctgg	gcatggagag	caaagccatc	tctgatgccc	agatcactgc	cagcagctac
tttaccaca	tgtttgctac	ttggagcccc	agcaaggcca	ggctgcacct	gcaggggagg
tctaattgcct	ggaggccccca	ggtgaacaac	ccaaggagt	ggctgcagg	ggacttccag
aagactatga	aggtgactgg	ggtgaccacc	caggggggtga	agagcctgct	gacctctatg
tatgtgaagg	agttcctgat	tagcagcagc	caggatggcc	accagtggac	cctgtttttc
cagaatggga	aggtgaaggt	gtttcagggg	aaccaggaca	gcttcaactcc	tgtggtgaac
tctctggacc	ccccctgct	gaccaggtat	ctgaggatcc	accctcagag	ctgggtgcac
cagattgccc	tgaggatgga	ggtgctgggc	tgtgaggccc	aggacctgta	ctga

[0374] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X06 (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	gtggagttha	ctgaccacct	gttcaacatt
gccaagccca	ggcctccctg	gatgggcctg	ctgggccccca	ccattcaggc	tgagggtgat
gacactgtgg	tcatcaccct	gaaaaatatg	gctagccacc	ctgtgtctct	gcatgctgtg
gggggtgagct	actggaaggc	ctctgagggg	gctgagtatg	atgaccagac	tagccagagg
gagaaggagg	atgacaaggt	gttccctggg	ggcagccaca	cttatgtgtg	gcagggtgctg
aaagagaatg	gccccatggc	ttctgatccc	ctgtgtctga	cctatagctc	cctgagccat
gtggatctgg	tgaaggacct	gaactctggc	ctgattgggg	ccctgctggg	gtgcagggag
ggcagcctgg	ctaaggagaa	gaccagacc	ctgcataagt	tcatectgct	gtttgctgtg

tttgatgagg	gcaagagctg	gcactctgag	actaagaaca	gcctgatgca	ggatagggat
gctgcttctg	ccagggcctg	gcccaagatg	cacactgtga	atgggtatgt	gaacaggagc
ctgcctggcc	tgattggctg	ccataggaag	tctgtctatt	ggcatgtgat	tggcatgggc
actactcctg	aggtgcacag	catctttctg	gagggccaca	ccttcctggg	gaggaaccac
aggcaggcca	gcctggagat	ctctcccac	actttcctga	ctgctcagac	cctgctgatg
gacctgggcc	agttcctgct	gttctgtcac	atctctagcc	accagcatga	tggcatggag
gcctatgtga	aggtggatag	ctgccctgag	gaaccccagc	tgaggatgaa	gaacaatgag
gaggctgagg	attatgatga	tgatctgact	gattctgaga	tggatgtggg	gaggtttgat
gatgacaatt	ctcctagctt	cattcagatc	agatctgtgg	ccaaaaagca	tctaagact
tgggtgcatt	atattgctgc	tgaggaggag	gattgggatt	atgccccct	ggtgctggct
cctgatgata	ggagctacaa	gtctcagtac	ctgaataatg	ggccccagag	gattggcagg
aagtacaaga	aggtgaggtt	catggcctac	actgatgaga	ccttcaagac	cagggaggcc
atcagcatg	agtctgggat	tctggggccc	ctgctgtatg	gggaggtggg	ggataccctg
ctgatcattt	tcaagaacca	ggccagcagg	ccctacaaca	tctaccccc	tgggattact
gatgtgaggc	ccctgtactc	taggaggctg	cctaaggggg	tgaagcacct	gaaggathtt
cctatcctgc	ctggggaaat	cttcaagtac	aagtggactg	tgactgtgga	ggatggcccc
actaagtctg	atcccagggtg	tctgaccagg	tattatagct	cttttgtgaa	catggagagg
gatctggcct	ctgggctgat	tggccctctg	ctgatctgct	acaaggagtc	tgtggaccag
aggggcaacc	agatcatgtc	tgacaagagg	aatgtgatcc	tgttctctgt	gtttgatgag
aacaggagct	ggtatctgac	tgagaacatc	cagaggtttc	tgcccaatcc	tgctggggtg
cagctgagg	atcctgagtt	ccaggctagc	aacatcatgc	acagcatcaa	tgggatgtg
tttgacagcc	tgacagctgc	tgtgtgtctg	catgaggtgg	cctactggta	tatcctgtct
attggggccc	agactgactt	cctgtctgtg	ttttttctg	ggtatacttt	taagcacaag
atgggtgatg	aggacaccct	gactctgttc	cccttctctg	gggagactgt	gtttatgagc
atggagaacc	ctggcctgtg	gatcctgggc	tgccacaatt	ctgacttcag	gaataggggg
atgactgccc	tgctgaaggt	gagcagctgt	gataagaata	ctggggacta	ctatgaggac
tcttatgagg	acattttctgc	ctatctgctg	tctaagaaca	atgccattga	accaggagc
ttctctcaga	acccccctgt	gctgaagagg	caccagaggg	aatcaccag	aactactctg
cagtctgatc	aggaggaaat	tgactatgat	gacactatht	ctgtggagat	gaagaaggag
gactttgaca	tctatgatga	ggatgagaac	cagagcccaa	ggagcttcca	gaagaagact
aggcactact	tcaattgctgc	tgtggagagg	ctgtgggact	atggcatgag	cagcagcccc
catgtgctga	gaaacagggc	ccagtctggg	tctgtgcccc	agttcaagaa	ggtggtgttc
caggagtcca	ctgatgggag	cttcacccag	ccccgtata	ggggggagct	gaatgagcac
ctgggcctgc	tgggccccta	tattagggt	gaggtggagg	acaacatcat	ggtgaccttc
aggaatcagg	cctctaggcc	ctacagcttc	tacagcagcc	tgattagcta	tgaggaggat
cagaggcagg	gggctgaacc	caggaagaac	tttgtgaagc	ccaatgagac	caagacctat
ttctggaagg	tgacagcatca	catggccccc	accaaggatg	agtttgactg	caaggcctgg
gcctacttct	ctgatgtgga	tctggagaag	gatgtgcact	ctggcctgat	tggccccctg
ctgggtgtgcc	acaccaacac	cctgaaccct	gctcatggca	ggcaggtgac	tgtgcaggag
tttgccctgt	tcttcacat	ctttgatgag	actaagtctt	ggtacttcac	tgagaatatg
gagaggaatt	gcagggcccc	ctgcaatatt	cagatggaag	acccccctt	caaggagaat
tacaggtccc	atgccattaa	tggtacatc	atggataccc	tgcctggcct	ggtgagtggc
caggatcaga	ggatcaggtg	gtacctgctg	agcatgggca	gcaatggaaa	catccactct
atccacttct	ctggccatgt	gtttactgtg	aggaagaagg	aggagtataa	gatggccctg
tacaacctgt	accctggggg	ctttgagact	gtggagatgc	tgccctctaa	ggctggcatt
tggaggggtg	agtgcctgat	tggggaacac	ctgcatgctg	gcatgtctac	cctgttctctg
gtgtacagca	ataagtgcc	gacccccctg	ggcatggcct	ctgggcata	cagggathtt
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	cctgatgggtg	ttctttggga	atgtggatag	ctctgggatc
aagcacaata	tcttcaacc	ccccatcatt	gccaggtata	tcaggctgca	ccccaccac
tacagcatta	ggtctaccct	gaggatggag	ctgatgggct	gtgatctgaa	cagctgtagc
atgcctctgg	gcatggagtc	taaggccatt	tctgatgccc	agattactgc	tagcagctac
ttcaccaaca	tgtttgccac	ctggtctccc	agcaaggcca	ggctgcatct	gcagggcagg
tctaattgctt	ggaggcccc	ggtgaacaac	ccaaaggagt	ggctgcagg	ggatttccag
aagactatga	aggtgactgg	ggtgaccact	caggggggtg	agtctctgct	gacctctatg
tatgtgaagg	agttcctgat	ctctagcagc	caggatggcc	atcagtggac	cctgttcttc

cagaatggca aggtgaaagt gttccagggc aatcaggata gcttcaactcc agtgggtgaaac
 agcctggatc cccctctgct gactaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac
 cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggacctgta ctga

[0375] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X07 (SEQ ID NO:7)

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgtctgc tgaggttctg cttctctgcc
 accaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
 ggggagctgc ctgtggatgc taggttcccc cccagggtgc ccaagagctt cccctttaac
 acttctgtgg tgtacaagaa gacctgttt gtggagtca ctgaccacct gttcaacatt
 gccaaagcca ggccccctg gatggggctg ctggggccca ccatccaggc tgaggtgat
 gacactgtgg tgatcacct gaagaacatg gccagccacc ctgtgacct gcatgctgtg
 ggggtgagct actggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg
 gagaaggagg atgacaagggt gtttctggg ggcagccata cctatgtgtg gcaggtgctg
 aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctacagcta cctgtctcat
 gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgtaggag
 ggcagcctgg ctaaggaaaa gaccagacc ctgcataagt ttatctctgct gtttctgtg
 tttgatgagg gcaagagctg gcaactctgag accaagaaca gcctgatgca ggatagggat
 gctgcctctg ccagggtctg gcctaagatg cacactgtga atgggtatgt gaataggagc
 ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tgggatgggc
 accaccctg aggtccatag catcttctctg gagggccaca ctttctctggt gaggaaccac
 agacaggcct ctctggagat ctctcccatc accttctga ctgctcagac tctgctgatg
 gacctgggcc agttctctgct gttttgccat attagcagcc accagcatga tgggatggag
 gcctatgtga aggtggatag ctgcctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaacaatgag
 gaggtgaag actatgatga tgacctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat
 gatgacaata gccccagctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaaaca cccaagacc
 tgggtgcact acattgctgc tgaggaagag gactgggact atgctcccct ggtgctggcc
 cctgatgata ggtcttataa gagccagtac ctgaacaatg ggccccagag gattggcagg
 aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaaa ccttcaaaac cagggaggcc
 attcagcatg agtctggcat cctgggccct ctgctgtatg gggagggtgg ggacaccctg
 ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctatctca tggcatcact
 gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaagacttc
 cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggccct
 accaagtctg accccaggtg tctgaccagg tactattcta gctttgtgaa catggagagg
 gacctggcct ctggcctgat tgggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
 aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag
 aataggagct ggtacctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctgggtg
 cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aatatcatgc atagcatcaa tggctatgtg
 tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
 attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttctttctg gctatacctt caagcacaag
 atgggtgatg aggataccct gacctgttc cccttctctg ggggagactgt gttcatgagc
 atggagaatc ctgggctgtg gatcctgggg tgccacaact ctgatttttag gaacaggggg
 atgactgccc tgctgaagggt gtctagctgt gataagaaca ctggggacta ctatgaggac
 agctatgagg acatttctgc ttatctgctg tctaagaata atgccattga gccagaagc
 ttcagccaga atccccctgt gctgaagaga catcagaggg agatcaccag aactaccctg
 cagtctgac aggaggagat tgactatgat gacactatct ctgtggagat gaagaaggag
 gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctcca ggagctttca gaagaagacc
 agacattact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct
 catgtgctga ggaacagggc ccagctctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
 caggaattca ctgatggcag cttcaccag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcac
 ctgggcctgc tggggcctta tatcagggct gaggtggagg ataataattat ggtgactttc
 aggaaccagg ccagcagggc ctactcttctc tatagcagcc tgatctctta tgaggaggat
 cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacctac
 ttctggaagg tccagcacca catggcccct accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
 gcctatttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtccatt ctgggctgat tggccccctg
 ctgggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca ggcaggtgac tgtccaggag
 tttgccctgt tcttcaactat ctttgatgag accaagagct ggtactttac tgagaacatg
 gagaggaact gcagagctcc ttgcaatatt cagatggagg accccacctt caaggagaat
 tacaggttcc atgcccattaa tgggtacatc atggacacc tgccctggcct ggtgatggct

```

caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa tatccacagc
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tataatctgt accctggggg gtttgaaact gtggagatgc tgcctctaa gctggcctc
tgagggtgg agtgectgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttctctg
gtgtacagca acaagtgcc aacccccctg ggcatggcct ctggccacat cagggacttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgactat
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagctct
ctgtacatct ctcagttcat catcatgtac tctctggatg ggaagaagtg gcagacctac
aggggcaaca gcaactggcac cctgatgggtg ttctttggga atgtggactc ttctggcctc
aagcacaaca tcttcaatcc ccccatcatt gctaggtata ttaggctgca tcccaccac
tacagcatca ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgacg
atgcccctgg gcatggagtc taaggccatc tctgatgccc agattactgc cagcagctac
ttaccaaca tgtttgccac ctggagcccc tctaaggcca ggctgcatct gcaggggagg
agcaatgcct ggaggcctca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggatttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtca agagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac tctgttcttt
cagaatggga aggtgaagggt gtttcagggc aatcaggact ctttcacccc tgtgggtgaa
agcctggacc cccccctgct gaccagatac ctgaggatcc acccccagtc ttgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggctc aggatctgta ctga

```

[0376] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X08 (SEQ ID NO:8)

```

atgcagattg agctgagcac ttgctttttt ctgtgctgct tgaggttttg tttttctgcc
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc ccagggtgc ccaagtcttt tcccttcaac
acctctgtgg tgtataagaa gacctgttt gtggagtca ctgaccacct gttcaacatt
gctaagccta ggccccctg gatgggcctg ctgggcccta ccattcaggc tgagggtgat
gacactgtgg tgatcacct gaagaacatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtctctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagaga
gagaaggagg atgacaagg ctccctggg ggctctcaca cctatgtgtg gcagggtctg
aaggaaaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgctgca cctacagcta tctgagccat
gtggatctgg tgaaggacct gaattctggc ctgattgggg ccctgctggg gtgcagggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt ttatcctgct gtttctgtg
tttgatgagg gcaagtcttg gcaactctgag actaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgctctct ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgctgggc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcattgtgat tggcatgggc
accaccctg aggtgcacag catcttctg gaaggccaca ctttctggt gaggaacct
aggcaggcca gcctggagat cagccctatc accttctgta ctgcccagac cctgctgatg
gatctggggc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tgggatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgcccagag gaggcctcagc tgaggatgaa aaacaatgaa
gaggctgagg attatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggg gagatttgat
gatgacaata gccctagctt tattcagatc aggtctgtgg ctaagaagca cccaagacc
tggggtgcatt acattgctgc tgaggaggag gactgggatt atgctcctct ggtgctggcc
cctgatgata ggagctacaa gagccagtac ctgaataatg gccctcagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc
atccagcatg agtctgggat cctggggccc ctgctgtatg gggagggtgg ggacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggctagcagg ccttacaaca tctatcccc tgggatcact
gatgtgagac ctctgtacag caggaggctg cccaaggggg tcaagcatct gaaagacttc
cccatcctgc ctggggagat ctttaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggccc
accaagtctg accccagggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa catggagagg
gatctggcct ctgggctgat tggccccctg ctgatctggt acaaggaatc tgtggatcag
aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggtctt ggtacctgac tgaaaacatc cagaggttcc tgcccacccc tgcctgggtc
cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg
tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgctg catgaggtgg cctactggta catcctgtct
attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttctttctg gctacacct caagcacaag
atgggtgatg aggacacct gaccctgttc cccttctctg gggagactgt cttatgagc
atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgatttcag gaataggggc

```

```

atgactgctc tgctgaaggt gagctcttgt gacaagaaca ctggggatta ctatgaggac
agctatgagg acatttctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggaggc
tttagccaga atcctcctgt cctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccacctg
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcactatt tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagctctcct
catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa agtgggtgttt
caggagtcca ctgatggctc tttcaccag cctctgtata ggggggagct gaatgagcac
ctggggctgc tgggccccta tatcagggct gagggtggagg ataacatcat ggtgacctc
aggaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tatagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacttac
ttctggaagg tgcagcatca catggcccc accaaggatg agtttgactg taaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcaact ctggcctgat tggccccctg
ctgggtgtgcc ataccaatac tctgaacctt gctcatggca ggcagggtgac tgtgcaggag
tttgcctctgt tcttcaactat ctttgatgag accaagtctt ggtatttcac tgagaatatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt taaggagaac
tataggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgccctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcagggtg gtacctgctg agcatgggggt ctaatgagaa catccacagc
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg agaaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaatctgt accctgggggt ctttgagact gtggagatgc tgccatgcaa ggctgggatc
tggaggggtg agtgccctgat tggggaacat ctgcatgctg ggatgtctac tctgttctctg
gtgtacagca acaagtgccca gacccccctg ggcattggctt 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 cctgatgggtg ttctttggca atgtggacag ctctggcatc
aagcacaaca tctttaacc cctatcatt gctaggtaca tcaggctgca tcccacccat
tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgacg
atgccctgg gcatggagag caaggccatt tctgatgccc agattactgc cagcagctac
ttactaaca tgtttgccac ctggctctccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgect ggaggccccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcagggt ggatttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagctctagc caggatggcc accagtggac tctgttttctc
cagaatggca aggtgaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcaactcc tgtgggtgaac
agcctggacc cccccctgct gaccaggtat ctgaggatc acccccagtc ttgggtgcat
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

```

[0377] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X09 (SEQ ID NO:9)

```

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgtctgc tgagattttg cttttctgccc
actaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgtcttggg actacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttccca cctaggggtgc ctaagagctt tcccttcaat
acctctgtgg tgtacaagaa gacctgttt gtggagtcca ctgaccacct gttcaacatt
gccaaagcta ggccccctg gatgggctg ctgggcccata ccatccaggc tgaagtgtat
gacactgtgg tgatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg
gagaaggaag atgacaaggt gtccctggg ggcagccaca cctatgtctg gcagggtctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgatecc ctgtgcctga cctactctta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggatct gaattctggc ctgattgggg cctgctgggt gtgcaggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcataagt tcactctgct gtttgcctg
tttgatgaag ggaagagctg gcaactctgag actaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcttctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaatagaagc
ctgcctggcc tgattgggtg ccacaggaag tctgtgtact ggcattgtgat tgggatgggc
actaccctg aggtgcatag catcttctct gaaggccata ccttctgggt gaggaatcat
aggcaggctt ctctggaaat ttctcccatc actttctctga ctgctcagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagctctc accagcatga tgggatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgtcctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt caggtttgat

```

gatgacaata gccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagact
tgggtgcaact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgcccctct ggtgctggcc
cctgatgaca ggagctataa gtctcagtac ctgaataatg gccccagag gattgggagg
aagtataaga aggtgaggtt tatggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggagggtgg ggataccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggctctagg ccctacaata tctaccctca tggcatcact
gatgtgagac ccctgtatag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg accccagggt cctgaccagg tattacagct cttttgtgaa catggagagg
gatctggcct ctgggctgat tggccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgaa
aataggtctt ggtatctgac tgagaacatc cagaggtttc tgcccaatcc tgctggggtg
cagctggagg atcctgagtt tcaggcctct aatatcatgc attctatcaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgagggtg cctactggta catcctgagc
attggggctc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctatacttt caagcacaag
atgggtgatg 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
caggagtcca ctgatgggag cttcaccag cccctgtata ggggggagct 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
gctactttt ctgatgtgga tctggagaag gatgtgcaact ctggcctgat tggcctctg
ctgggtgtgcc atactaacac tctgaacct gcccatggga ggcagggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaactat ttttgatgag accaagtctt ggtatttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggtccc ctgcaacatc cagatggaag accccacctt caaggagaac
tataggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgccctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccacagc
atccatttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaacctgt atcctggggg gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggtggcctc
tggaggggtg aatgcctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgttctg
gtgtatagca acaagtgcc gacccccctg ggcatggcct ctggccatat cagggatttc
cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcaactat
tctggcagca tcaatgcctg gagcactaag gagccttttt ctgggatcaa ggtggacctg
ctggccccta tgattattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctctagc
ctgtacatct ctcagttcat cattatgtat agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaata gcactggcac cctgatgggtg ttttttggga atgtggactc ttctgggatc
aagcacaaca tctttaacc ccccatcatt gccagggtata ttaggctgca cccaccac
tacagcatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa ttcttgctct
atgcccctgg gcatggagag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttac
ttaccaaca tgtttgccac ctggctcct agcaaggcca ggctgcatct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcagg gacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact cagggggtga agagcctgct gacctctatg
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggcc accagtggac tctgttcttc
cagaatggga aggtgaaggt gttccagggc aaccaggata gctttacccc tgtggatgac
agcctggacc ctctctgct gaccagatac ctgaggatcc atcctcagag ctgggtgac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

[0378] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X10 (SEQ ID NO:10)

atgcagattg agctgagcac ttgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttttctgct
actaggagggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgacctg

```

ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt tcctttcaac
acctctgtgg tgtacaagaa gaccctgttt gtggagtcca ctgaccacct gttcaacatt
gccaaagcca ggccccctg gatggggctg ctggggccca ccatccaggc tgagggtgat
gacactgtgg tgattaccct gaagaacatg gctagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg
gaaaaggagg atgacaaggt gtccctggg ggcagccata cttatgtgtg gcaggtgctg
aaggagaatg ggccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttacagcta tctgagccat
gtggacctgg tgaaggatct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggg gtgcagggag
ggcagcctgg ctaaggagaa gactcagact ctgcataagt tcactcctgct gtttgcctgtg
tttgatgaag gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat
gctgcctctg ccagggttg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattgggtg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
accaccctg aggtgcacag cattttcctg gagggccaca ccttccctggg gaggatcac
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctggggc agtttctgct gtctgcccac atcagcagcc atcagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ttgcctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggg gaggtttgat
gatgacaata gccccagctt catccagatt aggtctgtgg ccaagaagca ccctaagacc
tgggtgact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccct ggtgctggct
cctgatgaca ggtcttataa gagccagtac ctgaacaatg ggccccagag gatggcagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcttac actgatgaga ccttcaagac tagggaggcc
atccagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggagggtggg ggataccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tttaccctca tggcatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggagactg cccaaggggg tgaagcacct gaaggatttt
cccattctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg atcccagggt cctgactagg tactactctt cttttgtgaa tatggagagg
gatctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggagct ggtacctgac tgagaatatc cagaggttcc tgcctaacc tgctggggtc
cagctggagg atcctgagtt ccaggctagc aacattatgc acagcatcaa tggctatgtg
tttgattctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgagggtg cttactggta catcctgtct
attggggccc agaetgattt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caagcataag
atgggtgatg aggataccct gaccctgttc cccttctctg ggggagactgt gttcatgtct
atggagaacc ctggcctgtg gatcctgggc tgtcataact ctgacttcag aaacaggggc
atgactgccc tgctgaagggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg atatctctgc ttatctgctg agcaagaata atgccattga gcccaggagc
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcactag gactaccctg
cagctgatac aggaggagat tgactatgat gacaccatct ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagtccccc ggtctttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagcccc
catgtgctga ggaacagggc tcagtctggc tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtcttc
caggagtcca ctgatggctc ttttaccag cctctgtaca gaggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttc
agaaaccagg cctctaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca tatggccct actaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcttattttt ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctgggctgat tggccccctg
ctgggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaactat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagagaaatt gtagggctcc ctgcaatate cagatggagg accccacctt caaagaaat
tacagattcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgccctgggct ggtgatggct
caggaccaga ggatcagggtg gtacctgctg agcatggggg ctaatgagaa catccactct
atccatttct ctggccatgt gttcactgtg agaaagaagg aggagtataa gatggctctg
tacaacctgt acccaggggt gtttgagact gtggaaatgc tgcccagcaa agctgggatc
tggagggtgg agtgectgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttctg
tggtacagca acaagtgcc gactccccct ggcattggcct ctgggacatg caggattttt
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac
tetggcagca ttaatgcttg gagcactaag gacccttca gctggatcaa ggtggatctg
ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctctagc

```

```

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

```

[0379] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X11 (SEQ ID NO:11)

```

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttctctgct
accaggagggt actacctggg ggctgtggag ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc taggttccct cccagggtgc ccaagagctt cccctttaat
acctctgtgg tgtacaagaa aaccctgttt gtggagtca ctgacctctt gttcaacatt
gccaaagcca ggcccccttg gatgggcctg ctgggccccca ccattcaggc tgagggtgat
gacactgtgg tcattaccct gaagaacatg gcttctcacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgataagggt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcagggtctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgatccc ctgtgcctga cctactctta tctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggt gtgcagggag
ggctctctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt ttattctgct gtttctgtc
tttgatgagg gcaagagctg gcattctgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaaaatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcattgtgat tggcatgggc
accaccctg aggtgcacag catcttctctg gagggccaca cctttctggt gaggaatcac
aggcaggcca gcctggagat tagccccatc accttctga ctgccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggatag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa aaacaatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaata gccccagctt tattcagatt aggtctgtgg ctaagaagca cccaagact
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgccccctt ggtcctggcc
cctgatgata ggtcttacia gagccagtat ctgaacaatg gccccagag gattggcagg
aagtacaaga aggtgagggt catggcctac actgatgaga cctttaagac cagggaggcc
attcagcatg agtctgggat cctgggcccc ctgctgtatg gggagggtgg ggacactctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccttataaca tctaccctca tgggatcact
gatgtgagge ccctgtactc tagaaggctg cccaaggggg tcaagcacct gaaggattht
cccacctgc ctggggagat tttcaagtac aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
accaagtctg accctagggtg cctgaccagg tactacagct cttttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggcctctg ctgatttget acaaggagtc tgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttttctgt gtttgatgag
aacaggctct ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaacc agctggggtg
cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aatattatgc atagcattaa tggctatgtg
tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgectg catgagggtg cctactggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcataag
atgggtgatg aggacaccct gactctgttc ccttttctg ggggagactgt gtttatgagc
atggagaatc ctggcctgtg gatcctgggc tgccataatt ctgacttcag gaacaggggc
atgactgccc tgctgaaagt gagcagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaagac
agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gccaggagc
ttcagccaga acccccagt gctgaagagg caccagagag agatcaccag gactaccctg
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tttatgatga ggatgagaat cagagcccca ggagctcca gaagaagact
aggcactatt ttattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagctctccc
catgtgctga ggaatagggc ccagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgtc
caggagtca ctgatggcag ctttaccag cccctgtata ggggggagct gaatgagcac

```

```

ctgggcctgc tgggccccta tatcagggtt 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 tggccccctg
ctgggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca ggcagggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg atccccactt caaggagaac
tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacactc tgccctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcagggt gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa tatccatagc
atccacttct ctggccatgt gttcactgtc aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tataatctgt accctggggg gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctggcatc
tggaggggtg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgtttctg
gtgtactcta acaagtgccca 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 tctgatgggt ttctttggca atgtggacag ctctgggatc
aagcacaata tcttcaacc tcccatcatt gctaggtaca tcaggctgca ccccaccac
tatagcatca ggtctaccct gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttcgagc
atgccctgg gcatggagtc caaagctatc tctgatgcc agattactgc cagcagctac
ttaccaaca tgtttgccac ctgggtctccc tctaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccc ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcagg ggatttccag
aaaactatga aggtgactgg ggtgaccacc caggggggtga agtctctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctagc caggatggcc accagtggac tctgttcttc
cagaatggca aggtgaagg gtccaggggc aaccaggaca gcttcacccc tgtgggtgac
tctctggatc cccccctgct gaccaggtag ctgaggattc atccccagag ctgggtgcac
cagattgctc tgagaatgga ggtgctgggg tgtgaggctc aggacctgta ttga

```

[0380] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X12 (SEQ ID NO:12)

```

atgcagattg agctgtctac ttgttttttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgcc
accaggaggt attacctggg ggctgtggag ctgagctggg attacatgca gtctgatctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagagctt ccccttcaac
acctctgtgg tgtataagaa gacctgttt gtggagtca ctgatcatct gtttaacatt
gccaaagcca ggccccctg gatgggcctg ctgggccccaa ctatccaggc tgagggtgat
gacactgtgg tcatcaccct gaagaatatg gccagccatc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgacaagg gtccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcagggtctg
aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cttatagcta cctgtctcat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg cctgctgggt ctgtagggaa
ggcagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt ttattctgct gtttctgtg
tttgatgaag gcaagagctg gcaactctgag accaagaatt ctctgatgca ggatagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg catactgtga atggctatgt gaacagaagc
ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtatt ggcattgtgat tgggatgggc
actaccctg aagtgcacag catttctctg gagggccaca ctttctctgg gaggaccac
aggcaggcct ctctggagat cagccccatt actttctctga ctgcccagac cctgctgatg
gatctgggcc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaataatgag
gaggctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggg gaggtttgat
gatgataata gccccagctt catccagatc aggtctgtgg gactgggact atgcccctct ggtgctggct
tgggtgcact atattgctgc tgaagaggag gactgggact atgcccctct ggtgctggct
cctgatgaca ggagctataa gagccagtat ctgaacaatg ggccccagag gattgggagg
aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cttttaagac cagggaggcc
atccagcatg agtctggcat tctggggccc ctgctgtatg gggagggtgg ggacactctg
ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctacaata tttaccccc tggcatcact
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaaggggg tgaagcacct gaaggacttc
cccatcctgc ctggggagat cttcaagtag aagtggactg tgactgtgga ggatggccct

```

```

accaagtctg accctaggtg tctgactagg tactacagca gctttgtgaa catggagaga
gacctggcct ctggcctgat tggccccctg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag
aggggcaacc agattatgtc tgataagagg aatgtcatcc tgttctctgt gttgatgag
aacaggagct ggtatctgac tgagaacatt cagaggttcc tgccaaccc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc attctattaa tggctatgtg
tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cctactggta catcctgagc
attggggccc agactgactt tctgtctgtg ttttctctg ggtacacctt caagcacaag
atgggtctatg aggacaccct gaccctgttc cccttttctg gggaaactgt gtttatgagc
atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgactttag gaataggggc
atgactgccc tgctgaagggt gagcagctgt gacaagaata ctggggatta ctatgaggac
agctatgagg atatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gcctaggagc
ttcagccaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgac 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 ctttaccag cccctgtaca gaggggagct gaatgagcac
ctgggcctgc tgggccccta catcagggct gaggtggagg ataatatcat ggtgaccttt
aggaaccagg cctctaggcc ctattctttt tacagcagcc tgatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttttggaaag tgcagcacca catggcccc actaaggatg agtttgattg caaggcctgg
gcctatttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcaact ctggcctgat tggccccctg
ctgggtgtgcc acaccaacac tctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tctttaccat ctttgatgag actaagagct ggtatttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagagcccc ttgcaacatc cagatggagg accctacctt caaggagaac
tataggttcc atgccatcaa tgggtacatc atggataccc tgccctggcct ggtgatggct
caggaccaga ggatcaggtg gtacctgctg agcatgggga gcaatgagaa cattcatagc
atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtataa gatggccctg
tacaacctgt accctgggggt gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggetggcatc
tggaggggtg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac tctgttctctg
gtgtacagca acaagtgcc aacccccctg ggcattggcct ctggccacat cagggacttc
cagattactg cctctgggca gtatgggcag tgggccccca agctggccag gctgcaactac
tctgggtcta tcaatgcttg gagcaccaag gagccttca gctggatcaa ggtggatctg
ctggccccca tgatcattca tgggatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtatattt ctcagttcat catcatgtat tctctggatg gcaaaaagtg gcagacctat
agagggaaca gcaactgggac cctgatgggtg ttttttggca atgtggatag ctctggcatc
aagcacaata tcttcaacc cccattatt gccaggtaca tcaggctgca cccaccac
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgctct
atgcctctgg ggatggaaag caaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagcagctat
ttaccaata tgtttgccac ttggagccct agcaaggcta ggctgcatct gcagggcagg
tctaatagcct ggaggccccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcagggt ggacttccag
aagactatga aagtgactgg ggtgaccacc caggggggtga aaagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat tagcagcagc caggatggcc accagtggac cctgttcttc
cagaatggga aggtgaagggt gtttcagggc aatcaggata gcttcacccc agtgggtgaa
agcctggacc ccccctgct gaccaggtac ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

```

[0381] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X13 (SEQ ID NO:13)

```

atgcagattg agctgagcac ctgcttttct ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgct
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggtttccc cccagggtgc ccaagtcttt cccctttaac
acctctgtgg tgtataagaa gactctgttt gtggagtcca ctgatcacct gttcaatatt
gccaaagcca ggcccccttg gatgggcctg ctgggccccca ctatccaggc tgagggtgat
gacactgtgg tcatcaccct gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac cagccagagg
gagaaggagg atgacaagggt gttcccaggg ggggtctcaca cttatgtgtg gcagggtctg
aaggagaatg ggcccatggc ctctgaccct ctgtgcctga cttatagcta cctgtctcat
gtggatctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg ccctgctggt gtgcaggagg

```

gggagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttgcctgg
 tttgatgagg ggaagagctg gcactctgag accaagaata gcctgatgca ggacagggat
 gctgcttctg ctagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
 ctgcctggcc tgattgggtg tcacaggaag totgtgtact ggcatgtgat tggcatgggg
 actactccag aagtgcacag catcttcctg gaggggcaca ccttcctggg gaggaatcac
 aggcaggcca gcctggagat ttctcccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
 gatctggggc agttcctgct gttctgccac atcagcagcc atcagcatga tgggatggag
 gcctatgtga aggtggacag ctgccctgag gagcctcagc tgaggatgaa gaacaatgag
 gaggctgagg actatgatga tgatctgact gactctgaga tggatgtggg gaggtttgat
 gatgacaact ctcccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc
 tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgctcccct ggtgctggct
 cctgatgata ggagctacaa gagccagtat ctgaataatg ggcccagag gattggcagg
 aagtataaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga cctttaagac caggaggct
 attcagcatg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtatg gggagggtgg ggacaccctg
 ctgatcattt tcaagaacca ggccagcagg ccctataaca tctatccccca 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 tgcccacccc tgctggggtc
 cagctggagg accctgagtt tcaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tgggtatgtg
 tttgacagcc tgcagctgtc tgtgtgctg catgaggtgg cctactggta tatcctgagc
 attggggccc agactgattt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caagcacaag
 atgggtgatg 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 totgtgcccc agttcaagaa ggtggtggtt
 caggagtcca ctgatggcag cttcaccag cccctgtaca ggggggagct gaatgagcat
 ctgggcctgc tgggccccta catcagggtt gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc
 agaaatcagg ctagcaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatctctta tgaggaggac
 cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctat
 tcttgggaag tgcagcacca catggcccc accaaggatg agtttgattg caaggcctgg
 gctactctct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcatt ctgggctgat tggccctctg
 ctgggtgtgcc acaccaacac cctgaatcct gcccattgca ggcagggtgac tgtgcaggag
 tttgccctgt tctttactat ctttgatgag accaagtctt ggtattttac tgagaacatg
 gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac
 tacagattcc atgcatcaa tggctacatt atggacactc tgccctggcct ggtgatggcc
 caggaccaga ggatcagggtg gtacctgctg tctatgggca gcaatgagaa cattcactct
 atccacttct ctgggcatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
 tacaacctgt accctggggg gtttgagact gtggagatgc tgccctagcaa ggctgggatc
 tggaggggtg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttctctg
 gtgtacagca acaagtgcc aacccccctg ggcattggcct ctggccacat cagagatttt
 cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggctccta agctggccag gctgactac
 tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttta gctggatcaa ggtggacctg
 ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag actcaggggg ccaggcagaa gttctctagc
 ctgtacatta gccagttcat catcatgtat agcctggatg gcaagaagtg gcagacctac
 aggggcaaca gcaactgggac cctgatgggtg ttctttggga atgtggacag ctctgggatc
 aagcacaata tcttcaaccc cccattatt gccaggata ttaggctgca cccactcac
 tacagcatta ggagcaccct gaggatggag ctgatgggct gtgatctgaa cagctgcagc
 atgcccctgg gcatggagtc taaggccatc tctgatgccc agatcactgc cagctcttac
 ttcaccaaca tgtttgccac ttggagcccc agcaaggcca ggetgcacct gcagggcagg
 agcaatgcct ggaggcecca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcagggt ggatttccag
 aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtg 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

[0382] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X14 (SEQ ID NO:14)

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttttg cttttctgce
 actaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg attacatgca gtctgacctg
 ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc ccaagggtgc ccaagtcttt tcccttcaat
 acctctgtgg tgtacaagaa gacctgttt gtggagtta ctgatcatct gttaacatt
 gccaaagcca ggccccctg gatggggctg ctgggccccca ccatccaggc tgagggtgat
 gatactgtgg tgattacct gaagaatat gccagccatc ctgtgtctct gcatgctgtg
 ggggtgtctt attggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgatcagac cagccagagg
 gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggctctcaca cctatgtgtg gcagggtctg
 aaggagaatg ggcctatggc ctctgaccca ctgtgcctga cttacageta tctgagccat
 gtggacctgg tgaaggacct gaactctggg ctgattgggg ccctgctggt gtgcaggag
 ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagacc ctgcacaagt tcatcctgct gtttctgtg
 tttgatgagg gcaagtcttg gcactctgag accaagaaca gcctgatgca ggatagggat
 gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggctt
 ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
 accaccctg aggtgcatag cattttcctg gagggccaca ccttctctggt gaggaaccac
 aggcaggcta gcctggagat cagccccatc actttcctga ctgcccagac cctgctgatg
 gacctgggcc agttcctgct gttctgccac atctctagcc accagcatga tggcatggag
 gcctatgtga aggtggactc ttgtctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
 gaggtgagg attatgatga tgatctgact gattctgaga tggatgtggt gaggtttgat
 gatgacaaca gccctcttt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc
 tgggtgcaact acattgctgc tgaggaggag gattgggatt atgccccct ggtgctggcc
 cctgatgaca ggagctataa gtctcagtac ctgaacaatg gcccccagag aattggcagg
 aagtacaaga aggtgaggtt catggcctat actgatgaga ccttcaaac cagggaggcc
 attcagcatg agtctggcat cctggggccc ctgctgtatg gggagggtggg ggacaccctg
 ctgatcatct tcaagaacca ggctagcagg ccttacaaca tctacccccca tgggatcact
 gatgtgagge ccctgtacag caggaggctg cctaaggggg tgaagcacct gaaggacttt
 ccattctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatgggccc
 accaagtctg accccagggtg cctgactagg tactacteta gctttgtgaa catggagagg
 gacctggcct ctgggctgat tggccccctg ctgatctggt acaaggagtc tgtggaccag
 aggggcaacc agatcatgtc tgataagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
 aacaggaget ggtacctgac tgagaacatc cagagattcc tgcccacccc tgctgggtg
 cagctggagg atcctgagtt ccaggccagc aacatcatgc attctatcaa tgggtatgtg
 tttgatagcc tgcagctgtc tgtgtgtctg catgagggtg cctactggta cattctgagc
 attggggccc agactgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacttt caaacacaag
 atgggtgatg aggacaccct gacctgttc ccttctctg ggggagactgt gtttatgagc
 atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgccacaact ctgacttcag aacaggggc
 atgactgccc tgctgaagggt gtcttcttgt gataagaaca ctggggacta ttatgaagac
 agctatgagg acatctctgc ctacctgctg agcaagaata atgctattga gccaggctt
 ttctctcaga acccccctgt gctgaagagg caccagaggg agatcaccag gaccaccctg
 cagtctgac aggaggagat tgactatgat gacactattt ctgtggagat gaagaaggaa
 gactttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccta ggagctcca gaagaagact
 aggcattact tcatgtctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc
 catgtgctga ggaatagggc tcagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtgttc
 caggaattca ctgatggcag cttcactcag ccctgtaca ggggggagct gaatgagcac
 ctggggctgc tgggcccctta catcagggct gaggtggagg acaatatcat ggtgaccttt
 aggaaccagg cctctaggcc ttacagcttc tactctagcc tgatctctta tgaagaggac
 cagaggcagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac taagacttac
 ttctggaagg tgcagcacca catggctccc accaaggatg agtttgactg caaggcttgg
 gcctactct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcaact ctgggctgat tgggcccctg
 ctgggtgtgcc acactaacac tctgaatcct gcccatggca gacagggtgac 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	gttcaactgtg	aggaagaagg	aggagtacaa	gatggccctg
tataacctgt	atcctggggg	gtttgagact	gtggagatgc	tgcccagcaa	ggctggcactc
tggagagtgg	agtgcctgat	tggggagcac	ctgcatgctg	gcatgagcac	tctgtttctg
gtgtatagca	acaagtgtca	gaccctctg	ggcatggcct	ctgggcacat	tagggacttt
cagatcactg	cttctggcca	gtatgggcag	tgggctccca	agctggccag	gctgcaactat
tctggcagca	ttaatgcctg	gagcaccaag	gagcctttca	gctggatcaa	ggtggacctg
ctggcccca	tgatcatcca	tgggatcaag	acccaggggg	ctaggcagaa	gttcagcagc
ctgtacatca	gccagtttat	catcatgtat	tctctggatg	gcaagaagtg	gcagacctac
aggggcaatt	ctactggcac	tctgatgggtg	ttctttggga	atgtggatag	ctctgggatc
aagcataata	tcttcaatcc	ccccattatt	gctaggtata	tcaggctgca	ccccaccac
tatagcatca	ggagcaccct	gaggatggag	ctgatggggg	gtgacctgaa	cagctgcagc
atgccctgg	gcatggagag	caaggctatt	tctgatgccc	agatcactgc	cagcagctac
tttactaata	tgtttgccac	ctggagcccc	agcaaggcca	gactgcacct	gcagggcagg
tctaattgct	ggaggcctca	ggtgaataac	cccaaggagt	ggctgcaggt	ggacttccag
aaaacctatga	aggtgactgg	ggtgactacc	caggggggtga	agtctctgct	gaccagcatg
tatgtgaagg	agttcctgat	ctcttctage	caggatggcc	accagtggac	cctgttcttt
cagaatggga	aggtgaagg	cttccagggc	aaccaggata	gcttcacccc	tgtgggtgaat
agcctggatc	ctcctctgct	gaccaggtat	ctgaggatcc	acccccagag	ctgggtgcat
cagattgccc	tgaggatgga	ggtgctgggc	tgtgaggctc	aggacctgta	ctga

[0383] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X15 (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	gtggagtta	ctgaccacct	gttcaacatt
gctaagcca	ggcctccctg	gatggggctg	ctgggcccc	ccatccaggc	tgaggtgat
gatactgtgg	tgattaccct	gaagaacatg	gcctctcatc	cagtgagcct	gcatgctgtg
ggggtgagct	actggaaggc	ctctgaaggg	gctgagtatg	atgaccagac	cagccagagg
gagaaggagg	atgacaagg	gttccctggg	ggcagccaca	cctatgtgtg	gcaggtgctg
aaggagaatg	gccaatggc	ctctgacccc	ctgtgcctga	cttatagcta	cctgagccat
gtggatctgg	tgaaggacct	gaattctggc	ctgattgggg	ccctgctggg	gtgcagagag
ggctctctgg	ctaaggagaa	gaccagact	ctgcacaagt	tcctcctgct	gtttgctgtg
tttgatgagg	gcaagagctg	gcaactctgag	actaagaata	gcctgatgca	ggacagggat
gctgcttctg	ccagggcctg	gccaagatg	catactgtga	atggctatgt	gaacaggagc
ctgctggcc	tgattggctg	tcacaggaaa	tctgtctact	ggcatgtgat	tgggatgggc
actaccctg	aggtgcactc	tatcttctg	gagggccata	ccttctctgg	gaggaaccac
aggcaggcca	gcctggagat	ctctcccatt	accttctga	ctgcccagac	cctgctgatg
gatctgggccc	agttcctgct	gttctgccac	atcagcagcc	accagcatga	tgggatggag
gcttatgtga	aggtggatag	ctgccctgag	gagcccagc	tgaggatgaa	gaacaatgag
gaggctgagg	actatgatga	tgacctgact	gactctgaga	tggatgtgg	gaggtttgat
gatgacaact	ctcccagctt	tattcagatc	aggtctgtgg	ctaagaagca	ccccagact
tgggtgcaact	acattgctgc	tgaggaggag	gactgggact	atgcccctct	ggtgctggct
cctgatgaca	ggtcttacia	gtctcagtac	ctgaataatg	gccctcagag	gattggcagg
aagtacaaga	aggtgaggtt	catggcctac	actgatgaga	ccttcaagac	cagggaggcc
atccagcatg	agtctggcat	cctgggcccc	ctgctgtatg	gggaggtggg	ggataccctg
ctgatcatct	tcaagaatca	ggccagcagg	ccctacaaca	tctaccccc	tggcatcact
gatgtgaggc	cactgtacag	caggaggctg	cccaaggggg	tgaagcatct	gaaggacttc
cccattctgc	ctggggagat	cttcaagtac	aatggactg	tgactgtgga	ggatggccct
accaagtctg	accccagggtg	tctgaccagg	tactacagca	gctttgtgaa	tatggagagg
gacctggcct	ctggcctgat	tggccccctg	ctgatctgct	acaaggagtc	tgtggaccag
aggggcaatc	agatcatgtc	tgataagagg	aatgtgattc	tgttctctgt	gtttgatgag
aacaggagct	ggtacctgac	tgagaacatc	cagaggttcc	tgcccaatcc	tgctgggggtg
cagctggagg	accctgagtt	ccaggccagc	aatatcatgc	acagcatcaa	tggctatgtc
tttgacagcc	tgcagctgtc	tgtgtgctg	catgaggtgg	cttactggta	tattctgagc
attggggccc	agactgattt	cctgtctgtg	ttctttctg	gctatacctt	taagcacaag
atgggtgatg	aggacaccct	gaccctgttc	cccttctctg	gggagactgt	gttcatgtct

```

atggagaacc ctgggctgtg gatcctgggc tgccacaact ctgacttcag gaacaggggg
atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gataagaaca ctggggacta ttatgaggac
agctatgagg acatctctgc ttacctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggtct
ttcagccaga atccccctgt gctgaagagg catcagaggg agatcaccag gaccaccctg
cagtctgatac aggaggagat tgattatgat gacactatct ctgtggaaat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggatgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggatt atggcatgag cagctctccc
catgtgctga ggaacagagc ccagtctggc tctgtgcctc agttcaagaa ggtggtcttc
caggagtcca ctgatggctc tttcaccag 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
ctgggtgtgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt tcttcaccat ctttgatgag actaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaat
tacaggttcc atgccatcaa tggctacatt atggacaccc tgccctggcct ggtgatggcc
caggatcaga ggatcagggtg gtatctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccacagc
atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggaatacaa gatggctctg
tataacctgt accctggggg gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc
tgagggggtg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgagcac cctgttctctg
gtgtatagca ataagtgcc aacccccctg ggcatggctt ctggccacat cagggatttc
cagatcactg cttctggcca gtatggccag tgggctcccc agctggctag gctgcattac
tctgggtcta tcaatgcctg gagcactaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccc a tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ctaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatca gccagttcat cattatgtac agcctggatg gcaagaagtg gcagacttac
aggggcaata gcaactgggac tctgatgggtg ttctttggca atgtggactc ttctggcatc
aagcacaaca tcttcaacc tcccatcatt gccaggtaca ttaggctgca ccctaccac
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggg gtgatctgaa ctcttgacg
atgcctctgg gcatggaaag caaagccatc tctgatgcc agatcactgc ctctagctat
ttaccaata tgtttgccac ctggagccct agcaaggcca ggctgcacct gcagggcaga
tetaatgcct ggaggcccc ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcagg gacttccag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtga agagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctage caggatggcc accagtgag cctgttcttc
cagaatggca aggtgaaagt gttccagggc aaccaggata gcttactcc tgtgggtgac
tctctggacc ctcccctgct gactaggtac ctgaggatc atccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaggccc aggatctgta ctga

```

[0384] 编码FVIII的CpG减少的核酸变体X16 (SEQ ID NO:16)

```

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgccc
accaggaggt actacctggg ggctgtggag ctgtcttggg actatatgca gtctgacctg
ggggagctgc cagtggatgc caggttcccc cccaggggtgc ccaagagctt tctttcaac
acttctgtgg tgtacaagaa gacctgttt gtggagtcca ctgaccacct gttcaatatt
gctaagcccc ggccaccctg gatgggcctg ctgggccccta ccattcaggc tgagggtgat
gacactgtgg tgattactct gaagaatatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtgtctt actggaaggc ctctgagggg gctgagatg atgatcagac ttctcagagg
gagaaggagg atgataaggt gttccctggg ggctctcaca cttatgtgtg gcagggtctg
aaggagaatg gccccatggc ttctgatcca ctgtgcctga cctactctta cctgagccat
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgattgggg cctgctggt gtgcaggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcataagt tcactcctgct gtttctgtg
tttgatgagg ggaagagctg gcaactctgag accaagaatt ctctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcctaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggtct
ctgcctggcc tgattggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcagtgat tggcatgggc
actaccctg aggtgcacag catttctctg gagggccaca ccttctggt caggaacct
aggcaggcct ctctggagat cagccccatc actttctctga ctgcccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttcctgct gttctgccac attagcagcc accagcatga tggcatggag
gcctatgtga aggtggactc ttgccctgag gagccccagc tgaggatgaa gaacaatgag

```

```

gaagctgagg attatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt gaggtttgat
gatgacaaca gccccagett catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc
tgggtgcact acattgctgc tgaggaggag gattgggact atgctcccct ggtgctggct
cctgatgata ggagctacaa gtctcagtac ctgaataatg gccccagag gatggcagg
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 ctgatttgc tacaaggagtc tgtggatcag
aggggcaatc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag
aataggtctt ggtacctgac tgagaacatc cagaggttcc tgcctaatec tgcctgggtg
cagctggagg accctgagtt tcaggccagc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtg
tttgactctc tgcagctgtc tgtgtgcctg catgaggtgg cttactggta tatcctgagc
attggggctc agactgactt cctgtctgtg ttcttttctg gctacacttt taagcacaag
atgggtgatg aggacaccct gacctgttc cccttttctg ggggagactgt gttcatgtct
atggagaacc ctgggctgtg gattctgggc tgtcacaact ctgacttcag aaacaggggc
atgactgccc tgctgaaggt gtctagctgt gacaagaata ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg acatttctgc ctatctgctg agcaagaaca atgccattga gcccaggagc
ttttctcaga atccccctgt gctgaagagg caccagagag agatcaccag gaccactctg
cagtctgac aggaggagat tgattatgat gacactatct ctgtggagat gaagaagag
gactttgata tctatgatga ggatgagaat cagtctccca ggagcttcca gaagaagact
agacactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggact atggcatgag ctctagccct
catgtgctga ggaacagggc ccagtctggg tctgtgcccc agttcaagaa ggtggtgttc
caggagtca ctgatggcag ctttaccag ccctgtata ggggggagct gaatgagcat
ctgggcctgc tgggccccta tattagggct gaagtggagg acaacatcat ggtgaccttt
aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttt tacagcagcc tgattagcta tgaggaggat
cagagacagg gggctgagcc caggaagaac tttgtgaagc ccaatgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagcacca catggcccc accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcttacttct ctgatgtgga cctggagaaa gatgtgact ctggcctgat tgggcccctg
ctgggtgtgc acaccaacac cctgaacctt gcccatggga ggcaggtgac tgtgcaggag
tttgccctgt ttttcaccat ctttgatgag accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagaggaact gcagggcccc ctgtaacatc cagatggagg atcctacttt caaggagaac
tacaggttcc atgccattaa tgggtacatc atggacacc tgccctgggct ggtgatggcc
caggatcaga ggattaggtg gtatctgctg tctatgggct ctaatgagaa catccactct
atccacttct ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtaca gatggccctg
tacaacctgt accctggggg gtttgaaact gtggagatgc tgccctctaa agctgggatc
tggaggggtg agtgccctgat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttctctg
gtgtacagca ataagtgcc gactcccctg ggcattggct ctgggcacat cagggatttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggctag gctgactac
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttct cttggattaa ggtggacctg
ctggctccca tgatcattca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttttctagc
ctgtatatta gccagttcat catcatgtat agcctggatg ggaagaagtg gcagacctac
agggggaata gcaactggcac cctgatgggtg ttttttggca atgtggatc tcttggcatc
aagcataaca tcttcaatcc ccctatcatt gccaggtaaca ttaggctgca tcccacccat
tactctatca ggagcaccct gaggatggag ctgatggggt gtgatctgaa cagctgtagc
atgccctgg gcatggagtc caaggctatc tctgatgcc agatcactgc cagcagctac
ttaccaaca tgtttgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
tctaattgct ggaggcccca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcaggt ggactccag
aagactatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtg agagcctgct gaccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctage caggatgggc atcagtggac cctgtttttt
cagaatggca aagtgaaggt gtttcagggg aatcaggaca gctttacccc tgtggtgaac
agcctggatc ctctctgct gactagatac ctgaggatcc acccccagag ctgggtccac
cagattgctc tgaggatgga ggtgctgggg tgtgaggctc aggacctgta ctga

```

[0385] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X17 (SEQ ID NO:17)

```

atgcagattg agctgagcac ctgcttcttt ctgtgcctgc tgaggttctg cttctctgce

```

accaggaggt actacctggg ggctgtggaa ctgagctggg actatatgca gtctgacctg
 ggggagctgc ctgtggatgc caggttcccc cccagggtgc ccaagtcttt cccctttaac
 acttctgtgg tgtacaagaa gacctgttt gtggagtta ctgaccacct gttcaatatt
 gccaaagcca ggccccctg gatgggcctg ctgggcccaa ccatccagge tgagggtgat
 gatactgtgg tgatcacctt gaagaacatg gccagccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
 ggggtgagct attggaaggc ttctgagggg gctgagtatg atgaccagac tagccagagg
 gagaaggagg atgacaagggt gttccctggg ggggtctcata cctatgtgtg gcagggtctg
 aaggagaatg gccccatggc ctctgacccc ctgtgcctga cctattctta cctgagccat
 gtggacctgg tcaaggacct gaactctggc ctgattgggg ctctgctggg gtgcaggagg
 ggcagcctgg ccaaggagaa gactcagact ctgcataagt tcatcctgct gtttgcctg
 tttgatgagg gcaagagctg gcactctgag accaagaact ctctgatgca ggatagggat
 gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaataggctt
 ctgcctggcc tgattggctg ccataggaag tctgtgtact ggcatgtgat tggcatgggc
 actaccctg aggtgcactc tatcttctctg gaggggcaca ccttctctggg gaggaaccac
 aggcaggcca gcctggagat ctctcccac accttctctga ctgcccagac tctgctgatg
 gacctgggcc agttctctgct gttctgcat atcagcagcc accagcatga tggcatggag
 gcctatgtga aggtggacag ctgcccagag gaaccccagc tgaggatgaa gaacaatgag
 gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggg gaggttgat
 gatgacaaca gccccagctt tattcagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc
 tgggtgact acattgctgc tgaggaggag gactgggatt atgccccct ggtgctggcc
 cctgatgaca ggtcttacia gtctcagtac ctgaacaatg gccccagag gattgggagg
 aagtacaaga aggtgaggtt catggcctac actgatgaga ccttcaagac cagggaggcc
 atccagcatg agtctggcat cctggggccc ctgctgtatg gggagggtgg ggataccctg
 ctgattatct tcaagaacca ggctagcagg cctataaaca tctacccccca tggcattact
 gatgtgagge cctgtactc taggagactg cccaaggggg tgaagcacct gaaagacttc
 cccatcctgc ctggggagat cttcaagtat aagtggactg tgactgtgga ggatggcccc
 actaagtctg accccagggtg cctgaccagg tattacagca gctttgtgaa tatggagagg
 gatctggctt ctggcctgat tgggcctctg ctgatttgct acaaggagtc tgtggatcag
 agggggaacc agattatgtc tgacaagagg aatgtgattc tgttctctgt gtttcatgag
 aacaggagct ggtacctgac tgagaatate cagaggttcc tgccaatcc tgcctatgtg
 cagctggagg accctgagtt ccaggctagc catgaggtgg cttactggta cattctgtct
 tttgacagcc tgcagctgtc cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag
 attggggccc agactgactt gacctgttc ccttctctg gggagactgt gttcatgagc
 atgggtgatg aggacactct gattctgggg tgccacaact ctgatttcag gaacaggggc
 atgactgccc tgctgaagggt gagcagctgt gacaagaaca ctggggatta ttatgaggac
 agctatgagg acatttctgc ctacctgtg gctgaagaga caccagagg agatcactag gaccactctg
 ttcagccaga atccccctgt gactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag
 cagtctgac aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag
 gactttgata tttatgatga ggatgagaac cagagcccca gaagcttcca gaagaagacc
 aggcaactact tcattgctgc tgtggagagg ctgtgggatt atggcatgtc ttctagcccc
 catgtgctga ggaacagggc tcagtctggc tctgtgctc agttcaagaa ggtggtgttc
 caggagtcca ctgatgggag cttcaccag cctctgtaca ggggggagct gaatgaacat
 ctgggcctgc tggggcccta catcagggtt tactctagcc tgatcagcta tgaggaggac
 aggaatcagg cctctaggcc ctacagcttc taggaagaat tttgtgaaac ccaatgagac
 cagaggcagg gggctgagcc taggaagaat accaaggatg agtttgactg taaggcctgg
 ttttgaagg ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcat ctgggctgat tggccccctg
 gcctactct acaccaacac cctgaaccct gccatggca ggcagggtgac tgtgcaggag
 tttgccctgt tcttaccat ctttgatgag actaagagct ggtatctcac tgagaacatg
 gagaggaact gtagggctcc ctgcaacatc cagatggagg atccaacttt caaggagaac
 tacaggttcc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgccctggcct ggtgatggcc
 caggaccaga ggattagggtg gtacctgctg agcatgggct ctaatgagaa catccactct
 atccacttct ctggccatgt gtttactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
 tacaacctgt accctgggggt gtttgagact gtggagatgc tgccctagcaa ggctggcatt
 tggagagtgg agtgtctgat tggggagcac ctgcatgctg ggatgtctac cctgttctt
 tggtactctg acaagtgcc gacccccctg gggatggctt ctgggcacat cagagatttt
 cagattacta cttctgggca gtatggccag tgggctccca agctggccag actgcattac
 tctggctcta ttaatgcttg gagcaccaag gagccttca gctggatcaa ggtggacctg

ctggctccca	tgatcatcca	tggcattaag	actcaggggg	ctaggcagaa	gttcagcagc
ctgtatatatt	ctcagtttat	tatcatgtat	tctctggatg	gcaagaagtg	gcagacttac
aggggcaaca	gcaactggcac	cctgatgggtg	ttctttggca	atgtggacag	ctctgggatc
aagcataaca	tcttcaaccc	ccccattatt	gccaggtaca	tcaggetgca	ccccaccac
tattctatca	ggagcactct	gaggatggag	ctgatggggg	gtgacctgaa	cagctgctct
atgccctgg	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	aggtgaagg	gttccagggc	aatcaggaca	gcttcacccc	tgtgggtgaa
agcctggacc	ccccctgct	gaccaggtac	ctgaggatcc	atccccagag	ctgggtgcac
cagattgctc	tgagaatgga	ggtgctgggc	tgtgaggccc	aggacctgta	ttga

[0386] 编码FVIII的CpG减少的核酸变异体X18 (SEQ ID NO:18)

atgcagattg	agctgtctac	ctgttttttt	ctgtgcctgc	tgaggttctg	cttctctgct
accaggaggt	attatctggg	ggctgtggag	ctgagctggg	actacatgca	gtctgacctg
ggggagctgc	ctgtggatgc	caggtttctt	cccagggtgc	ctaagagctt	ccccttcaac
acctctgtgg	tgtacaagaa	gactctgttt	gtggagtcca	ctgaccacct	gttcaacatt
gccaaagcca	ggccccctg	gatggggctg	ctgggcccc	ctatccaggc	tgaggtgat
gatactgtgg	tgattaccct	gaagaacatg	gcctctcacc	ctgtgtctct	gcatgctgtg
ggggtgagct	actggaaggc	ttctgagggg	gctgaatatg	atgatcagac	ctctcagagg
gagaagggag	atgacaaggt	gtttcctggg	ggcagccaca	cctatgtgtg	gcaggtgctg
aaggagaatg	ggcccatggc	ctctgatccc	ctgtgcctga	cctacagcta	cctgagccat
gtggacctgg	tgaaggacct	gaactctggc	ctgattgggg	ccctgctggg	gtgcagggag
ggcagcctgg	ccaaggaaaa	gaccagacc	ctgcataagt	tcctcctgct	gtttgcctgtg
tttgatgagg	gcaagtcttg	gcactctgag	accaagaaca	gcctgatgca	ggacagggat
gctgcctctg	ctagggcctg	gccaagatg	cacactgtga	atgggtatgt	gaacagatct
ctgcctggcc	tgattggctg	ccacaggaag	tctgtgtact	ggcatgtgat	tggcatgggg
accaccctg	aggtgcatag	catcttctct	gaggggcaca	ccttctctgg	gagaaatcat
aggcaggcca	gcctggagat	tagccccatc	accttctga	ctgcccagac	cctgctgatg
gacctgggcc	agttcctgct	gttctgccc	atcttctagcc	accagcatga	tggcatggag
gcctatgtga	aggtggatag	ctgccctgaa	gagccccagc	tgaggatgaa	gaacaatgag
gaggctgagg	attatgatga	tgatctgact	gactctgaga	tggatgtggg	gaggtttgat
gatgacaaca	gccccagctt	catccagatc	aggtctgtgg	ccaagaagca	ccctaagacc
tgggtgcact	acattgctgc	tgaagaggag	gactgggact	atgccccctt	ggtgctggcc
ccagatgaca	ggtcttacia	gagccagtac	ctgaataatg	gccccagag	gattggggagg
aagtataaga	aagtgagggt	catggcttac	actgatgaga	cctttaagac	tagggaggcc
atcagcatg	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	gtttcatgag
aataggagct	ggtatctgac	tgagaacatc	cagaggttcc	tgcccaatcc	tgctgggggtg
cagctggagg	accctgagtt	ccaggcttct	aacatcatgc	atagcatcaa	tgggtatgtg
tttgactctc	tgcagctgtc	tgtgtgcctg	catgaggtgg	cctattggta	catcctgagc
attggggccc	agactgactt	cctgtctgtg	ttcttctctg	gctacacctt	caagcacaag
atgggtgatg	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	tcaattgctgc	tgtggagagg	ctgtgggact	atggcatgtc	tagcagcccc
catgtgctga	ggaacagagc	ccagtctggc	tctgtgcccc	agttcaagaa	ggtggtgttt

```

caggagtcca ctgatgggag cttcactcag cccctgtata ggggggagct gaatgagcat
ctgggcctgc tggggcccta catcagggct gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc
aggaaccagg ccagcaggcc ctactcttct tactcttctc tgatcageta tgaggaggat
cagaggcagg gggctgagcc taggaagaac tttgtcaagc ctaatgagac taagacctac
ttttggaagg tgcagcacca catggctccc actaaggatg agtttgattg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcaact ctggcctgat tggccccctg
ctgggtgtgtc acaccaatac cctgaaccct gcccatggca ggcaggtcac tgtgcaggag
tttgccctgt ttttactat ctttgatgag actaagtctt ggtacttcac tgagaacatg
gaaaggaatt gcagggtcc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac
tacaggtttc atgccatcaa tggctacatc atggacaccc tgccctggcct ggtgatggct
caggatcaga ggattagggt gtatctgctg agcatgggca gcaatgagaa catccacagc
atccactttt ctggccatgt gttcactgtg aggaagaagg aggagtacaa gatggctctg
tacaatctgt accctggggg gtttgagact gtggagatgc tgcccagcaa ggctgggatc
tgagggggtg agtgccctgat tggggaacac ctgcatgctg gcatgtctac cctgttctctg
gtgtactcta acaagtgcc aactccccct ggcatggcct ctgggcacat cagggacttc
cagatcactg cctctgggca gtatggccag tgggccccta agctggctag gctgcattac
tctggcagca tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccta tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccagacagaa gttctcttct
ctgtacatct ctacgttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacctac
aggggggaatt ctactggcac tctgatgggt ttctttggga atgtggatag ctctgggatc
aagcataata ttttcaacc cccattatt gctaggtaca tcaggetgca cccaaccac
tactctatta ggtctacctt gaggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctcttgtagc
atgcccctgg gcatggagag caaggctatc tctgatgccc agatcaactg cagcagctac
tttaccaaca tgtttgctac ttggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtgaacaac ccaaggagt ggctgcaggg ggattttcag
aagaccatga aggtgactgg ggtgaccact caggggggtg aaagcctgct gactagcatg
tatgtgaagg agtttctgat cagcagctct caggatggcc atcagtggac cctgttcttc
cagaatggca aggtgaagg gttccagggc aaccaggata gcttcacccc tgtggatgaat
agcctggacc cccccctgct gaccaggta cctgaggatcc atccccagag ctgggtgcac
cagattgccc tgaggatgga ggtgctgggc tgtgaagccc aggacctgta ctga

```

[0387] 野生型因子VIII-BDDcDNA (SEQ ID NO:19)

```

ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGGATTCTG CTTTAGTGCC
ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT 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 CTCCCTGGT 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
ACCACTCCTG AAGTGCCTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
CGCCAGGCGT CTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
GAAGCGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
GATGACAACCT CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACCT
TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC
CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATA ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG
TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
GATGTCCGTC CTTTGTATT C AAGGAGATTA CCAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT

```

CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGA CTGTAGA AGATGGGCCA
 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TG TAGATCAA
 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
 ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTCATGTCTG
 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAAC T CAGACTTTCG GAACAGAGGC
 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
 AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC
 TTCTCCCAA ACCCACCAGT CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
 CAGTCAGATC AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
 GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCC GCAGCTTTC A AAGAAAACA
 CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT ATGGGATGAG TAGCTCCCA
 CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC AGTGTCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTTTC
 CAGGAATTTA CTGATGGCTC CTTTACTCAG CCCTTATAAC GTGGAGAACT AAATGAACAT
 TTGGGACTCC TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAAC TTTC
 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC TTATTTCTTA TGAGGAAGAT
 CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC CTAATGAAAC CAAAAC TTAC
 TTTTGGAAG TGCAACATCA TATGGCACCC ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG
 GCTTATTTCT CTGATGTTGA CCTGGAAAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT
 CTGGTCTGCC AACTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 TTTGCTCTGT TTTTACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC TGAAAATATG
 GAAAGAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG ATCCCCTTT TAAAGAGAAT
 TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT
 CAGGATCAA GGATTCGATG GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAAA CATCCATTCT
 ATTCATTTCA GTGGACATGT GTTCACCGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT TACCATCAA AGCTGGAATT
 TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG GGATGAGCAC ACTTTTTCTG
 GTGTACAGCA ATAAGTGTC GACTCCCCTG GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT
 CAGATTACAG CTTCAGGACA ATATGGACAG TGGGCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
 TCCGATCAA TCAATGCCTG GAGACCAAG GAGCCCTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
 TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA GTTCTCCAGC
 CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
 CGAGGAAATT CCACTGGAAC CTTAATGGTC TTCTTTGGCA ATGTGGATTC ATCTGGGATA
 AAACACAATA TTTTAAACC TCCAATTATT GCTCGATAA TCCGTTTGCA CCAACTCAT
 TATAGCATTG GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC TTCATCCTAC
 TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC GACTTCACCT CCAAGGGAGG
 AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAGAGT GGCTGCAAGT GGA CTTCAG
 AAGACAATGA AAGTCACAG AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
 TATGTGAAGG AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
 CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC TGTGGTGAAC
 TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC ACCCCAGAG TTGGGTGCAC
 CAGATTGCC TGAGGATGGA GTTCTGGGC TCGAGGCAC AGGACCTCTA CTGA

[0388] V3因子VIII cDNA (SEQ ID NO:20)

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATACT
 ACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCC
 CCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCA
 CCTGTTCAACATTGCCAAGCCAGGCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACA
 CTGTGGTGTATCACCTGAAGAATGAGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCC
 TCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCA

CACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGA
GCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCC
AAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGTGTGTTTGTATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGA
AACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCT
ATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACC
ACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCTTGAGGGCCACACCTTCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGAT
CAGCCCCATCACCTTCTGACTGCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCA
GCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAAC
AATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGGAGGTTTGTATGATGACAACAG
CCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGG
AGGACTGGGACTATGCCCCCTGGTGTGGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCC
CAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCAT
CCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACC
AGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCAAG
GGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGA
TGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCT
CTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAG
AGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGTATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCTGCC
CAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGT
TTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCAGACTGAC
TTCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTT
CTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACCTCTGACTTCAGGA
ACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAG
GACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAACAGCAGGCACCCAG
CACCAGGCAGAAGCAGTTCAATGCCACCACCATCCCTGAGAATGACATAGAGAAGACAGACCCATGGTTTGGCCACC
GGACCCCATGCCAAGATCCAGAATGTGAGCAGCTCTGACCTGCTGATGCTGCTGAGGCAGAGCCCCACCCCAT
GGCCTGAGCCTGTCTGACCTGCAGGAGGCCAAGTATGAAACCTTCTCTGATGACCCAGCCCTGGGGCCATTGACAG
CAACAACAGCCTGTCTGAGATGACCACTTCAGGCCCCAGCTGCACCCTCTGGGGACATGGTGTTCACCCCTGAGT
CTGGCCTGCAGCTGAGGCTGAATGAGAAGCTGGGCACCACTGCTGCCACTGAGCTGAAGAAGCTGGACTTCAAAGTC
TCCAGCACCAGCAACAACCTGATCAGCACCATCCCCTCTGACAACCTGGCTGCTGGCACTGACAACACCAGCAGCCT
GGGCCCCCCCAGCATGCCTGTGCACTATGACAGCCAGCTGGACACCACCCTGTTTGGCAAGAAGAGCAGCCCCCTGA
CTGAGTCTGGGGGCCCTGAGCCTGTCTGAGGAGAACAATGACAGCAAGCTGCTGGAGTCTGGCCTGATGAACAGC
CAGGAGAGCAGCTGGGGCAAGAATGTGAGCACCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGT
GGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCAGTCTGGCTCTGTGCCCC
AGTTCAAGAAGGTGGTGTTCAGGAGTTCATGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAG
CACCTGGGCCTGCTGGGCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTACCTTCAGGAACCAGGCCAG
CAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCAGGAAGA
TTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCACCAAGGATGAGTTTGC
TGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGT

GTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCT
TTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAG
GACCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGCCTGGTGT
GGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTG
GCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTGTTGAGACT
GTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAG
CACCTGTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGA
TCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGG
AGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGG
GGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGA
CCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATC
TTCAACCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCTGAGGATGGA
GCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCA
CTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGC
AATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGG
GGTGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATCAGCAGCAGCCAGGATG
GCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTACCCCTGTG
GTGAACAGCCTGGACCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCAAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCT
GAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCAGGACCTGTACTGA

[0389] C03因子VIII cDNA (SEQ ID NO:21)

atgcagattg agctgtcaac ttgctttttc ctgtgcctgc tgagattttg tttttccgct
actagaagat actacctggg ggctgtggaa ctgtcttggg attacatgca gagtgacctg
ggagagctgc cagtggacgc acgatttcca cctagagtcc ctaaactcatt ccccttcaac
accagcgtgg tctataagaa aacactgttc gtggagtta ctgatcacct gttcaacatc
gctaagcctc ggccaccctg gatgggactg ctgggaccaa caatccaggc agaggtgtac
gacaccgtgg tcattacact gaaaaacatg gcctcacacc ccgtgagcct gcatgctgtg
ggcgtcagct actggaaggc ttccgaaggg gcagagtatg acgatcagac ttcccagaga
gaaaaagagg acgataaggt gtttcctggc ggggtctcata cctatgtgtg gcaggtcctg
aaagagaatg gccccatggc ttccgaccct ctgtgcctga cctaacttta tctgagtcac
gtggacctgg tcaaggatct gaacagcggg ctgatcggag cactgctggg gtgtagggaa
gggagcctgg ctaaggagaa aaccagaca ctgcataagt tcattctgct gttcgcctg
tttgacgaag gaaaatcatg gcacagcggg acaaagaata gtctgatgca ggaccgggat
gccgcttcag ccagagcttg gcccaaatg cacactgtga acggctacgt caatcgctca
ctgcctggac tgatcggctg ccaccgaaag agcgtgtatt ggcatgtcat cggaatgggc
accacacctg aagtgcactc cattttcctg gaggggcata cctttctggg ccgcaaccac
cgacaggcct ccctggagat ctctccaatt accttctga cagctcagac tctgctgatg
gatctgggac agttcctgct gttttgccac atcagctccc accagcatga tggcatggag
gcctacgtga aagtggacag ctgtcccggg gaacctcagc tgaggatgaa gaacaatgag
gaagctgaag actatgacga tgacctgacc gactccgaga tggatgtggg ccgattcgat
gacgataaca gccctcctt tatccagatt agatctgtgg ccaagaaaca ccctaagaca
tggttccatt acatcgcagc cgaggaagag gactgggatt atgcaccact ggtgctggca
ccagacgatc gatcctacaa atctcagtat ctgaacaatg gaccacagcg gattggcaga
aagtacaaga aagtgagggt catggcttat accgatgaaa ctttcaagac tgcggaagca
atccagcacg agagcgggat tctgggacca ctgctgtacg gagaagtggg ggacaccctg
ctgatcattt ttaagaacca ggccagcagg ccttacaata tctatccaca tgggaattaca
gatgtgcgcc ctctgtacag ccggagactg ccaaagggcg tcaaacacct gaaggacttc
ccaatcctgc ccggggaaat ttttaagtat aaatggactg tcaccgtcga ggatggcccc
actaagagcg accctagggtg cctgaccgcg tactattcta gtttcgtgaa tatggaaagg
gatctggcca gcggactgat cggcccactg ctgatttggt acaaagagag cgtggatcag
agaggcaacc agatcatgtc cgacaagagg aatgtgatc tgttcagtg ctttgacgaa
aaccggtcat ggtatctgac cgagaacatc cagagattcc tgcctaatac agccggagtg
cagctggaag atcctgagtt tcaggcttct aacatcatgc atagtattaa tggctacgtg
ttcgacagtc tgcagctgtc agtgtgtctg cacgaggctg cttactggta tatcctgagc
attggagcac agacagattt cctgagcgtg ttcttttccg gctacacttt taagcataaa
atgggtgatg aggacacact gactctgttc cccttcagcg gcgaaaccgt gtttatgtcc
atggagaatc ccgggctgtg gatcctggga tgccacaaca gcgatttcag gaatcgcggg
atgactgccc tgctgaaagt gtcaagctgt gacaagaaca ccggagacta ctatgaagat

```

tcatacagagg acatcagcgc atatctgctg tccaaaaaca atgccattga acccaggtct
tttagtcaga atcctccagt gctgaagagg caccagcgcg agatcaccocg cactaccctg
cagagtgatc aggaagagat cgactacgac gatacaatct ctgtggaaat gaagaaagag
gacttcgata tctatgacga agatgagaac cagagtcctc gatcattcca gaagaaaacc
cggcattact ttattgctgc agtggagcgc ctgtgggatt atggcatgtc ctctagtcct
cacgtgctgc gaaatcgggc ccagtcaggg agcgtcccac agttcaagaa agtggctctc
caggagttta cagacggatc ctttactcag ccactgtacc ggggcgaact gaacgagcac
ctggggctgc tgggacccta tatcagagct gaagtggagg ataacattat ggtcaccttc
agaaatcagg catctaggcc ttacagtttt tattcaagcc tgatctctta cgaagaggac
cagaggcagg gagcagaacc acgaaaaaac ttcgtgaagc ctaatgagac caaacatac
ttttggaagg tgcagcacca tatggcccca acaaaaagacg aattcgattg caaggcatgg
gcctattttt ctgacgtgga tctggagaag gacgtccaca gtggcctgat cgggccactg
ctgggtgtgc ataactaacac cctgaatccc gcacacggca ggcaggtcac tgtccaggaa
ttcgcctgt tctttaccat ctttgatgag acaaaaagct ggtacttcac cgaaaacatg
gagcgaaatt gccgggctcc atgtaatatt cagatggaag accccacatt caaggagaac
taccgctttc atgccatcaa tgggtatatt atggatactc tgcccggact ggtcatggct
caggaccaga gaatcagggtg gtacctgctg agcatgggggt ccaacgagaa tatccactca
attcatttca gcggacacgt gtttactgtc cggaagaaag aagagtataa aatggccctg
tacaacctgt atcccggcgt gttcgaacc gtcgagatgc tgccatgcaa ggcagggatc
tggagagtgg aatgcctgat tggggagcac ctgcatgccg gaatgtctac cctgtttctg
gtgtacagta ataagtgtca gacaccctg 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
cgcggaata gcacagggac tctgatgggtg ttctttggca acgtggacag ttcagggatc
aagcacaaca ttttcaatcc ccctatcatt gctagataca tcaggctgca cccaacccat
tattctattc gaagtacact gcggatggaa ctgatgggggt gcgatctgaa cagttgttca
atgccctgg gaatggagt ccaaggcaatc tctgacgcc agattaccgc tagctcctac
ttcactaata tgtttgctac ctggagcccc tccaaagcac gactgcatct gcagggacga
agcaacgcat ggcgaccaca ggtgaacaat cccaaggagt ggctgcagggt cgattttcag
aaaactatga aggtgaccgg agtcacaact cagggcgtga aaagtctgct gacctcaatg
tacgtcaagg agttcctgat ctctagttca caggacggcc accagtgagc actgttcttt
cagaacggaa aggtgaaagt cttccagggc aatcaggatt cctttacacc tgtgggtcaac
tctctggacc caccctgct gactcgtac ctgocgaatcc acccacagtc ctgggtgcat
cagattgcac tgagaatgga agtccctgggc tgcgaggccc aggacctgta ttga

```

[0390] 包含突变TTR启动子 (TTRmut)、合成内含子、CpG减少的因子VIII cDNA、多聚腺苷酸和ITR的全长表达盒 (SEQ ID NO:23)

```

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaaag cccgggcgctc
gggcgacctt tggtegcccg gcctcagtga gcgagcgcg gcgcagagag ggagtggcca
actccatcac taggggttcc tacgcgtgtc tgtctgcaca tttcgtagag cgagtgttcc
gatactctaa tctccctagg caaggttcat attgacttag gttacttatt ctcttttgt
tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttggagttag ctggcaggg atcagcagcc
tgggttgga ggagggggta taaaagcccc ttcaccagga gaagcctgca cacagatcca
caagctcctg ctagcaggta agtgcctgtg gtgggtccc cgggcctggc ctctttacgg
gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactg acactgacat ccacttttct tttttctca
caggtttaa cgccaccatg cagattgagc tgagcacctg cttcttctctg tgtctgctga
ggttctgctt ctctgccacc aggaggtatt acctgggggc tgtggagctg agctgggact
atatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgctag gttccccccc agggtgcca
agagcttccc ctttaacact tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg
accacctgtt caacattgcc aagcccagge ccccctggat ggggctgctg gggcccacca
tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcacctgaa gaacatggcc agccacctg
tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcttc tgagggggct gagtatgatg
accagactag ccagagggag aaggaggatg acaagggttt tctggggggc agccatacct
atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccctg tgctgacct
acagctacct gtctcatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggctc

```

tgctggtgtg	tagggagggc	agcctggcta	aggaaaagac	ccagaccctg	cataagttaa
tccctgctgtt	tgctgtgttt	gatgagggca	agagctggca	ctctgagacc	aagaacagcc
tgatgcagga	tagggatgct	gcctctgccca	gggcttggcc	taagatgcac	actgtgaatg
ggatgtgaa	taggagcctg	cctggcctga	ttggctgccca	caggaagtct	gtgtactggc
atgtgattgg	gatgggcacc	accctgagg	tccatagcat	cttcctggag	ggccacactt
tccctggtgag	gaaccacaga	caggcctctc	tggagatctc	tcccatcacc	ttcctgactg
ctcagactct	gctgatggac	ctgggccagt	tcctgctgtt	ttgccatatt	agcagccacc
agcatgatgg	gatggaggcc	tatgtgaagg	tggatagctg	cctgaggag	cctcagctga
ggatgaagaa	caatgaggag	gctgaagact	atgatgatga	cctgactgat	tctgagatgg
atgtggtgag	gtttgatgat	gacaatagcc	ccagcttcat	tcagatcagg	tctgtggcca
agaaacaccc	caagacctgg	gtgactaca	ttgctgctga	ggaagaggac	tgggactatg
ctcccctggt	gctggcccct	gatgataggt	cttataagag	ccagtacctg	aacaatgggc
cccagaggat	tggcaggaag	tacaagaagg	tgaggttcat	ggcctacact	gatgaaacct
tcaaaaaccag	ggaggccatt	cagcatgagt	ctggcatcct	gggccctctg	ctgtatgggg
aggtggggga	caccctgctg	atcatcttca	agaaccaggc	cagcaggccc	tacaacatct
atcctcatgg	catcaactgat	gtgaggcccc	tgtacagcag	gaggctgccc	aagggggtga
agcacctgaa	agacttcccc	atcctgectg	gggagatctt	taagtataag	tggactgtga
ctgtggagga	tggccctacc	aagtctgacc	ccaggtgtct	gaccaggtac	tattctaget
ttgtgaacat	ggagagggac	ctggcctctg	gctgatttg	gcccctgctg	atctgttaca
aggagtctgt	ggaccagagg	ggcaaccaga	tcatgtctga	caagaggaat	gtgatcctgt
tttctgtgtt	tgatgagaat	aggagctggt	acctgactga	gaacatccag	aggttctg
ccaatcctgc	tggggtgcag	ctggaggatc	ctgagtcca	ggccagcaat	atcatgcata
gcatcaatgg	ctatgtgttt	gacagcctgc	agctgtctgt	gtgcctgcat	gaggtggcct
actggtacat	cctgagcatt	ggggcccaga	ctgactttct	gtctgtgttc	tttctggct
ataccttcaa	gcacaagatg	gtgtatgagg	atacctgac	cctgttcccc	ttctctgggg
agactgtgtt	catgagcatg	gagaatcctg	ggctgtggat	cctgggggtgc	cacaactctg
attttaggaa	cagggggatg	actgccctgc	tgaagggtgc	tagctgtgat	aagaactctg
gggactacta	tgaggacagc	tatgaggaca	tttctgctta	tctgctgtct	aagaataatg
ccattgagcc	cagaagcttc	agccagaatc	ccctgtgct	gaagagacat	cagagggaga
tcaccagaac	taccctgcag	tctgatcagg	aggagattga	ctatgatgac	actatctctg
tggagatgaa	gaaggaggac	tttgacatct	atgatgagga	tgagaatcag	tctccagga
gctttcagaa	gaagaccaga	cattacttca	ttgctgctgt	ggagaggctg	tgggactatg
gcatgagctc	tagccctcat	gtgctgagga	acagggccca	gtctggctct	gtgccccagt
tcaagaaggt	ggtgttccag	gaattcactg	atggcagctt	caccagccc	ctgtacaggg
gggagctgaa	tgagcacctg	ggcctgctgg	ggccttata	cagggctgag	gtggaggata
atattatggt	gactttcagg	aaccaggcca	gcaggcccta	ctctttctat	agcagcctga
tctcttatga	ggaggatcag	aggcaggggg	ctgagcctag	gaagaacttt	gtgaagccca
atgagactaa	gacctacttc	tggaaagtcc	agcaccacat	ggccccacc	aaggatgagt
ttgactgcaa	ggcctggggc	tatttctctg	atgtggatct	ggagaaggat	gtccattctg
ggctgattgg	ccccctgctg	gtgtgccaca	ctaactctt	gaatctgccc	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	ccacagcadc	cacttctctg	ggcatgtgtt	cactgtgagg	aagaaggagg
agtacaagat	ggctctgtat	aatctgtacc	ctgggggtgt	tgaaactgtg	gagatgctgc
cctctaaggc	tggcatctgg	aggggtggagt	gectgattgg	ggagcacctg	catgctggca
tgagcaccct	gttccctggg	tacagcaaca	agtgccagac	ccccctgggc	atggcctctg
gccacatcag	ggacttccag	atcactgect	ctggccagta	tggccagtgg	gcccccaagc
tggccaggct	gcactattct	ggcagcatca	atgcctggag	caccaaggag	cccttcagct
ggatcaaggt	ggacctgctg	gccccatga	tcattcatgg	catcaagacc	cagggggcca
ggcagaagtt	cagctctctg	tacatctctc	agttcatcat	catgtactct	ctggatggga
agaagtggca	gacctacagg	ggcaacagca	ctggcaccct	gatgggtgtc	tttgggaatg
tggactcttc	tggcatcaag	cacaacatct	tcaatcccc	catcattgct	aggtatatta
ggctgcatcc	caccactac	agcatcaggt	ctaccctgag	gatggagctg	atgggctgtg
acctgaactc	ttgcagcatg	cccctgggca	tggagctctaa	ggccatctct	gatgcccaga
ttactgccag	cagctacttc	accaacatgt	ttgccacctg	gagccccctct	aaggccaggc
tgcactctgca	ggggaggagc	aatgcctgga	ggcctcaggt	gaacaacccc	aaggagtggc
tgcaggtgga	tttccagaag	accatgaagg	tgactggggt	gaccaccag	ggggtcaaga

```

gacctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag gatggccacc
agtggactct gttctttcag aatgggaagg tgaagggtgt tcagggcaat caggactctt
tcaccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatacctg aggatccacc
cccagtcttg ggtgcatcag attgcctga ggatggaggt gctgggctgt gaggctcagg
atctgtactg agcggcgcga ataaaagatc agagctctag agatctgtgt gttggttttt
tgtgtaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcctc gctcgtcac
tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccagc cccgggcttt gccggggcgg cctcagtgag
cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagg

```

[0391] 包含突变TTR启动子 (TTRmut)、合成内含子、CpG减少的因子VIII cDNA、多聚腺苷酸和ITR的全长质粒 (SEQ ID NO:24)

```

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc cggggcaaag cccgggcgtc
gggcgacctt tggtegcccc gcctcagtga gcgagcgcgc gcgcagagag ggagtggcca
actccatcac taggggttcc tacgcgtgct tgtctgcaca tttcgtagag cgagtgttcc
gataactctaa tctccctagg caaggttcat attgacttag gttacttatt ctcttttgt
tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttggagtcag cttggcaggg atcagcagcc
tgggttggaa ggagggggta taaaagcccc ttcaccagga gaagccgtca cacagatcca
caagctcctg ctagcaggta agtgccgtgt gtggttccc cgggcctggc ctctttacgg
gttatggccc ttgcgtgctt tgaattactg aactgacat ccactttttc tttttctcca
caggtttaa cgcaccatg cagattgagc tgagcacctg cttcttctctg tgtctgctga
ggttctgctt ctctgccacc aggaggtatt acctgggggc tgtggagctg agctgggact
atatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgctag gttccccccc agggtgcca
agagcttccc ctttaacact tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg gagttcactg
accacctgtt caacattgcc aagcccagge ccccctggat ggggctgctg gggcccacca
tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc agccacctg
tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcttc tgagggggct gagtatgatg
accagactag ccagagggag aaggaggatg acaaggtgtt tcctgggggc agccatacct
atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggctc tgacccccctg tgectgacct
acagctacct gtctcatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg attggggctc
tgctggtgtg tagggagggc agcctggcta aggaaaagac ccagaccctg cataagttta
tctctgctgt ttgctgtgtt gatgagggca agagctggca ctctgagacc aagaacagcc
tgatgcagga tagggatgct cctctgcca gggcttgccc taagatgcac actgtgaatg
ggtatgtgaa taggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct gtgtactggc
atgtgatgg gatgggcacc acccctgagg tccatagcat ctctctggag ggccacactt
tctgtgtgag gaaccacaga caggcctctc tggagatctc tcccatcacc ttctgactg
ctcagactct gctgatggac ctgggccagt tctgctgttt ttgccatatt agcagccacc
agcatgatgg gatggaggcc tatgtgaagg tggatagctg cctgaggag cctcagctga
ggatgaagaa caatgaggag gctgaagact atgatgatga cctgactgat tctgagatgg
atgtggtgag gtttgatgat gacaatagcc ccagcttcat tcagatcagg tctgtggcca
agaaacacc caagacctgg gtgcactaca ttgctgctga ggaagaggac tgggactatg
ctcccctggt gctggcccct gatgataggt cttataagag ccagtaacctg aacaatgggc
cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tgaggttcat ggcctacact gatgaaacct
tcaaaaccag ggaggccatt cagcatgagt ctggcatcct gggcctctg ctgtatgggg
aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccagge cagcagccc tacaacatct
atcctcatgg catcactgat gtgagcccc tgtacagcag gaggctgccc aagggggtga
agcacctgaa agacttcccc atcctgctg gggagatctt taagtataag tggactgtga
ctgtggagga tggcctacc aagtctgacc ccaggtgtct gaccaggtac tattctagct
ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gctgattgg gcccctgctg atctgctaca
aggagtctgt ggaccagag ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat gtgatcctgt
ttctgtgttt tgatgagaat aggagctggt acctgactga gaacatccag aggttctgc
ccaatcctgc ctatgtgttt ctagcctgac agctgtctgt gtgctgcat gaggggcct
gcatcaatgg cctgagcatt gggcccaga ctgactttct gtctgtgttc tttctggct
ataccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg ataccctgac cctgttcccc ttctctgggg
agactgtgtt catgagcatg gagaatcctg ggctgtggat cctgggggtgc cacaactctg
atcttaggaa cagggggatg actgcctgct tgaaggtgtc tagctgtgat aagaactctg
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 cattaacttca ttgctgctgt ggagaggctg tgggactatg
gcatgagctc tagcctcat gtgctgagga acagggccca gtctggctct gtgccccagt
tcaagaaggt ggtgttccag gaattcactg atggcagctt caccagccc ctgtacaggg
gggagctgaa tgagcacctg ggctgctgg ggcttatac cagggtgag gtggaggata
atattatggt gactttcagg aaccaggcca gcaggcccta ctctttctat agcagcctga
tctcttatga ggaggatcag aggcaggggg ctgagcctag gaagaacttt gtgaagcca
atgagactaa gacctacttc tgggaaggtcc agcaccacat ggccccacc aaggatgagt
ttgactgcaa ggcctgggccc tatttctctg atgtggatct ggagaaggat gtccattctg
ggctgattgg cccctgctg gtgtgccaca ctaaacactct gaatcctgcc catggcaggc
aggtgactgt ccaggagttt gcctgtttct tcaactatctt tgatgagacc aagagctggt
actttactga gaacatggag aggaactgca gagctccttg caatattcag atggaggacc
ccaccttcaa ggagaattac aggttccatg ccattaatgg gtacatcatg gacaccctgc
ctggcctggt gatggctcag gaccagagga tcaggtggtta cctgctgagc atgggctcta
atgagaatat ccacagcatc cacttctctg ggcattgttt cactgtgagg aagaaggagg
agtacaagat ggctctgtat aatctgtacc ctgggggtgt tgaactgtg gagatgctgc
cctctaaggg tggcatctgg aggggtggagt gctgattgg ggagcacctg catgctggca
tgagcacctc ggtcctgggtg tacagcaaca agtggccagac cccctggggc atggcctctg
ggcacactcag ggacttccag atcactgccc atggccagta tggccagtgg gccccaaagc
tggccaggct gcactattct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag cccttcagct
ggatcaaggt ggacctgctg gccccatga tcattcatgg catcaagacc cagggggcca
ggcagaagtt cagctctctg tacatctctc agttcatcat catgtactct ctggatggga
agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcacctc gatggtgttc ttgggaaatg
tggactcttc tggcatcaag cacaacatct tcaatcccc catcattgct aggtatatta
ggctgcatcc caccactac agcatcaggt ctaccctgag gatggagctg atgggctgtg
acctgaactc ttgcagcatg cccctgggca tggagtctaa ggccatctct gatgccaga
ttactgccag cagctacttc accaacatgt ttgccacctg gagccccctc aaggccaggc
tgcactctgca ggggaggagc aatgcctgga ggcctcaggt gaacaacccc aaggagtggc
tgcaggtgga tttccagaag accatgaagg tgactgggggt gaccaccag ggggtcaaga
gctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tectgatcag cagcagccag gatggccacc
agtggactct gttctttcag aatgggaagg tgaaggtgtt tcagggcaat caggactctt
tcaccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagataacctg aggatccacc
cccagtcttg ggtgcatcag attgcctga ggatggaggt gctgggctgt gaggctcagg
atctgtactg agcggccgca ataaaagatc agagctctag agatctgtgt gttggtttt
tgtgtaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcccctc gctcgtcac
tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccagc gcttgaagga aataactaagg caaaggtact
cgagcgcgag cgagctgcc cttatgcgga ttattgccc agtgcccggc cgcccggggc
gcaagtgtc gcaacattcg gtacagccg gtgggtgat attgccaaa cagagctgtg
ggggagagtt gtcgagaaag agtgcggaag atgcaaaggc gtcggctatt caaggtgcc
agcaagcgca gcatatcgcg ctgtgacgat gctaatccca aaccttacc aaccacctg
gtcacgcaact gttaaagccg tgtatgacgc tctgggtgggt caatgccaca aagaagagtc
aatcgcagac aacattttga atgcggtcac acgttagcag catgattgcc acggatggca
acatattaac ggcattgatat tgacttattg aataaaattg ggtaaatttg actcaacgat
gggttaattc gctcgttgtg gtagttagat gaaaagaggc ggcgcttact accgattccg
cctagttggt cacttcgacg tatcgtctgg aactccaacc atcgcaggca gagaggtctg
caaaatgcaa tcccgaaca gttcgcaggt aatagttaga gcctgcataa cggtttcggg
atthtttata tctgcacaac aggtaaagagc attgagtcga taatcgtgaa gagtcggcga
gctggttag ccagtgtctt ttccgttgtg ctgaattaag cgaataccgg aagcagaacc
ggatcaccaa atgcgtacag gcgtcatcgc cgccagcaa cagcacaacc caaactgagc
cgtagccact gtctgtcctg aattcattag taatagttac gctgcggcct ttacacatg
accttcgtga aagcgggtgg caggaggtcg cgctaacaac ctctgcccgt ttgcccgtg
catatcggtc acgaacaaat ctgattacta aacacagtag cctggatttg ttctatcagt
aatcgacctt attcctaatt aatagagca aatcccctta ttgggggtaa gacatgaaga
tgccagaaaa acatgacctg ttggccgcca ttctcgcggc aaaggaacaa ggcacgggg
caatccttgc gtttgcaatg gcgtacctc gggcgagata taatggcggg gcgtttacaa
aaacagtaat cgacgcaacg atgtgcgcca ttatcgcta gttcattcgt gaccttctcg

```

acttcgccgg actaagtagc aatctcgctt atataacgag cgtgtttatc ggctacatcg
gtactgactc gattggttcg cttatcaaac gcttcgctgc taaaaaagcc ggagtagaag
atggtagaaa tcaataatca acgtaaggcg ttctcgcgata tgctggcgctg gtcggaggga
actgataacg gacgtcagaa aaccagaaat catggttatg acgtcattgt aggcggagag
ctatttactg attactccga tcaccctcgc aaacttgtca cgctaaaccc aaaactcaa
tcaacaggcg ccggacgcta ccagcttctt tcccgttggg gggatgccta ccgcaagcag
cttggcctga aagacttctc tccgaaaagt caggacgctg tggcattgca gcagattaag
gagcgtggcg ctttacctat gattgatcgt ggtgatatcc gtcaggcaat cgaccgttgc
agcaatatct gggcttcaact gccgggcgct ggttatggtc agttcagagca taaggctgac
agcctgattg caaaattcaa agaagcgggc ggaacgggtca gagagattga tgtatgagca
gagtcaccgc gattatctcc gctctggtta tctgcatcat cgtctgcctg tcatgggctg
ttaatcatta ccgtgataac gccattacct acaaagccca gcgcgacaaa aatgccagag
aactgaagct ggcgaaacgc gcaattactg acatgcagat gcgtcagcgt gatgttgctg
cgctcgatgc aaaatacacg aaggagttag ctgatgctaa agctgaaaaat gatgctctgc
gtgatgatgt tgccgctggg cgtcgtcggg tgcacatcaa agcagctctgt cagtcagtgc
gtgaagccac caccgcctcc ggcgtagata atgcagcctc cccccgactc gcagacaccg
ctgaacggga ttatttcacc ctgagagaga ggtgatcac tatgcaaaaa caactggaag
gaaccagaa gtatattaat gagcagtgc gatagagtg cccatatega tgggcaactc
atgcaattat tgtgagcaat acacacgcgc ttccagcggg gtataaatgc cttaaagtaat
aaaaccgagc aatccattta cgaatgtttg ctgggttct gttttaacaa cattttctgc
gccgccacaa attttggtg catcgacagt tttcttctgc ccaattccag aaacgaagaa
atgatgggtg atggtttcct ttggtgctac tgctgccggt ttgttttgaa cagtaaactg
ctgttgagca catcctgtaa taagcagggc cagcgcagta gcgagtagca ttttttcat
gggtttatc ccgatgcttt ttgaagttcg cagaatcgta tgtgtagaaa attaaacaaa
ccctaaacaa tgagttgaaa tttcatattg ttaatattta ttaatgtatg tcaggtgca
tgaatcgtca ttgtattccc ggattaacta tgtccacagc cctgacgggg aacttctctg
cgggagtgtc cgggaataat taaaacgatg cacacagggg ttagcgcgta cacgtattgc
attatgccaa cgccccggg atgctctcag agaaaccgga cgttatgatt tagcgtggaa
agatttgtgt agtgttctga atgttctcag taaatagtaa tgaattatca aaggtatagt
aatatcttt atgttcatgg atatttgtaa cccatcggaa aactcctgct ttagcaagat
ttccctgta ttgctgaaat gtgatttctc ttgatttcaa cctatcatag gacgtttcta
taagatgcgt gtttcttgag aatttaacat ttacaacctt ttaagtcc tttattaaca
cgggtttatc gttttctaac acgatgtgaa tattatctgt ggctagatag taaatataat
gtgagacggt gtgacgtttt agttcagaat aaaacaattc acagtctaaa tcttttcgca
cttgatcgaa tatttcttta aaaatggcaa cctgagccat tggtaaaacc ttccatgga
tccagagggc cgtagtttgc attatcgttt ctatcgttc aatctggctc gacctcctg
tgttttggg atgatttatg tcaaatatta ggaatgttt cacttaatag tattggttgc
gtaacaaagt gcggtcctgc tggcattctg gagggaaata caaccgacag atgtatgtaa
ggccaacgtg ctcaaatctt catacagaaa gatttgaagt aatattttaa ccgctagatg
aagagcaagc gcatggagcg acaaaatgaa taaagaacaa tctgctgatg atccctcctg
ggatctgatt cgtgtaaaaa atatgcttaa tagcaccatt tctatgagtt accctgatgt
tgtaattgca tgtatagaac ataaggtgct tctggaagca ttccagagcaa ttgaggcagc
gttgggtgag cacgataata atatgaagga ttattcctg gtgggtgact gatcaccata
actgctaact attcaacta tttagctctg gacagagcca acacgcagtc tgtcactgct
aggaaagtgg taaaactgca actcaattac tgcaatgcc tcgtaattaa gtgaatttac
aatatcgtcc tgttcggagg gaagaacgcg ggatgttcat tcttcatcac ttttaattga
tgtatatgct ctcttttctg acgttagtct ccgacggcag gcttcaatga cccaggctga
gaaattccc gacccttttt gctcaagagc gatgttaatt tgttcaatca tttggttagg
aaagcggatg ttgcgggttg ttgttctgcg ggttctgttc ttcgttgaca tgaggttgcc
ccgtattcag tgctcgtgat ttgtattgct tgaagtgtt tttacgttaa gttgatgcag
atcaattaat acgataacct cgtcataatt gattatttga cgtggtttga tggcctccac
gcacgttggt atatgtagat gataatcatt atcactttac gggctccttc cggtgatccg
acaggttacg gggcggcgac ctgcctgatg cggtatcttc tcttaccgca tctgtcgggt
atctcacacc gcatacgtca aagcaacct agtacgcgc ctgtagcgc gcaataagcg
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga cegetacact tgccagcgc ttagcgcgcg
ctcctttcgc tttcttccct tcttttctgc ccacgttcgc cggcttccc cgtcaagctc
taaactcggg gctcccttta gggttccgat ttagtgctt acggcacctc gaccccaaaa
aacttgattt ggggtgatgg tcaactagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc
ctttgacggt ggagtcacag ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac

```

tcaactctat ctcgggctat tcttttgatt tagacctgca ggcattgcaag cttggcactg
gccgctcgtt tacaacgctg tgactgggaa aaccctggcg ttaccaact taatcgcctt
gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgcctt
tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgcgatttat tcaacaaagc cgccgtcccg
tcaagtcagc gtaatgctct gccagtgtta caaccaatta accaattctg attagaaaaa
ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt
ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc
aagatcctgg tatcgggtctg cgattccgac tegtccaaca tcaatacaac ctattaattt
cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcgca 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 agtgggtgagt aaccatgcat catcaggagt
acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac
catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcc tgtttcagaa acaactctgg
cgcatcgggc ttcccataca atcgatagat tgtcgcacct gattgcccga cattatcgcg
agcccattta taccatata aatcagcacc catgttggaa ttaatcgcg gcttcgagca
agacgtttcc cgttgaatat ggctcataac accccttcta ttactgttta tgtaagcaga
cagttttatt gttcatgatg atataatttt atcttctgca atgtaacatc agagattttg
agacacaacg tggctttggt gaataaatcg aacttttctg gagttgaagg atcagatcac
gcatcttccc gacaacgcag accgttccgt ggcaaagcaa aagttcaaaa tccaactg
gtccacctac aacaaagctc tcatcaaccg tggtccctc actttctggc tggatgatgg
ggcgattcag gcttggtatg agtcagcaac accttcttca cgaggcagac ctctcgacgg
agttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt
tgccggatca agagctacca actcttttct cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga
taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag
caccgcctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga
gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca
ggatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa
acgctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac
ggttctggtc cttttgctgg cttttgctc acatgt

[0392] X01-X18核酸序列编码的FVIII-BDD.SQ序列黑体/下划线 (SEQ ID NO:25)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPVRVPKSFPFNTSVVY
KKTLEFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG
AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGAL
LVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
LPGLIGCHRKSVMYWHVIGMGTTPEVHSIFLEHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMDLGQF
LLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQI
RSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDEF
KTREAIQHESGILGPLYGEVGDLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDF
PILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQI
MSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCL
HEVAYWYILSIGAQDFLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSEMPGLWILGCHNSD
FRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDI SAYLLSKNNAIEPR**SFSQNPVLRHQRE**ITRITL
QSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN
RAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTRNQASRPYSF
YSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG
LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETkswyftENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN

YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP
 GVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDQITASGQYGO
 WAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFI IMYSLDGK
 KWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCS
 MPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV
 TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRY
 LRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0393] 具有BDD的野生型FVIII (SEQ ID NO:26)

MQIELSTCFFLCLLRFCSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTTFVEF
 TDHLFNIAKPRPPWMGLLPTIQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPG
 GSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVDEGKSW
 HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS
 LEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSSEMDVVRFD
 DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR
 EAIQHESGILGPLYGEVGDLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVT
 VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQR
 FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL
 FPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDI SAYLLSKNNAIEPRFSQNSR
 HPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTPMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSGA
 IDSNNLSSEMTHFRPQLHHSMDMVFTEPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNL ISTIPSDNLAAGTDNT
 SSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSEGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRA
 HGPALLTKDNALFKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKN
 ATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSL
 GPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENV
 VLPQIHTVTGTFKFMKNLFLSTRQNVESYDYGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQ
 IVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKG
 AITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKK
 NNLSLAILTLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGH
 LDLVEGSLGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFAKK
 KDTILSLNACESNHAAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTISVE
 MKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVRNRAQSGSVPQFKKVVQFEFTDGSFTQPLY
 RGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKYFWKVVQHMAP
 TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSLGIGPLLVCHTNTLNPAGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP
 CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY
 PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDQITASGQYQWAPKLARLHYS
 GSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFI IMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS
 GIKHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL
 HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQ
 DSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0394] AAV-LK03 VP1衣壳 (SEQ ID NO:27)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADAAAL

EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSP
 QEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGN
 WHCDSQWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNW
 GFRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLN
 NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRQTGTTSGTTNQ
 SRLFSQAGPQSMQLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFF
 PMHGNIIFGKEGTTASNAELDNVMI TDEEE IRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDV
 YLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQK
 ENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRPL

[0395] 在AAV-SPK-8005和AAV-SPK-hFIX中使用的AAV-SPK VP1衣壳 (SEQ ID NO:28)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEV
 NAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLG
 LVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPIGEPAA
 PSGVGNPTMAAGGGAPMADNNEGADGVSSSSGNWHCDSQWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQ
 ISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKE
 VTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV
 GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTG
 GTAGTQQLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL
 NPGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTNPVATEQYGVVADN
 LQQNAAPIVGAVNSQALPGMVWQNRDVYLGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQIL
 IKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTNVDF
 AVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

hFVIII载体的%同一性矩阵 (WT, CO3, X09, X02, X06, X08, X15, X05, X18, X14, X01, X12, X04, X11, X07, X03, X16, X13, X17和X10)

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 X11	hFVIII X07	hFVIII X03	hFVIII X16	hFVIII X13	hFVIII X17	hFVIII X10
793	772	795	791	793	792	793	791	79	796	796	794	794	792	79.4	79.1	79	79.6	79.3
772	772	819	819	815	813	816	816	812	814	811	813	817	818	81.6	81.9	81.8	82.1	82.2
795	819		91.5	91.4	91.8	92	91.8	91	91.4	91.5	91.7	91.7	92.2	91.5	92.1	91.8	91.1	91.6
791	819	91.5		91.4	91.3	92	92.1	92.2	91.7	92	91.9	92	91.5	91	91.5	92.3	91.9	92.1
793	815	91.4	91.4		91.8	91.9	91.8	91.5	91.8	92.3	91.7	92	91.5	91.4	91.7	92.4	91.6	91.8
792	813	91.8	91.3	91.8		91.8	91.5	91.5	91.8	92.2	91.5	92.5	92	91.7	91.4	92.3	91.6	91.9
793	816	92	92	91.9	91.8		92.2	91.6	91.7	92.3	92.1	92.2	92	92.1	92.2	92.3	92.5	92
791	816	91.8	92.1	91.8	91.5	92.2		92.5	91.9	92.7	92.4	91.5	92.1	91.6	91.7	92.3	91.9	92
79	812	91	92.2	91.5	91.5	91.6	92.5		91.6	93	92.1	91.8	91.7	91.4	91.1	91.8	91.8	92
796	814	91.4	91.7	91.8	91.8	91.7	91.9	91.6		93	92	91.6	91.3	91.8	92.3	92.2	91.8	92
796	811	91.5	92	92.3	92.2	92.3	92.7	93	93		93.4	92.5	92.6	92.5	92.2	92.6	92.4	92.1
794	811	91.5	91.9	91.7	91.5	92.1	92.4	92.1	92	93.4		92	92.4	92.4	91.7	92.4	92.6	92.6
794	813	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	92.5
794	817	91.7	92	92	92.5	92.5	91.5	91.8	91.8	92.5	92	92.6	92.6	92	91.9	92.3	91.8	91.9
792	818	92.2	91.5	91.5	92	92	92.1	91.7	91.3	92.6	92.4	92.6		92.1	92	92.4	91.9	92.7
794	816	91.5	91	91.4	91.7	92.1	91.6	91.4	91.8	92.5	92.4	91.5	92.1		92	92.7	92.1	91.6
791	819	92.1	91.5	91.7	91.4	92.2	91.7	91.1	92.3	92.2	91.7	91.5	92	92		92.4	92	92.8
79	818	91.8	92.3	92.4	92.3	92.3	92.3	91.8	92.2	92.6	92.4	92	92.4	92.7	92.4		92.4	92.8
796	821	91.1	91.9	91.6	91.6	92.5	91.9	91.8	91.8	92.4	92.6	91.8	91.9	92.1	92	92.4		92.9
793	822	91.6	92.1	91.8	91.9	92	92	92	92	92.1	92.6	91.9	92.7	91.6	92.8	92.8	92.9	

[0396] 使用的某些定义/缩写

BDD:全部或至少一部分B结构域(BD)缺失

FVIII-BDD:具有B结构域缺失的FVIII

SQ:SFSQNPPVLKRHR (SEQ ID NO:29)

FVIII/SQ:具有SQ的FVIII

FVIII-X01-X18:CpG减少的编码FVIII的核酸变体,分别如SEQ ID No:1-18所示。

TTRmut:具有4个突变的TTR启动子,从TAmGTGTAG到TATTGACTTAG

C03:密码子优化的FVIII核酸变体,如SEQ ID NO:21所示

NHP:非人灵长类动物

ALT:丙氨酸转氨酶

D-二聚体:来自血块分解的蛋白质片段

SPK-8005:AAV衣壳 (SEQ ID NO:28)+TTRmut-hFVIII-X07;也称为AAV-SPK-8005

SPK-8011:AAV LK03衣壳 (SEQ ID NO:27)+TTRmut-hFVIII-X07;也称为AAV-SPK-8011

[0397] 尽管上面已经描述并具体例示了本发明的某些实施方案,但并不意图将本发明限于这些实施方案。在不脱离如所附权利要求书所述的本发明的范围和精神的情况下可以对其进行各种修改。

非人灵长类动物(NHP) 研究设计

物种 (Species)	食蟹猕猴(食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>))
测试产品	SPK-8005 或 SPK-8011 (LK03 衣壳)
年龄	2至3岁
体重	2至4 kg
持续时间	8 周

AAV-SPK-8005			AAV-SPK-8011 (LK03 衣壳)		
组	NHP的#	剂量水平	组	NHP的#	剂量水平
	雄性	vg/kg		雄性	vg/kg
1 (对照)	2	0	1 (对照)	2	0
2 (低)	3	2×10^{12}	2 (低)	3	2×10^{12}
3 (中等)	3	5×10^{12}	3 (中等)	3	6×10^{12}
4 (高)	3	1×10^{13}	4 (高)	3	2×10^{13}

图1

在 NHP 中的 hFVIII 抗原水平

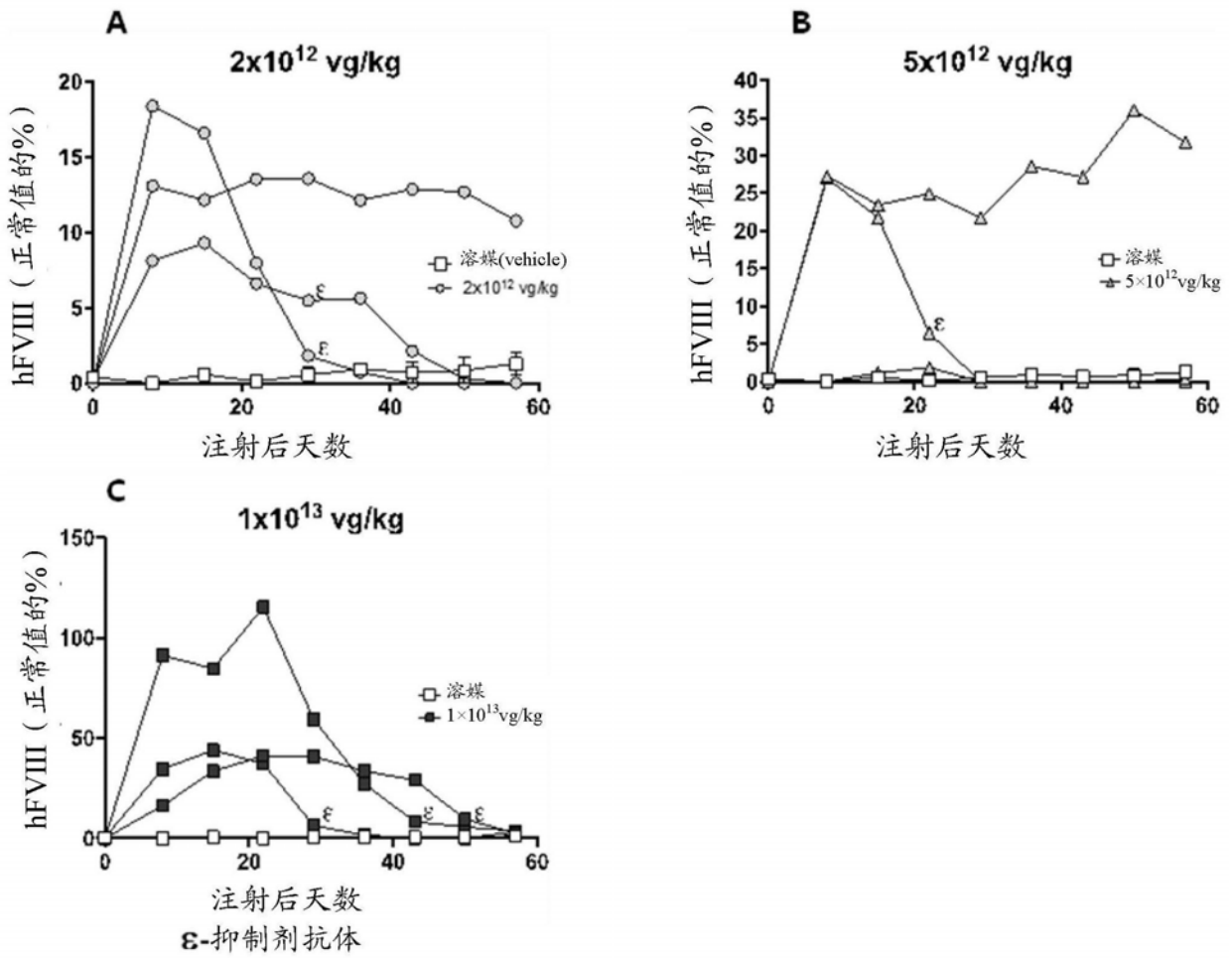


图2A-2C

NHP 中的 ALT 水平

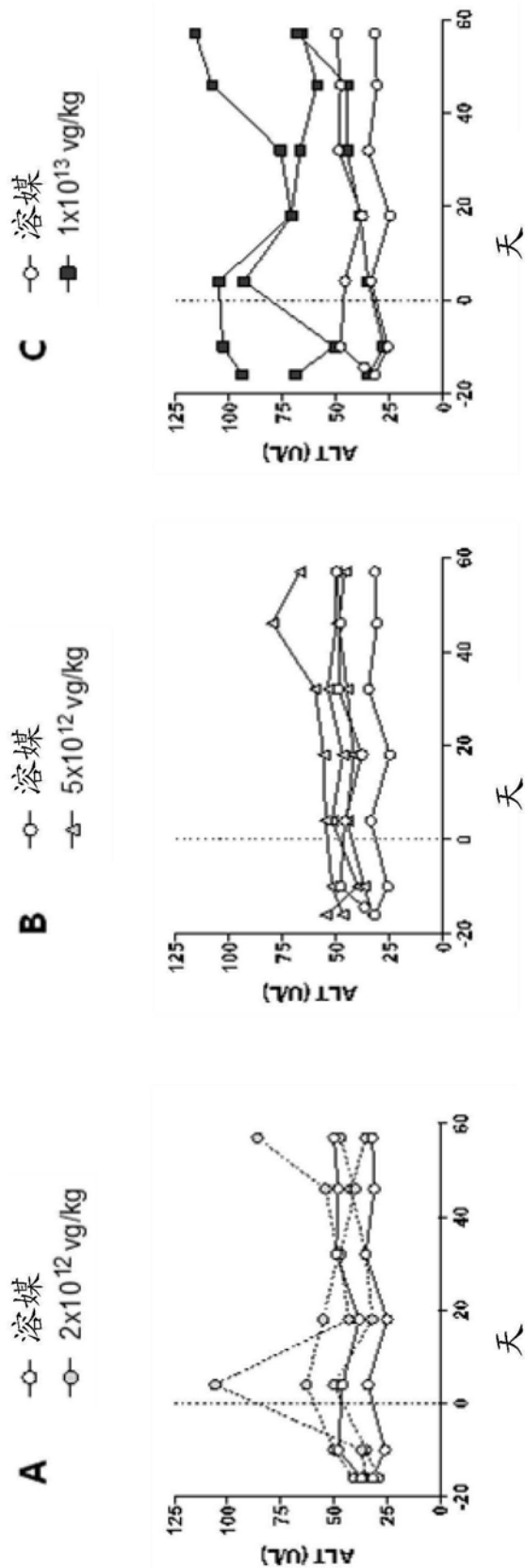


图3A-3C

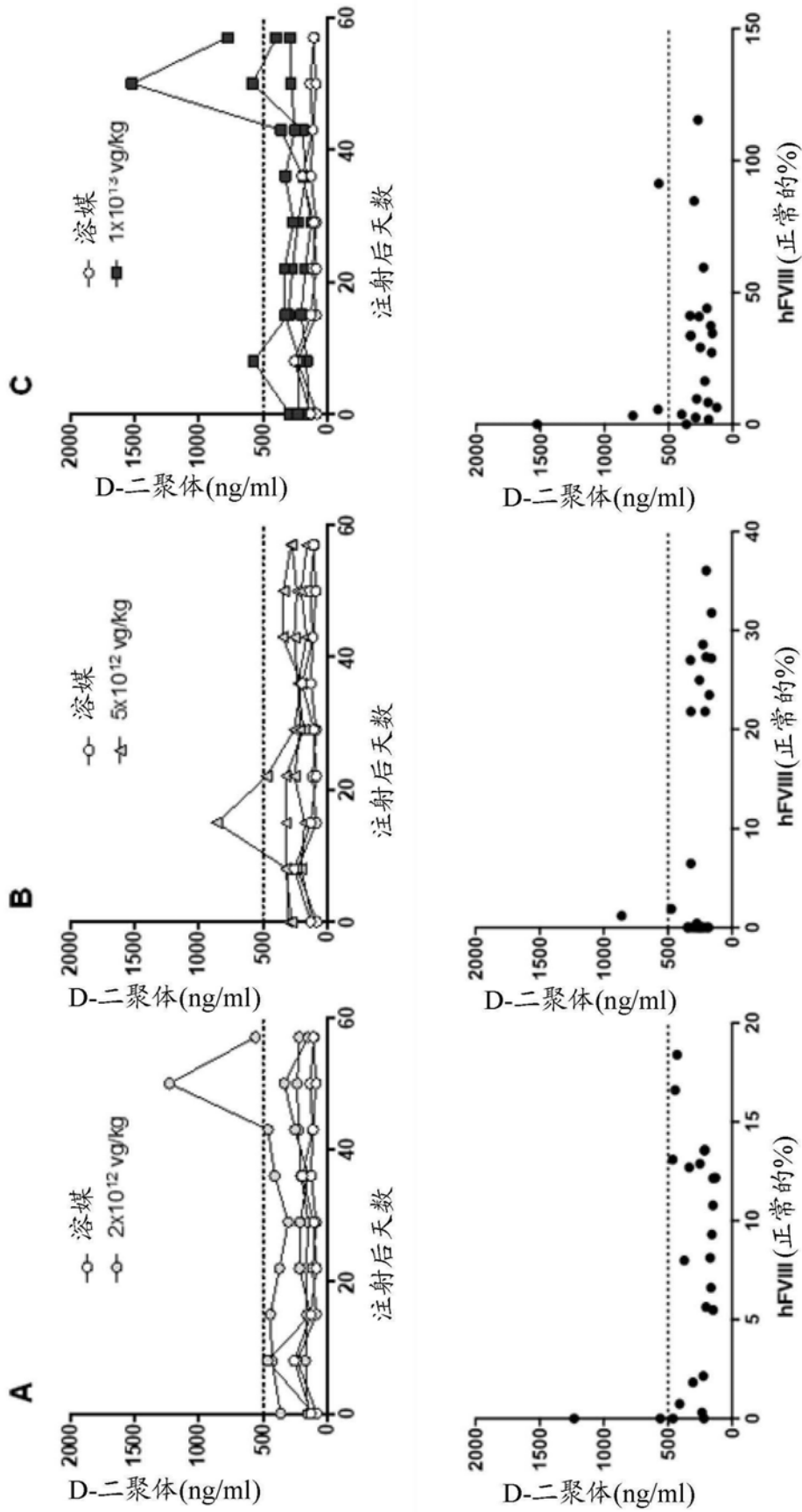


图4A-4C

概要

- 在 SPK-8005 的所有三个剂量中获得的 hFVIII 的治疗水平

剂量	所有动物中的平均峰值 hFVIII (正常值的%)	在 NHP w/o Inh. 中的平均“稳定的” hFVIII (正常值的%)
2×10^{12} vg/kg	13.2	10.8
5×10^{12} vg/kg	27.1	31.8
1×10^{13} vg/kg	54.1	N/A

- 如所预期的, 在 8 只动物中有 6 只观察到抗人 FVIII 的中和 Ab
- 无安全性问题

图5

在食蟹猕猴中 AAV-SPK-8011(LK03): hFVIII 抗原水平

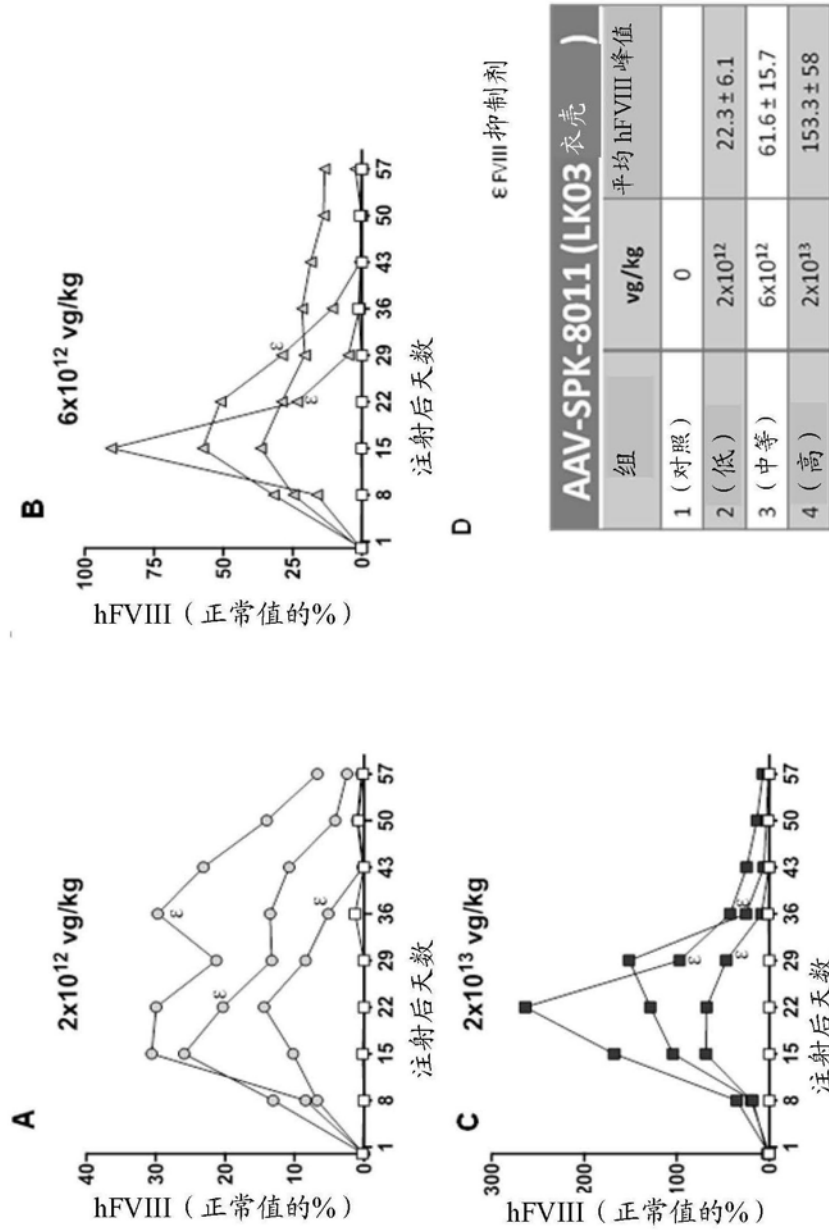


图6A-6D

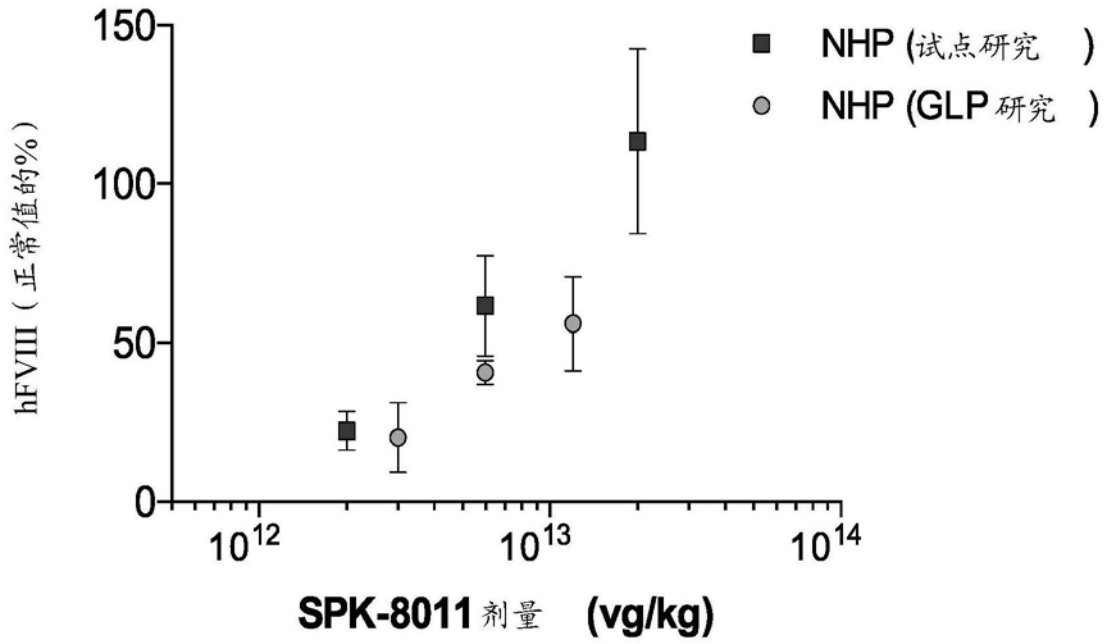
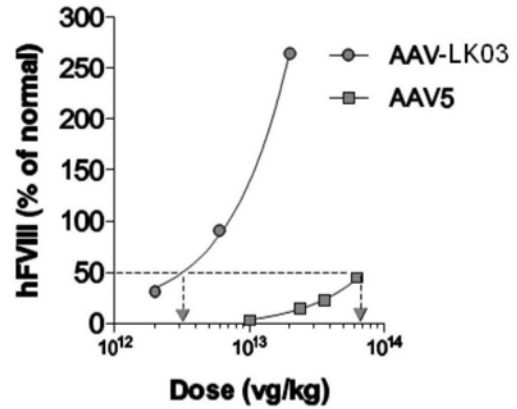


图7

**AAV-SPK-8011 (LK03 衣壳) 对比 AAV5对比AAV8:
在猕猴中的hFVIII 抗原水平**

vg/kg	AAV-SPK-8011 (LK03)	AAV5	AAV8
	在峰值的最大 hFVIII (正常值的%)		
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 衣壳)	AAV5
获得正常hFVIII的50%的预期剂量	
3.2x10 ¹² vg/kg	69.5x10 ¹² vg/kg

图8

在非人灵长类动物中AAV-LK03组织生物分布

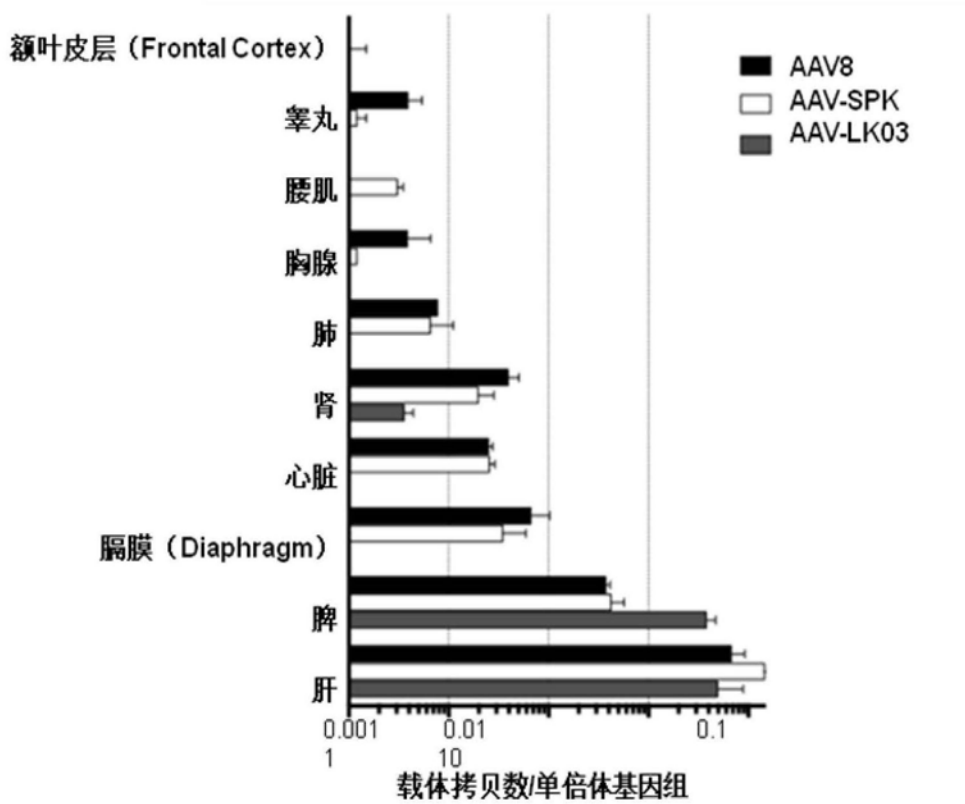


图9

在将AAV-hFVIII (SPK-8005)全身施用入小鼠之后肝和脾的FVIII表达

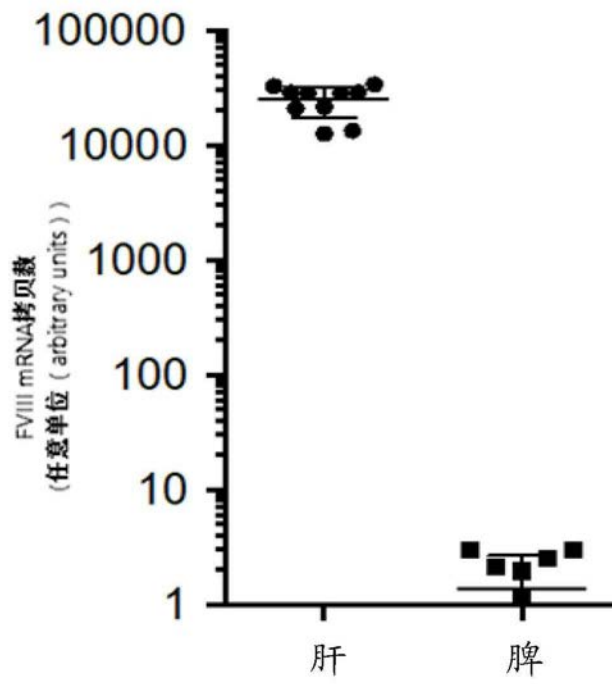


图10

AAV-LK03 衣壳的转导效率

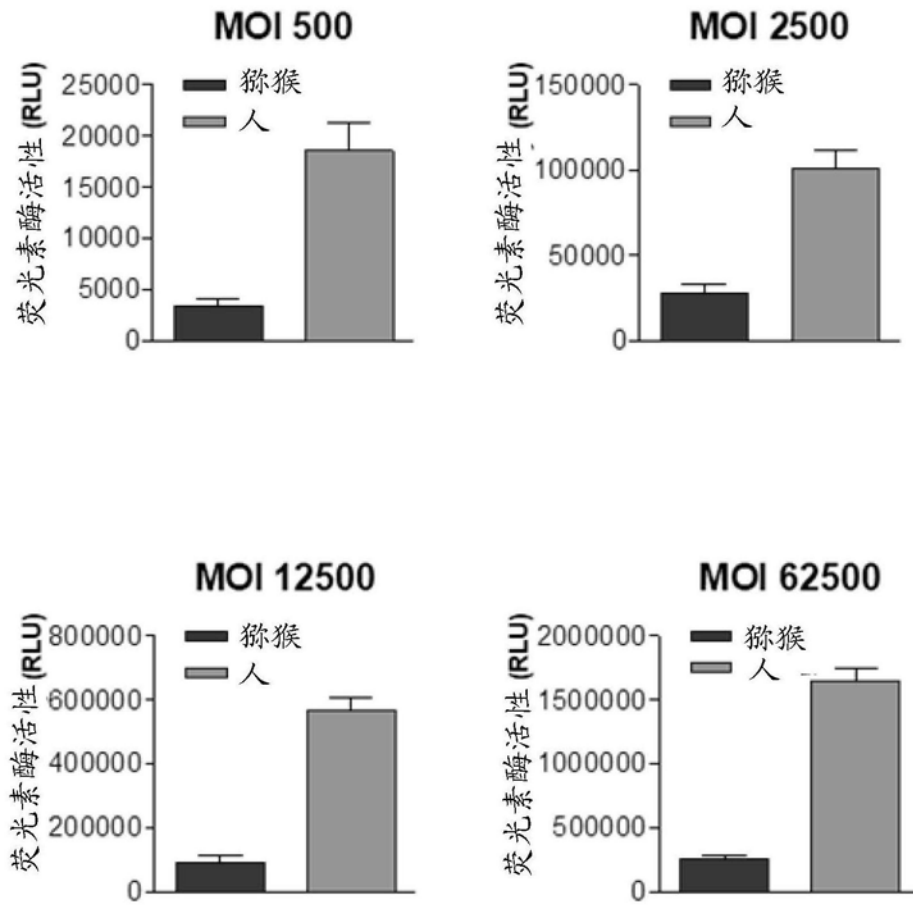


图11

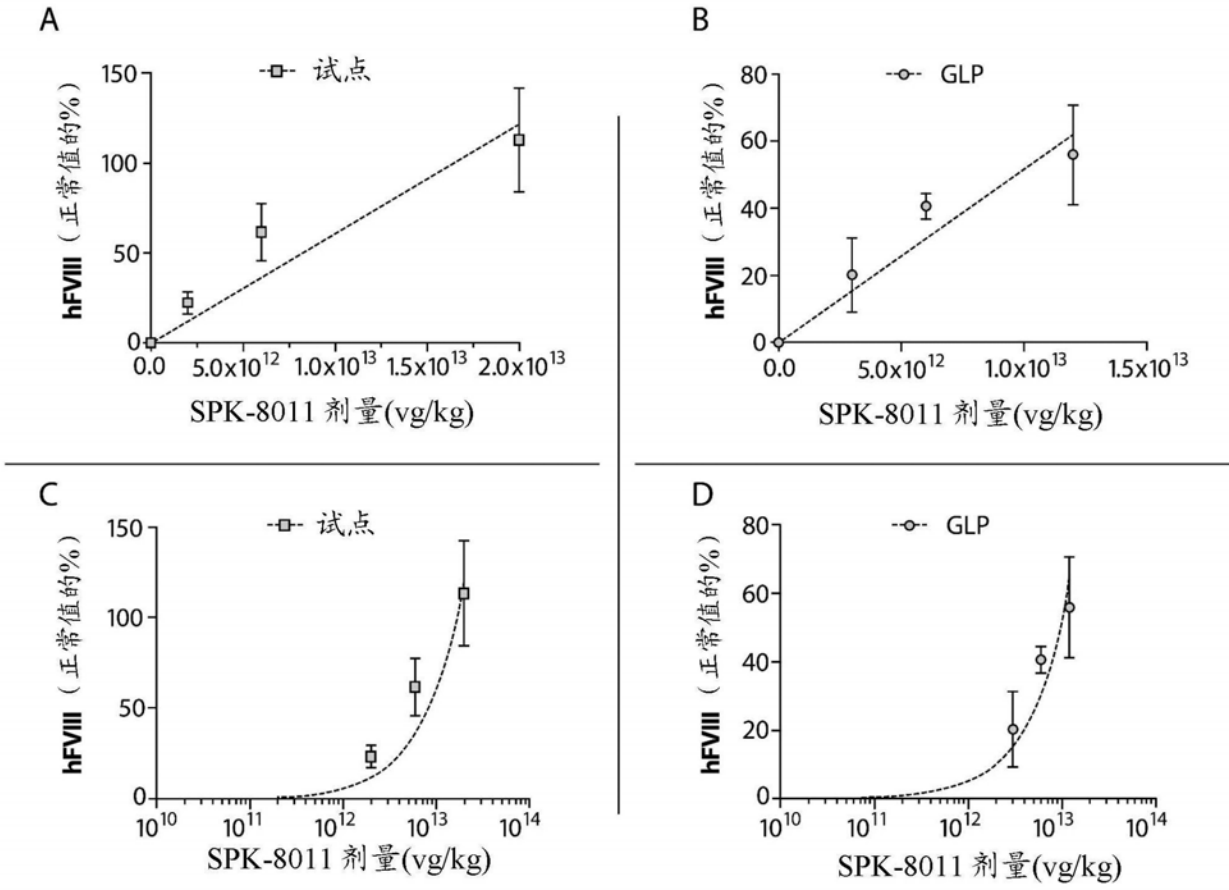


图12

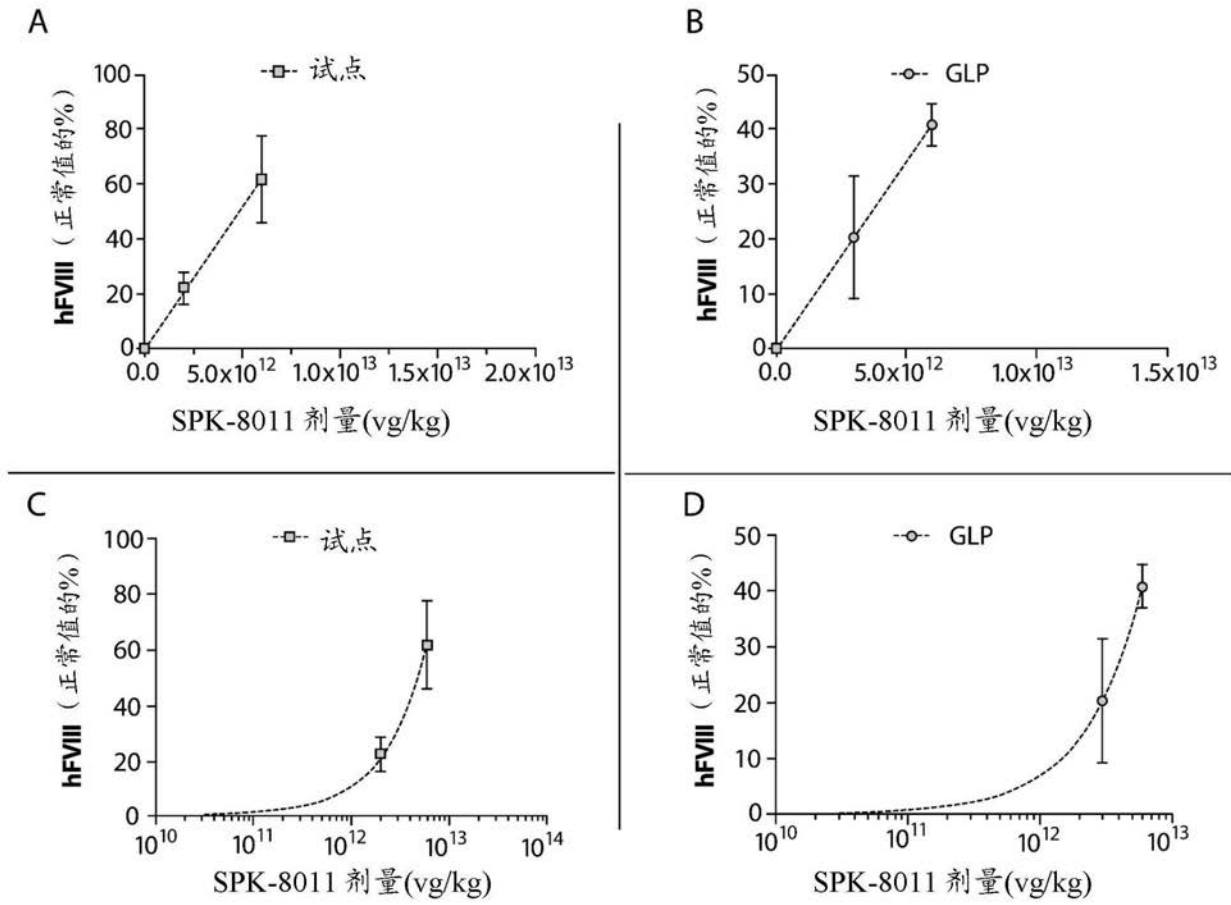


图13

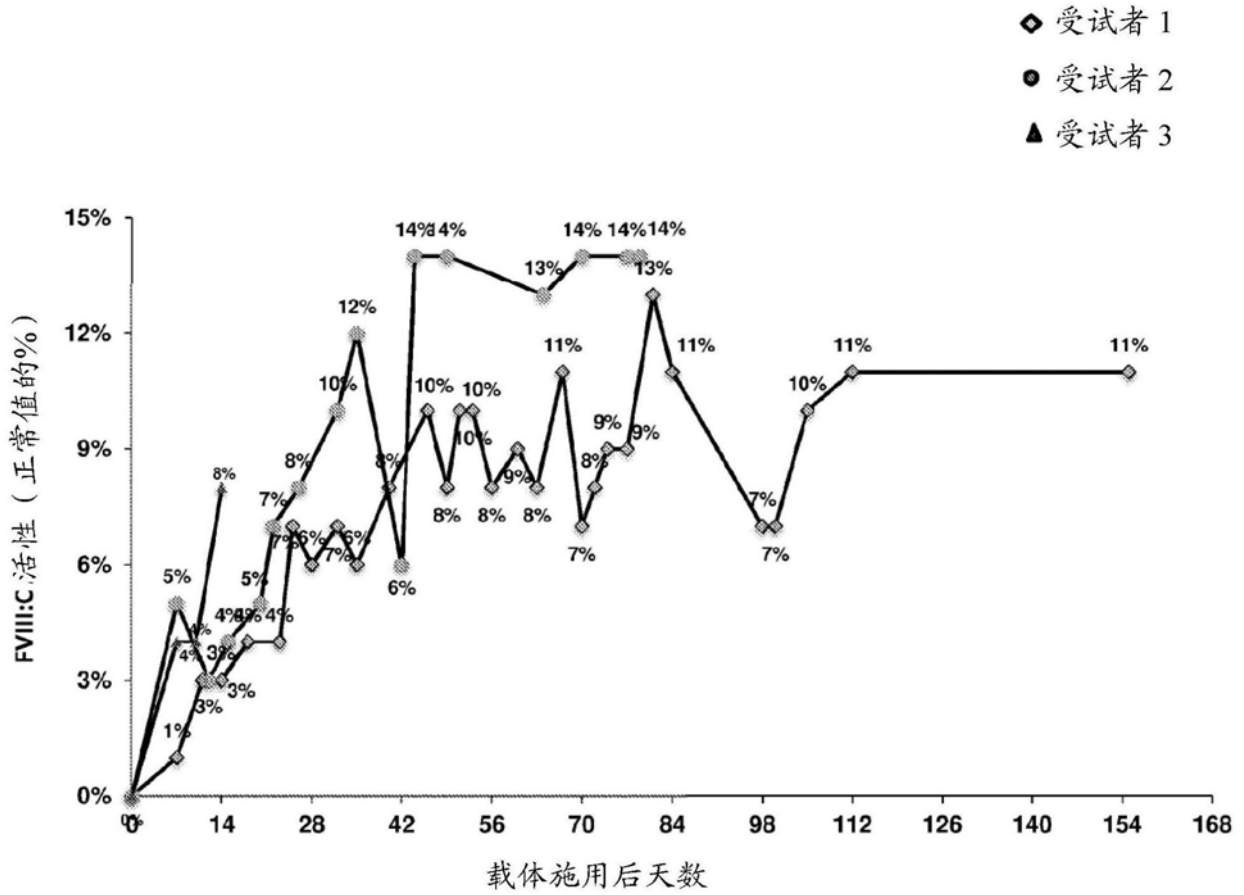


图14

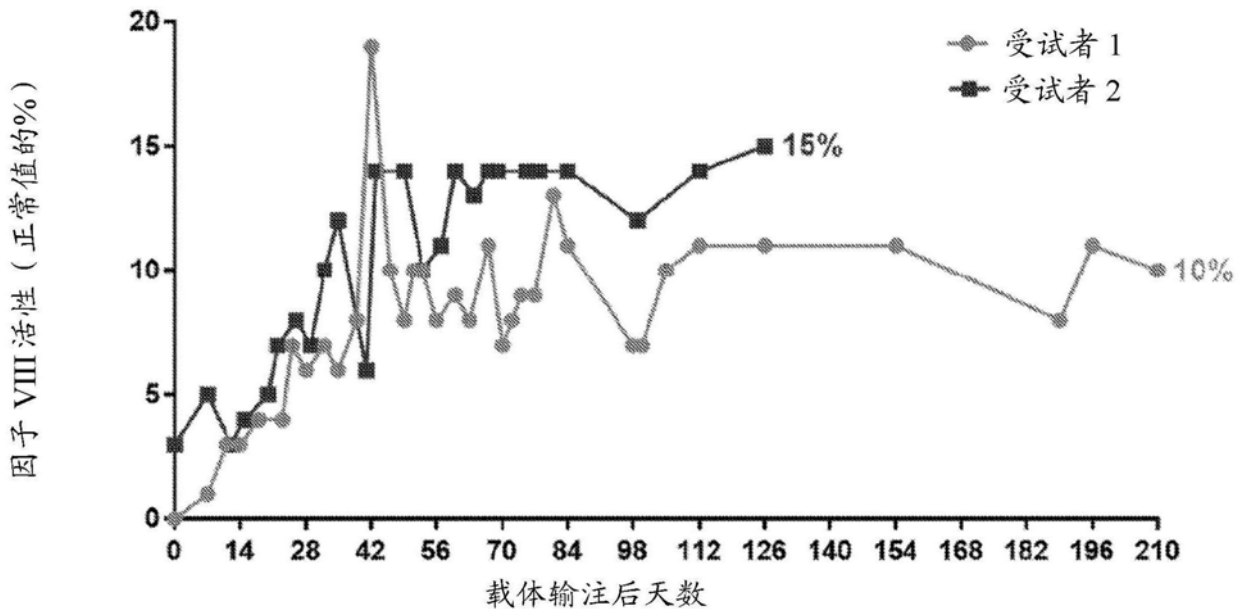


图15

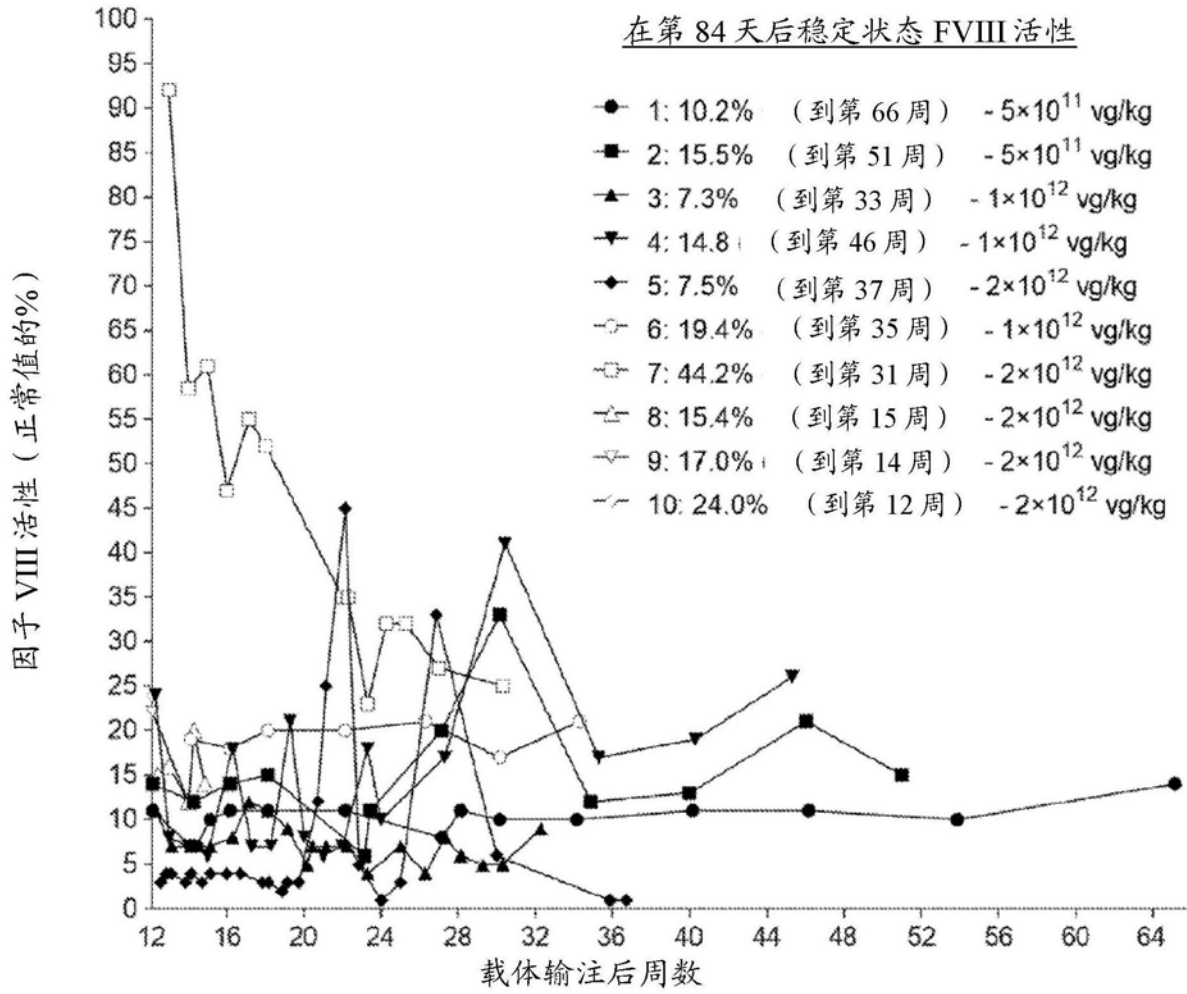


图16

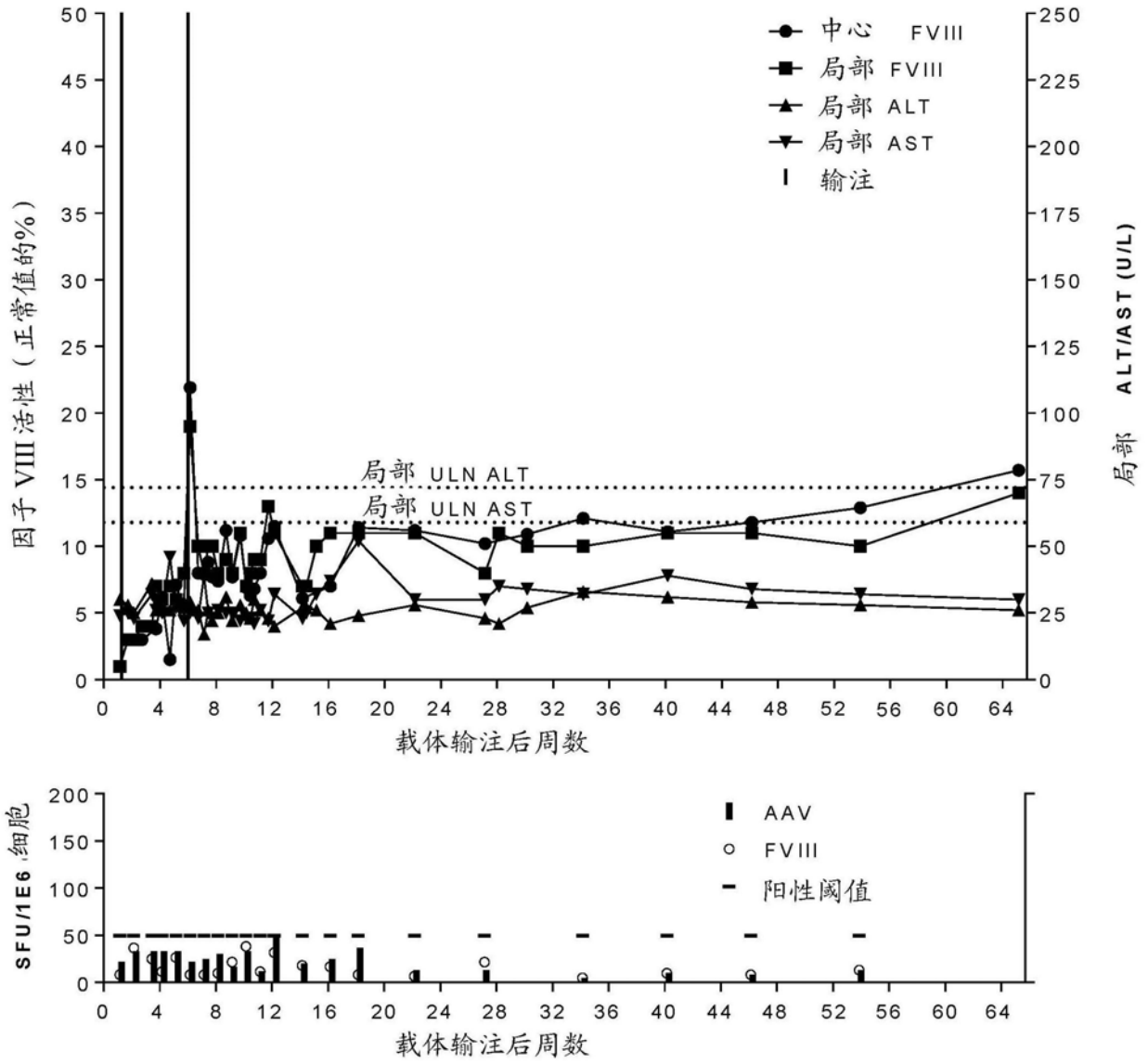


图17

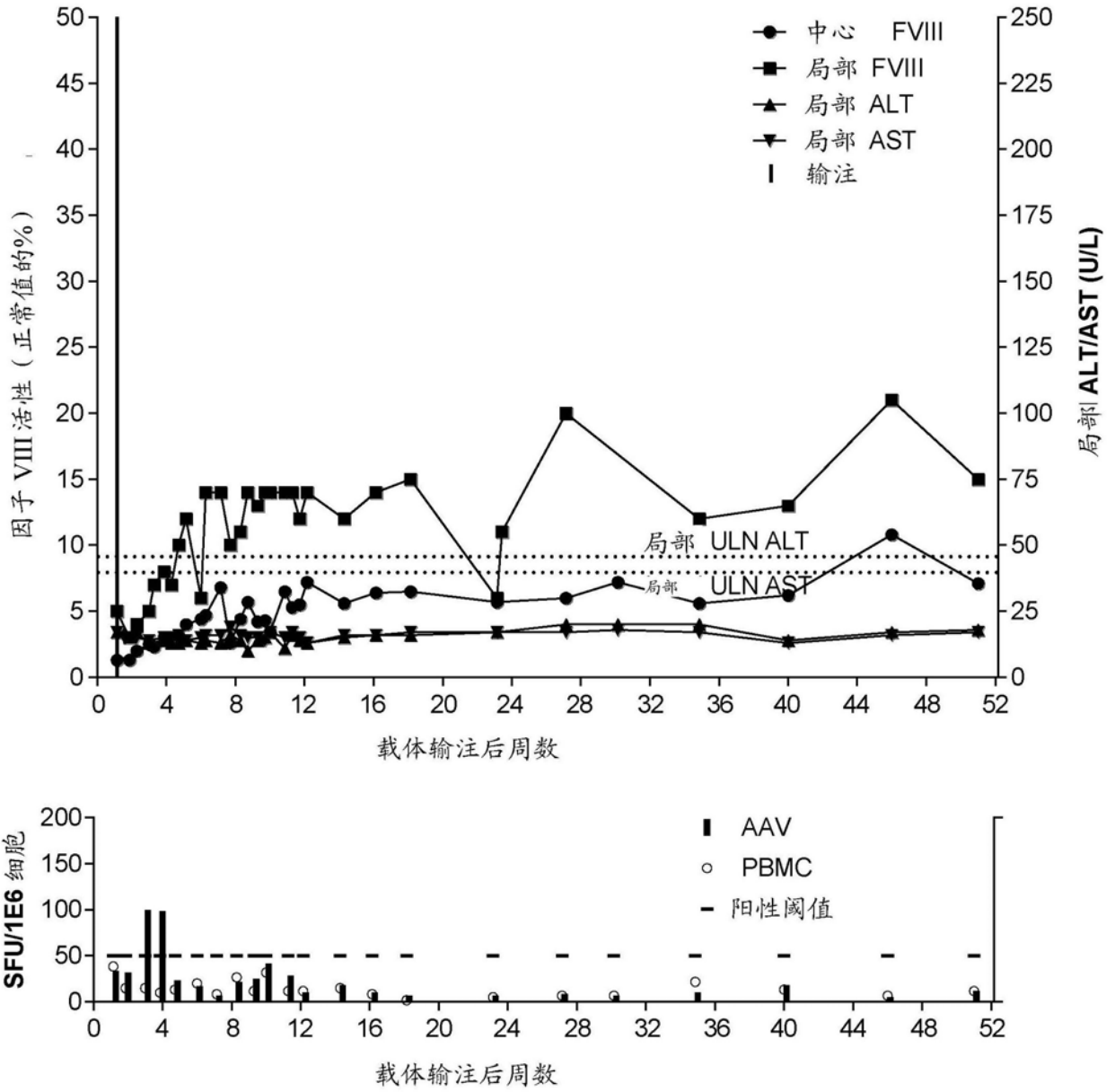


图18

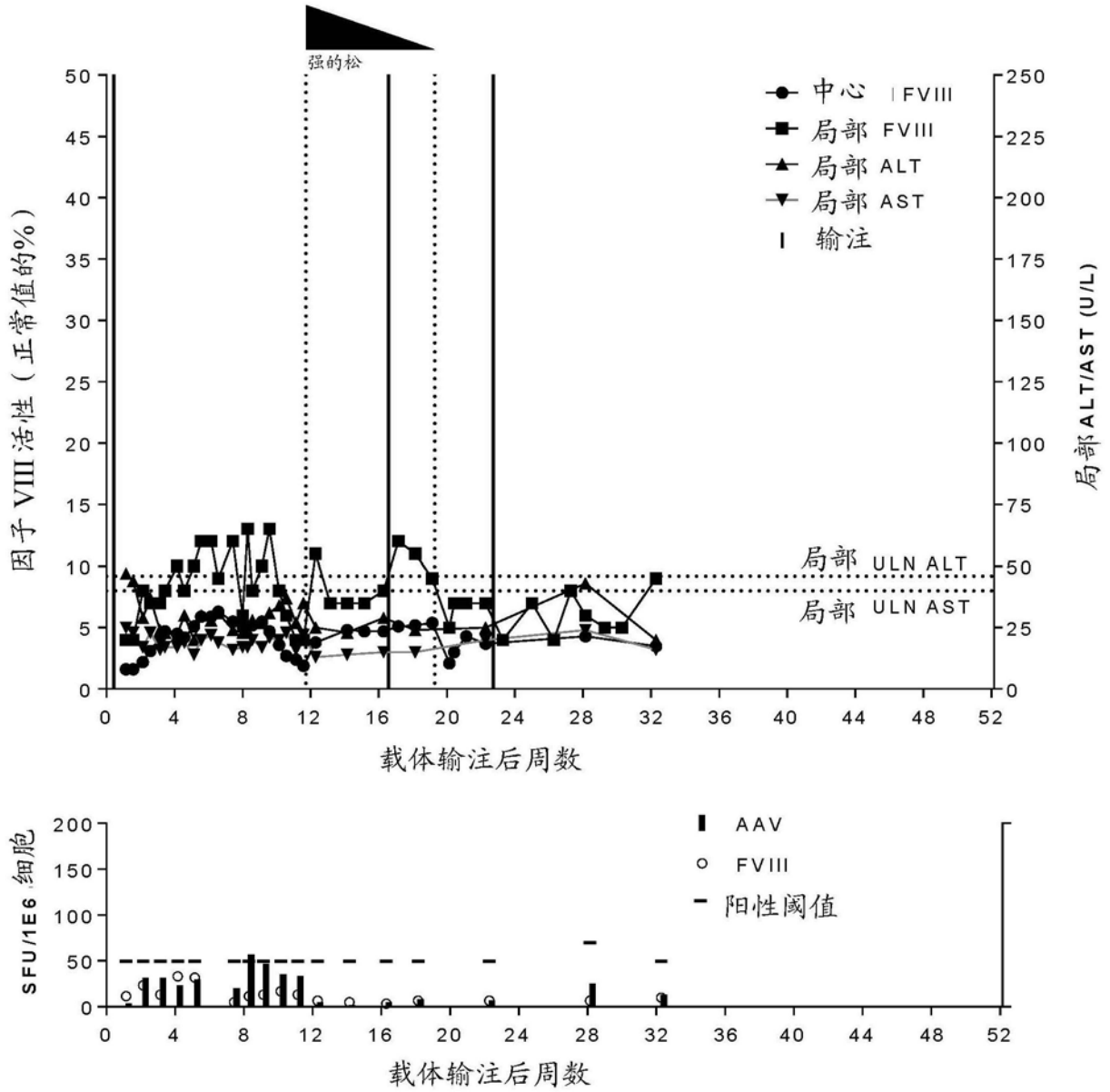


图19

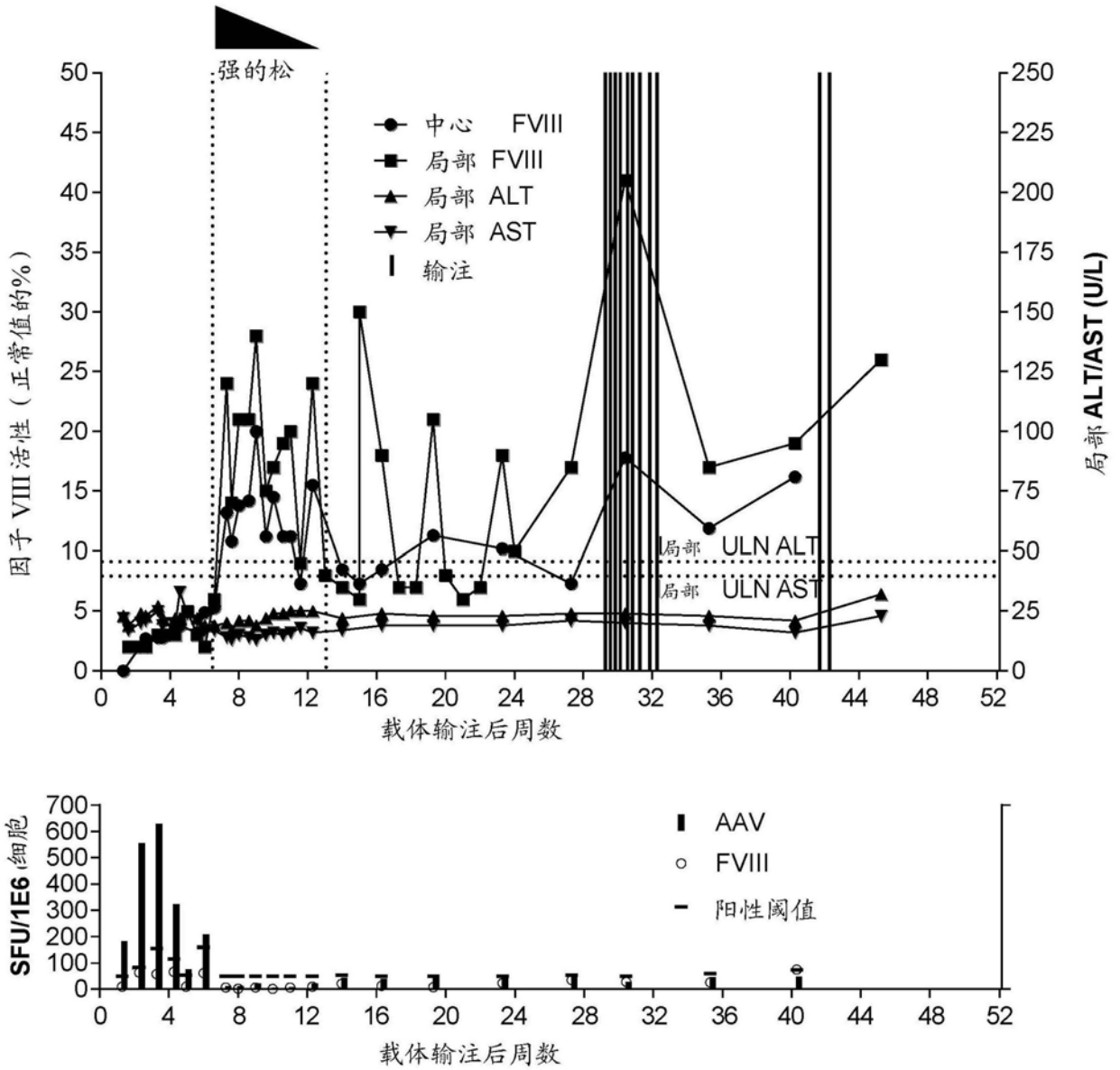


图20

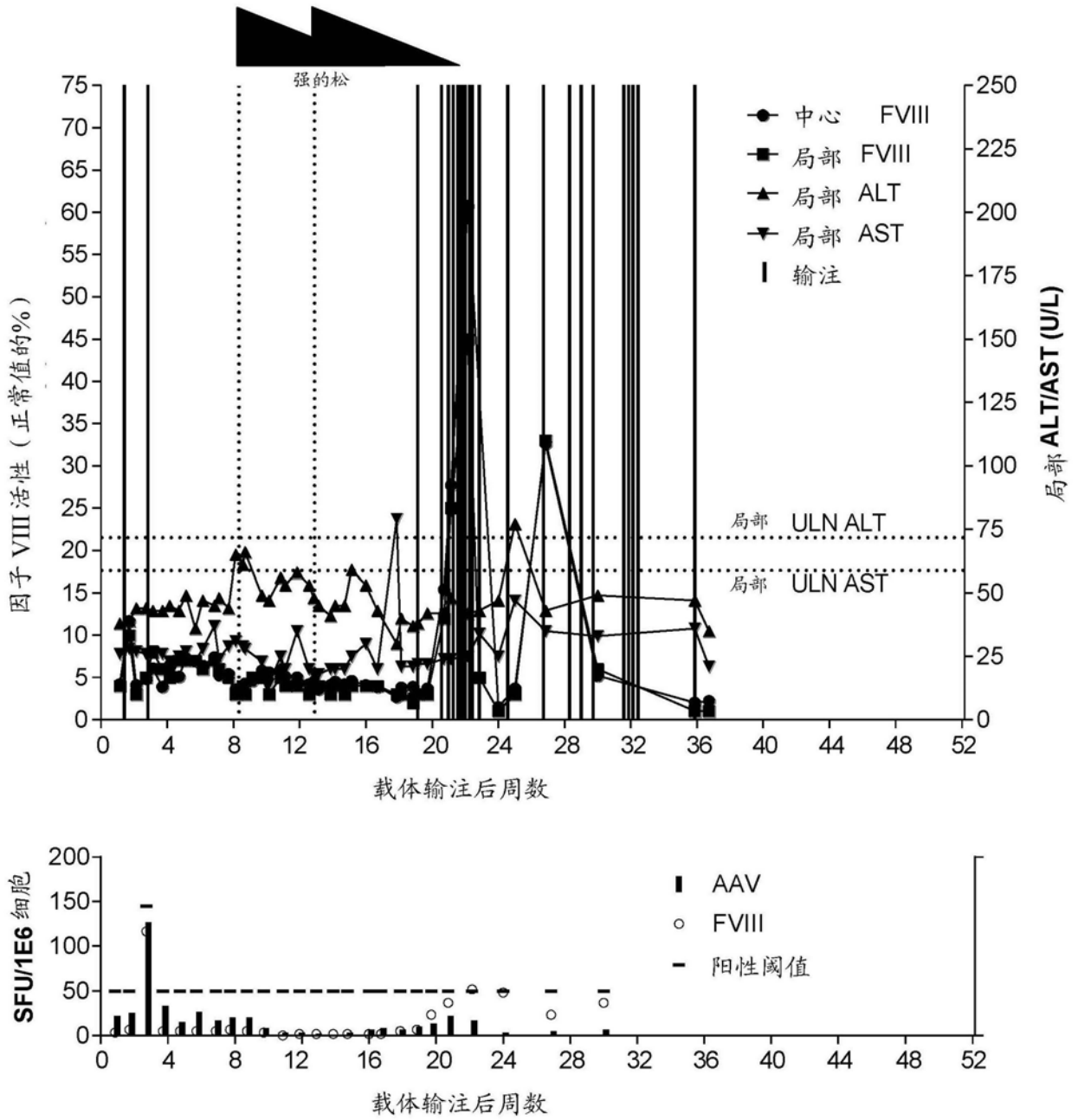


图21

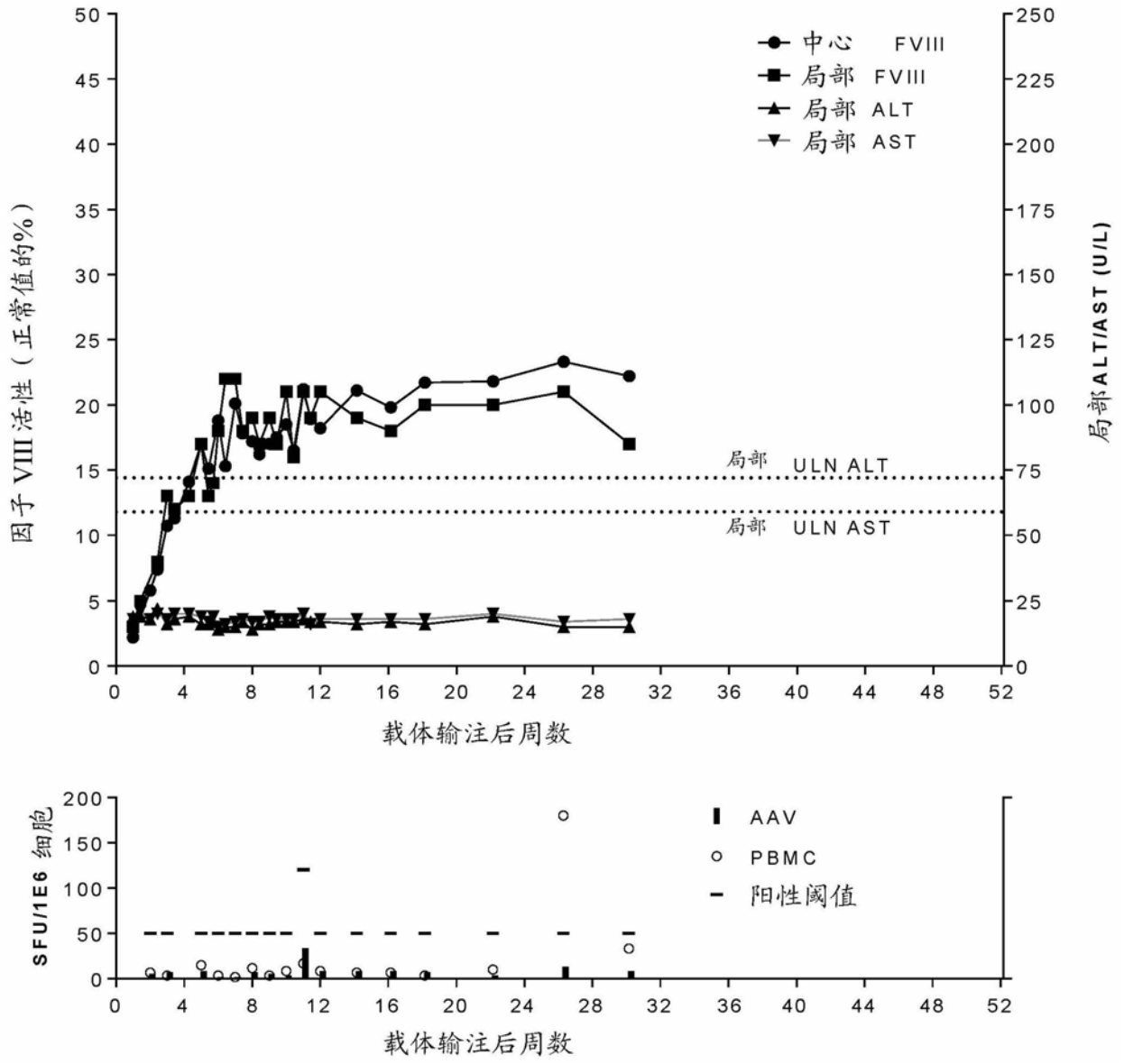


图22

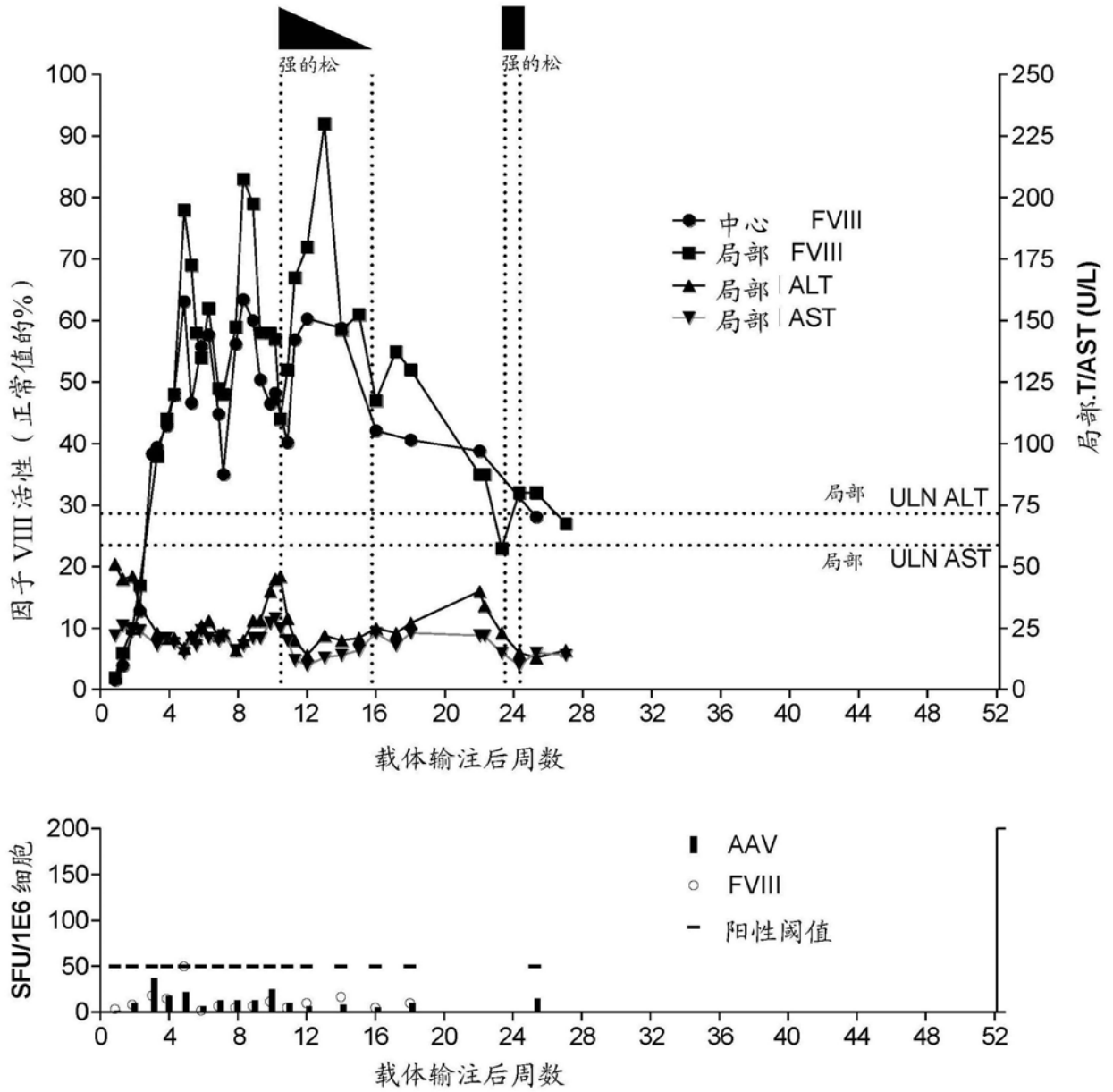


图23

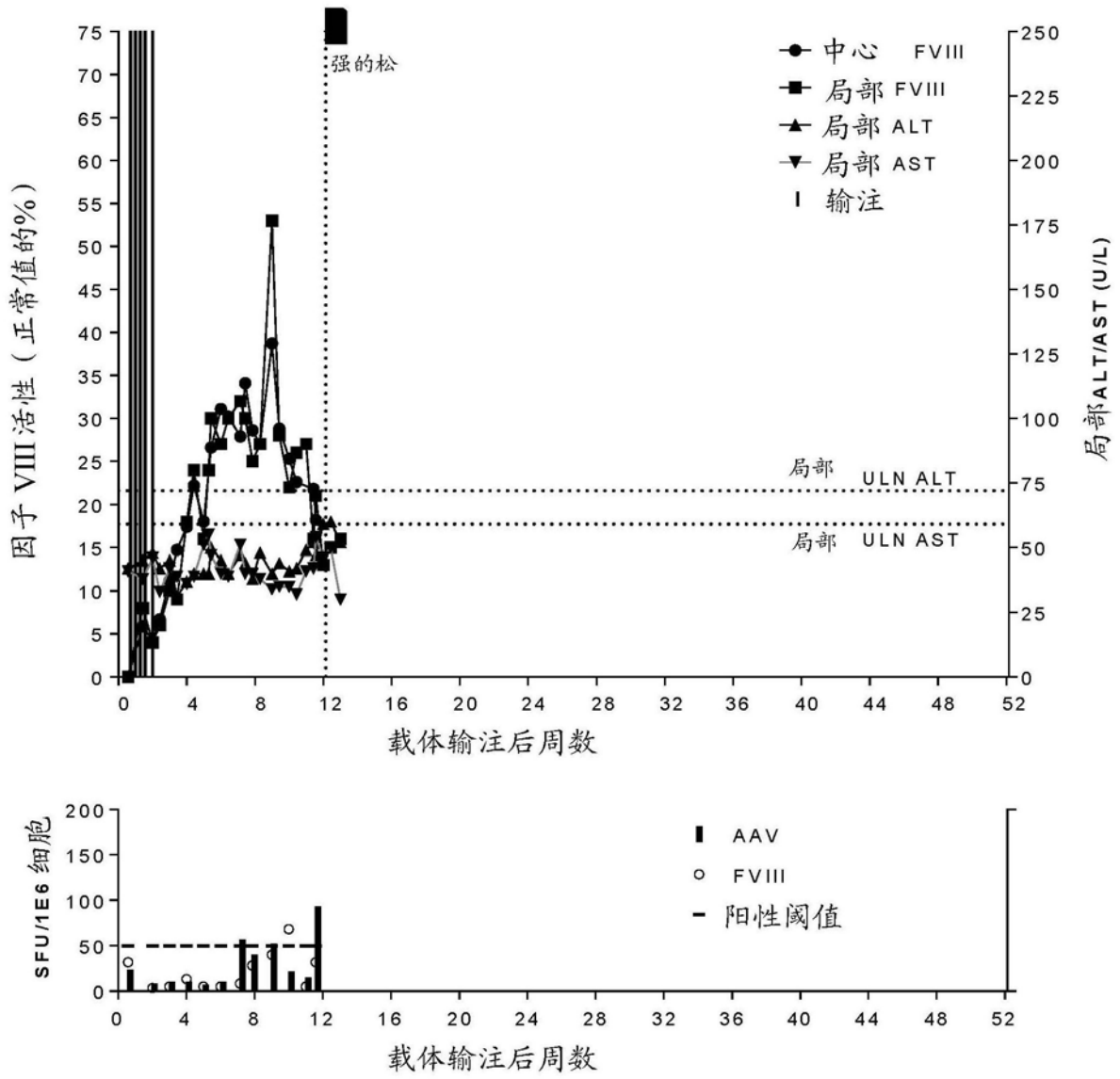


图24

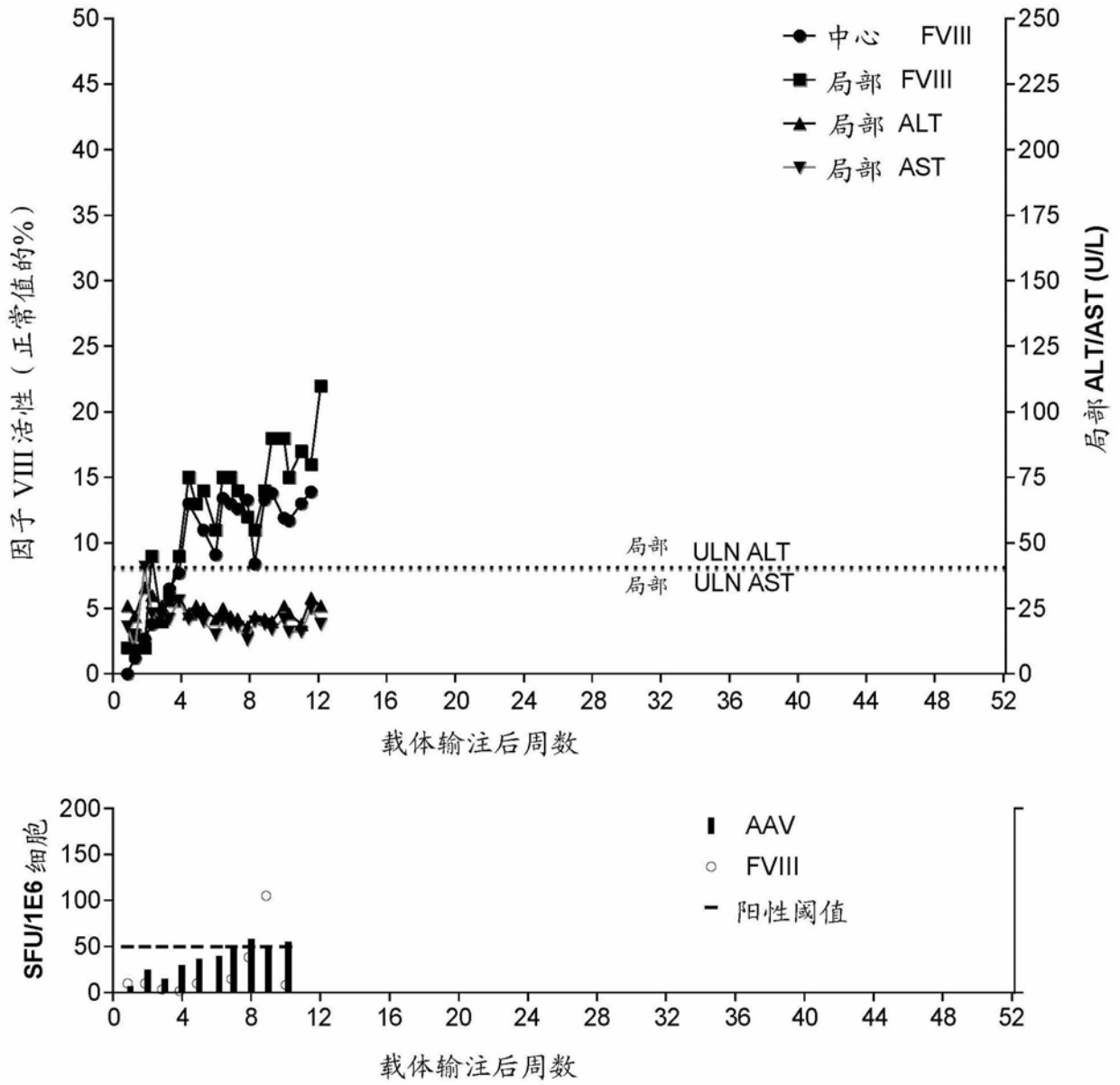


图25

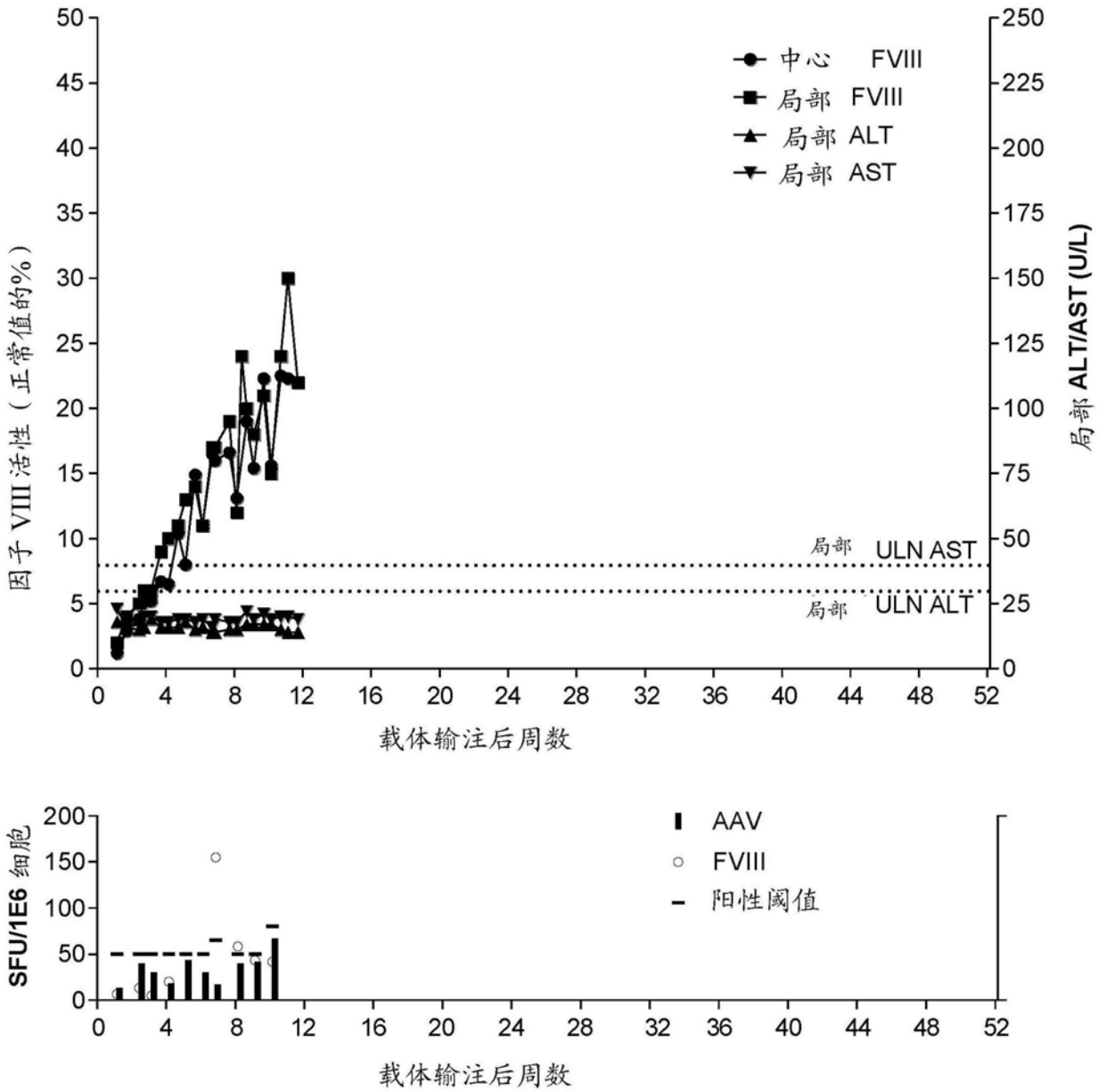


图26

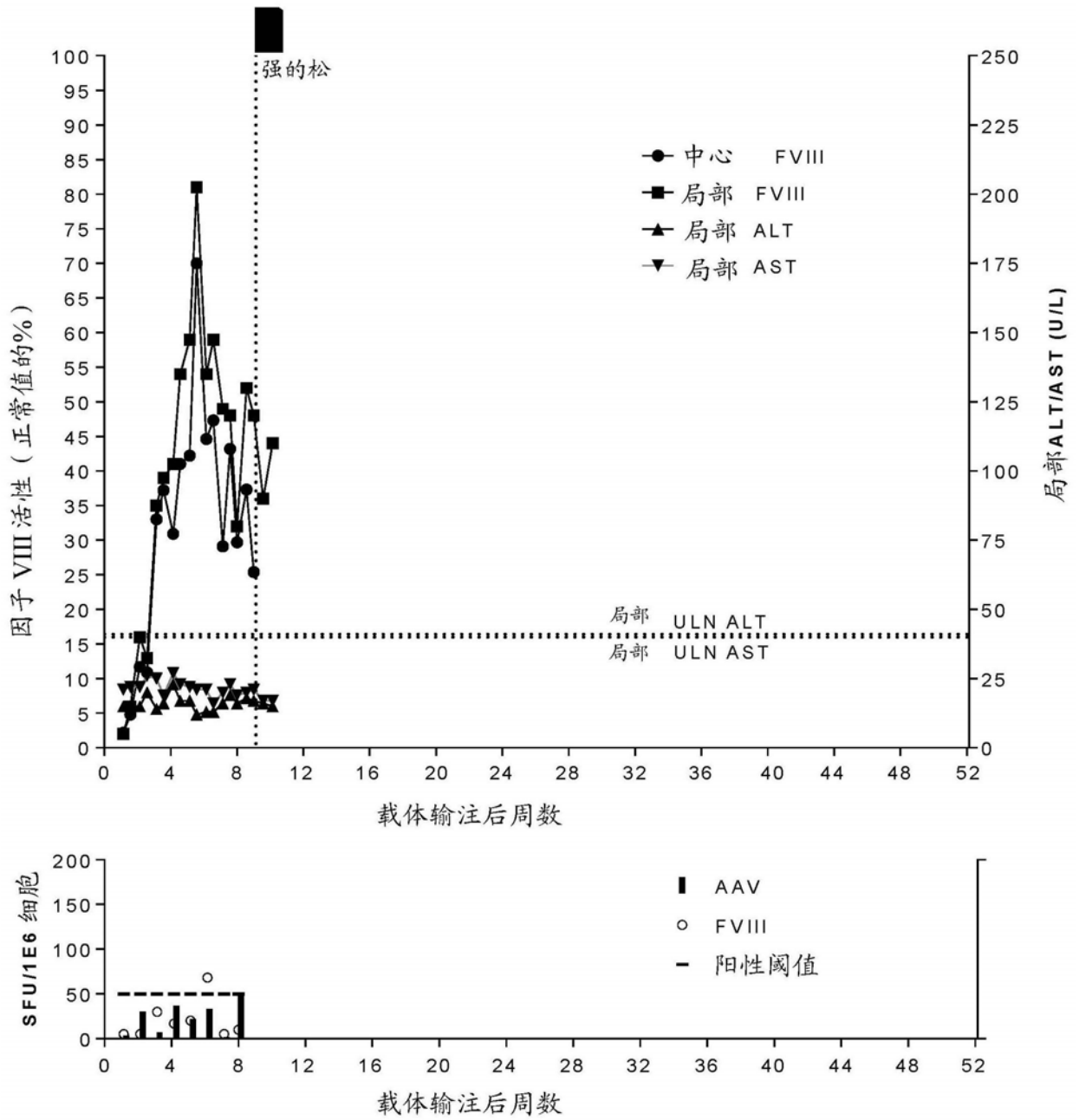


图27

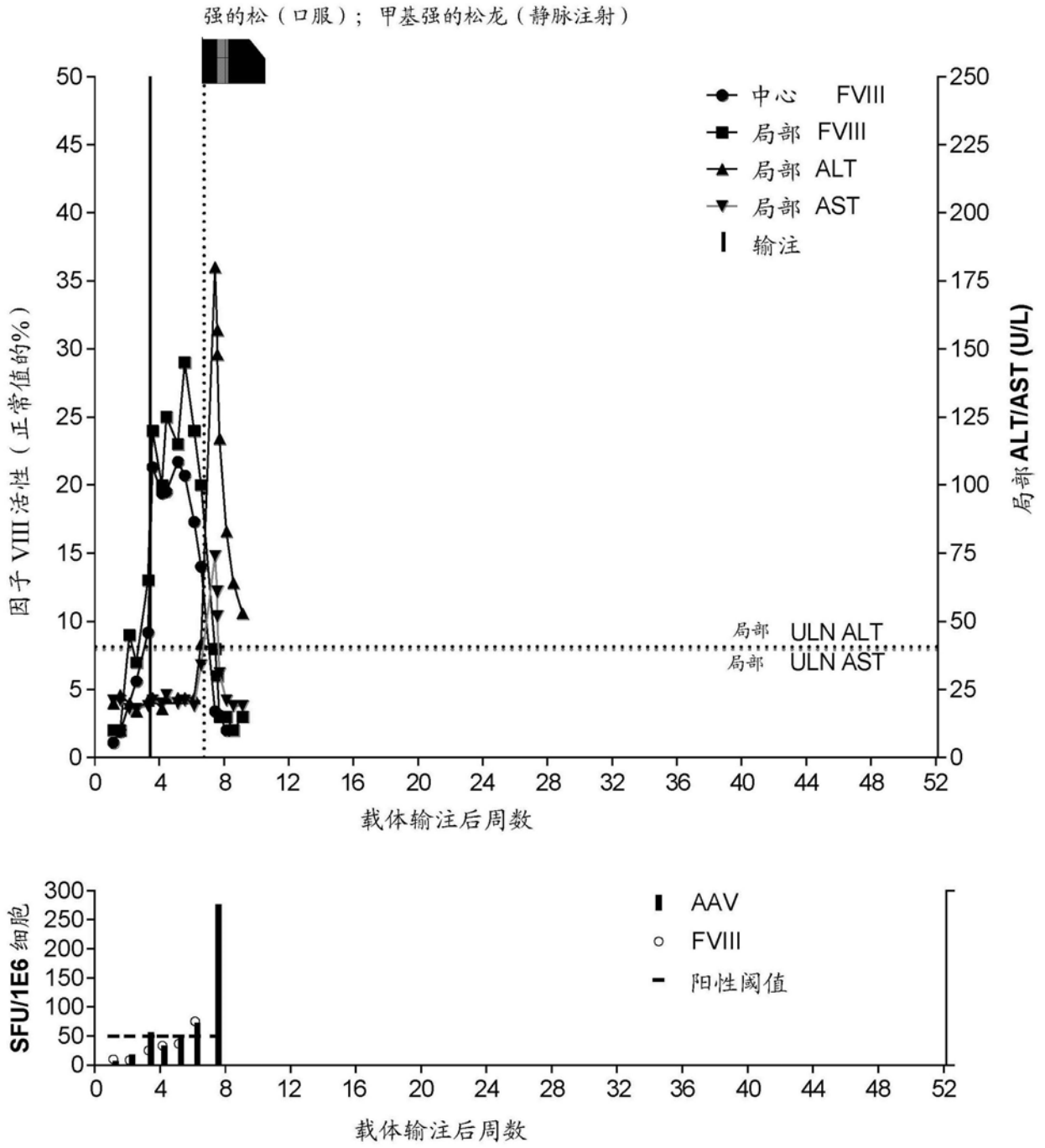


图28