(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113874513 A
(43)申请公布日 2021.12.31

(21)申请号 202080036209.7

(22)申请日 2020.03.13

(30)优先权数据
62/817,904 2019.03.13 US
62/856,432 2019.06.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/022738 2020.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/186207 EN 2020.09.17

(71)申请人 世代生物公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D·A·科尔 D·克拉特
P·萨马约亚 N·西尔弗

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平

(51)Int.Cl.
C12N 15/86(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)
A61P 3/08(2006.01)

权利要求书3页 说明书233页
序列表86页 附图32页

(54)发明名称

非病毒DNA载体及其用于表达FVIII治疗剂的用途

(57)摘要

本申请描述了一种用于递送和表达转基因的具有线性连续结构的ceDNA载体。ceDNA载体包含两侧是两个ITR序列的表达盒，其中表达盒编码转基因，转基因编码FVIII蛋白。一些ceDNA载体进一步包含顺式调控元件，包括调控开关。本文进一步提供了使用ceDNA载体进行FVIII蛋白的可靠的体外、离体和体内基因表达的方法和细胞系。本文提供包含可用于在细胞、组织或受试者中表达FVIII蛋白的ceDNA载体的方法和组合物，以及用表达FVIII蛋白的所述ceDNA载体治疗疾病的方法。这种FVIII蛋白可以表达用于治疗疾病，例如血友病A。

CN 113874513 A

1.一种无衣壳闭合端DNA(ceDNA)载体,其包含:

在侧翼反向末端重复序列(ITR)之间的至少一种异源核苷酸序列,其中至少一种异源核苷酸序列编码至少一种FVIII蛋白,其中编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少有85%同一性的以下序列。

2.根据权利要求1所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含选自与表9中序列具有至少85%同一性的序列的核酸序列。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少85%相同的核酸序列。

4.根据权利要求1或权利要求2所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少85%相同的核酸序列。

5.根据权利要求1到4中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含与编码至少一种FVIII蛋白的至少一个异源核苷酸序列可操作地连接的启动子。

6.根据权利要求1到5中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含增强子。

7.根据权利要求1到6中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含5'UTR和/或内含子序列。

8.根据权利要求1到7中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含3'UTR序列。

9.根据权利要求1到8中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含至少一个poly A序列。

10.如权利要求1到9中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含至少一个可操作地连接到至少一种异源核苷酸序列的启动子。

11.根据权利要求1到10中任一项所述的ceDNA载体,其中至少一种异源核苷酸序列是cDNA。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的ceDNA载体,其中至少一个ITR包含功能末端解链位点和Rep结合位点。

13.根据权利要求1到12中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ITR中的一个或两个来自病毒,所述病毒选自细小病毒、依赖病毒和腺相关病毒(AAV)。

14.根据权利要求1到13中任一项所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR是对称或不对称的。

15.根据权利要求14所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR是对称或基本对称的。

16.根据权利要求14所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR是不对称的。

17.根据权利要求1到16中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ITR中的一个或两个是野生型,或其中所述ITR中的两个都是野生型。

18.根据权利要求1到17中任一项所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR来自不同病毒血清型。

19.根据权利要求1到18中任一项所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR来自表2中所示的病毒血清型对。

20.根据权利要求1到19中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ITR中的一个或两个包含选自表3、表5A、表5B或表6中的序列的序列。

21.根据权利要求1到20中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ITR中的至少一个是由野

生型AAV ITR序列通过影响所述ITR的整体三维构象的缺失、添加或取代而变成。

22.根据权利要求1到21中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个来源于AAV血清型，所述AAV血清型选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

23.根据权利要求1到22中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个是合成的。

24.根据权利要求1到23中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个不是野生型ITR，或其中所述ITR中的两个都不是野生型。

25.根据权利要求1到24中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个是通过在选自A、A'、B、B'、C、C'、D和D'的至少一个ITR区域中进行缺失、插入和/或取代而经修饰。

26.根据权利要求25所述的ceDNA载体，其中所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述A、A'、B、B'、C或C'区域形成的茎-环结构的全部或一部分发生缺失。

27.根据权利要求1到26中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个是通过缺失、插入和/或取代而经修饰，所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述B和B'区域形成的茎-环结构的全部或一部分发生缺失。

28.根据权利要求1到26中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个是通过缺失、插入和/或取代而经修饰，所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述C和C'区域形成的茎-环结构的全部或一部分发生缺失。

29.根据权利要求1到26中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个是通过缺失、插入和/或取代而经修饰，所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述B和B'区域形成的茎-环结构的一部分和/或通常由所述C和C'区域形成的茎-环结构的一部分发生缺失。

30.根据权利要求1到29中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎-环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎-环结构的区域中包含单个茎-环结构。

31.根据权利要求1到30中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎-环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎-环结构的区域中包含单个茎和两个环。

32.根据权利要求1到31中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎-环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎-环结构的区域中包含单个茎和单个环。

33.根据权利要求1到32中任一项所述的ceDNA载体，其中两个ITR以使得当所述ITR相对于彼此呈反向时产生整体三维对称性的方式改变。

34.根据权利要求1到33中任一项所述的ceDNA载体，其中所述ITR中的一个或两个包含选自表3、5A、5B和6中的序列的序列。

35.根据权利要求1到34中任一项所述的ceDNA载体，其中至少一种异源核苷酸序列处于至少一个调控开关的控制下。

36.根据权利要求35所述的ceDNA载体，其中至少一个调控开关是选自二进制调控开关、小分子调控开关、密码调控开关、基于核酸的调控开关、转录后调控开关、辐射控制的或

超声波控制的调控开关、低氧介导的调控开关、发炎应答调控开关、剪切活化调控开关，和杀灭开关。

37.一种使FVIII蛋白在细胞中表达的方法，包含使所述细胞与根据权利要求1到36中任一项所述的ceDNA载体接触。

38.根据权利要求37所述的方法，其中所述细胞是感光细胞或RPE细胞。

39.根据权利要求37或38所述的方法，其中所述细胞在体外或体内。

40.根据权利要求37到39中任一项所述的方法，其中所述至少一个异源核苷酸序列为了在所述真核细胞中表达而进行密码子优化。

41.根据权利要求37到40中任一项所述的方法，其中所述至少一个异源核苷酸序列是与表1中列出的任何序列具有至少85％同一性的序列。

42.一种用治疗血友病A受试者的方法，其包含向所述受试者施用根据权利要求1到36中任一项所述的ceDNA载体，其中至少一种异源核苷酸序列编码到FVIII蛋白。

43.根据权利要求42所述的方法，其中与对照相比，在施用所述ceDNA载体的受试者中所述受试者血清中的FVIII水平增加。

44.根据权利要求43所述的方法，其中与对照相比，FVIII水平的增加大于约40％。

45.根据权利要求42所述的方法，其中所述至少一个异源核苷酸序列是与表1中列出的任何序列具有至少85％同一性的序列。

46.根据权利要求42到45中任一项所述的方法，其中将所述ceDNA载体施用于感光细胞或RPE细胞或两者。

47.根据权利要求42到46中任一项所述的方法，其中所述ceDNA载体在感光细胞或RPE细胞或两者中表达FVIII蛋白。

48.根据权利要求42到47中任一项所述的方法，其中所述ceDNA载体通过以下任何一种或多种方式施用:视网膜下注射、脉络膜上注射或玻璃体内注射。

49.一种医药组合物，其包含根据权利要求1到36中任一项所述的ceDNA载体。

50.一种细胞，其含有根据权利要求1到36中任一项所述的ceDNA载体。

51.根据权利要求50所述的细胞，其中所述细胞是感光细胞、或RPE细胞或两者。

52.一种组合物，其包含根据权利要求1到36中任一项所述的ceDNA载体和脂质。

53.根据权利要求52所述的组合物，其中所述脂质是脂质纳米颗粒(LNP)。

54.一种试剂盒，其包含根据权利要求1到36中任一项所述的ceDNA载体、根据权利要求49所述的组合物、根据权利要求50或权利要求51所述的细胞、或根据权利要求52或权利要求53所述的组合物。

非病毒DNA载体及其用于表达FVIII治疗剂的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年3月13日提交的第62/817,904号美国临时申请以及2019年6月3日提交的第62/856,432号美国临时申请的优先权,所述临时申请中的每一个的内容特此以全文引用的方式并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式以及本文的表1-9中的序列电子提交并各自特此通过全文引用的方式并入。所述ASCII副本创建于2020年3月11日,被命名为131698-06020_SL.txt并且大小为116,781字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及基因疗法领域,包括用于在受试者或细胞中表达转基因或经分离的多核苷酸的非病毒载体。本公开还涉及核酸构建体、启动子、载体和宿主细胞,包括多核苷酸以及将外源DNA序列递送至靶细胞、组织、器官或生物体的方法。例如,本公开提供了使用非病毒ceDNA载体从细胞表达FVIII的方法,例如表达FVIII治疗蛋白质以治疗患有血友病A的受试者。可以使用该方法和组合物,例如,用于通过在对其有需要的受试者的细胞或组织中表达FVIII来治疗疾病。

背景技术

[0006] 基因疗法旨在改善患有因基因表达谱畸变引起的基因突变或获得性疾病的患者的临床结果。基因疗法包括治疗或预防因可能导致病症、疾病、恶性病等的缺陷基因或者异常调节或表达、例如表达不足或过表达所引起的医学病状。例如,可以通过向患者递送矫正性遗传物质来治疗、预防或改善由缺陷基因引起的疾病或病症,或可以通过例如对患者用矫正性遗传物质改变或沉默缺陷基因,使得该遗传物质在患者体内发生治疗性表达来治疗、预防或改善。

[0007] 基因疗法的基础是向转录盒提供活性基因产物(有时称为转基因),例如能够产生正向功能获得效应、负向功能丧失效应或另一结果的活性基因产物。此类结果可归因于治疗蛋白(例如抗体、功能性酶或融合蛋白)的表达。基因疗法也可以用于治疗由其他因素引起的疾病或恶性疾病。人类单基因病症可以通过将正常基因递送给目标细胞并表达来治疗。矫正基因在患者目标细胞中的递送和表达可以通过多种方法进行,包括使用工程化病毒和病毒基因递送载体。在许多可用的病毒来源载体(例如,重组逆转录病毒、重组慢病毒、重组腺病毒等)当中,重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus;rAAV)作为基因疗法中的多用途载体越来越受到欢迎。

[0008] 腺相关病毒(AAV)属于细小病毒科,并且更具体地说,组成依赖病毒属。源自于AAV的载体(即重组AAV(rAVV)或AAV载体)对于递送遗传物质具有吸引力,因为(i)它们能够感染(转导)多种多样的非分裂和分裂细胞类型,包括肌细胞和神经元;(ii)它们缺乏病毒结构基因,从而减弱了宿主细胞对病毒感染的应答,例如干扰素介导的应答;(iii)野生型病

毒被认为在人类中是非致病性的;(iv)与能够整合到宿主细胞基因组中的野生型AAV相比,复制缺陷型AAV载体缺乏rep基因,并且通常作为附加体存留,从而限制了插入诱变或基因毒性的风险;以及(v)与其他载体系统相比,AAV载体通常被认为是相对较弱的免疫原,因此不会触发明显的免疫应答(参见ii),从而获得了载体DNA的持久性以及治疗性转基因的潜在长期表达。

[0009] 然而,使用AAV颗粒作为基因递送载体存在几个主要缺陷。与rAAV相关的一个主要缺点是其对异源DNA的约4.5kb的病毒封装容量有限(Dong等人,1996;Athanasopoulos等人,2004;Lai等人,2010),因此AAV载体的使用已限于小于150,000Da蛋白编码容量。第二个缺点是,由于群中野生型AAV感染盛行,所以必须筛查rAAV基因疗法候选者中从患者消除所述载体的中和抗体的存在。第三个缺点与衣壳免疫原性有关,所述免疫原性阻止了对未从初始治疗中排除的患者进行再施用。患者的免疫系统可以对有效充当"强化"注射的所述载体作出应答,以刺激免疫系统产生高滴度的抗AAV抗体,从而杜绝了进一步治疗。最近的一些报告指出在高剂量情况下对免疫原性的顾虑。另一个值得注意的缺点是,鉴于在异源基因表达之前必须将单链AAV DNA转化为双链DNA,所以AAV介导的基因表达的启动相对较慢。

[0010] 另外,通过引入一种或多种含有AAV基因组、rep基因和cap基因的质粒,产生具有衣壳的常规AAV病毒粒子(Grimm等人,1998)。然而,发现这种衣壳化AAV病毒载体不能有效地转导某些细胞和组织类型,并且衣壳还诱导免疫应答。

[0011] 相应地,由于单次施用于患者(因患者免疫应答)、适于AAV载体递送的转基因遗传物质的范围因最小病毒封装容量(约4.5kb)而受限,以及AAV介导的基因表达缓慢,因此基因疗法使用腺相关病毒(AAV)载体受到限制。

[0012] 对血友病A的疾病修饰疗法存在大量未满足的需求。目前的疗法是繁重的,并且需要静脉内(IV)施用。首先,这些因子VIII注射剂不提供因子的持续递送,其低谷水平允许出血事件。其次,没有获得批准的血友病A基因疗法,并且由于预先存在的抗体,25%到40%的患者不能使用基于AAV的疗法。AAV只能一次施用,所产生的因子VIII水平可能不够高而无法发挥作用,或者可能超常,无法调整剂量水平。第三,由于针对这些外源性人工凝结因子产生中和抗体的,许多血友病A患者无法使用这些疗法。

[0013] 因此,本领域需要一种允许治疗性FVIII蛋白在细胞、组织或受试者中表达以治疗血友病A的技术。

发明内容

[0014] 本文所述的技术涉及通过从具有共价闭合末端的无衣壳(例如,非病毒)DNA载体(本文称为"闭合-端DNA载体"或"ceDNA载体")表达因子VIII(FVIII)蛋白来治疗血友病A的方法和组合物,其中ceDNA载体包含FVIII核酸序列或其密码子优化版本。这些ceDNA载体可用于生产用于治疗、监测和诊断的FVIII蛋白。将表达FVIII的ceDNA载体应用于受试者来治疗血友病A可用于:(i)提供改善疾病的FVIII酶水平,(ii)在递送过程中具有微创性,(iii)可重复并按效果给药,(iv)具有快速起效的治疗效果,(v)导致肝脏中纠正性FVIII酶的持续表达,(vi)恢复尿素循环功能,和/或(vii)可滴定以获得适当药理学水平的有缺陷的酶。

[0015] 在一些实施方案中,表达FVIII的ceDNA载体任选地存在于脂质体纳米颗粒制剂(LNP)中以治疗血友病A。本文所述的ceDNA载体可提供一种或多种益处,包括但不限于提供

疾病改善水平的因子VIII在递送过程中具有微创性、可重复且按效果给药、在治疗干预的几天内提供快速起效的治疗效果、循环中纠正性因子VIII水平的持续表达、可滴定以获得适当药理学水平的缺陷凝血因子，和/或为其他血友病提供治疗，包括但不限于因子VIII缺乏症。

[0016] 因此，本文所述的发明涉及具有共价闭合末端的无衣壳(例如，非病毒)DNA载体(本文称为“闭合末端DNA载体”或“ceDNA载体”)，其包含编码FVIII的异源基因，以允许FVIII治疗蛋白在细胞中表达。根据一个方面，本公开提供了一种无衣壳的封闭末端DNA(ceDNA)载体，其在两侧反向末端重复序列(ITR)之间包含至少一个异源核苷酸序列，其中至少一个异源核苷酸序列编码至少一种FVIII蛋白，其中编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自表1中的任何序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含选自表9的那些中任一种的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含选自由以下组成的组的核酸序列：SEQ ID NO:207,SEQ ID NO:210,SEQ ID NO:212,SEQ ID NO:199,SEQ ID NO:208,SEQ ID NO:211和SEQ ID NO:214。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少85％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少90％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少95％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少96％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少97％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少98％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210至少99％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少85％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少90％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少95％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少96％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少97％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少98％相同的核酸序列。根据一些实施方案，ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214至少99％相同的核酸序列。

[0017] 在一个实施方案中，本文公开了一种无衣壳的封闭末端DNA(ceDNA)载体，其在两侧反向末端重复序列(ITR)之间包含至少一个异源核苷酸序列，其中至少一个异源核苷酸序列编码至少一种FVIII蛋白，其中编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少85％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少90％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少91％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少92％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少93％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少94％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少95％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少96％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白

的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少97％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少98％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自与表1中的任何序列具有至少99％同一性的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自包含表1中任何序列的序列。在一个实施方案中，编码至少一种FVIII蛋白的至少一种异源核苷酸序列选自由表1中的任何序列组成的序列。

[0018] 在一个实施方案中，表1中的序列选自SEQ ID NO:380、SEQ ID NO:381、SEQ ID NO:382、SEQ ID NO:383、SEQ ID NO:384、SEQ ID NO:385,SEQ ID NO:386,SEQ ID NO:387,SEQ ID NO:388,SEQ ID NO:389,SEQ ID NO:390,SEQ ID NO:391,SEQ ID NO:392,SEQ ID NO:393,SEQ ID NO:394、SEQ ID NO:395、SEQ ID NO:396和SEQ ID NO:397。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:380。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:381。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:382。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:383。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:384。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:385。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:386。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:387。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:388。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:389。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:390。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:391。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:392。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:393。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:394。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:395。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:396。在一个实施方案中，该序列是SEQ ID NO:397。

[0019] 在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少85％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少90％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少91％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少92％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少93％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少94％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少95％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少96％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少97％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少98％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含选自与表9中的任何序列具有至少99％同一性的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含了包含表9中的序列的核酸序列。在一个实施方案中，ceDNA载体包含由表9中的序列组成的核酸序列。

[0020] 在一个实施方案中，表9中的序列选自SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:209、SEQ ID

NO:210,SEQ ID NO:211、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216和SEQ ID NO:217。在一个实施方案中,表9中的序列是SEQ ID NO:197。在一个实施方案中,表9中的序列是SEQ ID NO:198。在一个实施方案中,表9中的序列是SEQ ID NO:199。在一个实施方案中,表9中的序列为200。在一个实施方案中,表9中的序列为201。在一个实施方案中,表9中的序列为202。在一个实施方案中,表9中的序列为203。在一个实施方案中,表9中的序列为204。在一个实施方案中,表9中的序列为205。在一个实施方案中,表9中的序列为206。在一个实施方案中,表9中的序列为207。在一个实施方案中,表9中的序列为208。在一个实施方案中,表9中的序列为209。在一个实施方案中,表9中的序列为210。在一个实施方案中,表9中的序列为211。在一个实施方案中,表9中的序列为212。在一个实施方案中,表9中的序列为213。在一个实施方案中,表9中的序列为214。在一个实施方案中,表9中的序列为215。在一个实施方案中,表9中的序列为216。在一个实施方案中,表9中的序列为217。

[0021] 在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少85%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少90%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少91%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少92%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少93%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少94%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少95%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少96%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少97%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少98%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:210具有至少99%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含了包含SEQ ID NO:210的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含由SEQ ID NO:210组成的核酸序列。

[0022] 在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少85%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少90%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少91%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少92%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少93%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少94%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少95%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少96%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少97%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少98%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含与SEQ ID NO:214具有至少99%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含了包含SEQ ID NO:214的核酸序列。在一个实施方案中,ceDNA载体包含由SEQ ID NO:214组成的核酸序列。

[0023] 如本文所述的用于表达FVIII蛋白产生的ceDNA载体是由具有共价闭合端的互补

DNA的连续链形成的无衣壳线性双链体DNA分子(线性、连续和非衣壳化结构),其包含5'反向末端重复(ITR)序列和3'ITR序列,其中5'ITR和3'ITR相对于彼此能够具有相同的对称三维组构(即,对称或大体对称),或替代地,5'ITR和3'ITR相对于彼此能够具有不同的三维组构(即,不对称ITR)。另外,ITR能够来自相同或不同的血清型。在一些实施方案中,ceDNA载体能够包含ITR序列,所述ITR序列具有对称的三维空间组构,以便其结构在几何空间中呈相同形状,或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环(即,它们是相同的或相对于彼此呈镜像)。在一些实施方案中,一个ITR可以来自一种AAV血清型,而另一个ITR可以来自不同的AAV血清型。

[0024] 相应地,本文所述的技术的一些方面涉及一种用于改进上述FVIII蛋白的蛋白表达和/或生产的ceDNA载体,所述FVIII蛋白质包含位于异源核酸序列侧翼的ITR序列,所述异源核酸序列包含表5中公开的任何FVIII核酸序列,所述ITR序列选自以下任何一项:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复(ITR)(例如不对称修饰的ITR);(ii)两个经修饰的ITR,其中mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组构(例如不对称修饰的ITR);或(iii)对称或基本对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组构;或(iv)不对称修饰的或基本对称ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组构。本文公开的ceDNA载体可以在真核细胞中产生,因此在昆虫细胞中没有原核DNA修饰和细菌内毒素污染。

[0025] 本文所述的方法和组合物部分地涉及发现具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体),其能够用于从细胞中表达至少一种FVIII蛋白,或超过一种FVIII蛋白。

[0026] 相应地,本文在一个方面中提供DNA载体(例如ceDNA载体),其包含:编码至少一种转基因的至少一种异源核酸序列,所述转基因编码其FVIII蛋白且可操作地连接到位于两个不同AAV反向末端重复序列(ITR)之间的启动子,ITR之一包含功能AAV末端解链位点和Rep结合位点,并且ITR之一相对于另一ITR包含缺失、插入或取代;其中所述转基因编码PAH蛋白;且其中在非变性凝胶上分析时,DNA当在DNA载体上用具有单一识别位点的限制酶消化时,相较于线性和非连续DNA对照组,存在线性和连续DNA的特征色带。其他方面包括通过从如本文所述的ceDNA载体在体内表达FVIII蛋白来递送FVIII蛋白,以及进一步地使用编码FVIII的ceDNA载体治疗血友病A。本文还涵盖包含如本文所述的编码FVIII的ceDNA载体的细胞。根据一些实施方案,ceDNA载体选自ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20和ceDNAFVIII-载体23。根据一些实施方案,ceDNA载体是ceDNAFVIII载体19或ceDNAFVIII载体23。

[0027] 本发明的方面涉及产生ceDNA载体的方法,所述ceDNA载体可用于如本文所述的在细胞中表达FVIII蛋白。其它实施方案涉及通过本文提供的方法产生的ceDNA载体。在一个实施方案中,用于产生FVIII蛋白的无衣壳(例如非病毒)DNA载体(ceDNA载体)获自包含多核苷酸表达构建体模板的质粒(在本文中称为"ceDNA质粒"),所述模板以此次序包含:第一5'反向末端重复(例如AAV ITR);异源核酸序列;和3'ITR(例如AAV ITR),其中如本文所定义,5'ITR和3'ITR相对于彼此可以是不对称或对称的(例如WT-ITR,或修饰的对称ITR)。根据一些实施方案,ceDNA载体选自ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20和ceDNAFVIII-载体23。

根据一些实施方案,ceDNA载体是ceDNAFVIII载体19或ceDNAFVIII载体23。

[0028] 本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可通过普通技术人员在阅读本公开之后将会知道的许多手段获得。举例来说,用于产生本发明的ceDNA载体的多核苷酸表达构建体模板可以是ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒,和/或ceDNA-杆状病毒。在一个实施方案中,ceDNA-质粒包含限制性克隆位点(例如SEQ ID NO:123和/或124)可操作地位于ITR之间,其中可以插入包含例如可操作地连接至转基因(例如编码FVIII的核酸)的启动子的表达盒。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体是由多核苷酸模板(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒、ceDNA杆状病毒)产生,所述多核苷酸模板含有对称或不对称的ITR(经修饰的ITR或WT ITR)。

[0029] 在允许的宿主细胞中,具有至少两个ITR的多核苷酸模板在例如Rep存在下复制而产生表达FVIII蛋白的ceDNA载体。ceDNA载体产生经历两个步骤:第一,通过Rep蛋白从模板主链(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒、ceDNA杆状病毒基因组等)中切除(“拯救”)模板;和第二,Rep介导所切除的ceDNA载体复制。各种AAV血清型的Rep蛋白和Rep结合位点是所属领域的普通技术人员熟知的。普通技术人员了解基于至少一种功能性ITR从血清型中选择结合并复制核酸序列的Rep蛋白。例如,如果有复制能力的ITR来自AAV血清型2,那么对应的Rep将来自与该血清型一起工作的AAV血清型,例如AAV2 ITR与AAV2或AAV4 Rep一起,但不是AAV5 Rep,它不行。复制后,共价封闭式ceDNA载体继续在容许细胞中累积,并且ceDNA载体在Rep蛋白存在下在标准复制条件下优选随时间足够稳定,例如,累积达至少1pg/细胞、优选至少2pg/细胞、优选至少3pg/细胞、更优选至少4pg/细胞、甚至更优选至少5pg/细胞的量。

[0030] 因此,本发明的一个方面涉及一种产生用于表达这种FVIII蛋白的ceDNA载体的方法,所述方法包含以下步骤:a)在Rep蛋白存在下,在有效诱导宿主细胞内产生ceDNA载体的条件下并历时足够诱导宿主细胞内产生ceDNA载体的时间来培育具有多核苷酸表达构建体模板(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒)的宿主细胞(例如昆虫细胞)群体,所述模板缺乏病毒衣壳编码序列,并且其中所述宿主细胞不包含病毒衣壳编码序列;和b)从宿主细胞中收获并分离ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰的ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体。然而,没有表达病毒颗粒(例如,AAV病毒粒子)。因此,没有病毒粒子所施加的大小限制。根据一些实施方案,ceDNA载体选自ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20和ceDNAFVIII-载体23。根据一些实施方案,ceDNA载体是ceDNAFVIII载体19或ceDNAFVIII载体23。

[0031] 可以通过用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化从宿主细胞分离的DNA,并在变性和非变性凝胶上分析消化的DNA物质,以与线性和非连续DNA相比较证实线性且连续DNA的特征色带的存在,从而证实从宿主细胞分离的可用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的存在。

[0032] 本文还提供了在细胞或受试者中使用ceDNA载体表达具有治疗用途的FVIII蛋白的方法。这种FVIII蛋白可用于治疗血友病A。因此,本文提供了用于治疗血友病A的方法,包括向有需要的受试者施用编码治疗性FVIII蛋白的ceDNA载体。根据一些实施方案,编码治疗性FVIII蛋白的ceDNA载体选自ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20和ceDNAFVIII-载体23。

根据一些实施方案，ceDNA载体是ceDNAFVIII载体19或ceDNAFVIII载体23。根据一些实施方案，与对照相比，在施用ceDNA载体的受试者中受试者血清中的FVIII水平增加。根据一些实施方案，与对照相比，FVIII水平的增加大于约40％。根据一些实施方案，与对照相比，FVIII水平的增加大于约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％。

[0033] 在一些实施方案中，本文所述技术的一个方面涉及一种具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)，其中ceDNA载体包含至少一个可操作地定位于两个反向末端重复序列之间的异源核苷酸序列，其中ITR序列可以是不对称的或对称的或基本对称的，这些术语如本文所定义，其中所述ITR中的至少一个包含功能末端解链位点和Rep结合位点，并且任选地，所述异源核酸序列编码转基因(例如FVIII蛋白)且其中所述载体不存在于病毒衣壳中。

[0034] 下面进一步详细描述本发明的这些和其它方面。

附图说明

[0035] 通过参考在附图中描绘的本公开的说明性实施方案，可以理解上面简要概述并且在下面更详细论述的本公开的实施方案。但是，附图仅示出了本公开的典型实施方案，因此不应视为对范围的限制，因为本公开可以允许其它等效的实施方案。

[0036] 图1A示出了如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的示例性结构，其包含不对称ITR。在此实施例中，示例性ceDNA载体包括含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码FVIII转基因的开放阅读框(ORF)能够插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点(R3/R4)中。表达盒的两侧是在两个反向末端重复序列(ITR)-表达盒上游(5’端)的野生型AAV2 ITR和下游(3’端)的经修饰ITR，因此位于表达盒两侧的两个ITR彼此不对称。

[0037] 图1B示出了如本文所公开的用于表达FVIII的ceDNA载体的示例性结构，其包含不对称ITR和含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码表达FVIII蛋白的转基因的开放阅读框(ORF)能够插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒的两侧是在两个反向末端重复序列(ITR)-表达盒上游(5’端)的经修饰的ITR和下游(3’端)的野生型ITR。

[0038] 图1C示出了如本文所公开的用于表达FVIII的ceDNA载体的示例性结构，其包含不对称ITR以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和聚腺苷酸信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许FVIII转基因插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒的两侧是两个彼此不对称的反向末端重复序列(ITR)；表达盒上游(5’端)的修饰ITR和下游(3’端)的修饰ITR，其中5’ITR和3’ITR都是修饰ITR，但是具有不同的修饰(即，它们不具有相同的修饰)。

[0039] 图1D示出了如本文所公开的用于因表达FVIII的ceDNA载体的示例性结构，其包含如本文所定义的对称修饰的ITR或基本对称修饰的ITR以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。将编码FVIII转基因的开放阅读框(ORF)插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒的两侧是两个修饰的反向末端重复序列(ITR)，其中5’修饰ITR和3’修饰ITR是对称的或基本上对称的。

[0040] 图1E示出了如本文所公开的用于表达FVIII的ceDNA载体的示例性结构，其包含如本文所定义的对称修饰的ITR或基本对称修饰的ITR以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和聚腺苷酸信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许转基因(例如FVIII)插入介

于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒的两侧是两个修饰的反向末端重复序列(ITR),其中5'修饰ITR和3'修饰ITR是对称的或基本上对称的。

[0041] 图1F示出了如本文所公开的用于表达FVIII的ceDNA载体的示例性结构,其包含如本文所定义的对称WT-ITR或基本对称WT-ITR以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码转基因(例如FVIII)的开放阅读框(ORF)是插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒的两侧是两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR),其中5'WT-ITR和3'WT ITR是对称的或基本上对称的。

[0042] 图1G示出了如本文所公开的用于表达FVIII的ceDNA载体的示例性结构,其包含如本文所定义的对称修饰的ITR或基本对称修饰的ITR以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和聚腺苷酸信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许转基因(例如FVIII)插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒的两侧是两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR),其中5'WT-ITR和3'WT ITR是对称的或基本上对称的。

[0043] 图2A提供了AAV2的野生型左ITR(SEQ ID NO:52)的T形茎-环结构,以及A-A'臂、B-B'臂、C-C'臂、两个Rep结合位点(RBE和RBE')的标识,并且还显示了末端解链位点(TRS)。RBE含有一连串4个双螺旋四聚体,其被认为与Rep 78或Rep 68相互作用。另外,RBE'也被认为与在所述构建体中的野生型ITR或突变的ITR上装配的Rep复合物相互作用。D和D'区含有转录因子结合位点和其它保守结构。图2B显示了所提出的Rep催化的在野生型左ITR(SEQ ID NO:53)中的切割和接合活性,所述野生型左ITR包括AAV2的野生型左ITR的T形茎-环结构以及A-A'臂、B-B'臂、C-C'臂、两个Rep结合位点(RBE和RBE')的标识,并且还显示了末端解链位点(TRS)以及包含若干转录因子结合位点和另一保守结构的D和D'区域。

[0044] 图3A提供了野生型左AAV2 ITR(SEQ ID NO:54)的A-A'臂的含RBE部分以及C-C'和B-B'臂的一级结构(多核苷酸序列)(左)和二级结构(右)。图3B显示了左ITR的示例性突变ITR(也称为修饰ITR)序列。示出的是示例性突变左ITR(ITR-1,左)(SEQ ID NO:113)的A-A'臂的RBE部分、C臂和B-B'臂的一级结构(左)和预测的二级结构(右)。图3C显示了野生型右AAV2 ITR(SEQ ID NO:55)的A-A'环的含RBE部分以及B-B'和C-C'臂的一级结构(左)和二级结构(右)。图3D显示了示例性右修饰ITR。示出的是示例性突变右ITR(ITR-1,右)(SEQ ID NO:114)的A-A'臂的含RBE部分、B-B'和C臂的一级结构(左)和预测的二级结构(右)。可以如本文所教示,使用左ITR和右ITR的任何组合(例如AAV2 ITR或其它病毒血清型ITR或合成ITR)。图3A-3D的多核苷酸序列中的每一个是指在用于产生如本文所描述的ceDNA的质粒或杆粒/杆状病毒基因组中所用的序列。图3A-3D的每一个中还包含从质粒或杆粒/杆状病毒基因组中的ceDNA载体构型推断出的相应ceDNA二级结构以及预测的吉布斯自由能(Gibbs free energy)值。

[0045] 图4A是示出了制备杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC)的上游方法的示意图,该方法适用于在图4B的示意图所述的方法中产生如本文所公开的用于表达FVIII的ceDNA载体。图4B是ceDNA生产的示例性方法的示意图,图4C说明了确认ceDNA载体产生的生化方法和过程。图4D和图4E是描述了用于鉴定从在图4B的ceDNA产生过程期间获得的细胞团粒采集的DNA中ceDNA的存在的过程的示意性图示。图4D显示了左未经切割或用限制核酸内切酶消化并然后在天然凝胶或变性凝胶上进行电泳的示例性ceDNA的示意性预期亮带。最左边的示意图是天然凝胶,并展示多个带,表明以其双链体和未经切割形式的ceDNA以至少单体和二

聚体状态存在,可看到呈迁移较快的较小单体和迁移较慢的二聚体,二聚体的大小是单体的两倍。左起第二个示意图显示,当用限制性核酸内切酶切割ceDNA时,原始色带消失并出现了迁移较快(例如较小)的色带,与裂解后剩余的预期片段大小相对应。在变性条件下,原始双链体DNA是单链的,并且因为互补链是共价连接的,所以作为两倍于天然凝胶上观察到的大小的物种进行迁移。因此,在右起第二个示意图中,经过消化的ceDNA展示出与在天然凝胶上观察到的相似的带分布,但所述带作为其天然凝胶对应物大小的两倍的片段进行迁移。最右边的示意图展示,在变性条件下未经切割的ceDNA作为单链开环进行迁移,并且因此观察到的带是在不开环的天然条件下观察到的带大小的两倍。在这个图中,"kb"用于指示核苷酸分子的相对大小,取决于上下文,其基于核苷酸链长(例如,对于在变性条件下观察到的单链分子)或碱基对数目(例如,对于在天然条件下观察到的双链分子)。图4E显示了具有不连续结构的DNA。ceDNA可以通过在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制核酸内切酶切割,并在中性和变性两种条件下产生两个大小不同(1kb和2kb)的DNA片段。PCT/US19/14122的图4E还显示了具有线性连续结构的ceDNA。所述ceDNA载体可被限制性核酸内切酶切割,并生成两个DNA片段,所述片段在中性条件下以1kb和2kb迁移,但在变性条件下,链保持连接并产生以2kb和4kb迁移的单链。

[0046] 图5是ceDNA载体的变性凝胶电泳实施例的示例性图像,所述ceDNA载体用核酸内切酶消化(+)或不消化(-)(ceDNA构建体1和2使用EcoRI;ceDNA构建体3和4使用BamH1;ceDNA构建体5和6使用SpeI;且ceDNA构建体7和8使用XhoI)。构建体1-8描述于国际申请PCT PCT/US18/49996的实施例1中,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。确定了用星号突出显示的色带的大小,并提供在图片的底部。

[0047] 图6描绘了实施例7中所述的实验结果且特别地示出了IVIS影像,所述影像获自经LNP-polyC对照物处理的小鼠(距左侧最远的小鼠)和经LNP-ceDNA荧光素酶处理的四个小鼠(除距离左侧最远的小鼠之外的所有小鼠)。经ceDNA处理的四只小鼠在小鼠的含肝脏区域中显示明显的荧光。

[0048] 图7描绘了实施例8中所述的实验结果。暗斑点表示由被表达的ceDNA转基因产生的蛋白质存在且证实所施用的LNP-ceDNA与肝细胞结合。

[0049] 图8A-8B描绘了实施例9中阐述的眼部研究结果。图8A显示了注射JetPEI®-ceDNA荧光素酶的大鼠眼(左上方)相对于相同大鼠的未注射眼(右上方)或注射质粒-荧光素酶DNA的大鼠眼(左下方)与相同大鼠的未注射眼(右下方)的代表性IVIS影像。图8B显示了每个处理组的经处理眼或相应未处理眼的平均辐射度图。ceDNA处理的大鼠在99天期间展现长时间的明显荧光(和因此荧光素酶转基因表达),与之形成鲜明对比的是经质粒-荧光素酶处理的大鼠,其中观察到的相对荧光(和因此荧光素酶转基因表达)最小。

[0050] 图9A和9B描绘了实施例10中描述的Rag2小鼠的ceDNA持久性和重复给药研究的结果。图9A显示了在LNP-ceDNA-Luc处理的野生型c57bl/6小鼠或Rag2小鼠中随时间观察到的总通量的图。图9B提供的图形显示了重复剂量对Rag2小鼠中的荧光素酶转基因表达水平的影响,重复剂量之后,随之观察到增加的稳定表达(箭头表示重复剂量施用的时间)。

[0051] 图10提供了实施例11中描述的经治疗小鼠的ceDNA荧光素酶表达研究的数据,示出了每组小鼠在研究期间的总通量。高水平的未甲基化CpG与小鼠中随时间所观察到的较低总通量相关,而肝脏特异性启动子的使用与ceDNA载体在至少77天期间对转基因的持久

稳定表达相关。

[0052] 图11A和11B显示了表达FVIII的ceDNA载体的流体动力学递送。图11A显示在流体动力学注射表达FVIII的三种不同ceDNA载体(LPS1-F8-v1;LPS1-F8-v2;LPS1-F8-v3)或对照ceDNA载体(仅表达荧光素酶的ceDNA)(示出为媒介物)后第3天和第7天小鼠的血清样本中FVIII的表达水平。表达FVIII的三个ceDNA载体中的两个显示出FVIII表达。图11B是在流体动力学注射少或大量的表达FVIII的三种不同ceDNA载体(LPS1-F8-v1;LPS1-F8-v2;LPS1-F8-v3),或大量的媒介物对照ceDNA载体(仅表达荧光素酶)超过30天后小鼠的血浆样品中FVIII表达水平的剂量反应图。

[0053] 图12是描绘流体动力学递送表达FVIII的各种ceDNA载体(ceDNAFVIII-载体4、ceDNAFVIII-载体6、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体14、ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体18、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNAFVIII-载体22)3天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体19和ceDNAFVIII-载体21在3天后显示出最高的血浆因子VIII浓度。仅使用媒介物作为对照。

[0054] 图13是描绘流体动力学递送表达FVIII的各种ceDNA载体(ceDNAFVIII-载体1、ceDNAFVIII-载体2、ceDNAFVIII-载体3、ceDNAFVIII-载体5、ceDNAFVIII-载体7、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体13、ceDNAFVIII-载体15)3天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。ceDNAFVIII-载体8在3天后显示出最高的血浆因子VIII浓度。仅使用媒介物作为对照。

[0055] 图14是描绘流体动力学递送表达FVIII的各种ceDNA载体(ceDNAFVIII-载体4、ceDNAFVIII-载体9、ceDNAFVIII-载体10、ceDNAFVIII-载体11、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20、ceDNAFVIII-载体24、ceDNAFVIII-载体25、ceDNAFVIII-载体26)3天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。ceDNAFVIII-载体17和ceDNAFVIII-载体20在3天后显示出最高的血浆因子VIII浓度。仅使用媒介物作为对照。

[0056] 图15是描绘流体动力学递送逐渐增加剂量的ceDNAFVIII-载体23(0.005μg-50μg)1天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。如图15所示,随着ceDNAFVIII载体23的剂量增加,血浆FVIII以剂量依赖性方式增加。仅使用媒介物作为对照。

[0057] 图16是描绘流体动力学递送LNP:ceDNAFVIII-载体23测试制品7天后血浆FVIII浓度(IU/mL)的图。

具体实施方式

[0058] 本文提供了使用包含一种或多种编码FVIII治疗蛋白或其片段的核酸的ceDNA载体治疗血友病A的方法。本文还提供了如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体,其包含一种或多种编码FVIII蛋白的异源核酸。在一些实施方案中,FVIII蛋白的表达可以包括治疗蛋白从表达它的细胞中分泌出来。或者,在一些实施方案中,表达的FVIII蛋白可在表达它的细胞内起作用或发挥作用(例如发挥其作用)。在一些实施方案中,ceDNA载体在受试者的肝脏、肌肉(例如,骨骼肌)或其他身体部位中表达FVIII蛋白,其可充当FVIII治疗蛋白产生和分泌到许多全身隔室的贮库。

[0059] I.定义

[0060] 除非本文另有定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应具有本公开所属领

域的普通技术人员通常所了解的含义。应理解,本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文中所用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求限定。免疫学和分子生物学中常用术语的定义能够在下列文献中找到:《默克诊疗手册(Merck Manual of Diagnosis and Therapy)》第19版,默沙东公司(Merck Sharp&Dohme Corp.)出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等人(编辑),《费氏病毒学(Fields Virology)》,第6版,利平科特·威廉斯·威尔金斯公司(Lippincott Williams&Wilkins),美国费城宾夕法尼亚州(2013);Knipe,D.M.和Howley,P.M.(编辑),《分子细胞生物学和分子药学百科全书(The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine)》,由布莱克威尔科学公司(Blackwell Science Ltd.)出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);和Robert A.Meyers(编辑),《分子生物学和生物技术(Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference)》,由VCH出版公司(VCH Publishers,Inc.)出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Werner Luttmann的《免疫学》,爱思唯尔(Elsevier)出版,2006;《詹韦氏免疫生物学(Janeway's Immunobiology)》,Kenneth Murphy、Allan Mowat、Casey Weaver(编辑),Taylor&Francis Limited,2014(ISBN 0815345305,9780815345305);《Lewin基因XI(Lewin's Genes XI)》,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:Laboratory Manual)》,第4版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),美国纽约冷泉港(2012)(ISBN 1936113414);Davis等人,《Basic Methods in Molecular Biology》,Elsevier Science Publishing,Inc.,美国纽约(2012)(ISBN 044460149X);《酶学实验室方法:》DNA(Laboratory Methods in Enzymology:DNA)》,Jon Lorsch(编辑),爱思唯尔(Elsevier),2013(ISBN 0124199542);《目前分子生物学实验大全(Current Protocols in Molecular Biology,CPMB)》,Frederick M.Ausubel(编辑),John Wiley and Sons公司,2014(ISBN047150338X,9780471503385),《目前分子生物学实验大全(CPPS)》,John E.Coligan(编辑),John Wiley and Sons公司,2005;和《当前免疫学协议(Current Protocols in Immunology,CPI)》(John E.Coligan、ADA M Kruisbeek、David H Margulies、Ethan M Shevach、Warren Strobe(编辑),John Wiley and Sons公司,2003(ISBN 0471142735,9780471142737),这些文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0061] 如本文所用,术语"施用(administration/administering)"及其变化形式是指将组合物或药剂(例如,如本文所述的治疗性核酸或免疫抑制剂)引入受试者中并且包括同时和依序引入一种或多种组合物或药剂。"施用"可以指例如治疗、药物动力学、诊断、研究、安慰剂以及实验方法。"施用"还涵盖体外和离体治疗。将组合物或药剂引入个体中是通过任何适合的途径,包括经口、经肺、经鼻、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、瘤内或局部。通过电穿孔将组合物或药剂引入受试者中。施用包含自我施用和由另一个人施用。可以通过任何适合的途径进行施用。适合的施用途径使得组合物或药剂执行其预期功能。举例来说,如果所适合的途径是静脉内,那么通过将组合物或药剂引入个体的静脉来施用组合物。

[0062] 如本文所用,短语"核酸治疗性"、"治疗性核酸"和"TNA"可互换地使用,并且是指

使用核酸作为治疗疾病或病症的治疗剂的活性组分的治疗的任何模态。如本文所用，这些短语是指基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的非限制性实施例包含mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性实施例包含小环DNA、小基因、病毒DNA(例如，慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、封闭端线性双链体DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone(dbDNA™)DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒辅助DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。

[0063] 如本文所用，如FVIII治疗蛋白或其片段的治疗剂的“有效量”或“治疗有效量”是例如治疗或预防血友病A足以产生期望效果的量。用于测量目标基因或目标序列的表达的适合的分析包括例如使用所属领域的技术人员已知的技术检查蛋白质或RNA水平，所述技术如斑点印迹、北方印迹法、原位杂合、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及所属领域的技术人员已知的表型分析。然而，剂量水平是基于多种因素，包括损伤类型、年龄、体重、性别、患者的医学病状、病状的严重程度、施用途径和所采用的特定活性剂。因此，剂量方案可以在很大范围内变化，但可以由医生使用标准方法常规地确定。另外，术语“治疗量”、“治疗有效量”和“药学上有效量”包括所描述的本发明的组合物的防治或预防量。在所描述的本发明的防治性或预防性应用中，以足以消除或降低疾病、病症或病状的风险、减轻严重程度或延迟发病的量向易患有疾病、病症或病状或以其他方式处于疾病、病症或病状风险下的患者施用药物组合物或药剂，所述疾病、病症或病状包括疾病、病症或病状的生物化学、组织学和/或行为症状，其并发症和在疾病、病症或病状的发展期间呈现的中间病理学表型。通常优选使用最大剂量，即，根据一些医学判断的最高安全剂量。根据一些实施方案，疾病、病症或病情是血友病A。术语“剂量(dose和dosage)”在本文中可互换使用。

[0064] 如本文所用，术语“治疗效果”是指治疗的结果，其结果被判定为合乎需要并且有益的。治疗效果可以直接或间接地包括疾病表现的遏制、减少或消除。治疗效果还可以直接或间接地包括疾病表现的进展的遏制减少或消除。

[0065] 对于本文所描述的任何治疗剂，治疗有效量可以初始地根据初步的体外研究和/或动物模型来确定。治疗有效剂量也可以根据人数据来确定。可以基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用剂量。基于上述方法和其他熟知的方法调整剂量以实现最大功效在普通技术人员的能力内。下文总结了用于测定治疗有效性的一般原理，其可以在《古德曼和吉尔曼的治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》，第10版，麦格劳-希尔专业出版公司(McGraw-Hill)(纽约)(2001)的第1章中找到，所述文献以引用的方式并入本文中。

[0066] 药代动力学原理为修改剂量方案以获得期望程度的治疗功效并且具有最小的不可接受的副作用提供了基础。在可以测量药物的血浆浓度并且与治疗窗口有关的情况下，可以获得针对剂量修改的另外的指导。

[0067] 如本文所用，术语“异源核苷酸序列”和“转基因”可互换使用，并且是指并入如本文公开的ceDNA载体中并可以由其递送和表达的所关注的核酸(除编码衣壳多肽的核酸外)。

[0068] 如本文所用，术语“表达盒”和“转录盒”可互换使用，并且是指一段线性核酸，其包

括与一个或多个启动子或足以引导转基因转录的其他调控序列可操作地连接的转基因，但是不包含衣壳编码序列、其他载体序列或反向末端重复区域。表达盒可以另外包含一个或多个顺式作用序列(例如启动子、增强子或阻遏子)、一个或多个内含子和一个或多个转录后调控元件。

[0069] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物形式。因此，这个术语包含单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交物、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。“寡核苷酸”通常是指单链或双链DNA的约5至约100个核苷酸之间的多核苷酸。然而，出于本公开的目的，寡核苷酸的长度没有上限。寡核苷酸也称为“寡聚物(oligomer)”或“寡聚物(oligo)”，并且可以从基因中分离出来，或通过本领域已知的方法化学合成。应了解术语“多核苷酸”和“核酸”包含单链(例如有义或反义)和双链多核苷酸(如果所描述的实施例适用的话)。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、DNA-DNA双链体、预缩合DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合的形式。DNA可以呈小环、质粒、杆粒、小基因、辅助DNA(线性共价闭合DNA载体)、封闭端线性双链体DNA(CELiD或ceDNA)、doggybone(dbDNA™)DNA、哑铃形DNA、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、病毒载体或非病毒载体的形式。RNA可以呈小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)和其组合的形式。核酸包含含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键联的核酸，其是合成的、天然存在的以及非天然存在的，并且其具有与参考核酸类似的结合特性。此类类似物和/或经修饰的残基的实施例包含(但不限于)：硫代磷酸酯、二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(吗啉基)、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2’-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNA™)和肽核酸(PNA)。除非特别限制，否则所述术语涵盖含有与参考核酸具有类似结合特性的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指出，否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如，简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。

[0070] 如本文所使用的，“核苷酸”含有糖脱氧核苷(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基连接在一起。

[0071] “碱基”包括嘌呤和嘧啶，所述嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物，以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物，其包括但不限于放置新的反应性基团(诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧化物和烷基卤化物)的修饰。

[0072] 如本文所用，术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”包括当干扰RNA在与靶基因或序列相同的细胞中时能够减少或抑制靶基因或序列的表达(例如，通过介导降解与干扰RNA序列互补的mRNA或抑制与干扰RNA序列互补的mRNA翻译)的单链RNA(例如，成熟的miRNA、ssRNAi寡核苷酸、ssDNAi寡核苷酸)、双链RNA(即，双螺旋RNA，诸如siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、shRNA、aiRNA或前-miRNA)、DNA-RNA杂交物(参见例如，PCT公开号WO 2004/078941)或DNA-DNA杂交物(参见例如，PCT公开号WO 2004/104199)。因此，干扰RNA是指与靶mRNA序列或与由两条互补链或由一条单一自身互补链形成的双链RNA互补的单链RNA。干扰RNA可能与靶基因或序列具有实质或完全同一性，或可能包含错配区域(即错配基序)。干扰RNA的序列可对应于全长靶基因或其子序列。优选地，干扰RNA分子是化学合成的。出于所有

目的，将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0073] 干扰RNA包括“小干扰RNA”或“siRNA”，例如，长度为约15-60个、15-50个或15-40个(双螺旋)核苷酸，更通常长度为约15-30个、15-25个或19-25个(双螺旋)核苷酸的干扰RNA，并且优选地长度为约20-24个、21-22个或21-23个(双螺旋)核苷酸(例如，双链siRNA的每个互补序列的长度为15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个核苷酸，优选长度为20-24个、21-22个或21-23个核苷酸，并且双链siRNA的长度为约15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个碱基对，优选长度为约18-22个、19-20个或19-21个碱基对)。siRNA双螺旋可包含约1个至约4个核苷酸或约2个至约3个核苷酸的3’突出端和5’磷酸末端。siRNA的实施例包括但不限于由两条单独的链分子组装的双链多核苷酸分子，其中一条链是有义链，而另一条链是互补的反义链；由单链分子组装的双链多核苷酸分子，其中有义区和反义区通过基于核酸的接头或基于非核酸的接头连接；含有自身互补的有义区和反义区的具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子；以及具有两个或更多个环结构和含有自身互补的有义区和反义区的茎的环状单链多核苷酸分子，其中所述环状多核苷酸可以在体内或在体外被加工以产生活性双链siRNA分子。如本文所用，术语“siRNA”包括RNA-RNA双螺旋以及DNA-RNA杂交物(参见，例如，PCT公开号WO 2004/078941)。

[0074] 如本文所用，术语“核酸构建体”是指单链或双链的核酸分子，其是从天然存在的基因中分离的，或者以自然界中不另外存在或合成的方式进行修饰以含有核酸区段。当核酸构建体包含表达本公开的编码序列所需的控制序列时，术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。“表达盒”包括可操作地连接至启动子的DNA编码序列。

[0075] “可杂交的”或“互补的”或“基本上互补的”意指核酸(例如RNA)包括使其能够与另一核酸序列在体外和/或体内适当的温度和溶液离子强度的条件下非共价结合，即形成沃森-克里克碱基对(Watson-Crick base pair)和/或G/U碱基对、“退火”或“杂交”以序列特异性的反向平行方式(即，核酸特异性地结合于互补核酸)的核苷酸序列。如本领域已知的，标准的沃森-克里克碱基对包含：腺嘌呤(A)与胸苷(T)配对，腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)配对，鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。另外，在本领域中还已知对于两个RNA分子(例如dsRNA)之间的杂交，鸟嘌呤(G)碱基与尿嘧啶(U)配对。例如，在与mRNA中的密码子进行tRNA反密码子碱基配对的情况下，G/U碱基配对部分负责遗传密码的简并性(即，冗余)。在本公开的上下文中，靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合区段(dsRNA双链体)的鸟嘌呤(G)被认为与尿嘧啶(U)互补，反之亦然。这样，当可以在靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合区段(dsRNA双链体)的给定核苷酸位置形成G/U碱基对时，该位置不被认为是非互补的，而是被认为是互补的。

[0076] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用，是指任何长度的氨基酸的聚合物形式，其可以包含编码和非编码的氨基酸、经过化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸和具有修饰的肽主链的多肽。

[0077] “编码”特定FVIII蛋白的DNA序列是转录成特定RNA和/或蛋白质的DNA核酸序列。DNA多核苷酸可以编码被翻译成蛋白质的RNA(mRNA)，或者DNA多核苷酸可以编码未被翻译成蛋白质的RNA(例如tRNA、rRNA或靶向DNA的RNA；也称为“非编码”RNA或“ncRNA”)。

[0078] 如本文所用，如本文所用的术语“融合蛋白”是指包含来自至少两种不同蛋白质的蛋白质域的多肽。例如，融合蛋白可包含(i)FVIII或其片段和(ii)至少一种非GOI蛋白。本

文中涵盖的融合蛋白包括(但不限于)抗体,或与FVIII蛋白融合的抗体的Fc或抗原结合片段(例如受体、配体、酶或肽的胞外域)。作为融合蛋白的一部分的FVIII蛋白或其片段可以是单特异性抗体或双特异性或多特异性抗体。

[0079] 如本文所用,术语“基因组安全港基因”或“安全港基因”是指可以插入核酸序列以使得该序列可以以可预测的方式整合和起作用(例如表达所关注蛋白质)且对内源基因活性没有明显的负面影响或不促进癌症的基因或基因座。在一些实施方案中,安全港基因也是可有效地表达所插入的核酸序列并且表达水平比非安全港位点高的基因座或基因。

[0080] 如本文所用,术语“基因递送”意指将外来DNA转移到宿主细胞中以施加基因疗法的方法。

[0081] 如本文所用,术语“末端重复”或“TR”包括任何包含至少一个最低需要的复制起点和包含回文发夹结构的区域的病毒末端重复或合成序列。Rep结合序列(“RBS”)(也称为RBE(Rep结合元件))和末端解链位点(“TRS”)共同构成“最低需要的复制起点”,并且因此TR包括至少一个RBS和至少一个TRS。在给定的一段多核苷酸序列内彼此是反向互补序列的TR通常各自被称为“反向末端重复”或“ITR”。在病毒的背景下,ITR介导复制、病毒包装、整合和原病毒拯救。正如本文在本发明中意外发现的,在全长上不是反向互补序列的TR仍然可以执行ITR的传统功能,因此术语ITR在本文中用于指ceDNA基因组或ceDNA载体中能够介导ceDNA载体复制的TR。本领域普通技术人员将了解,在复杂的ceDNA载体构型中,可以存在超过两个ITR或不对称的ITR对。ITR可以是AAV ITR或非AAV ITR,或可以来源于AAV ITR或非AAV ITR。例如,ITR可以来源于细小病毒科,其涵盖细小病毒和依赖病毒(例如犬细小病毒、牛细小病毒、小鼠细小病毒、猪细小病毒、人细小病毒B-19),或可以将充当SV40复制起点的SV40发夹用作ITR,其可以通过截断、取代、缺失、插入和/或添加而被进一步修饰。细小病毒科病毒由两个亚科组成:感染脊椎动物的细小病毒亚科和感染无脊椎动物的浓核病毒亚科。依赖病毒属包含腺相关病毒(AAV)的病毒家族,其能够在脊椎动物宿主中复制,所述宿主包含但不限于人、灵长类、牛、犬、马和羊物种。本文中为了方便起见,将位于ceDNA载体中表达盒的5’(上游)的ITR称为“5’ITR”或“左ITR”,并将位于ceDNA载体中表达盒的3’(下游)的ITR称为“3’ITR”或“右ITR”。

[0082] “野生型ITR”或“WT-ITR”是指AAV或其他依赖病毒中天然存在的ITR序列的序列,其保留例如Rep结合活性和Rep切口能力。由于遗传密码的简并性或漂移,来自任何AAV血清型的WT-ITR的核苷酸序列可能与规范的天然存在的序列略有不同,因此,本文涵盖使用的WT-ITR序列包括由于在产生过程中发生的天然存在的变化(例如复制误差)而产生的WT-ITR序列。

[0083] 如本文所用,术语“基本上对称的WT-ITR”或“基本上对称的WT-ITR对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的一对WT-ITR,它们都是在整个长度上具有反向互补序列的野生型ITR。举例来说,ITR即使具有一个或多个偏离典型的天然存在的序列的核苷酸,只要变化并不影响所述序列的特性和整体三维结构,所述ITR也可以被认为是野生型序列。在一些方面,偏离的核苷酸代表保守的序列变化。作为一个非限制性实施例,序列与典范序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(例如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与另一个WT-ITR具有对称的三维空间组织,以使它们的3D结构在几何空间中具有相同的形状。基本上对称的WT-ITR在3D空间中具有相同的A、C-C’和B-B’环。通过确定具有与合适

的Rep蛋白配对的可操作的Rep结合位点(RBE或RBE')和末端解离位点(TRS),可以在功能上将基本上对称的WT-ITR确认为WT。可以任选地测试其他功能,包括在允许条件下的转基因表达。

[0084] 如本文所使用的,短语"经修饰的ITR"或"mod-ITR"或"突变ITR"在本文中可互换使用,并且是指与来自相同血清型的WT-ITR相比在至少一个或多个核苷酸中具有突变的ITR。所述突变可以引起ITR中的A、C、C'、B、B'区中的一个或多个发生变化,并且可以使得三维空间组构(即,其几何空间中的3D结构)相较于相同血清型的WT-ITR的3D空间组构发生变化。

[0085] 如本文所使用的,术语"不对称ITR"也称为"不对称ITR对",是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内在全长上不反向互补的一对ITR。作为一个非限制性实施例,不对称的ITR与其同源ITR不具有对称的三维空间组织,使得其3D结构在几何空间中具有不同的形状。换句话说,不对称的ITR对具有不同的整体几何结构,即它们在3D空间中具有不同的A、C-C'和B-B'环组织(例如,一个ITR与同源ITR相比可能具有短的CC'臂和/或短的BB'臂)。两个ITR之间的序列差异可能是由于一个或多个核苷酸添加、缺失、截断或点突变引起的。在一个实施方案中,不对称ITR对中的一个ITR可以是野生型AAV ITR序列,另一个ITR是如本文定义的修饰ITR(例如非野生型或合成ITR序列)。在另一个实施方案中,不对称ITR对中的ITR皆不是野生型AAV序列,并且两个ITR是在几何空间中具有不同形状的经修饰的ITR(即,不同的整体几何结构)。在一些实施方案中,不对称ITR对中的一个mod-ITR可能具有短的C-C'臂,而另一个ITR可能具有不同的修饰(例如单臂或短的B-B'臂等),使得它们与同源不对称mod-ITR相比具有不同的三维空间组织。

[0086] 如本文所用,术语"对称ITR"是指在单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的、为野生型或突变型(例如相对于野生型被修饰的)依赖病毒ITR序列并且在其全长上反向互补的一对ITR。在一个非限制性实施例中,两个ITR都是来自AAV2的野生型ITR序列。在另一个实施例中,这两个ITR皆不是野生型ITR AAV2序列(即,它们是经修饰的ITR,也称为突变型ITR),并且由于核苷酸添加、缺失、取代、截断或点突变而在序列上与野生型ITR不同。本文中为方便起见,将位于ceDNA载体中表达盒的5'(上游)的ITR称为"5'ITR"或"左ITR",并将位于ceDNA载体中表达盒的3'(下游)的ITR称为"3'ITR"或"右ITR"。

[0087] 如本文所使用的,术语"基本上对称的修饰ITR"或"基本上对称的mod-ITR对"是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体中的一对修饰ITR,它们在其全长上具有反向互补序列。例如,修饰ITR即使具有一些偏离反向互补序列的核苷酸序列,只要变化不影响特性和整体形状,也可以认为是基本上对称的。作为一个非限制性实施例,序列与典型序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与其同源经修饰的ITR具有对称的三维空间组构,使得其3D结构在几何空间中具有相同的形状。换句话说,大体上对称的经修饰的ITR对具有在3D空间中组织的相同的A、C-C'和B-B'环。在一些实施方案中,来自mod-ITR对的ITR可以具有不同的反向互补核苷酸序列,但仍具有相同的对称三维空间组织,即两个ITR都具有产生相同的整体3D形状的突变。举例来说,mod-ITR对中的一个ITR(例如5'ITR)可以来自一种血清型,而另一个ITR(例如3'ITR)可以来自不同血清型,然而,两者均能够具有相同的相应突变(例如如果5'ITR在C区域中具有缺失,则来自不同血清型的经修饰的同源3'ITR在C'区域中的相应位置具有缺失),使得

经修饰的ITR对具有相同的对称三维空间组织。在此类实施方案中，经修饰的ITR对中的每个ITR可来自不同血清型(例如AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12)，诸如AAV2与AAV6的组合，其中一个ITR中的修饰在来自不同血清型的同源ITR的相应位置得到反映。在一个实施例中，大体上对称的经修饰的ITR对是指一对经修饰的ITR(mod-ITR)，只要ITR之间的核苷酸序列的差异不影响特性或整体形状并且其在3D空间中具有大体上相同的形状即可。作为非限制性实施例，如通过本领域公知的标准方法如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)或BLASTN测定，mod-ITR与规范的mod-ITR具有至少95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性，并且还具有对称的三维空间组织，以使其3D结构在几何空间中的形状相同。基本上对称的mod-ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环，例如，如果基本上对称的mod-ITR对中的经修饰的ITR缺失C-C'臂，那么同源mod-ITR对应缺失C-C'环，并且还具有在其同源mod-ITR的几何空间中呈相同形状的剩余A和B-B'环的类似3D结构。

[0088] 术语“位于侧翼”是指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。通常，在序列ABC中，B的两侧是A和C。对于A×B×C排列，情况也是如此。因此，位于两侧的序列在被侧接的序列之前或之后，但不必与被侧接的序列相邻或紧邻。在一个实施例中，术语位于两侧是指在线性双链体ceDNA载体的每个末端出的末端重复序列。

[0089] 如本文所用，术语“治疗(treat/treating/treatment)”包括减轻、大体上抑制、减缓或逆转病状的进展，大体上改善病状的临床症状或大体上预防病状的临床症状的出现、获得有益或所需的临床结果。根据一些实施方案，病症是血友病A。治疗进一步指代实现以下中的一个或多个：(a)降低病症的严重程度；(b)限制所治疗的一种或多种病症的症状特征的发展；(c)限制所治疗的一种或多种病症的症状特征的恶化；(d)限制先前患有病症的患者中的一种或多种病症的复发；以及(e)限制先前对于一种或多种病症无症状的患者中的症状的复发。有益或所需的临床结果，如药理学和/或生理学作用，包括(但不限于)：预防可能易患有疾病、病症或病状但尚未经历或展现疾病的症状的个体出现所述疾病、病症或病状(防治性治疗)；缓解所述疾病、病症或病状的症状；减轻所述疾病、病症或病状的程度；稳定所述疾病、病症或病状(即，不恶化)；预防所述疾病、病症或病状的扩散；延迟或减缓所述疾病、病症或病状进展；改善或缓和所述疾病、病症或病状；以及其组合，以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比，延长存活期。

[0090] 如本文所用，术语“增加”、“增强”、“提高”(以及类似术语)通常是指相对于自然条件、预期条件或平均条件、或者相对于对照条件直接地或间接地增加浓度、水平、功能、活性或行为的作用。

[0091] 如本文所用，术语“最小化”、“减少”、“降低”和/或“抑制”(以及类似术语)通常是指直接或间接地降低相对于自然条件、预期条件或平均条件，或相对于对照条件的浓度、水平、功能、活动或行为的行为。

[0092] 如本文所使用的，术语“ceDNA基因组”是指还并入了至少一个反向末端重复区域的表达盒。ceDNA基因组还可以包括一个或多个间隔区。在一些实施例中，ceDNA基因组作为DNA的分子间双链体多核苷酸并入质粒或病毒基因组中。

[0093] 如本文所使用的，术语“ceDNA间隔区”是指分隔ceDNA载体或ceDNA基因组中的功能元件的间插序列。在一些实施方案中，ceDNA间隔区将两个功能元件保持在对于最佳功能性来说所期望的距离上。在一些实施方案中，ceDNA间隔区提供或增加了ceDNA基因组在例

如质粒或杆状病毒内的遗传稳定性。在一些实施方案中，ceDNA间隔区通过提供克隆位点等的便利位置，促进ceDNA基因组的就绪遗传操作。举例来说，在某些方面中，含有若干限制性核酸内切酶位点的寡核苷酸“多酶切点接头”或设计成不具有已知蛋白质(例如转录因子)结合位点的非开放阅读框架序列能够定位于ceDNA基因组中以分离顺式作用因子，例如将6聚体、12聚体、18聚体、24聚体、48聚体、86聚体、176聚体等插入末端解链位点与上游转录调控元件之间。类似地，可以在聚腺苷酸化信号序列与3’末端解链位点之间并入间隔子。

[0094] 如本文所用，术语“Rep结合位点”、“Rep结合元件”、“RBE”和“RBS”可互换使用并且是指Rep蛋白(例如AAV Rep 78或AAV Rep 68)的结合位点，其在Rep蛋白结合后允许Rep蛋白在并入了所述RBS的序列上发挥其位点特异性核酸内切酶活性。RBS序列和其反向互补序列一起形成单个RBS。RBS序列在所属领域中是已知的，并且包括例如5’-GCGCGCTCGCTCGCTC-3’(SEQ ID NO:60)，AAV2中所鉴定的RBS序列。在本发明的实施例中可以使用任何已知的RBS序列，包含其它已知的AAV RBS序列和其它天然已知的或合成的RBS序列。不受理论束缚，相信Rep蛋白的核酸酶域结合到双链体核苷酸序列GCTC，并且因此，两种已知的AAV Rep蛋白直接结合到双链体寡核苷酸5’-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3’(SEQ ID NO:60)并且在其上稳定组装。另外，可溶性聚集性构象异构体(即，数目未定的相互缔合的Rep蛋白)解离并结合到含有Rep结合位点的寡核苷酸。每个Rep蛋白都与每个链上的含氮碱基和磷酸二酯主链相互作用。与含氮碱基的相互作用提供序列特异性，而与磷酸二酯主链的相互作用是非或较少序列特异性的，并稳定了蛋白质-DNA复合物。

[0095] 如本文所用，术语“末端解离位点”和“TRS”在本文可互换使用，是指一个区域，在此Rep与5’胸苷形成酪氨酸-磷酸二酯键，产生3’OH，充当通过细胞DNA聚合酶、例如DNA pol δ或DNA polε进行DNA延伸的底物。可替代地，Rep-胸苷复合物可以参与配位接合反应。在一些实施例中，TRS最低限度地涵盖非碱基配对的胸苷。在一些实施例中，TRS的切口产生效率可以至少部分地由其在同一分子内距RBS的距离来控制。当受体底物是互补ITR时，所产生的产物是分子内双链体。TRS序列在所属领域中已知，并且包括例如5’-GGTTGA-3’(SEQ ID NO:61)，AAV2中所鉴定的六核苷酸序列。本发明的实施方案中可以使用任何已知的TRS序列，包括其它已知的AAV TRS序列和其它天然已知或合成的TRS序列，例如AGTT(SEQ ID NO:62)、GGTTGG(SEQ ID NO:63)、AGTTGG(SEQ ID NO:64)、AGTTGA(SEQ ID NO:65)和其它基序，例如RRTTRR(SEQ ID NO:66)。

[0096] 如本文所用，术语“ceDNA-质粒”是指一种包含作为分子间双链体的ceDNA基因组的质粒。

[0097] 如本文所使用的，术语“ceDNA-杆粒”是指一种包括作为分子间双链体的ceDNA基因组的感染性杆状病毒基因组，其能够作为质粒在大肠杆菌中增殖，因此可以作为杆状病毒的穿梭载体操作。

[0098] 如本文所用，术语“ceDNA-杆状病毒”是指一种在杆状病毒基因组内包含作为分子间双链体的ceDNA基因组的杆状病毒。

[0099] 如本文所用，术语“ceDNA-杆状病毒感染的昆虫细胞”和“ceDNA-BIIC”可互换使用，是指被ceDNA-杆状病毒感染的无脊椎动物宿主细胞(包括但不限于昆虫细胞(例如Sf9细胞))。

[0100] 如本文所用，术语“ceDNA”是指用于非病毒基因转移、合成或其他目的的无衣壳闭

合端线性双链(ds)双螺旋DNA。ceDNA的详细描述描述于2017年3月3日提交的PCT/US2017/020828的国际申请中,所述申请的全部内容以引用的方式明确地并入本文中。使用基于细胞的方法产生包括各种反向末端重复(ITR)序列和构型的ceDNA的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的实施例1中,所述申请中的每一个以全文引用的方式并入本文中。用于产生包括各种ITR序列和构型的合成ceDNA载体的某些方法描述于例如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US2019/14122中,所述国际申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0101] 如本文所使用的,术语“封闭端DNA载体”是指具有至少一个共价封闭端的无衣壳DNA载体,其中所述载体的至少一部分具有分子内双链体结构。

[0102] 如本文所使用的,术语“ceDNA载体”与“ceDNA”可互换地使用并且指包括至少一个末端回文结构的封闭端DNA载体。在一些实施例中,ceDNA包括两个共价封闭端。

[0103] 如本文所使用的,术语“neDNA”或“带切口的ceDNA”是指在开放阅读框(例如,待表达的启动子和转基因)上游的茎区或间隔区5’中具有1-100个碱基对的切口或间隙的封闭端DNA。

[0104] 如本文所使用的,术语“间隙”和“切口”可互换地使用,并且意指本发明的合成DNA载体的中断部分,其在另外双链ceDNA中产生单链DNA部分的延伸。在双链体DNA的一个链中,间隙的长度可以是1个碱基对到100个碱基对。由本文所描述的方法以及由所述方法产生的合成载体设计和产生的典型间隙的长度可以是例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60bp。本公开中的示例性间隙的长度可以是1bp到10bp、1bp到20bp、1bp到30bp。

[0105] 如本文中所定义,“报告分子”是指可用于提供可检测的读出数的蛋白质。报告分子通常产生可测量的信号,例如荧光、颜色或发光。报告蛋白编码序列编码在细胞或生物体中的存在易于观察到的蛋白质。举例来说,荧光蛋白当被特定波长的光激发时会导致细胞发荧光,荧光素酶引起细胞催化产生光的反应,以及如β-半乳糖苷酶的酶将底物转化为有色产物。可用于实验或诊断目的的示例性报告多肽包含但不限于β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶(AP)、胸苷激酶(TK)、绿色荧光蛋白(GFP)和其它荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和其它在本领域中公知的报告多肽。

[0106] 如本文所用,术语“有义”和“反义”是指多核苷酸上结构元件的取向。元件的有义和反义型式彼此反向互补。

[0107] 如本文所用,术语“合成AAV载体”和“AAV载体的合成产生”是指在完全无细胞环境中的AAV载体和其合成产生方法。

[0108] 如本文所用,“报告子”是指可用于提供可检测的读出数的蛋白质。报告子通常产生可测量的信号,如荧光、颜色或发光。报告蛋白编码序列编码在细胞或生物体中的存在易于观察到的蛋白质。举例来说,荧光蛋白当被特定波长的光激发时会导致细胞发荧光,荧光素酶引起细胞催化产生光的反应,以及如β-半乳糖苷酶的酶将底物转化为有色产物。可用于实验或诊断目的的示例性报告多肽包括但不限于β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶(AP)、胸苷激酶(TK)、绿色荧光蛋白(GFP)和其他荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和其他在本领域中公知的报告多肽。

[0109] 如本文所用，术语“效应蛋白”是指一种提供可检测的读出数的多肽，例如作为报告多肽，或更适当地，作为杀死细胞的多肽，例如毒素，或致使细胞易用所选作用剂或因缺乏所选作用剂而被杀死的作用剂。效应蛋白包括直接靶向或损害宿主细胞的DNA和/或RNA的任何蛋白质或肽。举例来说，效应子蛋白可以包含(但不限于)：靶向宿主细胞DNA序列(无论是基因组的还是在染色体外元件上的)的限制核酸内切酶、降解细胞存活所必需的多肽目标的蛋白酶；DNA旋转酶抑制剂；以及核糖核酸酶型毒素。在一些实施例中，由如本文所描述的合成生物回路控制的效应蛋白表达可作为一个因子参与另一个合成生物回路，从而扩大了生物回路系统应答性的范围和复杂度。

[0110] 转录调节子是指活化或阻遏所关注基因(如FVIII)转录的转录活化因子和阻遏子。启动子是启动特定基因转录的核酸区域。转录活化因子通常在附近与转录启动子结合并募集RNA聚合酶来直接启动转录。阻遏子与转录启动子结合，并在空间上阻碍RNA聚合酶启动转录。其它转录调节子可取决于它们的结合位置以及细胞和环境条件来充当活化子或阻遏子。转录调节子类别的非限制性实施例包含但不限于同源域蛋白、锌指蛋白、翼状螺旋(叉头)蛋白和亮氨酸拉链蛋白。

[0111] 如本文所使用的，“阻遏蛋白”或“诱导蛋白”是与调控序列元件结合并分别阻遏或活化与调控序列元件操作性连接的序列的转录的蛋白质。如本文所描述的优选阻遏和诱导蛋白对至少一种输入剂或环境输入物的存在或不存在敏感。如本文所描述的优选蛋白质是模块的形式，包括例如可分离的DNA结合和输入剂结合或应答元件或结构域。

[0112] 如本文所使用的，“载剂(carrier)”包含任何和所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、缓冲液、载剂溶液、悬液、胶体等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是所属领域熟知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不会产生毒性的、过敏性的或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0113] 如本文所使用的，“输入剂应答结构域”是转录因子的一个结构域，其以致使连接的DNA结合融合结构域对条件或输入剂的存在作出应答的方式与所述条件或输入剂结合或以其它方式作出应答。在一个实施方案中，条件或输入剂的存在导致输入剂应答结构域或其融合的蛋白质发生构象变化，从而改变转录因子的转录调制活性。

[0114] 术语“体内”是指在生物体、例如多细胞动物中或内部进行的测定或过程。在本文描述的一些方面中，当使用单细胞生物例如细菌时，可以说方法或用途是在“体内”发生的。术语“离体”是指使用具有完整膜的活细胞进行的方法和用途，所述活细胞在多细胞动物或植物体之外，例如外植体、培养细胞，包括原代细胞和细胞系、转化的细胞系，以及提取的组织或细胞，包括血细胞，等等。术语“体外”是指不需要存在具有完整膜的细胞的测定和方法，例如细胞提取物，并且可以指在非细胞系统、例如不包含细胞或细胞系统的介质、例如细胞提取物中引入可编程的合成生物回路。

[0115] 如本文所用的术语“启动子”是指通过驱动核酸序列的转录来调节另一核酸序列表达的任何核酸序列，其可以是编码蛋白质或RNA的异源靶基因。启动子可以是组成型的、诱导型的、阻遏型的、组织特异性的或其任何组合。启动子是核酸序列的控制区域，在所述核酸序列的其余部分的引发和转录速率是受控的。启动子还可以含有可以结合调节蛋白和分子的遗传元件，例如RNA聚合酶和其他转录因子。在本文所述的方面的一些实施方案中，

启动子可以驱动调节启动子本身的表达的转录因子的表达。在启动子序列内将发现转录起始位点，以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合域。真核启动子将经常但并非总是含有“TATA”框和“CAT”框。各种启动子，包括诱导型启动子，可用于驱动本文公开的ceDNA载体中转基因的表达。启动子序列可以在其3’末端以转录起始位点为界并且向上游延伸(5’方向)以包括为了在高于背景的可检测水平上引发转录所必需的最少数目个碱基或元件。

[0116] 如本文所用，术语“增强子”是指顺式作用调控序列(例如50-1,500个碱基对)，其结合一种或多种蛋白质(例如活化剂蛋白质或转录因子)以增强核酸序列的转录活化。增强子可以位于其调节的基因起始位点上游或基因起始位点下游最多1,000,000个碱基对处。增强子可以位于内含子区域内，或无关基因的外显子区中。

[0117] 启动子可以被说成驱动其调节的核酸序列的表达或驱动其转录。短语“操作性地连接”、“操作性定位”、“操作性连接”，“在控制下”和“在转录控制下”指示启动子相对于其调节的核酸序列处于正确的功能位置和/或取向，以控制该序列的转录启动和/或表达。如本文所使用的，“反向启动子”是指核酸序列处于相反的取向，使得编码链现在成为非编码链的启动子，并且反之亦然。反向启动子序列可以在各种实施例中用于调控开关的状态。另外，在各种实施例中，启动子可以与增强子结合使用。

[0118] 启动子可以是与基因或序列天然结合的启动子，如可以通过分离位于编码区段上游的5’非编码序列和/或给定基因或序列的外显子所获得。此类启动子可以称为“内源性的”。类似地，在一些实施方案中，增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子，位于所述序列的下游或上游。

[0119] 在一些实施例中，编码核酸区段定位在“重组启动子”或“异源启动子”的控制下，所述启动子均指在其天然环境中通常不与其操作性地连接的编码核酸序列关联的启动子。重组或异源增强子是指在天然环境中正常不与给定核酸序列关联的增强子。这样的启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子；从任何其他原核、病毒或真核细胞中分离的启动子或增强子；以及非“天然存在”的合成启动子或增强子，即包含不同转录调节区域的不同元件、和/或通过本领域已知的基因工程方法来改变表达的突变。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列以外，还可以结合本文公开的合成生物回路和模块，使用重组克隆和/或核酸扩增技术，包含PCR，来产生启动子序列(参见例如美国专利第4,683,202号，美国专利第5,928,906号，每个专利都以引用方式并入本文中)。此外，经考虑也可以采用指导序列在例如线粒体、叶绿体等非核细胞器内的转录和/或表达的控制序列。

[0120] 如本文所描述的，“诱导型启动子”是特征在于当存在诱导物或诱导剂或受其影响或被其接触时，启动或增强转录活性的启动子。如本文所定义的“诱导物”或“诱导剂”可以是内源性的，或是以能够从诱寻型启动子诱导转录活性的方式施用的通常外源性的化合物或蛋白质。在一些实施方案中，诱导物或诱导剂，即化学物质、化合物或蛋白质，本身可以是核酸序列转录或表达的结果(即诱导物可以是由另一组分或模块表达的诱导蛋白)，转录或表达本身可以处于诱导型启动子的控制下。在一些实施方案中，诱导型启动子是在不存在某些剂、例如阻遏蛋白的情况下被诱导的。诱导型启动子的实施例包括但不限于：四环素、金属硫蛋白、蜕皮素、哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子；以及小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列(MMTV-LTR))和其他类固醇响应性启动子、雷帕霉素响应性启动子等。

[0121] 本文可互换使用的术语“DNA调控序列”、“控制元件”和“调控元件”是指提供和/或

调节非编码序列(例如靶向DNA的RNA)或编码序列(例如定点修饰多肽或Cas9/Csn1多肽)的转录和/或调节所编码多肽的翻译的转录和翻译控制序列,诸如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0122] “可操作地连接”是指一种并置,其中所描述的组分处于允许它们以预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子可操作地连接到所述编码序列。“表达盒”包括异源DNA序列,其可操作地连接到启动子或足以引导转基因在ceDNA载体中转录的其他调控序列。合适的启动子包括例如组织特异性启动子。启动子也可以是AAV起源的。

[0123] 如本文所用的术语“受试者”是指向其提供用本发明的ceDNA载体的治疗、包括预防性治疗的人类或动物。通常,动物是脊椎动物,例如但不限于灵长类动物、啮齿动物、家养动物或野生动物。灵长类动物包括但不限于黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养和野生动物包括但不限于:牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种如家猫、犬科物种如狗、狐狸、狼、禽类物种如鸡、鸸鹋、鸵鸟,以及鱼如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼。在本文所述方面的某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物或人。受试者可以是雄性或雌性。另外,受试者可以是婴儿或儿童。在一些实施方案中,受试者可以是新生儿或未出生的受试者,例如,受试者还在子宫内。优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实施例。人以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病和病症的动物模型的受试者。另外,本文所描述的方法和组合物可以用于家养动物和/或宠物。人受试者可以具有任何年龄、性别、种族或族群,例如,高加索人(白人)、亚洲人、非洲人、黑人、非裔美洲人、非裔欧洲人、西班牙人、中东人等。在一些实施方案中,受试者可以是临床环境中的患者或其他受试者。在一些实施方案中,受试者已进行治疗。在一些实施方案中,受试者是胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在一些实施方案中,受试者是人类胎儿、人类新生儿、人类婴儿、人类儿童、人类青少年或人类成人。在一些实施方案中,受试者是动物胚胎,或非人类胚胎或非人类灵长类动物胚胎。在一些实施方案中,受试者是人胚胎。

[0124] 如本文所用,术语“宿主细胞”包括易于被本公开的核酸构建体或ceDNA表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。作为非限制性实施例,宿主细胞可以是分离的原代细胞、多能干细胞、$CD34^+$细胞、诱导的多能干细胞或许多永生化细胞系(例如HepG2细胞)中的任何一种。可替代地,宿主细胞可以是组织、器官或生物体中的原位或体内细胞。

[0125] 术语“外源”是指存在于除天然来源外的细胞中的物质。当在本文中使用时,术语“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体等生物系统中的核酸(例如编码多肽的核酸)或多肽,通常在所述细胞或生物体中未发现所述核酸或多肽,并且希望将核酸或多肽引入这种细胞或生物中。可替代地,“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸或多肽,在所述细胞或生物体中发现核酸或多肽的量相对较低,并且希望增加细胞或生物体中核酸或多肽的量,例如以产生异位表达或水平。与此相反,术语“内源”是指原产于所述生物系统或细胞的物质。

[0126] 术语“序列一致性”是指两个核苷酸序列之间的相关性。为了本公开的目的,使用在EMBOSS软件包的Needle程序(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,同上)、优选版本3.0.0或更高版本中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,

1970,见上文)确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性程度。使用的可选参数是空位开放罚分10,空位延伸罚分0.5和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替换矩阵。标记为“最长一致性”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作一致性百分比,并按以下计算:(相同的脱氧核糖核苷酸乘以100)/(比对长度-比对空位总数)。比对的长度优选为至少10个核苷酸、优选为至少25个核苷酸、更优选为至少50个核苷酸并且最优选为至少100个核苷酸。

[0127] 如本文所用,术语“同源性”或“同源”被定义为,在比对序列且必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后,与靶染色体上的相应序列中的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。出于确定核苷酸序列同源性百分比的比对可以用所属技术领域中内的各种方式来实现,例如使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,当同源臂的例如核酸序列(例如DNA序列)与宿主细胞的相应原生或未经编辑的核酸序列(例如基因组序列)至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多一致时,所述序列被视为“同源”。

[0128] 如本文所用,术语“异源”意指分别在天然核酸或蛋白质中未发现的核苷酸或多肽序列。异源核酸序列可以与天然存在的核酸序列(或其变异体)连接(例如通过基因工程)以产生编码嵌合多肽的嵌合核苷酸序列。异源核酸序列可以连接到变异多肽(例如通过基因工程)以产生编码融合变异多肽的核苷酸序列。

[0129] “载体”或“表达载体”是复制子,诸如质粒、杆粒、噬菌体、病毒、病毒体或粘粒,另一个DNA区段(即“插入物”)可与之连接以便实现所连接区段在细胞中的复制。载体可以是设计用于递送到宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用,载体在起源和/或最终形式上可以是病毒或非病毒的,但是出于本公开的目的,“载体”通常是指ceDNA载体,如本文所用。术语“载体”涵盖与适当的控制元件结合时能够复制并且可以将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。在一些实施方案中,载体可以是表达载体或重组载体。

[0130] 如本文所用,术语“表达载体”是指指导RNA或多肽从与载体上的转录调控序列连接的序列的表达的载体。表达的序列通常但不一定与细胞异源。表达载体可以包含其他元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其可以在两种生物体中维持,例如在人类细胞中进行表达,以及在原核宿主中进行克隆和扩增。术语“表达”是指涉及产生RNA和蛋白质以及适当时分泌蛋白质的细胞过程,在适用时包括但不限于例如转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过翻译从基因转录的mRNA所获得的多肽。术语“基因”是指当可操作地连接至适当的调控序列时,在体外或体内转录(DNA)为RNA的核酸序列。基因可以包括或可以不包括编码区前后的区域,例如5’非翻译(5’UTR)或“前导”序列和3’UTR或“尾区”序列,以及单个编码区段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0131] “重组载体”意指包括能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”的载体。应了解,在一些实施方案中,本文所述的载体可以与其他合适的组合物和疗法组合。在一些实施

方案中，载体是游离型的。合适的游离型载体的使用提供了一种以高拷贝数的染色体外DNA维持受试者中的所关注核苷酸，从而消除染色体整合的潜在影响的方式。

[0132] 如本文所用的短语“遗传性疾病”是指部分或完全、直接或间接地由基因组中的一种或多种异常引起的疾病，尤其是从出生起出现的病状。异常可以是突变、插入或缺失。异常可能影响基因的编码序列或其调控序列。遗传疾病可以是(但不限于)DMD、血友病、囊肿性纤维化、亨廷顿氏舞蹈病、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊氏疾病(Wilson’s disease)、先天性肝卟啉症(hepatic porphyria)、遗传性肝代谢病症、勒什尼汗综合症(Lesch Nyhan syndrome)、镰状细胞贫血、地中海贫血、着色性干皮病、范克尼氏贫血(Fanconi’s anemia)、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁氏综合症、视网膜母细胞瘤，和泰伊-萨克斯二氏病(Tay-Sachs disease)。

[0133] 如本文所用，“抑制性多核苷酸”是指减少或阻止第二(靶标)多核苷酸的表达(转录或翻译)的DNA或RNA分子。抑制性多核苷酸包括反义多核苷酸、核酶和外部指导序列。术语“抑制性多核苷酸”还包括DNA和RNA分子，例如编码实际抑制性物质的RNAi，诸如编码核酶的DNA分子。

[0134] 如本文所用，关于RNAi分子例如siRNA或miRNA的活性的“基因沉默”是指细胞中靶基因的mRNA水平降低。

[0135] 如本文所用，术语“RNAi”是指任何类型的干扰RNA，包括但不限于siRNAi、shRNAi、内源性微RNA和人工微RNA。例如，其包括先前鉴定为siRNA的序列，而与RNA的下游加工机制无关(即，尽管据信siRNA具有导致mRNA切割的特定体内加工方法，但是可将此类序列并入在本文所述的侧翼序列的背景下的载体中)。术语“RNAi”可既包括基因沉默RNAi分子，又包括激活基因表达的RNAi效应子分子。

[0136] 如本文所使用的，术语“包括(comprising/comprises)”在提及组合物、方法以及对所述方法或组合物来说必不可少的其相应组分时使用，但对于包括未指明的要素，无论是否必要，仍然是开放的。

[0137] 如本文所使用的，术语“基本上由……组成”是指给定实施例所需要的那些要素。所述术语允许存在不实质影响所述实施方案的一个或多个基本和新颖或功能性特征的要素。“包含”的使用表示包含而不是限制。

[0138] 术语“由……组成”是指如本文所描述的组合物、方法和其相应组分，其排除在所述实施例的描述中未叙述的任何要素。

[0139] 如本文所使用的，术语“基本上由……组成”是指给定实施例所需要的那些要素。该术语允许存在不实质上影响本发明的那个实施方案的基本和新颖或功能特征的额外元件。

[0140] 如本说明书和所附权利要求书所用，除非上下文另有明确规定，否则单数形式“一种/一个(a/an)”和“所述”包含多个提及物。因此，举例来说，提到“方法”包括本文所描述的和/或在阅读本公开等之后对于所属领域技术人员而言将变得显而易见的类型的一个或多个方法和/或步骤。类似地，除非上下文另有明确规定，否则单词“或”旨在包括“和”。尽管与本文所描述的方法和材料相似或等效的那些方法和材料可以用于实施或测试本公开，但在下文描述适合的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”源自于拉丁文exempli gratia，并且在本文中用于指示非限制性实施例。因此，缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义

的。

[0141] 本文公开的本发明的替代要素或实施方案的分组不应解释为限制。每个组成员可以单独提及和要求，或呈与该组的其他成员或此处找到的其他要素的任何组合提及和要求。出于方便和/或可专利性的原因，一个组中的一个或多个成员可以包括在一个组中或从中删除。当发生任何这样的包括或删除时，在本文中认为说明书含有修改的组，从而满足所附权利要求书中使用的所有马库什组(Markush group)的书面描述。

[0142] 在任何方面的一些实施方案中，本文描述的公开内容不涉及克隆人的方法、用于修饰人的种系遗传身份的方法、用于工业或商业目的的人胚胎的使用、或用于修饰动物的基因身份，可能导致其遭受痛苦而对人或动物没有任何实质性医学益处的方法，以及由这类方法产生的动物。

[0143] 本文在本发明的各个方面的描述内定义了其它术语。

[0144] 本申请全文中引用的所有专利和其它出版物，包括参考文献、授权专利、已发布的专利申请和共同待决的专利申请，以引用的方式明确地并入本文中，以描述和公开例如在这些出版物中描述的可以与本文所述的技术结合使用的方法。提供这些出版物仅仅是出于其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。关于这一点，任何内容都不应被解释为承认发明者由于在先发明或任何其他原因而无权早于这种公开内容。关于这些文件的日期的所有声明或关于内容的陈述都是基于申请人可获得的信息，并且不等同于承认这些文件的日期或内容的正确性。

[0145] 本公开的实施方案的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方案和实施例，但是如相关领域的技术人员将认识到的，在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如，虽然方法步骤或功能以给定的顺序呈现，但是替代实施方案可以以不同的顺序执行功能，或者功能可以基本上同时执行。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本文描述的各种实施方案可以进行组合以提供其他实施方案。如果需要，可以修改本公开的各方面以采用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开的又一实施方案。而且，由于生物学功能等效性的考虑，可以在不影响生物学或化学作用的种类或数量的情况下对蛋白质结构进行一些改变。可以根据详细描述对本公开进行这些和其他改变。意图所有这些修改包括在所附权利要求书的范围内。

[0146] 任何前述实施方案的特定要素都可以进行组合或替代其他实施方案中的要素。此外，尽管已经在这些实施方案的上下文中描述了与本公开的某些实施方案相关联的优点，但是其他实施方案也可以表现出这样的优点，并且并非所有实施方案都需要为了落入本公开的范围内而表现出这样的优点。

[0147] 通过以下实施例进一步说明本文所述的技术，这些实施例决不应解释为进一步限制。应理解，本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等，并且因此可以变化。本文中所用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的，而无意于限制本发明的范围，本发明的范围仅仅由权利要求限定。

[0148] II.从ceDNA载体表达FVIII蛋白

[0149] 本文所述的技术大体上涉及FVIII蛋白通过非病毒DNA载体(例如如本文所述的ceDNA载体)在细胞中的表达和/或产生。用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体描述于本文中的

标题为“通用ceDNA载体”的章节中。具体地说，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含一对ITR(例如对称或不对称的，如本文所述)以及介于所述ITR对之间的如本文所述的编码PAH蛋白的核酸，所述核酸操作性地连接到启动子或调控序列。用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势是，编码所期望蛋白质的异源核酸序列不存在大小约束。因此，甚至可从单个ceDNA载体中表达全长为6.8kb的FVIII蛋白。因此，本文所述的ceDNA载体能够用于在有需要的血友病A受试者中表达治疗性FVIII蛋白。

[0150] 正如将了解的那样，本文所述的ceDNA载体技术能够适合于任何复杂程度或能够以模块化方式使用，其中FVIII蛋白的不同组分的表达能够以独立方式控制。举例来说，特别预期本文中所设计的ceDNA载体技术能够与使用单个ceDNA载体表达单一异源基因序列(例如FVIII蛋白)一样简单，或能够与使用多个ceDNA载体一样复杂，其中每个载体表达各自由不同启动子独立地控制的多种PAH蛋白或相关联辅因子或辅助蛋白。本文特别涵盖以下实施方案且本领域的技术人员能够按需要对其进行调适。

[0151] 在一个实施方案中，单个ceDNA载体可用于表达FVIII蛋白的单个组分。或者，单个ceDNA载体能够用于在单个启动子(例如强启动子)的控制下表达FVIII蛋白的多种组分(例如至少2种)，任选地使用一个或多个IRES序列确保每种组分的适当表达，例如辅因子或辅助蛋白。

[0152] 在另一个实施方案中，本文还涵盖了包含至少两个插入片段(例如表达重链或轻链)的单个ceDNA载体，其中每个插入片段的表达是在其自身启动子的控制下进行。启动子可以包括相同启动子的多个拷贝、多个不同启动子或其任意组合。正如本领域技术人员将了解的那样，常常期望以不同的表达水平表达抗体的组分，从而控制所表达的个别组分的化学计量以确保在细胞中的有效FVIII蛋白折叠和组合。

[0153] 本领域的技术人员能够设想ceDNA载体技术的其他变化形式或能够使用常规载体通过蛋白质产生方法对其进行调适。

[0154] A.核酸

[0155] 本文提供了用于潜在治疗用途的核酸分子的表征和开发。根据一些实施方案，用于治疗用途的核酸编码FVIII蛋白。在一些实施方案中，在适当情况下描述了出于改变和改善的体内性质(递送、稳定性、寿命、折叠、靶标特异性)以及其与治疗应用直接相关的生物学功能和机制的目的对寡核苷酸进行化学修饰。

[0156] 可具有免疫刺激作用并需要使用本文公开的免疫抑制剂的本公开的说明性治疗性核酸可包括但不限于：小基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(Msg)、核酶、闭合端双链DNA(例如，ceDNA、CELiD、线性共价闭合DNA(“辅助”)、狗骨头(dbDNA™)DNA、前端粒闭合端DNA或哑铃线性DNA)、切丁酶-底物RNA、双发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA和DNA病毒载体、病毒RNA载体以及其任何组合。

[0157] 本发明还预期可以通过称作RNA干扰(RNAi)的过程下调特定蛋白质的细胞内水平的siRNA或miRNA为核酸治疗剂。在将siRNA或miRNA引入宿主细胞的胞质中之后，这些双链RNA构建体可以结合到称为RISC的蛋白质。siRNA或miRNA的有义链通过RISC复合物去除。RISC复合物当与互补mRNA组合时，裂解mRNA并且释放切割的链。RNAi是通过诱导mRNA的特异性破坏而导致相应蛋白质的下调。

[0158] 抑制mRNA翻译到蛋白质中的反义寡核苷酸(ASO)和核酶可以是核酸治疗剂。对于反义构建体,这些单链脱氧核酸与目标蛋白mRNA的序列具有互补序列,并且沃森(Watson)能够通过克里克碱基配对(Crick base pairing)结合到mRNA。这一结合阻止目标mRNA的翻译,和/或触发mRNA转录物的RNaseH降解。因此,反义寡核苷酸具有增加的作用特异性(即,特定疾病相关蛋白的下调)。

[0159] 在本文所提供的任何方法中,治疗性核酸可以是治疗性RNA。治疗性RNA可以是mRNA翻译的抑制剂、RNA干扰的药剂(RNAi)、催化活性RNA分子(核酶)、转移RNA(tRNA)或结合mRNA转录物的RNA(ASO)、蛋白质或其他分子配体(适体)。在本文所提供的方法中的任一种中,RNAi的药剂可以是双链RNA、单链RNA、微RNA、短干扰RNA、短发夹RNA或三链形成寡核苷酸。

[0160] 根据一些实施方案,治疗性核酸是闭合端双链DNA,例如ceDNA。根据一些实施方案,治疗蛋白在细胞中的表达和/或产生来自非病毒DNA载体,例如ceDNA载体。用于表达治疗蛋白的ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势是,编码所期望蛋白质的异源核酸序列不存在大小约束。因此,甚至可从单个ceDNA载体中表达大的治疗蛋白。因此,ceDNA载体可用于在有需要的受试者中表达治疗蛋白。

[0161] 一般来说,如本文所公开的用于表达治疗蛋白的ceDNA载体在5'至3'方向上包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如,如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR。ITR序列选自以下中的任一者:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复序列(mod-ITR)(例如不对称的修饰ITR);(ii)两个经修饰的ITR,其中mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组织(例如不对称的修饰ITR);或(iii)对称或基本上对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织;或(iv)对称或基本上对称的修饰ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组织。

[0162] 在一些实施方案中,编码FVIII蛋白的转基因还将编码分泌序列,使得PAH蛋白被引导到高尔基体和内质网,其中当抗体穿过ER且离开细胞时,PAH蛋白将通过伴随蛋白分子折叠成正确的构象。示例性分泌序列包括(但不限于)VH-02(SEQ ID NO:88)和VK-A26(SEQ ID NO:89)和IgK信号序列(SEQ ID NO:126),以及允许标记的蛋白质从胞溶质中分泌出来的Gluc分泌信号(SEQ ID NO:188)、将经标记的蛋白质引导到高尔基体的TMD-ST分泌序列(SEQ ID NO:189)。

[0163] 调控开关还能够用于微调FVIII蛋白的表达,以便按需表达FVIII蛋白,包括(但不限于)在所期望的表达水平或量下表达FVIII蛋白,或替代地,当存在或缺乏特定信号时,包括细胞信号传导事件。举例来说,如本文所述,当出现特定病状时,能够打开或关闭ceDNA载体对FVIII蛋白的表达,如本文在标题为调控开关的章节中所述。

[0164] 例如,并且仅出于说明目的,FVIII蛋白可用于关闭不希望的反应,例如过高水平的FVIII蛋白生产。FVIII基因可包含信号肽标记物以将FVIII蛋白带到所需细胞。但是,在任一种情况下,都可能希望调控FVIII蛋白的表达。ceDNA载体轻松地适应抗体对调控开关的使用。

[0165] ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势是,编码FVIII蛋白的异源核酸序列不存在尺寸约束。因此,即使是全长FVIII以及任选的任何辅因子或辅助蛋白也可以从单个ceDNA载体表达。另外,根据必需的化学计量,能够表达相同FVIII蛋白的多

个区段，并且能够使用相同或不同启动子，并且还能够使用调控开关微调每个区域的表达。举例来说，如实施例所示，能够使用包含双重启动子系统的ceDNA载体，使得FVIII蛋白的结构域各自使用不同的启动子。使用ceDNA质粒产生FVIII蛋白可以包括用于表达FVIII蛋白域的启动子的独特组合，这导致适当比例的每个结构域用于形成功能性FVIII蛋白。因此，在一些实施方案中，ceDNA载体能够用于分别表达FVIII蛋白的不同区域(例如在不同启动子的控制下)。

[0166] 在另一个实施方案中，从ceDNA载体中表达的FVIII蛋白进一步包含另外的功能，例如荧光、酶活性、分泌信号或免疫细胞活化因子。

[0167] 在一些实施方案中，编码FVIII蛋白的ceDNA能够进一步包含例如接头域。如本文所用，“接头域”是指长度为约2到100个氨基酸的寡核苷酸或多肽区域，其使如本文所述的FVIII蛋白的任何结构域/区域连接在一起。在一些实施方案中，接头能够包括或由柔性残基(例如甘氨酸和丝氨酸)构成，使得相邻蛋白质域相对于彼此自由地移动。当希望确保两个相邻结构域在空间上彼此无干扰时，可以使用较长接头。接头可以是可裂解的或不可裂解的。可裂解接头的实施例包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等效物以及其组合。接头可以是来源于明脉扁刺蛾病毒(Thosea asigna virus)的T2A的接头区域。

[0168] 获取例如FVIII等的已知和/或可公开获得的蛋白质序列以及对cDNA序列进行反向工程改造以编码此类蛋白质充分属于本领域的技术人员的能力范围内。然后能够对cDNA进行密码子优化以与预定的宿主细胞匹配，并且插入如本文所述的ceDNA载体中。

[0169] B.表达FVIII蛋白的ceDNA载体

[0170] 用于表达FVIII蛋白的具有编码所期望FVIII的一个或多个序列的ceDNA载体能够包含调控序列，例如启动子、分泌信号、polyA区域和增强子。在最低限度，ceDNA载体包含编码FVIII蛋白的一个或多个异源序列。

[0171] 为了实现高效且准确的FVIII蛋白组装，在一些实施方案中特别预期PAH蛋白包含内质网ER前导序列以将其引导到ER，在ER中发生蛋白质折叠。举例来说，序列将所表达的蛋白质引导到ER进行折叠。

[0172] 在一些实施方案中，ceDNA载体中包含细胞或细胞外定位信号(例如分泌信号、核定位信号、线粒体定位信号等)以引导FVIII的分泌或所期望的亚细胞定位，使得FVIII蛋白能够结合到一个或多个细胞内靶标(例如胞内抗体)或一个或多个细胞外靶标。

[0173] 在一些实施方案中，如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体允许以模块化方式组装和表达任何所需的FVIII蛋白。如本文所用，术语“模块化”是指能够轻松地从构建体中去除的ceDNA表达质粒中的元件。举例来说，产生ceDNA的质粒中的模块化元件包含与构建体内的每个元件侧接的独特限制位点对，从而能够排它性地操控个别元件(参见例如图1A-1G)。因此，ceDNA载体平台能够容许所期望的任何FVIII蛋白构形实现表达和组装。本文在多个实施方案中提供ceDNA质粒载体，其能够减少和/或最小化为了组装编码FVIII蛋白的期望ceDNA载体所必需的操控量。

[0174] C.由ceDNA载体表达的示例性FVIII蛋白

[0175] 具体地说，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够编码例如(但不限于)用于治疗、预防和/或改善血友病A的一种或多种症状的PAH蛋白以及其变异体和/或活性片段。在一方面，血友病A是人血友病A。

[0176] (i)FVIII治疗蛋白及其片段

[0177] 基本上任何形式的FVIII治疗蛋白或其片段(例如,功能片段)都可以由本文所述的ceDNA载体编码并在其中表达。本领域技术人员将理解FVIII治疗蛋白包括FVIII蛋白的所有剪接变体和直向同源物。FVIII治疗蛋白包括完整分子及其片段(例如,功能性的)。

[0178] 因子VIII

[0179] 因子VIII是激活的凝结因子IX(FIXa)的非酶促辅因子,当其被蛋白水解激活时,会与FIXa相互作用形成紧密的非共价复合物,该复合物结合并激活因子X(FX)。

[0180] 因子VIII基因或蛋白质也可被称为F8、凝血因子VIII、促凝血成分、抗血友病因子、F8C、AHF、DXS1253E、FVIII、HEMA或F8B。因子VIII基因的表达是组织特异性的,主要在肝细胞中观察到。在肝窦细胞中检测到最高水平的mRNA和因子VIII蛋白;大量的因子VIII也存在于肝细胞和库普弗细胞(肝血窦的常驻巨噬细胞)中。在血清和血浆中可检测到中等水平的因子VIII蛋白。在胎儿脑、视网膜、肾和睾丸中表达低至中等水平的因子VIII蛋白。

[0181] 因子VIII mRNA在身体的许多组织中表达,包括骨髓、全血、白细胞、淋巴结、胸腺、大脑、大脑皮层、小脑、视网膜、脊髓、胫神经、心脏、动脉、平滑肌、骨骼肌、小肠、结肠、脂肪细胞、肾、肝、肺、脾、胃、食道、膀胱、胰腺、甲状腺、唾液腺、肾上腺、脑垂体、乳房、皮肤、卵巢、子宫、胎盘、前列腺和睾丸。位于X染色体长臂上的FVIII基因占据大约186kbp长的区域,并由26个外显子(69-3,106bp)和内含子(从207bp到32.4kbp)组成。该基因的编码序列的总长度为9kbp。

[0182] 成熟因子VIII多肽包含A1-A2-B-A3-C1-C2结构域。三个酸性子域,表示为a1-a3-A1(a1)-A2(a2)-B-(a3)A3-C1-C2,位于A域的边界,在FVIII和其他蛋白质(特别是凝血酶)之间的相互作用中发挥重要作用。这些子域中的突变通过凝血酶降低了因子VIII激活水平。

[0183] 因子VIII蛋白(凝血因子VIII同种型)是一种前蛋白原[智人];登录号:NP_000123.1(2351aa)并具有以下序列:

[0184] MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTH

GKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHN
QEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHT
AHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWS
KNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLP
AASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVE
LLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN
HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKR
HQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR
AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQR
QGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTV
QEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS
NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPL
GMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQF
IIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP
LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLT
SMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ
DLY(SEQ ID NO:218)

[0185] ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势是,编码所期望蛋白质的异源核酸序列不存在尺寸约束。因此,可以从单个ceDNA载体表达多种全长FVIII治疗蛋白。

[0186] 使用一种或多种本领域已知的或本文所述的诱导型或抑制型启动子,包括本文所述的调控开关,可以在空间和时间上实现从ceDNA载体表达FVIII治疗蛋白或其片段。

[0187] 在一个实施方案中,FVIII治疗蛋白是“治疗蛋白变体”,其指与其相应的天然FVIII治疗蛋白相比具有改变的氨基酸序列、组成或结构的FVIII治疗蛋白。在一个实施方案中,FVIII是功能版本(例如,野生型)。表达FVIII蛋白的突变形式例如导致血友病A的点突变或缺失突变也可能有用,例如用于疾病的动物模型和/或用于评估血友病A的药物。可以将突变体或经修饰的FVIII蛋白递送到细胞或动物模型系统,以便生成疾病模型。这种细胞或动物模型可用于研究和/或药物筛选。从ceDNA载体表达的FVIII治疗蛋白可以进一步包含赋予额外功能性的序列/部分,例如荧光、酶活性或分泌信号。在一个实施方案中,FVIII治疗蛋白变体包含用于鉴定的非天然标签序列(例如,免疫标签)以使其与受体宿主细胞中的内源性FVIII治疗蛋白相区分。

[0188] 获取例如FVIII治疗蛋白等的已知和/或可公开获得的蛋白质序列以及对cDNA序列进行反向工程改造以编码此类蛋白质充分属于本领域的技术人员的能力范围内。然后能够对cDNA进行密码子优化以与预定的宿主细胞匹配,并且插入如本文所述的ceDNA载体中。

[0189] 在一个实施方案中,FVIII治疗蛋白质编码序列可以得自现有的宿主细胞或细胞系,例如,通过逆转录从宿主获得的mRNA并使用PCR扩增该序列。

[0190] (ii)表达ceDNA载体的FVIII治疗蛋白

[0191] 具有一个或多个编码期望FVIII治疗蛋白的序列的ceDNA载体可包含调控序列,例如启动子、分泌信号、polyA区域和增强子。至少,ceDNA载体包含一个或多个编码FVIII治疗

蛋白或其功能片段的异源序列。图1A-1G描述了用于产生编码FVIII治疗蛋白的ceDNA载体的示例性盒插入物。在一个实施方案中，ceDNA载体包含本文表1中列出的FVIII序列。

[0192]

表1：用于治疗血友病A的示例性FVIII序列

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

描述	长度	参考文献	CG含量	SEQ ID NO:	序列
具有SQ序列II的B域缺失(BDD)hFVIII	4374	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292164	3	380	ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATACTACCTGGG GGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGT GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACA TTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCAC CCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGA GTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGC AGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGT GAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGA CCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGAT GCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCC TGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCATC TTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTG CCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGC CTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATG ATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGT GGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGTGCT GGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGG TCAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGGCATCCTGGGCCCCCT GCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCAT GGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTG CCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGACC AGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGG AGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACA GGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCTGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCC AGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGC CTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGAT GGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGG ATTCTGGGCTGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACA

[0193]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

具有SQ序列III的B域缺失(BDD) hFVIII	4374	US20170216408 A1	0	381	ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGTCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGGTATTACCTGGG	CTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGA
					GGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTATATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCTAGGTTCCCCCCCAGGGT	GCTTCAGCCAGAACCCCCCAGTGCTGAAGAGGCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACACCCTGCAGTCTGACCAGGAGG
					GCCCCAAGAGCTTCCCCTTTAACACTTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACA	AGATTGACTATATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGA
					TTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGGCTGCTGGGGCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCA	GCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCA
					CCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCTTCTGAGGGGGCTG	GCAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCA
					AGTATGATGACCAGACTAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTTCCTGGGGGCAGCCATACCTATGTGTGG	CTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCAGGG
					CAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTATGTCTCATGTGGACCTGG	CTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCA
					TGAAGGACCTGAAACTCTGGCCTGATTGGGGCTCTGCTGGTGTGTAGGGAGGGGCAGCCTGGCTAAGGAAAAGACCCAG	GCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCT
					GGCTGTGAGGAGCTGAGCTGGGACTATATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCTAGGTTCCCCCCCAGGGT	GGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCCACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCT
					CAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGG	GGAAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGG
					CCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGT	AGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCA
					GCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGG	ATGGCTACATCATGGGACACCCTGCCTGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGG
					CATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGG	GCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGG
					CTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCA	CCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGT
					TGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTA	GCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGG
					CAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTTTGGCAATGTGGA	CATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGG
					CAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCA	CTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCA
					TCAGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAG	TGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTA
					GCCATCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCT	CAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTTTGGCAATGTGGA
					GCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGA	CAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCA
					AGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCCAGGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTG	TCAGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAG
					ATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAG	GCCATCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCT
					GACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGG	GCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGA
					TGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGA	AGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCCAGGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTG
						ATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAG
						GACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGG
						TGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGA

[0194]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				ACCCTGCATAAGTTTATCCTGCTGTTTGCTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAGACCAAGAACAGCCTGA
				TGCAGGGATAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCTTGGCCTAAGATGCACACTGTGAATGGGTATGTGAATAGGAGCCTGC
				CTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGGATGGGCACCACCCCTGAGGTCCATAGCAT
				CTTCCTGGAGGGCCACACTTTCCTGGTGAGGAACCACAGACAGGCCTCTCTGGAGATCTCTCCCATCACCTTCCTGACTG
				CTCAGACTCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTTTGCCATATTAGCAGCCACCAGCATGATGGGATGGAGGC
				CTATGTGAAGGTGGATAGCTGCCCTGAGGAGCCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAAGACTATGATG
				ATGACCTGACTGATTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAATAGCCCCAGCTTCATTCAGATCAGGTCTGT
				GGCCAAGAAACACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAAGAGGACTGGGACTATGCTCCCCTGGTGCT
				GGCCCCTGATGATAGGTCTTATAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGGCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGT
				GAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAAACCAGGGAGAGCCATTCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCTCTG
				CTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTATCCTCATG
				GCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAAGACTTCCCCATCCTGC
				CTGGGGAGATCTTTAAGTATAAGTGGACTGTGGAGGATGGCCCTACCAAGTCTGACCCCAGGTGTCTGACCA
				GGTACTATTCTAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGGCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGA
				GTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTTTCTGTGTTTGATGAGAATAGG
				AGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTTCTGCCCAATCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGATCCTGAGTTCCAGG
				CCAGCAATATCATGCATAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTAC
				TGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTTCTGTCTGTGTTCTTTTCTGGCTATACCTTCAAGCACAAGATGGT
				GTATGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAATCCTGGGCTGTGGATC
				CTGGGGTGCCACAACTCTGATTTTAGGAACAGGGGGATGACTGCCCTGCTGAAGGTGTCTAGCTGTGATAAGAACACT
				GGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATTTCTGCTTATCTGTCTAAGAATAATGCCATTGAGCCCAGAAGCT
				TCAGCCAGAATCCCCCTGTGCTGAAGAGACATCAGAGGGAGATCACCAGAACTACCCTGCAGTCTGATCAGGAGGAGA
				TTGACTATGATGACACTATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTATGATGAGGATGAGAATCAGTCTCC
				CAGGAGCTTTCAGAAGAAGACCAGACATTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCTCTAG
				CCCTCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAATTCACTGAT
				GGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGGGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGGCCTTATATCAGGGCTGAG
				GTGGAGGATAATATTATGGTGACTTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACTCTTTCTATAGCAGCCTGATCTCTTATGA
				GGAGGATCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCTAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGG
				TCCAGCACCACATGGCCCCTACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTATTTCTCTGATGTGGATCTGGAGAA
				GGATGTCCATTCTGGGCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACTAACACTCTGAATCCTGCCCATGGCAGGCAGGTG
				ACTGTCCAGGAGATTTGCCCTGTTCTTCACTATCTTTGATGAGACCAAGAGCTGGTACTTTACTGAGAACATGGAGAGGA
				ACTGCAGAGCTCCTTGCAATATTCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAATTACAGGTTCCATGCCATTAATGGGTA
				CATCATGGACACCCTGCCTGGCTGGTGATGGCTCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCTCTAA
				TGAGAATATCCACAGCATCCACACTTCTCTGGGCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCTCTGTAT
				AATCTGTACCCTGGGGTGTTTGAAACTGTGGAGATGCTGCCCTCTAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTG
				GGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTC

[0195]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

具有SQ序列III的B域缺失(BDD) hFVIII	4374	WO2017074526A1	9	382	TGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTAT
					TCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATTC
					ATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCTCTCTGTACATCTCTCAGTTCATCATCATGTACTCTCTGGAT
					GGGAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTTTGGGAATGTGGACTCTTCTGGC
					ATCAAGCACAACATCTTCAATCCCCCCATCATTGCTAGGTATATTAGGCTGCATCCCACCCACTACAGCATCAGGTCTACC
					CTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACTCTTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGTCTAAGGCCATCTCTGATG
					CCCAGATTACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCTCTAAGGCCAGGCTGCATCTGCAGGG
					GAGGAGCAATGCCTGGAGGCCTCAGGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGATTTCCAGAAGACCATGAAGG
					TGACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATCAGCAGCAGCC
					AGGATGGCCACCAGTGGACTCTGTTCTTTCAGAATGGGAAGGTGAAGGTGTTTCAGGGCAATCAGGACTCTTTCACCCC
					TGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATCCACCCCCAGTCTTGGGTGCATCAGATTGCC
					CTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCTCAGGATCTGTACTGA
					ATGCAGATCGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTTGAGATTCTGCTTCAGCGCCACCAGGAGATACTACCTGGG
					GGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGT
					GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACA
					TTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCAC
					CCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGA
					GTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGC
					AGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGT
					GAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGA
					CCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGAT
					GCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCC
					TGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCATC
					TTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTG
					CCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGC
					CTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATG
					ATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGT
					GGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGTGCT
					GGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGG
					TCAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCT
					GCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCAT
					GGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTG
					CCTGGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGACC
					AGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGG
					AGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACA
					GGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCTGCCCAACCCTGCTGGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCC

[0196]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

内源性hFVIII cDNA	7056	NG_01140 3.1	70	383	AGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGC CTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGAT GGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGG ATTCTGGGCTGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACA CTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGA GCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAAGCGCCATCAGCGCGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGA GATTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAG CCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAG CAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCACT GATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCAGGGCT GAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGC TATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTG GAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTG GAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGGC AGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGA GAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAAT GGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGC AGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCC CTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGC CTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCA TGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCT GCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATG ATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACA GCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTTTGGCAATGTGGACA GCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCATC AGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGC CATCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGC ATCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAG ACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATC AGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGAC AGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTGC ACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGA
					ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGT GCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTCCTCCTAGAGTGC CAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACATCG CTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTT

[0197]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				AAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGA
				TGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCAGGTCCT
				GAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACT
				TGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCACA
				AATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTGATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAG
				GGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATT
				GGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAGTGCACTCAATATTCCTCGAAG
				GTCACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTTCCTTACTGCTCAAACACTCT
				TGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTTCCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTA
				GACAGCTGTCCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGAT
				TCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGATGATGACAACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCT
				AAAACTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCGATGACAGAA
				GTTATAAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAAGTCCGATTTATGGCATACAC
				AGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGA
				GACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCC
				TTTGTATTCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATA
				AATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAAT
				ATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACC
				AGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATAT
				ACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCA
				ATGGCTATGTTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCA
				CAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATATGAAGACACACTCACCCTATTCC
				CATTCTCAGGAGAAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACTCAGACTTTCG
				GAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAA
				GATATTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCCTAGCAC
				TAGGCAAAAGCAATTTAATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTGGTTTGCACACAGAACA
				CCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTAGTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTATCC
				TTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTCTGATGATCCATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCT
				GTCTGAAATGACACACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCCTGAGTCAGGCCTCCAATTAA
				GATTAAATGAGAAACTGGGGACAACTGCAGCAACAGAGTTGAAGAAACTTGATTTCAAAGTTTCTAGTACATCAAATAA
				TCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGGTACTGATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAG
				TTCATTATGATAGTCAATTAGATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCATCTCCCCTTACTGAGTCTGGTGGACCTCTGAGCT
				TGAGTGAAGAAAATAATGATTCAAAGTTGTTTAGAATCAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAAAAAATG
				TATCGTCAACAGAGAGTGGTAGGTTATTTAAAGGGAAAAGAGCTCATGGACCTGCTTTGTTGACTAAAGATAATGCCTT
				ATTCAAAGTTAGCATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAAACTTCCAATAATTCAGCAACTAATAGAAAGACTCACATTGATG
				GCCCATCATTATTAATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAAAAGTGACA

[0198]

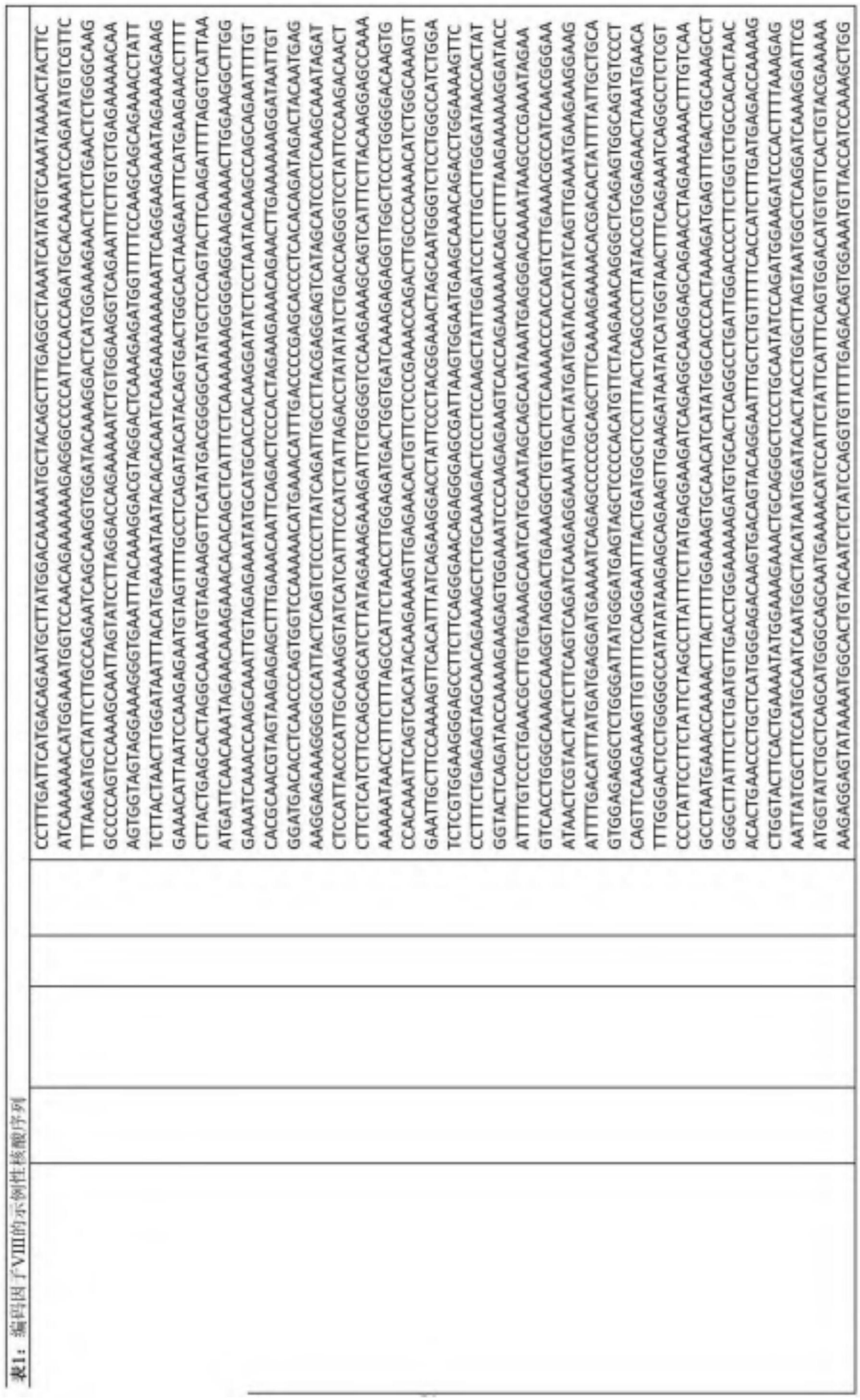


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				CCTTTGATTCATGACAGAATGCTTATGGACAAAAATGCTACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTC
				ATCAAAAAACATGGAAATGGTCCAACAGAAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCAGATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTC
				TTTAAGATGCTATTCTTGCCAGAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAAGAACTCTCTGAACTCTGGGCAAG
				GCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAGAAAAATCTGTGGAAGGTCAGAATTTCTTGTCTGAGAAAAACAA
				AGTGGTAGTAGGAAAGGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGAGATGGTTTTTCCAAGCAGCAGAAACCTATT
				TCTTACTAACTTGGATAATTTACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAAAAAATTCAGGAAGAAATAGAAAAGAAG
				GAAACATTAATCCAAGAGAATGTAGTTTTGCCTCAGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTTCATGAAGAACCTTTT
				CTTACTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATTAA
				ATGATTCAACAAATAGAACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAAGGGGGAGGAAGAAAACTTGGAAGGCTTGG
				GAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCACCACAAGGATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTGT
				CACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGT
				GGATGACACCTCAACCCAGTGGTCCAAAAACATGAAACATTTGACCCCGAGCACCCTCACACAGATAGACTACAATGAG
				AAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCCTTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGAT
				CTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTATATATCTGACCAGGGTCCTATTCCAAGACAACT
				CTTCTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCATTTCTTACAAGGAGCCAAA
				AAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACCTTGGAGATGACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAGTG
				CCACAAATTCAGTCACATACAAGAAAGTTGAGAACACACTGTTCTCCCGAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTT
				GAATTGCTTCCAAAAGTTCACATTTATCAGAAGGACCTATTCCCTACGGAAACTAGCAATGGGTCTCCTGGCCATCTGGA
				TCTCGTGGAAGGGAGCCTTCTTCAGGGAACAGAGGGAGCGATTAAGTGGAATGAAGCAAACAGACCTGGAAAAGTTC
				CCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAAGCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAACCACTAT
				GGTACTCAGATACCAAAAGAAGAGTGGAAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAAACAGCTTTTAAGAAAAAGGATACC
				ATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAATCATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGGACAAAATAAGCCCGAAATAGAA
				GTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAA
				ATAACTCGTACTACTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAG
				ATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCA
				GTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCT
				CAGTTCAAGAAAAGTTGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACA
				TTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGT
				CCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAA
				GCCTAATGAAACCAAAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCT
				GGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAAC
				ACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTCACCATCTTTGATGAGACCAAAAG
				CTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAGAAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGGAAGATCCCACTTTTAAAGAG
				AATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCG
				ATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTTCAGTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAA
				AAGAGGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGG

[0199]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

					AATTTGGCGGGGTGGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTCTGGTGTACAGCAATAAG
					TGTCAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGG
					CCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTTTCTTGGATCAAGGTG
					GATCTGTTGGCACCAATGATTATTCACGGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCTCA
					GTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCCACTGGAACCTTAATGGTCTTCT
					TTGGCAATGTGGATTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTTAACCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTTGCACCCAA
					CTCATTATAGCATTCGCAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATG
					GAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAA
					GCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGAC
					TTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGT
					TCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTTCAGGGAAAT
					CAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGG
					GTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGA
具有SQ序列、6个N连接糖基化位点和弗林蛋白酶裂解位点的B缺失(BDD) hFVIII (SFSQNATNVSNNSN TSNDSNVSPVPVLKRHQR)	4425	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426947	3	384	ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATACTACCTGGG
					GGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGT
					GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACA
					TTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCAC
					CCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGA
					GTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGC
					AGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGT
					GAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGA
					CCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGAT
					GCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCC
					TGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCATC
					TTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTG
					CCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGC
					CTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATG
					ATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGT
					GGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGTGCT
					GGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGG
					TCAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGCCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCT
					GCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCAT
					GGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTG
					CCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGACC
					AGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGG
					AGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACA

[0200]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

					GGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCTGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCC
					AGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGC
					CTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCCGGCTACACCTTCAAGCACAAGAT
					GGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGG
					ATTCTGGGCTGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACA
					CTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGA
					GCTTCAGCCAGAATGCCACTAATGTGTCTAACAACAGCAACACCAGCAATGACAGCAATGTGTCTCCCCAGTGCTGAA
					GAGGCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCATCTCTGT
					GGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCA
					GGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCCAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGG
					CCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTAC
					AGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGAC
					CTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGC
					TGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCAC
					AAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTG
					GCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTT
					CTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATC
					CAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGCC
					TGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACT
					TCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTTGA
					GACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCA
					TGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCA
					GATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGG
					AGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGG
					GCCAGGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCT
					ACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAA
					CCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATG
					GGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAGC
					AGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGG
					AGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCAC
					CCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTG
					GACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTG
					GACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGC
					TGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGA
具有SQ序列、6个N连接糖基化位点和弗林蛋白酶				385	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRP
					PWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENG

[0201]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

切割位点 - 氨基酸序列的B 域缺失 (BDD) hFVIII					
					PMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW
					PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI
					SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEED
					WDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYP
					HGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQR
					GNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQ
					TDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA
					YLLSKNNAIEPRSFSQNATNVSNNSNTSNDSNVSPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR
					SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNI
					MVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLI
					GPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLV
					MAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFL
					VYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI
					SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME
					SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLI
					SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY-
具有融合到Fc区域的SQ序列的B 域缺失 (BDD) hFVIII	5055	US 9,050,318 B2	92	386	atgcaaatagagctctccacctgctttctttctgtgccttttgcgattctgctttagtgccaccagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactata
					tgcaaagtgatctcggtgagtgcctgtggagcgcaaagatttcctcctagagtgccaaaatcttttccattcaacacctcagtcgtgtacaaaaagactctgtttg
					tagaattcacggatcacctttttcaacatcgctaagccaagggccaccctgagtgctctagtgctaggtcctacatccaggctgagttatgatacagtggtcatt
					acacttaagaacatggcttcccatcctgtcagtcttcatgctgttgatatcctactgcgaaagctctgcgaggagctgaaatatgatgatcaggaccagtcaaag
					ggagaaagaagatgataaagtcttcctggtggaagccatacatatgtctgcaggtcctgaaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtgccttacc
					tactcatatcttctcatgtggacctggtaaaagacttgaattcaggcctcattggagccctactagtatgtagagaaggagctgccaaggaaaagaacac
					agaccttgcacaaatttatactacttttttgctgtattttgatgaaggaaaaagttggcacctcagagaaacaaagaactccttgatgcaggatagggatgctgcatct
					gctcgggcctggcctaaaatgcacacagtcaatggttatgtaacaaggtctctgccaggtctgattggatgccacaggaaatcagtctattggcatgtgattgg
					aatgggcaccactcctgaagtgcactcaatattcctcgaaggtcacacatttcttgtgaggaaccatcgccaggcgtcctggaaatctcgccaatatacttcct
					tactgctcaaacactcttgatggacctggacagtttctactgttttgtcatatctcttcccaccaacatgatggcatggaagcttatgtcaaagtagacagctgt
					ccaggaggaacccaactacgaatgaaaaaatatgaagaagcggaagactatgatgatcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgatgatgac
					aactctcctcttttatccaaattcgctcagttgccaagaagcatcctaaaactttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgctcccctta
					gtcctgccccgatgacaagagttataaaagtcaatattgaacaatggccctcagcggattggtaggaagtacaaaaaagtccgatttatggcatacaca
					gatgaaaccttaagactcgtgaagctattcagcatgaatcaggaatcttgggacctttacttatgggaagttggagacacactgttgattatatttaagaa
					tcaagcaagcagaccatataacatctacccctcacggaatcactgatgtccgtccttgttattcaaggagattaccaaaaggtgtaaaacatttgaaggatttttc
					caattctgccaggagaaatattcaaatataaatggacagtgactgtagaagatgggccaactaaatcagatcctcggtgcctgaccccgctattactctagtttc
					gttaatatggagaggagatctagcttcaggactcattggccctctctcctcatctgctacaaagaatctgtagatcaaagaggaaaccagatatagtcagacaag
					aggaatgtcatcctgtttttctgtatttgatgagaaccgaagctggtacctcacagagaatatacaagctttcttccccaatccagctggagtgcagcttgagga
					tccagagttccaagcctccaacatcatgcacagcatcaatggctatgtttttgatagtttgcagttgtcagttgtttgttgcatgaggtggcatactggtacattcta
					agcatttggagcacagactgacttccttttctgtctttcttctctggatatacctttcaaacacaaaatggtctatgaagacacactcaccctattcccattctcaggag

[0202]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

具有SQ序列（codop）的B缺失（BDD）hFVIII	4374		211	387	aaactgtcttcatgtcgatggaaaaccccaggtctatggaattctgggtgccacaactcagacttccgaacagaggcatgaccgccttactgaaggtttctagt tgtgacaagaacactggtgattattacgaggacagttatgaagatatttcagcatacttgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaagaagcttctctcaaa acccaccagtcttgaaacgccatcaacgggaaatactgctactacttcagtcagatcaagaggaaattgactatgatataccatatgaaatgaa gaaggaagatttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagccccgcagctttcaaaagaaaacacgacactatttattgctgcagtggagaggctctg ggattatgggatgagtagctcccacatgttcaagaaacagggctcagagtggcagtgtccctcagttcaagaaagttgttttccaggaatttactgatggct cctttactcagcccttataccgtggagaactaaatgaacatttgggactcctgggccatatatagagcagaagttgaagatataatcatgtgataacttttcaga aatcaggcctctcgtccctattcctttcttattctagccttatttcttatgaggaagatcagaggcagaagcagaacctagaaaaaaacttgtcaagcctaatga aaccaaaactacttttggaaagtgcaacatcatatggcacccactaaagatgagtttgactgcaaagcctggcttatttctctgatgttgacctggaaaaag atgtgcactcaggcctgatttggaccccttctggtcgccacactaacacactgaaccctgctcatgggagacaagtgacagtacagggaattgctctgttttca ccatctttgatgagaccaaaagctggtacttccactgaaaatatggaaagaaactgcagggctccctgcaatatccagatggaagatccccacttttaaagaga attatcgcttccatgcaatcaatggctacatagatgtaacacactacctggcttagtaatggctcaggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatgggcagc aatgaaaacatccattctattcatttcagtggacatgtgttctactgtacgaaaaaaagaggagtatataaaatggcactgtacaatctctatccaggtgttttga gacagtggaaatgttaccatccaaagctgagaatttggcgggtggaatgccttattggcgaagcatctacatgctgggatgagcacacttttttctggtgtacagca ataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattagagattttcagattacagcttcaggacaatatggacagtgggcccaaagctgggccagact tcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagccctttcttggatcaaggtggatctgttggcaccaatgattattcaggcatcaagacccagg gtgcccgtcagaagttctccagcctctacatctctcagttatcatcatgtatagtctgatgggaagaagtggcagacttatcgaggaaattccactggaacct taatggtctcttggcaatgtggattcatctgggataaaacacaatatttttaacctccaattattgctcgatacatccgtttgcacccaactcattatagcatt cgcagcactcttcgcatggagttgatgggctgtgatttaaatagttgccagcatgcccattgggaatgagagtaaagcaatatcagatgcacagattactgcttc atcctactttaccaatatgtttgccacctggtctcctcaaaagctcgacttcacctccaagggaggagtaatgcctggagacctcaggtgaataatccaaaag agtggctgcaagtggacttccagaagacaatgaaagtcacaggagtaactactcagggagtaaaatctctgcttaccagcatgtatgtgaaggagttcctca tctccagcagtcaagatggccatcagtggactctttttttcagaatggcaaagtaaaggttttcaggaaatcaagactccttcacacctgtggtgaatctc tagacccaccgttactgactcgctacctttgaattcaccccaagattggtgtgcaccagattgccctgaggatggaggttctgggctgcgaggcacaggacct ctacgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagctccagacctcctgggcggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc tcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt gcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa	ATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGG CGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCCAAGAGT GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATA TCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCAC CCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAG TACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAGAAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAG GTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCA

[0203]

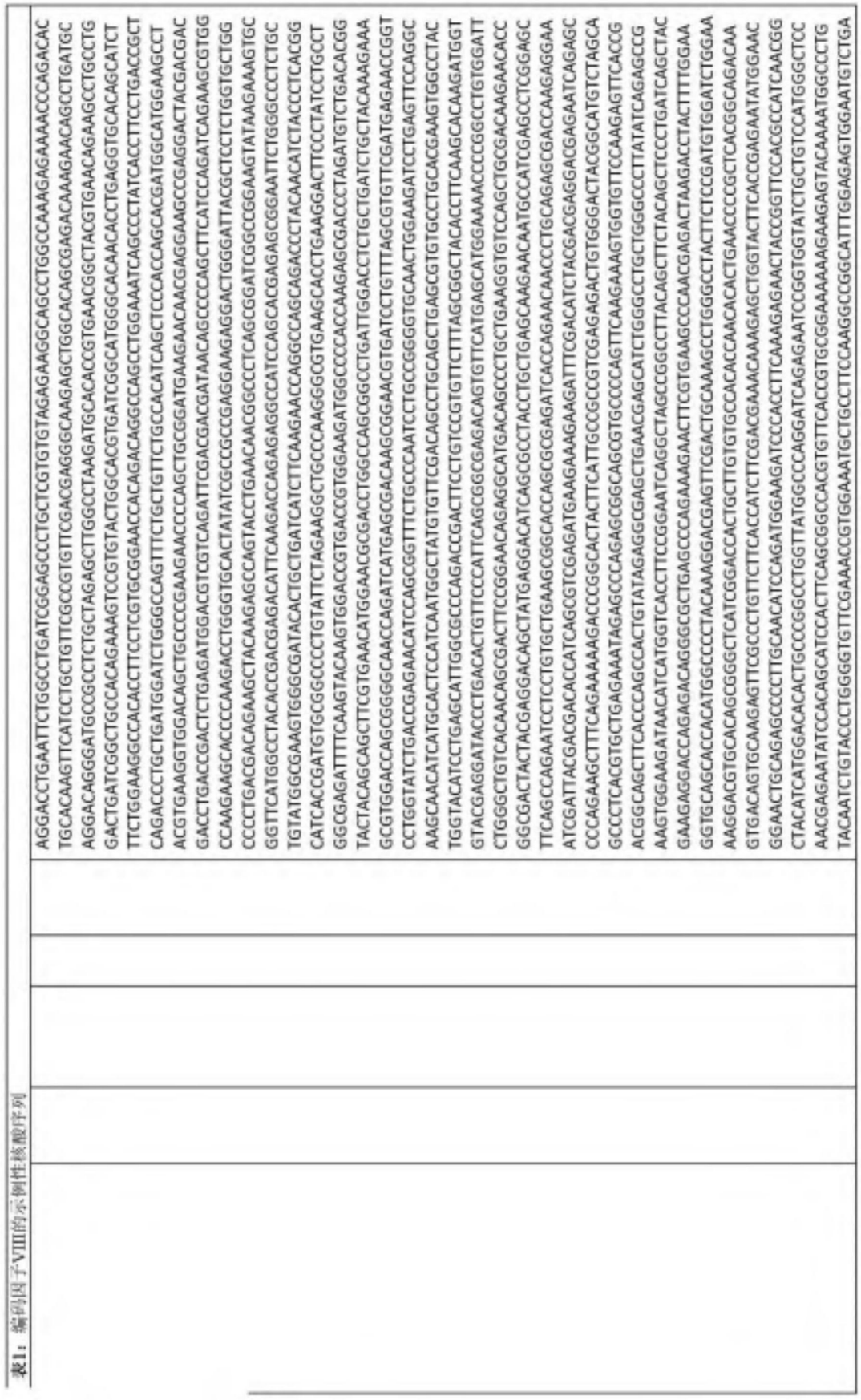


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				AGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACAC
				TGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGC
				AGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTG
				GACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCT
				TTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCT
				CAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCT
				ACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGAC
				GACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGG
				CCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGG
				CCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGC
				GGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGC
				TGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGG
				CATCACCGATGTGCGGCCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCT
				GGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGG
				TACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAAGAAA
				GCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGT
				CCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGC
				AAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTAC
				TGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGT
				GTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATT
				CTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACC
				GGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCTCGGAGC
				TTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGCGAGATCACCAGAACAACCCTGCAGAGCGACCAAGAGGAA
				ATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGC
				CCCAGAAGCTTTCAGAAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAGCA
				GCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCG
				ACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCG
				AAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTAC
				GAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAGAAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAA
				GGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAA
				AAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAA
				GTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAAC
				GGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGG
				CTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCC
				AACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTG
				TACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGA

[0204]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

Jcat优化的B域截断（剩余206个氨基酸）人因子VIII ORF (BDD-206)	4980		350	388	TTGGAGAGCACCTCCACGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGC CTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCAC TACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCA TCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCT GGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAG CGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGT CTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCA GCGACGCCCAGATCACAGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCT GCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCAT GAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCTCCAGC AGCCAGGACGGCCATCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTC ACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGAT CGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAG
					ATGCAGATCGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGCTTCTGCTTCAGCGCCACCCGCCGCTACTACCTGGG CGCCGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCCGTGGACGCCCGCTTCCCCCCCCGCGT GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCAGCGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTCGTGGAGTTCACCGACCACCTGTTCAACA TCGCCAAGCCCCGCCCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCAC CCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGAGCCTGCACGCCGTGGGCGTGAGCTACTGGAAGGCCAGCGAGGGCGCCG AGTACGACGACCAGACCAGCCAGCGCGAGAAGGAGGACGACAAGGTGTTCCCCGGCGGCAGCCACACCTACGTGTGG CAGGTGCTGAAGGAGAACGGCCCCATGGCCAGCGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTG GTGAAGGACCTGAACAGCGGCCTGATCGGCGCCCTGCTGGTGTGCCGCGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCA GACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACCAAGAACAGCCT GATGCAGGACCGCGACGCCGCCAGCGCCCGCGCCTGGCCCAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACCGCAGCCT GCCCGGCCTGATCGGCTGCCACCGCAAGAGCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACCACCCCCGAGGTGCACAG CATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTGCGCAACCACCGCCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGA CCGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCACGACGGCATGGA GGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAGGAGCCCCAGCTGCGCATGAAGAACAACGAGGAGGCCGAGGACTACG ACGACGACCTGACCGACAGCGAGATGGACGTGGTGCGCTTCGACGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCCGCA GCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATCGCCGCCGAGGAGGAGGACTGGGACTACGCCCCCCTG GTGCTGGCCCCCGACGACCGCAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCCCAGCGCATCGGCCGCAAGTACAAG AAGGTGCGCTTCATGGCCTACACCGACGAGACCTTCAAGACCCGCGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGC CCCCTGCTGTACGGCGAGGTGGGCGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCCGCCCCTACAACATCTACC CCCACGGCATCACCGACGTGCGCCCCCTGTACAGCCGCCGCCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCAT CCTGCCCGGCGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAGGACGGCCCCACCAAGAGCGACCCCCGCTGCCT GACCCGCTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATCGGCCCCCTGCTGATCTGCTAC AAGGAGAGCGTGGACCAGCGCGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCAGCGTGTTCGACGA

[0205]

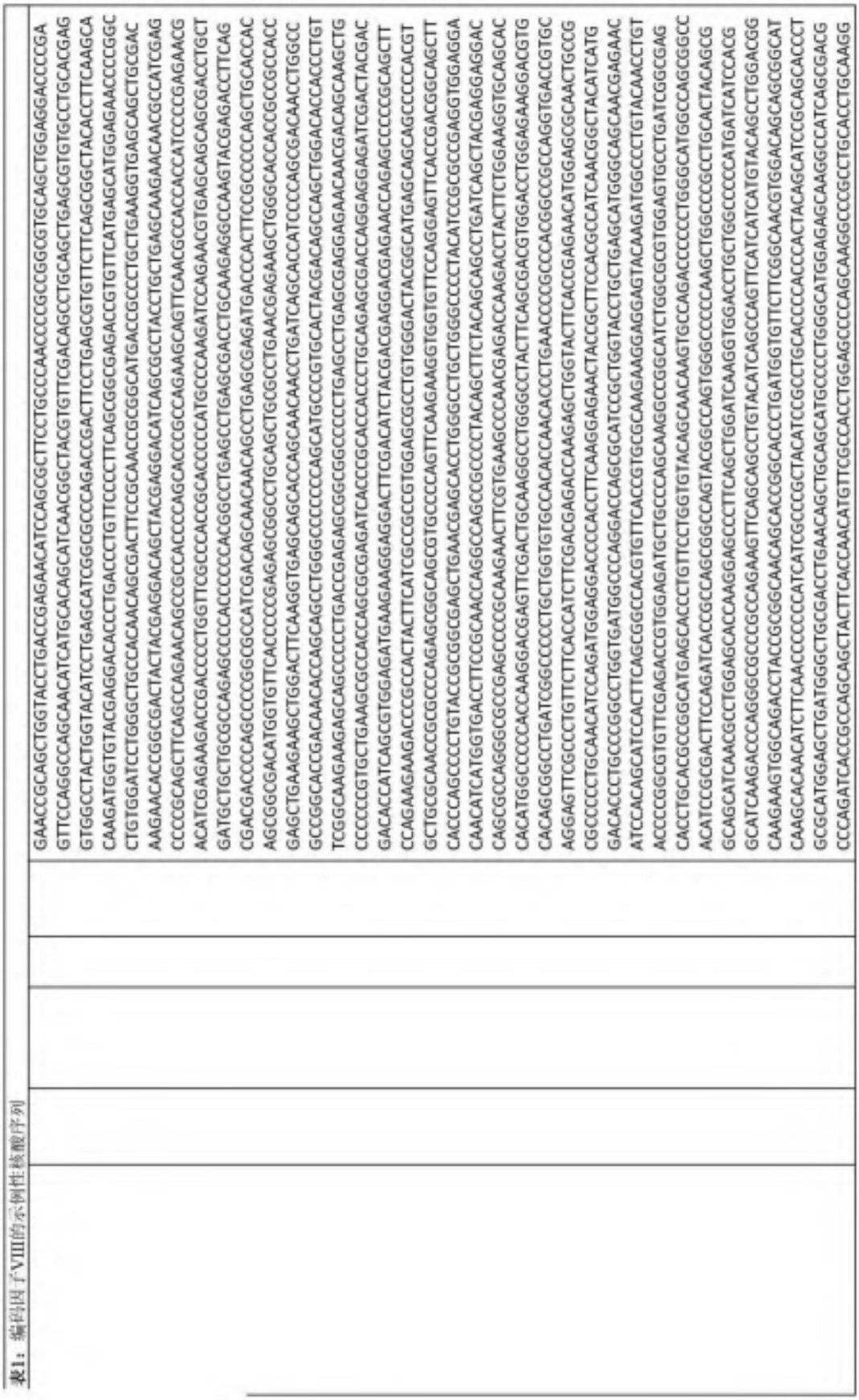


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				GAACCGCAGCTGGTACCTGACCGAGAACATCCAGCGCTTCCTGCCCAACCCCGCCGGCGTGCAGCTGGAGGACCCCGA
				GTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAACGGCTACGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAG
				GTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATCGGCGCCCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTTCTTCAGCGGCTACACCTTCAAGCA
				CAAGATGGTGTACGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCAGCGGCGAGACCGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCCGGC
				CTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGCAACCGCGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGAGCAGCTGCGAC
				AAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTACGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAACGCCATCGAG
				CCCCGCAGCTTCAGCCAGAACGCCGCCACCCCAGCACCCGCCAGAAGCAGTTCAACGCCACCACCATCCCCGAGAACG
				ACATCGAGAAGACCGACCCCTGGTTCGCCCACCGCACCCCCATGCCCAAGATCCAGAACGTGAGCAGCGACGACCTGCT
				GATGCTGCTGCGCCAGAGCCCCACCCCCACGGCCTGAGCCTGAGCGACCTGCAAGAGGCCAAGTACGAGACCTTCAG
				CGACGACCCCAGCCCCGGCGCCATCGACAGCAACAACAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCCGCCCCCAGCTGCACCAC
				AGCGGCGACATGGTGTTCACCCCCGAGAGCGGCCTGCAGCTGCGCCTGAACGAGAAGCTGGGCACCACCGCCGCCACC
				GAGCTGAAGAAGCTGGACTTCAAGGTGAGCAGCACCAGCAACAACCTGATCAGCACCATCCCCAGCGACAACCTGGCC
				GCCGGCACCGACAACACCAGCAGCCTGGGCCCCCCCAGCATGCCCGTGCACTACGACAGCCAGCTGGACACCACCCTGT
				TCGGCAAGAAGAGCAGCCCCCTGACCGAGAGCGGCGGCCCCCTGAGCCTGAGCGAGGAGAACAACGACAGCAAGCTG
				CCCCCCGTGCTGAAGCGCCACCAGCGCGAGATCACCCGCACCACCCTGCAGAGCGACCAGGAGGAGATCGACTACGAC
				GACACCATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCCGCAGCTT
				CCAGAAGAAGACCCGCCACTACTTCATCGCCGCCGTGGAGCGCCTGTGGGACTACGGCATGAGCAGCAGCCCCCACGT
				GCTGCGCAACCGCGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTT
				CACCCAGCCCCTGTACCGCGGCGAGCTGAACGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCCGCGCCGAGGTGGAGGA
				CAACATCATGGTGACCTTCCGCAACCAGGCCAGCCGCCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTACGAGGAGGAC
				CAGCGCCAGGGCGCCGAGCCCCGCAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCAC
				CACATGGCCCCCACCAAGGACGAGTTCGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCAGCGACGTGGACCTGGAGAAGGACGTG
				CACAGCGGCCTGATCGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCCGCCCACGGCCGCCAGGTGACCGTGC
				AGGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAGACCAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAACATGGAGCGCAACTGCCG
				CGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACCGCTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATG
				GACACCCTGCCCGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGCGCATCCGCTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAACGAGAAC
				ATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGT
				ACCCCGGCGTGTTCGAGACCGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGCGTGGAGTGCCTGATCGGCGAG
				CACCTGCACGCCGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCAGCGGCC
				ACATCCGCGACTTCCAGATCACCGCCAGCGGCCAGTACGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCCGCCTGCACTACAGCG
				GCAGCATCAACGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCACG
				GCATCAAGACCCAGGGCGCCCGCCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGG
				CAAGAAGTGGCAGACCTACCGCGGCAACAGCACCGGCACCCTGATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACAGCAGCGGCAT
				CAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATCGCCCGCTACATCCGCCTGCACCCCACCCACTACAGCATCCGCAGCACCCT
				GCGCATGGAGCTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCAGCGACG
				CCCAGATCACCGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACCTGGAGCCCCAAGCAGGCCCGCCTGCACCTGCAAGG

[0206]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

Jcat 优化的野生型人因子 VIII ORF	7056		467	389	ATGCAGATCGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGCTTCTGCTTCAGCGCCACCCGCCGCTACTACCTGGG
					CGCCGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCCGTGGACGCCCGCTTCCCCCCCGCGT
					GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCAGCGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTCGTGGAGTTCACCGACCACCTGTTCAACA
					TCGCCAAGCCCCGCCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCAC
					CCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGAGCCTGCACGCCGTGGGCGTGAGCTACTGGAAGGCCAGCGAGGGCGCCG
					AGTACGACCAGACCAGCCAGCGCGAGAAGGAGGACGACAAGGTGTTCCCCGGCGGCAGCCACACCTACGTGTGG
					CAGGTGCTGAAGGAGAACGGCCCCATGGCCAGCGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTG
					GTGAAGGACCTGAACAGCGGCCTGATCGGCGCCCTGCTGGTGTGCCGCGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCA
					GACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACCAAGAACAGCCT
					GATGCAGGACCGCGACGCCGCCAGCGCCCGCGCCTGGCCCAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACCGCAGCCT
					GCCCGGCCTGATCGGCTGCCACCGCAAGAGCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACCACCCCCGAGGTGCACAG
					CATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTGCGCAACCACCGCCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGA
					CCGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCACGACGGCATGGA
					GGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAGGAGCCCCAGCTGCGCATGAAGAACGAGGAGGCCGAGGACTACG
					ACGACGACCTGACCGACAGCGAGATGGACGTGGTGCGCTTCGACGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCCGCA
					GCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATCGCCGCCGAGGAGGAGGACTGGGACTACGCCCCCCTG
					GTGCTGGCCCCCGACGACCGCAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCCCAGCGCATCGGCCGCAAGTACAAG
					AAGGTGCGCTTCATGGCCTACACCGACGAGACCTTCAAGACCCGCGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGC
					CCCCTGCTGTACGGCGAGGTGGGCGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCCGCCCCTACAACATCTACC
					CCCACGGCATCACCGACGTGCGCCCCCTGTACAGCCGCCGCCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCAT
					CCTGCCCGGCGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAGGACGGCCCCACCAAGAGCGACCCCCGCTGCCT
					GACCCGCTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATCGGCCCCCTGCTGATCTGCTAC
					AAGGAGAGCGTGGACCAGCGCGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCAGCGTGTTCGACGA
					GAACCGCAGCTGGTACCTGACCGAGAACATCCAGCGCTTCCTGCCCAACCCCGCCGGCGTGCAGCTGGAGGACCCCGA
					GTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAACGGCTACGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAG
					GTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATCGGCGCCCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTTCTTCAGCGGCTACACCTTCAAGCA
					CAAGATGGTGTACGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCAGCGGCGAGACCGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCCGGC
					CTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGCAACCGCGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGAGCAGCTGCGAC
					AAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTACGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAACGCCATCGAG
					CCCCGCAGCTTCAGCCAGAACGCCGCCCACCCCAGCACCCGCCAGAAGCAGTTCAACGCCACCACCATCCCCGAGAACG
					ACATCGAGAAGACCGACCCCTGGTTCGCCCACCGCACCCCCATGCCCAAGATCCAGAACGTGAGCAGCAGCGACCTGCT

[0207]

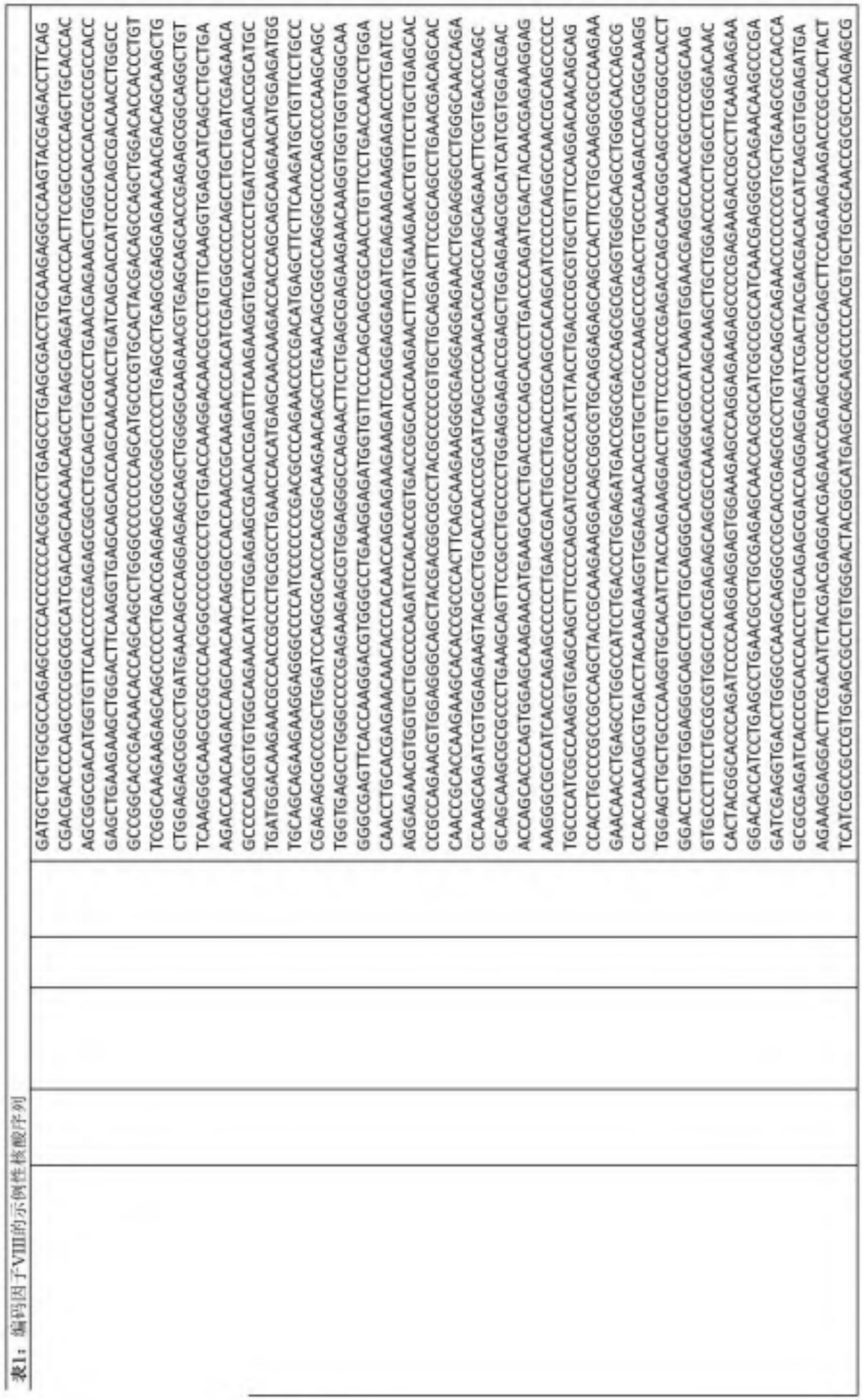


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列				
				GATGCTGCTGCGCCAGAGCCCCACCCCCACGGCCTGAGCCTGAGCGACCTGCAAGAGGCCAAGTACGAGACCTTCAG
				CGACGACCCCAGCCCCGGCGCCATCGACAGCAACAACAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCCGCCCCCAGCTGCACCAC
				AGCGGCGACATGGTGTTCACCCCCGAGAGCGGCCTGCAGCTGCGCCTGAACGAGAAGCTGGGCACCACGCCGCCAACC
				GAGCTGAAGAAGCTGGACTTCAAGGTGAGCAGCACCAACAACCTGATCAGCACCATCCCCAGCGACAACCTGGCC
				GCCGGCACCGACAACACCAGCAGCCTGGGCCCCCCCAGCATGCCCGTGCACTACGACAGCCAGCTGGACACCACCCTGT
				TCGGCAAGAAGAGCAGCCCCCTGACCGAGAGCGGCGGCCCCCTGAGCCTGAGCGAGGAGAACAACGACAGCAAGCTG
				CTGGAGAGCGGCCTGATGAACAGCCAGGAGAGCAGCTGGGGCAAGAACGTGAGCAGCACCGAGAGCGGCAGGCTGT
				TCAAGGGCAAGCGCGCCCACGGCCCCGCCCTGCTGACCAAGGACAACGCCCTGTTCAAGGTGAGCATCAGCCTGCTGA
				AGACCAACAAGACCAGCAACAACAGCGCCACCAACCGCAAGACCCACATCGACGGCCCCAGCCTGCTGATCGAGAACA
				GCCCCAGCGTGTGGCAGAACATCCTGGAGAGCGACACCGAGTTCAAGAAGGTGACCCCCCTGATCCACGACCGCATGC
				TGATGGACAAGAACGCCACCGCCCTGCGCCTGAACCACATGAGCAACAAGACCAGCAGCAAGAACATGGAGATGG
				TGCAGCAGAAGAAGAGCGCCCCATCCCCCCCGACGCCCAGAACCCCGACATGAGCTTCTTCAAGATGCTGTTCCTGCC
				CGAGAGCGCCCGCTGGATCCAGCGCACCCACGGCAAGAACAGCCTGAACAGCGGCCAGGGCCCCAGCCCCAAGCAGC
				TGGTGAGCCTGGGCCCCGAGAAGAGCGTGGAGGGCCAGAACTTCCTGAGCGAGAAGAACAAGGTGGTGGTGGGCAA
				GGGCGAGTTCACCAAGGACGTGGGCCTGAAGGAGATGGTGTTCCCCAGCAGCCGCAACCTGTTCCTGACCAACCTGGA
				CAACCTGCACGAGAACAACACCCACAACCAGGAGAAGAAGATCCAGGAGGAGATCGAGAAGAAGGAGACCCTGATCC
				AGGAGAACGTGGTGCTGCCCCAGATCCACACCGTGACCGGCACCAAGAACTTCATGAAGAACCTGTTCCTGCTGAGCAC
				CCGCCAGAACGTGGAGGGCAGCTACGACGGCGCCTACGCCCCCGTGCTGCAGGACTTCCGCAGCCTGAACGACAGCAC
				CAACCGCACCAAGAAGCACACCGCCCACTTCAGCAAGAAGGGCGAGGAGGAGAACCTGGAGGGCCTGGGCAACCAGA
				CCAAGCAGATCGTGGAGAAGTACGCCTGCACCACCCGCATCAGCCCCAACACCAGCCAGAACTTCGTGACCCAGC
				GCAGCAAGCGCGCCCTGAAGCAGTTCCGCCTGCCCCTGGAGGAGACCGAGCTGGAGAAGCGCATCATCGTGGACGAC
				ACCAGCACCCAGTGGAGCAAGAACATGAAGCACCTGACCCCCAGCACCCTGACCCAGATCGACTACAACGAGAAGGAG
				AAGGGCGCCATCACCCAGAGCCCCCTGAGCGACTGCCTGACCCGCAGCCACAGCATCCCCCAGGCCAACCGCAGCCCCC
				TGCCCATCGCCAAGGTGAGCAGCTTCCCCAGCATCCCGCCCCATCTACCTGACCCGCGTGCTGTTCCAGGACAACAGCAG
				CCACCTGCCCGCCGCCAGCTACCGCAAGAAGGACAGCGGCGTGCAGGAGAGCAGCCACTTCCTGCAAGGCGCCAAGAA
				GAACAACCTGAGCCTGGCCATCCTGACCCTGGAGATGACCGGCGACCAGCGCGAGGTGGGCAGCCTGGGCACCAGCG
				CCACCAACAGCGTGACCTACAAGAAGGTGGAGAACACCGTGCTGCCCAAGCCCGACCTGCCCAAGACCAGCGGCAAGG
				TGGAGCTGCTGCCCAAGGTGCACATCTACCAGAAGGACCTGTTCCCCACCGAGACCAGCAACGGCAGCCCCGGCCACCT
				GGACCTGGTGGAGGGCAGCCTGCTGCAGGGCACCGAGGGCGCCATCAAGTGGAACGAGGCCAACCGCCCCGGCAAG
				GTGCCCTTCCTGCGCGTGGCCACCGAGAGCAGCAAGCAGCGCCTGAAGAAGACCCCCAGCAAGCTGCTGGACCCCCTGGCCTGGGACAAC
				CACTACGGCACCCAGATCCCCAAGGAGGAGTGGAAGAGCCAGGAGAAGAGCCCCGAGAAGACCGCCTTCAAGAAGAA
				GGACACCATCCTGAGCCTGAACGCCTGCGAGAGCAACCACGCCATCGCCGCCATCAACGAGGGCCAGAACAAGCCCGA
				GATCGAGGTGACCTGGGCCAAGCAGGGCCGCACCGAGCGCCTGTGCAGCCAGAACCCCCCCGTGCTGAAGCGCCACCA
				GCGCGAGATCACCCGCACCACCCTGCAGAGCGACCAGGAGGAGATCGACTACGACGACACCATCAGCGTGGAGATGA
				AGAAGGAGGACTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCCGCAGCTTCCAGAAGAAGACCCGCCACTACT
				TCATCGCCGCCGTGGAGCGCCTGTGGGACTACGGCATGAGCAGCAGCCCCCACGTGCTGCGCAACCGCGCCCAGAGCG

[0208]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

Jcat 优化的B域缺失人因子 VIII ORF	4374		307	390	ATGCAGATCGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGCTTCTGCTTCAGCGCCACCCGCCGCTACTACCTGGG CGCCGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCCGTGGACGCCCGCTTCCCCCCCCGCGT GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCAGCGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTCGTGGAGTTCACCGACCACCTGTTCAACA TCGCCAAGCCCCGCCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCAC CCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGAGCCTGCACGCCGTGGGCGTGAGCTACTGGAAGGCCAGCGAGGGCGCCG AGTACGACGACCAGACCAGCCAGCGCGAGAAGGAGGACGACAAGGTGTTCCCCGGCGGCAGCCACACCTACGTGTGG CAGGTGCTGAAGGAGAACGGCCCCATGGCCAGCGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTG GTGAAGGACCTGAACAGCGGCCTGATCGGCGCCCTGCTGGTGTGCCGCGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCA GACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACCAAGAACAGCCT GATGCAGGACCGCGACGCCGCCAGCGCCCGCCTGGCCCAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACCGCAGCCT GCCCGGCCTGATCGGCTGCCACCGCAAGAGCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACCACCCCCGAGGTGCACAG CATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTGCGCAACCACCGCCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGA
					GCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACCGCGGCGG AGCTGAACGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCCGCGCCGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGCA ACCAGGCCAGCCGCCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTACGAGGAGGACCAGCGCCAGGGCGCCGAGCCCC GCAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGACG AGTTCGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCAGCGACGTGGACCTGGAGAAGGACGTGCACAGCGGCCTGATCGGCCCCC TGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCCGCCACGGCCGCCAGGTGACCGTGCAGGAGTTCGCCCTGTTCTTCAC CATCTTCGACGAGACCAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAACATGGAGCGCAACTGCCGCGCCCCCTGCAACATCCAGATG GAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACCGCTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACCCTGCCCGGCCTGGTGA TGGCCCAGGACCAGCGCATCCGCTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAACGAGAACATCCACAGCATCCACTTCAGCG GCCACGTGTTCACCGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCCGGCGTGTTCGAGACCG TGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGCGTGGAGTGCCTGATCGGCGAGCACCTGCACGCCGGCATGAGC ACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCAGCGGCCACATCCGCGACTTCCAGATCA CCGCCAGCGGCCAGTACGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCCGCCTGCACTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGAGCA CCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCACGGCATCAAGACCCAGGGCGCCC GCCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACCG CGGCAACAGCACCGGCACCCTGATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACAGCAGCGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCC CCCATCATCGCCCGCTACATCCGCCTGCACCCCACCCACTACAGCATCCGCAGCACCCTGCGCATGGAGCTGATGGGCTG CGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACCGCCAGCAGCTA CTTCACCAACATGTTCGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCCGCCTGCACCTGCAAGGCCGCAACGCCTGGCGCCCC CAGGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACCGGCGTGACCACCCAGGG CGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTACGTGAAGGAGTTCCTGATCAGCAGCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCT GTTCTTCCAGAACGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCCGTGGTGAACAGCCTGGACCC CCCCCTGCTGACCGCCTACCTGCGCATCCACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATCGCCCTGCGCATGGAGGTGCTGGGC TGCGAGGCCCAGGACCTGTACTAA

[0209]

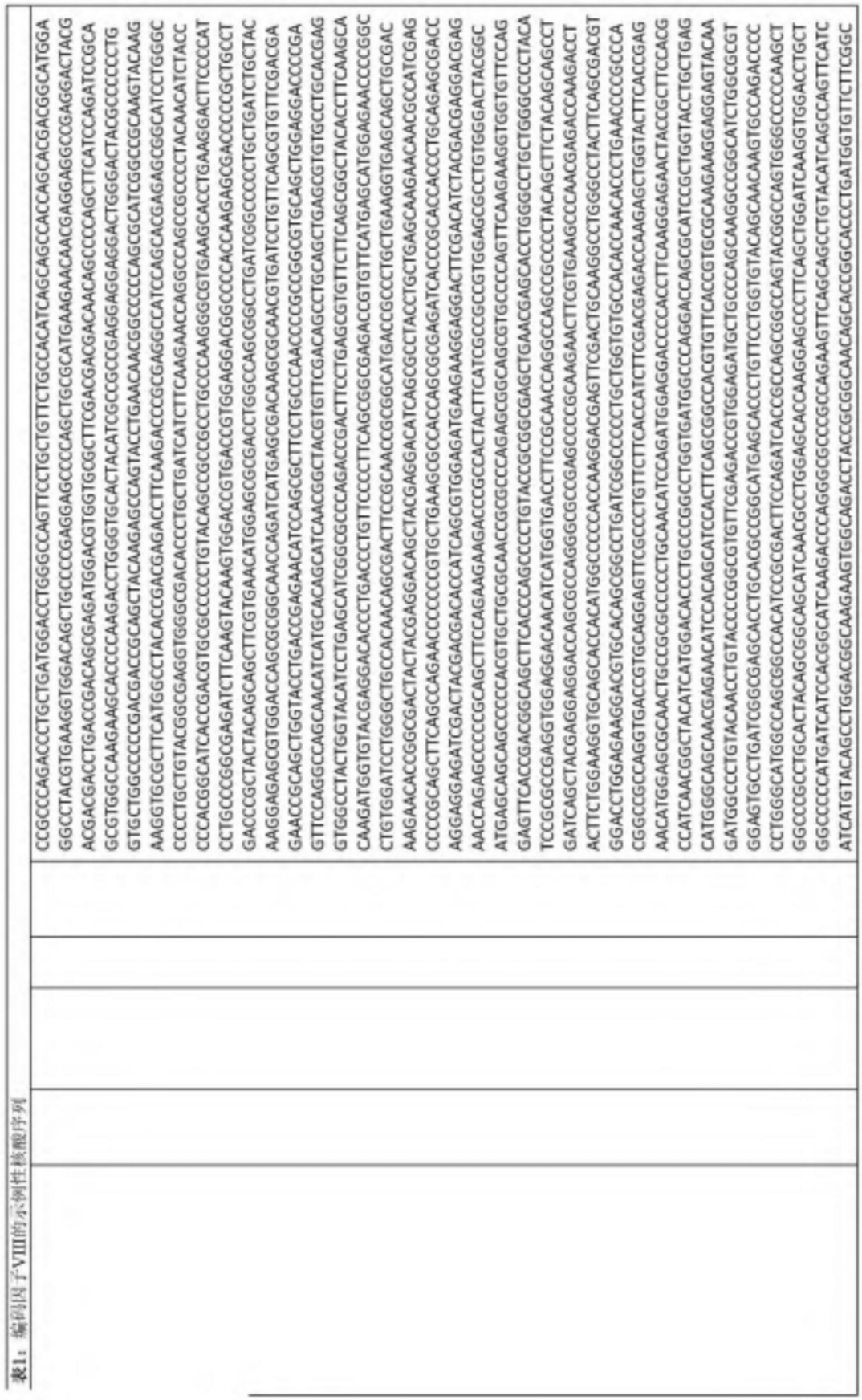


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列	
	CCGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCACGACGGCATGGA
	GGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAGGAGCCCCAGCTGCGCATGAAGAACAACGAGGAGGCCGAGGACTACG
	ACGACGACCTGACCGACAGCGAGATGGACGTGGTGCGCTTCGACGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCCGCA
	GCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATCGCCGCCGAGGAGGAGGACTGGGACTACGCCCCCCTG
	GTGCTGGCCCCCGACGACCGCAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCCCAGCGCATCGGCCGCAAGTACAAG
	AAGGTGCGCTTCATGGCCTACACCGACGAGACCTTCAAGACCCGCGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGC
	CCCCTGCTGTACGGCGAGGTGGGCGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCCGCCCCTACAACATCTACC
	CCCACGGCATCACCGACGTGCGCCCCCTGTACAGCCGCCGCCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCAT
	CCTGCCCGGCGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAGGACGGCCCCACCAAGAGCGACCCCCGCTGCCT
	GACCGCTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAGCGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATCGGCCCCCTGCTGATCTGCTAC
	AAGGAGAGCGTGGACCAGCGCGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGCAACGTGATCCTGTTCAGCGTGTTCGACGA
	GAACCGCAGCTGGTACCTGACCGAGAACATCCAGCGCTTCCTGCCCAACCCCGCCGGCGTGCAGCTGGAGGACCCCGA
	GTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAACGGCTACGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAG
	GTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATCGGCGCCCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTTCTTCAGCGGCTACACCTTCAAGCA
	CAAGATGGTGTACGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCAGCGGCGAGACCGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCCGGC
	CTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGCAACCGCGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGAGCAGCTGCGAC
	AAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTACGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAACGCCATCGAG
	CCCCGCAGCTTCAGCCAGAACCCCCCCGTGCTGAAGCGCCACCAGCGCGAGATCACCCGCACCACCCTGCAGAGCGACC
	AGGAGGAGATCGACTACGACGACACCATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGACGAGGACGAG
	AACCAGAGCCCCCGCAGCTTCCAGAAGAAGACCCGCCACTACTTCATCGCCGCCGTGGAGCGCCTGTGGGACTACGGC
	ATGAGCAGCAGCCCCCCACGTGCTGCGCAACCGGCGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAG
	GAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACCGCGGCGAGCTGAACGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACA
	TCCGCGCCGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGCAACCAGGCCAGCCGCCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCT
	GATCAGCTACGAGGAGGACCAGCGCCAGGGCGCCGAGCCCCGCAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACCAAGACCT
	ACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGACGAGTTCGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCAGCGACGT
	GGACCTGGAGAAGGACGTGCACAGCGGCCTGATCGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCCGCCCA
	CGGCCGCCAGGTGACCGTGCAGGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAGACCAAGAGCTGGTACTTCACCGAG
	AACATGGAGCGCAACTGCCGCGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACCGCTTCCACG
	CCATCAACGGCTACATCATGGACACCCTGCCCGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGCGCATCCGCTGGTACCTGCTGAG
	CATGGGCAGCAACGAGAACATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAA
	GATGGCCCTGTACAACCTGTACCCCGGCGTGTTCGAGACCGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGCGT
	GGAGTGCCTGATCGGCGAGCACCTGCACGCCGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCC
	CCTGGGCATGGCCAGCGGCCACATCCGCGACTTCCAGATCACCGCCAGCGGCCAGTACGGCCAGTGGGCCCCCAAGCT
	GGCCCGCCTGCACTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCT
	GGCCCCCATGATCATCCACGGCATCAAGACCCAGGGCGCCCGCCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATC
	ATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACCGCGGCAACAGCACCGGCACCCTGATGGTGTTCTTCGGC

[0210]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

人全长 FVIII ORF（密码子优化的）	7056		323	391	AACGTGGACAGCAGCAGCGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATCGCCCGCTACATCCGCCTGCACCCCACCCA
					CTACAGCATCCGCAGCACCCTGCGCATGGAGCTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGGA
					GAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACCGCCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACCTGGAGCCCCAGCAAG
					GCCCGCCTGCACCTGCAAGGCCGCAGCAACGCCTGGCGCCCCCAGGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGAC
					TTCCAGAAGACCATGAAGGTGACCGGCGTGACCACCCAGGGCGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTACGTGAAGGA
					GTTCCTGATCAGCAGCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAACGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGG
					CAACCAGGACAGCTTCACCCCCGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCGCTACCTGCGCATCCACCCCCAGA
					GCTGGGTGCACCAGATCGCCCTGCGCATGGAGGTGCTGGGCTGCGAGGCCCAGGACCTGTACTAA
					ATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGG
					CGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCAAGAGT
					GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATA
					TCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCAC
					CCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAG
					TACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAGAAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAG
					GTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCA
					AGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACAC
					TGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGC
					AGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTG
					GACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCT
					TTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCT
					CAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCT
					ACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGAC
					GACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGG
					CCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGG
					CCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGC
					GGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGGAATTCTGGGCCCTCTGC
					TGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGG
					CATCACCGATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCT
					GGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGG
					TACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAGAAA
					GCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGT
					CCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGC
					AAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTAC
					TGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGT
					GTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATT
					CTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACC

[0211]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				GGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCAGAAGC
				TTCAGCCAGAATAGCAGACACCCCTCCACCAGACAGAAGCAGTTCAACGCCACAACAATCCCCGAGAACGACATCGAGA
				AAACCGATCCTTGGTTTGCCCACAGAACCCCTATGCCTAAGATCCAGAACGTGTCCTCCAGCGATCTGCTGATGCTCCTG
				AGACAGAGCCCTACACCTCACGGACTGAGCCTGTCCGATCTGCAAGAGGCCAAATACGAAAACCTTCAGCGACGACCTT
				CTCCTGGCGCCATCGACAGCAACAATAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCAGACCACAGCTGCACCACAGCGGCGACAT
				GGTGTTTACACCTGAGAGCGGCCTCCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGAACCACCGCCGCCACCGAGCTGAAGAA
				ACTGGACTTCAAGGTGTCCTCTACCAGCAACAACCTGATCAGCACAATCCCCTCCGACAACCTGGCTGCCGGCACCGACA
				ACACATCTTCTCTGGGCCCACCTAGCATGCCCGTGCACTACGATAGCCAGCTGGATACCACACTGTTCGGCAAGAAGTCT
				AGCCCTCTGACAGAGTCTGGCGGCCCTCTGTCTCTGAGCGAGGAAAACAACGACAGCAAGCTGCTGGAATCCGGCCTG
				ATGAACAGCCAAGAGTCCTCCTGGGGCAAGAATGTGTCCAGCACCGAGTCCGGCAGACTGTTCAAGGGAAAGAGAGCC
				CACGGACCTGCTCTGCTGACCAAGGATAACGCCCTGTTCAAAGTGTCCATCAGCCTGCTCAAGACCAACAAGACCTCCA
				ACAACTCCGCCACCAACAGAAAGACCCACATCGACGGCCCTAGCCTGCTGATCGAGAATAGCCCTAGCGTCTGGCAGAA
				TATCCTGGAAAGCGACACCGAGTTCAAGAAAGTGACCCCTCTGATCCACGACCGGATGCTCATGGACAAGAACGCCACC
				GCTCTGCGGCTGAACCACATGAGCAACAAGACAACCAGCAGCAAGAATATGGAAATGGTGCAGCAGAAGAAAGAGGG
				CCCCATTCCTCCAGACGCTCAGAACCCCGATATGAGCTTCTTCAAGATGCTCTTTCTGCCCGAGAGCGCCCGGTGGATTC
				AGAGAACACACGGCAAGAACTCCCTGAACTCCGGCCAGGGACCTTCTCCAAAGCAGCTGGTTTCCCTGGGACCTGAGA
				AGTCCGTGGAAGGACAGAACTTCCTGAGCGAAAAGAACACAAAGTGGTCGTCGGCAAGGGCGAGTTCACCAAGGATGTG
				GGCCTGAAAGAGATGGTCTTTCCCAGCAGCCGGAACCTGTTCCTGACCAACCTGGACAACCTGCACGAGAACAACACCC
				ACAATCAAGAGAAGAAGATCCAAGAGGAAATCGAAAAGAAAAGAGACACTCATCCAAGAGAACGTGGTGCTGCCTCAG
				ATCCACACAGTGACCGGCACCAAGAACTTTATGAAGAATCTGTTCCTGCTGAGTACCCGGGCAGAACGTGGAAGGCAGCT
				ACGATGGCGCTTATGCCCCTGTGCTGCAGGACTTCAGATCCCTGAACGACTCCACCAATCGGACAAAGAAGCACACAGC
				CCACTTCTCCAAGAAGGGCGAAGAAGAGAACCTGGAAGGACTGGGCAATCAGACCAAGCAGATCGTCGAGAAGTACG
				CCTGCACCACCAGAATCAGCCCCAACACAAGCCAGCAGAACTTCGTGACCCAGCGGAGCAAAAGAGCCCTGAAGCAGT
				TTCGGCTGCCCCTGGAAGAAACCGAGCTGGAAAAGCGGATCATCGTGGACGACACCAGCACACCAGTGGTCCAAGAACA
				TGAAGCACTTGACCCCTAGCACACTGACCAGATCGACTACAACGAGAAAGAGGGCGCTATCACACAGAGCCCCAC
				TGAGCGACTGTCTGACCAGAAGCCACAGCATCCCTCAGGCCAACAGATCCCCTCTGCCAATGGCCAAAGTGTCTAGCTTC
				CCCAGCATCAGACCCATCTACCTGACCAGAGTGCTGTTCCAGGACAACAGCAGCCATCTGCCAGCCGCCAGCTACCGGA
				AGAAAGATTCTGGCGTGCAAGAGAGCAGCCACTTTCTGCAGGGCGCTAAGAAGAACAATCTGAGCCTGGCTATTCTGA
				CCCTGGAAATGACCGGCGATCAGAGAGAAGTCGGCTCTCTGGGCACCAGCGCCACAAATAGCGTGACCTACAAAAAGG
				TGGAAAACACCGTGCTGCCTAAGCCTGACCTGCCAAAGACAAGCGGCAAGGTGGAACTGCTGCCAAAGGTGCACATCT
				ACCAGAAGGACCTGTTTCCTACCGAGACAAGCAACGGCTCTCCCGGCCATCTGGATCTGGTGGAAGGATCTCTGCTGCA
				GGGAACCGAGGGCGCCATCAAGTGGAACGAGGCCAATAGACCTGGCAAGGTGCCCTTCCTGAGAGTGGCCACAGAGT
				CCAGCGCCAAGACACCCTCTAAACTGCTGGACCCTCTGGCCTGGGACAACCACTATGGCACTCAGATCCCCAAAGAGGA
				ATGGAAGTCCCAAGAAGTCCCCTGAAAAGACCGCCTTCAAGAAGAAGGACACCATTCTGTCCCTGAATGCCTGCGA
				GAGCAACCACGCCATTGCCGCCATCAATGAGGGCCAGAACAAGCCCGAGATCGAAGTGACCTGGGCCAAGCAGGGAA
				GAACCGAGAGACTGTGTAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGAGAGAAATCACCCGGACCACACTGCAGA

[0212]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

					GCGACCAAGAAGAGATCGATTACGACGATACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGG
					ACGAGAATCAGAGCCCTCGGAGCTTCCAGAAGAAAACCAGGCACTACTTTATTGCCGCCGTCGAGCGGCTGTGGGACT
					ACGGAATGTCTAGCTCTCCTCACGTGCTGCGGAATAGAGCCCAGTCTGGTAGCGTGCCCCAGTTCAAAAAGGTCGTGTT
					CCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCC
					TTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGC
					TCCCTGATCTCCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCAGAGCCCCGGAAGAATTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAG
					ACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCG
					ATGTGGACCTCGAAAAGGACGTGCACAGCGGACTCATCGGCCCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACTGAACCCCGC
					TCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTTTTCACCATCTTCGACGAAACGAAGTCCTGGTACTTCACCG
					AAAACATGGAAAGAAACTGCAGGGCCCCTTGCAACATTCAGATGGAAGATCCCAACTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCA
					CGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTG
					TCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACTCCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAAGAGTACA
					AAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTTGAGATGCTGCCTAGCAAGGCCGGAATTTGGAGAGT
					GGAATGTCTGATTGGAGAGCACCTCCACGCCGGGATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAGTGTCAGACCCCT
					CTCGGCATGGCCTCTGGCCACATTAGAGACTTCCAGATCACCGCCAGCGGACAGTATGGACAGTGGGCCCCTAAACTGG
					CCAGACTGCACTACTCCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCTTTCAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGC
					TCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAAAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATC
					ATGTACAGCCTGGACGGAAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGCAATAGCACCGGCACACTGATGGTGTTCTTCGGCAAC
					GTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACTA
					CAGCATCAGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGC
					AAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCTCTAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCTCTAAGGCCCG
					GCTTCATCTGCAAGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAATGGCTCCAGGTGGACTTTCA
					GAAAACCATGAAAGTGACAGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCCCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTTCTG
					ATCAGCTCCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGAAATCAG
					GACAGCTTCACACCCGTGGTCAATAGTCTGGACCCACCACTGCTGACCCGCTACCTGCGAATTCACCCTCAGTCTTGGGT
					GCACCAGATTGCCCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAG
密码子优化的人因子VIII 206 变异 ORF	4980		241	392	ATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGG
					CGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCCAAGAGT
					GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATA
					TCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCAC
					CCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAG
					TACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAGAAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAG
					GTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCA
					AGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACAC
					TGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGC
					AGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTG

[0213]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				GACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCT
				TTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCT
				CAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCT
				ACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGAC
				GACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGG
				CCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGG
				CCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGC
				GGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGC
				TGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGG
				CATCACCGATGTGCGGCCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCT
				GGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGG
				TACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAGAAA
				GCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGT
				CCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGC
				AAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTAC
				TGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGT
				GTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATT
				CTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACC
				GGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCAGAAGC
				TTCAGCCAGAATAGCAGACACCCCTCCACCAGACAGAAGCAGTTCAACGCCACACAATCCCCGAGAACGACATCGAGA
				AAACCGATCCTTGGTTTGCCCACAGAACCCCTATGCCTAAGATCCAGAACGTGTCCTCCAGCGATCTGCTGATGCTCCTG
				AGACAGAGCCCTACACCTCACGGACTGAGCCTGTCCGATCTGCAAGAGGCCAAATACGAAACCTTCAGCGACGACCCTT
				CTCCTGGCGCCATCGACAGCAACAATAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCAGACCACAGCTGCACCACAGCGGCGACAT
				GGTGTTTACACCTGAGAGCGGCCTCCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGAACCACCGCCGCCACCGAGCTGAAGAA
				ACTGGACTTCAAGGTGTCCTCTACCAGCAACAACCTGATCAGCACAATCCCCTCCGACAACCTGGCTGCCGGCACCGACA
				ACACATCTTCTCTGGGCCCACCTAGCATGCCCGTGCACTACGATAGCCAGCTGGATACCACACTGTTCGGCAAGAAGTCT
				AGCCCTCTGACAGAGTCTGGCGGCCCTCTGTCTCTGAGCGAGGAAAACAACGACAGCAAGCTGCCTCCTGTGCTGAAGC
				GGCACCAGCGGGGAAATCACCAGAACCACACTGCAGAGCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCG
				AGATGAAGAAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGCCCCCAGATCCTTTCAGAAAAAGACCCGGC
				ACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCA
				GAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCCACTGTATAG
				AGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTT
				CCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCTCCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGA
				GCCCCGGAAGAATTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAG
				GACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGA
				CCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGAACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTT

[0214]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

优化的无CpG人hFVIII BDD COOL	4374		1	393	ATGCAGATAGAATTATCTACTTGTTTTTTTCTTTGTCTGCTCAGGTTCTGCTTCTCTGCTACAAGGAGGTATTACTTAGGT GCTGTAGAGTTATCTTGGGACTACATGCAGTCTGATCTTGGGGAGCTCCCTGTGGATGCAAGATTTCCCCCTAGAGTACC TAAAAGTTTCCCTTTCAACACAAGTGTGGTGTATAAGAAGACTCTGTTTGTTGAGTTCACAGATCACCTTTTCAATATTGC CAAGCCCAGACCCCCCTGGATGGGTCTACTGGGGCCAACAATTCAAGCAGAGGTATATGATACAGTGGTGATCACATTA AAGAACATGGCATCCCACCCTGTAAGCCTGCATGCTGTTGGTGTGTCCTATTGGAAAGCAAGTGAAGGTGCTGAATATG ATGATCAAACATCCCAAAGAGAGAAGGAAGATGACAAAGTCTTCCCAGGTGGCTCTCACACCTATGTGTGGCAAGTGCT CAAGGAAAATGGGCCTATGGCTAGTGATCCATTGTGCCTCACATATAGCTACCTGTCCCATGTGGACTTAGTTAAAGATC TGAACTCAGGTCTGATTGGTGCCCTGCTGGTCTGTAGGGAAGGATCACTAGCTAAAGAAAAAACCCAGACTTTACACAA GTTCATCTTATTATTTGCTGTTTTTGATGAGGGAAAGAGCTGGCACTCAGAGACTAAGAATTCACTCATGCAGGATAGA GATGCAGCTTCTGCTAGAGCATGGCCAAAAATGCATACTGTGAATGGGTATGTTAACAGGAGTCTGCCTGGCCTCATAG GCTGCCATAGAAAATCAGTGTACTGGCATGTCATAGGTATGGGCACTACTCCTGAGGTGCATTCCATTTTTTGGAGGG GCATACTTTCCTTGTAAGAAACCACAGGCAGGCTTCATTGGAAATTAGTCCAATAACCTTTCTCACAGCCCAGACTCTGCT AATGGACTTGGGGCAGTTTTTATTATTTTGTCACATTAGCTCTCATCAGCATGATGGGAATGGGAAGCCTATGTTAAGGTTG ATTCCTGCCCAGAAGAGCCCCAGTTGAGAATGAAGAACAATGAGGAAGCAGAAGACTATGATGATGAATCTAACAGACT CAGAAATGGATGTTGTGAGATTTGATGATGATAACTCCCCAAGTTTTATTCAGATCAGGTCAGTGGCCAAGAAACATCC AAAAACATGGGTTCATTATATTCAACAATGGACCCCAGAGAAGAAGAAGACTGGGATTATGCACCCTTGGTATTAGCCCCTGATGACAGA AGCTATAAGTCACAATATCTCAACAATGGACCCCAGAGAATTGGCAGAAAGTACAAAAAAGTCAGGTTTATGGCTTATA CTGATGAGACTTTCAAAACTAGAGAGGCTATTCAACATGAATCTGGCATCCTAGGTCCTTTGTTATATGGGGAAGTAGG

[0215]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				GGACACCTTATTAATTATATTTAAAAACCAGGCCAGTAGGCCTTACAACATTTACCCCCACGGTATAACAGATGTCAGAC
				CACTGTACTCAAGGAGGCTACCAAAAGGGGGTGAAGCACCTAAAAGACTTCCCCATCCTACCTGGTGAGATTTTCAAGTA
				TAAGTGGACAGTGACTGTAGAAGATGGTCCAACCAAATCAGATCCCAGATGCCTGACAAGGTACTACAGTAGCTTTGTA
				AATATGGAGAGAGACCTGGCCTCAGGGTTAATAGGGCCCCTACTGATCTGCTACAAGGAGAGTGTAGACCAAAGAGGC
				AACCAAATTATGTCAGACAAGAGAAATGTCATCCTCTTTAGTGTTTTTGATGAGAATAGGGTCCTGGTACCTGACAGAAAA
				TATCCAAAGATTCCTTCCAAATCCAGCAGGGGTACAACTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCTCCAATATCATGCACAGC
				ATCAATGGTTATGTGTTTGACAGTTTGCAACTTTCAGTGTGCCTTCATGAGGTTGCATACTGGTATATACTTTCTATAGGG
				GCCCAGACAGACTTCTTGTCAGTTTTCTTTTCAGGCTATACTTTCAAGCATAAGATGGTATATGATGACACAATAAGTGT
				TTTCCCTTTAGTGGTGAGACAGTTTTCATGTCAATGGAAAACCCAGGGCTTTGGATCTTGGGATGCCACAACTCTGACTT
				TAGAAACAGAGGCATGACTGCCCTTTTAAAGGTGTCCTCTTGTGATAAGAATACTGGAGACTACTATGAGGACAGCTAT
				GAGGACATTTCAGCCTATCTGCTGTCAAAAAATAATGCTATAGAGCCAAGGTCATTTTCTCAAAATCCTCCTGTCCTGAA
				GAGGCACCAAAGAGAGATAACCAGGACTACCTTACAGTCTGACCAGGAGGAAATTGATTATGATGACACAATAAGTGT
				GGAGATGAAAAAGGAGGATTTTGATATTTATGATGAGGATGAAAACCAATCTCCAAGATCTTTCCAGAAGAAGACTAG
				ACACTATTTCATTGCTGCAGTGGGAAAGACTGTGGGACTATGGAATGTCCTCCAGCCCTCATGTTCTCAGGAATAGGGCTC
				AAAGTGGTTCTGTGCCACAGTTCAAGAAGGTGGTGTTTCAGGAATTCACAGATGGGTCCTTTACTCAACCACTGTATAG
				GGGAGAACTCAATGAACATCTAGGATTACTAGGTCCCTACATTAGAGCTGAGGTGGAGGACAATATCATGGTCACTTTC
				AGGAACCAGGCATCTAGACCATACTCTTTTTACAGCTCCTTGATATCTTATGAAGAGGACCAGAGACAGGGTGCAGAAC
				CCAGGAAGAACTTTGTGAAACCCAATGAGACCAAAACATACTTCTGGAAGGTCCAGCATCATATGGCTCCTACCAAGGA
				TGAATTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTACTTCTCAGATGTGGATTTGGAGAAAGATGTGCACAGTGGCTTGATTGGGCCT
				CTTTTGGTATGTCATACCAACACCTTAAACCCTGCTCATGGAAGACAAGTAACAGTGCAAGAGTTTGCCCTCTTTTTCACT
				ATATTTGATGAGACAAAAAAGTTGGTACTTTACTGAGAATATGGAGAGGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATACAGATGG
				AGGATCCTACTTTCAAGGAAAACTATAGGTTTCATGCCATTAATGGCTATATCATGGATACATTGCCTGGCTTAGTTATG
				GCCCAGGATCAGAGAATCAGATGGTACCTCCTTAGTATGGGAAGCAATGAAAACATACATTCTATTCACTTCAGTGGAC
				ATGTCTTTACTGTGAGAAAAAAGGAAGAGTACAAGATGGCACTGTACAATCTGTACCCTGGAGTGTTTGAGACAGTTGA
				GATGCTGCCCAGCAAGGCTGGGATCTGGAGGGTAGAATGCCTGATTGGAGAACACTTACATGCAGGTATGTCCACTCT
				ATTCTTGGTCTATTCCAACAAGTGTCAGAACCCCCCTAGGCATGGCATCTGGCCATATTAGAGATTTCCAGATAACTGCTTC
				TGGTCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTTGCTAGACTTCACTACAGTGGTTCAATAAATGCCTGGTCCACCAAGGAG
				CCCTTCAGCTGGATTAAAGTGGACTTGCTAGCCCCCATGATCATTCATGGGATAAAAACACAGGGTGCCAGACAGAAAT
				TTTCATCTCTGTACATCAGCCAGTTTATCATCATGTACAGTCTGGATGGCAAAAAATGGCAGACCTACAGAGGTAACTCT
				ACAGGTACACTAATGGTATTTTTTGGCAATGTAGATTCATCAGGTATCAAGCATAATATCTTTAATCCTCCCATTATTGCC
				AGATACATCAGGTTGCACCCAACTCATTACAGTATAAGATCCACTTTAAGGATGGAGCTTATGGGGTGTGACCTTAATA
				GCTGCAGTATGCCCTTGGGAATGGAAAGTAAGGCCATATCAGATGCCCAGATTACTGCAAGCAGCTACTTTACAAACAT
				GTTTGCAACCTGGTCTCCTAGTAAAGCCAGGCTGCACTTGCAGGGTAGGAGCAATGCATGGAGACCCCAGGTCAATAAC
				CCAAAAGAGTGGCTTCAAGTTGACTTTCAAAAGACAATGAAGGTAACAGGGGTAACCACCCAAGGGGTAAAGAGTCTG
				CTGACATCTATGTATGTAAAAGAATTCCTCATCTCAAGTAGTCAAGATGGGCACCAGTGGACACTGTTCTTCCAGAATGG
				AAAAGTTAAGGTGTTCCAGGTAATCAAGACAGCTTCACTCCAGTGGTGAACAGTCTGGATCCACCACTCCTAACCAGG

[0216]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

优化的无 CpG 人 hFVIII 全长 COOL	7056		0	394	TACCTGAGGATCCACCCTCAGTCCTGGGTCCACCAGATAGCTCTGAGAATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACC TATACTGA
					ATGCAAATTGAATTGAGTACCTGTTTTTTCCTCTGTCTATTAAGGTTTTTGTTTCAGTGCAACAAGAAGGTATTATCTGGGA
					GCTGTTGAGTTATCCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTCCCAGTGGATGCTAGGTTTCCCCCAAGAGTAC
					CCAAAAGCTTCCCTTTCAACACTTCTGTTGTCTATAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTCACAGATCATCTGTTTAACATTGC
					CAAGCCTAGACCTCCATGGATGGGGCTGCTGGGACCAACTATTCAGGCAGAGGTTTATGACACTGTGGTGATTACACTT
					AAGAATATGGCATCCCACCCAGTGAGCCTGCATGCTGTTGGGGTTTCCTACTGGAAGGCAAGTGAAGGAGCTGAGTAT
					GATGACCAGACTAGCCAAAGAGAGAAGGAGGATGACAAGGTCTTTCCAGGTGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAGGTG
					CTGAAGGAGAATGGCCCTATGGCCTCTGATCCTTTGTGTCTAACCTACAGTTATTTGTCTCATGTGGACCTGGTGAAGGA
					CCTTAACTCAGGGCTGATAGGGGCCTTGCTGGTGTGTAGGGAGGGAAGCCTGGCTAAGGAAAAGACACAGACTCTGCA
					TAAGTTTATTCTCTTGTTTGCAGTGTTTGATGAGGGTAAAAGCTGGCACTCTGAAACAAAAAACAGCTTGATGCAGGAC
					AGGGATGCTGCCAGTGCTAGGGCTTGGCCTAAGATGCACACAGTCAATGGCTATGTTAACAGATCACTGCCTGGTTTGA
					TTGGCTGCCACAGAAAGTCTGTTTACTGGCATGTAATTGGGATGGGGACAACCCCAGAAGTTCACTCTATCTTCCTGGA
					AGGGCACACCTTCCTGGTTAGAAATCATAGACAGGCATCCTTAGAGATTTCTCCTATTACATTCCTGACTGCCCAGACCC
					TCCTCATGGACCTGGGTCAGTTCCTGCTTTTTTGCCACATTTCCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAA
					GTTGATTCTTGCCCTGAGGAGCCTCAGCTTAGGATGAAGAACAATGAAGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTAACA
					GACAGTGAGATGGATGTTGTGAGGTTTGATGATGACAATTCACCTAGTTTCATCCAGATTAGGTCTGTGGCTAAGAAAC
					ATCCAAAGACCTGGGTTCACTACATTGCAGCAGAGGAGGAGGACTGGGATTATGCCCCCCTGGTTCTGGCACCTGATGA
					CAGAAGCTATAAGTCCCAGTATCTCAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGAAGAAAATACAAAAAAGTCAGATTTATGGCC
					TATACAGATGAGACTTTTAAAACTAGGGAAGCTATTCAGCATGAGTCAGGGATCCTGGGACCTCTTCTTTATGGAGAGG
					TGGGGGACACTCTTCTGATAATTTTTAAAAATCAGGCAAGTAGACCTTATAACATCTACCCCCATGGGATCACTGATGTC
					AGGCCTCTGTACTCAAGAAGGCTGCCCAAGGGTGTCAAACACCTCAAGGATTTCCCTATTCTTCCTGGGGAGATCTTCAA
					ATACAAGTGGACAGTTACTGTGGAGGATGGCCCCCACCAAATCTGACCCAAGGTGCCTCACCAGATATTACAGCTCCTTT
					GTGAATATGGAAAGAGACCTAGCTAGTGGTCTCATTGGCCCACTGCTCATCTGTTACAAGGAGTCAGTGGACCAGAGA
					GGGAATCAAATTATGTCTGACAAGAGAAATGTGATCCTTTTCTCAGTGTTTGATGAGAACAGAAGCTGGTATCTGACAG
					AGAACATTCAAAGGTTTCTGCCAAACCCAGCTGGAGTTCAGCTGGAGGACCCTGAATTCCAGGCATCTAATATTATGCAT
					TCTATCAATGGATATGTGTTTGATAGTCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAAGTGGCCTACTGGTATATCCTCTCTATT
					GGTGCCCAGACAGATTTCTTGTCTGTTTTTCAGTGGTTACACATTTAAACATAAAATGGTGTATGAGGACACACTTAC
					ATTATTCCCTTTTAGTGGAGAGACAGTGTTTATGTCCATGGAGAATCCAGGCCTGTGGATCTTGGGGTGTCATAATAGTG
					ACTTTAGGAATAGAGGTATGACAGCTCTGCTCAAAGTGTCTTCCTGTGACAAGAACACAGGGGACTATTATGAGGACTC
					TTATGAGGACATTTCAGCCTATTTACTGTCCAAGAACAATGCCATTGAACCAAGATCTTTCTCTCAGAACTCAAGACACCC
					CAGCACCAGGCAGAAGCAGTTCAATGCAACCACCATCCCAGAGAATGATATTGAAAAAACTGACCCTTGGTTTGCCCAC
					AGGACTCCCATGCCTAAGATTCAGAATGTATCTTCATCAGACTTGCTGATGCTCCTGAGACAGAGCCCCAACTCCTCATGG
					CCTGAGCTTAAGTGACCTCCAGGAGGCTAAGTATGAAACTTTCTCAGATGATCCCAGTCCTGGTGCCATTGATTCTAATA
					ATTCCCTGTCTGAGATGACACACTTCAGACCCCAGCTCCACCACTCTGGAGATATGGTCTTTACTCCTGAATCAGGCCTG
					CAGCTGAGGCTGAATGAAAAGCTTGGCACCACAGCAGCTACTGAACTGAAAAAGCTGGATTTTAAAGTGAGCTCCACAT

[0217]

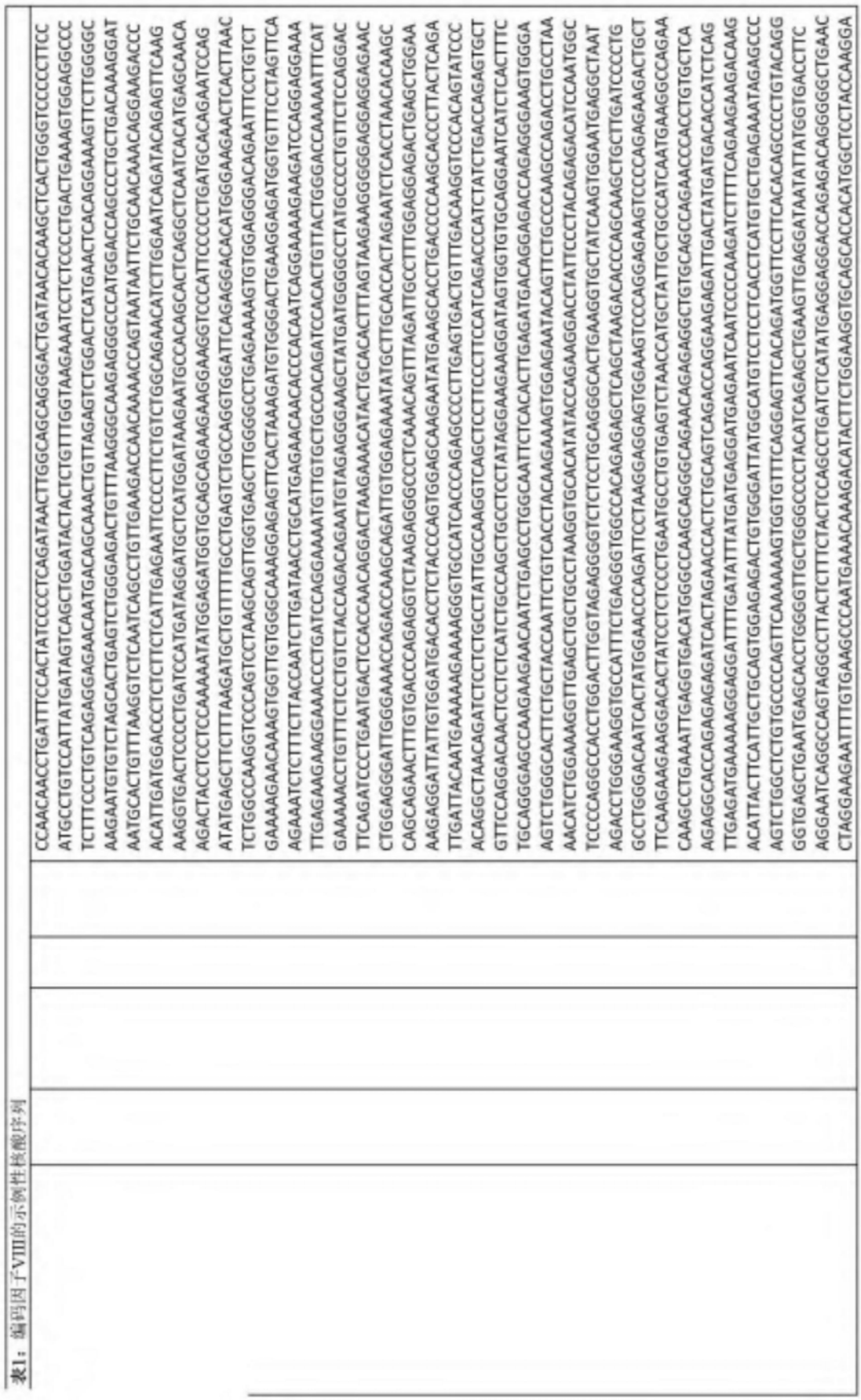


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列					
					CCAACAACCTGATTTCCACTATCCCCTCAGATAACTTGGCAGCAGGGACTGATAACACAAGCTCACTGGGTCCCCCTTCC
					ATGCCTGTCCATTATGATAGTCAGCTGGATACTACTCTGTTTGGTAAGAAATCCTCTCCCCTGACTGAAAGTGGAGGCCC
					TCTTTCCCTGTCAGAGGAGAACAATGACAGCAAACTGTTAGAGTCTGGACTCATGAACTCACAGGAAAGTTCTTGGGGC
					AAGAATGTGTCTAGCACTGAGTCTGGGAGACTGTTTAAGGGCAAGAGGGCCCATGGACCAGCCCTGCTGACAAAGGAT
					AATGCACTGTTTAAGGTCTCAATCAGCCTGTTGAAGACCAACAAAACCAGTAATAATTCTGCAACAAACAGGAAGACCC
					ACATTGATGGACCCTCTCTTCTCATTGAGAATTCCCCTTCTGTCTGGCAGAACATCTTGGAATCAGATACAGAGTTCAAG
					AAGGTGACTCCCCTGATCCCATGATAGGATGCTCATGGATAAGAATGCCACACAGCACTCAGGCTCAATCACATGAGCAACA
					AGACTACCTCCTCCAAAAAATATGGAGATGGTGCAGCAGAAGAAGGAAGGTCCCATTCCCCCTGATGCACAGAATCCAG
					ATATGAGCTTCTTTAAGATGCTGTTTTTGCCTGAGTCTGCCAGGTGGATTCAGAGGACACATGGGAAGAACTCACTTAAC
					TCTGGCCAAGGTCCCAGTCCTAAGCAGTTGGTGAGCTTGGGGCCTGAGAAAAGTGTGGAGGGACAGAATTTCCTGTCT
					GAAAAGAACAAAGTGGTTGTGGGCAAAGGAGAGTTCACTAAAGATGTGGGACTGAAGGAGATGGTGTTTCCTAGTTCA
					AGAAATCTCTTTCTTACCAATCTTGATAACCTGCATGAGAACAACACCCACACAATCAGGAAAAGAAGATCCAGGAGGAAA
					TTGAGAAGAAGGAAACCCTGATCCAGGAAAATGTTGTGCTGCCACAGATCCACACTGTTACTGGGACCAAAAATTTCAT
					GAAAAACCTGTTTCTCCTGTCTACCAGACACAGAATGTAGAGGGAAGCTATGATGGGGCCTATGCCCCTGTTCTCCAGGAC
					TTCAGATCCCTGAATGACTCCACCAACAGGACTAAGAAACATACTGCACACTTTAGTAAGAAGGGGGAGGAGGAGAAC
					CTGGAGGGATTGGGAAACCAGACCAAGCAGATTGTGGAGAAATATGCTTGCACCACTAGAATCTCACCTAACACAAGC
					CAGCAGAACTTTGTGACCCAGAGGTCTAAGAGGGCCCTCAAACAGTTTAGATTGCCTTTGGAGGAGACTGAGCTGGAA
					AAGAGGATTATTGTGGATGACACCTCTACCCAGTGGAGCAAGAATATGAAGCACCTGACCCCAAGCACCCTTACTCAGA
					TTGATTACAATGAAAAAGAAAAAGGGGTGCCATCACCCAGAGCCCCTTGAGTGACTGTTTGACAAGGTCCCACAGTATCCC
					ACAGGCTAACAGATCTCCTCTGCCTATTGCCAAGGTCAGCTCCTTCCCTTCCATCAGACCCATCTATCTGACCAGAGTGCT
					GTTCCAGGAGACAACTCCTCTCATCTGCCAGCTGCCTCCTCTATAGGAAGAAGGATAGTGGTGTGCAGGAATCATCTCACTTTC
					TGCAGGGAGCCAAGAAGAACAATCTGAGCCTGGCAATTCTCACACTTGAGATGACAGGAGACCAGAGGGAAGTGGGA
					AGTCTGGGCACTTCTGCTACCAATTCTGTCACCTACAAGAAAGTGGAGAATACAGTTCTGCCCAAGCCAGACCTGCCTAA
					AACATCTGGAAAGGTTGAGCTGCTGCCTAAGGTGCACATATACCAGAAGGACCTATTCCCTACAGAGACATCCAATGGC
					TCCCCAGGCCACCTGGACTTGGTAGAGGGGTCTCTCCTGCAGGGCACTGAAGGTGCTATCAAGTGGAATGAGGCTAAT
					AGACCTGGGAAGGTGCCATTTCTGAGGGTGGCCACAGAGAGCTCAGCTAAGACACCCAGCAAGCTGCTTGATCCCCTG
					GCCTGGGACAATCACTATGGAACCCAGATTCCTAAGGAGGAGTGGAAGTCCCAGGAGAAGTCCCCAGAGAAGACTGCT
					TTCAAGAAGAAGGACACTATCCTCTCCCTGAATGCCTGTGAGTCTAACCATGCTATTGCTGCCATCAATGAAGGCCAGAA
					CAAGCCTGAAATTGAGGTGACATGGGCCAAGCAGGGCAGAACAGAGAGGCTGTGCAGCCAGAACCCACCTGTGCTCA
					AGAGGCACCAGAGAGAGATCACTAGAACCACTCTGCAGTCAGACCAGGAAGAGATTGACTATGATGACACCATCTCAG
					TTGAGATGAAAAAGGAGGATTTTGATATTTATGATGAGGATGAGAATCAATCCCCAAGATCTTTTCAGAAGAAGACAAG
					ACATTACTTCATTGCTGCAGTGGAGAGACTGTGGGATTATGGCATGTCTCCTCACCTCATGTGCTGAGAAATAGAGCCC
					AGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAAAAAGTGGTGTTTCAGGAGTTCACAGATGGTTCCTTCACACAGCCCCTGTACAGG
					GGTGAGCTGAATGAGCACCTGGGGTTGCTGGGCCCCTACATCAGAGCTGAAGTTGAGGATAATATTATGGTGACCTTC
					AGGAATCAGGCCAGTAGGCCTTACTCTTTCTACTCCAGCCTGATCTCATATGAGGAGGACCAGAGACAGGGGGCTGAAC
					CTAGGAAGAATTTTGTGAAGCCCAATGAAACAAAGACATACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCTCCTACCAAGGA

[0218]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

					TGAATTTGATTGCAAGGCTTGGGCCTATTTTTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCATTCTGGCCTCATTGGCCCTC
					TCTTGGTGTGTCACACCAATACCTTGAATCCAGCCCATGGCAGACAGGTGACTGTTCAGGAGTTTGCTCTGTTTTTCACC
					ATCTTTGATGAGACAAAGTCCTGGTATTTTACAGAGAATATGGAGAGGAATTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGG
					AAGACCCAACCTTCAAGGAGAACTACAGATTCCATGCAATCAATGGATATATCATGGACACCCTGCCTGGCCTGGTTAT
					GGCTCAGGATCAGAGAATCAGGTGGTATCTGCTGTCTATGGGGTCAAATGAGAACATCCATAGTATCCACTTCTCTGGC
					CATGTGTTTACAGTGAGAAAGAAGGAAGAATATAAGATGGCCCTGTACAACCTCTACCCTGGAGTGTTTGAAACTGTTG
					AAATGCCTGCCTTCAAAGGCTGGAATCTGGAGGGTGGAATGCCTGATTGGAGAGCACCTTCATGCTGGCATGTCCACCCT
					GTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTCAGACTCCTCTGGGTATGGCTTCAGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCT
					CAGGACAGTATGGACAGTGGGCTCCCAAACTGGCAAGGCTCCACTACTCAGGCAGCATTAATGCCTGGTCCACCAAAG
					AGCCTTTCAGCTGGATTAAGGTGGATCTCCTGGCACCTATGATCATCCATGGGATCAAGACTCAGGGAGCTAGGCAGAA
					GTTTAGCAGCCTGTACATTTCTCAGTTTATCATTATGTACAGCCTGGATGGAAAAAAGTGGCAGACCTATAGAGGAAACT
					CCACTGGAACACTGATGGTGTTTTTTGGCAATGTGGACTCAAGTGGGATCAAGCACAATATCTTCAACCCCCCTATCATT
					GCCAGATACATCAGGCTCCACCCTACACACTACTCTATCAGATCTACACTTAGGATGGAGCTGATGGGATGTGATCTGAA
					CTCTTGCAGTATGCCTCTGGGTATGGAGTCCAAGGCCATCTCTGATGCTCAGATCACAGCCAGCTCTTACTTTACTAATAT
					GTTTGCTACCTGGTCCCCAAGCAAGGCAAGACTGCACCTGCAGGGCAGATCCAATGCTTGGAGACCCCAGGTGAATAAC
					CCAAAAGAGTGGCTTCAGGTGGACTTCCAGAAGACTATGAAGGTGACTGGAGTGACCACCCAGGGGGTGAAGTCACTG
					CTGACCTCCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGATCTCCAGCTCCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGG
					AAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGAAACCAGGACTCCTTTACCCCTGTGGTGAACTCCCTGGACCCCCCACTGCTGACCAGA
					TACCTGAGAATCCATCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTTAGGATGGAGGTGCTGGGATGTGAAGCCCAGGAC
					CTGTACTAA
优化的无 CpG 人 hFVIII 226 变体 COOL	5013	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726380	0	395	ATGCAAATTGAGTTAAGTACCTGTTTTTTCCTGTGCCTGTTGAGATTTTGCTTCTCTGCTACCAGAAGGTATTACCTGGGA
					GCTGTGGGAGCTGTCATGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTCCCTGTTGATGCTAGGTTTCCCCCTAGGGTGC
					CAAAGTCCTTTCCTTTAACACCTCAGTGGTGTACAAGAAGACACTGTTTGTGGAGTTTACTGACCACCTCTTCAATATTG
					CTAAGCCAAGACCCCCTTGGATGGGTCTCTTGGGCCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTGATTACCCTC
					AAGAATATGGCTTCTCATCCTGTTAGTCTGCATGCAGTAGGGGTCAGCTATTGGAAGGCCAGTGAAGGAGCTGAGTAT
					GATGACCAGAGCCAGAGAGAAAGAAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGATCACACACCTATGTGTGGCAGGT
					GTTGAAGGAAAATGGACCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACTTACTCCTACCTGTCTCATGTGGACCTGGTCAAAG
					ATCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCACTGTTGGTGTGCAGAGAAGGGTCTCTTGCCAAGGAGAAGACTCAGACCCTGC
					ACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAAGGCAAGTCTTGGCATTCTGAGACTAAGAACAGCCTGATGCAAGAT
					AGAGATGCTGCATCTGCCAGGGCCTGGCCTAAGATGCACACTGTGAATGGATATGTGAATAGGTCCTTGCCTGGCCTGA
					TTGGATGCCATAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTTCACTCTATTTTTCTGGAG
					GGCCATACTTCCTTGTGAGGAATCATAGACAGGCCTCTCTGGAGATTAGCCCTATTACATTTCTGACTGCTCAGACCCTC
					CTCATGGACTTGGGGCAGTTTCTGTTATTCTGCCACATCAGCAGCCATCAACATGATGGTATGGAAGCCTATGTCAAAGT
					GGATAGCTGCCCTGAAGAACCACAGCTTAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCAGAGGACTATGATGATATCTGACTG
					ATTCTGAAATGGATGTGGTGAGATTTGATGATGATAATAGCCCTTCCTTTATCCAGATCAGGTCAGTGGCCAAGAAGCA
					CCCAAGACCTGGGTGCATTATATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCTCTGGTGCTGGCCCCTGATGAT

[0219]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				AGAAGCTATAAGTCTCAATACTTGAATAATGGCCCACAGAGGATTGGGAGAAAGTACAAAAAGGTGAGATTTATGGCC
				TACACTGATGAGACTTTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCATGAATCAGGCATTTTGGGTCCCCTGCTGTATGGAGAGG
				TGGGGGATACCCTGCTGATCATCTTTAAGAACCAGGCCAGCAGACCTTACAACATTTACCCTCATGGGATCACAGATGT
				GAGGCCACTCTACTCTAGGAGATTGCCCAAGGGAGTCAAGCATCTTAAGGACTTTCCAATCCTGCCTGGGGAGATCTTC
				AAGTACAAATGGACAGTGACAGTTGAGGATGGACCTACTAAGAGTGACCCCAGGTGTCTGACCAGATATTACTCTAGCT
				TTGTCAATATGGAAAGAGACCTGGCTTCAGGCTTGATAGGCCCTCTTCTCATCTGCTACAAAGAGTCTGTGGACCAGAG
				AGGAAATCAGATTATGTCTGACAAGAGAAATGTTATTCTGTTTTCAGTCTTTGATGAGAACAGAAGTTGGTACTTGACAG
				AGAACATTCAGAGATTTCTGCCTAACCCTGCAGGAGTGCAGCTTGAGGACCCTGAGTTTCAGGCTTCCAATATCATGCAT
				TCTATCAATGGCTATGTGTTTGATAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTTGCCTATTGGTACATCCTGTCTATT
				GGGGCCCAAACTGATTTCTTGTCTGTGTTTTTCAGTGGATATACCTTTAAGCATAAGATGGTGTATGAAGATACCTTGAC
				ACTTTTCCCTTTCTCAGGAGAGACTGTCTTCATGTCTATGGAGAACCCTGGACTGTGGATCCTGGGATGCCACAACTCAG
				ACTTCAGAAACAGGGGTATGACAGCTCTGCTTAAGGTCTCCTCATGTGACAAAAATACAGGAGACTACTATGAAGATTC
				CTATGAGGACATCTCTGCTTACCTGCTCAGCAAAAACAATGCCATTGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAATTCCAGACATC
				CCAGTACTAGGCAGAAGCAGTTTAATGCCACCACCATCCCAGAAAATGACATTGAGAAGACAGACCCTTGGTTTGCCCA
				TAGAACCCCAATGCCCCAAGATTCAGAATGTGAGCAGCTCAGACTTGCTGATGCTGCTGAGGCAGTCTCCTACTCCCCATG
				GCCTGTCCCTCTCAGATCTGCAGGAAGCCAAGTATGAGACATTTTCTGATGACCCCTCCCCAGGGGCTATTGACAGTAAC
				AACAGCCTGTCTGAAATGACCCACTTCAGACCTCAGCTCCACCACAGTGGGGATATGGTGTTTACCCCAGAGTCAGGCC
				TGCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGGAACCACAGCTGCCACAGAACTGAAGAAGCTGGATTTCAAGGTGAGCTCTA
				CTTCAAATAATCTGATTTCCACTATCCCATCTGACAATTTGGCAGCTGGCACTGACAATACAAGCTCTCTGGGCCCACCTA
				GCATGCCAGTGCATTATGACAGCCAGTTGGACACCACTCTTTTTGGAAAGAAATCCAGTCCCCTGACAGAGTCAGGAGG
				ACCCCTTTCTCTGTCTGAGGAGAACAATGATAGTAAGCTTCTGGAGTCAGGCTTGATGAACTCCCAGGAGAGTTCTTGG
				GGCAAGAATGTGAGCTCTAGGGAGATCACCAGAACCACTCTGCAGTCTGACCAAGAAGAGATTGATTATGATGACACT
				ATCTCTGTTGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGATATCTATGATGAGGATGAGAACCAGTCTCCAAGAAGTTTCCAGAAGA
				AGACCAGGCACTACTTTATTGCTGCTGTGGAGAGACTGTGGGACTATGGAATGTCCTCCTCCCCTCATGTCCTGAGAAAT
				AGAGCTCAGTCAGGATCAGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAATTCACAGATGGGAAGTTTTACCCAGCCAC
				TGTATAGAGGTGAACTGAATGAACATCTGGGTCTGCTGGGGCCCTATATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAATATTATGG
				TGACCTTTAGAAACCAGGCCTCAAGGCCCTACAGCTTCTACTCTTCCCTCATTTCATATGAGGAAGACCAGAGACAGGGA
				GCAGAGCCTAGAAAGAACTTTGTCAAGCCCAATGAAACCAAAACCTATTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCACCCA
				CCAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCCTATTTCTCAGATGTGGATCTGGAGAAGGATGTCCATTCAGGTCTGAT
				TGGACCACTCCTGGTGTGCCACACCAACACACTGAATCCAGCTCATGGCAGACAGGTGACAGTCCAGGAGTTTGCCCTG
				TTTTTCACTATTTTTGATGAGACCAAGAGCTGGTATTTTACAGAGAATATGGAAAGAAACTGCAGAGCCCCCTTGTAATAT
				CCAGATGGAGGACCCAACCTTTAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATTATGGATACCCTGCCTGGC
				CTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGGATCAGGTGGTATCTGCTGTCAATGGGCTCCAATGAGAACATTCATAGTATTCACT
				TTTCAGGACATGTGTTCACAGTGAGAAAGAAGGAGGAGTATAAGATGGCCCTCTATAATCTCTACCCAGGGGTGTTTGA
				GACAGTTGAGATGCTGCCATCTAAGGCAGGCATCTGGAGAGTGGAATGCCTCATTGGAGAGCACCTGCATGCTGGCAT
				GTCCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAATGTCAGACCCCTCTTGGTATGGCCTCTGGCCACATTAGGGATTTCCAGAT

[0220]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

具有 F309S 突变的无 CpG 人 hFVIII 226 变体：优化的COOL	5013	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726380	0	396	TACTGCCAGTGGTCAGTATGGGCAGTGGGCCCCTAAGCTGGCCAGACTGCACTATTCTGGGAGCATCAATGCCTGGTCC ACCAAGGAACCTTTTTCTTGGATTAAAGTGGATCTGCTGGCCCCAATGATCATCCATGGGATCAAGACCCAGGGAGCTA GGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATTAGTCAGTTCATCATTATGTACAGTCTGGATGGCAAAAAGTGGCAGACATACAG GGGCAATTCCACTGGAACCCTGATGGTGTTCTTTGGAAATGTGGATAGCAGTGGTATCAAGCACAACATTTTCAACCCTC CCATCATTGCCAGGTACATCAGACTGCATCCAACCCACTACAGCATTAGGAGCACCCTTAGGATGGAGCTCATGGGGTG TGACCTGAACTCTTGCTCTATGCCACTTGGAATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATTACTGCTAGTTCCTACT TCACCAATATGTTTGCCACCTGGTCACCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGAAGGTCCAATGCTTGGAGGCCTCA GGTGAACAATCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACTATGAAGGTGACAGGAGTGACCACTCAGGGAG TGAAGAGCCTGCTGACCTCCATGTATGTGAAGGAGTTTCTGATCTCCAGCTCCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTT CTTTCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTTCAGGGGAATCAGGACTCCTTCACCCCAGTGGTGAATTCCCTGGATCCCCCT CTGCTGACCAGATACCTGAGAATCCACCCCCAGTCTTGGGTGCACCAGATTGCCCTTAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTG AGGCCCAGGACCTGTACTGA
					ATGCAAATTGAGTTAAGTACCTGTTTTTTCCTGTGCCTGTTGAGATTTTGCTTCTCTGCTACCAGAAGGTATTACCTGGGA GCTGTGGAGCTGTCATGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTCCCTGTTGATGCTAGGTTTCCCCCTAGGGTGC CAAAGTCCTTTCCTTTTAACACCTCAGTGGTGTACAAGAAGACACTGTTTGTGGAGTTTACTGACCACCTCTTCAATATTG CTAAGCCAAGACCCCCTTGGATGGGTCTCTTGGGCCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTGATTACCCTC AAGAATATGGCTTCTCATCCTGTTAGTCTGCATGCAGTAGGGGGTCAGCTATTGGAAGGCCAGTGAAGGAGCTGAGTAT GATGACCAGACCAGCCAGAGAGAAAGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGATCACACACCTATGTGTGGCAGGT GTTGAAGGAAAATGGACCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACTTACTCCTACCTGTCTCATGTGGACCTGGTCAAAG ATCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCACTGTTGGTGTGCAGAGAAGGGTCTCTTGCCAAGGAGAAGACTCAGACCCTGC ACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAAGGCAAGTCTTGGCATTCTGAGACTAAGAACAGCCTGATGCAAGAT AGAGATGCTGCATCTGCCAGGGCCTGGCCTAAGATGCACACTGTGAATGGATATGTGAATAGGTCCTTGCCTGGCCTGA TTGGATGCCATAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTTCACTCTATTTTTCTGGAG GGCCATACTTTCCTTGTGAGGAATCATAGACAGGCCTCTCTGGAGATTAGCCCTATTACATTTCTGACTGCTCAGACCCTC CTCATGGACTTGGGGCAGTTTCTGTTAAGCTGCCACATCAGCAGCCATCAACATGATGGTATGGAAGCCTATGTCAAAG TGGATAGCTGCCCTGAAGAACCACAGCTTAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCAGAGGACTATGATGATCTGACTG ATTCTGAAATGGATGTGGTGAGATTTGATGATAATGCCCCTTCCTTTATCCAGATCAGGTCAGTGGCCAAGAAGCA CCCAAAGACCTGGGTGCATTATATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCTCTGGTGCTGGCCCCTGATGAT AGAAGCTATAAGTCTCAATACTTGAATAATGGCCCACAGAGGATTGGGAGAAAGTACAAAAAGGTGAGATTTATGGCC TACACTGATGAGACTTTCAAGACCCAGAGAGGCCATCCAGCATGAATCAGGCATTTTGGGTCCCCTGCTGTATGGAGAGG TGGGGGATACCCTGCTGATCATCTTTAAGAACCAGGCCAGCAGACCTTACAACATTTACCCTCATGGGATCACAGATGT GAGGCCACTCTACTCTAGGAGATTGCCCAAGGGAGTCAAGCATCTTAAGGACTTTCCAATCCTGCCTGGGGAGATCTTC AAGTACAAATGGACAGTGACAGTTGAGGATGGACCTACTAAGAGTGACCCCAGGTGTCTGACCAGATATTACTCTAGCT TTGTCAATATGGAAAGAGACCTGGCTTCAGGCTTGATAGGCCCTCTTCTCATCTGCTACAAAGAGTCTGTGGACCAGAG AGGAAATCAGATTATGTCTGACAAGAGAAATGTTATTCTGTTTTCAGTCTTTGATGAGAACAGAAGTTGGTACTTGACAG AGAACATTCAGAGATTTCTGCCTAACCCTGCAGGAGTGCAGCTTGAGGACCCTGAGTTTCAGGCTTCCAATATCATGCAT

[0221]

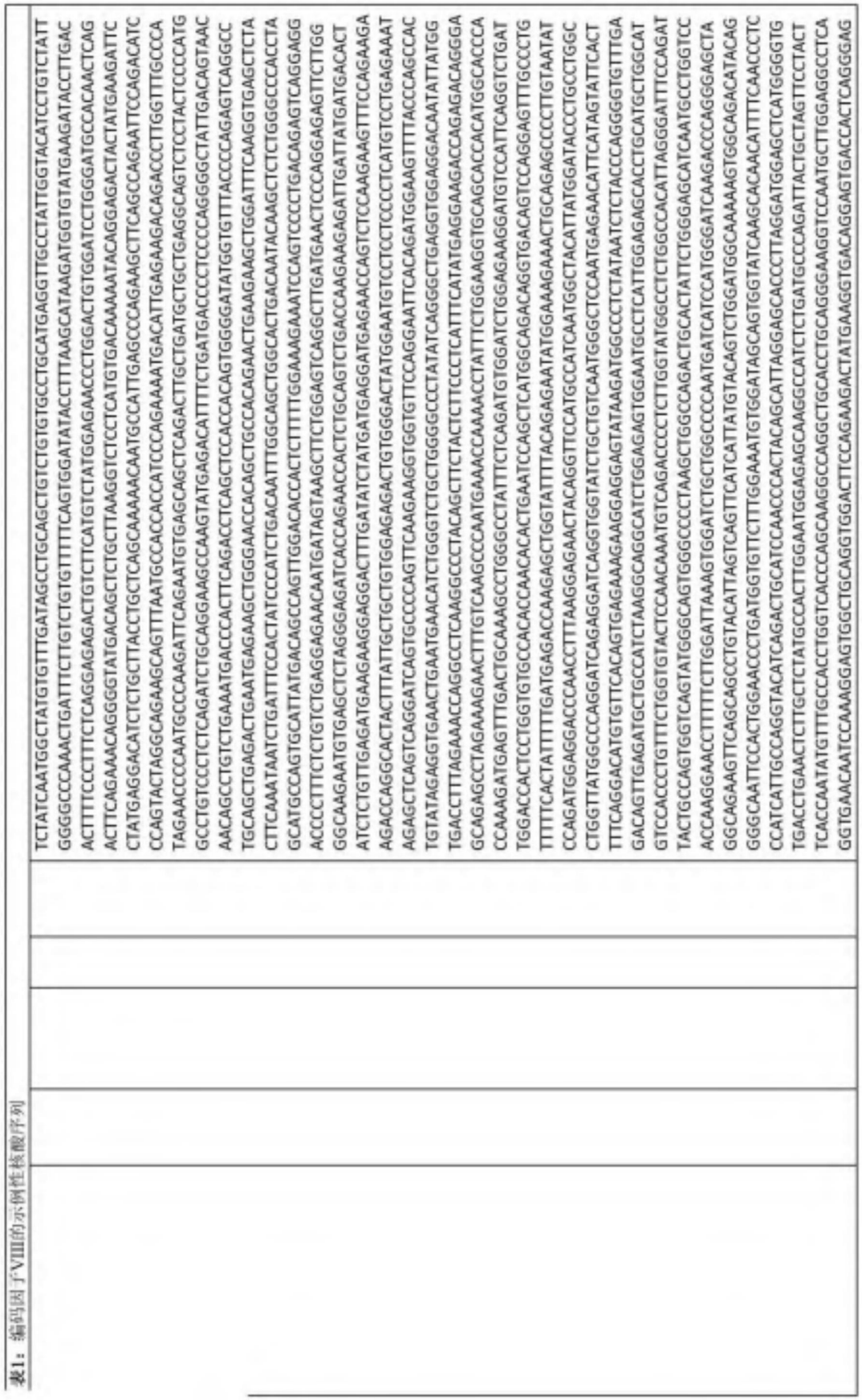


表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

				TCTATCAATGGCTATGTGTTTGATAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTTGCCTATTGGTACATCCTGTCTATT
				GGGGGCCCAAACTGATTTCTTGTCTGTGTTTTTCAGTGGATATACCTTTAAGCATAAGATGGTGTATGAAGATACCTTGAC
				ACTTTTCCCTTTCTCAGGAGAGACTGTCTTCATGTCTATGGAGAACCCTGGACTGTGGGATGCCACAACTCAG
				ACTTCAGAAACAGGGGTATGACAGCTCTGCTTAAGGTCTCCTCATGTGACAAAAATACAGGAGACTACTATGAAGATTC
				CTATGAGGACATCTCTGCTTACCTGCTCAGCAAAAACAATGCCATTGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAATTCCAGACATC
				CCAGTACTAGGCAGAAGCAGTTTAATGCCACCACCATCCCAGAAAATGACATTGAGAAGACAGACCCTTGGTTTGCCCA
				TAGAACCCCAATGCCCAAGATTCAGAATGTGAGCAGCTCAGACTTGCTGATGCTGCTGAGGCAGTCTCCTACTCCCCATG
				GCCTGTCCCTCTCAGATCTGCAGGAAGCCAAGTATGAGACATTTTCTGATGACCCCTCCCCAGGGGCTATTGACAGTAAC
				AACAGCCTGTCTGAAATGACCCACTTCAGACCTCCACCACAGTGGGGATATGGTGTTTACCCCAGAGTCAGGCC
				TGCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGAACCACAGCTGCCACAGAACTGAAGAAGCTGGATTTCAAGGTGAGCTCTA
				CTTCAAATAATCTGATTTCCACTATCCCATCTGACAATTTGGCAGCTGGCACTGACAATACAAGCTCTCTGGGCCCACCTA
				GCATGCCAGTGCATTATGACAGCCAGTTGGACACCACTCTTTTTGGAAAGAAATCCAGTCCCCTGACAGAGTCAGGAGG
				ACCCCTTTCTCTGTCTGAGGAGAACAATGATAGTAAGCTTCTGGAGTCAGGCTTGATGAACTCCCAGGAGAAGTTCTTGG
				GGCAAGAATGTGAGCTCTAGGGAGATCACCAGAACCACTCTGCAGTCTGACCAAGAAGAGATTGATTATGATGACACT
				ATCTCTGTTGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGATATCTATGATGAGGATGAGAACCAGTCTCCAAGAAGTTTCCAGAAGA
				AGACCAGGCACTACTTTATTGCTGCTGTGGAGAGACTGTGGGACTATGGAATGTCCTCCTCCCCTCATGTCCTGAGAAAT
				AGAGCTCAGTCAGGATCAGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAATTCACAGATGGAAGTTTTACCCAGCCAC
				TGTATAGAGGTGAACTGAATGAACATCTGGGTCTGCTGGGGCCCTATATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAATATTATGG
				TGACCTTTAGAAACCAGGCCTCAAGGCCCTACAGCTTCTACTCTTCCCTCATTTCATATGAGGAAGACCAGAGACAGGGA
				GCAGAGCCTAGAAAGAACTTTGTCAAGCCCAATGAAACCAAAACCTATTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCACCCA
				CCAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCCTATTTCTCAGATGTGGATCTGGAGAAGGATGTCCATTCAGGTCTGAT
				TGGACCACTCCTGGTGTGCCACACCAACACACTGAATCCAGCTCATGGCAGACAGGTGACAGTCCAGGAGTTTGCCCTG
				TTTTTCACTATTTTTGATGAGACCAAGAGCTGGTATTTTACAGAGAATATGGAAAGAAACTGCAGAGCCCCTTGTAATAT
				CCAGATGGAGGACCCAACCTTTAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATTATGGATACCCTGCCTGGC
				CTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGGATCAGGTGGTATCTGCTGTCAATGGGCTCCAATGAGAACATTCATAGTATTCACT
				TTTCAGGACATGTGTTCACAGTGAGAAAGAAGGAGGAGTATAAGATGGCCCTCTATAATCTCTACCCAGGGGGTGTTTGA
				GACAGTTGAGATGCTGCCATCTAAGGCAGGCATCTGGAGAGTGGAATGCCTCATTGGAGAGCACCTGCATGCTGGCAT
				GTCCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAATGTCAGACCCCTCTTGGTATGGCCTCTGGCCACATTAGGGATTTCCAGAT
				TACTGCCAGTGGTCAGTATGGGCAGTGGGCCCCTAAGCTGGCCAGACTGCACTATTCTGTGGGAGCATCAATGCCTGGTCC
				ACCAAGGAACCTTTTTCTTGGATTAAAGTGGATCTGCTGGCCCCAATGATCATCCATGGGATCAAGACCCAGGGAGCTA
				GGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATTAGTCAGTTCATCATTATGTACAGTCTGGATGGCAAAAAGTGGCAGACATACAG
				GGGCAATTCCACTGGAACCCTGATGGTGTTCTTTGGAAATGTGGATAGCAGTGGTATCAAGCACAACATTTTCAACCCTC
				CCATCATTGCCAGGTACATCAGACTGCATCCAACCCACTACAGCATTAGGAGCACCCTTAGGATGGAAGCTCATGGGGTG
				TGACCTGAACTCTTGCTCTATGCCACTTGGAATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATTACTGCTAGTTCCTACT
				TCACCAATATGTTTGCCACCTGGTCACCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGAAGGTCCAATGCTTGGAGGCCTCA
				GGTGAACAATCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACTATGAAGGTGACAGGAGTGACCACTCAGGGAG

[0222]

表1：编码因子VIII的示例性核酸序列

具有 F309S 突变的无 CpG 人 hFVIII 226 变体；COOL优化的氨基酸序列				397	TGAAGAGCCTGCTGACCTCCATGTATGTGAAGGAGTTTCTGATCTCCAGCTCCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTT CTTTCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTTCAGGGGAATCAGGACTCCTTCACCCCAGTGGTGAATTCCCTGGATCCCCCT CTGCTGACCAGATACCTGAGAATCCACCCCCAGTCTTGGGTGCACCAGATTGCCCTTAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTG AGGCCCAGGACCTGTACTGA MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRP PWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENG PMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEED WDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYP HGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQR GNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQ TDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA YLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAK YETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAA GTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSREITRTTLQSDQE EIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSF TQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAP TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQM EDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEML PSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWI KVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYS IRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKT MKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIAL RMEVLGCEAQDLY-

[0223] (iii)FVIII治疗蛋白及其用于治疗血友病A的用途

[0224] 本文所述的ceDNA载体可用于递送治疗性FVIII蛋白以治疗与FVIII蛋白的不当表

达和/或FVIII蛋白内的突变相关的血友病A。

[0225] 如本文所述的ceDNA载体能够用于表达任何所期望的FVIII治疗蛋白。示例性治疗性FVIII治疗蛋白包括但不限于由本文表1中所列的序列表达的任何FVIII蛋白。

[0226] 在一个实施方案中，表达的FVIII治疗蛋白对于治疗血友病A是有功能的。在一些实施方案中，FVIII治疗蛋白不引起免疫系统反应。

[0227] 在另一个实施方案中，编码FVIII治疗蛋白或其片段(例如，功能片段)的ceDNA载体可用于产生嵌合蛋白。因此，本文特别考虑可将表达嵌合蛋白的ceDNA载体施用于例如任何一种或多种选自以下的组织：肝、肾、胆囊、前列腺、肾上腺。在一些实施方案中，当将表达FVIII的ceDNA载体施用于婴儿或施用于子宫内的受试者时，可以将表达FVIII的ceDNA载体施用于选自以下的任何一种或多种组织：肝脏、肾上腺、心脏、肠、肺和胃，或其肝干细胞前体，用于体内或体外治疗血友病A。

[0228] 血友病：

[0229] 血友病A是凝结因子VIII的遗传缺陷，会导致出血增加，通常影响男性。在大多数情况下，它是作为X连锁隐性性状遗传的，但也有一些情况是由自发突变引起的。就血友病A的症状而言，有内部或外部出血事件。血友病更严重的个体会出现更严重和更频繁的出血，而其他轻度血友病患者通常会出现更轻微的症状，除非在手术或严重创伤后。中度血友病患者有不同的症状，表现在严重和轻度之间的范围内。

[0230] 目前预防血友病A患者出血的治疗涉及因子VIII药物治疗。大多数重度血友病患者需要定期补充静脉内重组或血浆浓缩因子VIII。重组血液凝结因子VIII是工业制造中最复杂的蛋白质之一，因为其基因转录效率低、翻译后加工过程中其前蛋白在细胞内大量丢失，以及分泌蛋白的不稳定性。轻度血友病患者可以使用去氨加压素来控制其病情，去氨加压素是一种从血管壁释放储存的因子VIII的药物。

[0231] 关于血友病A的治疗有许多并发症。在儿童中，可以插入一个容易进入的静脉注射端口，以减少频繁的创伤性静脉插管。然而，这些端口与高感染率和在导管尖端形成凝块的风险相关，使其无用。病毒感染在血友病患者中很常见，因为频繁输血使患者面临血液传播感染的风险，例如HIV、乙型肝炎和丙型肝炎。朊病毒感染也可以通过输血传播。血友病A的另一个治疗并发症是由于频繁输注而产生针对因子VIII的抑制剂抗体。这些随着身体将输注的因子VIII识别为外来物而发展，因为身体不会产生自己的副本。在这些个体中，活化的因子VII(凝血级联中因子VIII的前体)可作为用于治疗血友病个体的出血和针对替代因子VIII的抗体输注。

[0232] 凝血级联

[0233] 凝血，也称为凝结，是血液从液体变为凝胶，形成血液凝块的过程。它可能导致止血，即停止受损血管的失血，然后进行修复。凝血机制涉及血小板的活化、粘附和聚集以及纤维蛋白的沉积和成熟。凝血障碍是可导致出血(出血或瘀伤)或阻塞性凝结(血栓形成)的疾病状态。

[0234] 在血管的损伤损坏血管内衬的内皮后，凝血几乎立即开始。血液暴露于内皮下空间引发两个过程：血小板的变化，以及内皮下组织因子暴露于血浆因子VII，最终导致纤维蛋白形成。血小板立即在受伤部位形成栓塞；这称为初级止血。继发性止血同时发生：除因子VII(包括因子VIII)之外的另外凝血因子或凝结因子以复杂的级联反应形成纤维蛋白

链,从而加强了血小板栓塞。

[0235] 二次止血的凝血级联有两条导致纤维蛋白形成的初始途径。这些是接触激活途径(也称为内源性途径)和组织因子途径(也称为外源性途径),它们都导致产生纤维蛋白的相同基本反应。启动凝血的主要途径是组织因子(外源性)途径。该途径是一系列反应,其中丝氨酸蛋白酶的酶原(无活性酶前体)及其糖蛋白辅因子被激活成为活性成分,然后该活性成分催化级联中的下一个反应,最终产生交联的纤维蛋白。凝血因子通常用罗马数字表示,附加小写字母a表示活性形式。

[0236] 凝血因子通常是丝氨酸蛋白酶(酶),它通过切割下游蛋白质起作用。例外是组织因子、FV、FVIII、FXIII。组织因子、FV和FVIII是糖蛋白,而因子XIII是转谷氨酰胺酶。凝血因子作为无活性的酶原循环。因此,凝血级联通常分为三个途径。组织因子和接触激活途径都激活因子X、凝血酶和纤维蛋白的"最终共同途径"。

[0237] 组织因子(外源性)途径的主要作用是产生"凝血酶爆发",通过该过程,凝血酶(就其反馈激活作用而言是凝血级联的最重要组成)被非常迅速地释放。FVIIa的循环量高于任何其他活化凝血因子。该过程包括以下步骤:

[0238] 步骤1:在血管受损后,FVII离开循环并与在携带组织因子的细胞(基质成纤维细胞和白细胞)上表达的组织因子(TF)接触,形成活化复合物(TF-FVIIa)。

[0239] 步骤2:TF-FVIIa激活FIX和FX。

[0240] 步骤3:FVII本身被凝血酶、FXIa、FXII和FXa激活。

[0241] 步骤4:TF-FVIIa激活FX(形成FXa)几乎立即被组织因子途径抑制剂(TFPI)抑制。

[0242] 步骤5:FXa及其辅因子FVa形成凝血酶原酶复合物,将凝血酶原激活为凝血酶。

[0243] 步骤6:然后凝血酶激活凝血级联的其他成分,包括FV和FVIII(与FIX形成复合物),并激活和释放FVIII,使其免于与血管性血友病因子(vWF)结合。

[0244] 步骤7:FVIIIa是FIXa的辅因子,它们一起形成"酶(tenase)"复合物,激活FX;如此循环下去。

[0245] 接触激活(内源性)途径始于通过高分子量激肽原(HMWK)、前激肽释放酶和FXII(哈格曼因子)在胶原蛋白上形成初级复合物。前激肽释放酶转化为激肽释放酶,FXII变为FXIIa。FXIIa将FXI转化为FXIa。因子XIa激活FIX,FIX与其辅因子FVIIIa形成酶复合物,将FX激活为FXa。FXII、HMWK和前激肽释放酶严重缺乏的患者没有出血性疾病,这一事实可以说明接触激活途径在启动凝块形成方面的次要作用。相反,接触激活系统更多地参与炎症和先天免疫。

[0246] 内源性和外源性凝血途径共有的最终共同途径涉及凝血酶原转化为凝血酶和纤维蛋白原转化为纤维蛋白。凝血酶具有多种功能,不仅将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,而且是止血栓子的构成要素。此外,它是最重要的血小板激活剂,除此之外,它还激活因子VIII和V及其抑制蛋白C(在血栓调节蛋白存在的情况下),并激活因子XIII,因子XIII形成交联纤维蛋白聚合物的共价键,纤维蛋白聚合物由活化单体形成。

[0247] 在接触因子或组织因子途径激活后,凝血级联通过FVIII和FIX的持续激活而维持在促血栓形成状态,以形成酶复合物,直到它通过抗凝剂路径下调。该方法包括向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含编码本文所述的FVIII治疗蛋白或其片段(例如,功能片段)的ceDNA载体。如熟练的从业者将了解,术语"有效量"是指ceDNA组合物的施用量,引

起蛋白以治疗疾病的“治疗有效量”表达。

[0248] 包含编码FVIII治疗性蛋白质或其片段(例如,功能片段)的ceDNA载体的组合物的剂量范围取决于效力(例如,启动子的效率),并且包括足以产生所需效果的量,例如,表达所需的FVIII治疗蛋白,用于治疗苯丙酮尿症(血友病A)。剂量不应大到引起不可接受的副作用。通常,剂量将随ceDNA载体的特定特征、表达效率以及随患者的年龄、病状和性别而变化。剂量可以由本领域技术人员确定,并且与传统的AAV载体不同,在任何并发症的情况下,也可以由个别医师来调节,因为ceDNA载体不包含阻止重复给药的免疫活化衣壳蛋白。

[0249] 可以在有限的时间段内重复施用本文所述的ceDNA组合物。在一些实施方案中,定期或通过脉冲施用进行给药。在一个优选的实施方案中,上述剂量被施用数月。治疗持续时间视受试者的临床进展和对治疗的应答而定。预期随着时间的推移加强治疗。此外,表达水平可以随着受试者的成长而滴定。

[0250] FVIII治疗蛋白可以在受试者中表达至少1周、至少2周、至少1个月、至少2个月、至少6个月、至少12个月/一年、至少2年、至少至少5年,至少10年,至少15年,至少20年,至少30年,至少40年,至少50年或更长。通过在预定或期望的间隔时间反复施用本文所述的ceDNA载体能够达成长期表达。

[0251] 如本文所用,术语“治疗有效量”是足以在疾病生物标志物的表达中产生统计学显着的、可测量的变化或给定疾病症状的减少的表达的FVIII治疗蛋白或其功能片段的量(请参见下面的“功效测量”)。指定的ceDNA载体组合物的此类有效量能够在临床试验以及动物研究中加以调整。

[0252] 需要施用的ceDNA载体的精确量取决于从业者的判断并且因个体而异。合适的施用方案也是可变的,但以初始施用为代表,随后通过后续注射或其他施用以一个或多个间隔重复给药。或者,考虑持续静脉内输注足以将血液中的浓度维持在体内治疗规定的范围内,特别是用于治疗急性疾病/病症。

[0253] 可用于本文所述的方法和组合物的药剂能够通过体表、静脉内(通过推注或连续输注)、细胞内注射、组织内注射、口服、通过吸入、腹膜内、皮下、腔内施用,并且必要时能够通过蠕动方式或通过所属领域的技术人员已知的其它方式递送。如果需要,可以全身施用该药剂。它也可以在子宫内施用。

[0254] 对血友病A的给定治疗的功效可由熟练的临床医生确定。然而,在用编码FVIII或其功能片段的ceDNA载体治疗之后,如果疾病或病症的任一种或所有征象或症状以有益方式改变或临床上接受的其它症状或疾病标志物改良或改善例如至少10%,则治疗在所述术语在本文使用时被视为“有效治疗”。还可以根据个体未发生恶化来测量功效,如通过疾病的稳定或对医疗干预的需求(即,疾病的进展停止或至少减缓)所评估。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或描述于本文中。治疗包括对个体或动物(一些非限制性实施例包括人或哺乳动物)的疾病的任何治疗,并且包括:(1)抑制(例如遏制)疾病或减缓疾病或病症的进展;或(2)缓解疾病,例如引起症状消退;以及(3)阻止或减小疾病发展的可能性,或预防与疾病相关的继发疾病/病症(诸如肝脏或肾脏衰竭)。治疗疾病的有效量是指当施用于有需要的哺乳动物时足以产生对该疾病有效治疗的量,所述术语如本文所定义。

[0255] 可以通过评估血友病A特有的物理指标来确定药剂的功效。分析血友病A指标的标准方法是本领域已知的。

[0256] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体还能够编码能够结合从ceDNA表达的FVIII蛋白使用的辅因子或其它多肽、有义或反义寡核苷酸，或RNA(编码或非编码；例如siRNA、shRNA、微RNA，和其反义对应物(例如拮抗MiR))。另外，包含编码FVIII蛋白的序列的表达盒还能够包括外源序列，所述外源序列编码用于实验或诊断目的的报告蛋白，例如β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和所属领域中众所周知的其它蛋白。

[0257] 在一个实施方案中，ceDNA载体包含表达FVIII蛋白的核酸序列，所述FVIII蛋白对血友病A的治疗起作用。在优选实施方案中，治疗性FVIII蛋白不引起免疫系统反应，除非如此需要。

[0258] III.通常用于产生FVIII治疗蛋白的ceDNA载体

[0259] 本发明的实施方案是基于包含闭合端线性双链(ceDNA)载体的方法和组合物，所述载体能够表达FVIII转基因。在一些实施方案中，转基因是编码FVIII蛋白的序列。本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体不受大小限制，从而允许例如表达从单个载体表达转基因所需的所有组分。用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体优选地是双链体，例如相对于分子的至少一部分是自互补的，例如表达盒(例如，ceDNA不是双链环状分子)。ceDNA载体具有共价封闭端，因此抵抗核酸外切酶(例如，核酸外切酶I或核酸外切酶III)消化，例如在37℃下超过一个小时。

[0260] 一般来说，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体在5'至3'方向上包含：第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如，如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR。ITR序列选自以下中的任一个：(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复(mod-ITR)(例如经修饰的不对称ITR)；(ii)两个经修饰的ITR，其中mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组构(例如经修饰的不对称ITR)；或(iii)对称或基本对称的WT-WT ITR对，其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组构；或(iv)对称或基本对称修饰的ITR对，其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组构。

[0261] 本文中涵盖了包含用于FVIII蛋白产生的ceDNA载体的方法和组合物，其可以进一步包括递送系统，例如(但不限于)脂质体纳米颗粒递送系统。本文公开了预期使用的非限制示范性脂质体纳米颗粒系统。在一些方面中，本公开提供了包含ceDNA和可电离脂质的脂质纳米颗粒。举例来说，2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开了脂质纳米颗粒配制物，所述配制物经制备并且装载通过所述方法获得的ceDNA载体，所述国际申请并入本文中。

[0262] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体不存在由病毒衣壳内的有限空间所强加的封装局限。与囊封的AAV基因组相反，ceDNA载体是活真核生物产生的，代表原核生物产生的质粒DNA载体的替代方案。这允许插入控制元件，例如如本文公开的调控开关、大的转基因、多个转基因等。

[0263] 图1A-1E显示了用于表达FVIII蛋白的非限制性示例性ceDNA载体或ceDNA质粒的相应序列的示意图。ceDNA载体无衣壳，并且可从按以下顺序编码的质粒中获得：第一ITR、包含转基因的表达盒和第二ITR。表达盒可以包括一种或多种允许且/或控制转基因表达的调控序列，例如其中表达盒能够按照此次序包含以下中的一个或多个：增强子/启动子、ORF报告基因(转基因)、转录后调控元件(例如WPRE)，以及聚腺苷酸化和终止信号(例如BGH

polyA)。

[0264] 表达盒还可包含内部核糖体进入位点(IRES)和/或2A元件。顺式调控元件包含但不限于:启动子、核糖开关、隔离子、mir可调控元件、转录后调控元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在一些实施方案中,ITR可以充当转基因(例如,FVIII蛋白)的启动子。在一些实施方案中,ceDNA载体包含调控转基因表达的额外组件,例如调控开关,其描述于本文中的标题为“调控开关”的章节中,用于控制和调控FVIII蛋白的表达,并且必要时能够包括作为杀灭开关的调控开关,从而能够使包含ceDNA载体的细胞实现受控的细胞死亡。

[0265] 表达盒能够包含超过4000个核苷酸、5000个核苷酸、10,000个核苷酸或20,000个核苷酸、或30,000个核苷酸、或40,000个核苷酸、或50,000个核苷酸,或在约4000-10,000个核苷酸或10,000-50,000个核苷酸之间的任何范围,或超过50,000个核苷酸。在一些实施方案中,表达盒能够包含长度在500到50,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施方案中,表达盒能够包含长度在500到75,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施方案中,表达盒能够包含长度在500到10,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施方案中,表达盒能够包含长度在1000到10,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施方案中,表达盒能够包含长度在500到5,000个核苷酸范围内的转基因。ceDNA载体不存在衣壳化AAV载体的尺寸限制,从而能够递送大尺寸表达盒以提供有效的转基因表达。在一些实施方案中,ceDNA载体缺乏原核生物特异性甲基化。

[0266] ceDNA表达盒能够包括例如所编码的蛋白质在接受的受试者中不存在、无活性或活性不充分的可表达的外源序列(例如开放阅读框架)或转基因,或所编码的蛋白质具有所期望的生物或治疗作用的基因。转基因能够编码能够用以校正缺陷基因或转录物表达的基因产物。原则上,表达盒可包括编码因突变而减少或不存在或在本公开的范围内认为过度表达时会展现治疗益处的蛋白质、多肽或RNA的任何基因。

[0267] 表达盒可包含任何转基因(例如,编码FVIII蛋白),例如用于治疗受试者的血友病A的FVIII蛋白,即治疗性FVIII蛋白。ceDNA载体能够单独或与编码多肽的核酸或非编码核酸(例如RNAi、miRs等)以及外源基因和核苷酸序列(包括受试者基因组中的病毒序列,例如HIV病毒序列等等)组合使用,以递送和表达受试者中的所关注的任何FVIII蛋白。优选地,本文所公开的ceDNA载体用于治疗目的(例如用于医学、诊断或兽医学用途)或免疫原性多肽。在某些实施方案中,ceDNA载体适用于表达受试者中的所关注的任何基因,包括一种或多种多肽、肽、核糖核酸酶、肽核酸、siRNA、RNAi、反义寡核苷酸、反义多核苷酸,或RNA(编码或非编码;例如siRNA、shRNA、微RNA,和其反义对应物(例如拮抗MiR))、抗体、融合蛋白或其任何组合。

[0268] 表达盒还能够编码多肽、有义或反义寡核苷酸,或RNA(编码或非编码;例如siRNA、shRNA、微RNA,和其反义对应物(例如拮抗MiR))。表达盒可包括编码用于实验或诊断目的的报道蛋白的外源序列,所述报道蛋白例如β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和其它本领域众所周知的报道蛋白。

[0269] 本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的表达盒、表达构建体中提供的序列能够针对靶宿主细胞进行密码子优化。如本文所用,术语“进行密码子优化”或“密码子优化”是指通过用如小鼠或人等所关注脊椎动物的基因中使用频率较高或最高的密码子替换

天然序列(例如原核序列)的至少一个、超过一个或大量密码子来修饰核酸序列以增强其在所述脊椎动物的细胞中的表达的过程。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。通常,密码子优化不会改变原始翻译蛋白质的氨基酸序列。能够使用例如Aptagen的GeneForge®密码子优化和定制基因合成平台(Aptagen公司,2190Fox Mill Rd.Suite 300,Herndon,Va.20171)或其他公开可用的确定优化密码子。在一些实施方案中,编码FVIII蛋白的核酸针对人表达进行优化,且/或是所属领域中已知的人FVIII或其功能片段。

[0270] 由本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体表达的转基因编码FVIII蛋白。用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的许多结构特征不同于基于质粒的表达载体。ceDNA载体可以具有以下特征中的一个或多个:缺乏原始(即,非插入)细菌DNA、缺乏原核复制起点、是自给式,即,它们不需要除所述两个ITR之外的任何序列,包括Rep结合和末端解链位点(RBS和TRS),和ITR之间的外源序列;存在形成发夹的ITR序列,以及缺乏细菌型DNA甲基化或实际上被哺乳动物宿主视为异常的任何其它甲基化。一般来说,本发明载体优选不含有任何原核DNA,但作为非限制性实施例,预期可以将一些原核DNA作为外源序列插入启动子或增强子区中。将ceDNA载体与质粒表达载体区分开来的另一个重要特征是,ceDNA载体是具有闭合端的单链线性DNA,而质粒始终是双链DNA。

[0271] 通过本文所提供的方法产生的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体优选具有线性连续结构,而非非连续结构,如限制酶消化分析所测定的(图4D)。相信线性和连续结构在受到细胞核酸内切酶攻击时更稳定,并且不太可能重组并引起诱变。因此,线性和连续结构的ceDNA载体是优选的实施例。连续、线性、单链的分子内双链体ceDNA载体可以具有共价结合的末端,而不具有编码AAV衣壳蛋白的序列。这些ceDNA载体在结构上不同于质粒(包含本文所描述的ceDNA质粒),所述质粒是细菌来源的环状双链体核酸分子。质粒的互补链在变性后可以分离,从而产生两个核酸分子,而与此相反,ceDNA载体虽具有互补链,却是单个DNA分子,并且因此即使变性,也仍保持是单个分子。在一些实施例中,与质粒不同,如本文所描述的ceDNA载体的产生可以没有原核类型的DNA碱基甲基化。因此,在结构方面(特别是线性对比环形)以及还根据用于产生和提纯这些不同物体的方法方面,以及还根据它们的DNA甲基化方面,即ceDNA-质粒属于原核类型而ceDNA载体属于真核类型,ceDNA载体和ceDNA质粒是不同的。

[0272] 与基于质粒的表达载体相比,使用如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体有几个优点,此类优点包括但不限于:1)质粒含有细菌DNA序列并且经历原核特异性甲基化,例如6-甲基腺苷和5-甲基胞嘧啶甲基化,而无衣壳AAV载体序列具有真核起源并且未经历原核特异性甲基化;因此,相较于质粒,无衣壳AAV载体不大可能诱导发炎和免疫应答;2)质粒在产生过程期间需要存在抗性基因,而ceDNA载体则不需要;3)环状质粒在引入细胞后并不递送到细胞核并且需要过量装载以规避细胞核酸酶的降解作用,而载体含有病毒顺式元件,即经修饰的ITR,其赋予核酸酶抗性并且可以设计成靶向并递送到细胞核。假设:ITR功能必需的最小限定元件是Rep结合位点(RBS;对于AAV2,为5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60))和末端解链位点(TRS;对于AAV2,为5'-AGTTGG-3'(SEQ ID NO:64)),加上允许发夹形成的可变回文序列;且4)ceDNA载体不具有通常在原核生物来源的质粒中发现的CpG二核苷酸过度表达,原核生物来源的质粒据报导结合铎样受体家族成员,诱发T细胞介导的免疫应答。相比之下,用本文公开的无衣壳AAV载体进行的转导可以有效地靶向难以使用各

种递送试剂用常规AAV病毒粒子转导的细胞和组织类型。

[0273] IV.反向末端重复序列(ITR)

[0274] 如本文所公开,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体含有位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的转基因或异源核酸序列,其中ITR序列可以是不对称ITR对或对称或基本上对称的ITR对,这些术语如本文所定义。如本文所公开的ceDNA载体能够包含选自以下中的任一种的ITR序列:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复(mod-ITR)(例如不对称修饰的ITR);(ii)两个经修饰的ITR,其中mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组构(例如不对称修饰的ITR),或(iii)对称或基本对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组构,或(iv)对称或基本对称修饰的ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组构,其中本公开的方法可以进一步包括递送系统,例如(但不限于)脂质体纳米颗粒递送系统。

[0275] 在一些实施方案中,ITR序列可以来自细小病毒科的病毒,细小病毒科包括两个亚科:感染脊椎动物的细小病毒亚科,和感染昆虫的浓核病毒亚科。细小病毒亚科(称为细小病毒)包含依赖病毒属,其成员在大多数情况下需要与如腺病毒或疱疹病毒的辅助病毒共同感染才能进行产生性感染。依赖病毒属包括通常感染人类(例如血清型2、3A、3B、5和6)或灵长类动物(例如血清型1和4)的腺相关病毒(AAV),以及感染其它温血动物的相关病毒(例如牛、犬、马和羊的腺相关病毒)。细小病毒和细小病毒科的其它成员大体描述于Kenneth I.Berns,《病毒学领域(FIELDS VIROLOGY)》(第3版,1996)中第69章“细小病毒科:病毒和其复制(Parvoviridae:The Viruses and Their Replication)”。

[0276] 尽管在说明书和本文的实施例中举例说明的ITR是AAV2 WT-ITR,但是本领域的普通技术人员知道如上所述,可以使用来自任何已知的细小病毒,例如如AAV的依赖病毒(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV 5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV 11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组。例如,NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261)的ITR、嵌合ITR或来自任何合成AAV的ITR。在一些实施方案中,AAV可以感染温血动物,例如禽类(AAAV)、牛(BAAV)、犬、马和绵羊腺相关病毒。在一些实施方案中,ITR来自B19细小病毒(基因库登录号:NC 000883)、来自小鼠的细小病毒(MVM)(基因库登录号NC 001510);鹅细小病毒(基因库登录号NC 001701);蛇细小病毒1(基因库登录号NC 006148)。在一些实施方案中,如本文所论述,5'WT-ITR可以来自一种血清型,而3'WT-ITR来自不同血清型。

[0277] 普通技术人员知道,ITR序列具有双链霍利迪连结体(Holliday junction)的共同结构,所述结构通常为T形或Y形发夹结构(参见例如图2A和图3A),其中每个ITR由嵌入较大回文臂(A-A')中的两个回文臂或环(B-B'和C-C')和单链D序列形成,(其中这些回文序列的次序限定ITR的翻转或翻动取向)。参见例如来自不同AAV血清型(AAV1-AAV6)的ITR的结构分析和序列比较,并描述于Grimm等人,《病毒学杂志(J.Virology)》,2006;80(1);426-439;Yan等人,《病毒学杂志》,2005;364-379;Duan等人,《病毒学(Virology)》1999;261;8-14。本领域的技术人员基于本文提供的示例性AAV2 ITR序列,可以容易地确定用于ceDNA载体或ceDNA质粒的来自任何AAV血清型的WT-ITR序列。参见例如来自不同AAV血清型(AAV1-AAV6和禽类AAV(AAAV)和牛AAV(BAAV))的ITR的序列比较,其描述于Grimm等人,《病毒学杂志》,2006;80(1);426-439;其示出了AAV2的左ITR与来自其它血清型的左ITR的同一性%:AAV-1

(84%)、AAV-3(86%)、AAV-4(79%)、AAV-5(58%)、AAV-6(左ITR)(100%)和AAV-6(右ITR))(82%)。

[0278] A.对称的ITR对

[0279] 在一些实施方案中,如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体按照5'到3'方向包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR,其中第一ITR(5'ITR)和第二ITR(3'ITR)相对于彼此是对称的或基本对称的,也就是说,ceDNA载体能够包含具有对称三维空间组构的ITR序列,使得其结构在几何空间中具有相同形状,或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环。在这样的实施方案中,对称的ITR对或基本上对称的ITR对可以是不是野生型ITR的修饰ITR(例如mod-ITR)。一个mod-ITR对可以具有相同的相对于野生型ITR具有一个或多个修饰的序列,并且彼此反向互补(反向)。在替代实施方案中,修饰ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,修饰ITR对可以具有不同的序列,但是具有一致或相同的对称的三维形状。

[0280] (i)野生型ITR

[0281] 在一些实施例中,对称的ITR或大体上对称的ITR是如本文所描述的野生型(WT-ITR)。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须是来自同一AAV血清型的WT-ITR。也就是说,在一些实施方案中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在这样的实施方案中,WT-ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组构。

[0282] 因此,如本文所公开,ceDNA载体含有位于两个侧接野生型反向末端重复(WT-ITR)序列之间的转基因或异源核酸序列,所述两个野生型反向末端重复序列彼此反向互补(逆向),或替代地,相对于彼此基本对称,即,WT-ITR对具有对称的三维空间组构。在一些实施方案中,野生型ITR序列(例如AAV WT-ITR)包含功能Rep结合位点(RBS;例如AAV2为5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3',SEQ ID NO:60)和功能末端解链位点(TRS;例如5'-AGTT-3',SEQ ID NO:62)。

[0283] 在一方面,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可从编码异源核酸的载体多核苷酸获得,所述异源核酸操作性地位于两个WT反向末端重复序列(WT-ITR)(例如AAV WT-ITR)之间。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须是来自同一AAV血清型的WT-ITR。也就是说,在一些实施方案中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在这样的实施方案中,WT-ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组构。在一些实施方案中,5'WT-ITR来自一种AAV血清型,而3'WT-ITR来自相同或不同的AAV血清型。在一些实施方案中,5'WT-ITR和3'WT-ITR是彼此的镜像,即它们是对称的。在一些实施方案中,5'WT-ITR和3'WT-ITR来自相同的AAV血清型。

[0284] WT ITR是众所周知的。在一个实施方案中,两个ITR来自相同的AAV2血清型。在某些实施方案中,可以使用来自其它血清型的WT。有许多同源的血清型,例如AAV2、AAV4、AAV6、AAV8。在一个实施方案中,可以使用紧密同源的ITR(例如具有相似环结构的ITR)。在另一个实施方案中,能够使用较多样化的AAV WT ITR,例如AAV2和AAV5,并且在仍另一个实施方案中,能够使用基本上呈WT的ITR,也就是说,其不仅具有WT的基本环结构,而且具有不改变或不影响所述特性的一些保守核苷酸变化。当使用来自相同病毒血清型的WT-ITR时,

可以进一步使用一种或多种调控序列。在某些实施方案中，调控序列是容许调节ceDNA活性(例如所编码FVIII蛋白的表达)的调控开关。

[0285] 在一些实施方案中，本文所述技术的一个方面涉及一种用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体，其中ceDNA载体包含至少一个可操作地位于两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR)之间的编码FVIII蛋白的异源核苷酸序列，其中WT-ITR能够来自相同血清型、不同血清型或相对于彼此是基本对称的(即，具有对称的三维空间组构，使得其结构在几何空间中具有相同形状，或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环)。在一些实施方案中，对称的WT-ITR包含功能性末端解链位点和Rep结合位点。在一些实施方案中，异源核酸序列编码转基因，并且其中载体不在病毒衣壳中。

[0286] 在一些实施方案中，WT-ITR是相同的，但是彼此反向互补。例如，5'ITR中的序列AACG可以是3'ITR中相应位点处的CGTT(即，反向互补)。在一个实施例中，5'WT-ITR有义链包含ATCGATCG的序列，而相应的3'WT-ITR有义链包含CGATCGAT(即与ATCGATCG反向互补)。在一些实施方案中，WT-ITR ceDNA进一步包含末端解链位点和复制蛋白结合位点(RPS)(有时称为复制蛋白结合位点)，例如Rep结合位点。

[0287] 在本文的表3中显示了用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中的示例性WT-ITR序列，所述载体包含WT-ITR，其显示成对的WT-ITR(5'WT-ITR和3'WT-ITR)。

[0288] 作为一个示例性实施例，本公开提供了一种用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体，所述载体包含可操作地连接到转基因(例如异源核酸序列)的启动子，存在或不存在调控开关，其中ceDNA缺乏衣壳蛋白并且：(a)由编码WT-ITR的ceDNA质粒(参见例如图1F-1G)产生，其中每个WT-ITR的发夹二级构型具有相同数目个分子内双链体碱基对(相较于这些参考序列，优选排除这种构型中的任何AAA或TTT末端环的缺失)；和(b)使用分析鉴定为ceDNA，所述分析是通过琼脂糖凝胶电泳、在实施例1中的天然凝胶和变性条件下鉴定ceDNA。

[0289] 在一些实施方案中，位于两侧的WT-ITR彼此基本上对称。在所述实施方案中，5'WT-ITR可以来自AAV的一种血清型，而3'WT-ITR可以来自AAV的另一种血清型，使得WT-ITR不是相同的反向互补序列。举例来说，5'WT-ITR能够来自AAV2，并且3'WT-ITR来自不同血清型，例如AAV1、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。在一些实施方案中，WT-ITR可以选自两种不同的细小病毒，选自以下任一项：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、蛇细小病毒(例如，巨蟒细小病毒)、牛细小病毒、山羊细小病毒、禽类细小病毒、犬细小病毒、马细小病毒、虾细小病毒、猪细小病毒或昆虫AAV。在一些实施方案中，WT ITR的这种组合是来自AAV2和AAV6的WT-ITR的组合。在一个实施方案中，当一个相对于另一个ITR反向时，基本上对称的WT-ITR是至少90％一致，至少95％一致，至少96％…97％…98％…99％…99.5％以及之间的所有点，并具有相同的对称三维空间组构。在一些实施方案中，WT-ITR对由于其具有对称的三维空间组构，例如具有A、C-C'、B-B'和D臂的相同三维组构。在一个实施方案中，大体上对称的WT-ITR对相对于彼此呈反向，并且彼此至少95％一致、至少96％…97％…98％…99％…99.5％和其间的所有点，并且一个WT-ITR保留5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的Rep结合位点(RBS)和末端解链位点(TRS)。在一些实施方案中，大体上对称的WT-ITR对相对于彼此呈反向，并且彼此至少95％一致、至少96％…97％…98％…99％…99.5％和其间的所有点，并且一个WT-ITR保留5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的Rep结合位点(RBS)和末端解链位点(TRS)，此外保

留允许发夹二级结构形成的可变回文序列。同源性可以通过所属领域熟知的标准方法来确定，如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)、BLASTN。

[0290] 在一些实施方案中，ITR的结构元件可以是参与ITR与大的Rep蛋白(例如Rep 78或Rep 68)的功能性相互作用的任何结构元件。在某些实施方案中，结构元件为ITR与大的Rep蛋白的相互作用提供了选择性，即，至少部分确定哪种Rep蛋白与ITR功能性相互作用。在其它实施方案中，当Rep蛋白与ITR结合时，结构元件与大的Rep蛋白物理上相互作用。每个结构元件可以是例如ITR的二级结构、ITR的核苷酸序列、两个或更多个元件之间的间距元件，或上述任一个的组合。在一个实施方案中，结构元件选自由A和A'臂、B和B'臂、C和C'臂、D臂、Rep结合位点(RBE)和RBE'(即互补RBE序列)以及末端解链位点(TRS)组成的组。

[0291] 仅举例而言，表2指出WT-ITR的示例性组合。

[0292] 表2:来自相同血清型或不同血清型或不同细小病毒的WT-ITR的示例性组合。显示的顺序并不表示ITR位置，例如，“AAV1,AAV2”表明ceDNA可以在5'位置包含WT-AAV1ITR，而在3'位置包含WT-AAV2 ITR，反之亦然，WT-AAV2 ITR位于5'位置，WT-AAV1 ITR位于3'位置。缩写:AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型2(AAV2)、AAV血清型3(AAV3)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、AAV血清型7(AAV7)、血清型8(AAV8)、AAV血清型9(AAV9)、AAV血清型10(AAV10)、AAV血清型11(AAV11)或AAV血清型12(AAV12);AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组(例如，NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261)、来自温血动物(禽AAV(AAAV)、牛AAV(BAAV)、犬、马和绵羊AAV)的ITR，来自B19细小病毒的ITR(GenBank登录号:NC 000883)、来自小鼠的细小病毒(MVM)(基因库登录号NC 001510);鹅:鹅细小病毒(基因库登录号NC 001701);蛇:蛇细小病毒1(基因库登录号NC 006148)。

[0293] 表2

[0294]

AAV1、AAV1	AAV2、AAV2	AAV3、AAV3	AAV4、AAV4	AAV5、AAV5
AAV1、AAV2	AAV2、AAV3	AAV3、AAV4	AAV4、AAV5	AAV5、AAV6
AAV1、AAV3	AAV2、AAV4	AAV3、AAV5	AAV4、AAV6	AAV5、AAV7
AAV1、AAV4	AAV2、AAV5	AAV3、AAV6	AAV4、AAV7	AAV5、AAV8
AAV1、AAV5	AAV2、AAV6	AAV3、AAV7	AAV4、AAV8	AAV5、AAV9
AAV1、AAV6	AAV2、AAV7	AAV3、AAV8	AAV4、AAV9	AAV5、AAV10
AAV1、AAV7	AAV2、AAV8	AAV3、AAV9	AAV4、AAV10	AAV5、AAV11
AAV1、AAV8	AAV2、AAV9	AAV3、AAV10	AAV4、AAV11	AAV5、AAV12
AAV1、AAV9	AAV2、AAV10	AAV3、AAV11	AAV4、AAV12	AAV5、AAVRH8

[0295]

AAV1、AAV10	AAV2、AAV11	AAV3、AAV12	AAV4、AAVRH8	AAV5、AAVRH10
AAV1、AAV11	AAV2、AAV12	AAV3、AAVRH8	AAV4、AAVRH10	AAV5、AAV13
AAV1、AAV12	AAV2、AAVRH8	AAV3、AAVRH10	AAV4、AAV13	AAV5、AAVDJ
AAV1、AAVRH8	AAV2、AAVRH10	AAV3、AAV13	AAV4、AAVDJ	AAV5、AAVDJ8
AAV1、AAVRH10	AAV2、AAV13	AAV3、AAVDJ	AAV4、AAVDJ8	AAV5、禽
AAV1、AAV13	AAV2、AAVDJ	AAV3、AAVDJ8	AAV4、禽	AAV5、牛
AAV1、AAVDJ	AAV2、AAVDJ8	AAV3、禽	AAV4、牛	AAV5、犬
AAV1、AAVDJ8	AAV2、禽	AAV3、牛	AAV4、犬	AAV5、马
AAV1、禽	AAV2、牛	AAV3、犬	AAV4、马	AAV5、山羊
AAV1、牛	AAV2、犬	AAV3、马	AAV4、山羊	AAV5、虾
AAV1、犬	AAV2、马	AAV3、山羊	AAV4、虾	AAV5、猪
AAV1、马	AAV2、山羊	AAV3、虾	AAV4、猪	AAV5、昆虫
AAV1、山羊	AAV2、虾	AAV3、猪	AAV4、昆虫	AAV5、绵羊
AAV1、虾	AAV2、猪	AAV3、昆虫	AAV4、绵羊	AAV5、B19
AAV1、猪	AAV2、昆虫	AAV3、绵羊	AAV4、B19	AAV5、MVM
AAV1、昆虫	AAV2、绵羊	AAV3、B19	AAV4、MVM	AAV5、鹅
AAV1、绵羊	AAV2、B19	AAV3、MVM	AAV4、鹅	AAV5、蛇
AAV1、B19	AAV2、MVM	AAV3、鹅	AAV4、蛇	
AAV1、MVM	AAV2、鹅	AAV3、蛇		
AAV1、鹅	AAV2、蛇			
AAV1、蛇				
AAV6、AAV6	AAV7、AAV7	AAV8、AAV8	AAV9、AAV9	AAV10、AAV10
AAV6、AAV7	AAV7、AAV8	AAV8、AAV9	AAV9、AAV10	AAV10、AAV11
AAV6、AAV8	AAV7、AAV9	AAV8、AAV10	AAV9、AAV11	AAV10、AAV12
AAV6、AAV9	AAV7、AAV10	AAV8、AAV11	AAV9、AAV12	AAV10、

[0296]

				AAVRH8
AAV6、AAV10	AAV7、AAV11	AAV8、AAV12	AAV9、AAVRH8	AAV10、AAVRH10
AAV6、AAV11	AAV7、AAV12	AAV8、AAVRH8	AAV9、AAVRH10	AAV10、AAV13
AAV6、AAV12	AAV7、AAVRH8	AAV8、AAVRH10	AAV9、AAV13	AAV10、AAVDJ
AAV6、AAVRH8	AAV7、AAVRH10	AAV8、AAV13	AAV9、AAVDJ	AAV10、AAVDJ8
AAV6、AAVRH10	AAV7、AAV13	AAV8、AAVDJ	AAV9、AAVDJ8	AAV10、禽
AAV6、AAV13	AAV7、AAVDJ	AAV8、AAVDJ8	AAV9、禽	AAV10、牛
AAV6、AAVDJ	AAV7、AAVDJ8	AAV8、禽	AAV9、牛	AAV10、犬
AAV6、AAVDJ8	AAV7、禽	AAV8、牛	AAV9、犬	AAV10、马
AAV6、禽	AAV7、牛	AAV8、犬	AAV9、马	AAV10、山羊
AAV6、牛	AAV7、犬	AAV8、马	AAV9、山羊	AAV10、虾
AAV6、犬	AAV7、马	AAV8、山羊	AAV9、虾	AAV10、猪
AAV6、马	AAV7、山羊	AAV8、虾	AAV9、猪	AAV10、昆虫
AAV6、山羊	AAV7、虾	AAV8、猪	AAV9、昆虫	AAV10、绵羊
AAV6、虾	AAV7、猪	AAV8、昆虫	AAV9、绵羊	AAV10、B19
AAV6、猪	AAV7、昆虫	AAV8、绵羊	AAV9、B19	AAV10、MVM
AAV6、昆虫	AAV7、绵羊	AAV8、B19	AAV9、MVM	AAV10、鹅
AAV6、绵羊	AAV7、B19	AAV8、MVM	AAV9、鹅	AAV10、蛇
AAV6、B19	AAV7、MVM	AAV8、鹅	AAV9、蛇	
AAV6、MVM	AAV7、鹅	AAV8、蛇		
AAV6、鹅	AAV7、蛇			
AAV6、蛇				
AAV11、AAV11	AAV12、AAV12	AAVRH8、AAVRH8	AAVRH10、AAVRH10	AAV13、AAV13
AAV11、AAV12	AAV12、	AAVRH8、	AAVRH10、	AAV13、

	AAVRH8	AAVRH10	AAV13	AAVDJ
AAV11、AAVRH8	AAV12、AAVRH10	AAVRH8、AAV13	AAVRH10、AAVDJ	AAV13、AAVDJ8
AAV11、AAVRH10	AAV12、AAV13	AAVRH8、AAVDJ	AAVRH10、AAVDJ8	AAV13、禽
AAV11、AAV13	AAV12、AAVDJ	AAVRH8、AAVDJ8	AAVRH10、禽	AAV13、牛
AAV11、AAVDJ	AAV12、AAVDJ8	AAVRH8、禽	AAVRH10、牛	AAV13、犬
AAV11、AAVDJ8	AAV12、禽	AAVRH8、牛	AAVRH10、犬	AAV13、马
AAV11、禽	AAV12、牛	AAVRH8、犬	AAVRH10、马	AAV13、山羊
AAV11、牛	AAV12、犬	AAVRH8、马	AAVRH10、山羊	AAV13、虾
AAV11、犬	AAV12、马	AAVRH8、山羊	AAVRH10、虾	AAV13、猪
AAV11、马	AAV12、山羊	AAVRH8、虾	AAVRH10、猪	AAV13、昆虫
AAV11、山羊	AAV12、虾	AAVRH8、猪	AAVRH10、昆虫	AAV13、绵羊
AAV11、虾	AAV12、猪	AAVRH8、昆虫	AAVRH10、绵羊	AAV13、B19
AAV11、猪	AAV12、昆虫	AAVRH8、绵羊	AAVRH10、B19	AAV13、MVM
AAV11、昆虫	AAV12、绵羊	AAVRH8、B19	AAVRH10、MVM	AAV13、鹅
AAV11、绵羊	AAV12、B19	AAVRH8、MVM	AAVRH10、鹅	AAV13、蛇
AAV11、B19	AAV12、MVM	AAVRH8、鹅	AAVRH10、蛇	
AAV11、MVM	AAV12、鹅	AAVRH8、蛇		
AAV11、鹅	AAV12、蛇			
AAV11、蛇				
AAVDJ、AAVDJ	AAVDJ8，AVVDJ8	禽，禽	牛，牛	犬，犬
AAVDJ，AAVDJ8	AAVDJ8，禽	禽，牛	牛，犬	犬，马
AAVDJ，禽	AAVDJ8，牛	禽，犬	牛，马	犬，山羊
AAVDJ，牛	AAVDJ8，犬	禽，马	牛，山羊	犬，虾

[0297]

[0298]

AAVDJ，犬	AAVDJ8，马	禽，山羊	牛，虾	犬，猪
AAVDJ，马	AAVDJ8，山羊	禽，虾	牛，猪	犬，昆虫
AAVDJ，山羊	AAVDJ8，虾	禽，猪	牛，昆虫	犬，绵羊
AAVDJ，虾	AAVDJ8，猪	禽，昆虫	牛，绵羊	犬，B19
AAVDJ，猪	AAVDJ8，昆虫	禽，绵羊	牛，B19	犬，MVM
AAVDJ，昆虫	AAVDJ8，绵羊	禽，B19	牛，MVM	犬，鹅
AAVDJ，绵羊	AAVDJ8，B19	禽，MVM	牛，鹅	犬，蛇
AAVDJ，B19	AAVDJ8，MVM	禽，鹅	牛，蛇	
AAVDJ，MVM	AAVDJ8，鹅	禽，蛇		
AAVDJ，鹅	AAVDJ8，蛇			
AAVDJ，蛇				
马，马	山羊，山羊	虾，虾	猪，猪	昆虫，昆虫
马，山羊	山羊，虾	虾，猪	猪，昆虫	昆虫，绵羊
马，虾	山羊，猪	虾，昆虫	猪，绵羊	昆虫，B19
马，猪	山羊，昆虫	虾，绵羊	猪，B19	昆虫，MVM
马，昆虫	山羊，绵羊	虾，B19	猪，MVM	昆虫，鹅
马，绵羊	山羊，B19	虾，MVM	猪，鹅	昆虫，蛇
马，B19	山羊，MVM	虾，鹅	猪，蛇	
马，MVM	山羊，鹅	虾，蛇		
马，鹅	山羊，蛇			
马，蛇				
绵羊，绵羊	B19，B19	MVM，MVM	鹅，鹅	蛇，蛇
绵羊，B19	B19，MVM	MVM，鹅	鹅，蛇	
绵羊，MVM	B19，鹅	MVM，蛇		
绵羊，鹅	B19，蛇			
绵羊，蛇				

[0299] 仅举例而言,表3显示来自一些不同AAV血清型的示例性WT-ITR的序列。

[0300] 表3

[0301]

AAV 血清型	5’ WT-ITR（左）	3’ WT-ITR（右）
AAV1	5’-TTGCCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTCTGCCGGCCCCACCGAGCGAGCGACGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACTAGGGTAA-3’（SEQ ID NO: 5）	5’-TTACCCTAGTGATGGAGTTGCCCACTCCCTCTCTGCGCGCGTCGCTCGCTCGGTGGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCGTCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCCACCGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGCAA-3’（SEQ ID NO: 10）
AAV2	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT（SEQ ID NO: 2）	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGctgcctgcagg（SEQ ID NO: 1）
AAV3	5’-TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAAGGTCGCCAGACGGACGTGGGTTTCCACGTCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCGCATAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGAGGTAT-3’（SEQ ID NO: 6）	5’-ATACCTCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGGTGGGGCCGGACGTGGAAACCCACGTCCGTCTGGCGACCTTTGGTCGCCAGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCGCATAGAGGGAGTGGCCAA-3’（SEQ ID NO: 11）
AAV4	5’-TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGCTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCATAGAGGGAGTGGCCAACT-3’（SEQ ID NO: 7）	5’-AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGCTCGCTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCCGGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCATAGAGGGAGTGGCCAA-3’（SEQ ID NO: 12）
AAV5	5’-TCCCCCCTGTCGCGTTCGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGA	5’-CTTACAAAACCCCCTTGCTTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCCTGTCGC

[0302]

	CGGCCAGAGGGCCGTCGTCTGGCA GCTCTTTGAGCTGCCACCCCCCCAA ACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACGC GACAGGGGGGAGAGTGCCACACTC TCAAGCAAGGGGGTTTTGTAAG -3' (SEQ ID NO: 8)	GTTCGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTG GGGGGGTGGCAGCTCAAAGAGCTG CCAGACGACGGCCCTCTGGCCGTC GCCCCCCCAAACGAGCCAGCGAGC GAGCGAACGCGACAGGGGGGA-3' (SEQ ID NO: 13)
AAV6	5'-TTGCCCACTCCCTCTAATGCGCG CTCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGCGG ACCAAAGGTCCGCAGACGGCAGAG GTCTCCTCTGCCGGCCCCACCGAGC GAGCGAGCGCGCATAGAGGGAGTG GGCAACTCCATCACTAGGGGTAT-3' (SEQ ID NO: 9)	5'-ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCC ACTCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGC TCGGTGGGGCCGGCAGAGGAGACC TCTGCCGTCTGCGGACCTTTGGTCC GCAGGCCCCACCGAGCGAGCGAGC GCGCATTAGAGGGAGTGGGCAA (SEQ ID NO: 14)

[0303] 在一些实施方案中,可以修饰WT-ITR序列的核苷酸序列(例如,通过修饰1、2、3、4或5个或更多个核苷酸或其中的任何范围),其中所述修饰是替代互补核苷酸,例如,G替代C,反之亦然,T替代A,反之亦然。

[0304] 在本发明的某些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体不具有由选自以下中的任一个的核苷酸序列组成的WT-ITR:SEQ ID NO:1、2、5-14。在本发明的替代实施方案中,如果ceDNA载体具有包含选自以下中的任一个的核苷酸序列的WT-ITR:SEQ ID NO:1、2、5-14,则侧接ITR也是WT并且ceDNA载体包含调控开关,例如如本文和国际申请PCT/US18/49996所公开(例如参见PCT/US18/49996的表11)。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含如本文公开的调控开关和所选择的WT-ITR,所述WT-ITR具有选自由以下组成的组中的任一种的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、2、5-14。

[0305] 本文所描述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以包括保留了可操作的RBE、TRS和RBE'部分的WT-ITR结构。出于示例性目的使用野生型ITR,图2A和图2B展示了关于ceDNA载体的野生型ITR结构部分内的TRS位点操作的一种可能机制。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体含有一种或多种功能WT-ITR多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含Rep结合位点(RBS;对于AAV2为5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60))和末端解链位点(TRS;5'-AGTT(SEQ ID NO:62))。在一些实施例中,至少一个WT-ITR是功能性的。在用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含彼此大体上对称的两个WT-ITR的替代实施例中,至少一个WT-ITR是功能性的并且至少一个WT-ITR是非功能性的。

[0306] B.通常对于包含不对称ITR对或对称ITR对的ceDNA载体的修饰ITR(mod-ITR)

[0307] 如本文所讨论,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够包含对称的ITR对或不对称的ITR对。在两个例子中,ITR中的一个或两个可以是经修饰的ITR,差异在于,在第一个例子(即,对称mod-ITR)中,mod-ITR具有相同的三维空间组构(即,具有相同的A-A'、C-C'和B-B'臂构形),而在第二个例子(即,不对称mod-ITR)中,mod-ITR具有不同的三维空间组构(即,具有A-A'、C-C'和B-B'臂的不同构形)。

[0308] 在一些实施方案中,相较于野生型ITR序列(例如AAV ITR),经修饰的ITR是通过缺

失、插入和/或取代进行修饰的ITR。在一些实施方案中，ceDNA载体中的至少一个ITR包含功能Rep结合位点(RBS；对于AAV2为例如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'，SEQ ID NO:60)和功能末端解链位点(TRS；例如5'-AGTT-3'，SEQ ID NO:62)。在一个实施例中，所述ITR中的至少一个ITR是非功能性ITR。在一个实施方案中，不同或修饰ITR不是来自不同血清型的每种野生型ITR。

[0309] 在本文中详细描述了ITR中的特定改变和突变，但是在ITR的情况下，“改变”或“突变”或“修饰”表明相对于野生型、参考或原始ITR序列，插入、缺失和/或取代核苷酸。更改或突变的ITR可以是工程化的ITR。如本文所使用的，“工程化”是指通过人手进行操纵的方面。例如，当多肽的至少一个方面，例如其序列，通过人的手进行操纵而不同于自然存在的方面时，则认为该多肽是“工程化”的。

[0310] 在一些实施方案中，mod-ITR可以是合成的。在一个实施方案中，合成的ITR是基于来自一种以上AAV血清型的ITR序列。在另一个实施例中，合成ITR不包含基于AAV的序列。在又一个实施方案中，合成的ITR尽管仅具有一些或不具有源自AAV的序列，但是保留了上述的ITR结构。在一些方面，合成的ITR可以优先与野生型Rep或特定血清型的Rep相互作用，或者在某些情况下，野生型Rep将不识别其，而仅突变的Rep可识别其。

[0311] 技术人员可以通过已知手段确定其它血清型的相应序列。例如，确定改变是否在A、A'、B、B'、C、C'或D区域中，并确定另一种血清型中的相应区域。能够在默认状态下使用BLAST®(基本局部比对搜索工具)或其它同源性比对程序测定相应序列。本发明进一步提供了包含来自不同AAV血清型的组合的mod-ITR的ceDNA载体群体和多种ceDNA载体，也就是说，一个mod-ITR可以来自一种AAV血清型，而另一个mod-ITR可以来自不同血清型。不希望受理论的束缚，在一个实施方案中，一个ITR可以来自或基于AAV2 ITR序列，而ceDNA载体的另一个ITR可以来自或基于以下中的任一种或多种ITR序列：AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、AAV血清型7(AAV7)、AAV血清型8(AAV8)、AAV血清型9(AAV9)、AAV血清型10(AAV10)、AAV血清型11(AAV11)或AAV血清型12(AAV12)。

[0312] 任何细小病毒ITR都可以用作ITR或用于修饰的基础ITR。优选地，细小病毒是依赖病毒。更优选是AAV。选择的血清型可以是基于血清型的组织嗜性。AAV2具有广泛的组织嗜性，AAV1优先靶向神经元和骨骼肌，而AAV5优先靶向神经元、视网膜色素上皮和光感受器。AAV6优先靶向骨骼肌和肺。AAV8优先靶向肝脏、骨骼肌、心脏和胰腺组织。AAV9优先靶向肝脏、骨骼和肺组织。在一个实施方案中，修饰ITR是基于AAV2 ITR。

[0313] 更具体地，可以通过修饰结构元件来改变结构元件与特定的大Rep蛋白功能性相互作用的能力。举例来说，可以与ITR的野生型序列相比较来修饰结构元件的核苷酸序列。在一个实施方案中，可以除去ITR的结构元件(例如A臂、A'臂、B臂、B'臂、C臂、C'臂、D臂、RBE、RBE'和TRS)并用来自不同细小病毒的野生型结构元件替代。例如，替代结构可以来自：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、蛇细小病毒(例如巨蟒细小病毒)、牛细小病毒、山羊细小病毒、禽类细小病毒、犬细小病毒、马细小病毒、虾细小病毒、猪细小病毒或昆虫AAV。例如，ITR可以是AAV2 ITR，并且A或A'臂或RBE可以用来自AAV5的结构元件替代。在另一个实施例中，ITR可以是AAV5 ITR，并且C或C'臂、RBE和TRS可以用来自AAV2的结构元件替代。在另一个实施例中，AAV ITR可以是B和B'臂被AAV2 ITR B和B'臂替代的AAV5 ITR。

[0314] 仅举例而言，表4显示经修饰的ITR的区域中的至少一个核苷酸的示例性修饰(例如缺失、插入和/或取代)，其中X表示那个区段中的至少一个核酸相对于相应野生型ITR的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施方案中，在C和/或C'和/或B和/或B'的任何区域中的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)在至少一个末端环中保留三个连续的T核苷酸(即，TTT)。例如，如果修饰引起以下任一种：单臂ITR(例如，单个C-C'臂或单个B-B'臂)或修饰的C-B'臂或C'-B臂、或具有至少一个截断臂(例如截断的C-C'臂和/或截断的B-B'臂)的两臂ITR，那么至少所述单臂、或两臂ITR(其中一个臂可以是截断的)的至少一个臂在至少一个末端环中保留三个连续的T核苷酸(即TTT)。在一些实施方案中，截断的C-C'臂和/或截断的B-B'臂在末端环中具有三个连续的T核苷酸(即TTT)。

[0315] 表4：ITR的不同B-B'和C-C'区域或臂的至少一个核苷酸的修饰的示例性组合(例如缺失、插入和/或取代)(X指示核苷酸修饰，例如所述区域中的至少一个核苷酸的添加、缺失或取代)。

[0316]

B区	B'区	C区	C'区
X			
	X		
X	X		
		X	
			X
		X	X
X		X	
X			X
	X	X	
	X		X
X	X	X	
X	X		X
X		X	X
	X	X	X
X	X	X	X

[0317] 在一些实施方案中，如本文公开的包含不对称ITR对或对称mod-ITR对的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中使用的mod-ITR能够包含表4中所示的任一种修饰组合，以及选自以下的任一个或多个区域中的至少一个核苷酸的修饰：A'与C之间、C与C'之间、C'与B之间、B与B'之间以及B'与A之间。在一些实施方案中，在C或C'或者B或B'区域中的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)仍然保留了茎环的末端环。在一些实施方案中，在C和C'和/或B和B'之间的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)在至少一个末端环中保留三个连续的T核苷酸(即TTT)。在替代实施方案中，C与C'之间和/或B与B'之间的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)使至少一个末端环中保留三个连续A核苷酸(即，AAA)。在一些实施方案中，本文中使用的经修饰的ITR可以包括表4中所示出的修饰组合中的任一个，并且还包括选自以下的区域中的一个或多个的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)：A'、A和/或D。例如，在一些实施方案中，本文中使

用的经修饰的ITR可以包括表4中所示出的修饰组合中的任一个，并且还包括A区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施方案中，本文中使用的经修饰的ITR可以包含表4中所示的修饰的组合中的任一个，并且还包含A'区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施方案中，本文中使用的经修饰的ITR可以包括表4中所示出的修饰组合中的任一个，并且还包括D区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施方案中，本文中使用的经修饰的ITR可以包括表4中所示出的修饰组合中的任一个，并且还包括D区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。

[0318] 在一个实施方案中，能够修饰结构元件的核苷酸序列(例如修饰1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多个核苷酸或其中的任何范围)，以产生经修饰的结构元件。在一个实施方案中，本文举例说明了对ITR的特定修饰(例如，SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187，或2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的图7A-7B中所示(例如PCT/US2018/064242中的SEQ ID No 97-98、101-103、105-108、111-112、117-134、545-54)。在一些实施方案中，能够修饰ITR(例如通过修饰1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多个核苷酸或其中的任何范围)。在其它实施方案中，ITR与SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187的经修饰的ITR之一或SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187的A-A'臂和C-C'和B-B'臂的含RBE区段或国际申请PCT/US18/49996的表2-9中所示(即，SEQ ID NO:110-112、115-190、200-468)能够具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或更大序列一致性，所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0319] 在一些实施方案中，经修饰的ITR能够包含例如所有特定臂(例如A-A'臂的全部或一部分，或B-B'臂的全部或一部分，或C-C'臂的全部或一部分)的去除或缺失，或替代地，形成环茎的1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个碱基对的去除，只要对茎(例如单臂)进行封端的最终环仍然存在(参见例如2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的图7A中的ITR-21)。在一些实施方案中，经修饰的ITR可以包括从B-B'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对。在一些实施例中，经修饰的ITR可以包括从C-C'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对(参见例如图3B中的ITR-1或2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的图7A中的ITR-45)。在一些实施例中，经修饰的ITR可以包括从C-C'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对以及从B-B'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对。设想去除碱基对的任何组合，例如可以在C-C'臂中去除6个碱基对以及在B-B'臂中去除2个碱基对。作为说明性示例，图3B展示了示例性的修饰ITR，其从C部分和C'部分各缺失至少7个碱基对，C和C'区域之间的环中的核苷酸被取代，以及从B区域和B'区域各自缺失至少一个碱基对，使得修饰ITR包含至少一个臂(例如C-C')截断的两个臂。在一些实施方案中，修饰ITR还包含从B区域和B'区域各自缺失至少一个碱基对，使得臂B-B'相对于WT ITR也截断。

[0320] 在一些实施例中，经修饰的ITR相对于全长野生型ITR序列可以具有1与50个之间(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50)的核苷酸缺失。在一些实施例中，相对于全长WT ITR序列，经修饰的ITR可以具有1与30个之间的核苷酸缺失。在一些实施例中，相对于全长野生型ITR序列，经修饰的ITR可以具有2与20个之

间的核苷酸缺失。

[0321] 在一些实施例中,经修饰的ITR在A或A'区域的含RBE部分中不含任何核苷酸缺失,以便不干扰DNA复制(例如,通过Rep蛋白结合到RBE,或在末端解链位点切割)。在一些实施方案中,预期用于本文中的经修饰的ITR在如本文所述的B、B'、C和/或C区域中具有一个或多个缺失。

[0322] 在一些实施方案中,包含对称ITR对或不对称ITR对的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含如本文所公开的调控开关和至少一个经修饰的ITR,所述ITR具有选自由以下组成的群组中的任一个的核苷酸序列:SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187。

[0323] 在另一个实施例中,结构元件的结构可以为经修饰的。例如,结构元件改变了茎高和/或环中核苷酸的数量。例如,茎高可以是约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个或更多个核苷酸或其中的任何范围。在一个实施例中,茎高可以是约5个核苷酸至约9个核苷酸并与Rep功能性相互作用。在另一个实施例中,茎高可以是约7个核苷酸并与Rep功能性相互作用。在另一个实施例中,环可以具有3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个或更多个核苷酸或其中的任何范围。

[0324] 在另一个实施例中,RBE或扩展RBE内GAGY结合位点或GAGY相关结合位点的数量可以增加或减少。在一个实施例中,RBE或扩展RBE可以包括1、2、3、4、5或6个或更多个GAGY结合位点或其中的任何范围。每个GAGY结合位点可以独立地是精确的GAGY序列或类似于GAGY的序列,只要该序列足以结合Rep蛋白即可。

[0325] 在另一个实施方案中,能够改变(例如增加或减少)两个元件(例如(但不限于)RBE和发夹)之间的间距,以改变与大Rep蛋白的功能相互作用。例如,间距可以是约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个或更多个核苷酸或其中的任何范围。

[0326] 本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够包括相对于本文公开的野生型AAV2ITR结构经修饰,但仍保留可操作的RBE、TRS和RBE'部分的ITR结构。图2A和图2B示出了用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的野生型ITR结构部分内的TRS位点的一种可能的操作机理。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体含有一种或多种功能ITR多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含Rep结合位点(RBS;对于AAV2为5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60))和末端解链位点(TRS;5'-AGTT(SEQ ID NO:62))。在一些实施方案中,至少一个ITR(wt或修饰ITR)是功能性的。在其中用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包括彼此不同或不对称的两个经修饰的ITR的替代性实施例中,至少一个经修饰的ITR是功能性的并且至少一个经修饰的ITR是非功能性的。

[0327] 在一些实施方案中,如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的经修饰的ITR(例如左或右ITR)在环臂、截断的臂或间隔子内具有修饰。具有环臂、截断臂或间隔子内的修饰的ITR的示例性序列列于国际申请PCT/US18/49996的下表中:表2(例如SEQ ID NO:135-190、200-233);表3(例如,SEQ ID NO:234-263);表4(例如,SEQ ID NO:264-293);表5(例如,SEQ ID NO:本文的294-318);表6(例如,SEQ ID NO:319-468;和表7-9(例如,SEQ ID NO:101-110、111-112、115-134)或表10A或10B(例如,SEQ ID NO:9,100,469-483,484-499),所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0328] 在一些实施方案中,包含不对称ITR对或对称mod-ITR对的用于表达FVIII蛋白的

ceDNA载体中使用的经修饰的ITR选自国际申请PCT/US18/49996的表2、3、4、5、6、7、8、9和10A-10B中所示的那些修饰中的任一个或组合，所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0329] 表5A和5B中提供了每一个以上类别中的包含不对称ITR对或对称mod-ITR对的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中使用的另外的示例性的修饰ITR。表5A中经修饰的右ITR的预测二级结构示于2018年12月6日提交的国际申请PCT/US2018/064242的图7A中，以及表5B中的经修饰的右ITR的预测二级结构示于2018年12月6日提交的国际申请PCT/US2018/064242的图7B中，所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0330] 表5A和表5B展示了示例性的经修饰的右和左ITR。

[0331] 表5A：示例性经修饰的右ITR。经修饰的这些示例性右ITR能够包含GCGCGCTCGCTCGCTC-3′(SEQ ID NO:60)的RBE、ACTGAGGC(SEQ ID NO:69)的间隔子、间隔子补体GCCTCAGT(SEQ ID NO:70)和GAGCGAGCGAGCGCGC(SEQ ID NO:71)的RBE’(即，RBE的补体)。

[0332]

表 5A：示例性经修饰的右 ITR

ITR 构建体	**序列**	SEQ ID NO:
右 ITR-18	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCGCACGCCCGGGTTTCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	15
右 ITR-19	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	16
右 ITR-20	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG	17
右 ITR-21	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGCTGCCTGCAGG	18
右 ITR-22	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACAAAGTCGCCCGACG CCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCAGG	19
右 ITR-23	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAAATCGCCCGACGCCC GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG	20
右 ITR-24	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAACGCCCGACGCCCG GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG	21
右 ITR-25	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAAAGCCCGACGCCCGGG CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG	22

[0333]

右 ITR-26	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCAGG	23
右 ITR-27	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCGGTTTCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG	24
右 ITR-28	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCGTTTCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG	25
右 ITR-29	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG	26
右 ITR-30	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCTTTGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG	27
右 ITR-31	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCTTTGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG	28
右 ITR-32	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGTTTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC AGG	29
右 ITR-49	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	30
右 ITR-50	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA	31

[0334]

	CGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCC TGCAGG	

[0335] 表5B：示例性经修饰的左ITR。经修饰的这些示例性左ITR能够包含GCGCGCTCGCTCGCTC-3’(SEQ ID NO:60)的RBE、ACTGAGGC(SEQ ID NO:69)的间隔子、间隔子补体GCCTCAGT(SEQ ID NO:70)和GAGCGAGCGAGCGCGC(SEQ ID NO:71)的RBE补体(RBE’)。

[0336]

表 5B：示例性经修饰的左 ITR		
左 ITR-33	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC GGGAAACCCGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	32
左 ITR-34	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	33
左 ITR-35	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC GGGCAAAGCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	34
左 ITR-36	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	35
左 ITR-37	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCAAAG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCCT	36
左 ITR-38	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC GGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGTCGCCCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA TCACTAGGGGTTCCT	37
左 ITR-39	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC GGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCGCCCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCA CTAGGGGTTCCT	38

[0337]

左 ITR-40	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	39
左 ITR-41	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	40
左 ITR-42	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAAACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	41
左 ITR-43	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGAAACCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	42
左 ITR-44	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGAAACGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	43
左 ITR-45	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCAAAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	44
左 ITR-46	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	45
左 ITR-47	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCAAAGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	46
左 ITR-48	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAA	47

[0338]

	ACGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT	

[0339] 在一个实施方案中，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体按照5’到3’方向包含：第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注非核苷酸序列(例如如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR，其中第一ITR(5’ITR)和第二ITR(3’ITR)相对于彼此是不对称的，也就是说，它们具有彼此不同的3D空间构型。作为示例性实施方案，第一ITR可以是野生型ITR，并且第二ITR可以是突变或修饰ITR，或反过来，其中第一ITR可以是突变或修饰ITR，第二ITR可以是野生型ITR。在一些实施方案中，第一ITR和第二ITR均是mod-ITR，但具有不同序列或具有不同修饰，因此不是相同的经修饰的ITR，并且具有不同的3D空间构型。换句话说，具有不对称ITR的ceDNA载体包含如下ITR：其中一个ITR相对于WT-ITR的任何变化均未反映于另一个ITR中；或可替代地，其中具有经修饰的不对称ITR对的不对称ITR可以具有相对于彼此不同的序列和不同的三维形状。用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中以及用于产生ceDNA-质粒的示例性不对称ITR示于表5A和5B中。

[0340] 在一个替代实施方案中，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含两个对称mod-ITR，也就是说，两个ITR均具有相同序列，但是彼此的反向(逆向)补体。在一些实施方案中，相对于来自相同AAV血清型的野生型ITR序列，对称的mod-ITR对包含缺失、插入或取代中的至少一种或任何组合。对称ITR中的添加、缺失或取代是相同的，但彼此反向互补。举例来说，在5’ITR的C区中插入3个核苷酸将反映为在3’ITR的C’区中相应部分中插入3个反向互补核苷酸。仅出于说明目的，如果在5’ITR中添加AACG，那么在3’ITR中相应位点处添加CGTT。举例来说，如果5’ITR有义链是ATCGATCG，则G与A之间添加AACG会产生序列ATCGAACGATCG(SEQ ID NO:51)。相应的3’ITR有义链是CGATCGAT(ATCGATCG的反向补体)，其中T与C之间添加CGTT(即，AACG的反向补体)会产生序列CGATCGTTCGAT(SEQ ID NO:49)(ATCGAACGATCG的反向补体)(SEQ ID NO:51)。

[0341] 在替代实施方案中，修饰ITR对如本文所定义是基本上对称的，即，修饰ITR对可以具有不同的序列，但是具有一致或相同的对称的三维形状。举例来说，一个经修饰的ITR能够来自一种血清型，而另一个经修饰的ITR能够来自不同血清型，但它们在相同区域中具有相同突变(例如核苷酸插入、缺失或取代)。换句话说，仅出于说明目的，5’mod-ITR可以来自AAV2并在C区域有一个缺失，而3’mod-ITR可以来自AAV5并在C’区域中有相应的缺失，并且如果5’mod-ITR和3’mod-ITR具有相同或对称的三维空间组构，那么其作为修饰ITR对涵盖用于在本文中。

[0342] 在一些实施方案中，基本上对称的mod-ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C’和B-B’环，例如，如果基本上对称的mod-ITR对中的修饰ITR缺失C-C’臂，那么同源mod-ITR相应缺失C-C’环，并且在其同源mod-ITR的几何空间呈相同形状下，剩余A和B-B’环具有相似3D结构。仅作为示例，基本上对称的ITR可以具有对称的空间组构，使得它们的结构在几何空间中是相同的形状。例如，当将GC对修饰为例如CG对，反之亦然，或者将AT对修饰为TA对，反之亦然时，可能会发生这种情况。因此，如果例如5’ITR具有序列ATCGAACCATCG(SEQ ID NO:

50)(其中G另外修饰成C),并且基本对称的3'ITR具有序列CGATCGTTCGAT(SEQ ID NO:49)(除a之外,T不进行相应修饰),那么使用上述示例性实施例经修饰的5'ITR作为ATCGAACGATCG(SEQ ID NO:51)和经修饰的3'ITR作为CGATCGTTCGAT(SEQ ID NO:49)(即,ATCGAACGATCG的反向补体(SEQ ID NO:51)),这些经修饰的ITR仍然会是对称的。在一些实施方案中,此类经修饰的ITR对是基本对称的,原因是经修饰的ITR对具有对称立体化学构型。

[0343] 表6显示对称修饰的示例性ITR对(即,经修饰的左ITR和经修饰的对称右ITR),其用于用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中。序列的黑体(红色)部分标识了部分ITR序列(即A-A'、C-C'和B-B'环的序列),也在图31A-46B中示出。经修饰的这些示例性ITR能够包含GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的RBE、ACTGAGGC(SEQ ID NO:69)的间隔子、间隔子补体GCCTCAGT(SEQ ID NO:70)和GAGCGAGCGAGCGCGC(SEQ ID NO:71)的RBE'(即,RBE的补体)。

[0344]

表 6: 用于表达 FVIII 蛋白的 ceDNA 载体中的示例性对称修饰的 ITR 对

经修饰的左 ITR（经修饰的 5' ITR）		经修饰的对称右 ITR（经修饰的 3' ITR）	
SEQ ID NO: 32（左 ITR-33）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGAAACCCGGGCG TGCGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCT	SEQ ID NO: 15（右 ITR-18）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCGCACGCCC GGGTTTCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC**AGCTGCCTGCA

[0345]

			GG
SEQ ID NO: 33（左 ITR-34）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC**AGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACT AGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 48（右 ITR-51）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAC CAAAGGTCGCCCGACG GCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGC**AGCTGCCTG CAGG
SEQ ID NO: 34（左 ITR-35）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGG CGTCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC**AGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACT AGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 16（右 ITR-19）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGACGCCC GGGCTTTGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGC**AGCTGCCTG CAGG
SEQ ID NO: 35（左 ITR-36）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCG CCCGGGCGTCGGGCGACC TTTGGTCGCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGC**A GAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 17（右 ITR-20）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAC CAAAGGTCGCCCGACG CCCGGGCGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGC**A GCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 36（左 ITR-37）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCA AAGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGC**AGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGG GTTCCT	SEQ ID NO: 18（右 ITR-21）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCTTTGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGC GC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 37（左	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC**	SEQ ID NO: 19（右	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC

	ITR-38）	**GCCCGGGCAAAGCCCGGG CGTCGGGCGACTTTGTCGC CCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCT	ITR-22）	**T**GCGCGCTCGCTCGCTC **ACTGAGGCCGGGCGAC AAAGTCGCCCGACGCC CGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGCTGCCT GCAGG
	SEQ ID NO: 38（左 ITR-39）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGG CGTCGGGCGATTTTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGC**AGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	SEQ ID NO: 20（右 ITR-23）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAA AATCGCCCGACGCCCG GGCTTTGCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGC**AGCTGCCTGC AGG
[0346]	SEQ ID NO: 39（左 ITR-40）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGG CGTCGGGCGTTTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC**AGAGAGGGAGTGG CCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT	SEQ ID NO: 21（右 ITR-24）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAA ACGCCCGACGCCCGGG CTTTGCCCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAG CGCGC**AGCTGCCTGCAG G
	SEQ ID NO: 40（左 ITR-41）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGG CGTCGGGCTTTGCCCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC**AGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTC CT	SEQ ID NO: 22（右 ITR-25）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC T**GCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCAAA GCCCGACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCG CGC**AGCTGCCTGCAGG

[0347]

SEQ ID NO: 41（左 ITR-42）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGAAACCCGGGCG TCGGGCGACCTTTGGTCGC CCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCT	SEQ ID NO: 23（右 ITR-26）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC **TGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAC CAAAGGTCGCCCGACG CCCGGGTTTCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGCTGCCT GCAGG
SEQ ID NO: 42（左 ITR-43）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGAAACCGGGCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGC**AGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGG GTTCCT	SEQ ID NO: 24（右 ITR-27）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC **TGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAC CAAAGGTCGCCCGACG CCCGGTTTCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGC**AGCTGCCTGC AGG
SEQ ID NO: 43（左 ITR-44）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGAAACGGGCGTCGG GCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGC**AGAGAGGGAGTGG CCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT	SEQ ID NO: 25（右 ITR-28）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC **TGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAC CAAAGGTCGCCCGACG CCCGTTTCGGGCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAG CGCGC**AGCTGCCTGCAG G
SEQ ID NO: 44（左 ITR-45）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCAAAGGGCGTCGGGC GACCTTTGGTCGCCCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCG CGC**AGAGAGGGAGTGGCCA	SEQ ID NO: 26（右 ITR-29）	AGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTC **TGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGAC CAAAGGTCGCCCGACG CCCTTTGGGCGGCCTCA**

[0348]

	ACTCCATCACTAGGGGTTCCT		**GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG**
SEQ ID NO: 45（左ITR-46）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG**CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 27（右ITR-30）	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC**TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCTTTGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 46（左ITR-47）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCAAAGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 28（右ITR-31）	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC**TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCTTTGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 47（左ITR-48）	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAACGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 29（右ITR-32）	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC**TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGTTTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGCTGCCTGCAGG

[0349] 在一些实施方案中，包含不对称ITR对的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够包含具有修饰的ITR，所述修饰对应于以下序列中的任一修饰：本文表5A-5B中的任一个或多个中所示的ITR序列或ITR部分序列；或2018年12月6日提交的国际申请PCT/US2018/064242的图7A-7B中所示的序列，所述国际申请全文并入本文中；或2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996的表2、3、4、5、6、7、8、9或10A-10B中所公开的序列，所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0350] V.示例性ceDNA载体

[0351] 如上所述，本公开涉及重组ceDNA表达载体和编码FVIII蛋白的ceDNA载体，其包含以下中的任一种：如上所述的不对称的ITR对、对称的ITR对或基本上对称的ITR对。在某些实施方案中，本公开涉及用于表达FVIII蛋白的重组ceDNA载体，其具有侧接的ITR序列和转基因，其中如本文所定义，ITR序列相对于彼此是不对称的、对称的或基本对称的，并且ceDNA进一步包含位于侧接的ITR之间的所关注核苷酸序列(例如包含转基因的核酸的表达盒)，其中所述核酸分子缺乏病毒衣壳蛋白编码序列。

[0352] 重组用于表达FVIII蛋白的ceDNA表达载体可以是任何ceDNA载体,其可以方便地进行包括如本文所述的核苷酸序列的重组DNA程序,条件是改变至少一个ITR。本公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体与其中将要引入ceDNA载体的宿主细胞相容。在某些实施方案中,ceDNA载体可以是线性的。在某些实施方案中,ceDNA载体可以作为染色体外实体存在。在某些实施方案中,本公开的ceDNA载体可以含有容许供体序列整合到宿主细胞基因组中的元件。如本文所用,"转基因"与"异源核苷酸序列"同义,并且编码FVIII蛋白,如本文所述。

[0353] 现参考图1A-1G,显示了用于制备用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的两个非限制性质粒的功能组分示意图。图1A、1B、1D、1F显示了ceDNA载体的构建体或用于表达FVIII蛋白的ceDNA质粒的相应序列。ceDNA载体是无衣壳的并且能够获自质粒,所述质粒按照此次序编码:第一ITR、可表达的转基因盒,和第二ITR,其中如本文所定义,第一与第二ITR序列相对于彼此是不对称的、对称的或基本对称的。ceDNA载体是无衣壳的并且能够获自质粒,所述质粒按照此次序编码:第一ITR、可表达的转基因(蛋白质或核酸),和第二ITR,其中如本文所定义,第一与第二ITR序列相对于彼此是不对称的、对称的或基本对称的。在一些实施方案中,可表达的转基因盒在需要时包括:增强子/启动子、一个或多个同源臂、供体序列、转录后调控元件(例如WPRE,例如SEQ ID NO:67)),以及聚腺苷酸化和终止信号(例如,BGH polyA,例如,SEQ ID NO:68)。

[0354] 图5是使用实施例中所述的方法证实从多个质粒构建体产生ceDNA的凝胶。如关于图4A和实施例中所讨论的,ceDNA通过凝胶中的特征色带图案来证实。

[0355] A.调控元件.

[0356] 包含如本文所定义的不对称ITR对或对称ITR对的如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够进一步包含顺式调控元件的特定组合。顺式调控元件包含但不限于:启动子、核糖开关、隔离子、mir可调控元件、转录后调控元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在一些实施方案中,ITR可以充当转基因(例如,FVIII蛋白)的启动子。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包括调控转基因表达的其它组分,例如如本文所描述的调控转基因表达的调控开关,或可以杀灭包含编码其FVIII蛋白的ceDNA载体的细胞的杀灭开关。国际申请PCT/US18/49996中更充分地论述了本发明中能够使用的调控元件,包括调控开关,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0357] 在实施方案中,第二核苷酸序列包括调控序列和编码核酸酶的核苷酸序列。在某些实施方案中,基因调控序列与编码核酸酶的核苷酸序列可操作地连接。在某些实施方案中,调控序列适合于控制核酸酶在宿主细胞中的表达。在某些实施方案中,调控序列包括适合的启动子序列,其能够引导可操作地连接到启动子序列的基因转录,例如编码本公开的核酸酶的核苷酸序列。在某些实施方案中,第二核苷酸序列包括连接到编码核酸酶的核苷酸序列的5'末端的内含子序列。在某些实施方案中,在启动子的上游提供增强子序列以增加启动子的功效。在某些实施方案中,调控序列包括增强子和启动子,其中第二核苷酸序列包括在编码核酸酶的核苷酸序列上游的内含子序列,其中内含子包括一个或多个核酸酶裂解位点,并且其中启动子与编码核酸酶的核苷酸序列可操作地连接。

[0358] 以合成方式或使用如本文实施例中所述的基于细胞的产生方法产生的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够进一步包含顺式调控元件的特定组合,例如WHP转录后调控元

件(WPRE)(例如SEQ ID NO:67)和BGH polyA(SEQ ID NO:68)。适用于表达构建体中的表达盒不受病毒衣壳强加的包装约束的限制。

[0359] (i)启动子：

[0360] 所述领域普通技术人员将了解,适当时应该根据它们启动的特定序列来定制如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中所用的启动子。根据一些实施方案,启动子是2020年3月6日提交的国际申请号PCT/US2020/021328中阐述的任何启动子或启动子序列,所述国际申请以全文引用的方式并入本文。

[0361] 根据一些实施方案,启动子是VandenDriessche(VD)启动子。根据一些实施方案,VD启动子包含如下所示SEQ ID NO:191:CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTG(SEQ ID NO:191)。

[0362] 根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约85％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约90％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约95％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约96％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约97％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约98％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子包含与SEQ ID NO:191至少约99％相同的核酸序列。根据一些实施方案,启动子由SEQ ID NO:191的核酸序列组成。

[0363] 用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的表达盒能够包括启动子,所述启动子能够影响整体表达水平以及细胞特异性。为了转基因表达,例如,FVIII蛋白表达,它们可以包含高度活性的病毒源即刻早期启动子。表达盒可以含有组织特异性的真核启动子,以将转基因表达限制在特定细胞类型,并减少由不受调控的异常表达引起的毒性效应和免疫应答。在一些实施方案中,表达盒能够含有启动子或合成调控元件,例如CAG启动子(SEQ ID NO:72)。CAG启动子包括(i)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件,(ii)鸡β-肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子,以及(iii)兔β-珠蛋白基因的剪接受体。替代地,表达盒能够含有α-1-抗胰蛋白酶(AAT)启动子(SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74)、肝脏特异性(LP1)启动子(SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76),或人延伸因子-1α(EF1a)启动子(例如SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:78)。在一些实施方案中,表达盒包括一个或多个组成型启动子,例如逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地具有RSV增强子),或巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子(任选地具有CMV增强子,例如SEQ ID NO:79)。可替代地,可以使用诱导型启动子、转基因的天然启动子、组织特异性启动子或所属领域已知的各种启动子。

[0364] 适合的启动子,包含上文所描述的那些启动子,可以来源于病毒并因此可以称为病毒启动子,或其可以来源于任何生物体,包含原核或真核生物体。适合的启动子可以用于通过任何RNA聚合酶(例如,pol I、pol II、pol III)来驱动表达。示例性启动子包括(但不限于)SV40早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒长末端重复(LTR)启动子;腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP);单纯疱疹病毒(HSV)启动子、细胞巨大病毒(CMV)启动子(例如CMV即刻早期启

动子区域(CMVIE))、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、人U6小核启动子(U6,例如SEQ ID NO:80)(Miyagishi等人,《自然·生物技术(Nature Biotechnology)》20,497-500(2002))、增强型U6启动子(例如Xia等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》2003年9月1日;31(17))、人H1启动子(H1)(例如SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:155)、CAG启动子、人α1-抗胰蛋白酶(HAAT)启动子(例如SEQ ID NO:82)等等。在某些实施方案中,这些启动子在其下游含内含子的末端处被改变以包括一个或多个核酸酶裂解位点。在某些实施方案中,含有核酸酶裂解位点的DNA与启动子DNA是无关的。

[0365] 在一个实施方案中,使用的启动子是编码治疗性蛋白的基因的天然启动子。编码治疗蛋白的相应基因的启动子和其它调控序列是已知的并且已被表征。所用的启动子区还可以包括一个或多个另外的调控序列(例如,天然的),例如增强子(例如SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:83),包括SV40增强子(SEQ ID NO:126)。

[0366] 在一些实施方案中,启动子还可以是来自人基因的启动子,例如人泛素C(hUbC)、人肌动蛋白、人肌凝蛋白、人血红素、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白。启动子还可以是组织特异性启动子,例如肝脏特异性启动子,例如天然或合成的人α1-抗胰蛋白酶(HAAT)。在一个实施方案中,使用内源性ApoE、经由存在于肝细胞表面上的低密度脂蛋白(LDL)受体将包含ceDNA载体的组合物特异性靶向肝细胞可以实现向肝脏的递送。

[0367] 本发明适用的启动子的非限制性实施例包括本文所述的启动子的任一种或以下中的任一种:例如CAG启动子(SEQ ID NO:72)、HAAT启动子(SEQ ID NO:82)、人EF1-α启动子(SEQ ID NO:77),或EF1a启动子(SEQ ID NO:78)、IE2启动子(例如SEQ ID NO:84)和大鼠EF1-α启动子(SEQ ID NO:85)的片段、mEF1启动子(SEQ ID NO:59),或1E1启动子片段(SEQ ID NO:125)。

[0368] (ii)增强剂

[0369] 在一些实施方案中,表达FVIII的ceDNA包含一种或多种增强子。在一些实施方案中,增强子序列位于启动子序列的5'。在一些实施方案中,增强子序列位于启动子序列的3'。根据一些实施方案,增强子是2020年3月6日提交的国际申请号PCT/US2020/021328中阐述的任何增强子或增强子序列,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0370] (iii)5'UTR序列和内含子序列

[0371] 在一些实施方案中,ceDNA载体包含5'UTR序列和/或位于5'ITR序列的3'的内含子序列。在一些实施方案中,5'UTR位于转基因的5',例如编码FVIII蛋白的序列。国际申请号PCT/US2020/021328中列出了示例性5'UTR序列,例如在表9A中,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0372] (iv)3'UTR序列

[0373] 在一些实施方案中,ceDNA载体包含位于3'ITR序列的5'的3'UTR序列。在一些实施方案中,3'UTR位于转基因的3',例如编码FVIII蛋白的序列。国际申请号PCT/US2020/021328中列出的示例性3'UTR序列,例如在表9B中,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0374] (v)聚腺苷酸化序列:

[0375] 用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中可包括编码多聚腺苷酸化序列的序列,以稳定由ceDNA载体表达的mRNA,并有助于核输出和翻译。在一个实施方案中,ceDNA载体不包括聚

腺苷酸化序列。在其他实施方案中，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包括至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少45个、至少50个或更多个腺嘌呤二核苷酸。在一些实施方案中，聚腺苷酸化序列包括约43个核苷酸、约40-50个核苷酸、约40-55个核苷酸、约45-50个核苷酸、约35-50个核苷酸或它们之间的任何范围。

[0376] 表达盒可以包含本领域已知的任何聚腺苷酸化序列或其变体。在一些实施方案中，聚腺苷酸化(polyA)序列选自国际申请号PCT/US2020/021328中列出的任何那些，例如在表10中，所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。也可以使用本领域公知的其他polyA序列，例如，包括但不限于从牛BGHpA(例如，SEQ ID NO:68)或病毒SV40pA(例如，SEQ ID NO:86)中分离的天然存在的序列，或合成序列(例如，SEQ ID NO:87)。一些表达盒还可以包含SV40晚期polyA信号上游增强子(USE)序列。在一些实施方案中，USE可以与SV40pA或异源聚A信号组合使用。PolyA序列位于编码FVIII蛋白的转基因的3'。

[0377] 表达盒还可以包含转录后元件以增加转基因的表达。在一些实施方案中，使用土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)(例如SEQ ID NO:67)增强转基因表达。可以使用其它转录后处理元件，如来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因或乙型肝炎病毒(HBV)的转录后元件。分泌序列可以连接到转基因，例如VH-02和VK-A26序列，例如SEQ ID NO:和SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89。

[0378] (vi)核定位序列

[0379] 在一些实施方案中，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含一个或多个核定位序列(NLS)，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个NLS。在一些实施方案中，一个或多个NLS位于氨基端或附近、羧基端或附近，或这些位置的组合(例如氨基端的一个或多个NLS和/或羧基端的一个或多个NLS)。当存在超过一个NLS时，可以彼此独立地选择，使得单个NLS可以呈超过一个拷贝存在和/或与呈一个或多个拷贝存在的一个或多个其他NLS组合存在。NLS的非限制性实施例如表7所示。

[0380] 表7:核定位信号

[0381]

来源	*序列*	*SEQ ID NO.*
SV40病毒大T抗原	PKKKRKV(由CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTG编码；SEQ ID NO: 91)	90
核质蛋白	KRPAATKKAGQAKKKK	92
c-myc	PAAKRVKLD	93
	RQRRNELKRSP	94
hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY	95
来自输入蛋白-α的IBB域	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	96
肌瘤T蛋白	VSRKRPRP	97
	PPKKARED	98
人p53	PQPKKKPL	99
小鼠c-abl IV	SALIKKKKKMAP	100
流感病毒NS1	DRLRR	117
	PKQKKRK	118
肝炎δ病毒抗原	RKLKKKIKKL	119
小鼠Mx1蛋白	REKKKFLKRR	120
人聚（ADP-核糖）聚合酶	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK	121
类固醇激素受体（人）糖皮质激素	RKCLQAGMNLEARKTKK	122

[0382] B.ceDNA载体的其它组分

[0383] 本公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以含有编码用于基因表达的其它组分的核苷酸。例如，为了选择特定的基因靶向事件，可以将保护性shRNA嵌入微型RNA中，然后插入被设计成位点特异性地整合至高活性基因座(如白蛋白基因座)中的重组ceDNA载体中。这样的实施方案可以提供用于在任何遗传背景下体内选择和扩增基因修饰的肝细胞的系统，例如在Nygaard等人的《体内选择基因修饰的肝细胞的通用系统(A universal system to select gene-modified hepatocytes in vivo)》《基因疗法(Gene Therapy)》，2016年6月8日)中所述。本公开的ceDNA载体可以含有一种或多种选择性标志物，其允许选择转化、转染、转导等的细胞。选择性标志物是产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原营养、NeoR等的基因。在某些实施方案中，将正向选择标志物并入供体序列中，例如NeoR。可以将负向选择标志物并入供体序列的下游，例如可以将编码负向选择标志物的核酸序列HSV-tk并入供体序列下游的核酸构建体中。

[0384] C.调控开关

[0385] 分子调控开关是一种响应信号而产生可测量的状态变化的开关。此类调控开关能

够与本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体组合使用以控制FVIII蛋白从ceDNA载体中表达的输出。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包含用以微调FVIII蛋白的表达的调控开关。例如,其可以发挥ceDNA载体的生物封存功能。在一些实施方案中,所述开关是"ON/OFF"开关,其设计成以可控和可调方式启动或终止(即,中断)FVIII蛋白在ceDNA载体中的表达。在一些实施方案中,开关可以包含"杀灭开关",一旦所述开关被激活,其就可以指令包括ceDNA载体的细胞经历细胞程序性死亡。涵盖用于FVIII蛋白表达用ceDNA载体中的示例性调控开关可用于调节转基因的表达,并在国际申请PCT/US18/49996中更全面地论述,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。

[0386] (i)二元调控开关

[0387] 在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体包括可以用来可控制地调节FVIII蛋白的表达的调控开关。举例来说,位于ceDNA载体的ITR之间的表达盒可以另外包含与编码FVIII蛋白的核酸操作性连接的调节区域,例如启动子、顺式元件、阻遏子、增强子等,其中调节区由一种或多种辅因子或外源作用剂调节。仅举例来说,调控区可以通过小分子开关或诱导型或阻遏型启动子进行调节。诱导型启动子的非限制性实施例是激素诱导型或金属诱导型启动子。其他示例性诱导型启动子/增强子元件包括(但不限于):RU486诱导型启动子、蜕皮激素诱导型启动子、雷帕霉素诱导型启动子和金属硫蛋白启动子。

[0388] (ii)小分子调控开关

[0389] 所属领域中已知的多种基于小分子的调控开关在所属领域中是已知的,并且可以与本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体组合以形成调控开关控制的ceDNA载体。在一些实施方案中,调控开关可以选自以下中的任何一种或组合:正交配体/核受体对,例如类视黄醇受体变体/LG335和GRQCIMFI,以及控制操作性连接的转基因的表达的人工启动子,如Taylor等人,《BMC生物技术(BMC Biotechnology)》10(2010):15中公开的人工启动子;工程化的类固醇受体,例如C末端截断的经修饰的孕酮受体,其不能结合孕酮但结合RU486(米非司酮)(美国专利第5,364,791号);来自果蝇(Drosophila)的蜕皮激素受体和其蜕皮类固醇配体(Saez等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,97(26)(2000),14512-14517;或由抗生素甲氧苄啶(trimethoprim,TMP)控制的开关,如Sando R第3版;《自然方法(Nat Methods)》。2013,10(11):1085-8。在一些实施方案中,控制转基因或由ceDNA载体表达的调控开关是前药活化开关,如美国专利8,771,679和6,339,070中公开的活化开关。

[0390] (iii)"密码"调控开关

[0391] 在一些实施方案中,调控开关可以是"密码开关"或"密码回路"。在发生特定条件时,也就是说,需要存在条件的组合才能发生转基因表达和/或阻遏时,密码开关允许微调对转基因从ceDNA载体的表达的控制。例如,为了发生转基因的表达,至少必须发生条件A和B。密码调控开关可以是任何数量的条件,例如,要存在至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个、或至少6个、或至少7个或更多个条件方能发生转基因表达。在一些实施方案中,需要发生至少2个条件(例如A、B条件),并且在某些实施方案中,需要发生至少3个条件(例如A、B和C,或A、B和D)。仅举例来说,为了从具有密码"ABC"调控开关的ceDNA发生基因表达,必须存在条件A、B和C。条件A、B和C可以如下:条件A是存在病状或疾病,条件B是激素响应,并且条件C是对转基因表达的响应。举例来说,如果转基因编辑缺陷性EPO基因,那么条件A是存在慢性肾病(CKD),如果受试者的肾脏中有低氧状况,那么发生条件B,条件C是肾脏中产

生促红细胞产生素的细胞(EPC)的募集受损;或可替代地,HIF-2活化受损。一旦氧水平升高或达到期望的EPO水平,转基因就会关闭,直到再次发生3个条件,它重新打开。

[0392] 在一些实施方案中,涵盖用于ceDNA载体中的密码调控开关或“密码回路”包含杂合转录因子(TF)以扩大用于界定生物封存条件的环境信号的范围和复杂度。与在预定条件存在下触发细胞死亡的致命开关相反,“密码回路”允许在特定“密码”存在下细胞存活或转基因表达,并且只有当存在预定环境条件或密码时,才可以容易地重新编程以允许转基因表达和/或细胞存活。

[0393] 本文公开的调控开关,例如小分子开关、基于核酸的开关、小分子-核酸杂合开关、转录后转基因调控开关、翻译后调节、辐射控制开关、低氧介导的开关和如本文公开的本领域中普通技术人员已知的其他调控开关中的任何和所有组合均可以用于如本文公开的密码调控开关中。涵盖使用的调控开关也在综述文章Kis等人,《皇家学会界面杂志(J R Soc Interface)》12:20141000(2015)中论述,并总结在Kis的表1中。在一些实施方案中,用于密码系统中的调控开关能够选自国际专利申请PCT/US18/49996的表11中所公开的任何开关或开关组合,所述专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0394] (iv)控制转基因表达的基于核酸的调控开关

[0395] 在一些实施方案中,控制由ceDNA进行的FVIII蛋白表达的调控开关是建立在基于核酸的控制机理的基础上。示例性核酸控制机构是所属领域中已知的并且是设想使用的。举例来说,此类机理包括核糖开关,例如以下文献中所公开的核糖开关:例如US2009/0305253、US2008/0269258、US2017/0204477、WO2018026762A1、美国专利9,222,093和EP申请EP288071;以及Villa JK等人的评论中所公开的核糖开关,《微生物学光谱(Microbiol Spectr.)》2018年5月;6(3)。还包括代谢物响应性转录生物传感器,例如WO2018/075486和WO2017/147585中公开的那些。设想使用的其他本领域已知的机制包括用siRNA或RNAi分子(例如miR、shRNA)使转基因沉默。例如,ceDNA载体可以包含编码与ceDNA载体所表达的转基因的两部分互补的RNAi分子的调控开关。当此类RNAi表达时,即使ceDNA载体表达转基因(例如FVIII蛋白),所述转基因也将因互补的RNAi分子而沉默,并且当ceDNA载体表达转基因时而所述RNAi未表达时,所述转基因(例如FVIII蛋白)不会因RNAi沉默。

[0396] 在一些实施方案中,调控开关是组织特异性自失活调控开关,例如如US2002/0022018中所公开,其中调控开关在其中转基因表达原本可能不利的位点有意地将转基因(例如FVIII蛋白)表达关闭。在一些实施方案中,调控开关是重组酶可逆基因表达系统,例如如US2014/0127162和美国专利8,324,436中所公开。

[0397] (v)转录后和翻译后调控开关

[0398] 在一些实施方案中,控制ceDNA载体表达FVIII蛋白的调控开关是转录后修饰系统。例如,此类调控开关可以是对四环素或茶碱敏感的适体酶(aptazyme)核糖开关,如以下中所公开:US2018/0119156、GB201107768、WO2001/064956A3、欧洲专利2707487和Beilstein等人,《ACS合成生物学(ACS Synth.Biol.)》,2015,4(5),第526-534页;Zhong等人,Elife.2016年11月2日;5.pii:e18858。在一些实施方案中,设想所属领域的普通技术人员可以编码转基因和含有配体敏感性(OFF-开关)适体的抑制性siRNA二者,净结果是配体敏感性ON-开关。

[0399] (vi)其他示例性调控开关

[0400] 任何已知的调控开关可以用于ceDNA载体中以控制ceDNA载体进行的FVIII蛋白表达,包含环境变化所触发的那些。另外的实施例包含(但不限于);以下中BOC方法:Suzuki等人,《科学报告8(Scientific Reports 8)》;10051(2018);遗传密码扩展和非生理氨基酸;辐射控制或超声控制的on/off开关(参见例如Scott S等人,《基因疗法》,2000年7月;7(13):1121-5;美国专利5,612,318;5,571,797;5,770,581;5,817,636;以及WO1999/025385A1。在一些实施方案中,调控开关是由可植入系统控制,例如如美国专利7,840,263;US2007 0190028A1中所公开,其中基因表达由一种或多种形式的能量控制,包括电磁能,所述能量将可操作地连接到ceDNA载体中的转基因的启动子活化。

[0401] 在一些实施方案中,设想用于ceDNA载体中的调控开关是低氧介导或应激活化的开关,例如以下文献中所公开的那些:WO1999060142A2、美国专利5,834,306;6,218,179;6,709,858;US2015/0322410;Greco等人(2004)《靶向癌症疗法(Targeted Cancer Therapies)》9;S368以及FROG、TOAD和NRSE元件,以及条件诱导型静默元件,包括低氧应答元件(HRE)、炎症反应元件(IRE)和剪切应激活化元件(SSAE),例如如美国专利9,394,526中所公开。此类实施例可用于在缺血后或在缺血组织和/或肿瘤中打开转基因从ceDNA载体的表达。

[0402] (vii)杀灭开关

[0403] 本文所述的其它实施方案涉及如本文所述用于表达FVIII蛋白的包含杀灭开关的ceDNA载体。如本文公开的杀灭开关能够使包括ceDNA载体的细胞被杀灭或经历程序性细胞死亡,作为从受试者的系统中永久去除引入的ceDNA载体的手段。所属领域的普通技术人员将了解,杀灭开关在用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中的使用通常联接ceDNA载体靶向受试者可以接受地所能失去的有限数目个细胞或靶向希望细胞凋亡的细胞类型(例如癌细胞)。在所有方面,如本文公开的“杀灭开关”被设计成在缺乏输入的存活信号或其它指定条件下提供对包括ceDNA载体的细胞的快速而稳固的细胞杀灭。换句话说,由如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体编码的杀灭开关可以将包含ceDNA载体的细胞的细胞存活限制在特定输入信号所限定的环境。如果希望从受试者中去除用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体或确保其不表达所编码的FVIII蛋白,那么此类杀灭开关发挥生物学的生物封存功能。

[0404] 所属领域的普通技术人员已知的其它杀灭开关涵盖用于如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体中,所述杀灭开关例如如以下文献中所公开:US2010/0175141;US2013/0009799;US2011/0172826;US2013/0109568;以及以下文献中所公开的杀灭开关:Jusiak等人,《细胞生物学和分子医药评论(Reviews in Cell Biology and molecular Medicine)》;2014;1-56;Kobayashi等人,《美国国家科学院院刊》,2004;101;8419-9;Marchisio等人,《国际生物化学和细胞生物学杂志(Int.Journal of Biochem and Cell Biol.)》,2011;43;310-319;以及Reinshagen等人,《科学转化医学(Science Translational Medicine)》2018,11。

[0405] 因此,在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以包括杀灭开关核酸构建体,其包括编码效应子毒素或报告蛋白的核酸,其中效应子毒素(例如死亡蛋白)或报告蛋白的表达受预定条件控制。举例来说,预定条件可以是存在环境试剂,例如外源试剂,在没有所述环境试剂的情况下,细胞将默认表达效应毒素(例如死亡蛋白质)并且被杀灭。在替代性实施方案中,预定条件是存在两种或更多种环境试剂,例如细胞将仅在提供两

种或更多种必需的外源试剂时存活,而在其中的任一种不存在的情况下,包含ceDNA载体的细胞被杀灭。

[0406] 在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体经修饰以并入杀灭开关,从而破坏包括ceDNA载体的细胞,以有效地终止ceDNA载体正在表达的转基因的体内表达(例如FVIII蛋白的表达)。具体地说,进一步对ceDNA载体进行基因工程改造以表达在哺乳动物细胞中、在正常生理学条件下不具功能性的开关蛋白。仅在药物施用后或在特异性靶向这种开关蛋白的环境条件下,表达开关蛋白的细胞被破坏,从而终止治疗蛋白或肽的表达。举例来说,据报告,表达HSV-胸苷激酶的细胞在药物(例如苷昔洛韦(ganciclovir)和胞嘧啶脱氨酶)施用后可以被杀灭。参见例如Dey和Evans,《单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSV-TK)的自杀基因疗法(Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK))》,于You编辑的《基因疗法中的靶标(Targets in Gene Therapy)》(2011)中;以及Beltinger等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)》96(15):8699-8704(1999)。在一些实施方案中,ceDNA载体可以包括siRNA杀灭开关,称为DISE(存活基因排除所诱发的死亡)(Murmann等人,《肿瘤标靶(Oncotarget)》2017;8:84643-84658。DISE在体内卵巢癌细胞中的诱导(Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo))。

[0407] VI.产生ceDNA载体的详细方法

[0408] A.通用产生

[0409] 用于产生ceDNA载体的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US1849996的章节IV中,所述ceDNA载体包含如本文所定义的不对称ITR对或对称ITR对,用于表达FVIII蛋白,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,可以使用如本文所述的昆虫细胞来生产如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体。在替代性实施方案中,如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够以合成方式生产并且在一些实施方案中以无细胞方法生产,如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122所公开,所述国际申请以全文引用的方式并入本文。

[0410] 如本文所述,在一个实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够通过例如包含以下步骤的方法获得:a)在诱导宿主细胞内产生ceDNA载体的有效条件和充足时间下,在Rep蛋白存在下,培育含有缺乏病毒衣壳编码序列的多核苷酸表达构建体模板(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒,和/或ceDNA杆状病毒)的宿主细胞(例如昆虫细胞)群,且其中宿主细胞不包含病毒衣壳编码序列;和b)从宿主细胞中收获且分离出ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰的ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生ceDNA载体。然而,没有表达病毒粒子(例如AAV病毒粒子)。因此,没有大小限制,如在AAV或其它基于病毒的载体中天然强加的大小限制。

[0411] 可以通过以下来确认从宿主细胞分离的ceDNA载体的存在:用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶来消化从宿主细胞分离的DNA,并在非变性凝胶上分析消化的DNA材料,以与线性和非连续DNA相比确认线性和连续DNA的特征带的存在。

[0412] 在又另一方面,本发明提供了将DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板)稳定地整合至其自身基因组中的宿主细胞系的用途,所述细胞系用于产生非病毒DNA载体,例如如Lee,L.等人(2013)《公共科学图书馆综合(Plos One)》8(8):e69879中所描述的。优选地,Rep以约3的MOI加入宿主细胞中。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系、例如HEK293细胞时,所

述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板，并且可以使用第二载体、例如疱疹病毒将Rep蛋白引入细胞中，使得在Rep和辅助病毒存在下切除和扩增ceDNA。

[0413] 在一个实施方案中，用于制备本文所描述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的宿主细胞是昆虫细胞，并使用杆状病毒递送编码Rep蛋白的多核苷酸和用于ceDNA的非病毒DNA载体多核苷酸表达构建体模板，例如如图4A-4C和实施例1中所描述。在一些实施方案中，宿主细胞经工程改造以表达Rep蛋白。

[0414] 然后从宿主细胞中收获和分离ceDNA载体。从细胞采集和收集本文所描述的ceDNA载体的时间可以进行选择和优化，以实现高产率地产生ceDNA载体。例如，可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等来选择收获时间。在一个实施方案中，细胞在足以产生ceDNA载体的条件下生长，并在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体但在大多数细胞开始因杆状病毒毒性而死亡之前的时间采集。可以使用质粒纯化试剂盒，例如Qiagen Endo-Free Plasmid试剂盒分离DNA载体。为分离质粒而开发的其它方法也适用于DNA载体。通常，可以采用任何核酸纯化方法。

[0415] DNA载体可以通过所属领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施例中，ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施例中，将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0416] 用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的存在可以如下证实：使用在DNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化从细胞中分离出的载体DNA，并且使用凝胶电泳术分析已消化和未消化的DNA材料，从而相较于线性和非连续DNA来证实线性和连续DNA的特征色带的存在。图4C和图4D展示了用于鉴定通过本文的方法产生的闭合端ceDNA载体的存在的一个实施方案。

[0417] B.ceDNA质粒

[0418] ceDNA-质粒是用于后期产生用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的质粒。在一些实施方案中，ceDNA质粒可以使用已知的技术构建，以在转录方向上提供至少下列作为操作性连接的组分：(1)修饰5’ITR序列；(2)含有例如启动子、诱导型启动子、调控开关、增强子等顺式调控元件的表达盒；以及(3)修饰3’ITR序列，其中3’ITR序列相对于5’ITR序列是对称的。在一些实施例中，侧接ITR的表达盒包括用于引入外源序列的克隆位点。表达盒替换了AAV基因组的rep和cap编码区。

[0419] 一方面，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体是从质粒获得，该质粒在本文中称为“ceDNA-质粒”，其按以下顺序编码：第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、包括转基因的表达盒、以及突变或修饰AAV ITR，其中所述ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列。在替代实施方案中，ceDNA-质粒依次编码：第一(或5’)修饰或突变AAV ITR、包含转基因的表达盒、以及第二(或3’)修饰AAV ITR，其中所述ceDNA质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列，并且其中5’和3’ITR彼此对称。在替代实施方案中，ceDNA质粒依次编码：第一(或5’)修饰或突变AAV ITR、包含转基因的表达盒、以及第二(或3’)突变或修饰AAV ITR，其中所述ceDNA质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列，并且其中5’和3’修饰ITR具有相同的修饰(即彼此反向互补或对称)。

[0420] 在另一个实施方案中，ceDNA-质粒系统不含病毒衣壳蛋白编码序列(即，其不含AAV衣壳基因，也没有其他病毒的衣壳基因)。另外，在特定实施例中，ceDNA-质粒还不含AAV

Rep蛋白编码序列。因此,在一个优选实施例中,ceDNA-质粒缺乏AAV2的功能性AAV cap和AAV rep基因GG-3'加上允许发夹形成的可变回文序列。

[0421] 本发明的ceDNA-质粒可以使用本领域公知的任何AAV血清型的基因组的天然核苷酸序列来产生。在一个实施例中,ceDNA-质粒主链源自于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV 11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组。例如,NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261;Kotin和Smith,《Springer病毒索引(The Springer Index of Viruses)》,在Springer维护的URL上可得(www网址:oesys.springer.de/viruses/database/mkchapter.asp?virID=42.04.)(注意-对URL或数据库的引用是指截至本申请生效提交日为止的URL或数据库的内容)。在一个特定实施方案中,ceDNA-质粒主链源自于AAV2基因组。在另一个特定实施例中,ceDNA-质粒主链是合成的主链,其经过基因工程以在它的5'和3'ITR处包含源自于这些AAV基因组之一。

[0422] ceDNA-质粒可以任选地包括选择性或选择标志物,用于建立产生ceDNA载体的细胞系。在一个实施方案中,选择标志物能够插入3'ITR序列的下游(即,3')。在另一个实施方案中,选择标志物能够插入5'ITR序列的上游(即,5')。适当的选择标志物包括例如赋予耐药性的标志物。选择标志物可以是例如杀稻瘟菌素S抗性基因、卡那霉素(kanamycin)、遗传霉素(geneticin)等。在优选实施方案中,药物选择标志物是杀稻瘟菌素S抗性基因。

[0423] 用于表达FVIII蛋白的示例性ceDNA(例如,rAAV0)载体由rAAV质粒产生。一种用于产生rAAV载体的方法可以包括:(a)为宿主细胞提供如上文所描述的rAAV质粒,其中宿主细胞和质粒均不含衣壳蛋白编码基因,(b)在允许产生ceDNA基因组的条件下培养宿主细胞;以及(c)采集细胞并分离从所述细胞产生的AAV基因组。

[0424] C.从ceDNA质粒制备ceDNA载体的示例性方法

[0425] 本文还提供了制备用于表达FVIII蛋白的无衣壳的ceDNA载体的方法,特别是具有足够高的产率以提供足够的载体用于体内实验的方法。

[0426] 在一些实施例中,产生用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的方法包含以下步骤:(1)将包含表达盒和两个对称ITR序列的核酸构建体引入宿主细胞(例如Sf9细胞)中;(2)任选地,例如通过使用质粒上存在的选择标记建立克隆细胞系;(3)将Rep编码基因引入(通过用携带所述基因的杆状病毒转染或感染)所述昆虫细胞中;以及(4)收获细胞并纯化ceDNA载体。上述用于产生ceDNA载体的包含表达盒和两个ITR序列的核酸构建体可以呈ceDNA-质粒的形式,或如下所述用ceDNA-质粒产生的杆粒或杆状病毒的形式。可以通过转染、病毒转导、稳定整合或所属领域中已知的其它方法将核酸构建体引入宿主细胞中。

[0427] D.细胞系

[0428] 用于产生用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的宿主细胞系可以包含来源于草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)的昆虫细胞系,如Sf9 Sf21,或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)细胞,或其它无脊椎动物、脊椎动物或其它真核细胞系,包含哺乳动物细胞。也可以使用普通技术人员已知的其他细胞系,如HEK293、Huh-7、HeLa、HepG2、HeplA、911、CHO、COS、MeWo、NIH3T3、A549、HT1 180、单核细胞、以及成熟和不成熟的树突状细胞。可以转染宿主细胞系以稳定表达ceDNA-质粒,从而高产率地产生ceDNA载体。

[0429] 可以使用本领域已知的试剂(例如脂质体、磷酸钙)或物理手段(例如电穿孔),通

过瞬时转染将ceDNA-质粒引入Sf9细胞中。可替代地,可以建立将ceDNA-质粒稳定整合至基因组中的稳定Sf9细胞系。此类稳定细胞系可以通过如上文所描述将选择标志物并入ceDNA-质粒中来建立。如果用于转染细胞系的ceDNA-质粒包含选择标志物,如抗生素,那么可以通过向细胞生长培养基中加入抗生素来选择已用ceDNA-质粒转染并将ceDNA-质粒DNA整合到基因组中的细胞。然后可以通过单细胞稀释或集落转移技术来分离细胞的抗性克隆并增殖。

[0430] E.分离和提纯ceDNA载体:

[0431] 图4A-4E和下面的特定实施例中描述了用于获得和分离ceDNA载体的方法的实施例。本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以从表达一种或多种AAV Rep蛋白的生产细胞获得,进一步用ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒或ceDNA-杆状病毒转化。可用于生产ceDNA载体的质粒包括编码FVIII蛋白的质粒或编码一种或多种REP蛋白的质粒。

[0432] 在一个方面中,多核苷酸编码在质粒(Rep-质粒)、杆粒(Rep-杆粒)或杆状病毒(Rep-杆状病毒)中递送到生产细胞的AAV Rep蛋白(Rep 78或68)。Rep-质粒、Rep-杆粒和Rep-杆状病毒可以通过上文所描述的方法产生。

[0433] 本文描述了产生用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的方法。用于产生如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的表达构建体可以是质粒(例如ceDNA-质粒)、杆粒(例如ceDNA-杆粒)和/或杆状病毒(例如ceDNA-杆状病毒)。仅举例来说,ceDNA-载体可以由用ceDNA-杆状病毒和Rep-杆状病毒共同感染的细胞产生。由Rep-杆状病毒产生的Rep蛋白可以复制ceDNA-杆状病毒以产生ceDNA-载体。可替代地,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以由经构建体稳定转染的细胞产生,所述构建体包含编码AAV Rep蛋白(Rep78/52)的序列,所述AAV Rep蛋白在Rep-质粒、Rep-杆粒或Rep-杆状病毒中递送。ceDNA-杆状病毒可以瞬时转染到细胞中,通过Rep蛋白复制并产生ceDNA载体。

[0434] 杆粒(例如ceDNA-杆粒)能够转染到允许的昆虫细胞中,例如Sf9、Sf21、Tni(粉纹夜蛾)细胞、High Five细胞,并且产生ceDNA-杆状病毒,所述杆状病毒是重组杆状病毒,其包括包含对称ITR的序列和表达盒。ceDNA-杆状病毒能够再次感染到昆虫细胞中以获得下一代重组杆状病毒。任选地,所述步骤可以重复一次或多次以产生更大量的重组杆状病毒。

[0435] 从细胞采集和收集本文所描述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的时间可以进行选择和优化,以实现高产率地产生ceDNA载体。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等来选择收获时间。通常,细胞可在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体(例如ceDNA载体)的时间后但在大多数细胞开始因病毒毒性而死亡之前收获。使用质粒纯化试剂盒,例如Qiagen ENDO-FREE PLASMID®试剂盒,可以从Sf9细胞中分离出ceDNA-载体。为了分离质粒而开发的其它方法也可以适合于ceDNA载体。通常,可以采用所属领域中已知的任何核酸纯化方法,以及可商购的DNA提取试剂盒。

[0436] 可替代地,可以通过对细胞团块进行碱溶解法、离心所得溶解液并进行色谱分离来实施纯化。作为一个非限制性实施例,所述方法可以如下进行:将上清液装载于保留核酸的离子交换柱(例如SARTOBIND Q®)上,然后洗脱(例如使用1.2M NaCl溶液)并且在凝胶过滤柱(例如6个快速流动GE)上进一步进行色谱纯化。然后通过例如沉淀来回收无衣壳的AAV载体。

[0437] 在一些实施例中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体也可以外泌体或微粒形式纯

化。所属领域中已知,许多细胞类型不仅释放出可溶性蛋白质,而且通过膜微囊泡脱落释放出复杂的蛋白质/核酸货物(Cocucci等人,2009;EP 10306226.1)此类囊泡包括微囊泡(也称为微粒)和外泌体(也称为纳米囊泡),二者均包含蛋白质和RNA作为货物。微囊泡由质膜的直接出芽产生,而外泌体在多囊泡内体与质膜融合后释放到细胞外的环境中。因此,可以从已经用ceDNA-质粒转导的细胞或用ceDNA-质粒产生的杆粒或杆状病毒中分离出含有ceDNA载体的微囊泡和/或外泌体。

[0438] 微囊泡可以通过对培养基进行过滤或以20,000×g超速离心来分离,而对外泌体以100,000×g超速离心。超速离心的最佳持续时间可以通过实验确定,并将取决于从中分离出囊泡的特定细胞类型。优选地,首先利用低速离心(例如在2000×g下进行5-20分钟)清除培养基并且使用例如AMICON®离心柱(密理博(Millipore),英国赫特福德郡(Watford,UK))进行离心浓缩。微米囊泡和外泌体可以通过使用识别存在于微米囊泡和外泌体上的特定表面抗原的特异性抗体,通过FACS或MACS进一步提纯。其他微米囊泡和外泌体提纯方法包括但不限于免疫沉淀、亲和色谱、过滤和涂有特异性抗体或适体的磁珠。提纯后,用例如磷酸盐缓冲盐水洗涤囊泡。使用微囊泡或外泌体递送含ceDNA的囊泡的一个优点是,这些囊泡可以通过在其膜蛋白上包括被相应细胞类型上的特异性受体识别的蛋白质而靶向各种细胞类型。(也参见EP 10306226)

[0439] 本文发明的另一方面涉及从已将ceDNA构建体稳定整合到自身基因组中的宿主细胞系中纯化ceDNA载体的方法。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施例中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0440] 国际申请PCT/US18/49996的图5显示了确认ceDNA使用实施例中所述的方法从多种ceDNA-质粒构建体产生的凝胶。如关于图4D和实施例中所讨论的,ceDNA通过凝胶中的特征色带图案来证实。

[0441] VII.药物组合物

[0442] 在另一方面,提供了药物组合物。医药组合物包含如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体和药学上可接受的载剂或稀释剂。

[0443] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够并入适于施用于受试者的医药组合物中以便体内递送到受试者的细胞、组织或器官。通常,药物组合物包括如本文公开的ceDNA-载体和药学上可接受的载剂。例如,可以将本文所描述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体并入适合于期望的治疗施用途径(例如肠胃外施用)的药物组合物中。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及例如核内显微注射或胞浆内注射等细胞内注射进行的被动组织转导。用于治疗目的的医药组合物能够配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合高ceDNA载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分之一或组合一起并入适当的缓冲液中、然后进行过滤灭菌来制备。可以配制包括ceDNA载体,以将核酸中的转基因递送到接受者的细胞,使得转基因或供体序列在其中治疗性表达。组合物还可以包含药学上可接受的载剂。

[0444] 包含用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的医药活性组合物能够被配制成将用于不同目的的转基因递送到细胞,例如受试者的细胞。

[0445] 用于治疗目的的药物组合物通常必须在制造和存储条件下是无菌的和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高ceDNA载体浓度的有序结构。

无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起并入适当的缓冲液中，接着进行过滤灭菌来制备。

[0446] 如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可并入适合于局部、全身、羊膜内、鞘内、颅内、动脉内、静脉内、淋巴内、腹膜内、皮下、气管、组织内(例如肌内、心内、肝内、肾内、脑内)、鞘内、膀胱内、结膜(例如眼眶外、眼眶内、眼眶后、视网膜内、视网膜下、脉络膜、脉络膜下、基质内、前房内和玻璃体内)、耳蜗内和粘膜(例如口腔、直肠、鼻)施用的药物组合物。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及如核内显微注射或胞质内注射的细胞内注射进行的被动组织转导。

[0447] 在一些方面中，本文提供的方法包含将一种或多种如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体递送到宿主细胞。本文还提供了通过这类方法产生的细胞，以及包含这类细胞或由这类细胞产生的生物体(例如动物、植物或真菌)。核酸的递送方法可包括脂质转染、核转染、显微注射、生物弹药、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸偶联物、裸DNA和试剂增强的DNA吸收。脂质转染描述于例如美国专利第5,049,386号、第4,946,787号和第4,897,355号)并且脂质体转染试剂有市售(例如TransfectamTM和LipofectinTM)。能够递送到细胞(例如体外或离体施用)或靶组织(例如体内施用)。

[0448] 将核酸递送到细胞的各种技术和方法是所属领域中已知的。举例来说，可以将核酸(如用于表达FVIII蛋白的ceDNA)配制成脂质纳米粒子(LNP)、类脂(lipidoid)、脂质体、脂质纳米粒子、脂质体复合物(lipoplex)或核壳纳米粒子。通常，LNP由核酸(例如ceDNA)分子、一种或多种可电离或阳离子脂质(或其盐)、一种或多种非离子或中性脂质(例如磷脂)、防止聚集的分子(例如PEG或PEG-脂质偶联物)以及任选的固醇(例如胆固醇)构成。

[0449] 将核酸(例如用于表达FVIII蛋白的ceDNA)递送到细胞的另一种方法是将核酸与被所述细胞内化的配体偶联。例如，配体可以结合细胞表面上的受体并通过胞吞而被内化。配体可以与核酸中的核苷酸共价连接。用于将核酸递送到细胞中的示例性偶联物描述于例如WO2015/006740、WO2014/025805、WO2012/037254、WO2009/082606、WO2009/073809、WO2009/018332、WO2006/112872、WO2004/090108、WO2004/091515和WO2017/177326中。

[0450] 核酸，如用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体，也可以通过转染递送到细胞。有用的转染方法包含(但不限于):脂质介导的转染、阳离子聚合物介导的转染或磷酸钙沉淀。转染试剂在所属领域中是熟知的并且包含(但不限于):TurboFect转染试剂(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific))、Pro-Ject试剂(赛默飞世尔科技)、TRANSPASS™P蛋白转染试剂(新英格兰生物实验室)、CHARIOT™蛋白递送试剂(Active Motif)、PROTEOJUICE™蛋白转染试剂(EMD密理博)、293fectin、LIPOFECTAMINE™2000、LIPOFECTAMINE™3000(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTAMINE™(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTIN™(赛默飞世尔科技)、DMRIE-C、CELLFECTIN™(赛默飞世尔科技)、OLIGOFECTAMINE™(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTACE™、FUGENE™(瑞士巴塞尔的罗氏(Roche,Basel,Switzerland))、FUGENE™HD(罗氏)、TRANSFECTAM™(转染胺，威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega,Madison,Wis.))、TFX-10™(普洛麦格公司)、TFX-20™(普洛麦格公司)、TFX-50™(普洛麦格公司)、TRANSFECTIN™(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(BioRad,Hercules,Calif.))、SILENTFECT™(伯乐公司)、Effectene™(加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司(Qiagen,Valencia,Calif.))、DC-chol(阿凡提极性脂质公司(Avanti Polar Lipids))、

GENEPORTER™(加利福尼亚圣地亚哥的基因疗法系统(Gene Therapy Systems,San Diego,Calif.))、DHARMAFECT 1™(科罗拉多州拉斐特的达尔马肯(Dharmacon,Lafayette,Colo.))、DHARMAFECT 2™(达尔马肯)、DHARMAFECT 3™(达尔马肯)、DHARMAFECT 4™(达尔马肯)、ESCORT™III(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma,St.Louis,Mo.))和ESCORT™IV(西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co.))。核酸,如ceDNA,也可以通过所属领域的技术人员已知的微流体方法递送到细胞。

[0451] 如本文所描述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体也可以直接施用于生物体以在体内转导细胞。施用是通过正常用于引入分子与血液或组织细胞最终接触的任何途径,包含(但不限于):注射、输注、局部施用和电穿孔。适合的施用此类核酸的方法是可利用的并且是所属领域的技术人员熟知的,并且虽然可以使用超过一种途径来施用特定的组合物,但特定的途径经常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0452] 引入如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的核酸载体ceDNA载体的方法可以例如通过如例如美国专利第5,928,638号中所描述的方法来递送到造血干细胞中。

[0453] 根据本发明的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以添加到脂质体中以递送到受试者的细胞或目标器官中。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于这类递送的脂质体组合物由磷脂、特别是具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其它脂质。2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的国际申请PCT/US2018/064242中公开了示例性脂质体和脂质体配方,包括(但不限于)含有聚乙二醇(PEG)官能基的化合物,参见例如标题为“医药配方”的章节。

[0454] 本领域已知的各种递送方法或其改良方法可用于在体外或体内递送ceDNA载体。例如,在一些实施方案中,通过机械、电力、超声波、流体动力或基于激光的能量让细胞膜瞬时渗透以便于DNA进入靶向细胞中来递送用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体。例如,可以通过经过大小限制的通道挤压细胞或通过所属领域中已知的其它手段来瞬时破坏细胞膜来递送ceDNA载体。在一些情况下,单独的ceDNA载体作为裸DNA直接注射到以下任一组织中:任何一种或多种组织选自:肝脏、肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心脏、肠、肺和胃、皮肤、胸腺,心肌或骨骼肌。在一些情况下,通过基因枪递送ceDNA载体。涂覆有无衣壳的AAV载体的金或钨球形颗粒(直径1-3μm)可以通过加压气体加速到高速而渗透到目标组织细胞中。

[0455] 本文特别涵盖包含用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体和药学上可接受的载剂的组合物。在一些实施方案中,ceDNA载体与脂质递送系统,例如本文所述的脂质体一起配制。在一些实施方案中,这类组合物通过熟练从业人员期望的任何途径来施用。可以通过不同途径,包括经口、肠胃外、舌下、经皮直肠、经粘膜、局部、通过吸入、经颊施用、胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鼻内鞘内和关节内或其组合,向受试者施用组合物。对于兽医用途,可根据正常兽医实践将组合物作为适当可接受的配制物施用。兽医可以很容易地确定最适合具体动物的给药方案和施用途径。可以通过传统注射器、无针注射装置、“微弹轰击基因枪”或其它物理方法(例如电穿孔(“EP”)、流体动力学方法或超声波)施用组合物。

[0456] 在一些情况下,通过流体动力注射来递送用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体,这是一种将任何水溶性化合物和颗粒直接经细胞内递送到内脏器官和整个肢体的骨骼肌中的

简单高效的方法。

[0457] 在一些情况下,通过超声波在膜上制造纳米孔,以促进DNA颗粒在细胞内递送到内部器官或肿瘤的细胞中来递送用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体,因此质粒DNA的大小和浓度在所述系统的效率中起着重要作用。在一些情况下,通过使用磁场的磁转染来递送ceDNA载体,以将含有核酸的颗粒集中到目标细胞中。

[0458] 在一些情况下,可以使用化学递送系统,例如通过使用纳米复合物,其包含用属于阳离子脂质体/胶束或阳离子聚合物的聚阳离子纳米颗粒来压紧带负电核酸。用于递送方法的阳离子脂质包含但不限于单价阳离子脂质、多价阳离子脂质、含胍化合物、胆固醇衍生化合物、阳离子聚合物、(例如聚(乙烯亚胺)、聚-L-赖氨酸、鱼精蛋白、其它阳离子聚合物)和脂质-聚合物杂化物。

[0459] A.外泌体

[0460] 在一些实施例中,如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体通过包装在外泌体中来递送。外泌体是胞吞来源的小膜囊泡,其在多囊泡体与质膜融合后被释放到细胞外环境中。其表面由来自供体细胞的细胞膜的脂质双层组成,其含有来自产生外泌体的细胞的胞溶质并且在表面上展现来自亲本细胞的膜蛋白。外泌体由包含上皮细胞、B和T淋巴细胞、肥大细胞(MC)以及树突状细胞(DC)在内的各种细胞类型产生。一些实施例设想使用直径在10nm与1μm之间、20nm与500nm之间、30nm与250nm之间、50nm与100nm之间的外泌体。使用外泌体的供体细胞或通过将特定核酸引入外泌体中,可以分离外泌体以递送到目标细胞中。所属领域中已知的各种方法可以用于产生含有本发明的无衣壳AAV载体的外泌体。

[0461] B.微米粒子/纳米粒子

[0462] 在一些实施方案中,如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体通过脂质纳米颗粒来递送。通常,脂质纳米颗粒包含可电离的氨基脂质(例如4-(二甲基氨基)丁酸三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯、DLin-MC3-DMA、磷脂酰胆碱(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱,DSPC)、胆固醇和外被脂质(聚乙二醇-二肉豆蔻酰基甘油,PEG-DMG),例如如Tam等人(2013)《用于递送siRNA的脂质纳米粒子的进展(Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery.)》,《制药(Pharmaceuticals)》5(3):498-507所公开。

[0463] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒的平均直径在约10nm与约1000nm之间。在一些实施例中,脂质纳米颗粒的直径小于300nm。在一些实施例中,脂质纳米颗粒的直径在约10nm与约300nm之间。在一些实施例中,脂质纳米颗粒的直径小于200nm。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的直径在约25nm与约200nm之间。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒制剂(例如包含多个脂质纳米颗粒的组合物)具有一定的尺寸分布,其中平均尺寸(例如直径)是约70nm至约200nm,且更典型地,平均尺寸是约100nm或更小。

[0464] 本领域已知的各种脂质纳米颗粒可用于递送本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体。例如,在美国专利第9,404,127号、第9,006,417号和第9,518,272号中描述了使用脂质纳米颗粒的各种递送方法。

[0465] 在一些实施方案中,通过金纳米颗粒递送本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体。通常,核酸可以与金纳米粒子共价结合或与金纳米粒子非共价结合(例如通过电荷-电荷相互作用结合),例如如Ding等人(2014)《用于核酸递送的金纳米粒子(Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery.)》,《分子疗法(Mol.Ther.)》22(6):1075-

1083所描述。在一些实施例中，使用例如美国专利第6,812,334号中描述的方法产生金纳米颗粒-核酸偶联物。

[0466] C.偶联物

[0467] 在一些实施方案中，将如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体偶联(例如与增加细胞吸收的药剂共价结合。“增加细胞吸收的药剂”是促进核酸跨脂质膜运输的分子。例如，核酸能够与亲脂性化合物(例如胆固醇、生育酚等)、细胞穿透肽(CPP)(例如穿膜肽、TAT、Syn1B等)和多胺(例如精胺)偶联。增强细胞吸收的试剂的其它实施例公开于例如Winkler(2013)《用于治疗应用的寡核苷酸偶联物(Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications.)》《治疗剂递送(Ther.Deliv.)》4(7);791-809。

[0468] 在一些实施方案中，如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体与聚合物(例如聚合分子)或叶酸类分子(例如叶酸分子)偶联。通常，与聚合物偶联的核酸的递送是所属领域中已知的，例如如WO2000/34343和WO2008/022309中所描述。在一些实施方案中，例如如美国专利第8,987,377号中所描述，将如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体与聚(酰胺)聚合物偶联。在一些实施方案中，如美国专利第8,507,455号中所描述，将本公开所描述的核酸与叶酸分子偶联。

[0469] 在一些实施方案中，例如如美国专利第8,450,467号中所描述，将如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体与碳水化合物偶联。

[0470] D.纳米胶囊

[0471] 可替代地，可以使用如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的纳米胶囊调配物。纳米胶囊通常可以呈稳定并且可再现的方式截留物质。为了避免由于细胞内聚合物过载所致的副作用，应使用能够在体内降解的聚合物来设计此类超细颗粒(尺寸约0.1μm)。满足这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒是预期使用的。

[0472] E.脂质体

[0473] 根据本发明的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以添加到脂质体中以递送到受试者的细胞或目标器官中。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下，脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂，尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成，然而这些组合物还可以包括其他脂质。

[0474] 脂质体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的。已经研发了血清稳定性和循环半衰期有所改善的脂质体(美国专利第5,741,516号)。此外，已经描述了脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载剂的各种方法(美国专利第5,567,434号;第5,552,157号;第5,565,213号;第5,738,868号和第5,795,587号)。

[0475] F.示例性脂质体和脂质纳米颗粒(LNP)组合物

[0476] 根据本发明的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够添加到脂质体中以便递送到细胞，例如需要表达转基因的细胞。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下，脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂，尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成，然而这些组合物还可以包含其它脂质。

[0477] 2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的国际

申请PCT/US2018/064242中公开了包含ceDNA载体的脂质纳米颗粒(LNP),所述国际申请全文并入本文中并且设想用于如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的方法和组合物中。

[0478] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包含一种或多种具有聚乙二醇(PEG)官能团的化合物(所谓的"PEG化的化合物"),所述聚乙二醇官能团可以降低一种或多种所述化合物的免疫原性/抗原性、为其提供亲水性和疏水性并降低剂量频率。或者,脂质体调配物仅包含聚乙二醇(PEG)聚合物作为额外组分。在此类方面,PEG或PEG官能团的分子量可以从62Da至约5,000Da。

[0479] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其将在数小时至数周的时间内以延长释放或受控释放曲线来递送API。在一些相关的方面,脂质体调配物可以包括以脂质双层结合的水性腔。在其它相关方面,脂质体调配物将API与组分一起包封起来,所述组分在升高的温度下经历物理转变,在数小时到数周的时段内释放API。

[0480] 在一些方面,脂质体调配物包括鞘磷脂和一种或多种本文公开的脂质。在一些方面,脂质体调配物包括光敏体。

[0481] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包含一种或多种选自以下的脂质:N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐、(二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺)、MPEG(甲氧基聚乙二醇)偶联的脂质、HSPC(氢化大豆磷脂酰胆碱);PEG(聚乙二醇);DSPE(二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺);DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱);DOPC(二油酰基磷脂酰胆碱);DPPG(二棕榈酰基磷脂酰甘油);EPC(绵羊磷脂酰胆碱);DOPS(二油酰基磷脂酰丝氨酸);POPC(棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱);SM(鞘磷脂);MPEG(甲氧基聚乙二醇);DMPC(二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱);DMPG(二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油);DSPG(二硬脂酰基磷脂酰甘油);DEPC(二芥酰基磷脂酰胆碱);DOPE(二油酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺)、硫酸胆固醇酯(CS)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、DOPC(二油酰基-sn-甘油-磷脂酰胆碱)或其任何组合。

[0482] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括磷脂、胆固醇和PEG化脂质,摩尔比为56:38:5。在一些方面,脂质体调配物的总脂质含量为2-16mg/mL。在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和PEG化脂质。在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和PEG化脂质,摩尔比分别为3:0.015:2。在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、胆固醇和PEG化脂质。在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质和胆固醇。在一些方面,PEG化脂质是PEG-2000-DSPE。在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括DPPG、大豆PC、MPEG-DSPE脂质偶联物和胆固醇。

[0483] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括一种或多种含有磷脂酰胆碱官能团的脂质和一种或多种含有乙醇胺官能团的脂质。在一些方面,本公开提供了一种脂质体调配物,其包括以下中的一种或多种:含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和固醇,例如胆固醇。在一些方面,脂质体调配物包括DOPC/DEPC;和DOPE。

[0484] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体配制物,其还包含一种或多种药物赋形剂,例如蔗糖和/或甘氨酸。

[0485] 在一些方面，本公开提供了一种结构上为单层或多层的脂质体配制物。在一些方面中，本公开提供了一种包含多囊泡颗粒和/或泡沫基颗粒的脂质体配制物。在一些方面，本公开提供了一种相对普通纳米颗粒的相对尺寸更大并且尺寸为约150至250nm的脂质体调配物。在一些方面，脂质体调配物是冻干粉末。

[0486] 在一些方面，本公开提供了一种脂质体调配物，其通过向在脂质体外部具有分离的ceDNA的混合物中添加弱碱，用本文中公开或描述的ceDNA载体制备并负载所述ceDNA载体。这种添加将脂质体外部的pH提高到大致7.3，并驱动API进入脂质体中。在一些方面，本公开提供了一种脂质体内部pH为酸性的脂质体调配物。在此类情况下，脂质体的内部可以处于pH 4-6.9下，并且更优选pH 6.5。在其它方面，本公开提供了一种通过使用脂质体内药物稳定化技术制备的脂质体调配物。在这样的情况下，利用聚合或非聚合的带高电荷阴离子和脂质体内俘获剂，例如多磷酸盐或蔗糖八硫酸盐。

[0487] 在一些方面中，本公开提供了包含ceDNA和可电离脂质的脂质纳米颗粒。举例来说，通过如2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开的方法获得的ceDNA制备并负载ceDNA的脂质纳米粒子配制物，所述申请并入本文中。这可以通过在低pH下将乙醇脂质与ceDNA水溶液高能混合，使可电离脂质质子化并为ceDNA/脂质缔合和粒子成核提供有利的能量来实现。通过水稀释和去除有机溶剂可以进一步稳定粒子。能够将颗粒浓缩至所需水平。

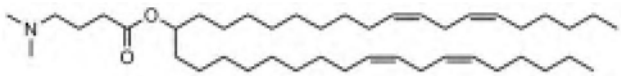
[0488] 通常，以约10:1至30:1的总脂质与ceDNA(质量或重量)比率制备脂质颗粒。在一些实施方案中，脂质与ceDNA比率(质量/质量比率;w/w比率)可以在约1:1至约25:1、约10:1至约14:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1范围内。能够调节脂质和ceDNA的量以提供所需的N/P比，例如N/P比为3、4、5、6、7、8、9、10或更高。通常，脂质颗粒配制物的总脂质含量能够在约5mg/ml至约30mg/mL的范围内。

[0489] 可电离的脂质通常用于在低pH值下浓缩核酸货物(例如ceDNA)并驱动膜缔合和融合。通常，可电离的脂质是包含至少一个氨基的脂质，所述氨基在酸性条件下(例如在pH 6.5或更低的条件下)带正电或质子化。可电离脂质在本文中也称为阳离子脂质。

[0490] 示例性可电离脂质描述于国际PCT专利公开WO2015/095340、WO2015/199952、WO2018/011633、WO2017/049245、WO2015/061467、WO2012/040184、WO2012/000104、WO2015/074085、WO2016/081029、WO2017/004143、WO2017/075531、WO2017/117528、WO2011/022460、WO2013/148541、WO2013/116126、WO2011/153120、WO2012/044638、WO2012/054365、WO2011/090965、WO2013/016058、WO2012/162210、WO2008/042973、WO2010/129709、WO2010/144740、WO2012/099755、WO2013/049328、WO2013/086322、WO2013/086373、WO2011/071860、WO2009/132131、WO2010/048536、WO2010/088537、WO2010/054401、WO2010/054406、WO2010/054405、WO2010/054384、WO2012/016184、WO2009/086558、WO2010/042877、WO2011/000106、WO2011/000107、WO2005/120152、WO2011/141705、WO2013/126803、WO2006/007712、WO2011/038160、WO2005/121348、WO2011/066651、WO2009/127060、WO2011/141704、WO2006/069782、WO2012/031043、WO2013/006825、WO2013/033563、WO2013/089151、WO2017/099823、WO2015/095346和WO2013/086354;以及美国专利公开US2016/0311759、US2015/0376115、US2016/0151284、US2017/0210697、US2015/0140070、US2013/0178541、US2013/0303587、US2015/0141678、US2015/0239926、US2016/0376224、US2017/0119904、US2012/0149894、US2015/0057373、

US2013/0090372、US2013/0274523、US2013/0274504、US2013/0274504、US2009/0023673、US2012/0128760、US2010/0324120、US2014/0200257、US2015/0203446、US2018/0005363、US2014/0308304、US2013/0338210、US2012/0101148、US2012/0027796、US2012/0058144、US2013/0323269、US2011/0117125、US2011/0256175、US2012/0202871、US2011/0076335、US2006/0083780、US2013/0123338、US2015/0064242、US2006/0051405、US2013/0065939、US2006/0008910、US2003/0022649、US2010/0130588、US2013/0116307、US2010/0062967、US2013/0202684、US2014/0141070、US2014/0255472、US2014/0039032、US2018/0028664、US2016/0317458和US2013/0195920,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0491] 在一些实施方案中,可电离脂质为具有以下结构的MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3):

[0492] 

DLin-M-C3-DMA ("MC3")

。

[0493] 脂质DLin-MC3-DMA描述于Jayaraman等人,《英国应用化学国际版(Angew.Chem.Int.Ed Engl.》(2012),51(34):8529-8533,其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0494] 在一些实施方案中,可电离脂质是如WO2015/074085中所述的脂质ATX-002,其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0495] 在一些实施方案中,可电离脂质是如WO2012/040184中所述的(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(化合物32),所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0496] 在一些实施方案中,可电离脂质是如WO2015/199952中所述的化合物6或化合物22,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0497] 没有限制,可电离的脂质可以占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的20-90%(mol)。例如,可电离的脂质摩尔含量可以为脂质纳米颗粒中存在的总脂质的20-70%(mol)、30-60%(mol)或40-50%(mol)。在一些实施方案中,可电离的脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约90mol%。

[0498] 在一些方面中,脂质纳米颗粒可以进一步包含非阳离子脂质。非离子脂质包括两亲脂质、中性脂质和阴离子脂质。因此,非阳离子脂质可以是中性不带电的、两性离子型或阴离子脂质。非阳离子脂质通常用于增强融合性。

[0499] 设想用于如本文所公开的方法和组合物中的示例性非阳离子脂质描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242中,所述国际申请全文并入本文中。示例性非阳离子脂质描述于国际申请公开WO2017/099823和美国专利公开US2018/0028664中,两者的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0500] 非阳离子脂质能够占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0-30%(mol)。例如,非阳离子脂质含量为脂质纳米颗粒中存在的总脂质的5-20%(mol)或10-15%(mol)。在各种实施方案中,可电离的脂质与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

[0501] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒不包含任何磷脂。在一些方面中,脂质纳米颗粒

能够进一步包含例如固醇等组分,以提供膜完整性。

[0502] 能够用于脂质纳米颗粒的一种示例性固醇是胆固醇和其衍生物。示例性胆固醇衍生物描述于国际申请WO2009/127060和美国专利公开US2010/0130588中,所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0503] 提供膜完整性的组分(例如固醇)能够占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0-50%(mol)。在一些实施方案中,此类组分占脂质纳米粒子的总脂质含量的20%-50%(mol)、30%-40%(mol)。

[0504] 在一些方面,脂质纳米粒子可以还包含聚乙二醇(PEG)或偶联的脂质分子。通常,这些用于抑制脂质纳米颗粒的聚集和/或提供空间稳定。示例性的偶联脂质包括但不限于PEG-脂质偶联物、聚噁唑啉(POZ)-脂质偶联物、聚酰胺-脂质偶联物(如ATTA-脂质偶联物)、阳离子聚合物脂质(CPL)偶联物以及其混合物。在一些实施方案中,偶联的脂质分子是PEG-脂质偶联物,例如(甲氧基聚乙二醇)偶联的脂质。示例性PEG-脂质偶联物包括(但不限于):PEG-二酰基甘油(DAG)(如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG丁二酸酯二酰基甘油(PEGS-DAG)(如4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,或其混合物。另外的示例性PEG-脂质偶联物描述于例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224和US2017/0119904中,所有这些文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0505] 在一些实施方案中,PEG-脂质是如US2018/0028664中定义的化合物,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,US20150376115或US2016/0376224中公开了PEG-脂质,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0506] PEG-DAA偶联物可以是例如PEG-二月桂酰氧基丙基、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基、PEG-二棕榈酰氧基丙基或PEG-二硬脂酰氧基丙基。PEG-脂质可以是以下中的一种或多种:PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕榈酰基甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油酰胺、PEG-二肉豆蔻基甘油酰胺、PEG-二棕榈酰基甘油酰胺、PEG-二硬脂基甘油酰胺、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)、PEG-DMB(3,4-二(十四烷氧基)苯甲基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚),以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些实施例中,PEG-脂质可以选自由以下组成的群组:PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

[0507] 还能够使用与除PEG之外的分子偶联的脂质替代PEG-脂质。举例来说,代替PEG-脂质或除PEG-脂质以外,还可以使用聚噁唑啉(POZ)-脂质偶联物、聚酰胺-脂质偶联物(如ATTA-脂质偶联物)和阳离子聚合物脂质(CPL)偶联物。示例性的偶联脂质(即,PEG-脂质、(POZ)-脂质偶联物、ATTA-脂质偶联物和阳离子聚合物-脂质)描述于WO1996/010392、WO1998/051278、WO2002/087541、WO2005/026372、WO2008/147438、WO2009/086558、WO2012/000104、WO2017/117528、WO2017/099823、WO2015/199952、WO2017/004143、WO2015/095346、WO2012/000104、WO2012/000104和WO2010/006282;美国专利申请公开US2003/0077829、

US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2013/0303587、US2018/0028664、US2015/0376115、US2016/0376224、US2016/0317458、US2013/0303587、US2013/0303587和US20110123453;和US5,885,613、US6,287,591、US6,320,017和US6,586,559,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0508] 在一些实施方案中,一种或多种另外的化合物可以是治疗剂。治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。换句话说,治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。换句话说,可以根据治疗目的和所需的生物学作用选择治疗剂。举例来说,如果LNP内的ceDNA可用于治疗血友病A,则另外的化合物可以是抗血友病A剂(例如化学治疗剂、其他血友病A疗法(包括(但不限于)小分子或抗体)。举例来说,如果LNP内的ceDNA可用于治疗血友病A,则另外的化合物可以是抗微生物剂(例如抗生素或抗病毒化合物)。在又一个实施例中,如果含有ceDNA的LNP可用于治疗免疫疾病或病症,那么另外的化合物可以是调控免疫应答的化合物(例如免疫抑制剂、免疫刺激化合物或调控一种或多种特异性免疫途径的化合物)。在一些实施方案中,含有例如编码不同蛋白质的ceDNA或例如治疗剂的不同化合物的不同化合物的不同脂质纳米颗粒的不同混合物可以用于本发明的组合物和方法中。

[0509] 在一些实施方案中,另外的化合物是免疫调节剂。例如,另外的化合物是免疫抑制剂。在一些实施方案中,另外的化合物是免疫刺激剂。本文还提供了一种药物组合物,其包含所产生的经脂质纳米颗粒囊封的昆虫细胞,或如本文所述用于表达FVIII蛋白的合成产生的ceDNA载体,和药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0510] 在一些方面,本公开提供了一种脂质纳米粒子配制物,其还包含一种或多种药物赋形剂。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒配制物还包含蔗糖、三羟甲基氨基甲烷(tris)、海藻糖和/或甘氨酸。

[0511] ceDNA载体能够与颗粒的脂质部分复合或囊封于脂质纳米颗粒的脂质位置。在一些实施方案中,可以将ceDNA完全囊封在脂质纳米颗粒的脂质位置中,从而保护其免于被核酸酶降解,例如在水溶液中。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中的ceDNA在37℃下脂质纳米颗粒暴露于核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟后基本上不降解。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中的ceDNA在颗粒在血清中在37℃下培育至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后基本上不降解。

[0512] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒对受试者,例如对哺乳动物,例如人基本上是无毒的。在一些方面,脂质纳米颗粒配制物是冻干粉末。

[0513] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒是具有至少一个脂质双层的固体芯颗粒。在其它实施方案中,脂质纳米颗粒具有非双层结构,即非层状(即非双层)形态。不受限制,非双层形态能够包括例如三维管、棒、对称立方体等。举例来说,脂质纳米粒子的形态(层状相对于非层状)可以很容易地进行评估,并使用例如Cryo-TEM分析如内容US2010/0130588中所描述来表征,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0514] 在一些其他实施方案中,具有非片层形态的脂质纳米颗粒是电子致密的。在一些方面中,本公开提供了结构上为单层或多层的脂质纳米颗粒。在一些方面中,本公开提供了脂质纳米颗粒配制物,其包含多囊泡颗粒和/或基于泡沫的颗粒。

[0515] 通过控制脂质组分的组成和浓度,可以控制脂质偶联物从脂质颗粒中交换出来的速率,进而可以控制脂质纳米颗粒融合的速率。另外,包括例如pH、温度或离子强度的其他变量可以用于改变和/或控制脂质纳米粒子融合的速率。基于本公开,所属领域的普通技术人员将清楚可以用于控制脂质纳米粒子融合的速率的其他方法。同样显而易见,通过控制脂质偶联物的组成和浓度,可以控制脂质粒子的大小。

[0516] 配制的阳离子脂质的pKa可能与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,《应用化学国际版(Angewandte Chemie,International Edition)》(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》28,172-176(201 0),两个文献都以全文引用的方式并入本文)。pKa的优选范围是约5到约7。使用基于2-(对甲苯胺基)-6-萘磺酸(TNS)荧光的分析测定脂质纳米粒子中阳离子脂质的pKa。

[0517] VIII.使用方法

[0518] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体还能够用于递送所关注核苷酸序列(例如编码FVIII蛋白)到靶细胞(例如宿主细胞)的方法。所述方法尤其可以是将FVIII蛋白递送至有需要的受试者的细胞并治疗血友病A的方法。本发明实现了ceDNA载体中编码的FVIII蛋白在受试者细胞中的体内表达,使得FVIII蛋白表达的治疗效应发生。在ceDNA载体的体内和体外递送模式中均可以看到这些结果。

[0519] 另外,本发明提供了在有需要的受试者的细胞中递送FVIII蛋白的方法,其包括多次施用编码所述FVIII蛋白的本发明的ceDNA载体。由于本发明的ceDNA载体不像对包封病毒载体通常所观察到那样诱发免疫应答,所以这样的多次施用策略将可能在基于ceDNA的系统中取得更大的成功。ceDNA载体的施用量足以转染所需组织的细胞,并提供足够水平的基因转移和FVIII蛋白的表达,而不会产生过度的不利影响。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于视网膜施用(例如视网膜下注射,脉络膜上注射或玻璃体内注射)、静脉内施用(例如在脂质体配制物中)、直接递送至所选器官(例如选自肝脏、肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心脏、肠、肺和胃中的任何一种或多种组织)、肌内施用和其他肠胃外施用途径。如果需要,可以组合施用途径。

[0520] 如本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的递送不限于表达的FVIII蛋白的递送。举例来说,常规产生(例如使用基于细胞的产生方法(例如昆虫细胞产生方法))或合成产生的如本文所述的ceDNA载体可以联合为了提供基因疗法的一部分而提供的其他递送系统使用。可以与根据本公开的ceDNA载体组合的系统的一个非限制性实施例包括为了使表达FVIII蛋白的ceDNA载体实现有效的基因表达而单独递送一种或多种辅因子或免疫抑制剂的系统。

[0521] 本发明还提供了一种治疗受试者的血友病A的方法,所述方法包括将治疗有效量的ceDNA载体任选地与药学上可接受的载剂一起引入受试者的有需要的目标细胞(尤其是肌肉细胞或组织)中。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入,但此类载剂不是必需的。选择的ceDNA载体包含编码可用于治疗血友病A的FVIII蛋白的核苷酸序列。具体地说,ceDNA载体可以包含操作性地连接到控制元件的所期望FVIII蛋白序列,当引入受试者中时,所述控制元件能够引导由外源DNA序列编码的所期望FVIII蛋白转录。ceDNA载体可以通过如上文和本文其它地方提供的任何适合的途径施用。

[0522] 本文提供的组合物和载体可用于FVIII蛋白以用于各种目的。在一些实施方案中,

转基因编码旨在用于研究目的的FVIII蛋白，例如建立具有转基因的体细胞转基因动物模型，例如研究FVIII蛋白产物的功能。在另一个实施例中，转基因编码旨在用于建立血友病A动物模型的FVIII蛋白。在一些实施方案中，编码的FVIII蛋白可用于治疗或预防哺乳动物受试者的血友病A状态。可以将FVIII蛋白以足量转移到患者(例如在其中表达)，以治疗与基因表达降低、缺乏表达或功能障碍有关的血友病A。

[0523] 原则上，表达盒能够包括被视为属于本发明范围内的核酸或任何转基因，其编码因突变而减少或缺乏或当过度表达时达成治疗益处的FVIII蛋白。优选地，本文提供的ceDNA组合物中不存在未插入的细菌DNA，并且优选地不存在细菌DNA。

[0524] ceDNA载体不限于ceDNA载体的一种。因而，在另一个方面中，表达不同蛋白或相同FVIII蛋白、可操作地连接到不同启动子或顺式调控元件的多种ceDNA载体能够同时或依序递送到靶细胞、组织、器官或受试者。因此，这种策略能够允许多个基因同时进行基因疗法或基因递送。还能够将FVIII蛋白的不同部分分离到单独的ceDNA载体中(例如FVIII蛋白的功能所需的不同结构域和/或辅因子)，所述ceDNA载体能够同时或在不同时间施用，并且能够是分别可调控的，借此增添FVIII蛋白的额外表达控制水平。考虑到由于缺乏病毒衣壳而缺乏抗衣壳宿主免疫应答，递送也可以进行多次，并且对于临床环境中的基因疗法来说，重要的是随后增加或减少剂量。可以预期，由于没有衣壳，因此不会发生抗衣壳应答。

[0525] 本发明还提供了一种治疗受试者的血友病A的方法，包含将治疗有效量的如本文所公开的ceDNA载体、任选地与药学上可接受的载剂一起引入受试者的有需要的靶细胞(具体地说，肌肉细胞或组织)。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入，但此类载剂不是必需的。所实施的ceDNA载体包括可用于治疗血友病A的所关注的核苷酸序列。具体地，ceDNA载体可以包括与控制元件操作性地连接的期望的外源DNA序列，当引入受试者中时，所述控制元件能够指导由外源DNA序列编码的期望的多肽、蛋白质或寡核苷酸的转录。ceDNA载体可以通过如上文和本文其它地方提供的任何适合的途径施用。

[0526] IX.递送用于FVIII蛋白产生的ceDNA载体的方法

[0527] 在一些实施方案中，可以通过各种适合的方法将用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体体外或体内递送到目标细胞。ceDNA载体可以单独施加或注射。CeDNA载体可以在不借助于转染试剂或其它物理方式的情况下递送到细胞。可替代地，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以使用所属领域已知的任何转染试剂或所属领域已知的促进DNA进入细胞的其它物理方式递送，例如脂质体、醇类、富含聚赖氨酸的化合物、富含精氨酸的化合物、磷酸钙、微囊泡、显微注射、电穿孔等等。

[0528] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够有效地靶向使用各种递送试剂、使用常规AAV病毒粒子通常难以转导的细胞和组织类型。

[0529] 本文所描述的技术的一个方面涉及一种将FVIII蛋白递送到细胞的方法。典型地，在体内和体外方法中，可以使用如本文所公开的方法以及所属领域中已知的其它方法将如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体引入细胞中。如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体优选以生物学有效量施用于细胞。如果将ceDNA载体在体内施用到细胞(例如到受试者)，那么ceDNA载体的生物学有效量是足以使FVIII蛋白在目标细胞中转导和表达的量。

[0530] 如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的示例性施用模式包括口服、直

肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如,通过气雾剂)、口腔(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、经皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、颅内、肌肉内[包括施用给骨骼肌、膈肌和/或心肌]、胸膜内、脑内和关节内)。施用可以全身或直接递送至肝脏或其他地方(例如,任何肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心脏、肠、肺和胃)。

[0531] 施用可以是局部(例如,皮肤和粘膜表面,包括气道表面和透皮施用)、淋巴管内等,以及直接组织或器官注射(例如但不限于肝脏,但也可用于眼、肌肉,包括骨骼肌、心肌、膈肌或大脑)。

[0532] 可以向受试者的任何部位施用ceDNA载体,包括(但不限于)选自由以下组成的组的部位:肝脏和/或眼睛、脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、膈膜、气道上皮、肾脏、脾脏、胰腺。

[0533] 在任何给定情况下最适合的途径将取决于所治疗、改善和/或预防的病状的性质和严重程度,以及所使用的特定ceDNA载体的性质。另外,ceDNA允许通过单个载体或多个ceDNA载体(例如ceDNA混合物)施用超过一种FVIII蛋白。

[0534] A.ceDNA载体的肌肉内施用

[0535] 在一些实施方案中,治疗受试者的疾病的方法包括将治疗有效量的编码FVIII蛋白的ceDNA载体、任选地与药学上可接受的载剂一起引入受试者的需要其的靶细胞(特别是肌肉细胞或组织)中。在一些实施方案中,用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体施用于受试者的肌肉组织。

[0536] 在一些实施方案中,ceDNA载体能够施用于受试者的任何部位,包括但不限于选自骨骼肌、平滑肌、心脏、隔膜或眼肌的部位。

[0537] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体向根据本发明的骨骼肌的施用包括(但不限于)施用于肢体(例如上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背、颈、头(例如舌)、胸腔、腹部、骨盘/会阴和/或手指的骨骼肌。如本文所公开的ceDNA载体可以通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌注(任选地,腿和/或手臂的隔离肢体灌注;参见例如Arruda等人,(2005)《血液(Blood)》105:3458-3464)和/或直接肌肉内注射而递送到骨骼肌。在特定实施例中,如本文所公开的ceDNA载体通过肢体灌注、任选地隔离肢体灌注(例如静脉内或关节内施用)来施用到受试者(例如患有如DMD的肌营养不良症的受试者)的肢体(臂和/或腿)。在实施例中,如本文所公开的ceDNA载体可以在不使用“流体动力学”技术的情况下施用。

[0538] 举例来说,常规病毒载体的组织递送(例如递送到肌肉)通常利用流体动力学技术增强(例如大体积的静脉内/静脉内施用),其增强血管压力并且促进病毒载体穿越内皮细胞屏障的能力。在特定实施方案中,本文所述的ceDNA载体能够在流体动力学技术缺乏的情况下施用,例如大体积输注和/或升高的血管内压力(例如大于正常收缩压,例如小于或等于血管内压力相对于正常收缩压的5%、10%、15%、20%、25%增幅)。这样的方法可以减少或避免与流体动力学技术相关的副作用,例如水肿、神经损伤和/或隔室综合征。

[0539] 此外,包含如本文所公开的施用于骨骼肌的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的组合物能够施用于肢体(例如上臂、下臂、大腿和/或小腿)的骨骼肌、背、颈、头(例如舌)、胸腔、腹部、骨盘/会阴和/或手指。合适的骨骼肌包括(但不限于)外展小指肌(手)、外展小趾肌(足)、拇展肌(abductor hallucis)、第五趾(指)展肌(abductor ossis metatarsi quinti)、拇短展肌(abductor pollicis brevis)、拇长展肌(abductor pollicis

longus)、内收短肌(adductor brevis)、拇收肌(adductor hallucis)、内收长肌(adductor longus)、内收大肌(adductor magnus)、拇收肌(adductor pollicis)、肘肌(anconeus)、前斜角肌(anterior scalene)、膝关节肌(articularis genus)、肱二头肌(biceps brachii)、股二头肌(biceps femoris)、肱肌(brachialis)、肱桡肌(brachioradialis)、颊肌(buccinator)、喙肱肌(coracobrachialis)、皱眉肌(corrugator supercilii)、三角肌(deltoid)、降口角肌(depressor anguli oris)、降下唇肌(depressor labii inferioris)、二腹肌(digastric)、骨间背侧肌(dorsal interossei)(手)、骨间背侧肌(足)、桡侧腕短伸肌(extensor carpi radialis brevis)、桡侧腕长伸肌(extensor carpi radialis longus)、尺侧伸腕肌(extensor carpi ulnaris)、伸小指肌(extensor digiti minimi)、伸趾肌(extensor digitorum)、伸趾短肌(extensor digitorum brevis)、伸趾长肌(extensor digitorum longus)、伸拇短肌(extensor hallucis brevis)、伸拇长肌(extensor hallucis longus)、伸食指肌(extensor indicis)、伸拇短肌(extensor pollicis brevis)、伸拇长肌(extensor pollicis longus)、桡侧腕屈肌(flexor carpi radialis)、尺侧屈腕肌(flexor carpi ulnaris)、小指短屈肌(flexor digiti minimi brevis)(手)、小趾短屈肌(足)、趾短屈肌(flexor digitorum brevis)、趾长屈肌(flexor digitorum longus)、指深屈肌(flexor digitorum profundus)、指浅屈肌(flexor digitorum superficialis)、拇短屈肌(flexor hallucis brevis)、拇长屈肌(flexor hallucis longus)、拇短屈肌(flexor pollicis brevis)、拇长屈肌(flexor pollicis longus)、额肌(frontalis)、腓肠肌(gastrocnemius)、颏舌骨肌(geniohyoid)、臀大肌(gluteus maximus)、臀中肌(gluteus medius)、臀小肌(gluteus minimus)、股薄肌(gracilis)、颈髂肋肌(iliocostalis cervicis)、腰髂肋肌(iliocostalis lumborum)、胸髂肋肌(iliocostalis thoracis)、髂肌(illiacus)、下孖肌(inferior gemellus)、下斜肌(inferior oblique)、下直肌(inferior rectus)、冈下肌(infraspinatus)、棘间肌(interspinalis)、横突间肌(intertransversi)、翼外肌(lateral pterygoid)、外直肌(lateral rectus)、背阔肌(latissimus dorsi)、提口角肌(levator anguli oris)、提上唇肌(levator labii superioris)、提上唇鼻翼肌(levator labii superioris alaeque nasi)、提上睑肌(levator palpebrae superioris)、肩胛提肌(levator scapulae)、长回旋肌(long rotators)、头最长肌(longissimus capitis)、颈最长肌(longissimus cervicis)、胸最长肌(longissimus thoracis)、头长肌(longus capitis)、颈长肌(longus colli)、蚓状肌(lumbricals)(手)、蚓状肌(足)、咬肌(masseter)、翼内肌(medial pterygoid)、内直肌(medial rectus)、中斜角肌(middle scalene)、多裂肌(multifidus)、下颌舌骨肌(mylohyoid)、头下斜肌(obliquus capitis inferior)、头上斜肌(obliquus capitis superior)、闭孔外肌(obturator externus)、闭孔内肌(obturator internus)、枕肌(occipitalis)、肩胛舌骨肌(omohyoid)、小指对掌肌(opponens digiti minimi)、拇对掌肌(opponens pollicis)、眼轮匝肌(orbicularis oculi)、口轮匝肌(orbicularis oris)、骨间掌侧肌(palmar interossei)、掌短肌(palmaris brevis)、掌长肌(palmaris longus)、耻骨肌(pectineus)、胸大肌(pectoralis major)、胸小肌(pectoralis minor)、腓短肌(peroneus brevis)、腓长肌(peroneus longus)、第三腓骨肌(peroneus tertius)、梨状肌(piriformis)、跖侧骨间肌(plantar interossei)、跖肌(plantaris)、颈阔肌

(platysma)、腘肌(popliteus)、后斜角肌(posterior scalene)、旋前方肌(pronator quadratus)、旋前圆肌(pronator teres)、腰大肌(psoas major)、股方肌(quadratus femoris)、跖方肌(quadratus plantae)、头直前肌(rectus capitis anterior)、头侧直肌(rectus capitis lateralis)、头后大直肌(rectus capitis posterior major)、头后小直肌(rectus capitis posterior minor)、股直肌(rectus femoris)、大菱形肌(rhomboid major)、小菱形肌(rhomboid minor)、笑肌(risorius)、缝匠肌(sartorius)、小斜角肌(scalenus minimus)、半膜肌(semimembranosus)、头半棘肌(semispinalis capitis)、颈半棘肌(semispinalis cervicis)、胸半棘肌(semispinalis thoracis)、半腱肌(semitendinosus)、前锯肌(serratus anterior)、短回旋肌(short rotators)、比目鱼肌(soleus)、头棘肌(spinalis capitis)、颈棘肌(spinalis cervicis)、胸棘肌(spinalis thoracis)、头夹肌(splenius capitis)、颈夹肌(splenius cervicis)、胸锁乳突肌(sternocleidomastoid)、胸舌骨肌(sternohyoid)、胸骨甲状肌(sternothyroid)、茎突舌骨肌(stylohyoid)、锁骨下肌(subclavius)、锁骨下肌(subscapularis)、上孖肌(superior gemellus)、上斜肌(superior oblique)、上直肌(superior rectus)、旋后肌(supinator)、冈上肌(supraspinatus)、颞肌(temporalis)、阔筋膜张肌(tensor fascia lata)、大圆肌(teres major)、小圆肌(teres minor)、胸肌(thoracis)、甲状舌骨肌(thyrohyoid)、胫前肌(tibialis anterior)、胫骨后肌(tibialis posterior)、斜方肌(trapezius)、肱三头肌(triceps brachii)、股中间肌(vastus intermedius)、股外侧肌(vastus lateralis)、股内侧肌(vastus medialis)、颧大肌(zygomaticus major)和颧小肌(zygomaticus minor)，以及所属领域中已知的任何其它合适的骨骼肌。

[0540] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够通过任何合适方法施用到隔膜肌，包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。在一些实施方案中，从ceDNA载体表达的转基因递送到靶组织还能够通过递送包含ceDNA载体的合成储槽来实现，其中将包含ceDNA载体的储槽植入骨骼肌、平滑肌、心肌和/或隔膜肌组织，或能够使肌肉组织与包含如本文所述的ceDNA载体的膜或其它基质接触。此类可植入基质或底物描述于美国专利第7,201,898号中。

[0541] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体施用于心肌包括施用于左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜。如本文所述的ceDNA载体可以通过静脉内施用、动脉内施用、例如主动脉内施用、直接心脏注射(例如注入左心房、右心房、左心室、右心室)和/或冠状动脉灌注而递送到心肌。

[0542] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体施用于平滑肌能够通过任何合适方法实现，包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。在一个实施例中，可以施用存在于平滑肌内、附近和/或平滑肌上的内皮细胞。平滑肌的非限制实施例包括眼虹膜、肺细支气管、喉肌(声带)、胃肠道的胃、食道、小肠和大肠肌肉层、膀胱的输尿管、逼尿肌肌肉、子宫的子宫肌层、阴茎或前列腺腺体。

[0543] 在一些实施方案中，将如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体施用于骨骼肌、隔膜肌和/或心肌。在中代表性实施方案中，根据本发明的ceDNA载体是用于治疗和/或预防骨骼肌、心肌和/或隔膜肌的病症。

[0544] 具体地说，预期包含如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的组合物能

够递送到眼部的一种或多种肌肉(例如外直肌(Lateral rectus)、内直肌(Medial rectus)、上直肌(Superior rectus)、下直肌(Inferior rectus)、上斜肌(Superior oblique)、下斜肌(Inferior oblique))、面部肌肉(例如枕额肌(Occipitofrontalis muscle)、颞下颌肌(Temporoparietalis muscle)、降眉间肌(Procerus muscle)、鼻肌(Nasalis muscle)、降鼻中隔肌(Depressor septi nasi muscle)、眼轮匝肌(Orbicularis oculi muscle)、皱眉肌(Corrugator supercilii muscle)、降眉肌(Depressor supercilii muscle)、耳廓肌(Auricular muscles)、口轮匝肌(Orbicularis oris muscle)、降口角肌(Depressor anguli oris muscle)、笑肌(Risorius)、颧大肌(Zygomaticus major muscle)、颧小肌(Zygomaticus minor muscle)、提上唇肌(Levator labii superioris)、提上唇鼻翼肌(Levator labii superioris alaeque nasi muscle)、降下唇肌(Depressor labii inferioris muscle)、提口角肌(Levator anguli oris)、颊肌(Buccinator muscle)、颏肌(Mentalis))或舌肌(例如颏舌肌(genioglossus)、舌骨舌肌(hyoglossus)、小角舌肌(chondroglossus)、茎舌肌(styloglossus)、腭舌肌(palatoglossus)、舌上纵肌(superior longitudinal muscle)、舌下纵肌(inferior longitudinal muscle)、舌直肌(vertical muscle)、舌横肌(transverse muscle))。

[0545] (i)肌肉注射:在一些实施方案中,使用针能够将包含如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的组合物注射到受试者的指定肌肉的一个或多个部位,例如骨骼肌(例如三角肌、股外侧肌、背外侧肌的侧臀肌,或婴儿的前外侧股)。包含ceDNA的组合物能够引入肌肉细胞的其它亚型中。肌肉细胞亚型的非限制性实施例包括骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和/或隔膜肌细胞。

[0546] 肌内注射的方法是本领域技术人员已知的,因此本文中不再详细描述。然而,当执行肌肉内注射时,应该基于患者的年龄和体型、组合物的粘度以及注射部位来确定适当的针头尺寸。表8提供了示例性注射部位和相应针头尺寸的指南:

[0547] 表8:人类患者肌内注射指南

[0548]

注射部位	***针头规格***	***针头尺寸***	***组合物的最大体积***
侧臀部位（臀中肌和臀小肌）	*水溶液*：20-25 号规格 *粘性或油性溶液*：18-21 号规格	成人瘦子：15 到 25 mm 成人平均：25 mm 较大成人（超过 150 磅）：25 到 38 mm。 儿童和婴儿：需要较小号针头	3 mL
股外侧肌	*水溶液*：20-25 号规格 *粘性或油性溶液*：18-21 号规格 儿童/婴儿：22 到 25 号规格	成人：25 mm 到 38 mm	3 mL
三角肌	22 到 25 号规格	男性： 130-260 lbs：25 mm 女性： <130 lbs：16 mm 130-200 lbs：25mm >200 lbs：38mm	1 mL

[0549] 在某些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体按照小体积(例如如表8中针对指定受试者概述的示例性体积)配制。在一些实施方案中，必要时，受试者在注射之前，能够施用全身或局部麻醉剂。如果需要多次注射，或如果注射更深的肌肉，而非上文提及的常见注射部位，这是特别期望的。

[0550] 在一些实施方案中，能够将肌肉内注射与以下组合：电穿孔、递送压力或使用转染试剂增强ceDNA载体的细胞吸收。

[0551] (ii)转染试剂：在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体被配制成包含一种或多种转染试剂的组合物，以促进载体吸收到肌管或肌肉组织中。因此，在一个实施方案中，使用本文中别处所述的方法、通过转染将本文所述的核酸施用于肌肉细胞、肌管或肌肉组织。

[0552] (iii)电穿孔：在某些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体在缺乏载剂的情况下施用以促进ceDNA进入细胞中，或在生理学上呈惰性的药学上可接

受的载剂中(即,不改进或不增强无衣壳非病毒载体吸收到肌管中的任何载剂)施用。在此类实施例中,通过对细胞或组织进行电穿孔能够促进无衣壳非病毒载体的吸收。

[0553] 细胞膜天然地抵抗从细胞外传递到细胞的细胞质中。一种用于暂时减小这种抵抗力的方法是“电穿孔”,其中使用电场在细胞中产生孔隙而对细胞不引起持久性损伤。这些孔隙大足以允许DNA载体、医药、DNA和其它极性化合物触及细胞内部。细胞膜中的孔隙闭合并且细胞再次变得不可通透。

[0554] 电穿孔能够用于体外和体内应用中以将例如外源DNA引入活细胞中。体外应用典型地是将活细胞样品与包含例如DNA的组合物混合。然后将细胞放在电极(例如平行板)之间并且向细胞/组合物混合物施加电场。

[0555] 体内电穿孔的方法有多种;电极能够以多种配置提供,例如夹持表皮的测径规上覆于待处理的细胞区域上。替代地,可以将针形电极插入组织中,从而更深地触及所定位的细胞。在任一情况下,将包含例如核酸的组合物注射到处理区域之后,电极向所述区域施加电场。在一些电穿孔应用中,这个电场包含约10到60ms持续时间的约100到500V/cm的单一方波脉冲。此类脉冲可以通过例如Genetronics有限公司的分公司BTX制造的Electro Square Porator T820的已知应用产生。

[0556] 典型地,仅当肌肉在施用组合物(例如注射到肌肉中)之后立即或不久加以电刺激时才成功地发生例如核酸的吸收。

[0557] 在某些实施方案中,使用电场脉冲或使用低电压/长脉冲处理方案(例如使用方波脉冲电穿孔系统)达成电穿孔。能够产生脉冲电场的示例性脉冲发生器包括例如能够产生指数波形的ECM600,和能够产生方波形的ElectroSquarePorator(T820),两者均获自BTX,Genetronics有限公司的分公司(加利福尼亚州圣地亚哥)。方波电穿孔系统递送可控的电脉冲,其快速地升高到设定电压,在那个水平保持设定的时间长度(脉冲长度),然而快速地降到零。

[0558] 在一些实施方案中,施用局部麻醉剂,例如通过在处理部位注射以减少疼痛,所述疼痛可能与组织在包含如本文所述的无衣壳非病毒载体的组合物存在下电穿孔有关。另外,本领域的技术人员将了解,应该选择最小化且/或防止过度组织损伤、以致肌肉发生纤维化、坏死或发炎的组合物剂量。

[0559] (iv)递送压力:在一些实施方案中,如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体递送到肌肉组织是通过递送压力促进,其将大体积与快速注射到供应肢体的动脉(例如髂动脉)组合使用。这种施用模式能够通过多种方法达成,包括将包含ceDNA载体的组合物输注到肢体血管中,典型地同时使用血管钳压脉带将肌肉与全身循环分隔。在一种方法中,组合物通过肢体血管循环以容许外渗到细胞中。在另一方法中,提高血管内流体动力学压力以扩展血管床且增强ceDNA载体吸收到肌肉细胞或组织中。在一个实施方案中,将ceDNA组合物施用于动脉。

[0560] (v)脂质纳米颗粒组合物:在一些实施方案中,将肌肉内递送用的如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体配制成包含如在本文别处所述的脂质体的组合物。

[0561] (vi)靶向肌肉组织的ceDNA载体的全身施用:在一些实施方案中,如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体配制成通过间接递送施用靶向肌肉,其中与肝脏相反,将ceDNA输送到肌肉。相应地,本文所述的技术涵盖将包含如本文所公开的用于表达FVIII蛋

白的ceDNA载体的组合物间接施用于肌肉组织，例如通过全身施药。此类组合物能够通过体表、静脉内(通过推注或连续输注)、细胞内注射、组织内注射、口服、通过吸入、腹膜内、皮下、腔内施用，并且在必要时能够通过蠕动方式或通过所属领域的技术人员已知的其它方式递送。药剂能够全身性施用，例如通过静脉内输注(如果希望如此)。

[0562] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体吸收到肌肉细胞/组织内是通过使用优先引导载体到肌肉组织中的靶向药剂或部分来增加。因此，在一些实施方案中，相较于无衣壳ceDNA载体存在于身体的其它细胞或组织中的量，无衣壳ceDNA载体能够在肌肉组织中浓缩。

[0563] 在一些实施方案中，包含如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的组合物进一步包含肌肉细胞的靶向部分。在其它实施方案中，所表达的基因产物包含对期望产生作用的组织具有特异性的靶向部分。靶向部分能包括能够靶向细胞或组织的细胞内、细胞表面或细胞外生物标志物、与其相互作用、与其偶联且/或结合至其的任何分子或分子复合物。生物标志物能包括例如细胞蛋白酶、激酶、蛋白质、细胞表面受体、脂质和/或脂肪酸。靶向部分能靶向、相互作用、偶联和/或结合到的生物标志物的其它实施例包括与特定疾病有关的分子。举例来说，生物标志物能够包括涉及癌症发展的细胞表面受体，例如表皮生长因子受体和运铁蛋白受体。靶向部分能够包括(但不限于)结合到靶肌肉组织中所表达的分子的合成化合物、天然化合物或产物、巨分子实体、生物工程化分子(例如多肽、脂质、多核苷酸、抗体、抗体片段)以及小实体(例如小分子、神经传递素、底物、配体、激素和元素化合物)。

[0564] 在某些实施方案中，靶向部分可以进一步包含受体分子，包括例如天然地识别靶细胞中的特定期望分子的受体。此类受体分子包括已经修饰以增强其与靶分子相互作用的特异性的受体、已经修饰以与受体天然不识别的所期望靶分子相互作用的受体，以及此类受体的片段(参见例如Skerra，2000，《分子识别杂志(J.Molecular Recognition)》，13:167-187)。优选的受体是趋化因子受体。示例性趋化因子受体已经描述于例如Lapidot等人，2002，《实验血液学(Exp Hematol)》，30:973-81和Onuffer等人，2002，《制药学趋势(Trends Pharmacol Sci)》，23:459-67。

[0565] 在其它实施方案中，另外的靶向部分可以包含配体分子，包括例如天然地识别靶细胞的特定期望受体的配体，例如运铁蛋白(Tf)配体。此类配体分子包括已经修饰以增强其与靶受体相互作用的特异性的配体、已经修饰以与配体天然不识别的期望受体相互作用的配体，和此类配体的片段。

[0566] 在仍其它实施方案中，靶向部分可以包含适体。适体是经选择可特异性结合到靶细胞的期望分子结构的寡核苷酸。适体典型地是类似于噬菌体呈现亲和力选择(又称为体外分子进化)的亲和力选择方法的产物。所述方法涉及执行亲和力分离的若干次串联迭代，例如使用致病免疫原所结合的固体载体执行；随后执行聚合酶链反应(PCR)以扩增结合到免疫原的核酸。每一轮亲和力分离由此从核酸群体中富集成功地结合期望免疫原的分子。以这种方式，可以“培育”随机核酸池，从而产生特异性结合靶分子的适体。适体典型地是RNA，但可以是DNA或其类似物或衍生物，例如(不限于)肽核酸(PNA)和硫代磷酸酯核酸。

[0567] 在一些实施方案中，靶向部分能够包含光可降解配体(即，‘笼状’配体)，所述配体通过例如聚焦光束释放，从而使无衣壳非病毒载体或基因产物靶向特定组织。

[0568] 本文还预期组合物递送到受试者的一种或多种肌肉的多个部位。也就是说，能够在至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100个注射部位中进行注射。此类部位相对于单一肌肉的区域能够扩展或能够在多种肌肉之间分布。

[0569] B.将用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体施用到非肌肉位置

[0570] 在另一个实施方案中，将用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体施用于肝脏。可以将ceDNA载体引入眼部的区域，例如角膜和/或视神经。还可以将ceDNA载体引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、垂体腺、黑质、松果体)、小脑、端脑(纹状体；包括枕骨、颞叶、顶叶和额叶的大脑；皮质；基底神经节；海马和杏仁核(portaamygdala))、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。ceDNA载体可以被递送到脑脊髓液中(例如通过腰椎穿刺)。可以在血脑屏障已被扰动的情况下(例如脑瘤或大脑梗塞)，进一步将用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体通过血管内施用CNS。

[0571] 在一些实施方案中，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以通过所属领域中已知的任何途径施用眼部的一个或多个所需区域，所述途径包括(但不限于)：鞘内、眼内、大脑内、脑室内、静脉内(例如在如甘露糖醇的糖的存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如眼球筋膜囊下区(sub-Tenon's region))递送，以及逆行递送到运动神经元的肌肉内递送。

[0572] 在一些实施例中，用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体在液体配制物中通过直接注射(例如立体定向注射)施用CNS中的所需区域或区室中。在其它实施例中，可以通过局部施加到期望区域或通过鼻内施用气雾剂配制物来提供ceDNA载体。可以通过局部施加液滴来施用眼睛。作为另一个替代方案，ceDNA载体可以作为固体、缓释型配制物施用(参见例如美国专利第7,201,898号)。在另外的实施方案中，ceDNA载体可用于逆行转运，以治疗、改善和/或预防涉及运动神经元的疾病和病症(例如肌萎缩性侧索硬化(ALS)；脊髓性肌萎缩(SMA)等)。举例来说，可以将ceDNA载体递送到肌肉组织，其可以从肌肉组织迁移到神经元中。

[0573] C.离体治疗

[0574] 在一些实施方案中，从受试者中去除细胞，将如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体引入其中，然后将细胞替换回到受试者中。从受试者取出细胞进行离体处理、然后再引回到受试者中的方法是本领域已知的(参见例如美国专利第5,399,346号；其公开内容整体并入本文中)。可替代地，将ceDNA载体引入另一个个体的细胞，引入培养细胞中，或引入任何其他适合来源的细胞中，并将细胞施用有需要的个体。

[0575] 经如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体转导的细胞优选以“治疗有效量”与医药载剂组合施用于受试者。所属领域的技术人员将了解，治疗效果不必是完全的或治愈的，只要给个体提供了一些益处即可。

[0576] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够编码如本文所述的FVIII蛋白(有时称为转基因或异源核苷酸序列)，所述FVIII蛋白是体外、离体或体内细胞中产生。举例来说，与在如本文所论述的治疗方法中使用本文所述的ceDNA载体相比，在一些实施方案中，可以将用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体引入所培养细胞中并且从细胞中分离出所表达的FVIII蛋白，例如产生抗体和融合蛋白。在一些实施方案中，包含

如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的所培养细胞能够用于商业上生产抗体或融合蛋白，例如充当小或大规模生物制造抗体或融合蛋白的细胞源。在替代性实施方案中，将如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体引入宿主非人类受试者的细胞中，用于体内产生抗体或融合蛋白，包括小规模生产以及商业上大规模生产FVIII蛋白。

[0577] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够用于兽医学与医学应用中。如上所述的离体基因递送方法的合适受试者包括禽类(例如鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡和野鸡)和哺乳动物(例如人、牛、绵羊、山羊、马、猫、犬和兔)，以哺乳动物为优选。人类受试者是最优选的。人类个体包括新生儿、婴儿、青少年和成人。

[0578] D.剂量范围

[0579] 本文提供了治疗方法，包含向受试者施用有效量的包含如本文所述的编码FVIII蛋白的ceDNA载体的组合物。如熟练的从业者将了解，术语“有效量”是指ceDNA组合物的施用量，引起FVIII蛋白以治疗血友病A的“治疗有效量”表达。

[0580] 可以任选地采用体内和/或体外分析来帮助鉴定使用的最佳剂量范围。配制物中使用的精确剂量还取决于施用途径和病状的严重程度，并且应该根据所属领域的技术人员的判断和每个受试者的情形来决定。有效剂量可以从源自于体外或动物模型试验系统的剂量-反应曲线推断。

[0581] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体是以足转染所期望组织的细胞且提供足够的基因转移和表达水平而无不当副作用的量施用。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于上文在“施用”部分中所述的那些途径，例如直接递送至选定的器官(例如门静脉内递送至肝脏)、口服、吸入(包括鼻内和气管内递送)、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内、肿瘤内和其它胃肠外施用途径。如果需要，施用途径可以组合。

[0582] 实现特定“治疗效果”所需的本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体量的剂量将基于若干因素而变化，这些因素包含(但不限于)：核酸施用途径、实现治疗效果所需的基因或RNA表达水平、所治疗的特定疾病或病症以及一种或多种基因、一种或多种RNA产物或一种或多种所得表达的蛋白质的稳定性。所属领域的技术人员可以基于前述的因素以及所属领域中熟知的其它因素容易地确定治疗患有特定疾病或病症的患者的ceDNA载体剂量范围。

[0583] 剂量方案可以调整，以提供最佳的治疗反应。例如，可以重复施用寡核苷酸，例如可以每天施用若干剂量，或者可以根据治疗情况的紧急程度的指示，按比例减少剂量。所属领域的普通技术人员将能够容易地确定受试者寡核苷酸的适当剂量和施用计划，无论所述寡核苷酸是施用细胞还是受试者。

[0584] “治疗有效剂量”将落在相对较宽的范围内，该范围可以通过临床试验确定并将取决于特定应用(神经细胞将需要很少的量，而全身性注射将需要大量)。例如，对于体内直接注射到人类受试者的骨骼肌或心肌中，治疗有效剂量将为约1μg至100g左右的ceDNA载体。如果使用外泌体或微粒来递送ceDNA载体，那么可以通过实验确定治疗有效剂量，但预计递送1μg至约100g的载体。此外，治疗有效剂量是表达足量的转基因、从而对受试者起作用的ceDNA载体的量，其使得疾病的一种或多种症状减少，但不产生显著的脱靶或显著的不良副作用。在一个实施方案中，“治疗有效量”是所表达的FVIII蛋白的量，所述量足以使血友病A生物标志物的表达产生统计显著的可测量变化或使指定疾病症状产生统计显著的可测量

减轻。指定的ceDNA载体组合物的此类有效量能够在临床试验以及动物研究中加以调整。

[0585] 药学上可接受的赋形剂和载剂溶液的调配物是所属领域的技术人员熟知的，开发在多种治疗方案中使用本文所描述的特定组合物的适合的剂量和治疗方案也是所属领域技术人员熟知的。

[0586] 对于体外转染来说，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体递送到细胞($1x10^6$个细胞)的有效量将是约0.1到100μg ceDNA载体，优选1到20μg且更优选1到15μg或8到10μg ceDNA载体。ceDNA载体越大，需要的剂量越高。如果使用外泌体或微粒，那么可以通过实验确定有效的体外剂量，但意图递送大致相同量的ceDNA载体。

[0587] 治疗血友病A时，如本文所公开的表达FVIII蛋白的ceDNA载体的适当剂量将取决于待治疗的疾病的特定类型、FVIII蛋白类型、血友病A疾病的严重度和病程、此前疗法、患者的临床史和对抗体的应答，以及主治医师的判断。一次或经过一系列治疗将编码FVIII蛋白的ceDNA载体适当地施用于患者。本文涵盖了各种给药方案，包括(但不限于)单次施药或在不同时间点上的多次施药、推注施药和脉冲输注。

[0588] 视疾病的类型和严重度而定，ceDNA载体通过一次或多次分开施用或通过连续输注来施用，施用的量使得所编码的FVIII蛋白以约0.3mg/kg到100mg/kg(例如15mg/kg-100mg/kg，或所述范围内的任何剂量)表达。ceDNA载体的一种典型日剂量足以引起所编码的FVIII蛋白在约15mg/kg到100mg/kg或更大值范围内表达，此视上文提及的因素而定。ceDNA载体的一种示例性剂量是足以引起如本文所公开的经编码的FVIII蛋白在约10mg/kg至约50mg/kg范围内表达的量。因此，量足以引起所编码的FVIII蛋白表达以约0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、3mg/kg、4.0mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg(或其任何组合)的ceDNA载体的一种或多种剂量可以施用于患者。在一些实施方案中，ceDNA载体是足以引起所编码FVIII蛋白按照50mg到2500mg范围内的总剂量表达的量。ceDNA载体的示例性剂量是足以引起所编码的FVIII蛋白的总表达为50mg、约100mg,200mg,300mg,400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约720mg、约1000mg、约1050mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2050mg、约2100mg、约2200mg、约2300mg、约2400mg或约2500mg(或其任何组合)的量。于FVIII蛋白从ceDNA载体中的表达能够小心地通过本文中的调控开关或替代地通过施用于受试者的ceDNA载体的多种剂量控制，因此FVIII蛋白从ceDNA载体中的表达能够以使得所表达的FVIII蛋白的剂量可以间歇性地(例如每周、每两周、每三周、每四周、每个月、每两个月、每三个月或每六个月)从ceDNA载体中施用的方式加以控制。通过常规技术和分析能够监测此疗法的进展。

[0589] 在某些实施方案中，ceDNA载体的施用量足以引起所编码的FVIII蛋白以15mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg或均一剂量(例如300mg、500mg、700mg、800mg或更高)的剂量表达。在一些实施方案中，FVIII蛋白从ceDNA载体中的表达受到控制，以使得FVIII蛋白在一段时间内每天、每隔一天、每周、每2周或每4周表达。在一些实施方案中，FVIII蛋白从ceDNA载体中的表达受到控制，以使得FVIII蛋白在一段时间内每2周或每4周表达。在某些实施方案中，时间段是6个月、一年、十八个月、两年、五年、十年、15年、20年或患者一生。

[0590] 治疗可以涉及施用单次剂量或多次剂量。在一些实施方案中，能够向受试者施用超过一次剂量；实际上，在需要时能够施用多次剂量，原因是ceDNA载体因缺乏病毒衣壳而诱发/不诱发抗衣壳宿主免疫应答。因此，本领域技术人员可以容易地确定适当剂量次数。施用的剂数可以例如1-100剂，优选地2-20剂的量级。

[0591] 不希望受任何特定理论束缚，缺乏通过施用如本公开所描述的ceDNA载体(即，缺乏衣壳组分)所诱发的典型抗病毒免疫应答允许用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体在多种场合下施用于宿主。在一些实施方案中，将异源核酸递送至受试者的次数在2至10次的范围内(例如2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次)。在一些实施例中，向受试者递送ceDNA载体超过10次。

[0592] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的剂量施用于受试者每个日历日(例如24小时时间段)不超过一次。在一些实施例中，每2个、3个、4个、5个、6个或7个日历日向受试者施用一剂ceDNA载体不超过一次。在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的剂量施用于受试者，每个日历周(例如7个日历日)不超过一次。在一些实施方案中，ceDNA载体的剂量施用于受试者，每两周不超过一次(例如两个日历周时间段为一次)。在一些实施方案中，ceDNA载体的剂量施用于受试者，每个日历月不超过一次(例如30个日历日为一次)。在一些实施方案中，ceDNA载体的剂量施用于受试者，每六个日历月不超过一次。在一些实施方案中，ceDNA载体的剂量施用于受试者，每个日历年(例如365天或闰年366天)不超过一次。

[0593] 在特定实施方案中，超过一次施用(例如两次、三次、四次或更多次施用)如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以用于在不同间隔期(例如每日、每周、每月、每年等)内实现所期望的基因表达水平。

[0594] 在一些实施方案中，如本文所公开的ceDNA载体所编码的治疗性FVIII蛋白能够通过调控开关、诱导型或可抑制型启动子调控，使得其在受试者中表达至少1小时、至少2小时、至少5小时、至少10小时、至少12小时、至少18小时、至少24小时、至少36小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少1个月、至少2个月、至少6个月、至少12个月/一年、至少2年、至少5年、至少10年、至少15年、至少20年、至少30年、至少40年、至少50年或更长。在一个实施方案中，通过在预定或期望的间隔时间反复施用本文所述的ceDNA载体能够达成表达。替代地，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够进一步包含基因编辑系统的组分(例如CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸内切酶等)以容许一种或多种核酸序列插入，所述一种或多种核酸序列编码用于基本上持久治疗或“治愈”疾病的FVIII蛋白。包含基因编辑组分的此类ceDNA载体在国际申请PCT/US18/64242中公开，并且能够包括5’和3’同源臂(例如SEQ ID NO:151-154，或与其具有至少40％、50％、60％、70％或80％同源性的序列)以便编码FVIII蛋白的核酸插入安全港区域，例如但不包括白蛋白基因或CCR5基因。例如，于2019年3月1日提交的国际专利申请PCT/US2019/020225中公开了表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以包含至少一个基因组安全港(GSH)特异性同源臂，用于将PAH转基因插入基因组安全港中，所述专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0595] 治疗持续时间视受试者的临床进展和对治疗的应答而定。初始较高治疗剂量之后，预期为连续的相对较低维持剂量。

[0596] E.单位剂型

[0597] 在一些实施方案中，包含如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的药物组合物能够方便地以单位剂型呈递。单位剂型通常将适于医药组合物的一种或多种特定施用途径。在一些实施方案中，单位剂型适合于直接施用到眼睛的液滴。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过吸入施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过汽化器施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过喷雾器施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过气雾器施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于口服施用、经颊施用或舌下施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于静脉内、肌肉内或皮下施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于视网膜下注射、脉络膜上注射或玻璃体内注射。

[0598] 在一些实施方案中，单位剂型适合于鞘内或脑室内施用。在一些实施方案中，配制药物组合物以供局部施用。可以与载剂材料组合以产生单个剂型的活性成分的量将通常是化合物产生治疗效果的量。

[0599] X.治疗方法

[0600] 本文所描述的技术还展示了通过多种方式制备所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的方法和其使用方法，包含例如离体、非原位、体外和体内施用、方法、诊断程序和/或基因治疗方案。

[0601] 在一个实施方案中，从如本文所公开的ceDNA载体中表达的经表达的治疗性FVIII蛋白具有治疗疾病的功能。在一个优选实施方案中，治疗性FVIII蛋白不引起免疫系统反应，除非期望如此。

[0602] 本文提供了一种治疗受试者的血友病A的方法，包含将治疗有效量的如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体、任选地与药学上可接受的载剂一起引入有需要的靶细胞(例如肌肉细胞或组织，或其它受影响的细胞类型)。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入，但此类载剂不是必需的。所建构的ceDNA载体包含编码如本文所述的适用于治疗疾病的FVIII蛋白的核苷酸序列。具体地说，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以包含操作性地连接到控制元件的所期望FVIII蛋白DNA序列，当引入受试者中时，所述控制元件能够引导由外源DNA序列编码的所期望FVIII蛋白转录。如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够经由如上文和本文中别处所提供的任何适合途径施用。

[0603] 本文公开了如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体组合物和配制物，其包括本发明的一种或多种ceDNA载体以及药学上可接受的一种或多种缓冲液、稀释剂或赋形剂。此类组合物可以包含在一种或多种诊断或治疗试剂盒中，以用于诊断、预防、治疗或改善血友病A的一种或多种症状。一方面，所述疾病、损伤、病症、创伤或功能障碍是人疾病、损伤、病症、创伤或功能障碍。

[0604] 本文所描述技术的另一方面提供了一种向有需要的受试者提供诊断或治疗有效量的本文所述的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的方法，所述方法包括向有需要的受试者的细胞、组织或器官提供如本文公开的ceDNA载体，提供的量和时间有效地使FVIII蛋白从ceDNA载体表达，从而为受试者提供诊断或治疗有效量的由ceDNA载体表达的FVIII蛋白。在另一方面，受试者为人。

[0605] 本文描述的技术的另一方面提供了一种用于诊断、预防、治疗或改善受试者的血友病A、病症、功能障碍、损伤、异常病状或创伤的至少一种或多种症状的方法。就整体和一般意义而言，所述方法至少包括以足以诊断、预防、治疗或改善受试者的疾病、病症、功能异

常、损伤、异常病状或创伤的一种或多种症状的量和时间向有需要的受试者施用一种或多种所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的步骤。在这样的实施方案中，可以评估受试者的FVIII蛋白的功效，或者，检测FVIII蛋白或FVIII蛋白在受试者中的组织定位(包括细胞和亚细胞定位)。因而，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够用作体内诊断工具，例如用于检测癌症或其它适应症。在另一方面，受试者为人。

[0606] 另一方面是如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体用作治疗或减轻血友病A或疾病状态的一种或多种症状的工具的用途。有许多遗传性疾病中的缺陷基因是已知的，并且通常分为两类：缺陷状态，通常是酶，一般以隐性方式遗传；和不平衡状态，其可以涉及调节蛋白或结构蛋白，并且通常但不总是以显性方式遗传。就不均衡的疾病状态而言，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够用于在模型系统中建立血友病A状态，然后能够利用所述模型系统尝试抵消疾病状态。因此，如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体允许治疗遗传疾病。如本文所使用的，通过部分或完全拯救导致疾病或使其更严重的缺陷或不平衡，可以治疗血友病A状态。

[0607] A.宿主细胞

[0608] 在一些实施方案中，如本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体将FVIII蛋白转基因递送到受试者宿主细胞中。在一些实施方案中，细胞是感光细胞。在一些实施方案中，细胞是RPE细胞。在一些实施方案中，受试者的宿主细胞是人宿主细胞，包括例如血细胞、干细胞、造血细胞、$CD34^+$细胞、肝细胞、癌细胞、血管细胞、肌肉细胞、胰腺细胞、神经细胞、视觉或视网膜细胞、上皮或内皮细胞、树突状细胞、成纤维细胞或任何其它哺乳动物来源的细胞，包括但不限于肝(即肝)细胞、肺细胞、心脏细胞、胰腺细胞、肠细胞、隔膜细胞、肾(即肾)细胞、神经细胞、血细胞、骨髓细胞或预期进行基因治疗的受试者的任何一种或多种选定的组织。在一方面，个体的宿主细胞是人类宿主细胞。

[0609] 本公开还涉及如上文所提及的重组宿主细胞，其包括如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体。因此，对于技术人员而言显而易见的是，可以根据目的使用多种宿主细胞。将如本文所公开的包括供体序列的用于表达FVIII蛋白的构建体或ceDNA载体引入宿主细胞中，使得供体序列作为染色体整合体维持，如早先所描述。术语宿主细胞涵盖由于复制过程中发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程度上取决于供体序列和其来源。

[0610] 宿主细胞还可以是真核生物，例如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是人细胞(例如原代细胞、干细胞或永生化细胞系)。在一些实施方案中，能够将如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体离体施用于宿主细胞，然后在基因疗法事件之后，递送到受试者。宿主细胞可以是任何细胞类型，例如体细胞或干细胞、诱导型多能干细胞或血细胞，例如T细胞或B细胞，或骨髓细胞。在某些实施方案中，宿主细胞是同种异体细胞。例如，T细胞基因组工程可用于癌症免疫疗法、如HIV疗法的疾病调节(例如受体敲除，如CXCR4和CCR5)和免疫缺陷疗法。可靶向B细胞上的MHC受体进行免疫治疗。在一些实施方案中，能够将基因经修饰的宿主细胞(例如骨髓干细胞，例如$CD34^+$细胞，或诱导多能干细胞)移植回到患者中用于表达治疗蛋白。

[0611] B.基因治疗的其它疾病：

[0612] 一般来说，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够用于递送根据上

述说明的任何FVIII蛋白以治疗、预防或改善与血友病A有关的症状，所述病症与受试者的异常蛋白质表达或基因表达有关。

[0613] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可用于将FVIII蛋白递送至骨骼肌、心肌或隔膜肌，以产生用于在血液中分泌和循环的FVIII蛋白或用于全身递送至其他组织以治疗、改善和/或预防血友病A。

[0614] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够通过任何适合方式，任选地通过施用受试者所吸入的包含ceDNA载体的可吸入颗粒的气雾剂悬浮液施用于受试者的肺。可吸入粒子可以是液体或固体。包含ceDNA载体的液体粒子的气雾剂可以通过任何适合的方式产生，如用压力驱动的气雾剂喷雾器或超声波喷雾器，如所属领域的技术人员已知的。参见例如美国专利第4,501,729号。包含ceDNA载体的固体粒子的气雾剂也可以通过制药领域已知的技术，用任何固体粒子药物气雾剂发生器产生。

[0615] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够施用于CNS组织(例如脑、眼)。

[0616] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体可以治疗、改善或预防的眼病包括涉及视网膜、后束和视神经的眼科病症(例如色素性视网膜炎、糖尿病性视网膜病变和其它视网膜变性疾病、葡萄膜炎、年龄相关黄斑变性、青光眼)。许多眼科疾病和病症与以下三种类型适应症中的一种或多种有关：(1)血管产生、(2)炎症和(3)变性。在一些实施例中，如本文所公开的ceDNA载体可以用于递送抗血管生成因子；抗炎因子；延缓细胞变性、促进细胞免毒或促进细胞生长的因子以及前述的组合。例如，糖尿病性视网膜病的特征是血管产生。通过眼内(例如玻璃体内)或眼周(例如眼球筋膜囊下区域)递送一种或多种抗血管产生抗体或融合蛋白能够治疗糖尿病性视网膜病变。可以用本发明的ceDNA载体治疗、改善或预防的其它眼病包括：地图样萎缩、血管性或“湿性”黄斑变性、PKU、雷伯氏先天性黑蒙(LCA)、尤塞氏综合征、弹力纤维性假黄瘤(PXE)、x-连锁视网膜色素变性(XLRP)、x-连锁视网膜劈裂症(XLRS)、无脉络膜症、雷伯氏遗传性视神经病变(LHON)、全色盲、视锥-视杆细胞营养不良、富克斯角膜内皮营养不良、糖尿病性黄斑水肿以及眼癌和肿瘤。

[0617] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够治疗、改善或预防炎性眼疾病或病症(例如葡萄膜炎)。通过眼内(例如玻璃体或前房)施用如本文所公开的ceDNA载体能够表达一种或多种消炎抗体或融合蛋白。

[0618] 在一些实施方案中，如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体能够编码与转基因有关的FVIII蛋白，所述转基因编码报告子多肽(例如酶，例如绿色荧光蛋白，或碱性磷酸酶)。在一些实施例中，编码可用于实验或诊断目的的报告蛋白的转基因选自下列中的任何一种：β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和所属领域中熟知的其它转基因。在一些方面中，表达连接到报告子多肽的FVIII蛋白的ceDNA载体可以用于诊断目的，以及测定ceDNA载体在其所施用到的受试者中的功效或用作ceDNA载体在所述受试者中的活性的标志物。

[0619] C.使用ceDNA载体测试成功的基因表达

[0620] 所属领域中众所周知的分析能够用于测试ceDNA载体对FVIII蛋白的基因递送的效率，所述测试能够在体外和体内模型中进行。所属领域的技术人员通过测量FVIII蛋白的mRNA和蛋白质水平(例如逆转录PCR、蛋白质印迹分析，和酶联免疫吸附分析(ELISA))能够

评估ceDNA对FVIII蛋白的表达水平。在一个实施方案中，ceDNA包含能够用于评估FVIII蛋白表达的报道蛋白，例如通过荧光显微术或发光读盘器检查报道蛋白的表达。体内施用时，蛋白质功能测定能够用于测试给定FVIII蛋白的功能，以确定基因表达是否已经成功地发生。熟练的技术人员将能够确定最佳的测试来体外或体内测量ceDNA载体所表达的FVIII蛋白的功能。

[0621] 本文中预期FVIII蛋白通过ceDNA载体在细胞或受试者中的基因表达效应能够持续至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少10个月、至少12个月、至少18个月、至少2年、至少5年、至少10年、至少20年，或能够持久存在。

[0622] 在一些实施例中，本文所描述的表达盒、表达构建体或ceDNA载体中的FVIII蛋白可以针对宿主细胞进行密码子优化。如本文所用，术语“进行密码子优化”或“密码子优化”是指通过用如小鼠或人(例如人源化)等所关注脊椎动物的基因中使用频率较高或最高的密码子替换天然序列(例如原核序列)的至少一个、超过一个或大量密码子来修饰核酸序列以增强其在所述脊椎动物的细胞中的表达的过程。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。通常，密码子优化不会改变原始翻译蛋白质的氨基酸序列。使用例如Aptagen的GeneForge®密码子优化和定制基因合成平台(Aptagen公司)或其它公共数据库可以确定优化密码子。

[0623] D.通过评估来自ceDNA载体的FVIII蛋白表达来确定功效

[0624] 所属领域中已知的用于测定蛋白表达的基本上任何方法能够用于分析FVIII蛋白从ceDNA载体中的表达。此类方法/分析的非限制性实施例包括酶联免疫分析(ELISA)、亲和力ELISA、ELISPOT、连续稀释、流式细胞术、表面等离子体共振分析、动力学排除分析、质谱学、蛋白质印迹、免疫沉淀和PCR。

[0625] 为了评估体内FVIII蛋白表达，可以从受试者获得生物样品进行分析。示例性的生物样品包括生物流体样品、体液样品、血液(包括全血)、血清、血浆、尿液、唾液、活检和/或组织样品等。生物样品或组织样品还可以指从个体中分离出的组织或流体样品，包括(但不限于)肿瘤切片、粪便、脊髓液、胸膜液、乳头抽出物、淋巴液、皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外部切片、泪液、唾液、母乳、细胞(包括(但不限于)血细胞)、肿瘤、器官，以及体外细胞培养液成分的样品。术语还包括上述样品的混合物。术语“样品”还包括未处理或预处理(或预处理)的生物样品。在一些实施方案中，用于本文描述的分析和方法的样品包含从待测受试者收集的血清样品。

[0626] E.通过临床参数确定表达的FVIII蛋白的功效

[0627] 由ceDNA载体表达的给定FVIII蛋白对血友病A(即功能性表达)的功效可由熟练的临床医生确定。然而，在如本文所述的编码治疗性FVIII蛋白的ceDNA载体治疗之后，如果血友病A的任一种或所有征象或症状以有益方式改变或临床上接受的其它症状或疾病标志物改良或改善例如至少10％，则治疗在所述术语在本文使用时被视为“有效治疗”。还可以根据个体未发生恶化来测量功效，如通过血友病A的稳定或对医疗干预的需求(即，疾病的进展停止或至少减缓)所评估。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或描述于本文中。治疗包括对个体或动物(一些非限制性实施例包括人或哺乳动物)的疾病的任何治疗，并且包括：(1)抑制(例如遏制)血友病A或减缓血友病A的进展；或(2)缓解血友病A，例如引起血友病A消退；以及(3)阻止或减小血友病A发展的可能性，或预防与疾病/病症相关的

继发血友病A(诸如肝脏或肾脏衰竭)。治疗疾病的有效量是指当施用给需要治疗的哺乳动物时,足以对该疾病产生如本文所定义术语的有效治疗的量。药剂功效能够通过评估血友病A疾病所特有的身体指标来测定。医生可以评估血友病A的任何一种或多种临床症状,包括:因割伤或受伤,或手术或牙科工作后导致的不明原因出血和过度出血;许多大的或深的瘀伤;接种疫苗后异常出血;关节疼痛、肿胀或紧绷;尿液或粪便中带血;不明原因的流鼻血;在婴儿中,无法解释的烦躁。

[0628] XI.表达抗体或融合蛋白的ceDNA载体的各种应用

[0629] 如本文所公开,如本文所述用于表达FVIII蛋白的组合物和ceDNA载体能够用于表达用于一系列目的的FVIII蛋白。在一个实施方案中,表达FVIII蛋白的ceDNA载体可用于创建携带转基因的体细胞转基因动物模型,例如,研究血友病A的功能或疾病进展。在一些实施方案中,表达FVIII蛋白的ceDNA载体是用于治疗、预防或改善哺乳动物受试者的血友病A状态或病症。

[0630] 在一些实施方案中,FVIII蛋白在受试者中能够以足以治疗与基因产物的表达增强、活性提高或基因的不当上调有关的疾病的量从ceDNA载体中表达。

[0631] 在一些实施方案中,FVIII蛋白在受试者中能够以足以治疗与蛋白质的表达减少、表达缺乏或功能异常有关的血友病A的量从ceDNA载体中表达。

[0632] 所属领域的普通技术人员应了解,转基因可以不是自身转录的基因的开放阅读框架,相反,其可以是靶基因的启动子区域或抑制子区域,并且ceDNA载体可以修饰此类区域,结果使如此调节FVIII基因的表达。

[0633] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的组合物和ceDNA载体可用于递送FVIII蛋白以用于如上所述的各种目的。

[0634] 在一些实施方案中,转基因编码一种或多种可用于治疗、改善或预防哺乳动物受试者的血友病A状态的FVIII蛋白。ceDNA载体所表达的FVIII蛋白以足以治疗与异常基因序列有关的血友病A的量施用于患者,从而能够产生以下中的任何一种或多种:增强的蛋白质表达、蛋白质的过度活性、靶基因或蛋白质的表达减少、表达缺乏或功能异常。

[0635] 在一些实施方案中,设想本文公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体用于诊断和筛选方法中,其中使转基因瞬时或稳定表达于细胞培养系统中,或可替代地,表达于转基因动物模型中。

[0636] 本文所述技术的另一方面提供了一种用如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体转导哺乳动物细胞群的方法。从总体和一般意义上讲,所述方法至少包含以下步骤:将包含有效量的一种或多种如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体的组合物引入所述群体的一个或多个细胞中。

[0637] 另外,本发明提供了组合物以及治疗和/或诊断试剂盒,所述试剂盒包含一种或多种本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体或ceDNA组合物,所述ceDNA载体或ceDNA组合物与一种或多种另外的成分一起配制,或备有一个或多个关于其使用的说明书。

[0638] 如本文所公开的用于表达FVIII蛋白的ceDNA载体所施用的细胞可以是任何类型,包括(但不限于)神经细胞(包括末梢和中枢神经系统的细胞,具体地说,脑细胞)、肺细胞、视网膜细胞、上皮细胞(例如肠道和呼吸道上皮细胞)、肌肉细胞、树突状细胞、胰脏细胞(包括胰岛细胞)、肝细胞、心肌细胞、骨细胞(例如骨髓干细胞)、造血干细胞、脾细胞、角质细

胞、纤维母细胞、内皮细胞、前列腺细胞、生殖细胞等等。可替代地，细胞可以是任何祖细胞。作为另一个替代方案，细胞可以是干细胞(例如神经干细胞、肝干细胞)。作为又一个替代方案，细胞可以是癌细胞或肿瘤细胞。此外，如上文指出，细胞可以来自任何物种来源。

[0639] A.表达FVIII的ceDNA载体的生产和纯化

[0640] 本文公开的ceDNA载体将用于在体外或体内产生FVIII蛋白。以这种方式产生的FVIII蛋白能够分离出来，针对期望的功能加以测试，并且经过提纯以便进一步用于研究或治疗性治疗。每种蛋白产生系统具有其自身的优点/缺点。虽然体外产生的蛋白能够轻松地提纯且能够在短时间内产生蛋白，但体内产生的蛋白能够具有翻译后修饰，例如糖基化。

[0641] 使用所属领域的技术人员已知的任何方法(例如离子交换色谱、亲和层析、沉淀或电泳)能够将使用ceDNA载体产生的FVIII治疗蛋白提纯。

[0642] 能够测试通过本文所述的方法和组合物产生的FVIII治疗蛋白对所期望的靶蛋白的结合。

[0643] 实施例

[0644] 以下实施例是为了说明而非限制而提供。本领域普通技术人员将了解，可以从本文所述的任何野生型或修饰ITR中构建ceDNA载体，并且以下示例性方法可以用于构建和评估这类ceDNA载体的活性。尽管所述方法以某些ceDNA载体为例，但与描述一致，它们可应用于任何ceDNA载体。

[0645] 实施例1：使用基于昆虫细胞的方法构建ceDNA载体

[0646] PCT/US18/49996的实施例1中描述了使用多核苷酸构建体模板产生ceDNA载体，所述文献以全文引用的方式并入本文中。例如，用于生成本发明的ceDNA载体的多核苷酸构建体模板可以是ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒和/或ceDNA-杆状病毒。不受理论束缚，在容许的宿主细胞中，在例如Rep存在下，具有两个对称ITR(其中至少一个ITR相对于野生型ITR序列经修饰)和表达构建体的多核苷酸构建体模板复制而产生ceDNA载体。ceDNA载体产生经历两个步骤：第一，通过Rep蛋白从模板主链(例如ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒基因组等)中切除(“拯救”)模板；以及第二，Rep介导所切除的ceDNA载体复制。

[0647] 产生ceDNA载体的一种示例性方法是从如本文所描述的ceDNA-质粒产生。参考图1A和1B，ceDNA-质粒中的每一种的多核苷酸构建体模板均包括左修饰ITR和右修饰ITR，在ITR序列之间具有以下：(i)增强子/启动子；(ii)转基因的克隆位点；(iii)转录后反应元件(例如，土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE))；以及(iv)聚腺苷酸化信号(例如，来自牛生长激素基因(BGHpA))。在每个组分之间还引入了独特的限制核酸内切酶识别位点(R1-R6)(图1A和1B中所示)，以便于将新的基因组分引入构建体中的特定位点。将R3(PmeI)GTTTAAAC(SEQ ID NO:123)和R4(PacI)TTAATTAA(SEQ ID NO:124)酶位点工程改造成克隆位点以引入转基因的开放阅读框架。将这些序列克隆到从ThermoFisher Scientific获得的pFastBac HT B质粒中。

[0648] ceDNA-杆粒的产生：

[0649] 依循根据制造商说明书的方案，用测试或对照质粒转化DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY®DH10Bac™感受态细胞，赛默飞世尔)。诱导DH10Bac细胞中质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组，以产生重组ceDNA-杆粒。通过在含有X-gal和IPTG，利用抗生素选择转化体并维持杆粒和转座酶质粒的细菌琼脂平板上大肠杆菌(E.coli)中基于蓝白筛选来

筛选正向选择(Φ80dlacZΔM15标志物提供了来自杆粒载体的β-半乳糖苷酶基因的α-互补)来选择重组杆粒。挑选出由破坏-半乳糖苷指示基因的转座所造成的白色菌落,并在10ml培养基中进行培养。

[0650] 从大肠杆菌中分离重组ceDNA-杆粒,并使用FugeneHD将其转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中以产生感染性杆状病毒。将附着性Sf9或Sf21昆虫细胞在25℃下在T25烧瓶内的50ml培养基中进行培养。四天后,从细胞去除培养基(含有P0病毒),将培养基通过0.45μm过滤器过滤,从细胞或细胞碎片中分离出感染性杆状病毒颗粒。

[0651] 任选地,第一代杆状病毒(P0)通过在50到500ml培养基中感染原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增。将细胞在回转式振荡培育箱的悬浮培养液中、在130rpm下、在25℃下维持,监测细胞直径和存活率,直到细胞达到18-19nm直径(从14-15nm的原初直径)和～4.0E+6个细胞/mL的密度。感染后第3天到第8天,利用离心去除细胞和残骸、然后通过0.45μm过滤器过滤来收集培养基中的P1杆状病毒颗粒。

[0652] 收集包括测试构建体的ceDNA-杆状病毒,并测定杆状病毒的感染活性或滴度。具体来说,将四个20ml的2.5E+6个细胞/ml的Sf9细胞培养物用P1杆状病毒按1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000的稀释度处理,并在25-27℃下进行培育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0653] 如PCT/US18/49996的图8A中所公开的“Rep-质粒”(所述文献以全文引用的方式并入本文中)在pFASTBAC™-Dual表达载体(赛默飞世尔)中产生,所述表达载体包含Rep78(SEQ ID NO:131或133)和Rep52(SEQ ID NO:132)或Rep68(SEQ ID NO:130)和Rep40(SEQ ID NO:129)。按照制造商提供的方案,将Rep-质粒转化到DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY® DH10Bac™感受态细胞(赛默飞世尔))中。诱导DH10Bac细胞中Rep质粒与杆状病毒穿梭载体之间重组,以产生重组杆粒(“Rep杆粒”)。通过在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上大肠杆菌中包含蓝白筛选的正向选择(Φ80dlacZΔM15标记提供了来自杆粒载体的β-半乳糖苷酶基因的α-互补)来选择重组杆粒。挑选分离的白色菌落,并接种到10ml选择培养基(含卡那霉素、遗传霉素(gentamicin)、四环素的LB肉汤)中。从大肠杆菌中分离出重组杆粒(Rep-杆粒),并将Rep-杆粒转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中,以产生感染性杆状病毒。

[0654] 将Sf9或Sf21昆虫细胞在50ml培养基中培养4天,并从培养物中分离感染性重组杆状病毒(“Rep-杆状病毒”)。任选地,第一代Rep-杆状病毒(P0)通过感染未处理的原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增并且在50ml到500ml培养基中培养。在感染后3天与8天之间,通过离心或过滤或其它分级分离方法分离细胞来收集培养基中的P1杆状病毒颗粒。收集Rep-杆状病毒并测定杆状病毒的感染活性。具体地,用P1杆状病毒按下列稀释度处理四个20mL的2.5×10^6个细胞/mL的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0655] ceDNA载体产生和表征

[0656] 参考图4B,然后将Sf9昆虫细胞培养基分别按照1:1000和1:10,000的比率添加到新制的Sf9细胞培养基(2.5E+6个细胞/毫升,20ml)中,所述昆虫细胞培养基含有:(1)含有ceDNA杆粒或ceDNA杆状病毒的样品;和(2)上述Rep杆状病毒。然后将细胞在25℃下以130rpm的速度培养。共感染后4-5天,检测细胞直径和活力。当细胞直径达到18nm-20nm并且活力为约70%-80%时,将细胞培养物离心,去除培养基,并收集细胞团粒。首先将细胞团粒

悬浮于适量的水性介质,即水或缓冲液中。使用凯杰(Qiagen)MIDI PLUSTM纯化方案(凯杰,每个柱处理0.2mg细胞团粒质量)从细胞中分离并纯化ceDNA载体。

[0657] 初始基于260nm下的UV吸光度,测定从Sf9昆虫细胞产生和纯化的ceDNA载体的产率。

[0658] 可以通过如图4D所展示在天然或变性条件下的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定来评估ceDNA载体,其中(a)在限制核酸内切酶裂解和凝胶电泳分析后,对比天然凝胶,变性凝胶上存在以两倍大小迁移的特征色带;以及(b)在未裂解物质的变性凝胶上存在单体和二聚体(2x)色带是ceDNA载体存在的特征。

[0659] 通过用限制核酸内切酶消化从共同感染的Sf9细胞(如本文所描述)获得的DNA,进一步分析分离的ceDNA载体的结构,其中限制核酸内切酶是针对以下条件选择的:a)在ceDNA载体内仅存在单个切割位点;和b)所得片段足够大,以便在0.8%变性琼脂糖凝胶上进行分级分离时被清楚看到(>800bp)。如图4D和4E所示,具有非连续结构的线性DNA载体以及具有线性和连续结构的ceDNA载体可以通过其反应产物的大小来区分-例如,预期具有非连续结构的DNA载体将产生1kb和2kb片段,而具有连续结构的非衣壳化载体预期产生2kb和4kb片段。

[0660] 因此,为了以定性方式证明分离的ceDNA载体是根据定义所要求那样共价闭合端的,将样品用在特定DNA载体序列的背景下被鉴定为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化,优选产生两个大小不等的裂解产物(例如1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后,线性、非共价闭合的DNA将以1000bp和2000bp大小分解,而共价闭合的DNA(即ceDNA载体)将以2倍大小分解(2000bp和4000bp),这是因为两条DNA链是连接的并且现在伸展且长度翻倍(尽管是单链)。此外,由于多聚体DNA载体的端对端连接,对单体、二聚体和n聚体形式的DNA载体的消化都将分解为相同大小的片段(参见图4D)。

[0661] 如本文中所用,短语“通过在天然凝胶和变性条件下的琼脂糖凝胶电泳鉴定DNA载体的分析法”是指通过进行限制性核酸内切酶消化、然后对消化产物进行电泳评估来评估ceDNA闭合端的分析法。后面是一种此类示例性分析,尽管所属领域的普通技术人员将了解,对这个实施例可以进行许多所属领域已知的变化。选择限制核酸内切酶作为所关注的ceDNA载体的单切酶,其将产生DNA载体长度的大致1/3×和2/3×的产物。由此使天然凝胶和变性凝胶上的带解析。变性之前,重要的是从样品中去除缓冲液。Qiagen PCR清洁试剂盒或脱盐“离心柱”,例如GE HEALTHCARE ILUSTRA™MICROSPIN™G-25柱,是核酸内切酶消化的一些本领域已知的选项。所述测定包括例如:i)用适当的限制性核酸内切酶消化DNA;2)施加于例如Qiagen PCR清洁试剂盒,用蒸馏水洗脱;iii)加入10x变性溶液(10x=0.5M NaOH、10mM EDTA),加入10X染料,不进行缓冲,并与通过添加入10X变性溶液至4x而制备的DNA序列梯一起,在预先与1mM EDTA和200mM NaOH一起培育以确保凝胶和凝胶盒中的NaOH浓度均匀的0.8-1.0%凝胶上进行分析,并在1x变性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)存在下跑动凝胶。本领域普通技术人员将了解基于所得物的大小和期望的计时使用什么电压来跑动电泳。电泳后,将凝胶排出并在1×TBE或TAE中中和,并转移到蒸馏水或含1×SYBR金的1×TBE/TAE中。然后使用例如赛默飞世尔SYBR®金核酸凝胶染色剂(DMSO中的10,000×浓缩液)和落射荧光(蓝色)或UV(312nm)使带可视化。

[0662] 产生的ceDNA载体的纯度可以使用任何所属领域已知的方法来评估。作为一个示例性和非限制性方法，通过对ceDNA载体的荧光强度与标准进行比较，能够估计ceDNA-质粒对样品的总体UV吸光度的贡献。举例来说，若基于UV吸光度将4μg ceDNA载体装载于凝胶上并且ceDNA载体荧光强度等效于已知是1μg的2kb色带，则存在1μg ceDNA载体，且ceDNA载体是总UV吸收材料的25％。然后将凝胶上的带强度相对于带表示的计算输入作图-例如，如果总ceDNA载体是8kb，而切下的比较带为2kb，那么带强度将按总输入的25％绘制，在这种情况下，对于1.0μg输入，将为.25μg。使用ceDNA载体质粒滴定来绘制标准曲线，然后使用回归线方程计算ceDNA载体色带的量，然后可用于测定ceDNA载体所占的总输入的百分比或纯度百分比。

[0663] 出于比较目的，实施例1描述了使用基于昆虫细胞的方法和多核苷酸构建体模板产生ceDNA载体，并且还描述于PCT/US18/49996的实施例1中，所述文献以全文引用的方式并入本文中。举例来说，根据实施例1用于产生本发明的ceDNA载体的多核苷酸构建体模板可以是ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒，和/或ceDNA-杆状病毒。不受理论束缚，在容许的宿主细胞中，在例如Rep存在下，具有两个对称ITR(其中至少一个ITR相对于野生型ITR序列经修饰)和表达构建体的多核苷酸构建体模板复制而产生ceDNA载体。ceDNA载体产生经历两个步骤:第一，通过Rep蛋白从模板主链(例如ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒基因组等)中切除(“拯救”)模板;以及第二，Rep介导所切除的ceDNA载体复制。

[0664] 在使用昆虫细胞的方法中产生ceDNA载体的示例性方法是通过如本文所述的ceDNA-质粒。参考图1A和1B，ceDNA-质粒中的每一种的多核苷酸构建体模板均包括左修饰ITR和右修饰ITR，在ITR序列之间具有以下:(i)增强子/启动子;(ii)转基因的克隆位点;(iii)转录后反应元件(例如，土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE));以及(iv)聚腺苷酸化信号(例如，来自牛生长激素基因(BGHpA))。在每个组分之间还引入了独特的限制核酸内切酶识别位点(R1-R6)(图1A和1B中所示)，以便于将新的基因组分引入构建体中的特定位点。将R3(PmeI)GTTTAAAC(SEQ ID NO:123)和R4(PacI)TTAATTAA(SEQ ID NO:124)酶位点工程改造成克隆位点以引入转基因的开放阅读框架。将这些序列克隆到从赛默飞世尔科技公司获得的pFastBac HT B质粒中。

[0665] 实施例2:通过切除从双链DNA分子产生合成的ceDNA

[0666] ceDNA载体的合成产生描述于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122的实施例2-6中，所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。使用合成方法产生ceDNA载体的一种示例性方法涉及切除双链DNA分子。简单地说，可以使用双链DNA构建体来生成ceDNA载体，例如参见PCT/US19/14122的图7A-8E。在一些实施例中，双链DNA构建体是ceDNA质粒，例如参见例如2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US2018/064242的图6)。

[0667] 在一些实施方案中，制备ceDNA载体的构建体包含如本文所描述的调控开关。

[0668] 出于说明的目的，实施例2描述了ceDNA载体的产生，所述ceDNA载体是使用此方法产生的示例性闭合端DNA载体。然而，虽然这个实施例中以ceDNA载体为例来说明产生闭合端DNA载体的体外合成产生方法，其通过切除包含ITR和表达盒(例如异源核酸序列)的双链多核苷酸、随后如本文所述将自由的3’和5’端接合来实现，但所属领域的普通技术人员了解，能够如上所说明修饰双链DNA多核苷酸分子，以便产生任何所期望的闭合端DNA载体，包括(但不限于)狗骨状DNA、哑铃状DNA等等。能够利用实施例2中所述的合成产生方法产生的

用于产生抗体或融合蛋白的示例性ceDNA载体论述于标题为“III.通用ceDNA载体”的章节中。由ceDNA载体表达的示例性抗体和融合蛋白描述于标题为“IIC.由ceDNA载体表达的示例性抗体和融合蛋白”的章节中。

[0669] 所述方法包括(i)从双链DNA构建体中切除编码表达盒的序列和(ii)在一个或多个ITR处形成发夹和(iii)通过接合(例如通过T4 DNA连接酶)将自由的5’与3’端连接。

[0670] 双链DNA构建体按照5’到3’次序包含:第一限制性核酸内切酶位点;上游ITR;表达盒;下游ITR;以及第二限制性核酸内切酶位点。然后使双链DNA构建体与一种或多种限制核酸内切酶接触,以在两个限制性核酸内切酶位点处均产生双链断裂。一种核酸内切酶可以靶向两个位点,或每个位点可以被不同的限制性内切酶靶向,只要限制性位点不存在于ceDNA载体模板内即可。由此将限制性核酸内切酶位点之间的序列从双链DNA构建体的其余部分中切除(参见PCT/US19/14122的图9)。接合后,形成封闭式DNA载体。

[0671] 所述方法中使用的一个或两个ITR可以是野生型ITR。也可以使用经修饰的ITR,其中修饰能够包括来自野生型ITR的一个或多个核苷酸在形成B和B’臂和/或C和C’臂的序列中缺失、插入或取代(参见例如PCT/US19/14122的图6-8和10、图11B),并且可以具有两个或更多个发夹环(参见例如PCT/US19/14122的图6-8、图11B)或单个发夹环(参见例如PCT/US19/14122的图10A-10B、图11B)。通过对现有寡核苷酸进行基因修饰或通过重新生物学和/或化学合成能够产生发夹环经修饰的ITR。

[0672] 在一个非限制性实施例中,左和右ITR-6(SEQ ID NO:111和112)在B-B’和C-C’臂中包括来自AAV2的野生型ITR的40个核苷酸的缺失。经修饰的ITR中剩余的核苷酸预测可形成单个发夹结构。去折叠所述结构的吉布斯自由能是约-54.4kcal/mol。还可以对ITR产生其它修饰,包括功能Rep结合位点或Trs位点的任选缺失。

[0673] 实施例3:经由寡核苷酸构建来产生ceDNA

[0674] 使用涉及组装不同寡核苷酸的合成方法产生ceDNA载体的另一种示例性方法提供于PCT/US19/14122的实施例3中,其中ceDNA载体是通过合成5’寡核苷酸和3’ITR寡核苷酸并且将ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合来产生。PCT/US19/14122的图11B展示了将5’ITR寡核苷酸和3’ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合的示例性方法。

[0675] 如本文所公开,ITR寡核苷酸可包含WT-ITR(例如,参见图3A,图3C),或修改的ITR(例如,参见图3B和图3D)。(还参见例如PCT/US19/14122的图6A、6B、7A和7B,所述文献全文并入本文中)。示例性ITR寡核苷酸包括(但不限于)SEQ ID NO:134-145(参见例如PCT/US19/14122的表7)。经修饰的ITR可以包括形成B和B’臂和/或C和C’臂的序列中的野生型ITR中的一个或多个核苷酸的缺失、插入或取代。可以通过基因修饰或生物和/或化学合成来生成用于无细胞合成的包含如本文所描述的WT-ITR或mod-ITR的ITR寡核苷酸。如本文所讨论,实施例2和3中的ITR寡核苷酸可以包含WT-ITR,或呈对称或不对称构型的经修饰的ITR(mod-ITR),如本文所讨论。

[0676] 实施例4:通过单链DNA分子产生ceDNA

[0677] 使用合成方法产生ceDNA载体的另一种示例性方法提供于PCT/US19/14122的实施例4中,并且其使用包含两个有义ITR的单链线性DNA,所述两个有义ITR侧接有义表达盒序列并且共价附接到与反义表达盒侧接的两个反义ITR,然后将所述单链线性DNA的末端接合以形成封闭式单链分子。一个非限制性实施例包含合成和/或产生单链DNA分子、使所述分

子的各部分粘接以形成具有二级结构的一个或多个碱基对区域的单一线性DNA分子，然后使自由的5’与3’端彼此接合以形成封闭的单链分子。

[0678] 用于产生ceDNA载体的示例性单链DNA分子从5’到3’包含：有义第一ITR；有义表达盒序列；有义第二ITR；反义第二ITR；反义表达盒序列；以及反义第一ITR。

[0679] 用于实施例4的示例性方法的单链DNA分子可以通过本文所描述的任何DNA合成方法形成，例如体外DNA合成，或通过用核酸酶使DNA构建体(例如质粒)裂解并将所得的dsDNA片段解链以提供ssDNA片段来提供。

[0680] 通过将温度降低到低于有义和反义序列对的所计算的解链温度可以实现粘接。解链温度取决于特定核苷酸碱基含量和所用溶液的特征，例如盐浓度。任何给定序列的解链温度和溶液组合容易由所属领域的普通技术人员计算出。

[0681] 所粘接分子的自由5’和3’端可以彼此接合，或与发夹分子接合而形成ceDNA载体。适合的示例性接合方法和发夹分子描述于实施例2和3中。

[0682] 实施例5：ceDNA的提纯和/或产生确认

[0683] 通过本文所述方法(包括例如实施例1中所述的基于昆虫细胞的产生方法或实施例2到4中所述的合成产生方法)产生的任一种DNA载体产物能够使用所属领域的技术人员通常已知的方法加以提纯，例如去除杂质、未使用的组分或副产物；且/或能够加以分析，从而确认所产生的DNA载体(在此情况下是ceDNA载体)是所期望的分子。用于提纯DNA载体(例如ceDNA)的示例性方法是使用Qiagen Midi Plus提纯方案(Qiagen)和/或凝胶提纯。

[0684] 以下是用于确认ceDNA载体身份的示例性方法。

[0685] 可以通过如图4D所展示在天然或变性条件下的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定来评估ceDNA载体，其中(a)在限制核酸内切酶裂解和凝胶电泳分析后，对比天然凝胶，变性凝胶上存在以两倍大小迁移的特征色带；以及(b)在未裂解物质的变性凝胶上存在单体和二聚体(2x)色带是ceDNA载体存在的特征。

[0686] 分离出的ceDNA载体的结构进一步如下分析：用根据以下所选的限制核酸内切酶消化经提纯的DNA：a)ceDNA载体内仅存在单个切割位点；和b)所得片段当在0.8％变性琼脂糖凝胶上分级分离时大得足以清晰可见(>800bp)。如图4C和4D所示，具有非连续结构的线性DNA载体和具有线性连续结构的ceDNA载体能够根据其反应产物的尺寸区分，举例来说，具有非连续结构的DNA载体预期产生1kb和2kb片段，而具有连续结构的ceDNA载体预期产生2kb和4kb片段。

[0687] 因此，为了以定性方式证明分离的ceDNA载体是根据定义所要求那样共价闭合端的，将样品用在特定DNA载体序列的背景下被鉴定为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化，优选产生两个大小不等的裂解产物(例如1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后，线性、非共价闭合的DNA将以1000bp和2000bp大小分解，而共价闭合的DNA(即ceDNA载体)将以2倍大小分解(2000bp和4000bp)，这是因为两条DNA链是连接的并且现在伸展且长度翻倍(尽管是单链)。此外，由于多聚体DNA载体的端对端连接，对单体、二聚体和n聚体形式的DNA载体的消化都将分解为相同大小的片段(参见图4E)。

[0688] 如本文所用，短语“通过在天然凝胶和变性条件下进行琼脂糖凝胶电泳来鉴定DNA载体的分析”是指一种通过执行限制性核酸内切酶消化、随后对消化产物进行电泳评估来

评估ceDNA闭合端的分析。后面是一种这样的示例性分析，尽管本领域普通技术人员将了解，对这个实施例可以进行许多本领域已知的变化。选择限制核酸内切酶作为所关注的ceDNA载体的单切酶，其将产生DNA载体长度的大致1/3×和2/3×的产物。由此使天然凝胶和变性凝胶上的带解析。变性之前，重要的是从样品中去除缓冲液。Qiagen PCR提纯试剂盒或脱盐“离心柱”(例如GE HEALTHCARE ILUSTRA™MICROSPIN™G-25柱)是本领域中已知用于内切核酸酶消化的一些选项。分析包括例如：i)用适当限制性核酸内切酶消化DNA；2)施加于例如Qiagen PCR提纯试剂盒，用蒸馏水洗脱；iii)添加10x变性溶液(10x＝0.5M NaOH、10mM EDTA)，添加10X染料，不缓冲，且分析，且通过在预先用1mM EDTA和200mM NaOH培育的0.8-1.0％凝胶上添加10X变性溶液直至4x来制备DNA梯，以确保凝胶和凝胶盒中的NaOH浓度均一；以及在1x变性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)存在下跑凝胶。本领域普通技术人员将了解基于所得物的大小和期望的计时使用什么电压来跑动电泳。电泳后，将凝胶排出并在1×TBE或TAE中中和，并转移到蒸馏水或含1×SYBR金的1×TBE/TAE中。然后使用例如赛默飞世尔SYBR®金核酸凝胶染色剂(DMSO中的10,000×浓缩液)和落射荧光(蓝色)或UV(312nm)使带可视化。前述基于凝胶的方法通过从凝胶色带中分离出ceDNA载体且允许其复性而能够根据提纯目的调整。

[0689] 产生的ceDNA载体的纯度可以使用任何本领域已知的方法来评估。作为一个示例性和非限制性方法，通过对ceDNA载体的荧光强度与标准进行比较，能够估计ceDNA-质粒对样品的总体UV吸光度的贡献。举例来说，若基于UV吸光度将4μg ceDNA载体装载于凝胶上并且ceDNA载体荧光强度等效于已知是1μg的2kb色带，则存在1μg ceDNA载体，且ceDNA载体是总UV吸收材料的25％。然后将凝胶上的带强度相对于带表示的计算输入作图-例如，如果总ceDNA载体是8kb，而切下的比较带为2kb，那么带强度将按总输入的25％绘制，在这种情况下，对于1.0μg输入，将为.25μg。使用ceDNA载体质粒滴定来绘制标准曲线，然后使用回归线方程计算ceDNA载体带的量，然后可以用于测定ceDNA载体所表示的总输入的百分比或纯度百分比。

[0690] 实施例6：ceDNA的可控转基因表达：重复剂量施用能够维持和/或增加体内ceDNA载体的转基因表达。

[0691] 使用包含CAG启动子(SEQ ID NO:72)和侧接于不对称ITR(例如5’WT-ITR(SEQ ID NO:2)与3’mod-ITR(SEQ ID NO:3)之间的荧光素酶转基因(SEQ ID NO:56)的ceDNA质粒作为示例性FVIII，根据以上实施例1所述的方法产生ceDNA载体，且在不同体内治疗方案中进行评估。实施例6到10所述的所有后续实验中都使用这种ceDNA载体。在实施例6中，提纯ceDNA载体且配制成脂质纳米颗粒(LNP ceDNA)且注射到每只CD-1®IGS小鼠的尾静脉中。脂质体是用适合的脂质掺混物配制而成，所述脂质掺混物包含四种组分以形成脂质纳米颗粒(LNP)脂质体，包括阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG-脂质。

[0692] 为了评估ceDNA载体在体内在长时间段内对转基因的持续表达，通过尾静脉的静脉内注射将存在于无菌PBS中的LNP-ceDNA施用于大约5到7周龄的CD-1®IGS小鼠。评估了三个不同的剂量组：0.1mg/kg、0.5mg/kg和1.0mg/kg，每组十只小鼠(除1.0mg/kg之外，每组15只小鼠)。第0天施用注射液。每组五只小鼠在第28天另外注射相同剂量。静脉内施用于CD-1®IGS小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)；野生型小鼠)之后，通过IVIS成像来测量荧光素酶表达。在第3、4、7、14、21、28、31、35和42天，以及在第42天至第110

天之间常规地(例如每周、每两周,或每10天或每2周)腹膜内注射150mg/kg荧光素底物之后,通过IVIS成像来评估荧光素酶表达。作为示例性FVIII的荧光素酶转基因表达通过IVIS成像测量,持续3种不同施用方案之后的至少132天。

[0693] 为了研究重复剂量(例如再施用)的表达荧光素酶的LNP-ceDNA对经LNP-ceDNA治疗的受试者的效果,进行了扩展研究。具体地说,评估其以确定一次或多次额外施用ceDNA载体是否能够增加表达水平。

[0694] 在此研究中,在第0天和第28天初始静脉内施用1.0mg/kg(即,预致敏剂量)之后,通过IVIS评估ceDNA载体的荧光素酶表达在CD-1®IGS小鼠中的生物分布(A组)。ceDNA载体的第二次施用是在第84天,经由尾静脉注射3mg/kg(B组)或10mg/kg(C组),以1.2mL施用于尾静脉。在此研究中,A、B和C组各自使用五(5)只CD-1®小鼠。如上文所述,在第49、56、63和70天额外给药之前,且在第84天和第91、98、105、112和132天重复剂量后,对小鼠中的荧光素酶表达进行IVIS成像。评估且检测到所有三个组A、B和C的荧光素酶表达直到至少110天(所评估的最长时间段)。

[0695] 显示LNP-ceDNA-Luc重复剂量(即,ceDNA组合物再施用)使荧光素酶表达水平增加,如通过在荧光素存在下评估荧光素酶活性所测定。作为示例性FVIII的荧光素酶转基因表达通过IVIS成像测量,持续3种不同施用方案之后的至少110天(A、B和C组)。在研究期间,对于尚未给予任何额外重复剂量(1mg/kg预致敏剂量(即,A组))治疗的小鼠观察到稳定的荧光素酶表达。已施用3mg/kg ceDNA载体重复剂量的B组小鼠的辐射度观察值相对于C组小鼠增加大约七倍。惊人地,重复给药10mg/kg ceDNA载体的小鼠的荧光素酶辐射度观察值相对于未接受任何重复剂量的小鼠(A组)增加17倍。

[0696] 在第0和28天静脉内施用1mg/kg ceDNA载体于尾静脉之后,A组的CD-1®IGS小鼠显示荧光素酶表达。B组和C组显示在第一时间点(第0天)施用1mg/kg ceDNA载体且在第二时间点第84天重复给药施用ceDNA载体的CD-1®IGS小鼠的荧光素酶表达。ceDNA载体的第二次施用(即,重复剂量)使表达增加至少7倍、甚至高达17倍。

[0697] B组重复剂量施用的ceDNA载体的剂量(即,量)的3倍增加(即,重复剂量施用3mg/kg)引起荧光素酶表达增加7倍。还意外的是,C组重复剂量施用ceDNA载体的量增加10倍(即,重复剂量施用10mg/kg)引起荧光素酶表达增加17倍。因此,ceDNA的第二次施用(即,重复剂量)使表达增加至少7倍、甚至高达17倍。这表明,重复剂量引起的转基因表达增加大于预期且依赖于ceDNA载体在重复剂量施用时的剂量或量,且似乎与第0天的初始预致敏施用引起的初始转基因表达协同作用。也就是说,转基因表达的剂量依赖性增加不具有相加作用;相反,转基因表达水平具有剂量依赖性且大于在每个时间点所施用的ceDNA载体的量的总和。

[0698] 相较于未在第二时间点给予ceDNA载体的对照小鼠(A组),B组和C组均显示荧光素酶表达有明显的剂量依赖性增加。综合而言,这些数据表明ceDNA载体对转基因的表达能够通过在至少第二时间点重复给药(即,再施用)ceDNA载体、以剂量依赖性方式增加。

[0699] 综合而言,这些数据表明转基因(例如来自ceDNA载体的FVIII)的表达水平能够在持续的水平保持至少84天且至少在第二时间点施用ceDNA载体重复剂量之后能够在体内增加。

[0700] 实施例7:LNP配制的ceDNA载体在体内的持续转基因表达

[0701] 评估具有不同脂质纳米颗粒的实施例6的结果在体内、在小鼠中的再现性。小鼠在第0天给予包含由CAG启动子驱动的荧光素酶转基因的ceDNA载体,所述ceDNA载体囊封于与实施例6中所用不同的LNP中或包含polyC、但缺乏ceDNA或荧光素酶基因的相同LNP中。具体地说,大约4周龄的雄性CD-1®小鼠在第0天通过单次注射0.5mg/kg LNP-ceDNA荧光素酶或对照LNP-polyC(静脉内经由侧向尾静脉施用)来处理。第14天,动物经由腹膜内注射2.5mL/kg全身性给予150mg/kg荧光素。荧光素施用之后的大约15分钟,使用体内成像系统("IVIS")对每只动物进行成像。

[0702] 如图7所示,观察到所有四只经ceDNA处理的小鼠的肝脏中存在明显荧光,并且除注射部位之外,在动物中观察到的其他荧光极少,表明LNP介导ceDNA构建体发生肝脏特异性递送且递送的ceDNA载体在施用之后至少两周能够控制其转基因的持续表达。

[0703] 实施例8:体内施用ceDNA载体引起的转基因在肝脏中的持续表达

[0704] 在单独实验中,评估LNP递送的ceDNA在经处理动物的肝脏内的定位。将包含所关注的功能转基因的ceDNA载体囊封于实施例7所用的相同LNP中且以0.5mg/kg的剂量水平、通过体内静脉内注射施用于小鼠。6小时之后,终结小鼠且取肝脏样品,用福尔马林固定且使用标准方案进行石蜡包埋。进行RNAscope®原位杂交分析,以使用对ceDNA转基因具特异性的探针使组织内的ceDNA载体可视化且利用显色反应和苏木精染色(Advanced Cell Diagnostics)进行检测。图8显示了结果,其表明ceDNA存在于肝细胞中。

[0705] 实施例9:ceDNA在体内的持续视觉转基因表达

[0706] 评估ceDNA载体转基因表达在除肝脏之外的组织中的可持续性,以测定在眼施用之后,ceDNA载体在体内的耐受性和表达。尽管荧光素酶在实施例9中被用作示例性转基因,但是本领域普通技术人员可容易地用来自表1中列出那些的FVIII序列代替荧光素酶转基因。

[0707] 第0天,向大约9周龄的雄性史泊格多利大鼠(Sprague Dawley rats)视网膜下注射使用jetPEI®转染试剂(Polyplus)配制的5μL包含荧光素酶转基因的ceDNA载体或使用jetPEI®配制的编码荧光素酶的质粒DNA,两者浓度均为0.25μg/μL。每组测试四只大鼠。给动物服镇静剂且使用33号针在右眼视网膜下注射测试制品。每只动物的左眼不处理。注射之后立即利用光学相干断层扫描或眼底成像来检查眼以便确认视网膜下水泡的存在。大鼠根据标准程序用丁基原啡因(buprenorphine)和体表抗生素软膏处理。

[0708] 第7、14、21、28和35天,两组动物在荧光素施用后的5到15分钟,经由腹膜内注射(2.5mL/kg)全身性给予150mg/kg新制荧光素,所有动物均在异氟醚麻醉下的同时使用IVIS成像。在5分钟暴露期间,获得包含眼的所关注区域内的总通量[p/s]和平均通量(p/s/sr/cm^2)。结果作为每个处理组的经处理的眼("注射")的平均辐射度相对于每个处理组的未处理眼("未注射")的平均辐射度的图形表示(图9B)。在ceDNA载体处理的眼中容易检测到明显的荧光,但在质粒处理的眼中则弱得多(图9A)。35天之后,将质粒注射的大鼠终结,同时继续研究ceDNA处理的大鼠,在第42、49、56、63、70和99天进行荧光素注射和IVIS成像。结果表明,通过单次注射引入大鼠眼中的ceDNA载体介导体内转基因表达,且所述表达在高水平持续到注射之后的至少99天。

[0709] 实施例10:ceDNA载体对Rag2小鼠的持续给药和重复给药。

[0710] 在ceDNA载体的基因表达盒中编码的一个或多个转基因表达于宿主环境(例如细胞或受试者)的情形中,在所表达的蛋白质被识别为外来蛋白质的情况下,宿主将可能建立适应性免疫应答,这可能使表达产物发生非期望的耗竭,从而会潜在地与表达的缺乏发生混淆。在一些情况下,与正常宿主环境异源的报道分子可能会发生这种情况。相应地,评估Rag2小鼠模型体内的ceDNA载体转基因表达,所述小鼠模型缺乏B和T细胞且因此未建立针对非原生鼠蛋白质(例如荧光素酶)的适应性免疫应答。简单来说,c57bl/6和Rag2基因敲除小鼠在第0天,经由尾静脉注射,静脉内给予0.5mg/kg的经LNP囊封的表达荧光素酶的ceDNA载体或polyC对照物,且在第21天,某些小鼠重复给药相同剂量水平的相同的经LNP囊封的ceDNA载体。所有测试组各自由4只小鼠组成。如实施例9中所述,每周按时间间隔注射荧光素之后,进行IVIS成像。

[0711] 与从IVIS分析中观察到的总通量相比,在给予LNP-ceDNA载体-Luc的野生型小鼠中观察到的荧光(所表达的荧光素酶的存在的间接测量)在第21天之后逐渐减少,而施用相同疗法的Rag2小鼠在第42天实验期间显示相对恒定持续的荧光素酶表达(图10A)。在野生型小鼠中观察到减少的大约第21天时间点对应于预期可能会产生适应性免疫应答的时间范围。LNP-ceDNA载体再施用于Rag2小鼠引起表达明显增加,在此研究中追踪其的至少21天期间,所述表达的明显增加被维持(图10B)。结果表明,当ceDNA载体在宿主中表达非原生蛋白质时,适应性免疫可以起作用,并且在从初始施用的20+天时间范围内观察到的表达的减少可以使混杂的适应性免疫应答而非表达的衰减(或除其之外)信号传导到所表达的分子。值得注意的是,当原生蛋白质在宿主中表达时,这个应答预期较低,其中预期宿主将所表达的分子正确地识别为自身的且将不产生此类免疫应答。

[0712] 实施例11:肝脏特异性表达和CpG调节对持续表达的影响

[0713] 如实施例10中所述,非期望的宿主免疫应答在一些情况下可能会人为地抑制原本是一个或多个期望转基因从所引入的ceDNA载体中的持续表达。采取两种方法来评估避免和/或抑制潜在宿主免疫应答对来自ceDNA载体的持续表达的影响。首先,由于前述实施例中所用的ceDNA-Luc载体处于组成型CAG启动子的控制下,因此使用肝脏特异性启动子(hAAT)或不同组成型启动子(hEF-1)制备类似构建体,以了解避免长时间暴露于骨髓细胞或非肝脏组织是否减少所观察到的任何免疫效应。其次,对某些ceDNA荧光素酶构建体进行工程改造以使CpG含量减小(一种已知的用于宿主免疫反应的触发事件)。将此类工程化和启动子开关的ceDNA载体施用于小鼠后,测量ceDNA编码的荧光素酶基因表达。

[0714] 使用三种不同ceDNA载体,每种编码作为转基因的荧光素酶。第一种ceDNA载体具有数目较多的未甲基化CpG(约350)且包含组成型CAG启动子(“ceDNACAG”);第二种具有中等数目个未甲基化CpG(约60)且包含肝脏特异性hAAT启动子(“ceDNA hAAT低CpG”);并且第三种是第二种的甲基化形式,使得其不含有未甲基化CpG,并且也包含hAAT启动子(“ceDNA hAAT无CpG”)。ceDNA载体原本是相同的。如上文所述制备载体。

[0715] 四组大约4周龄的四只雄性CD-1®小鼠用囊封于LNP中的ceDNA载体之一或polyC对照物处理。第0天,每只小鼠施用0.5mg/kg ceDNA载体的单次静脉内尾静脉注射液,体积为5mL/kg。在第-1、-、1、2、3、7天和随后每周记录体重,直到小鼠终结为止。在第0、1和35天,获取全血和血清样品。第7、14、21、28和35天和随后每周使用体内成像系统(IVIS)执行体内成像。为了成像,每只小鼠经由腹膜内注射2.5mL/kg来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后,

使每只小鼠麻醉并且成像。第93天终结小鼠且收集末端组织，包括肝脏和脾脏。第0天给药之后的6小时进行细胞因子测量。

[0716] 虽然所有经ceDNA处理的小鼠在第7天和第14天显示明显的荧光，但是ceDNA CAG小鼠中的荧光在第14天之后快速减少且在研究的其余时间内逐渐减少。相比之下，ceDNA hAAT低CpG和无CpG处理的小鼠的总通量保持在稳定的高水平(图11)。这表明，将ceDNA载体递送特异性引向肝脏使得载体的转基因表达在单次注射之后的至少77天期间持续、持久。CpG最小化或完全缺乏CpG含量的构建体具有相似的持久、持续表达特征，而高CpG组成型启动子构建体的表达随时间展现衰减，表明ceDNA载体引入引起的宿主免疫活化可以起到减少此类载体在受试者中的所观察到的任何表达的作用。这些结果提供了按照所期望水平定制应答持续时间的替代方法，这是通过在观察到宿主免疫应答(一种潜在的转基因特异性应答)的情况下选择组织限制性启动子和/或改变ceDNA载体的CpG含量来实现。

[0717] 实施例12:表达FVIII的ceDNA的流体动力学传递

[0718] 将核酸引入啮齿动物中的肝脏的熟知的方法是通过流体动力尾静脉注射。在此系统中，大量未囊封核酸的加压注射导致细胞通透性的瞬时增加，并直接递送到组织和细胞中。这提供了绕过许多宿主免疫系统(诸如巨噬细胞递送)的实验机制，提供了在没有这种活性的情况下观察递送和表达的机会。

[0719] 如上文实施例1和5中所述制备和纯化三种不同的ceDNA载体，每种载体具有野生型左ITR和截短突变体右ITR并具有编码FVIII的转基因区。将在肝脏特异性启动子或单独PBS控制下的ceDNA FVIII载体施用于大约6周龄的雄性C57bl/6J小鼠。裸ceDNA载体经由外侧尾静脉、通过流体动力学静脉内注射、以5秒内施用1.2mL的体积或以5-8秒内施用100mL/kg的剂量、按每个动物(每组4个动物)0.005mg给药。在第0、1、2、3和7天及其后每周测量体重。在第3天、第7天、第14天、第21天以及末尾第28天，从每个经处理的动物收集血液样品。血浆样品中表达的FVIII的存在通过人总因子VIIIELISA试剂盒(创新研究)测量。

[0720] 如图11A所示，在来自用三种ceDNA FVIII载体中的两种处理的小鼠的第3天和第7天血浆样品中容易检测到FVIII，但在用PBS处理的小鼠中未观察到。图11B显示FVIII表达在观察到FVIII表达的两种载体中是剂量体积依赖性的，并且在28天的研究中保持相对恒定，但载体3除外，该载体在第7天后表达迅速下降。该实验证明，ceDNA载体能够在流体动力学注射后从肝脏表达FVIII，并且在ceDNA施用后，可在血清中快速且容易地检测到FVIII。

[0721] 实施例13:表达FVIII的ceDNA的流体动力学递送-表达FVIII的各种ceDNA载体的测试

[0722] 使用如实施例12中所述的流体动力学递送系统来测试表达FVIII的各种ceDNA载体对血清FVIII水平的影响，其中在血清中检测到FVIII表明ceDNA载体能够在注射后表达FVIII。

[0723] 制备如实施例12中所述的ceDNA载体。每个ceDNA FVIII载体(单独的，没有任何LNP封装)和对照通过流体动力学静脉内(IV)注射途径施用于C57BL/6小鼠。ceDNA载体经由外侧尾静脉、通过流体动力学静脉内注射、以90-100mg/mL的体积、以每个动物(每组4个动物)5μg给药。终末时间点是第7天。使用单独的媒介物作为对照。

[0724] 对以下ceDNA载体在三个独立的实验中进行了测试。以下ceDNA载体的序列显示在表9中。在表9中，开放阅读框用下划线显示。启动子以粗体显示。

[0725] (1)ceDNAFVIII-载体4、ceDNAFVIII-载体6、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体14、ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体18、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNA2FVIII-载体22；

[0726] (2)ceDNAFVIII-载体1、ceDNAFVIII-载体2、ceDNAFVIII-载体3、ceDNAFVIII-载体5、ceDNAFVIII-载体7、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体13、ceDNAFVIII-载体15；

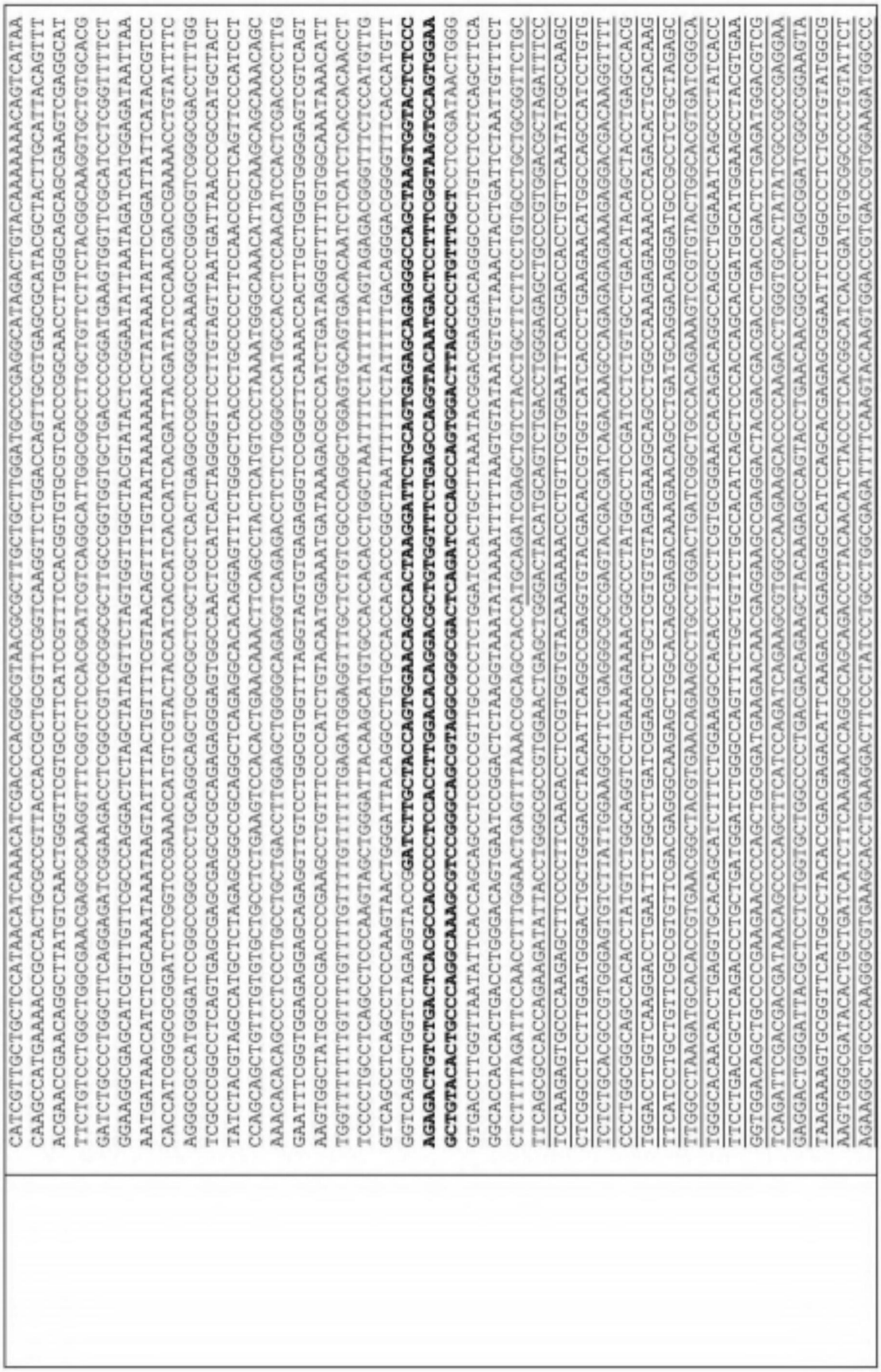
[0727] (3)ceDNAFVIII-载体9、ceDNAFVIII-载体10、ceDNAFVIII-载体11、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20、ceDNAFVIII-载体24、ceDNAFVIII-载体25、ceDNAFVIII-载体26。

[0728]

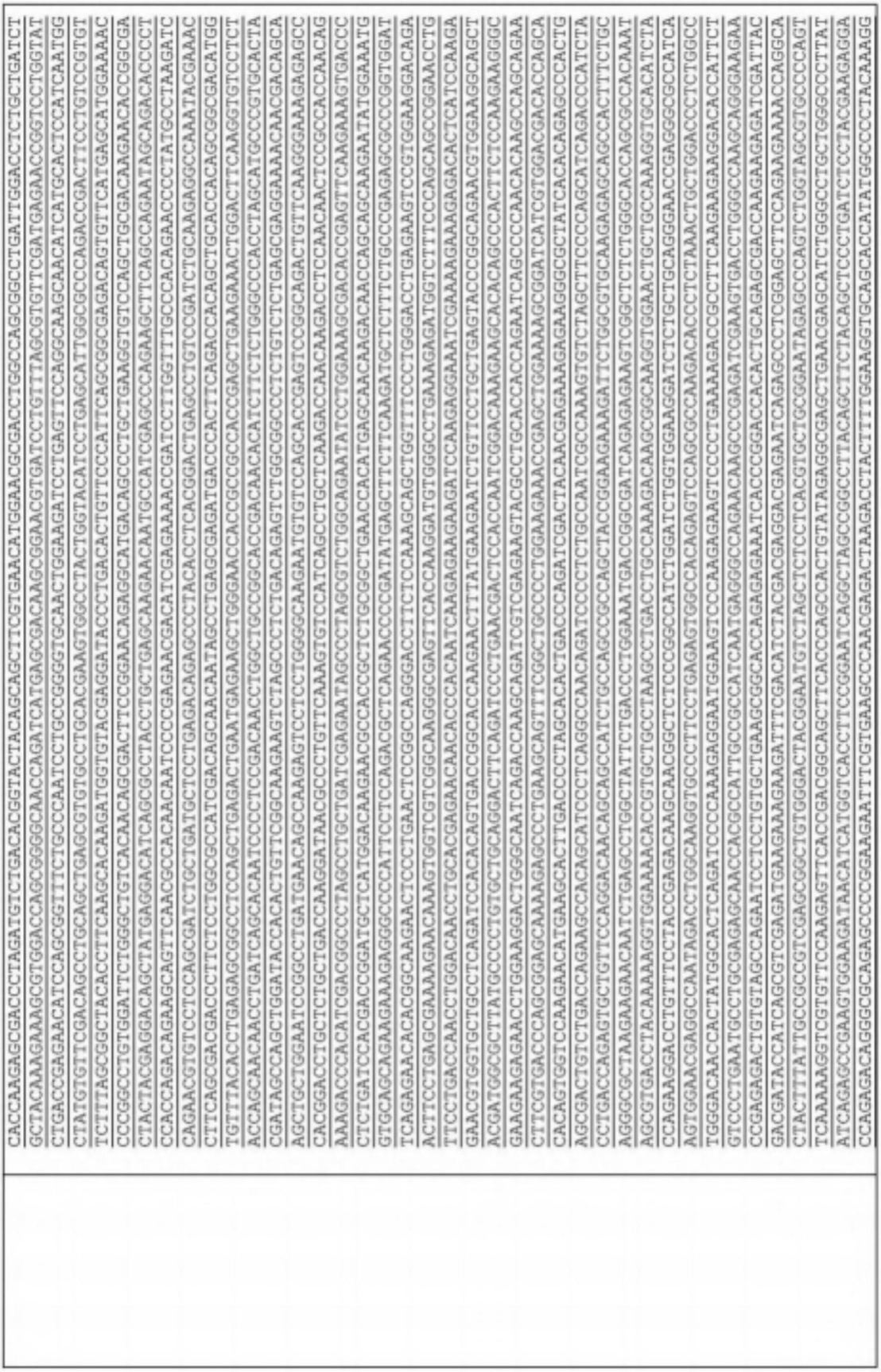
表9

ceDNA 载体名称	核酸序列
ceDNAFVIII-载体1 (SEQ ID NO: 192)	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTA CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTCTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGC CGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAG ATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTAT GGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTG TGACAATTTACCGAACACTCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTT CTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCA TGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTC AAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGA GGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCA GGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAA

[0729]



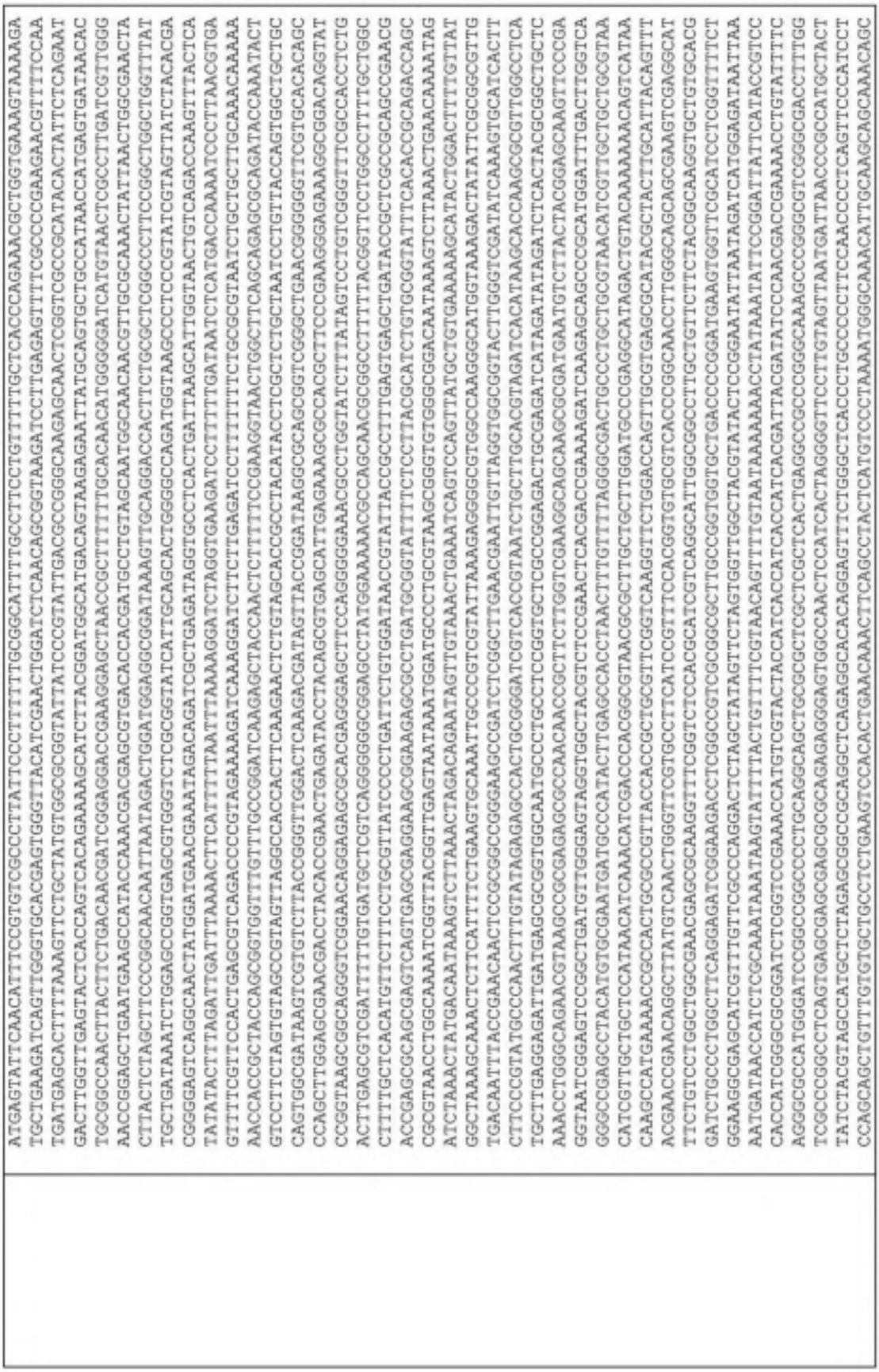
[0730]


CACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCT
GCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTAT
CTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGG
CTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGCCGTCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGT
TCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAAC
CCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGA
CTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACGCCATCGAGGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAATAGCAGACACCCCT
CCACCAGACAGAAGCAGTTCAACGCCACACAATCCCCGAGAACGCATCGAGAAAACCGATCCTTGGTTTGCCACACAGAACCCCTATGCCTAAGATC
CAGAACGTGTCCTCCAGCGATCTGCTGATGCTCCTGAGACAGAGCCCTACACCTCACGGACTGAGCCTGTCGTCCAAGAGGCCAAATACGAAAC
CTTCAGCGACGACCTTCTCCTGGCGCCATCGACAGCAACAATAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCAGACCACAGCTGCACCACAGCGGCGACATGG
TGTTTACACCTGAGAGCGGCCTCCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGAACCACCGCCGCCACCGAGCTGAAGAAACTGGACTTCAAGGTGTCCTCT
ACCAGCAACAACCTGATCAGCAATCCCCTCCGACAACCTGGCTCCGGCACCGACAACACATCTTCTCTGGGCCCACCTAGCATGCCCGTGCACTA
CGATAGCCAGCTGGATACCACACTGTTCGGCAAGAAGTCTAGCCCTCTGACAGAGTCTGGCGGCCCTCTGTCTCTGAGCGAGGAAAACAACGACAGCA
AGCTGCTGGAATCCGGCCTGATGAACAGCCAAGAGTCCTCCTGGGGCAAGAATGTGTCCAGCACCGAGTCCGGCAGACTGTTCAAGGGAAAGAGAGCC
CACGGACCTGCTCTGCTGACCAAGGATAACGCCCTGTTCAAAGTGTCCATCAGCCTGCTCAAGACCAACAAGACCTCCAACACTCCGCCACCAACAG
AAAGACCCACATCGACGGCCCTAGCCTGCTGATCGAGAATAGCCCTAGCGTCTGGCAGAATATCCTGGAAAGCGACACCGAGTTCAAGAAAGTGACCC
CTCTGATCCACGACCGGATGCTCATGGACAAGAACGCCACCGCTCTGCGGCTGAACCACATGAGCAACAAGACAACCAGCAAGAATATGGAAATG
GTGCAGCAGAAGAAAGAGGCCCCATTCCTCCAGACGCTCAGAACCCCGATATGAGCTTCTTTCTGCCCGAGAGCGCCCGGTGGATGAT
TCAGAGAACACACGGCAAGAACTCCCTGAACTCCGGCCAGGGACCTTCTCCAAAGCAGCTGGTTTCCCTGGGACCTGAGAAGTCCGTGAAGGACAGA
ACTTCCTGAGCGAAAAGAACAAAGTGGTCGTCGGCAAGGGCGATGTTCACCAAGGATGTGGGCCTGAAAGAGATGGTCTTTCCCAGCAGCCGGAACCTG
TTCCTGACCAACCTGGACAACCTGCACGAGAACAACACCCACAATCAAGAAGAAGATCCAAGAGGAAATCGAAAAGAAAGAGACACTCATCCAAGA
GAACGTGGTGCTGCCTCAGATCCACACAGTGACCGGCACCAAGAACTTTATGAAGAATCTGTTCCTGCTGAGTACCCGGCAGAACGTGGAAGGCAGCT
ACGATGGCGCTTATGCCCCCTGTGCTGCAGGACTTCAGATCCCTGAACGACTCCACCACAGCCCACTTCTCCAAGAAGGGC
GAAGAAGAGAACCTGGAAGGACTGGGCAATCAGACCAAGCAGATCGTCGAGAAGTACGCCTGCACCACCAGAATCAGCCCCCAACACAAGCCAGCAGAA
CTTCGTGACCCAGCGGAGCAAAAGAGCCCTGAAGCAGTTTCGGCTGCCCCCTGGAAGAAACCGAGCTGGAAAAGCGGATCATCGTGGACGACACCAGCA
CACAGTGGTCCAAGAACATGAAGCACTTGACCCCTAGCACACTGACCCAGATCGACTACAACGAGAAAGAGAAGGGCGCTATCACACAGAGCCCACTG
AGCGACTGTCTGACCAGAAGCCACAGCATCCCCTCTGCCAATCGCCCTAAAGTGTCTAGCTTCCCCAGCATCAGACCCATCTA
CCTGACCAGAGTGCTGTTCCAGGACAACAGCAGCCATCTGCCAGCCGCCAGCTACCGGAAGAAAGATTCTGGCGTGCAAGAGAGCAGCCACTTCTGC
AGGGCGCTAAGAAGAACAATCTGAGCCTGGCTATTCTGACCCTGGAAATGACCGGCGATCAGAGAGAAGTCGGCTCTCTGGGCACCAGCGCCACAAAT
AGCGTGACCTACAAAAAGGTGGAAAACACCGTGCTGCCTAAGCCTGACCTGCCAAAGACAAGCGGCAAGGTGGAACTGCTGCCAAAGGTGCACATCTA
CCAGAAGGACCTGTTTCCTACCGAGACAAGCAACGGCTCTCCCGGCCATCTGGATCTGGTGGAAGGATCTCTGCTGCAGGGAACCGAGGGCGCCATCA
AGTGGAACGAGGCCAATAGACCTGGCAAGGTGCCCTTCCTGAGAGTGGCCACAGAGTCCAGCGCCAAGACACCCTCTAAACTGCTGGAACCCTCTGGCC
TGGGACAACCACTATGGCACTCAGATCCCCAAAGAGGAATGGAAGTCCCAAGAGAAGACCGCCTTCAAGAAGAAGGACACCATTCT
GTCCCTGAATGCCTGCGAGAGCAACCACGCCATTGCCGCCATCAATGAGGGCCAGAACAAGCCCGAGATCGAAGTGACCTGGGCCAAGCAGGGAAGAA
CCGAGAGACTGTGTAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGAGAGAAATCACCCGGACCACACTGCAGAGCGACCAAGAAGAGATCGATTAC
GACGATACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGCCCTCGGAGCTTCCAGAAGAAAACCAGGCA
CTACTTTATTGCCGCCGTCGAGCGGCTGTGGGACTACGGAATGTCTAGCTCTCCTCACGTGCTGCGGAATAGAGCCCAGTCTGGTAGCGTGCCCCAGT
TCAAAAAGGTCGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTAT
ATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCTCCTACGAAGAGGA
CCAGAGACAGGGCGCAGAGCCCCGGAAGAATTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCTACAAAGG

[0731]

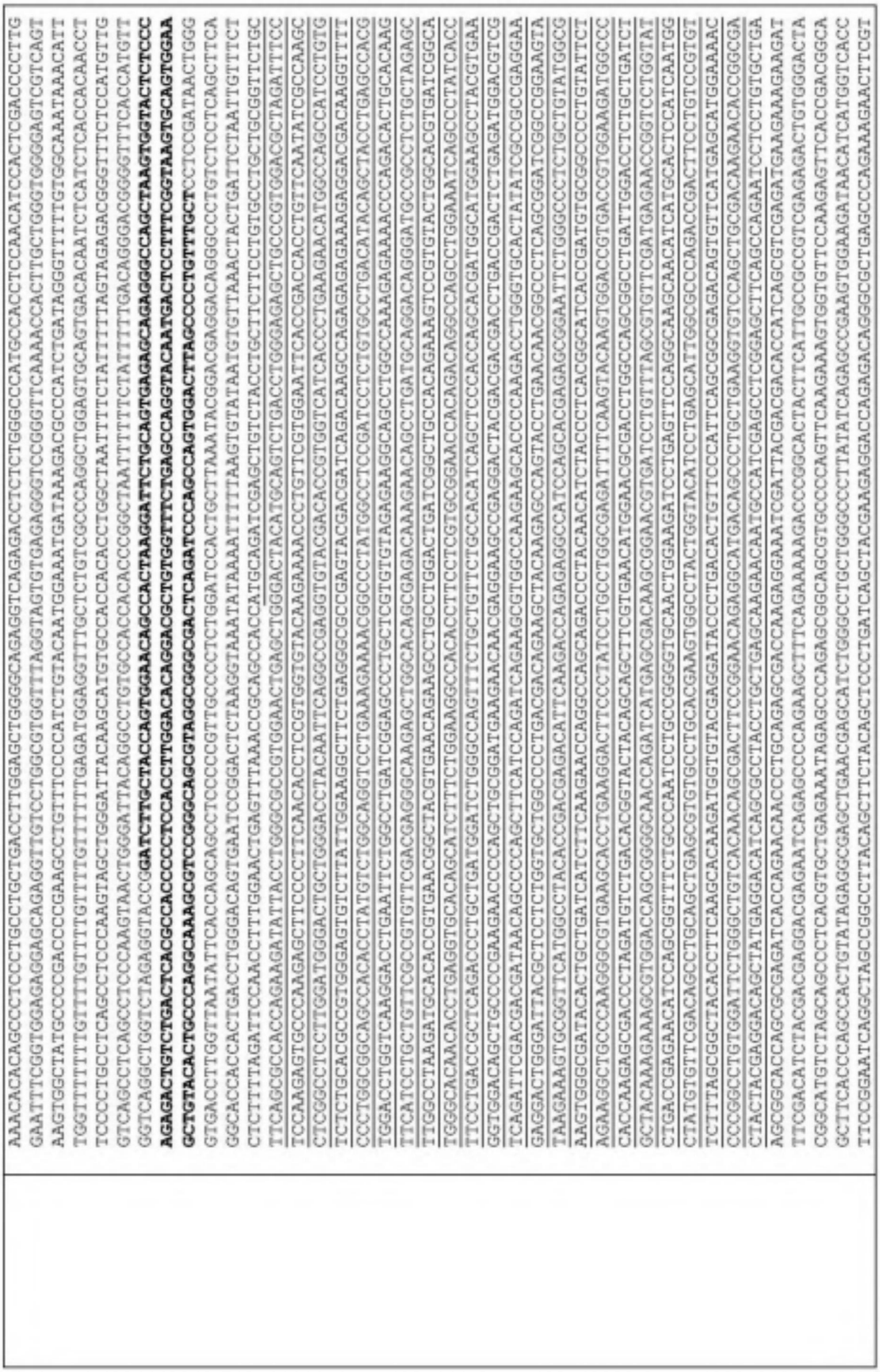
ceDNAFVIII-载体2（SEQ ID NO: 193）	ACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGACCTCGAAAAGGACGTGCACAGCGGACTCATCGGCCCACTGCTTGTGTGCCACACC AACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTTTTCACCATCTTCGACGAAACGAAGTCCTGGTACTTCACCGA AAACATGGAAAGAACTGCAGGGCCCCTTGCAACATTCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCA TGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACTCCATCCACTTC AGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTTGAGATGCTGCCTAG CAAGGCCGGAATTTGGAGAGTGTCTGATTGGAGAGCACCTCCACGCCGGGATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAGTGTCAGACCC CTCTCGGCATGGCCTCTGGCCACATTAGAGACTTCCAGATCACCGCCAGCGGACAGTATGGACAGTGGGCCCCTAAACTGGCCAGACTGCACTACTCC GGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCTTTCAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGC CAGACAAAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGAAGAGTGGCAGACCTACCGGGGCAATAGCACCGGCA CACTGATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACA CACTACAGCATCAGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGA CGCCCAGATCACAGCCTCTAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCTAAGGCCCGGCTTCATCTGCAAGGCAGAAGCAACGCTTGGA GGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAATGGCTCCAGGTGGACTTTCAGAAAACCATGAAAGTGACACAGGGCGTCAAGTCCCTGCTG ACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTTCTGATCAGCTCCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGG AAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATAGTCTGGACCCACCACTGCTGACCCGCTACCTGCGAATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATTG CCCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTC TTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCA CAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCT TAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGT ATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGC TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTG CTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTT CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGACATGGCTACGTAGA TAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGA GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCA AGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTG AAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGC ATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAAC CAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTC CCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAAT CAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATG TTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGG	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT

[0732]

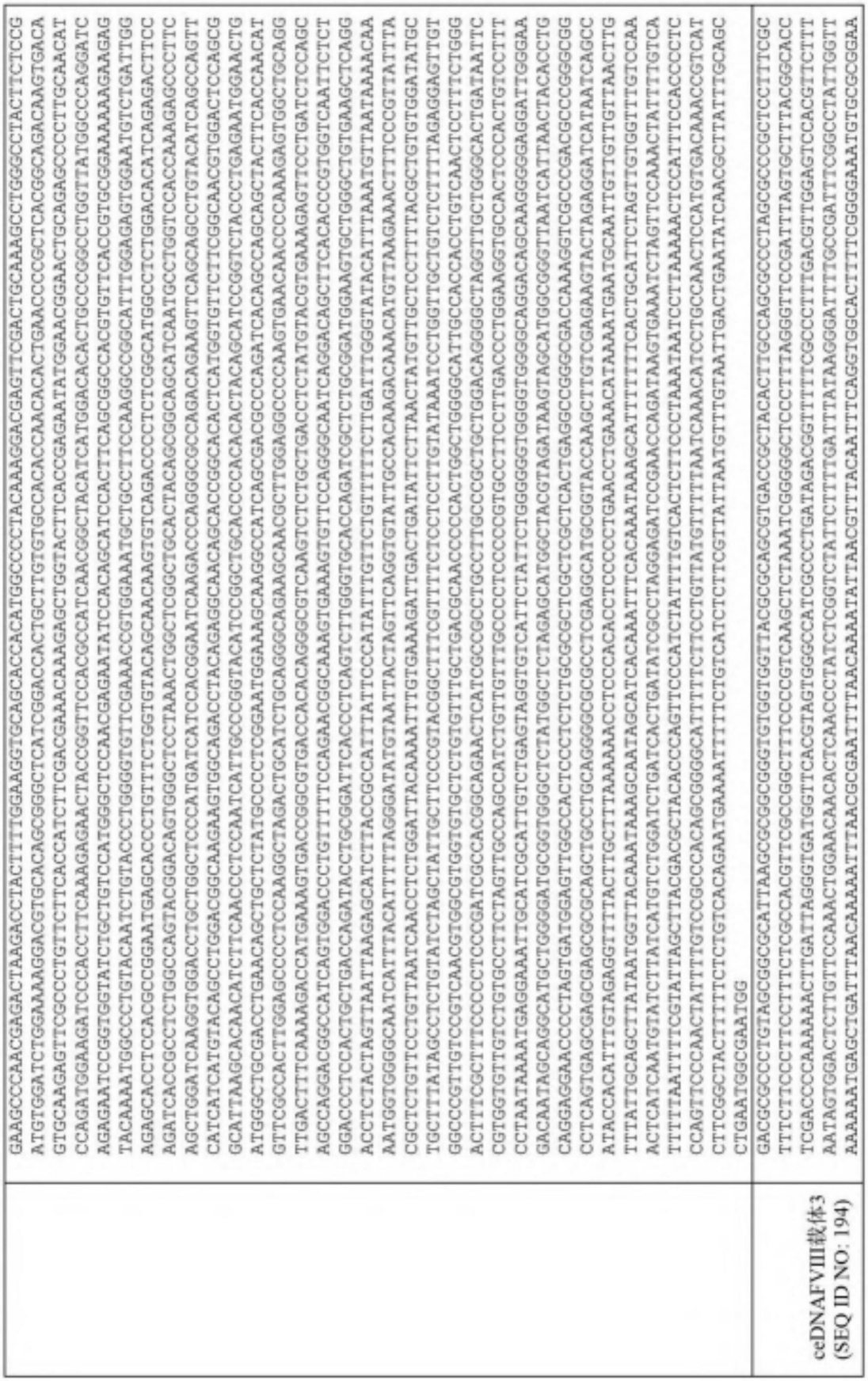


ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA
TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT
GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTA
CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT
TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA
TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA
GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA
AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC
CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG
ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG
ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGC
CGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAG
ATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTAT
GGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTG
TGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTT
CTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCA
TGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTC
AAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGA
GGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCA
GGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTTAACATCGTTGCTGCTGCGTAA
CATCGTTGCTGCTCCATACATCAACATCGACCCACGGCGTTAACGCGCTTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAA
CAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTT
ACGAACGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCAT
TTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACG
GATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCT
GGAAGGCGAGCATCGTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAA
AATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCC
CACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTC
AGGGCGCCATGGGATCCGGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT
TATCTACGTAGCCATGCTCTAGAGCGGCCGCAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCT
CCAGCAGCTGTTTGTGTGCTCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGC

[0733]

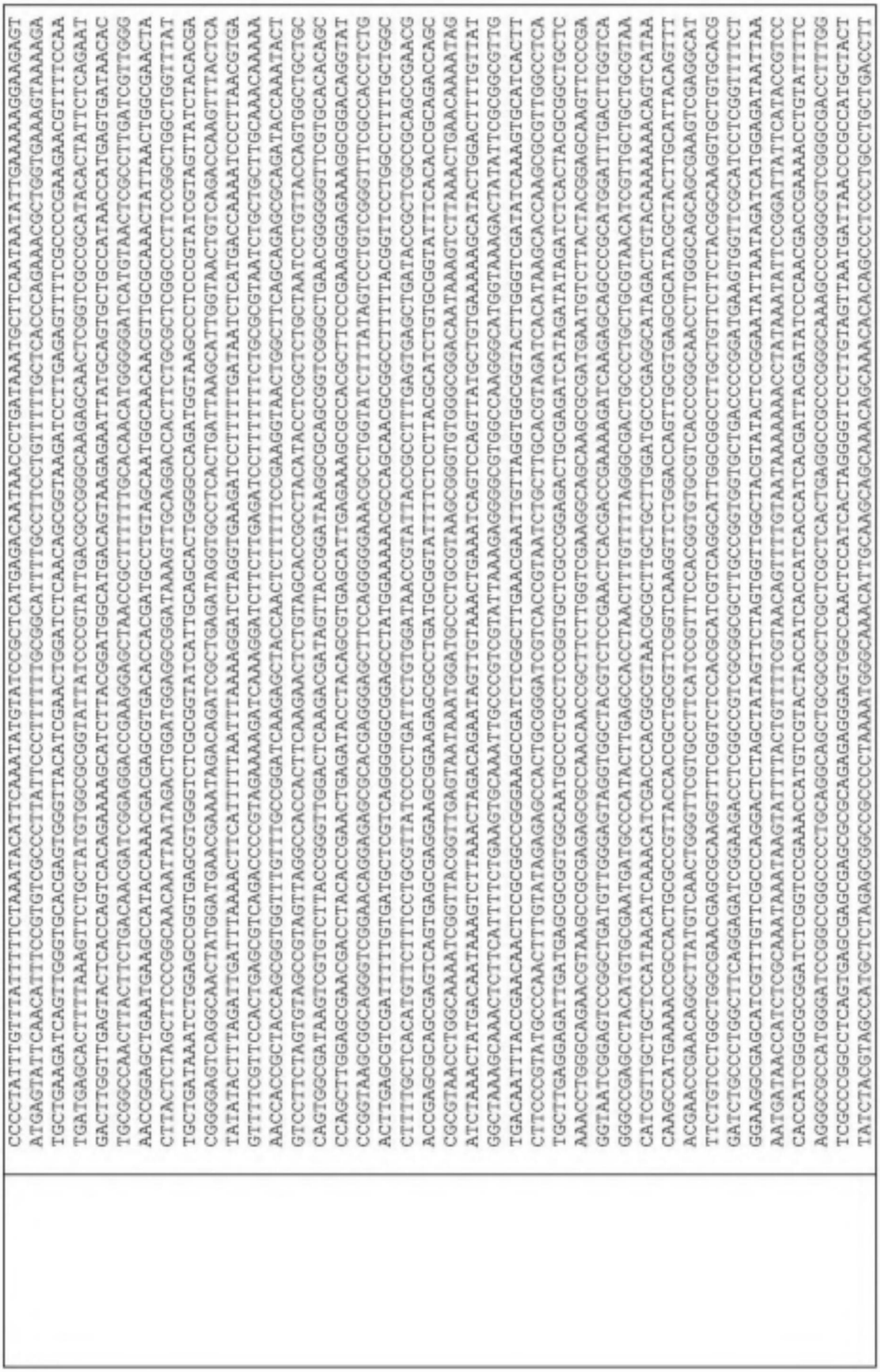


[0734]



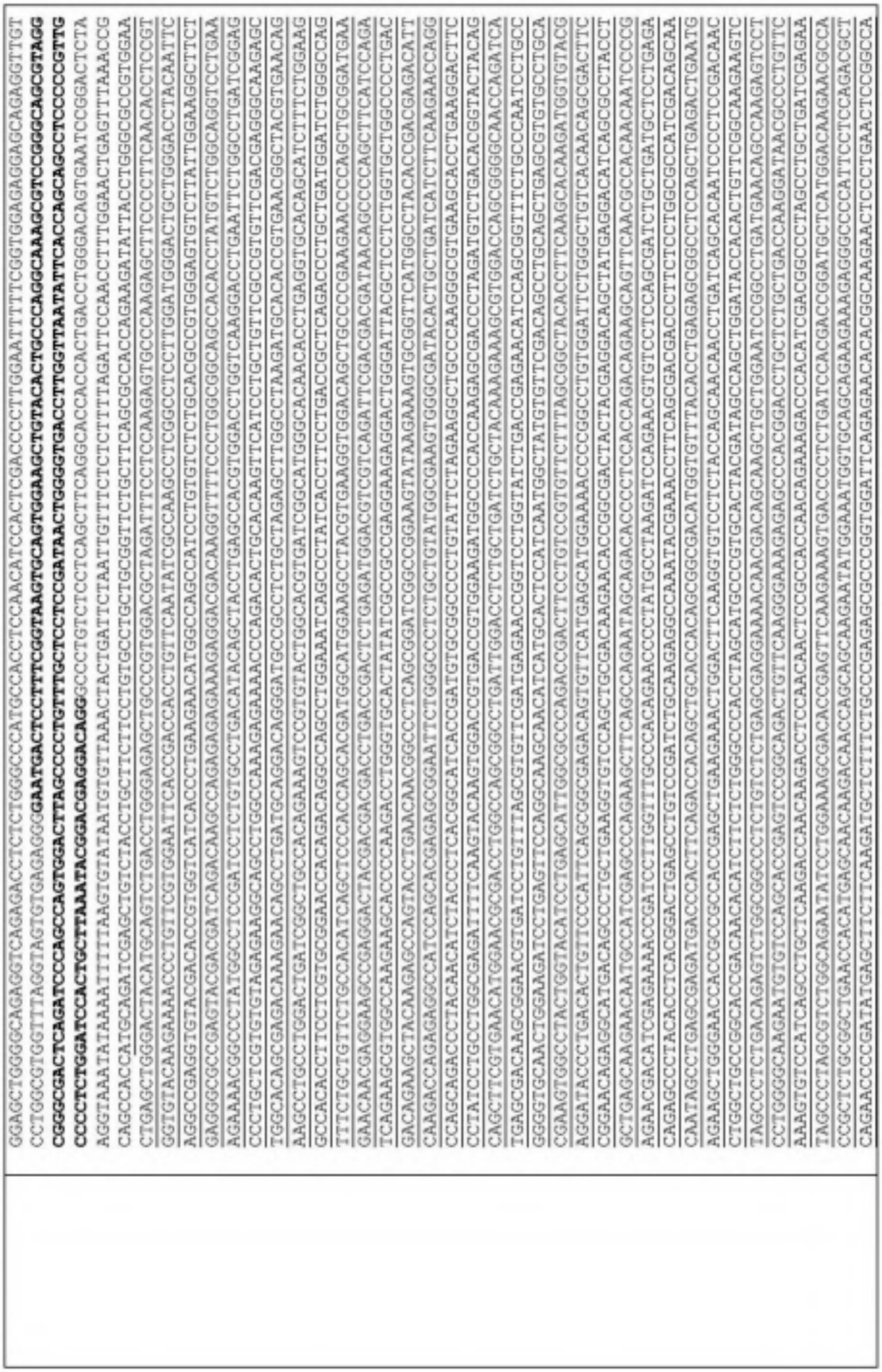
ceDNAFVIII载体3 (SEQ ID NO: 194)	GAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCG ATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACA GTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACAT CCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATC AGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCAATGGGCTCCAACGAGAATATCCACACATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAAGAG TACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGG AGAGCACCTCCACGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCC AGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTC AGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTT CATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCG GCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGGAACTG ATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCACTACTTCACCAACAT GTTCGCCACTTGGAGCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCAAAGAGTGGCTGCAGG TTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCTCCAGC AGCCAGGACGGCCATCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCGTGGTCAATTCTCT GGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGG ACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAA AATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTACAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTTAAGAAACTTTCCGTTATTTA CGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGC TGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGT GGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGG ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTC CGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTT CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGACATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCCTG CAGGAGGACCCCTATGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCC ATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTG TTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAA ACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCA TTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTATAAAACTCCATTTCCACCCCTC CCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCAT CTTCGGCTACTTTTTCTTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGC CTGAATGGCGAATGG
	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA

[0735]

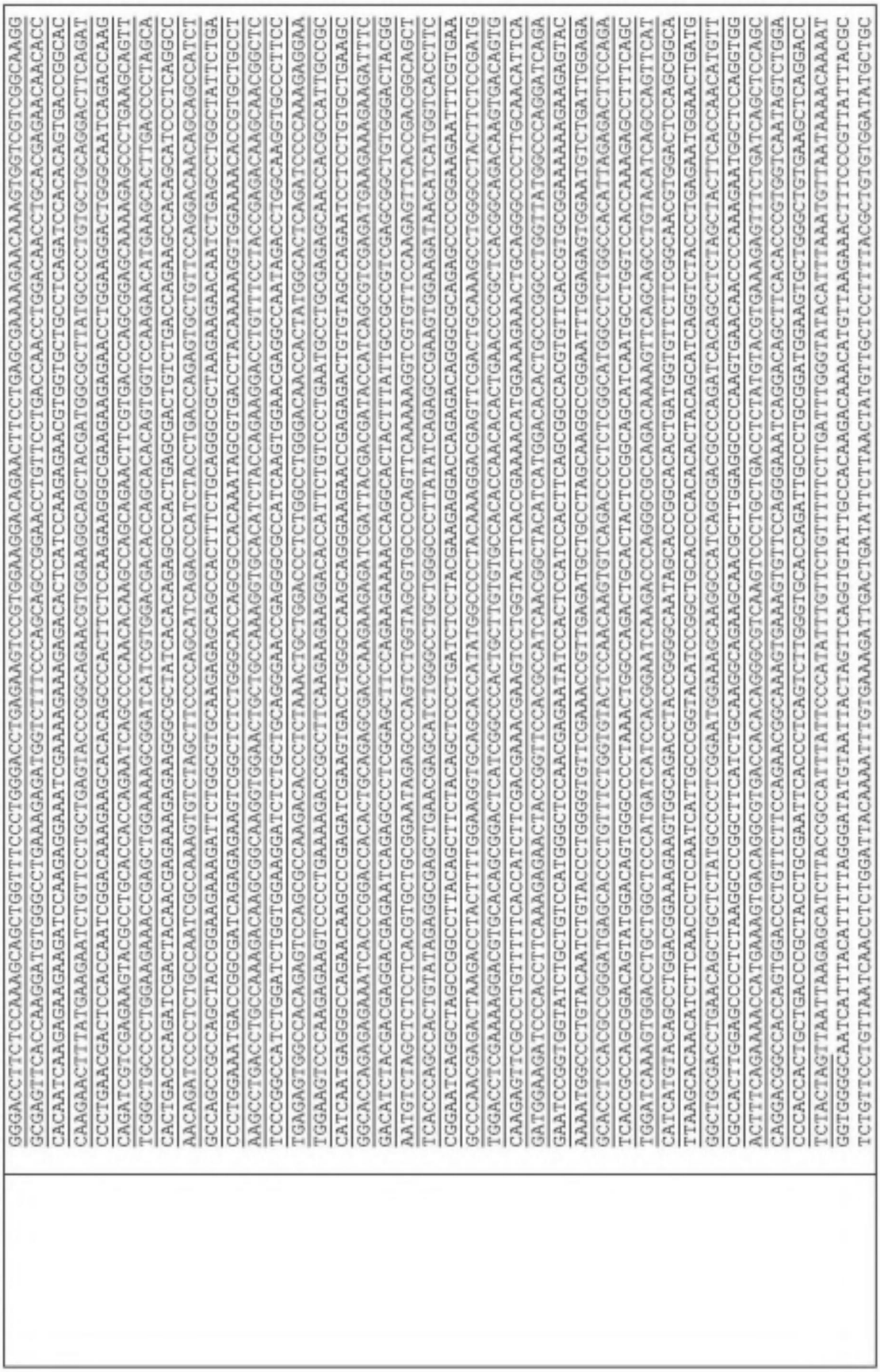


CCCCTATTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA
TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT
GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTA
CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT
TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA
TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA
GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA
AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC
CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG
ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG
ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGC
CGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAG
ATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTAT
GGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTG
TGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTT
CTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACACTAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCA
TGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTCTC
AAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGA
GGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCA
GGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTTAACATCGTTGCTGCTGCGTAA
CATCGTTGCTGCTCCATACATCAACATCGACCCACGCGCCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAA
CAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTT
ACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCAT
TTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACG
GATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCT
GGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAA
AATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCC
CACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATACTCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTC
AGGGCGCCATGGGATCCGGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT
TATCTACGTAGCCATGCTCTAGAGCGGCCGCCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT

[0736]



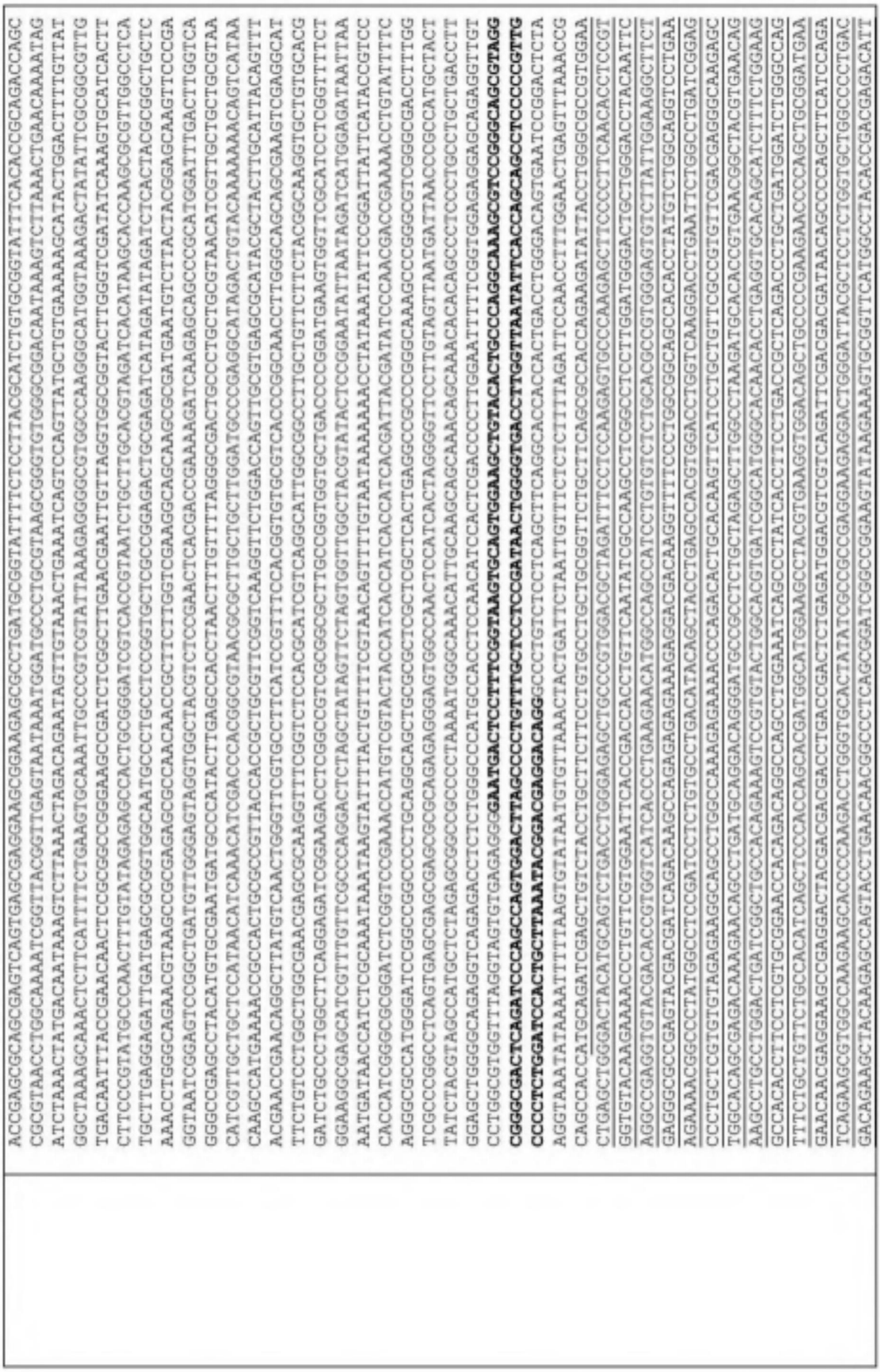
[0737]



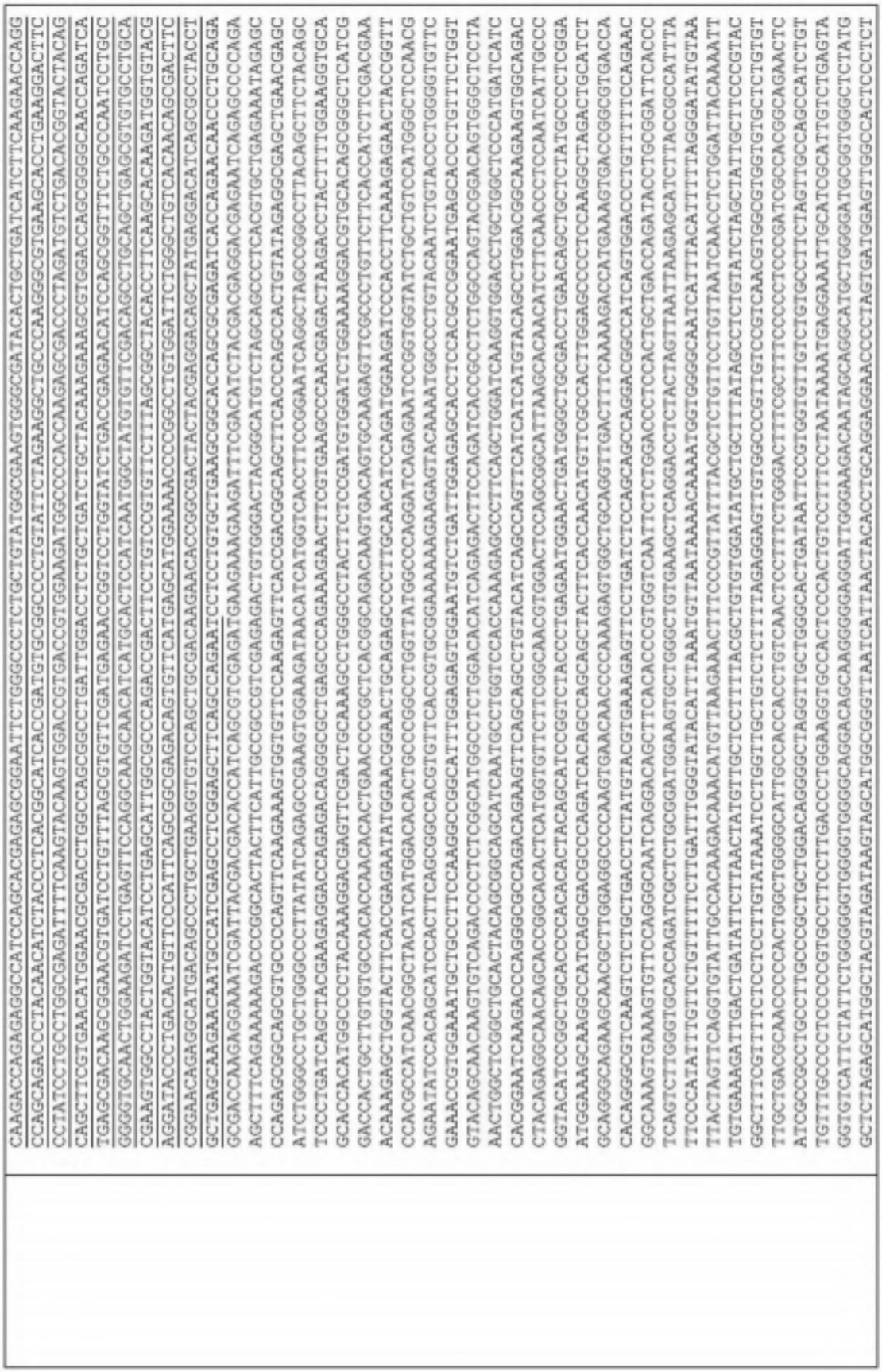
[0738]

	TTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGC
	CCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACT
	TTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGT
	GGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCT
	AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC
	AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAG
	GAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCT
	CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATA
	CCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTT
	ATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACT
	CATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTT
	TTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTATAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCA
	GTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTT
	CGGCTACTTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTG
	AATGGCGAATGG
	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC
	TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC
	TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
	AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT
	AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA
	CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA
	TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
	TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT
	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
	TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
	AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTA
	CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT
	TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
	CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA
	TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA
	GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA
	AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
	GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC
	CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
	CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
	CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG
ceDNAFVIII载体4 (SEQ ID NO: 195)	ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC
	CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG

[0739]



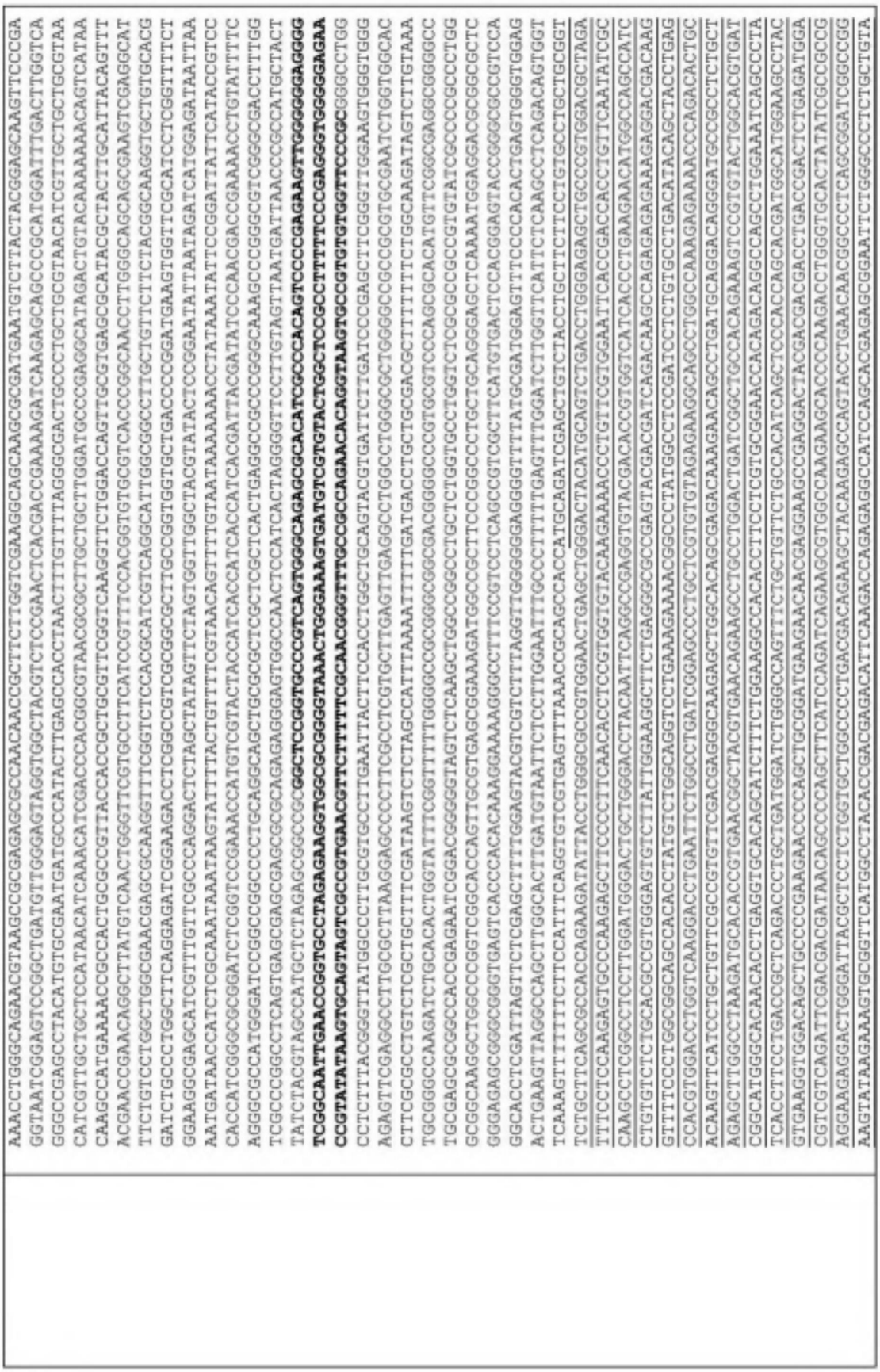
[0740]


CAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGG
CCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTC
CCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAG
CAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCA
TGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCC
GGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCA
CGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACACAAGATGGTGTACG
AGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTC
CGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCT
GCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCTCGGAGCTTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGCGAGATCACCAGAACAACCCTGCAGA
GCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGCCCCAGA
AGCTTTCAGCTACGAAGAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAAGCTGTGGGACTACGGCATGTCTACGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGC
GCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCG
CCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGGCGAGCTGAACGAGC
GACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAA
ATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGC
ACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTT
TCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAGAAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCA
CCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACG
AGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTC
GAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGACACCTCCACGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGT
GTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTA
AACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATC
CACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGAC
CTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCC
GGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCCTCGGA
ATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCT
GCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCA
CACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCTCCAGCAGCCAGGACGGCCATCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAAC
GGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCC
TCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTA
TTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAA
TTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATT
TGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTAC
GGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGT
TTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTC
ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGT
TGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATG
GCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT

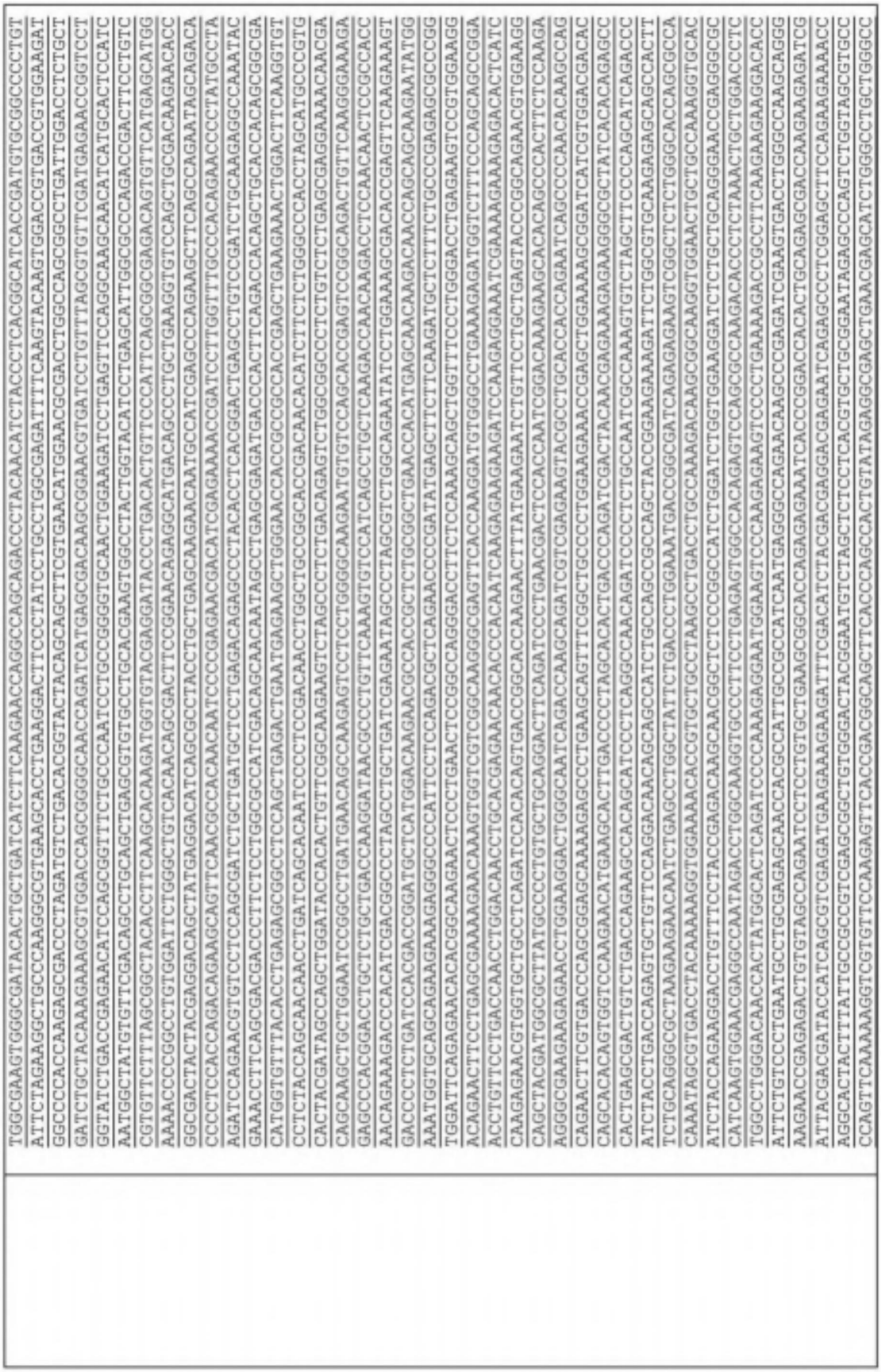
[0741]

ccDNAFVIII载体5 (SEQ ID NO: 196)	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGC GCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACC TCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC ATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACT GATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGT TCCCATCTATTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATT TTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCCTGTCACAGAATGAAAATTTTT CTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGG
	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTA CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTCTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGC CGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAG ATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTAT GGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTG TGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTT CTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCA TGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTC

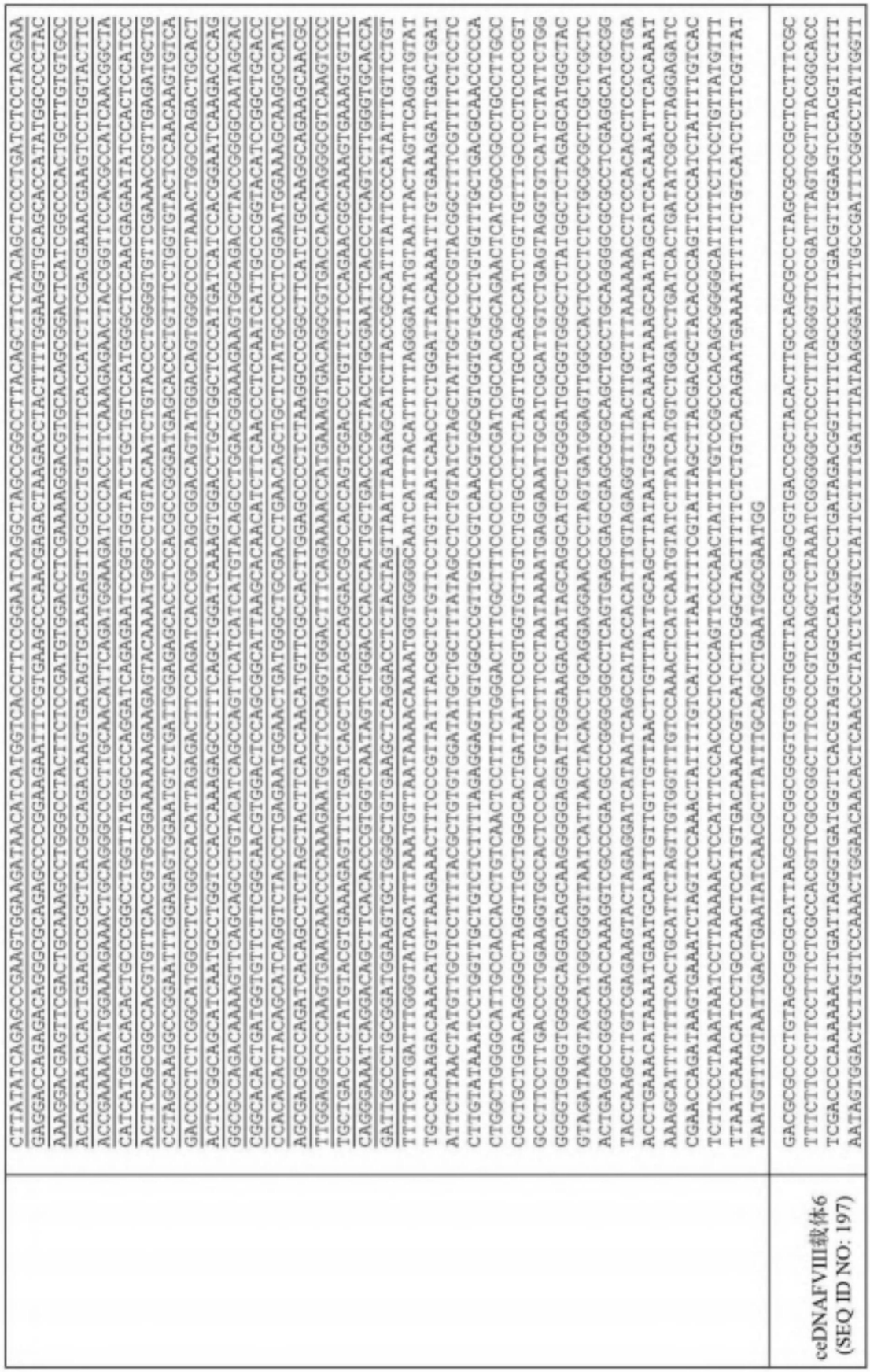
[0742]


AAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGA
GGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCA
GGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAA
CATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAA
CAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTT
ACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCAT
TTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACG
GATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCT
GGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAA
AATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCC
CACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTC
AGGGCGCCATGGGATCCGGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGTCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT
TATCTACGTAGCCATGCTCTAGAGCGGCCGCGGCTCCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG
TCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA
CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG
CCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGG
AGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCAC
CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAA
TGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCC
TGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGTCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGG
GCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTC
GGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA
GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAG
ACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGT
TCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGTTTAAACCGCAGCCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGT
TCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGA
TTTCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATATCGC
CAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATC
CTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACACAAGCCAGAGAGAAGAGGACGACAAG
GTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAG
CCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAAAACCCAGACACTGC
ACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCT
AGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGAT
CGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCTTTCTTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTA
TCACCTTCCTGACCGCTCAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCTAC
GTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACCTGACCGACTCTGAGATGGA
CGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCG
AGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGG
AAGTATAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTA

[0743]

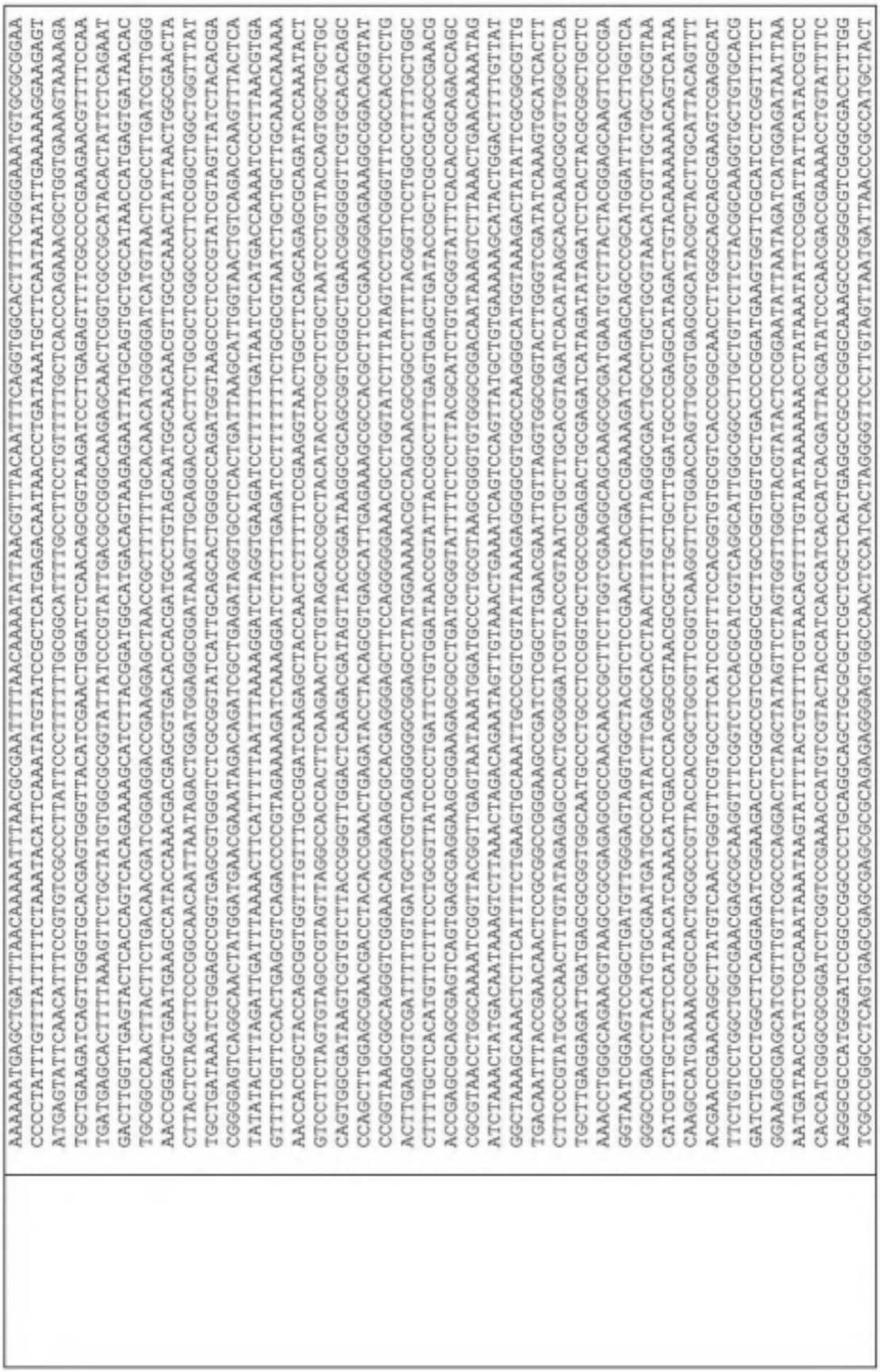

TGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGT
ATTCTAGAAGGCTGCCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGAT
GGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCT
GATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCT
GGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATC
AATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTC
CGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGG
AAAACCCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACC
GGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAATAGCAGACA
CCCCTCCACCAGACAGAAGCAGTTCAACGCCACAACAATCCCCGAGAACGACATCGAGAAAACCGATCCTTGGTTTGCCCACAGAACCCCTATGCCTA
AGATCCAGAACGTGTCCTCCAGCGATCTGCTGATGCTCCTGAGACAGAGCCCTACACCTCACGGACTGAGCCTGTCCGATCTGCAAGAGGCCAAATAC
GAAACCTTCAGCGACGACCCTTCTCCTGGCGCCATCGACAGCAACAATAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCAGACCACAGCTGCACCACAGCGGCGA
CATGGTGTTTACACCTGAGAGCGGCCTCCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGAACCACCGCCGCCACCGAGCTGAAGAAACTGGACTTCAAGGTGT
CCTCTACCAGCAACAACCTGATCAGCACAATCCCCTCCGACAACCTGGCTGCCGGCACCGACAACACATCTTCTCTGGGCCCACCTAGCATGCCCGTG
CACTACGATAGCCAGCTGGATACCACACTGTTCGGCAAGAAGTCTAGCCCTCTGACAGAGTCTGGCGCCCTCTGTCTCTGAGCGAGGAAAACAACGA
CAGCAAGCTGCTGGAATCCGGCCTGATGAACAGCCAAGAGTCCTCCTGGGGCAAGAATGTGTCCAGCACCGAGTCCTTCAAGGGAAAGA
GAGCCCACGGACCTGCTCTGCTGACCAAGGATAACGCCCTGTTCAAAGTGTCCATCAGCCTGCTCAAGACCAACAAGAGCCTCCAACAACTCCGCCACC
AACAGAAAGACCCACATCGACGGCCCTAGCCTGCTGATCGAGAATAGCCCTAGCGTCTGGCAGAATATCCTGGAAAGCGACACCGAGTTCAAGAAAGT
GACCCCTCTGATCCACGACCGGATGCTCATGGACAAGAACGCCACCGCTCTGCGGCTGAACCACATGAGCAACAAGACAACCAGCGACAAGAATATGG
AAATGGTGCAGCAGAAGAAAGAGGGCCCCATTCCTCCAGACGCTCAGAACCCCGATATGAGCTTCTTCAAGATGCTCTTTCTGCCCGAGAGCGCCCGG
TGGATTCAGAGAACACACGGCAAGAACTCCCTGAACTCCGGCCAGGGACCTTCTCCAAAGCAGCTGGTTTCCCTGGGACCTGAGAAGTCCGTGGAAGG
ACAGAACTTCCTGAGCGAAAAGAACAAAGTGGTCGTCGGCAAGGGCGAGTTCACCAAGGATGTGGGCCTGAAAGAGATGGTCTTTCCCAGCAGCGGA
ACCTGTTCCTGACCAACCTGGACAACCTGCACGAGAACAACACCCACAATCAAGAAGAAGAAGATCCAAGAGGAAATCGAAAAGAAAGAGACACTCATC
CAAGAGAACGTGGTGCTGCCTCAGATCCACACAGTGACCGGCACCAAGAACTTTATGAAGAATCTGTTCCTGCTGAGTACCCGGCAGAACGTGGAAGG
CAGCTACGATGGCGCTTATGCCCCTGTGCTGCAGGACTTCAGATCCCTGAACGACTCCACCAATCGGACAAAGAAGCACACAGCCCACTTCTCCAAGA
AGGGCGAAGAAGAACCTGGAAGGACTGGGCAATCAGACCAAGCAGATCGTCGAGAAGTACGCCTGCACCACCAGAATCAGCCCCAACACAAGCCAG
CAGAACTTCGTGACCCAGCGGAGCAAAAGAGCCCTGAAGCAGTTTCGGCTGCCCCTGGAAGAAACCGAGCTGGAAAAGCGGATCATCGTGGACGACAC
CAGCACACAGTGGTCCAAGAACATGAAGCACTTGACCCCTAGCACACTGACTACAACGAGATCCAGTTCCTGAGTACCCGGCAGAACGTGGAAGCC
CACTGAGCGACTGTCTGACCAGAAGCCACAGCATCCCCTCTGCCAATCGCCAAAGTGTCTAGCTTCCCCAGCATCAGACCC
ATCTACCTGACCAGAGTGCTGTTCCAGGACAACAGCAGCCAGCCATCTGCCAGCGCCAGCTACCGGAAGAAAGATTCTGGCGTGCAAGAGAGCAGCCACTT
TCTGCAGGGCGCTAAGAAGAACAATCTGAGCCTGGCTATTCTGACCCTGGAAATGACCGGCGATCAGAGAGAAGTCGGCTCTCTGGGCACCAGCGCCA
CAAATAGCGTGACCTACAAAAAGGTGGAAAACACCGTGCTGCCTAAGCCTGACCTGCCAAAGACAAGCGGCAAGGTGGAAACTGCTGCCAAAGGTGCAC
ATCTACCAGAAGGACCTGTTTCCTACCGAGACAAGCAACGGCTCTCCCGGCCATCTGGATCTGGTGGAAGGATCTCTGCTGCAGGGAACCGAGGGCGC
CATCAAGTGGAACGAGGCCAATAGACCTGGCAAGGTGCCCTTCCTGAGAGTGGCCACAGAGTCCAGCGCCAAGACACCCTCTAAACTGCTGGACCCTC
TGGCCTGGGACAACCACTATGGCACTCAGATCCCCAAAGAGGAATGGAAGTCCCAAGAGAAGTCCCTGAAAAGACCGCCTTCAAGAAGAAGGACACC
ATTCTGTCCCTGAATGCCTGCGAGAGCAACCACGCCATTGCCGCCATCAATGAGGGCCAGAACAAGCCCGAGATCGAAGTGACCTGGGCCAAGCAGGG
AAGAACCGAGAGACTGTGTAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGAGAGAAATCACCCGGACCACACTGCAGAGCGACCAAGAAGAGATCG
ATTACGACGATACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGCCCTCGGAGCTTCCAGAAGAAAACC
AGGCACTACTTTATTGCCGCCGTCGAGCGGCTGTGGGACTACGGAATGTCTAGCTCTCCTCACGTGCTGCGGAATAGAGGCCCAGTCTGGTAGCGTGCC
CCAGTTCAAAAAGGTCGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCC

[0744]

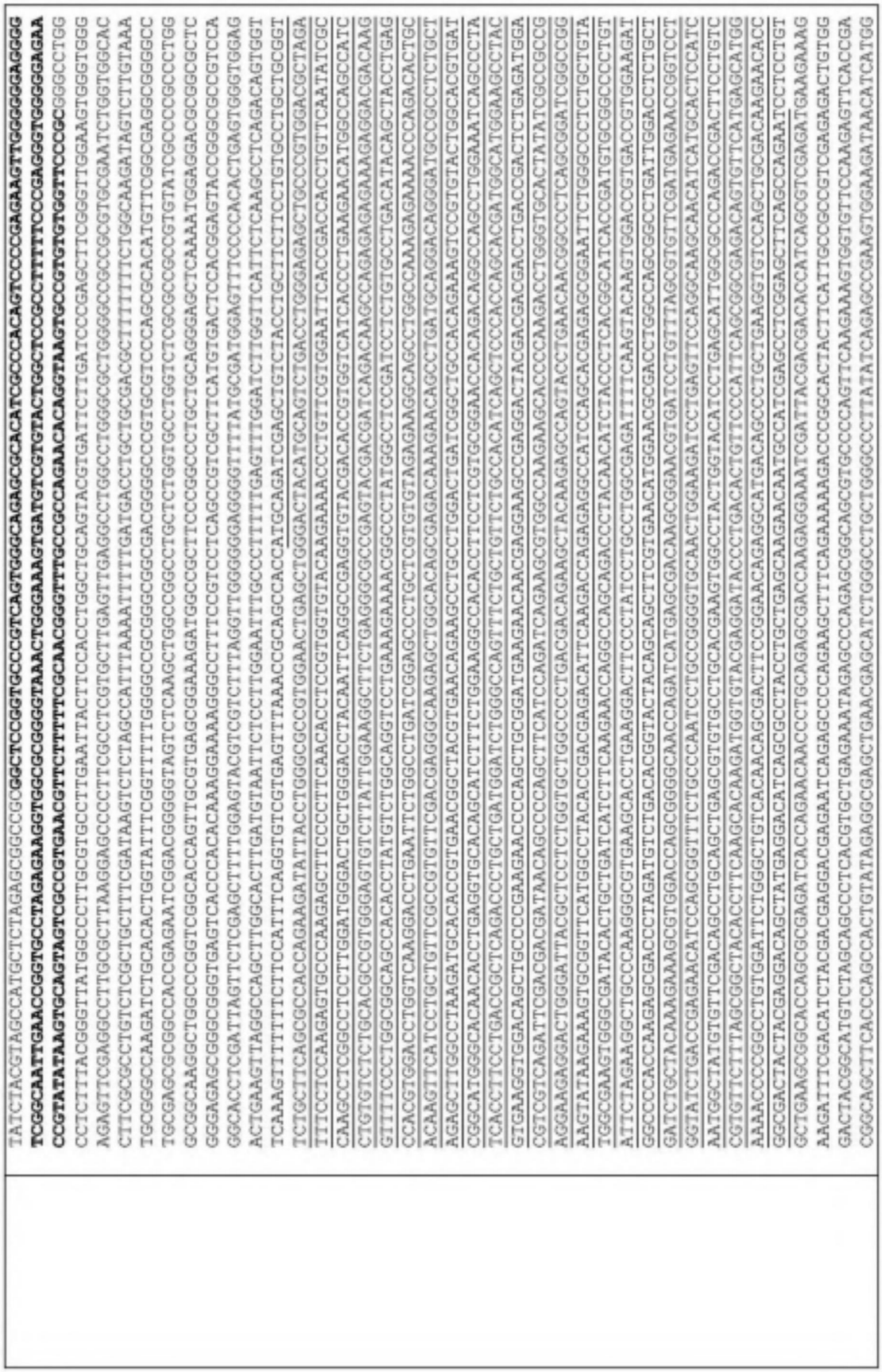


ceDNAFVIII载体6 (SEQ ID NO: 197)	CTTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCTCCTACGAA GAGGACCAGAGACAGGGCGCAGAGCCCCGGAAGAATTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCCTAC AAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGACCTCGAAAGGACGTGCACAGCGGACTCATCGGCCCACTGCTTGTGTGCC ACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTTTTCACCATCTTCGACGAAACGAAGTCCTGGTACTTC ACCGAAAACATGGAAAGAACTGCAGGGCCCCTTGCAACATTCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTA CATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACTCCATCC ACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAGGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTTGAGATGCTG CCTAGCAAGGCCGGAATTTGGAGAGTGTCTGATTGGAGAGCACCCTCCACGCCGGGATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAGTGTCA GACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGCCACATTAGAGACTTCCAGATCACCGCCAGCGGACAGTATGGACAGTGGGCCCCTAAACTGGCCAGACTGCACT ACTCCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCTTTCAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAG GGCGCCAGACAAAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGAAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGCAATAGCAC CGGCACACTGATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACC CCACACACTACAGCATCAGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATC AGCGACGCCCAGATCACAGCCTCTAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCTAAGGCCCGGCTTCATCTGCAAGGCAGAAGCAACGC TTGGAGGCCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAATGGCTCCAGGTGGACTTTCAGAAAACCATGAAAGTGACAGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCCC TGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTTCTGATCAGCTCCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTC CAGGGAAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATAGTCTGGACCCACCACCTGCTGACCCGCTACCTGCGAATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCA GATTGCCCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGT TTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTAT TGCCACAGACAAACACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATATTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGAT ATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTC CTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCA CTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTCGCTTTCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCC CGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTAC GTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGCCGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCAGCAGGTCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTCGAGGCATGCGG TACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGA ACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAAT AAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATC CGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCAC TCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTT TTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTAT TAATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGG
	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT

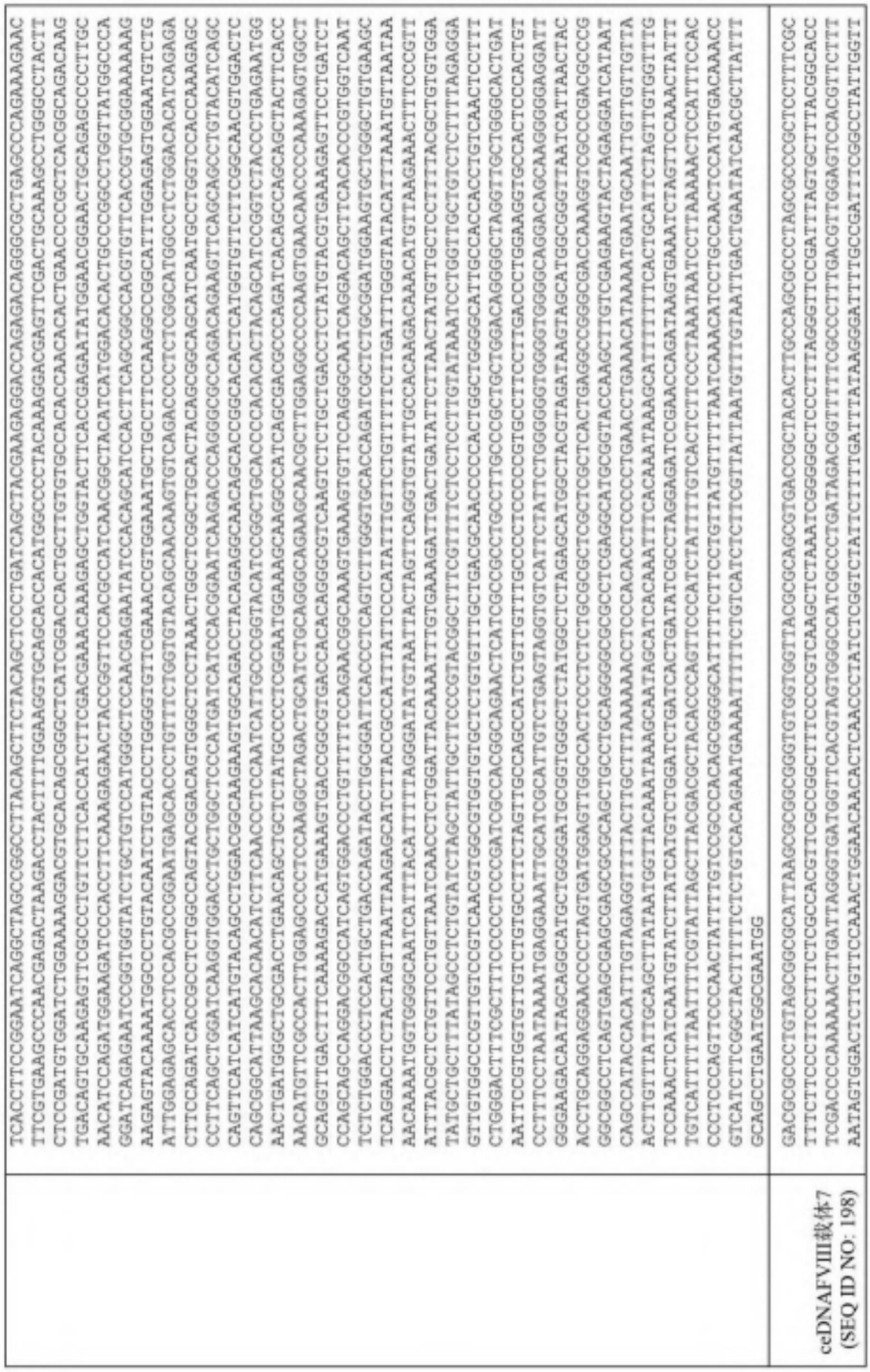
[0745]



[0746]

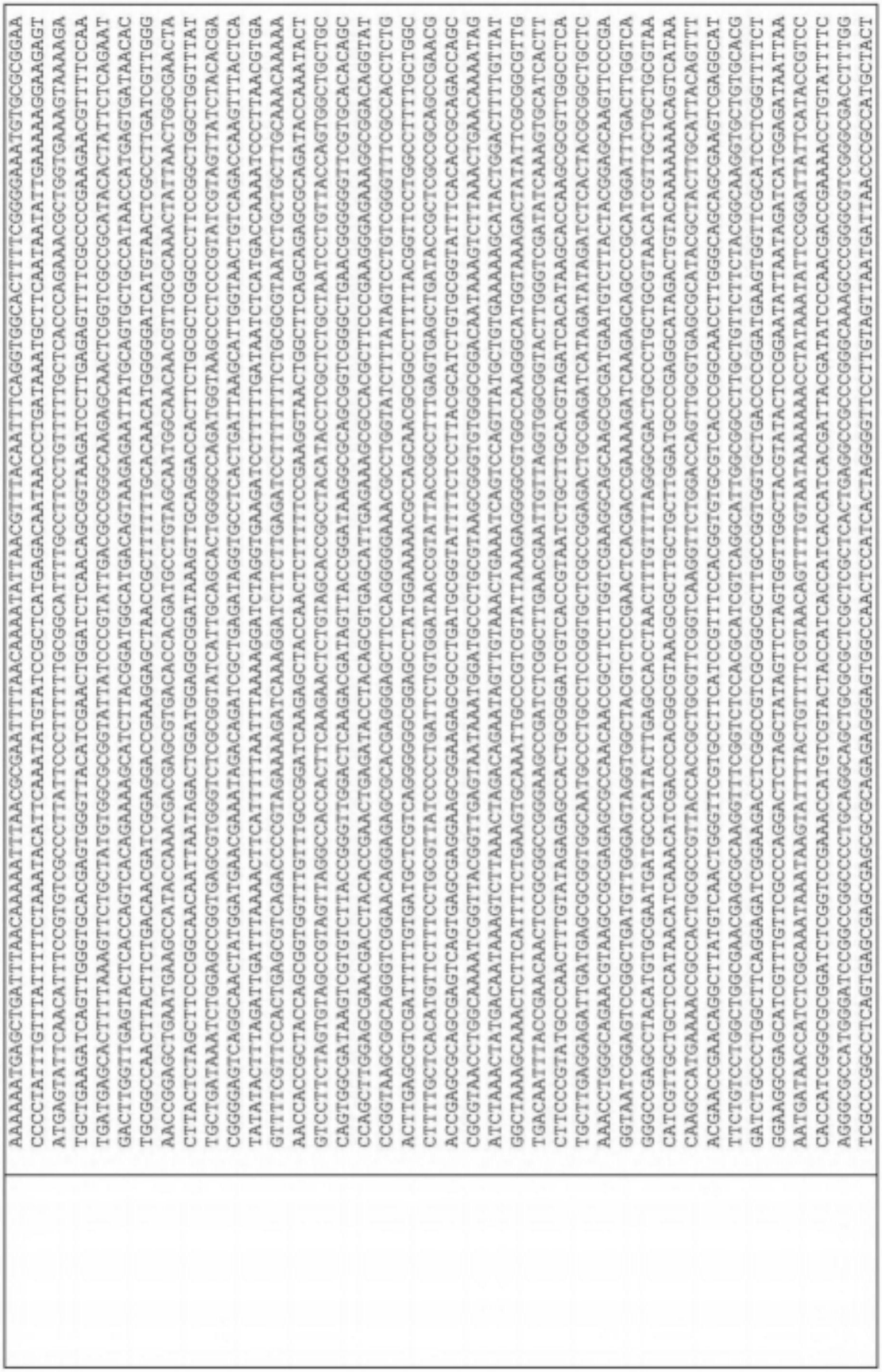


[0747]

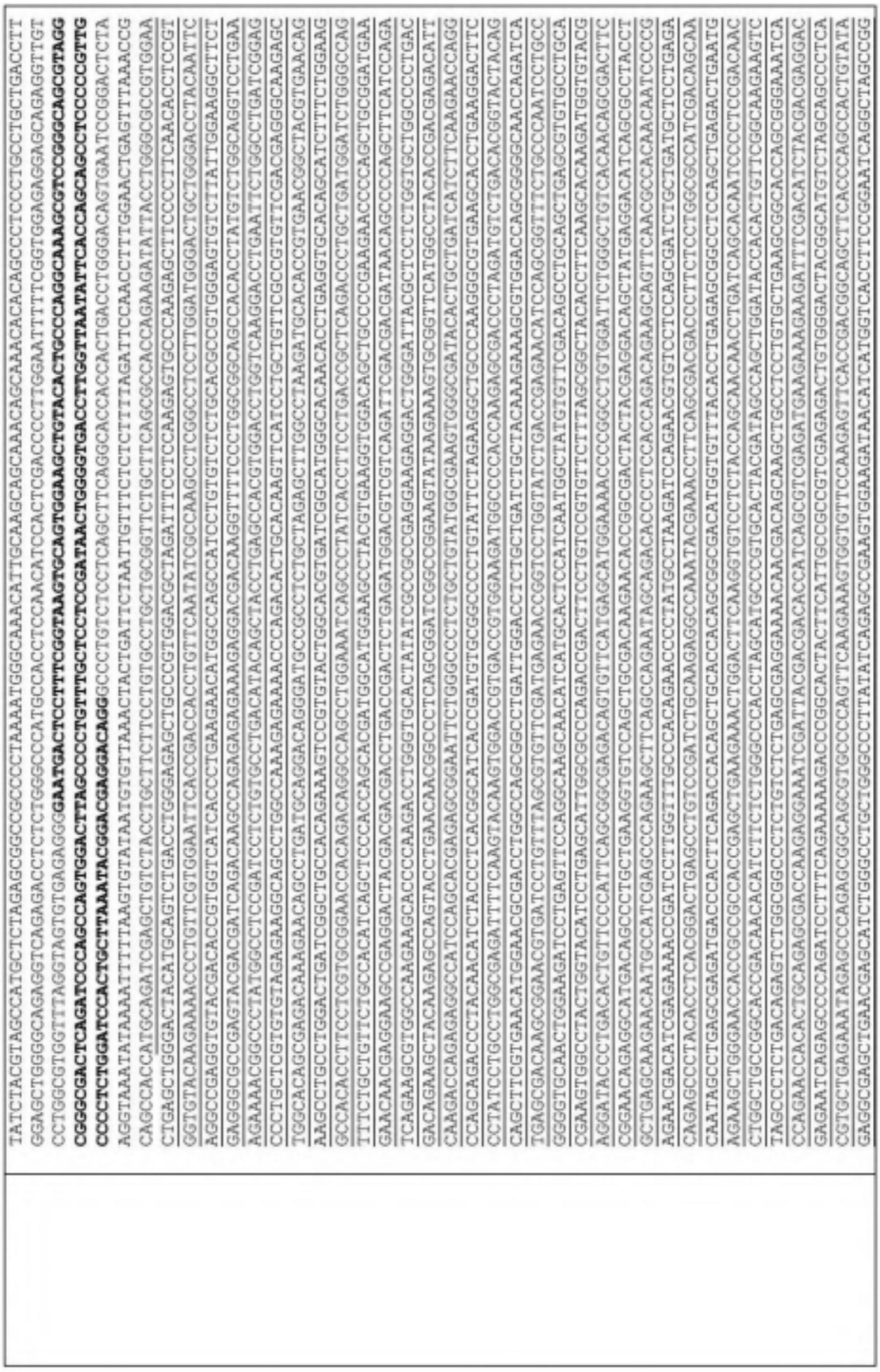


	TCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAGAAAGAAC
	TTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTT
	CTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAG
	TGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGC
	AACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCA
	GGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCACGGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAAG
	AAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTG
	ATTGGAGAGCACCTCCACGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGA
	CTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAGAGC
	CCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGC
	CAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTC
	CAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGG
	AACTGATGGGCTCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCAGCTACTTCACC
	AACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCT
	GCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCT
	CCAGCAGCCAGGACGGCCATCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAAT
	TCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGC
	TCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAA
	AACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTACGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTT
	ATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGA
	TATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGA
	GTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTCTTT
	CTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGAT
	AATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGT
	CCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT
	GGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTAC
	ACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCG
	GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAAT
	CAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAA
	ACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
	TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTT
	TGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCAC
	CCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACC
	GTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTT
	GCAGCCTGAATGGCGAATGG
ceDNAFVIII载体7 (SEQ ID NO: 198)	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC
	TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC
	TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
	AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT

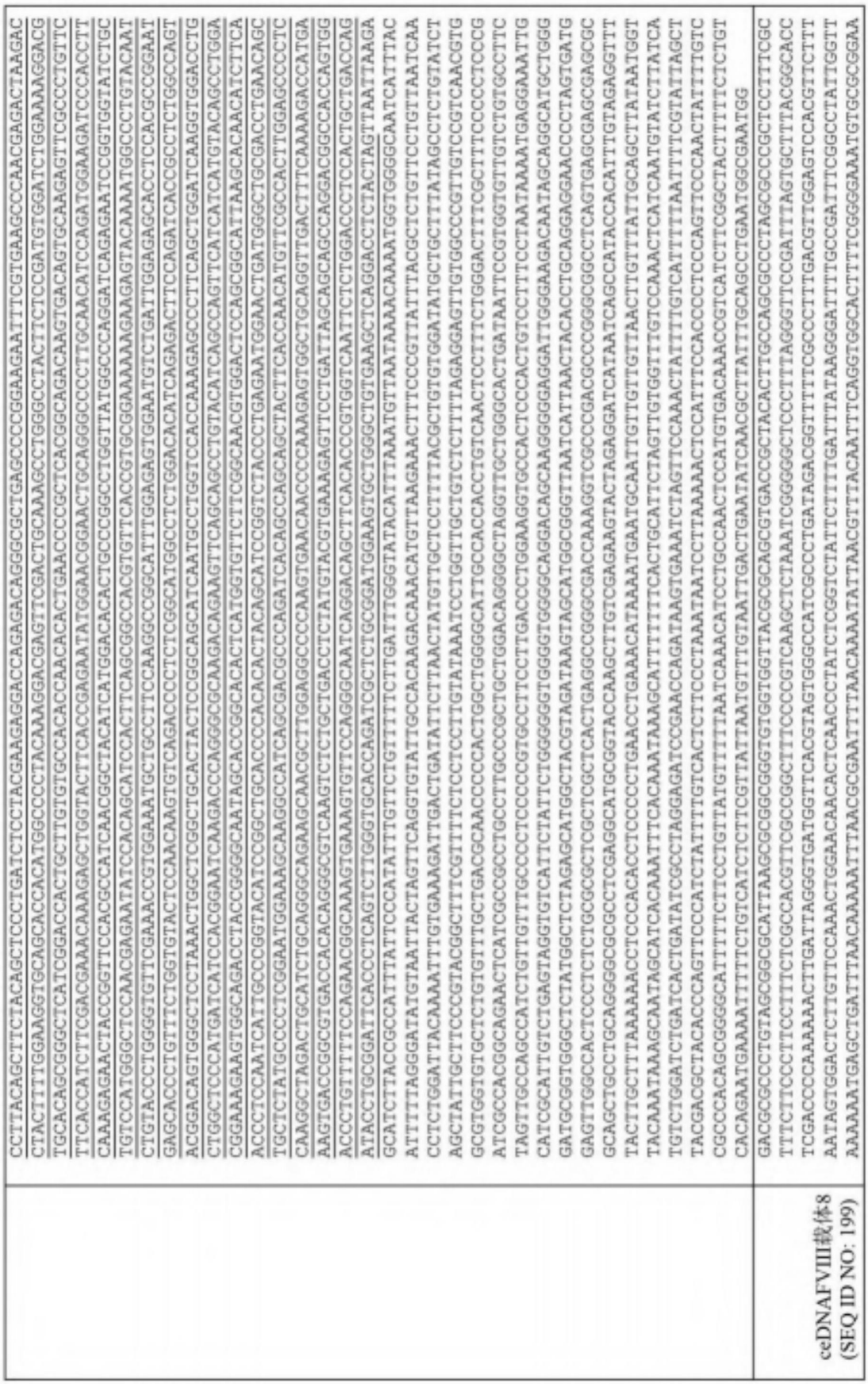
[0748]



[0749]

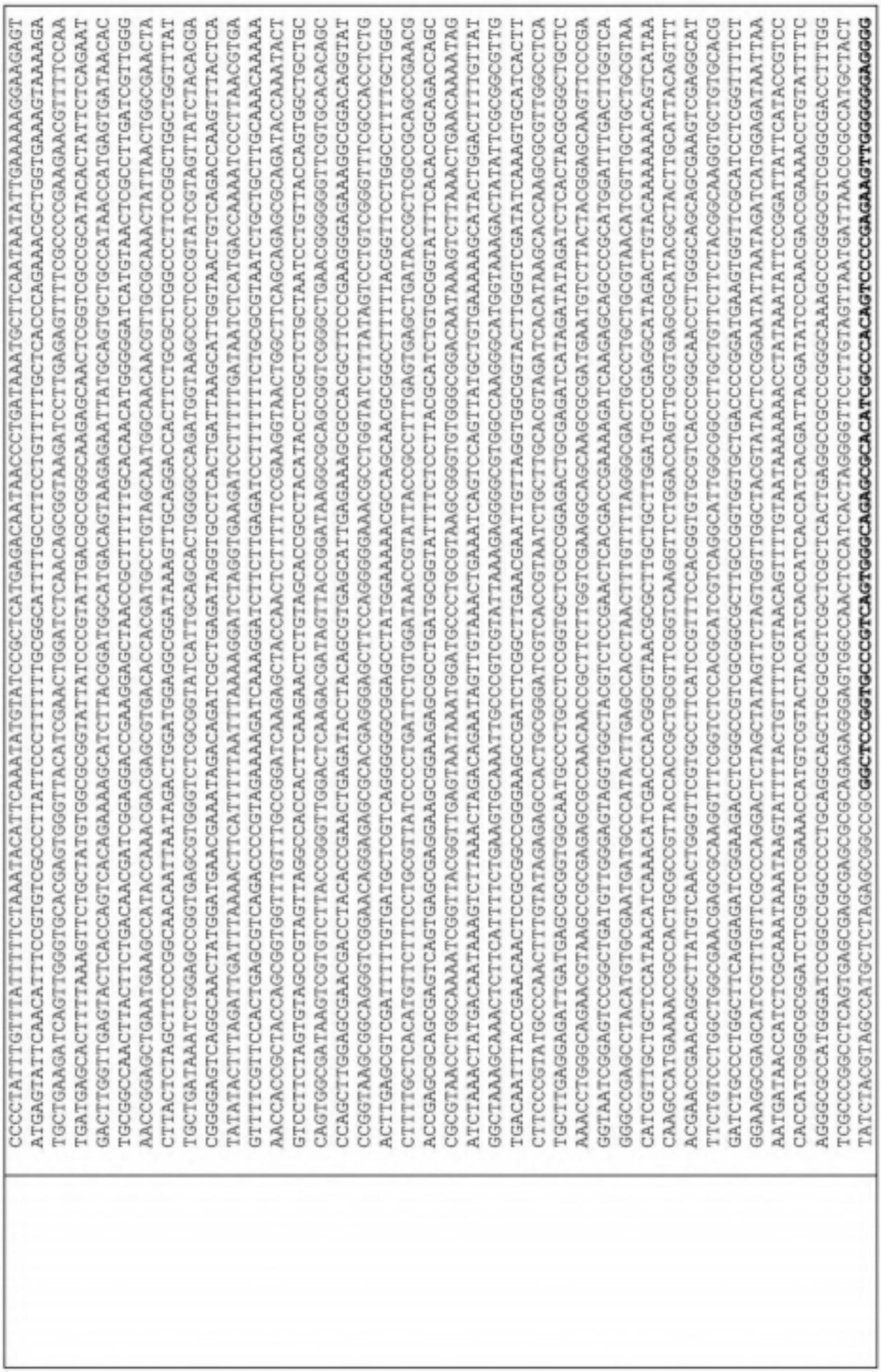


[0750]



ceDNAFVIII载体8 (SEQ ID NO: 199)	CCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCTCCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCCGGAAGAATTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGAC
	CTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACG
	TGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTC
	TTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGGGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTT
	CAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGC
	TGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAAT
	CTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGAGCACCTCCACGCCGGAAT
	GAGCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGT
	ACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACTCCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTG
	CTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCAAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGA
	CGGAAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGCAATAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCA
	ACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGC
	TGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCTC
	CAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGA
	AAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCCAGGACGGCCACCAGTGG
	ACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAG
	ATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGA
	GCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTAC
	ATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAA
	CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCT
	AGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTG
	GCGTGGTGTGCTCTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCG
	ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTC
	TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG
	CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG
	GATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGGATGCCCTAGTGATG
	GAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCAGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC
	GCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTT
	TACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
	TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
	TGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTCGTATTAGCT
	TACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTATAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTC
	CGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGT
	CACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTGTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGG
	GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGC
	TTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC
	TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
	AATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT
	AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA

[0751]

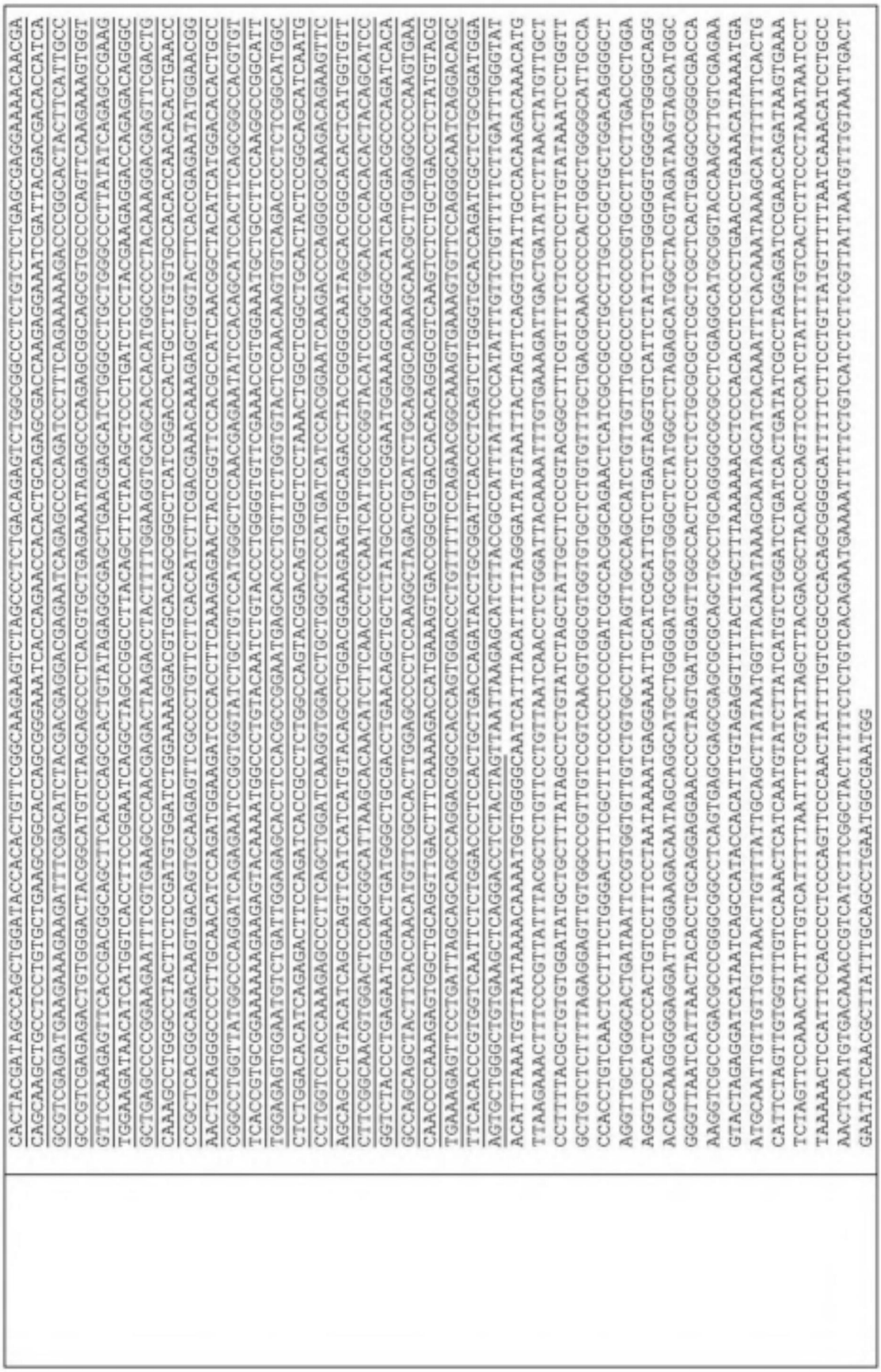


CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA
TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT
GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTA
CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTAT
TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA
TATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGA
GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA
AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC
CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG
ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG
ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGC
CGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAG
ATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTAT
GGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTG
TGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTT
CTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCA
TGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTCTC
AAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGA
GGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCA
GGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTTAACATCGTTGCTGCTGCGTAA
CATCGTTGCTGCTCCATACATCAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAA
CAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTT
ACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCAT
TTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACG
GATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCT
GGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAA
AATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAATATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCC
CACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTC
AGGGCGCCATGGGATCCGGCCGGCCCTGCAGGCAGCTGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT
TATCTACGTAGCCATGCTCTAGAGCGGCCGC**GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG**

[0752]

TCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA	
CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG	
CCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGG	
AGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGGCGCTGGGCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCAC	
CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAA	
TGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCC	
TGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGTCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGG	
GCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTC	
GGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA	
GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAG	
ACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGT	
TCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGTTTAAACCGCAGCCACCATGCAGCTGTCTACCATGCTATCCTGTGCCTGCTGCGGT	
TCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGA	
TTTCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATATCGC	
CAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATC	
CTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAGAAGAGGACGACAAG	
GTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAG	
CCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACACTGC	
ACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCT	
AGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGAT	
CGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTA	
TCACCTTCCTGACCGCTCAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCTAC	
GTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACGACGACCTGACCGACTCTGAGATGGA	
CGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCG	
AGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGG	
AAGTATAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTA	
TGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGT	
ATTCTAGAAGGCTGCCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGAT	
GGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCT	
GATCTGCTACAAGGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCT	
GGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATC	
AATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTC	
CGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGG	
AAAACCCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACC	
GGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACGCATCGAGAAAACCGATCCTTGGTTTGCCCACAGAACCCCTATGCCTA	
CCCCTCCACCAGACAGAAGCAGTTCAACGCCACAACAATCCCCGAGAACGACATCGAGAAAACCGATCCTTGGTTTGCCCACAGAACCCCTATGCCTA	
AGATCCAGAACGTGTCCTCCAGCGATCTGCTGATGCTCCTGAGACAGAGCCCTACACCTCACGGACTGAGCCTGTCCGATCTGCAAGAGGCCAAATAC	
GAAACCTTCAGCGACGACCCTTCTCCTGGCGCCATCGACAGCAACAATAGCCTGAGCGAGATGACCCACTTCAGACCACAGCTGCACCACAGCGGCGA	
CATGGTGTTTACACCTGAGAGCGGCCTCCAGCTGAGACTGAATGAGAAGCTGGGAACCACCGCCGCCACCGAGCTGAAGAAACTGGACTTCAAGGTGT	
CCTCTACCAGCAACAACCTGATCAGCACAATCCCCTCCGACAACCTGGCTGCCGGCACCGACAACACATCTTCTCTGGGCCCACCTAGCATGCCCGTG	

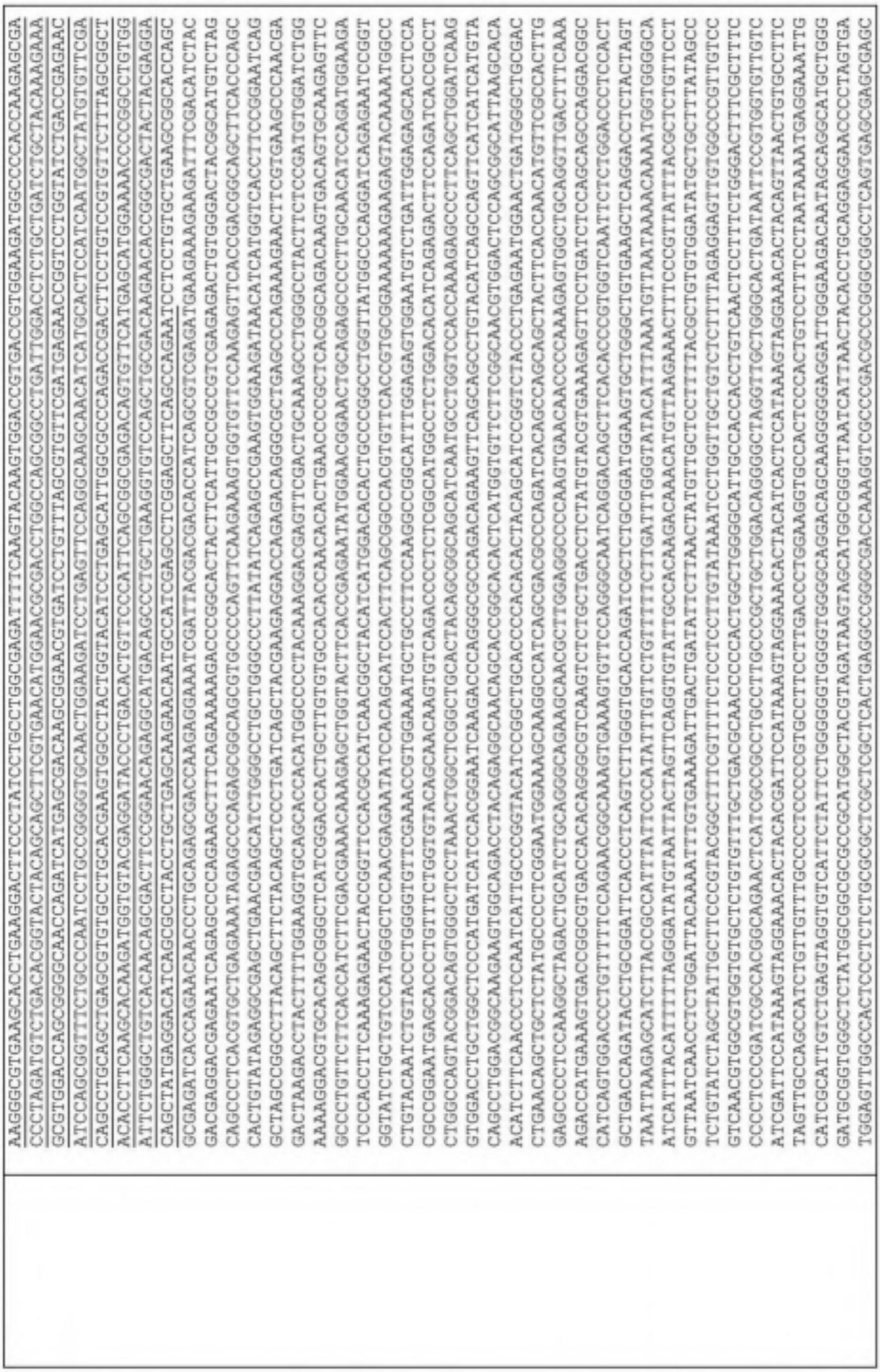
[0753]


CACTACGATAGCCAGCTGGATACCACACTGTTCGGCAAGAAGTCTAGCCCTCTGACAGAGTCTGGCGGCCCTCTGTCTCTGAGCGAGGAAAACAACGA
CAGCAAGCTGCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGGGAAATCACCAGAACCACACTGCAGAGCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGACACCATCA
GCGTCGAGATGAAGAAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGCCCCAGATCCTTTCAGAAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCC
GCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGT
GTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCGAAG
TGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCTCCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGC
GCTGAGCCCCCGGAAGAATTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTG
CAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACC
CCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGG
AACTGCAGGGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACCACACTGCC
CGGCCTGGTTATGGCCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGT
TCACCGTGCGGAAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTTCACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATT
TGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGACACCTCCACGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACTCCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGC
CTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACTCCGGCAGCATCAATG
CCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCAAGACAGAAGTTC
AGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGAAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGCAATAGCACCGGCACACTCATGGTGTT
CTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCC
GGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACA
GCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAA
CAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACG
TGAAAGAGTTCCTGATTAGCAGCAGCGACGGCCACCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGC
TTCACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGA
AGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTAT
ACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATG
TTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCT
CCTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCGGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTT
GCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCA
CCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCT
AGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA
AGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGG
ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGACATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGC
GGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA
AAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAA
GTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGA
ATGCAATTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGC
CATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAA
TCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCT
TAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTTCCTTGTTATATGTTTTTAATCAAACATCCTGCC
AACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTGACT
GAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGG

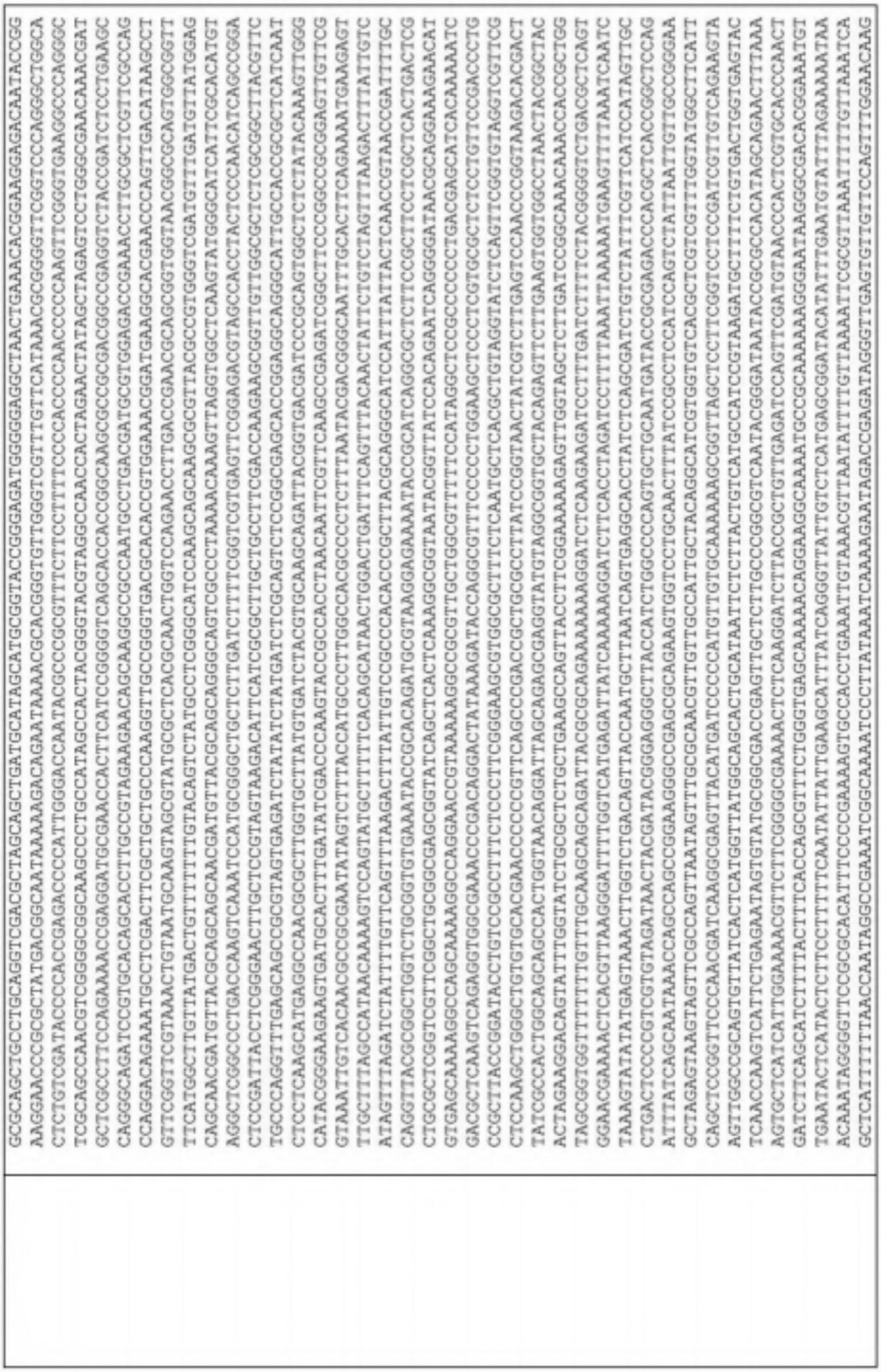
[0754]

ceDNAFVIII载体9 (SEQ ID NO: 200)	AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAAT AGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATA CGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCCTGCAGGCCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT AGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTTCGCCGGCCGCTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAA ATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGGCATTG ATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG GCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG**TCGAGGTGAGCCCCACGT** **TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGG** **GGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCCGAGGGGCGGGGCCGGGGCGGGGAGAGGGTGCGGCGGCCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAA** **GTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATA**AAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCC CGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCG GGGGGTGCGTGCGTGTGTGCTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGGCGGCCTGTGAGCGCTGCGGGGCGCGGGGCTTTGTGCG CTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGT GGGGGGGTGAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCG GGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGCCTCGGGCCGGGGA GGGCTCGGGGGAGGGGGCGCGGCCGGCCCCCGGAGCGCCGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGG CGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACACCCCCTCTAGCGGGCGCGGCGGCAAGCGGTGCGGGCCC GGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTG CCTTTCGGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTTAGCCTTTCTTCTTTTT CCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGTCGACAGAATTCCTCGAAGATCCGAAGGGGTTCAAGCTTGGCATTCCGG TACTGTTGGTAAAGCCAGTTTAAACCGCAGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGGGTTCTCGCTTCAGCGCCACC AGAAGATATTACCTGGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCTCAAGAGTGCC CAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACACCACCTGTTCAATATCGCCAAGCCTCGGCCTCCTT GGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCC GTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAG CCACACCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCTCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCA AGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACACTGCACAAGTTCATCCTGCTG ITCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGAT GCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACAACAC CTGAGGTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCT CAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTG CCCCGAAGAACCCCAGCTGCGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACG ACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGAT TACGCTCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCG GTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGATA CACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCC

[0755]


AAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGA
CCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAAGAAA
GCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTGACCGAGAAC
ATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGA
CAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCT
ACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGG
ATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGA
CAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCTCGGAGCTTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGC
GCGAGATCACCAGAACACAACCCTGCAGAGCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGGATTTCGACATCTAC
GACGAGGACGAGAATCAGAGCCCCCAGAAGCTTTCAGAAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAG
CAGCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGC
CACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAG
GCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAGAAAGACTTCGTGAAGCCCAACGA
GACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGG
AAAAGGACGTGCACAGCGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTC
GCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGA
TCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGT
GGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAAGAGGAGTACAAAATGGCC
CTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGAGCACCTCCA
CGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCT
CTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAG
GTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTA
CAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACA
ACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGAC
CTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGNAAGCAAGGCCATCAGCGACCCCAGATCACACGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTG
GAGCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCCAAGTGAACAACCCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAA
AGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCTCCAGCAGCCAGGACGGC
CATCAGTGGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGTGTTCCAGGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACT
GCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGT
TAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCA
ATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCGTTATTTACGCTCTGTTCCT
GTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCC
TCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCC
GTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTC
CCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTC
ATCGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAGTAACTACAGTTAACTGTGCCTTC
TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG
CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG
GATGCGGTGGGCTCTATGGCGGCCGCCGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGA
TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC

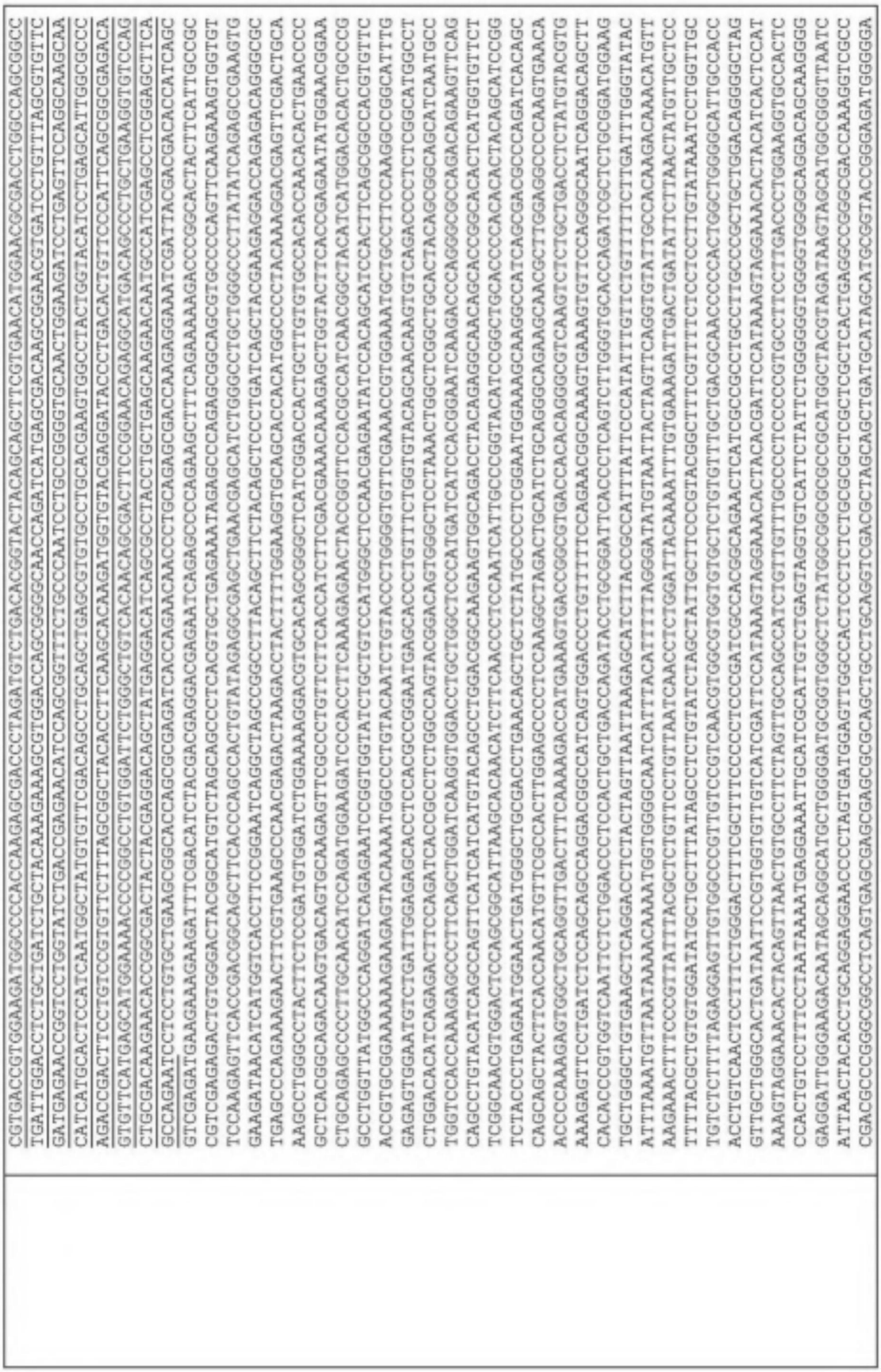
[0756]



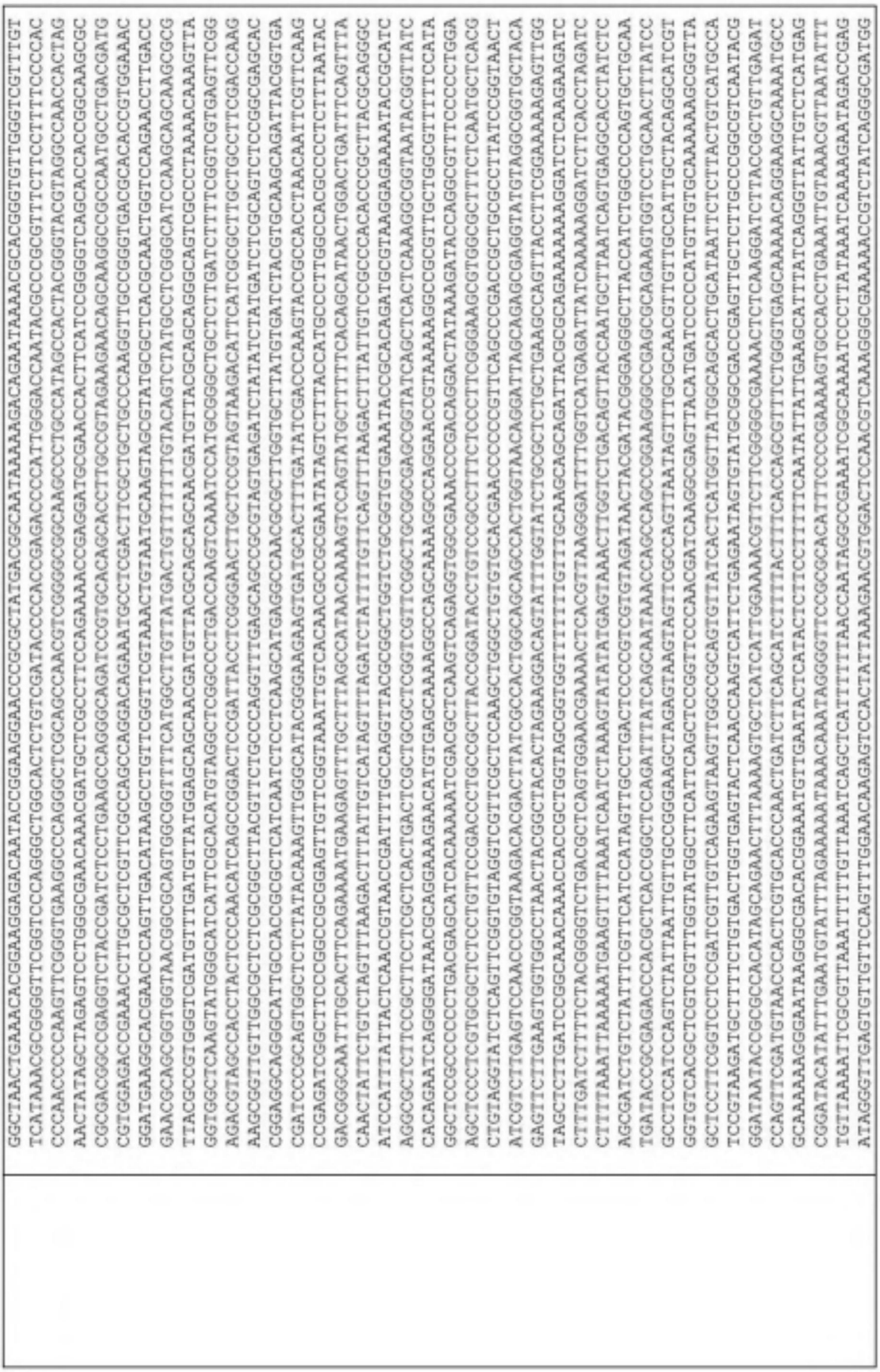
[0757]

	AGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTT
	TTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG
	AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTA
	CAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATG
	CTGTGACAGAGAA
	AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAAAT
	AGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATA
	CGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
	AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT
	AGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTTCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAGGG
	CAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAA
	ACATTGCAAGCAGCAAACACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTC
	CAACATCCACTCGACCCCTTGGAATTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAAACCACTT
	GCTGGGTGGGGAGTCGTCAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAGCCTGTTTCCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAGGG
	TTTTTGTGGCAAATAAACATTTGGTTTTTTTGTTTTTGTTTTTGAGATGGAGGTTTGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGACAC
	AATCTCATCTCACCACAACCTTCCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAAGCATGTGCCACCACACCTGGCTAATTTTCTATTTTTAGTA
	GAGACGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTCAGCCTCCCAAGTAACTGGGATTACAGGCCTGTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTTCTATTTTTGACA
	GGGACGGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCG**GATCTTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGG**
	CCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTC
	CTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTG
	TTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAG
	GGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAA
	CTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAACTGAGTTTAAACCGCAGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTC
	CTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGGACCTGGTCAAGGGACCTGAATCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAGAG
	GCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACC
	ACCTGTTCAATATCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCACCCTGAAG
	AACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACAAGCCAGAGGA
	GAAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGA
	CATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTGAATTCTGGCGAGCCCTGCTCGTGTTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAGAG
	AAAACCCAGACACTGCACAAGTTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACAG
	GGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCG
	TGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCTTTCTTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGC
	CTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCTCAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGA
	TGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACCTGA
	CCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTG
	CACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCC
	TCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTC
	TGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACC
	GATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGAC
ceDNAFVIII载体10 (SEQ ID NO: 201)	

[0758]



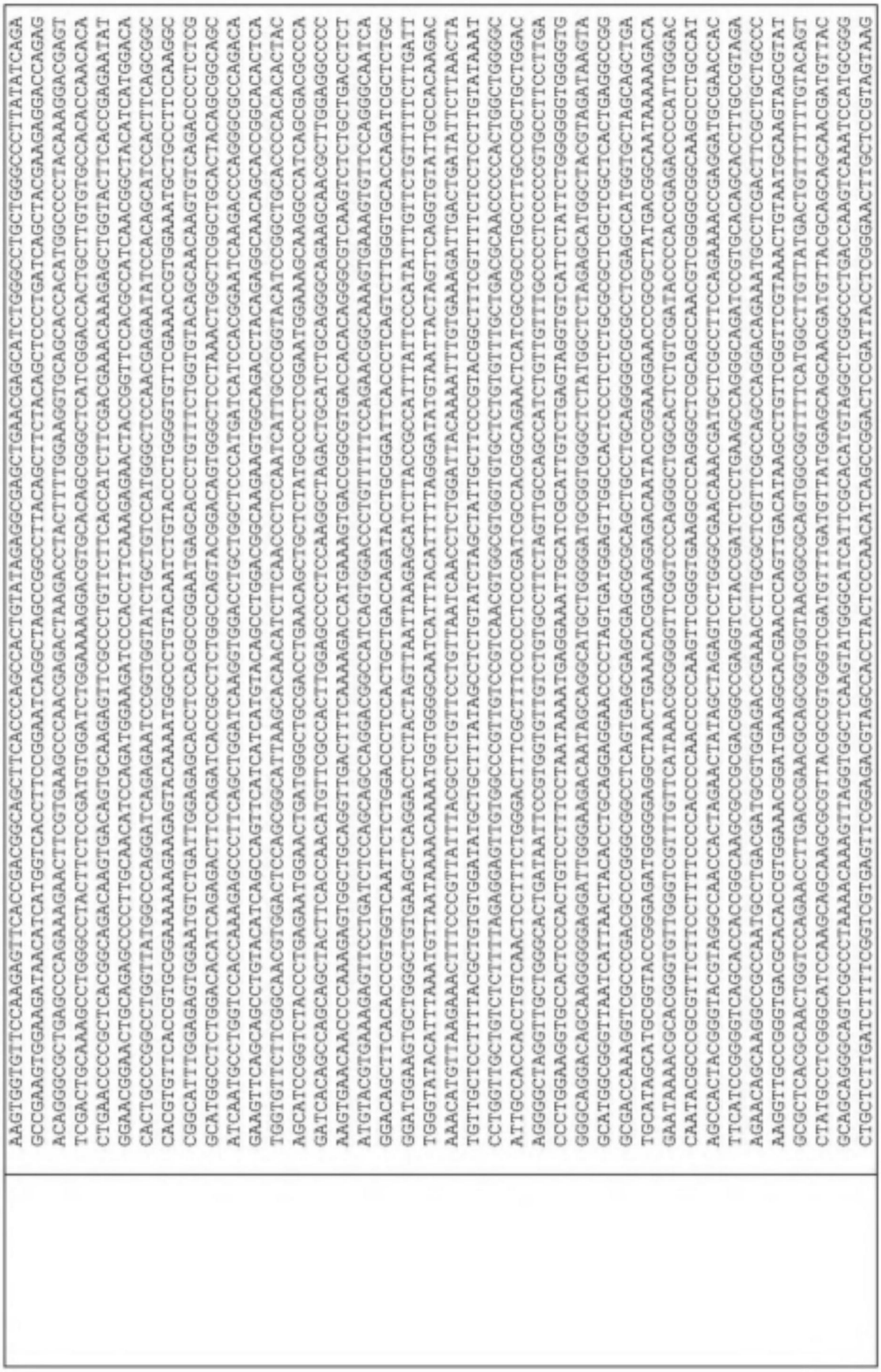
[0759]


GGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGT
TCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGACCAATACGCCCGCGTTCTTCCTTTCCCCCAC
CCCAACCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAAGCCCTGCCATAGCCATCCAGGTACGTAGGCCAACCACTAG
AACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGC
CGCGACGGCCGAGGTCTACCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTCGACGATG
CGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAAC
GGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTTCGTAAATCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACC
GAACGCAGCGGTGGTTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCG
TTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTA
GGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTCGGTCGTGAGTTCGG
AGACGTAGCCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATCGCCTTGCTGCCTTCGACCAAG
AAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCGTCCGGCGAGCAC
CGGAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATTGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGA
CGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCACTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAG
CCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGGAGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTTTAATAC
GACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTATGCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTA
CAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCGCTTACGCAGGGC
ATCCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATC
AGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC
CACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATA
GGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA
AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACT
ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC
CTTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC
AGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA
TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA
GCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCA
TCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACG
GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGAT
CCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCC
GCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTT
TGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAG
ATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG

[0760]

ceDNAFVIII载体11 (SEQ ID NO: 202)	CCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTT GACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACAT TAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAA
	AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAAT AGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATA CGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT AGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTGCGGCCGC**CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGGTCACCCCAGTTATC** **GGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGT** **TCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGG** **TTGGAAGGGAGGGGG**GTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGG TGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGGTTTAAACCGCCACCATCGAGATCGAGCTGTCTACC TGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGACTACATGCAGTCTGACCT GGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAAT TCACCGACCACCTGTTCAATATCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATC ACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACAAG CCAGAGAGAGAAAGAGGACGACAAGGTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCTACTGGCCTCCGATCCTC TGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTG GCCAAAGAGAAAACCCAGACACTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGAT GCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACA GAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCAGCAACACCTGAGGTGCACAGCATCTTCTGGAAGGCCACACCTTCCTGCGTGCGGAACCACAGA CAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCA CCAGCACGATGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACACGCTGCCCCGAAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACG ACGACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAG ACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAA CAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGA GCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCAC GGCATCACCGATGTGCGGCCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGGCGAGATTTTCAAGTA CAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGG CCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAAGAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTT AGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCA GGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCA TTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCATTCAGC GGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAA GGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCTC GGAGCTTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGCGAGATCACCAGAACACCCTGCAGAGCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGAC CATTGCCGCCGTCGAGATGTGGGACTACGGCATGTCTAGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGA

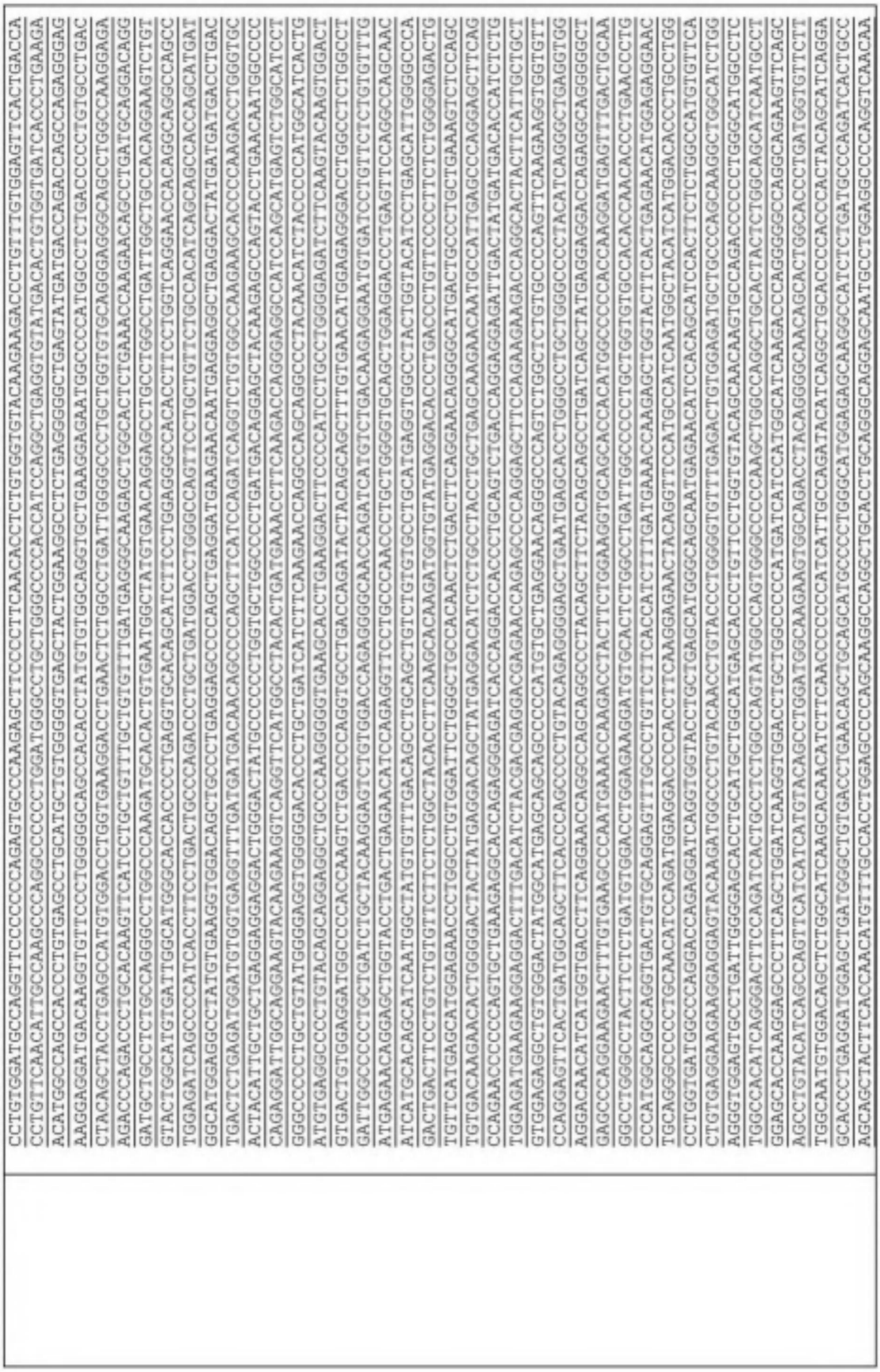
[0761]


AAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCCTGCTGGGCCCTTATATCAGA
GCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAG
ACAGGGCGCTGAGCCCAGAAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGT
TCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACA
CTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATAT
GGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACA
CACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCAATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGC
CACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGC
CGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGAGCACCTCCACGCCGGAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCG
GCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGC
ATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACA
GAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCA
TGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCACACACTAC
AGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAGGCCATCAGCGACGCCCA
GATCACAGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCC
AAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCT
ATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCTCCAGCCAGCGGCCATCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGTTCCAGGGCAATCA
GGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGC
GGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATT
TGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGAC
AAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTA
TGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTCTCCTCTTGTATAAAT
CCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGC
ATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGAC
AGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTG
GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTA
GCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGG
GCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCAGCAGGTCGCGAGCGAGCGGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCAGCCATGGTGCTAGCAGCTGA
TGCATAGCATGCGGTACCGGTACCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACA
GAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGAC
CAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAAGCCCTGCCAT
AGCCACTACGGGTACGTAGGCCAACCACTAGAACTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCAC
TTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTACCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGA
AGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCC
AAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTAT
GCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGT
CTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGCAACGATGTTAC
GCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGG
CTGCTCTTGATCTTTTCGGTCGTGAGTTCGGAGACGTAGCCACCTACATCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAG

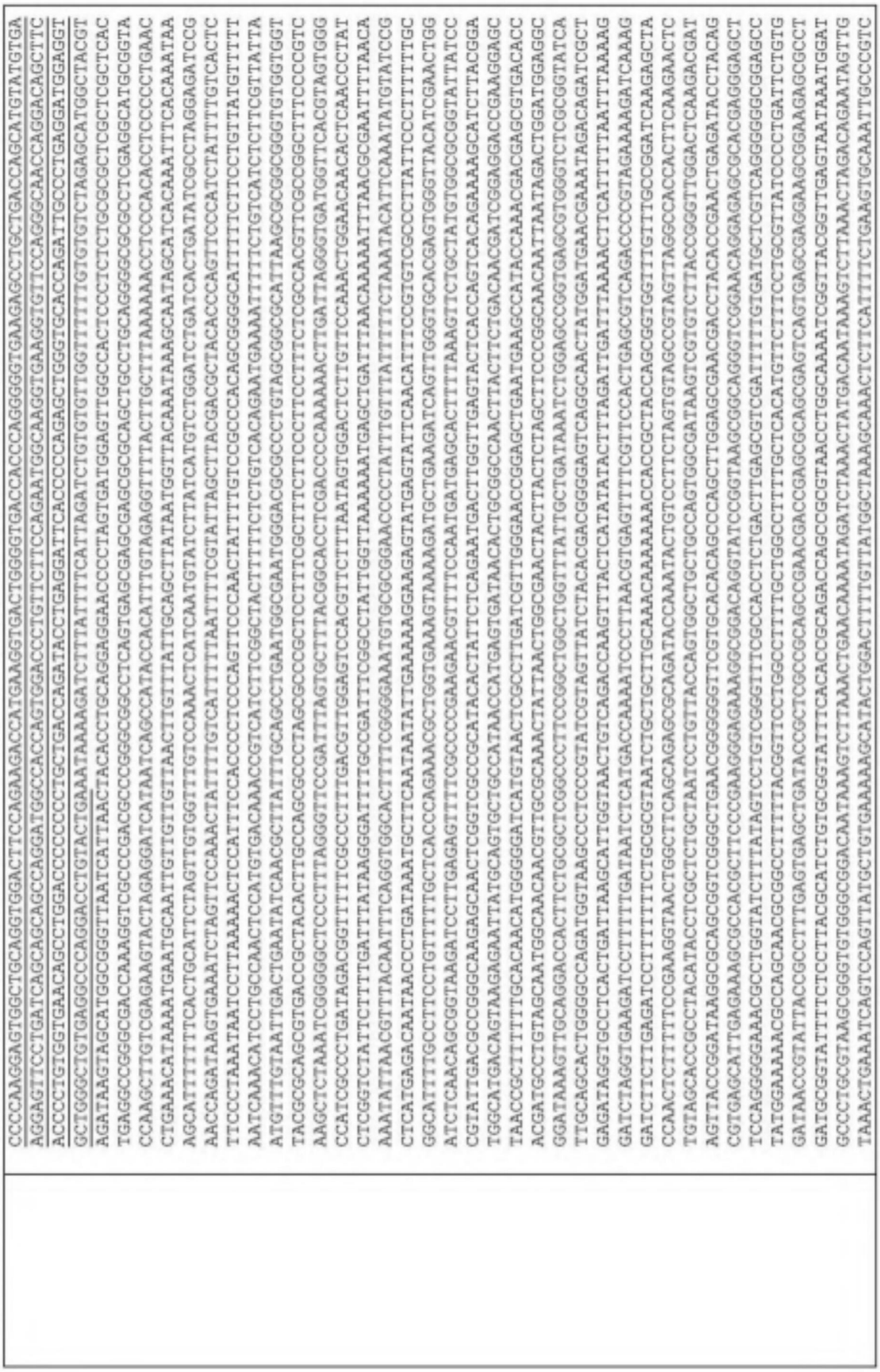
[0762]

ceDNAFVIII载体12 (SEQ ID NO: 203)	ACATTCATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTA TATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTT ATGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCACTTTGATATCGAC CCAAGTACCGCCACCTACAATTCGTTCAAGCCGAGATCGGCTTCCCGGCCGCGGAGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTA CCATGCCCTTGGCCACGCCCCTCTTTAATACGACGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTATGCTTT TTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACAACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTTGTCATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTT TATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCATCCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACC GCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTAT CAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGT AAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTT CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATT ACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTT ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGG GAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC CGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGC AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGA AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTC TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATT GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA GTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAA AATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCA AAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGG AACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC GCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAA TAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAA	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC TCTAGAGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGG**GGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGAC** **TTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGG** **ACGAGGACAGGGCCCCTGTC**TCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCC TGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGGAGCTG

[0763]


CCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCA
CCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGA
ACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAG
AAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGAC
CTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGA
AGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGG
GATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGT
GTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCC
TGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGAT
GGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGAC
TGACTCTGAGATGGATGTGGTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGC
ACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGTGCTGGCCCCTGATGACAGGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCC
CAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCT
GGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTG
ATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACT
GTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCT
GATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTG
ATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCTGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAACC
ATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCA
GACTGACTTCCTGTCTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTG
TGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCTGCTGAAAGTCTCCAGC
TGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAG
CCAGAACCCCCCAGTGCTGAAGAGGCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCATCTCTG
TGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCT
GTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCAGTGAGCAGCAGCCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTT
CCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCCCCTACATCAGGGCTGAGGTGG
AGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCT
GAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCCACCAAGGATGAGTTTGACTGCAA
GGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTG
CCCATGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAAC
TGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGG
CCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTTCA
CTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTTCCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAAGAAGGCTGGCATCTGG
AGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGAGCCCCCTGGGCATTGCCTC
TGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCT
GGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGC
AGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTT
TGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACTACAGCATCAGGA
GCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATCACTGCC
AGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAA

[0764]

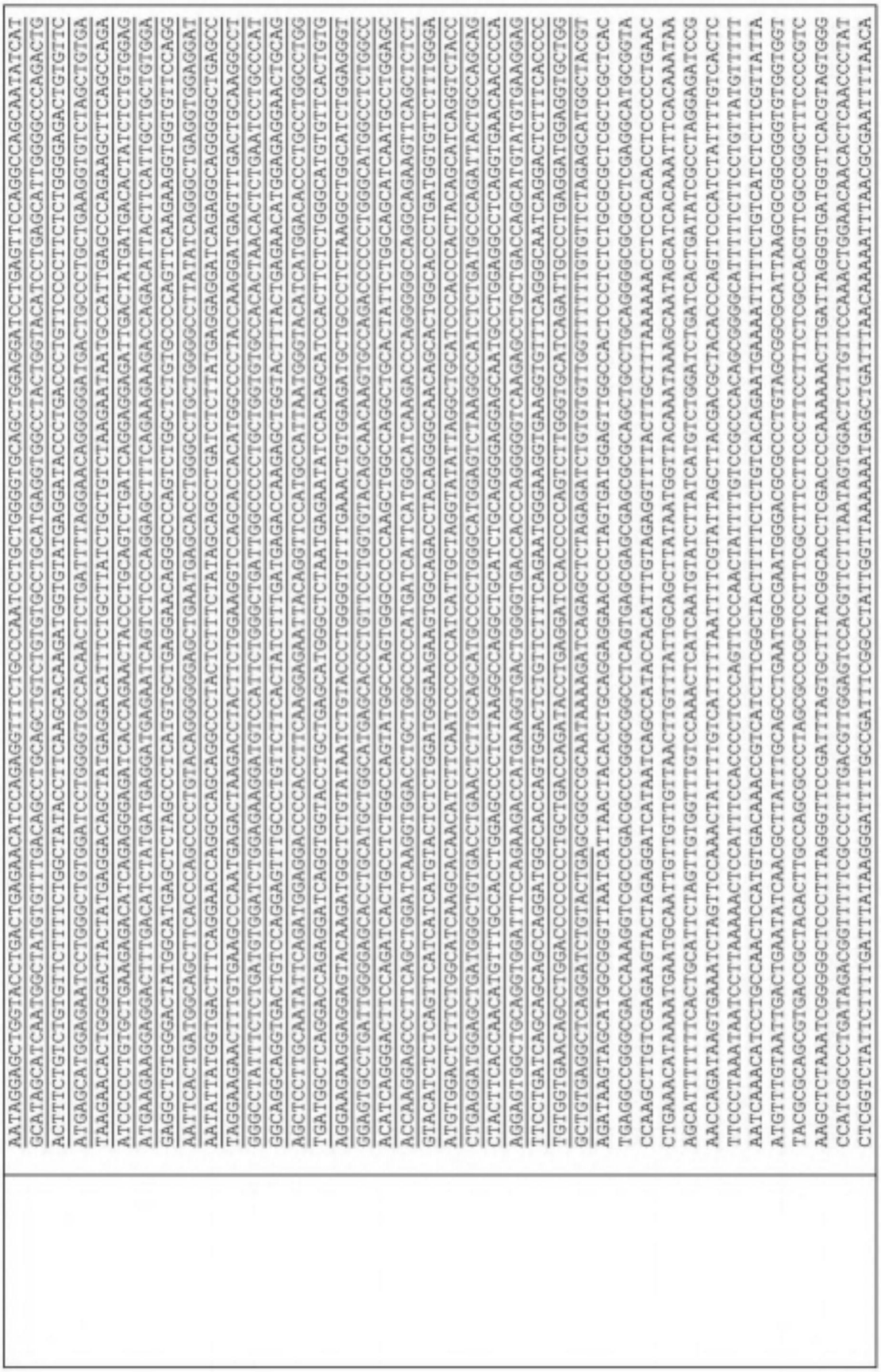


CCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGA
AGGAGTTCCTGATCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTC
ACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGT
GCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGAAATAAAGATCTTTATTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAGCATGGCTACGT
AGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTCGAGGCATGCGGTA
CCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAAC
CTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAA
AGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCG
AACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTCCCATCTATTTTGTCACTC
TTCCCTAAATAATCCTTTAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCCTGTTATGTTTTT
AATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTA
ATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGT
TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTAT
CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACA
AAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGC
GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGG
ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC
CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGA
TGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGC
TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
ACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
TTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTA
CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG
CGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC
TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG
GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCT
GATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGAT
GCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTG
TAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTC

[0765]

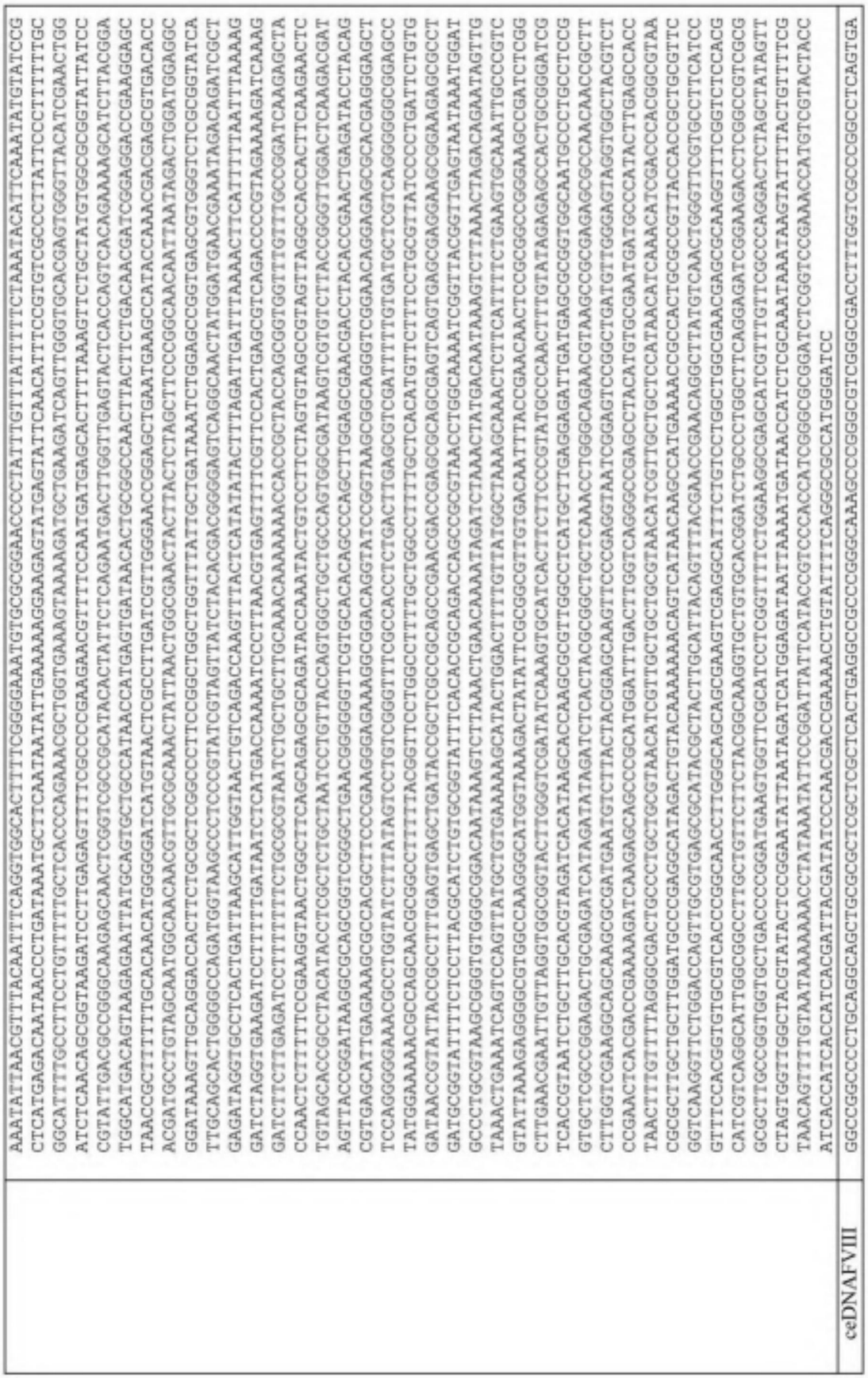
ceDNAFVIII载体13 (SEQ ID NO: 204)	GTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGG CTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCG TCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCCG GTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTT CTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCT CCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACC TAACTTTGTTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCTTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAA CGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTC GGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCC GTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACG CATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCG GCGCTTGCCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTT CTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATATTTACTGTTTTCG TAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACC ATCACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC TCTAGA**GTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTGACTTATTCTCCTTTTG** **TTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCA** **GGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCT**GCTAGCAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCG TGCCTTGAATTACTGACACTGACATCCACTTTTTCTTTTTCTCCACAGGTTTAAACGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGT CTGCTGAGGTTCTGCTTCTGCCACCAGGAGGATATACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTATATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGT GGATGCTAGGTTCCCCCCCAGGGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTTAACACTTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGT TCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGGCTGCTGGGGCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATG GCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCTTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACTAGCCAGAGGGAGAAGGA GGATGACAAGGTGTTTCCTGGGGGCAGCCATACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTATCA GCTACCTGTCTCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCTCTGTGGTGTAGGGAGGGCAGCCTGGCTAAGGAAAAGACC CAGACCCTGCATAAGTTTATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAGACCAAGAACAGCCTGATGCAGGATAGGGATGC TGCCTCTGCCAGGGCTTGGCCTAAGATGCACACTGTGAATGGGTATGTGAATAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACT GGCATGTGATTGGGATGGGCACCACCCTGAGGTCCATAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACTTTCCTGGTGAGGAACCACAGACAGGCCTCTCTGGAG ATCTCTCCCATCACCTTCCTGACTGCTCAGACTCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTTGCCATATTAGCAGCCACCAGCATGATGGGAT GGAGGCCTATGTGAAGGTGGATAGCTGCCCTGAGGAGCCTCAGCTGAGGATGAAGAACACAATGAGGAGGCTGAAGACTATGATGATGACCTGACTGATT CTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAATAGCCCCAGCTTCATTCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAACACCCCAAGACCTGGGTGCACTAC ATTGCTGCTGAGGAAGAGGACTGGGACTATGCTCCCCCTGGTGCTGGCCCCTGATGATAGGTCTTATAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGGCCCCAGAG GATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTGAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAAACCAGGGAGGCCATTCAGCATGAGTCTGGCATCCCTGGGCC CTCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTATCCTCATGGCATCACTGATGTG AGGCCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAAGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTTAAGTATAAAGTGGACTGTGAC TGTGGAGGATGGCCCTACAAGTCTGACCCCAGGTGTCTGACCAGGTACTATTCTAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTG GGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTTTCTGTGTTTGATGAG

[0766]



AATAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTTCTGCCCAATCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGATCCTGAGTTCCAGGCCAGCAATATCAT
GCATAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTG
ACTTTCTGTCTGTGTTCTTTTCTGGCTATACCTTCAAGCACACAAGATGGTGTATGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTC
ATGAGCATGGAGAATCCTGGGGTGTGGATCCTGGGGTGCCACAACTCTGATTTTAGGAACAGGGGGATGACTGCCCTGCTGAAGGTGTCTAGCTGTGA
TAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATTTCTGCTTATCTGCTGTCTAAGAATAATGCCATTGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGA
ATCCCCCTGTGCTGAAGAGGACATCAGAGGGAGATCACCAGAACTACCTGCAGTCTGATCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACTATCTCTGTGGAG
ATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTATGATGAGGATGAGAATCAGTCTCCCAGGAGCTTTCAGAAGAAGACCAGACATTACTTCATTGCTGCTGTGGA
GAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCTCTAGCCCTCATGTCTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGG
AATTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGGGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGGCCTTATATCAGGGCTGAGGTGGAGGAT
AATATTATGGTGACTTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCTACTCTTCTATAGCAGCCTGATCTCTTATGAGGAGGATCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCC
TAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGGTCCAGCACCACATGGCCCCTACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCT
GGGCCTATTTCTCTGATGTGGATCTGGAGAAGGATGTCCATTCTGGGCTGATTGGCCCCCCTGCTGGTGTGCCACACTAACACTCTGAATCCTGCCCAT
GGCAGGCAGGTGACTGTCCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACTATCTTTGATGAGACCAAGAGCTGGTACTTTACTGAGAACATGGAGAACTGCAG
AGCTCCTTGCAATATTCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAATTACAGGTTCCATGCCATTAATGGGTACATCATGGACACCCTGCCTGGCCTGG
TGATGGCTCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCTCTAATGAGAATATCCACAGCATCCACTTCTCTGGGCATGTGTTCACTGTG
AGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCTCTGTATAATCTGTACCCTGGGGTGTTTGAAACTGTGGAGATGCTGCCCTCTAAGGCTGGCATCTGGAGGGT
GGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCC
ACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTATTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGC
ACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATTCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGCAGAAGTTCAGCTCTCT
GTACATCTCTCAGTTCATCATCATGTACTCTCTGGATGGGAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTGTTCTTTGGGA
ATGTGGACTCTTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAATCCCCCCATCATTGCTAGGTATATTAGGCTGCATCCCAACCCACTACAGCATCAGGTCTACC
CTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACTCTTGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGTCTAAGGCCATCTCTGATGCCCAGCAGTTACTGCCAGCAG
CTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCCTCTAAGGCCAGGCTGCATCTGCAGGGGAGGAGCAATGCCTGGAGGCCTCAGGTGAACAACCCCA
AGGAGTGGCTGCAGGTGGATTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAG
TTCCTGATCAGCAGCCAGCCCAGGATGGCCACCAGTGGACTCTGTTCTTTCAGAATGGGAAGGTGAAGGTGTTTCAGGGCAATCAGGACTCTTTCACCCC
TGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATCCACCCCCAGTCTTGGGTGCATCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGG
GCTGTGAGGCTCAGGATCTGTACTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCAGAGCTCTAGAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTTCTAGAGCATGGCTACGT
AGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATGCGGTA
CCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAAC
CTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACACAAATTTCACAAATAA
AGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCG
AACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTCCCATCTATTTGTCACTC
TTCCCTAAATAATCCTTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTT
AATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTA
ATGTTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGT
TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTAT
CTCGGTCTATTCTTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACA

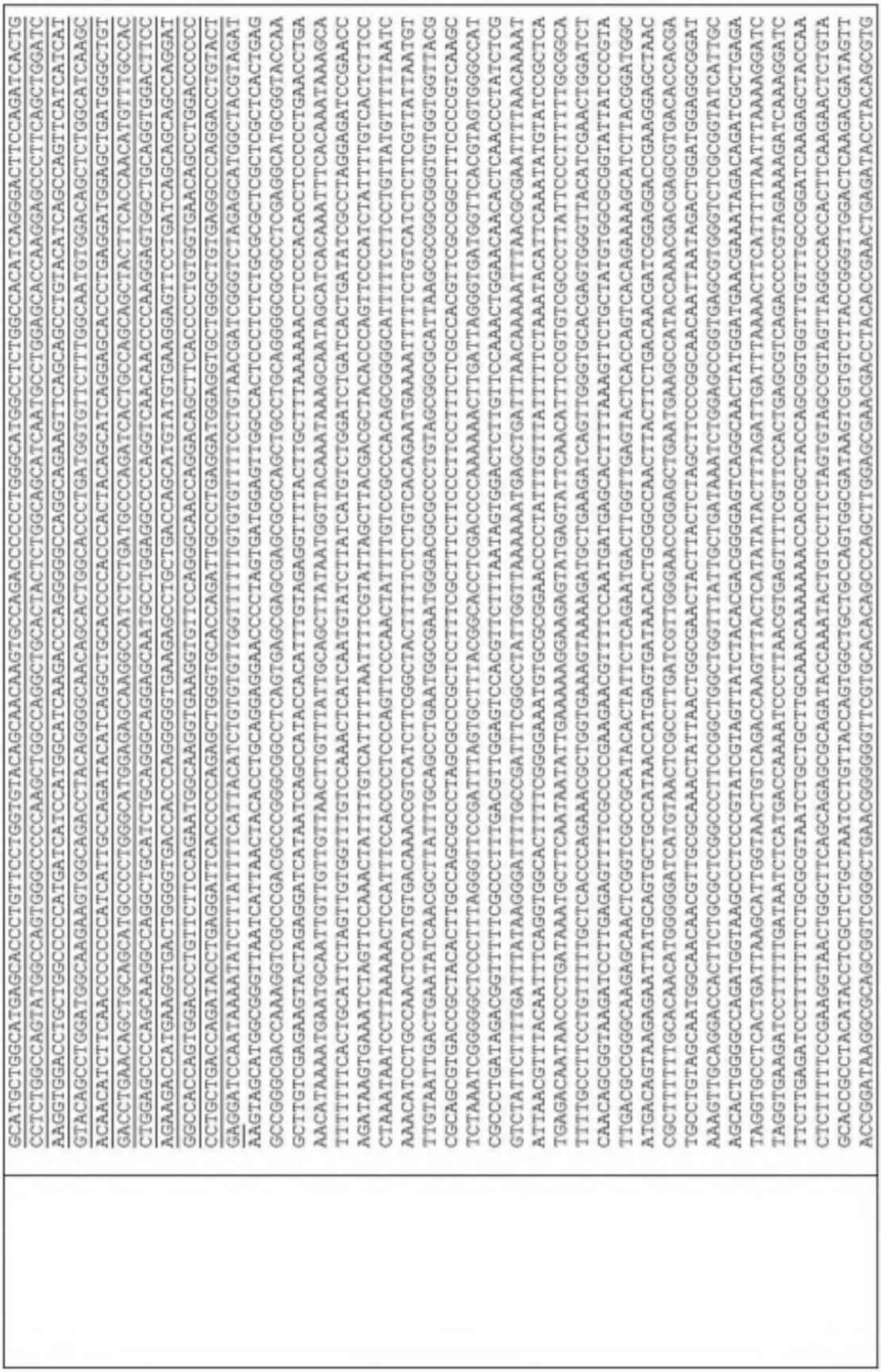
[0767]


AAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGG
ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC
CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGA
TGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGC
TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
ACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
TTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTA
CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG
CGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC
TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG
GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCT
GATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGAT
GCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTG
TAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTC
GTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGG
CTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCG
TCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCG
GTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTT
CTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCT
CCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACC
TAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAA
CGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTC
GGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCC
GTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACG
CATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCGTCGCG
GCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTT
CTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAAAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCG
TAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACC
ATCACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
ceDNAFVIII
GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA

[0768]

载体14 (SEQ ID NO: 205)	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC TCTAGAGGAACCATTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCACCCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAAGTTCACA CGCGTGGTA**CCGTCTGTCTGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCC** **TTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTT** **CACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTG**AAGAGGTTAAGTTATCGTTAGTTCGTGCACCATTAATGTTTAATTACCTGGAG CACCTGCCTGAAATCATTTTTTTTTTCAGGTTGGCTAGTATGCAGATCGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTTGAGATCTGCTCAGCGCC ACCAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGT GCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCC CCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCAT GCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGGTGTTCCCTGGGGG CAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTATGTGAGCCATGGACCTGG TGAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTG CTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAA GATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGCACCA CCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACT GCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAG CTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTG ATGATGACAACAGCCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGG GACTATGCCCCCCCTGGTGCTGGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGT CAGGTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGG ACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCCCTGTACACGCAGGAGGCTG CCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTC TGACCCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGG AGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAG AACATCCAGAGGTTCCTGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTT TGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTTCTTCTCTG GCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTG TGGATTCTGGGCTGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGA GGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAAGCGCCATC AGCGCGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAGGAGGACTTTGACATC TACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAG CAGCAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCC AGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAAC CAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAA TGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACC TGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGGTGACTGTGCAGGAG TTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGA GGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGCCCAGGACCAGAGGATCA GGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAGGAGGAGTACAAGATG GCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCT

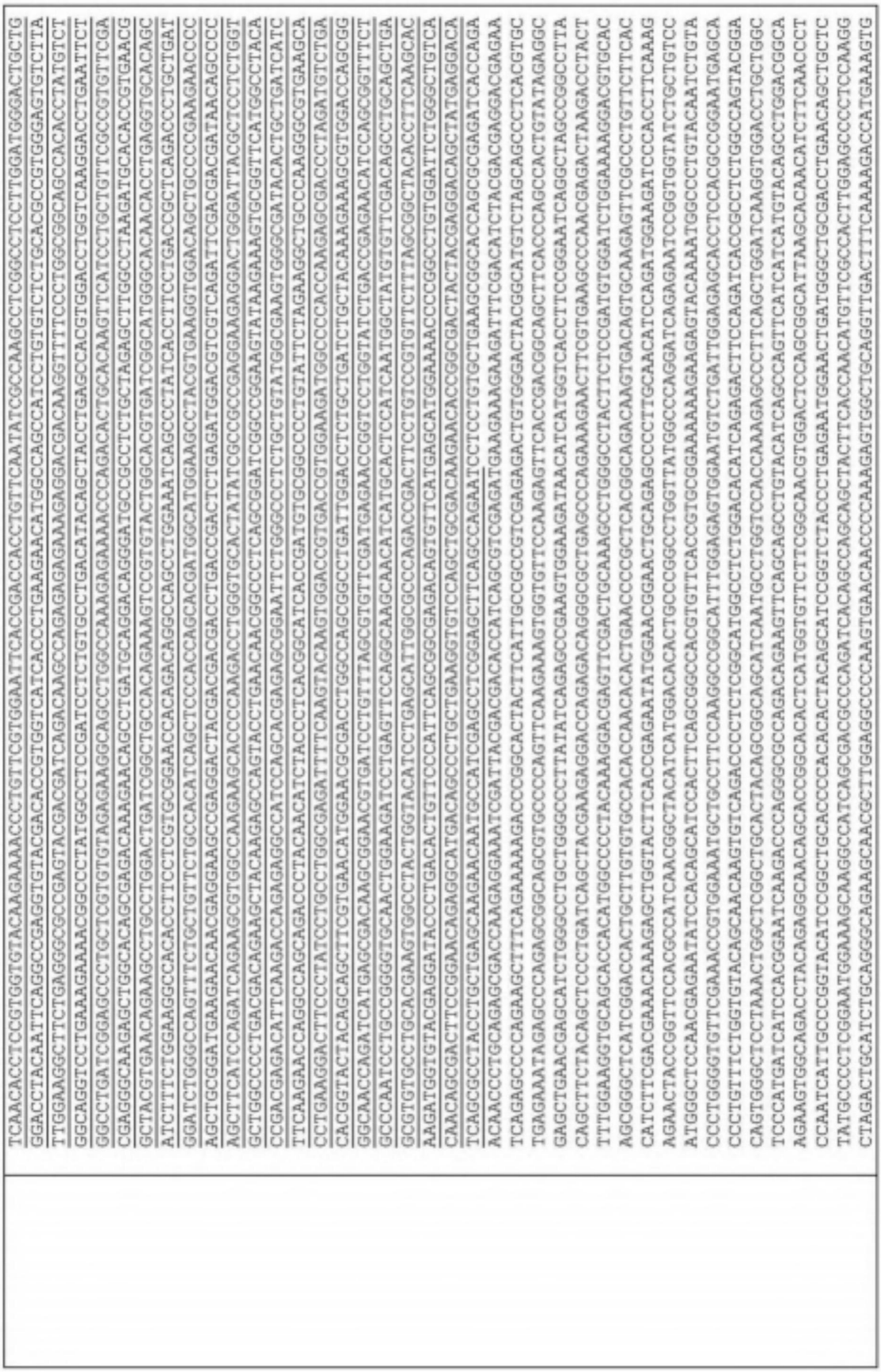
[0769]



[0770]

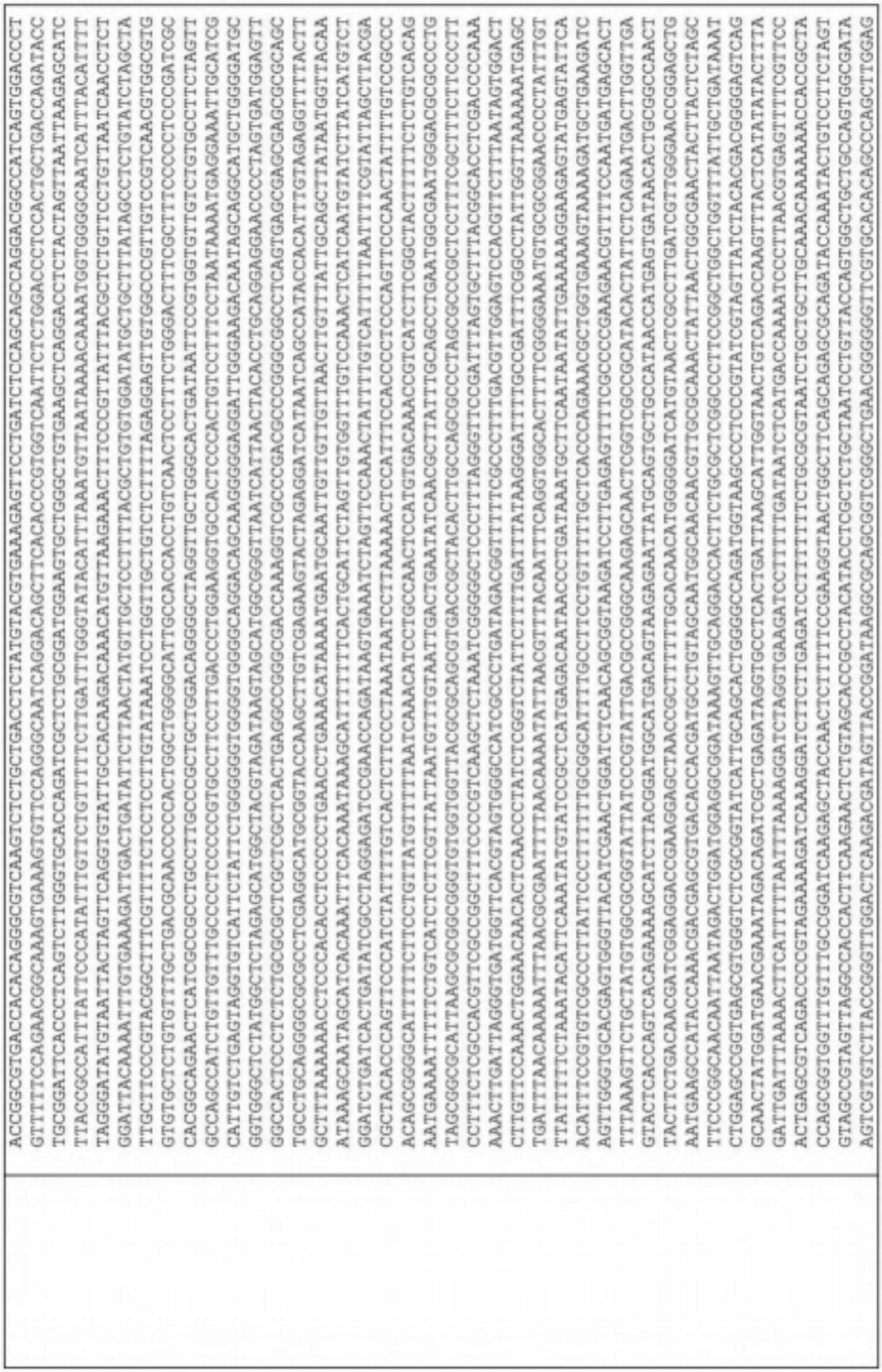
ceDNAFVIII载体15 (SEQ ID NO: 206)	AGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCA GGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA ACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATG CGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCC TGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAA CTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTAT TAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTG AACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCAC CGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGC TCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTG GTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGA ACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAAC TTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCG CTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTC AAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTT CCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATC GTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCGTCGCGGCGC TTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAG TGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACC AGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCA CCATCACCATCACGATATACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC TCTAGAAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTC TGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCT GACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAGAGGAGGAGCAGAGG TTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAAACCACTTGCTGGGGTGGGGAGTCGTCAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAG CCTGTTTCCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAGGGTTTTTGTGGCAAATAAACATTTGGTTTTTGTTTTTGTTTTT GTTTTTTGAGATGGAGGTTTGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCACCACAACCTTCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAG CTGGGATTACAAGCATGTGCCACCACACCTGGCTAATTTTTCTATTTTTAGTAGAGACGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTCAGCCTCCCAAGTAACT GGGATTACAGGCCTGTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTTCTATTTTTGACAGGGACGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCGG **ATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCC** **CCTCCACCTTGGACACAGGAGCGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGT** **CCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCT**CCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGC AGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACACCACACTGACCTGGGACAGT GAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTTAGATTCCAACCTTTGGAA CTGAGTTTAAACGCCCGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCT GGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCT

[0771]



TCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATATCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTG
GGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTA
TTGGAAGGCTTCTGAGGCGCCGAGTACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCT
GGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTGAATTCT
GGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAAAACCCAGACACTGCCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGA
CGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACG
GCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCAACAACCTGAGGTGCACAGC
ATCTTTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATACCTTCCTGACCGCTCAGACCCTGCTGAT
GGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCC
AGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCC
AGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGT
GCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACA
CCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATC
TTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCA
CCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGA
CACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAGGAAGCGTGGACCAGCGG
GGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTGACAGCCTGCAGCTGA
GCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGA
GCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCAC
AAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACACTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAACCCCGGCCTGTGGGCTGTCA
CAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACA
TCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCTCGGAGCTTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGCGAGATCACCAGA
ACAACCCTGCAGAGCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAA
TCAGAGCCCCAGAAGCTTTCAGAAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAGCAGCCCTCACGTGC
TGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGC
GAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTA
CAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAAGAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACT
TTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCAC
AGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCAC
CATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAG
AGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCC
ATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTA
CCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGAGCACCTCCACGCCGGAATGAGCA
CCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGA
CAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGC
TCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCA
AGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCT
CCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTC
TATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCCAAGG
CTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTG

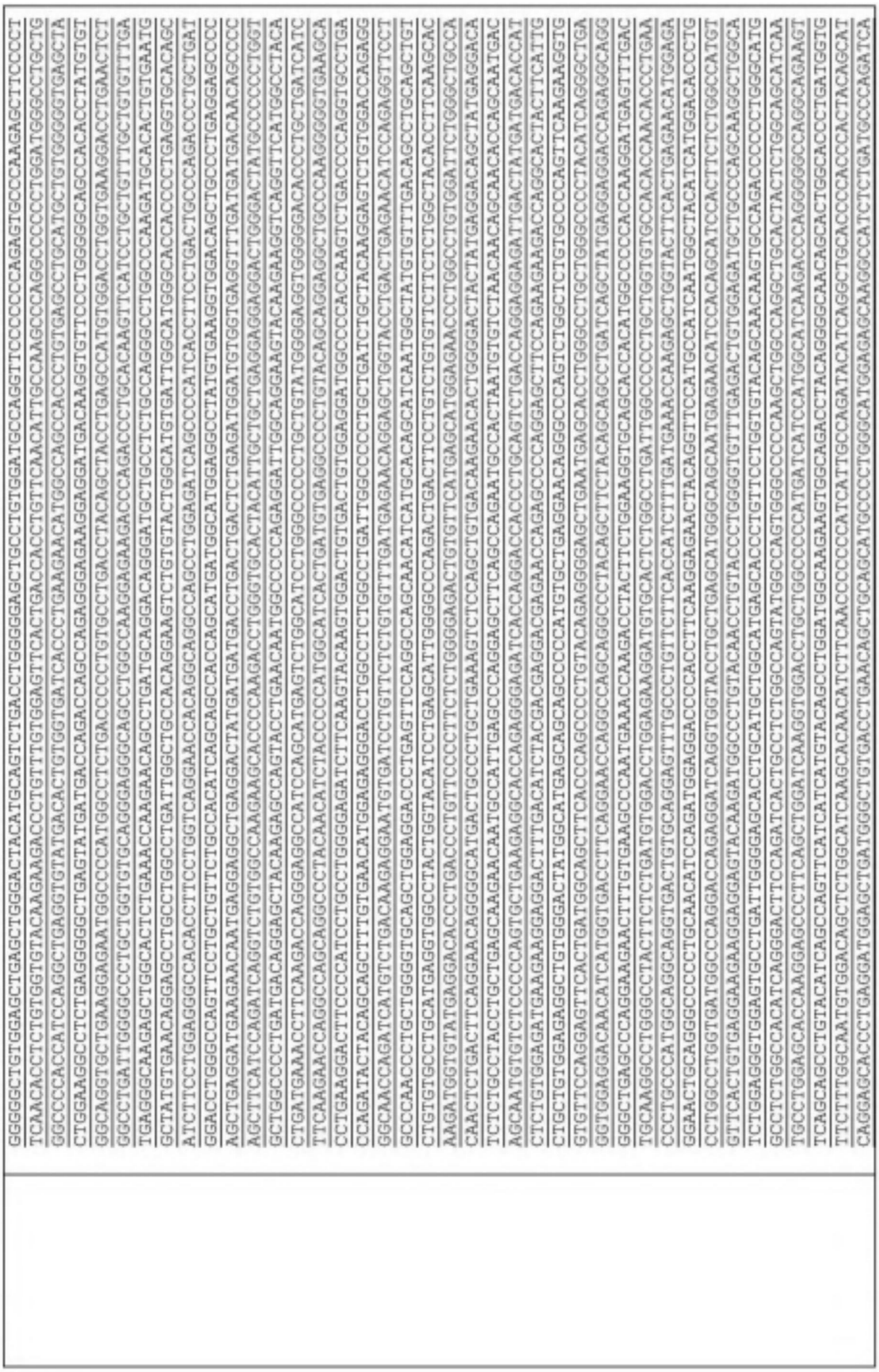
[0772]



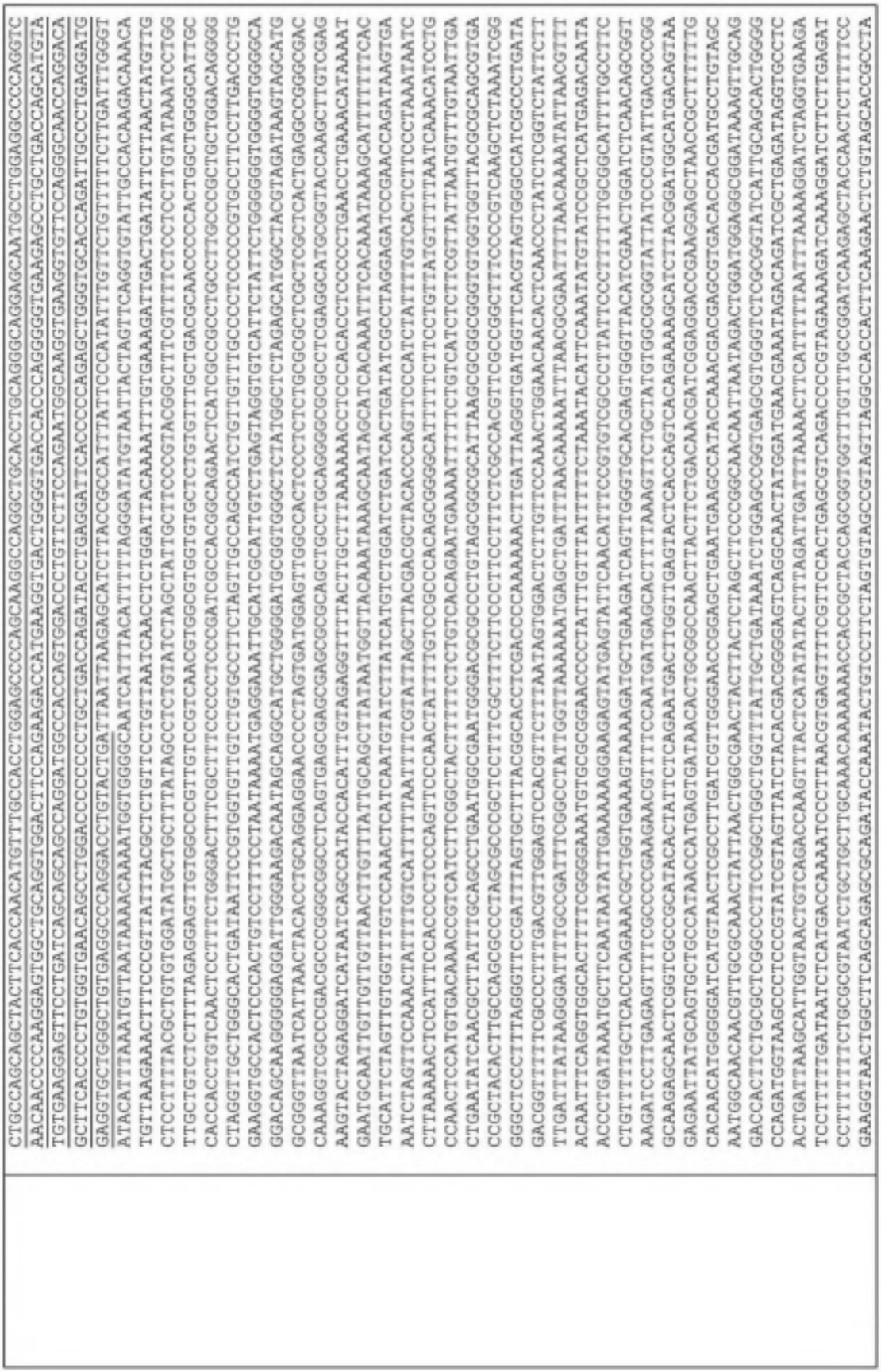
[0773]

	CGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
	CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
	GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCAC
	ATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
	CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTG
	GCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTAT
	GACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAA
	ACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTAC
	CGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATG
	CCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAG
	ATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCA
	GAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAG
	TCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCT
	ACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTG
	CTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAA
	AACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAAC
	AGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGG
	CTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTG
	GCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCGTCGCGGCGCTTCGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGC
	ATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAAAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCA
	TCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGC
	GCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATG
	GGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGAAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTC
	TGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCT
	GACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAATTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGG
	TTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAAACCACTTGCTGGGTGGGGAGTCGTCAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAG
	CCTGTTTCCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAGGGTTTTTGTGGCAAATAAACATTTGGTTTTTTTGTTTTGTTTT
	GTTTTTTGAGATGGAGTTTGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCACCACAACCTTCCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAG
	CTGGGATTACAAGCATGTGCCACCACACCTGGCTAATTTTTCTATTTTTAGTAGAGACGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTCAGCCTCCCAAGTAACT
	GGGATTACAGGCCTGTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTTCTATTTTTGACAGGGACGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCGG
	ATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCC
	CCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGT
	CCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCCAGCCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGC
ceDNAFVIII载体16 (SEQ ID NO: 207)	AGCCTCCCCCCGTTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACAGGGACAGGGCCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGT
	GAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTTAGATTCCAACCTTTGGAA
	CTGAGTTTAAACGCCCGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATACTACCT

[0774]


GGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCCT
TCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGCCTGCTG
GGCCCCACCATCCAGGCTGAGGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTA
CTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGT
GGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCT
GGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGA
TGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATG
GCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGC
ATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGAT
GGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAAGGCCTATGTGGAAGGTGGACACGCTGCCCTGAGGAGCCCC
AGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCC
AGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGT
GCTGGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCATGGCCTACA
CTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATC
TTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCA
CCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGA
CCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGG
GGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCT
GCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGT
CTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCAC
AAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCA
CAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACA
TCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATGCCACTAATGTGTCTAACAACAGCAACACCAGCAATGAC
AGCAATGTGTCTCCCCCAGTGCTGAAGAGGCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCAT
CTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACCAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTG
CTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTG
GTGTTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCCCTACATCAGGGCTGA
GGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGG
GGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGATGAGTTTGAC
TGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAA
CCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGA
GGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTG
CCTGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGT
GTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTTTCCCGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCA
TCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATG
GCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAA
TGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGT
TCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTG
TTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCAT
CAGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATCA

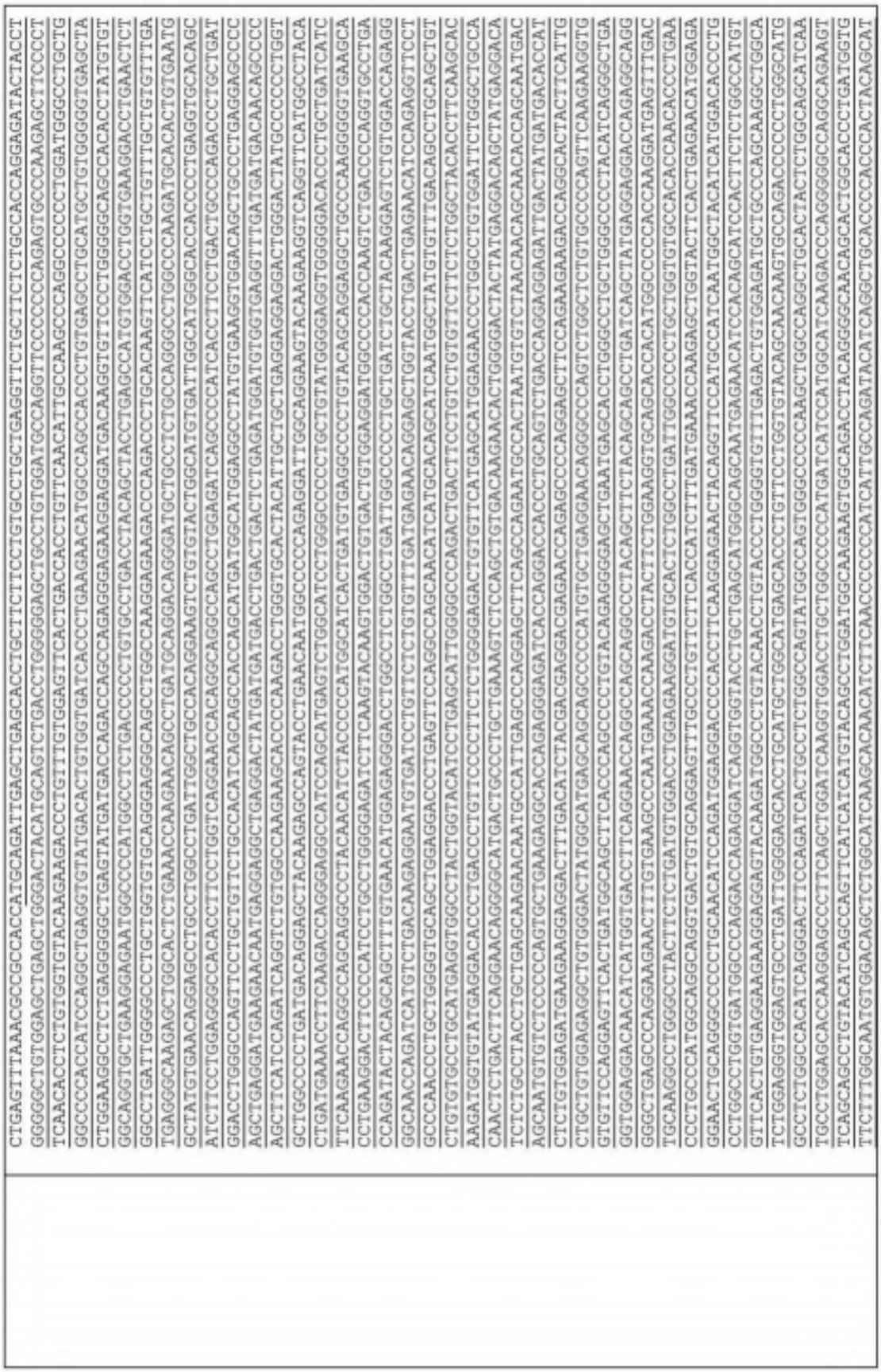
[0775]



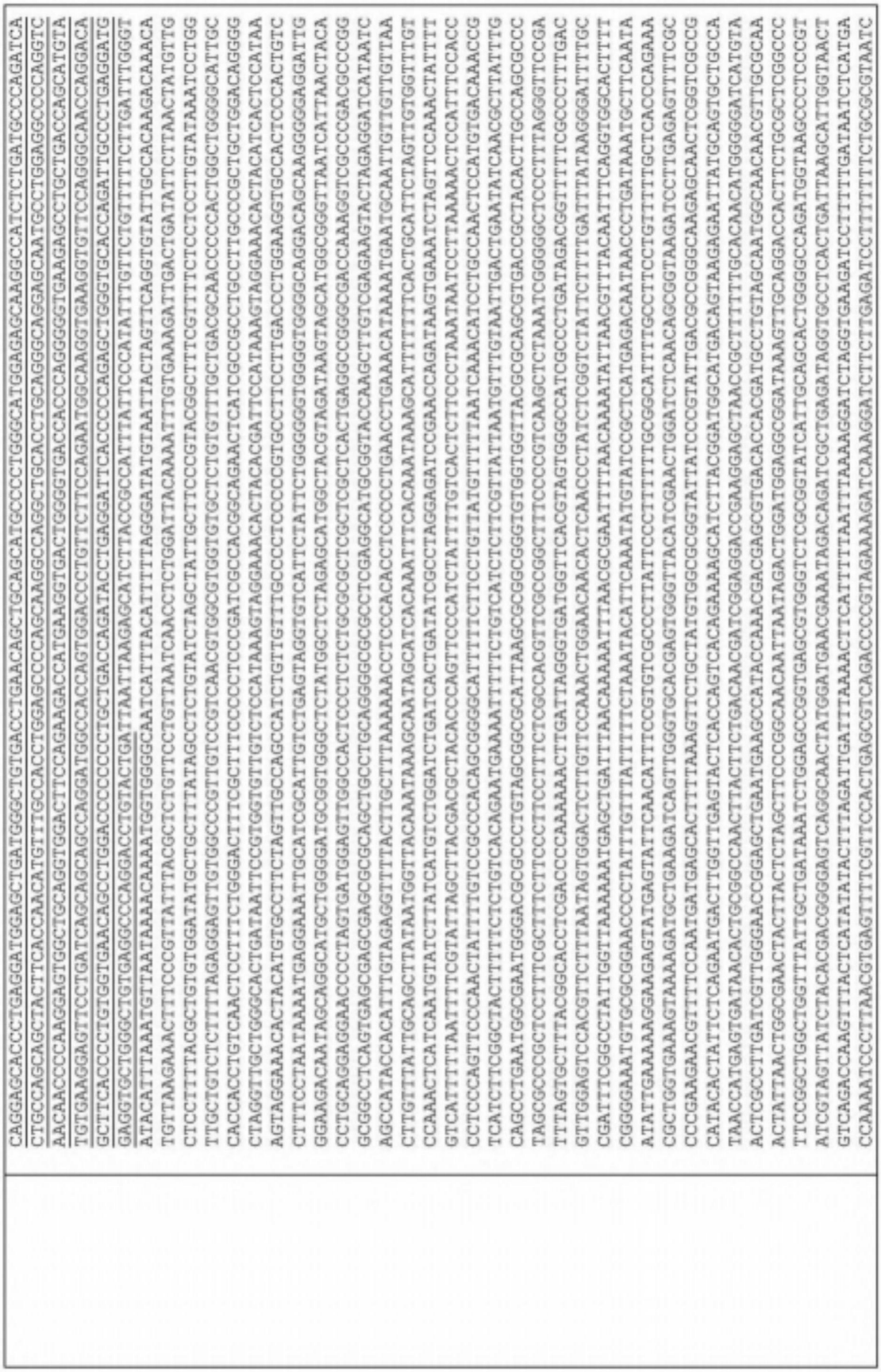
[0776]

	CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG
	GCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGA
	AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
	CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
	AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
	CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTC
	TCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCG
	GGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAG
	TCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGG
	CGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGT
	TAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGC
	TTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGA
	CTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCA
	GCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACC
	GAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAG
	GGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTT
	GGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGG
	ACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTG
	CGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATT
	GGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGG
	TGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGTTCTAGTGGTTGGCTA
	CGTATCACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAA
	TAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACCAT
	CACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGAAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTC
	TGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCT
	GACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAATTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGG
	TTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAAACCACTTGCTGGGTGGGGAGTCGTCAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAG
	CCTGTTTCCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAGGGTTTTTGTGGCAAATAAACATTTGGTTTTTTGTTTTGTTTT
	GTTTTTTGAGATGGAGGTTTGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCACCACAACCTTCCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAG
	CTGGGATTACAAGCATGTGCCACCACACCTGGCTAATTTTTCTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTCAGCCTCCCAAGTAACT
	GGGATTACAGGCCTGTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTTTCTATTTTTGACAGGGACGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCGG
ceDNAFVIII载体17 (SEQ ID NO: 208)	**ATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCC** **CCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAGCGT** **CCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCT**TCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGC AGCCTCCCCCGTTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGT GAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTTAGATTCCAACCTTTGGAA

[0777]


CTGAGTTTAAACGCCGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTGCCACCAGGAGATACTACCT
GGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGAATGCCAGGTTCCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCT
TCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATGGGCCTGCTG
GGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTA
CTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGT
GGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCT
GGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTTTTGA
TGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATG
GCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGC
ATCTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGAT
GGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCACCACGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCC
AGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCC
AGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGT
GCTGGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCATGGCCTACA
CTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATC
TTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCA
CCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGA
CCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGG
GGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCT
GCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGT
CTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCAC
AAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCA
CAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACA
TCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATGCCACTAATGTGTCTAACAACAGCAACACCAGCAATGAC
AGCAATGTGTCTCCCCCAGTGCTGAAGAGGCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCAT
CTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTG
CTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCCCCCCATGTGCTGAGTGGAACAGGGCCCAGTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTG
GTGTTCCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCCTGCTGGCCCCTACATCAGGGCTGA
GGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGG
GGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAAGGATGAGTTTGAC
TGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAA
CCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGA
GGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTG
CCTGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGT
GTTCACTGTGAGGAAGAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCA
TCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCCTGTTCCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATG
GCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAA
TGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGT
TCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCTGATGGTG
TTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCAT

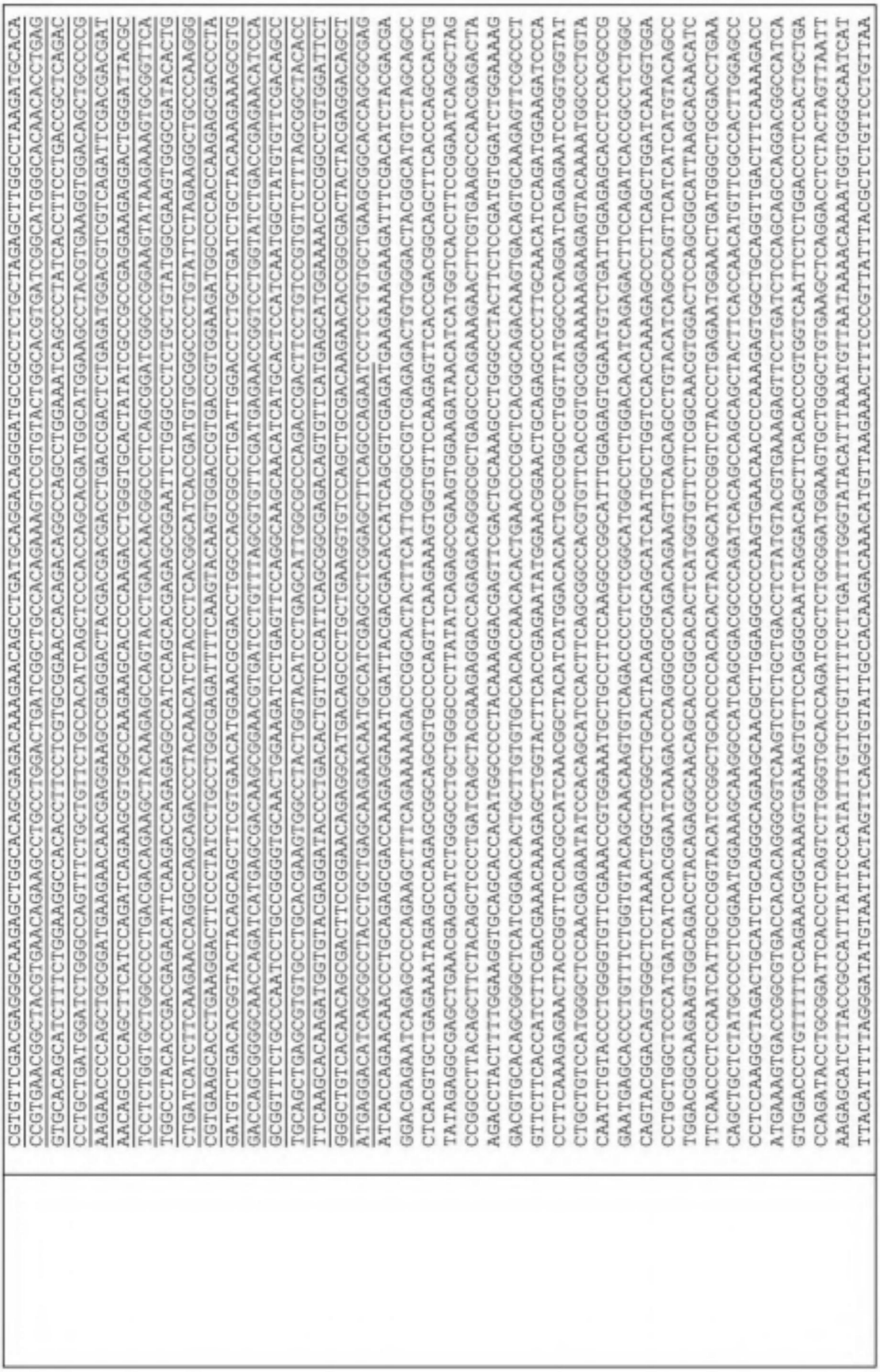
[0778]


CAGGAGCACCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATCA
CTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTC
AACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTA
TGTGAAGGAGTTCCTGATCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACA
GCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATG
GAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGATTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGT
ATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTACAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACA
TGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTG
CTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG
TTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGC
CACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGG
CTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGCGGCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGG
AGTAGGAAACACTACATGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC
CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA
CCTGCAGGAGGAAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGG
GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATC
AGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAA
CTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT
CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTT
GTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTATAAAACTCCATTTCCACC
CCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCG
TCATCTTCGGCTACTTTTTTCTTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATTGTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTG
CAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC
TAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA
TTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGC
CGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTT
CGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATA
ATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAA
CGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGC
CCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCG
CATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCA
TAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA
ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
ACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCC
TTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGT
ATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATC

[0779]

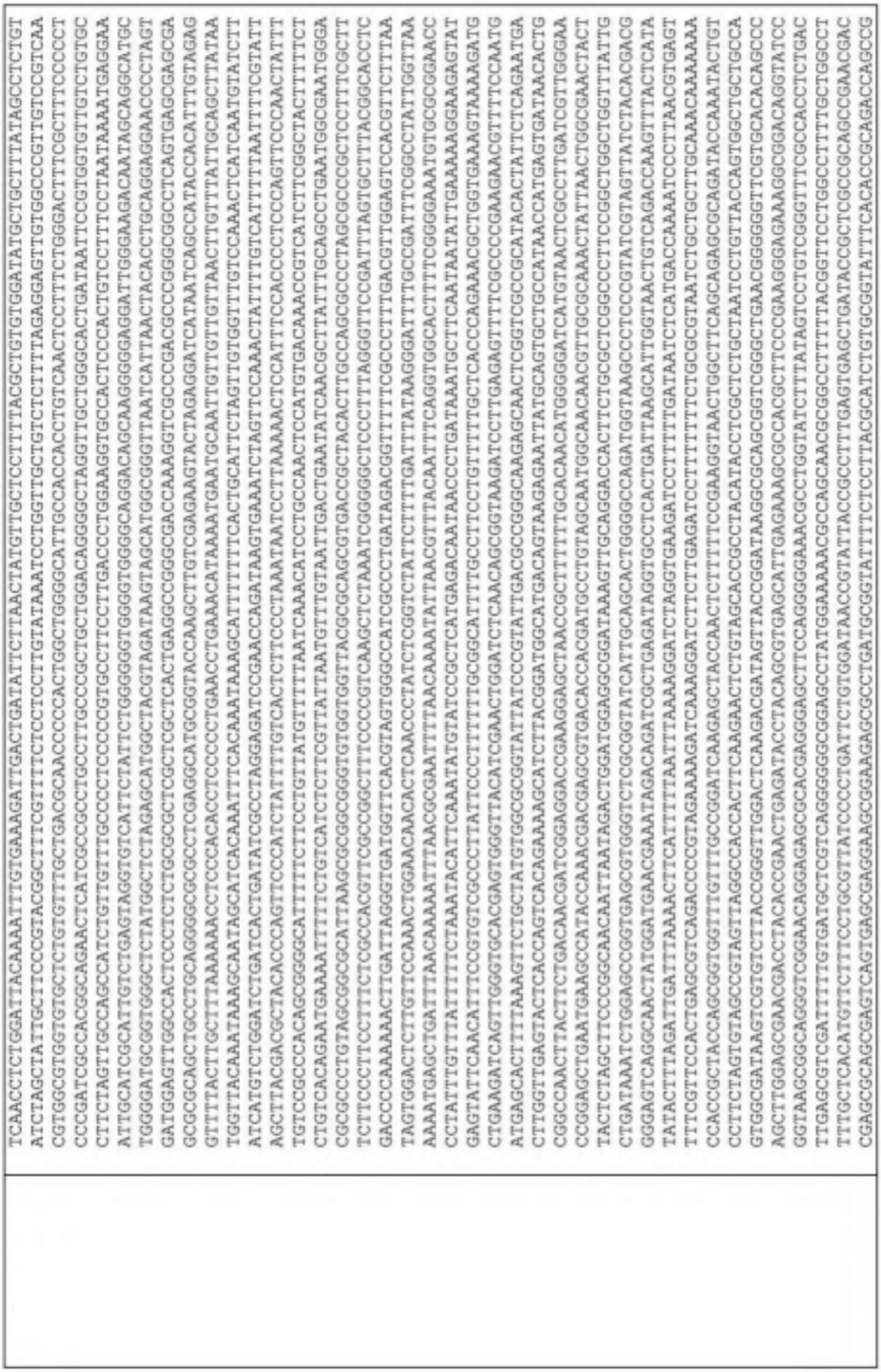
	TGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAG
	AGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
	TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
	GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGG
	GAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTG
	TCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGG
	TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC
	CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
	TTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGT
	CTTAAACTGAACAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAG
	CATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAA
	GACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCG
	ATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGC
	ACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGA
	TCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTA
	CTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCG
	CATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAA
	CATCGTTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTG
	TACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATAC
	GCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGC
	AGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTA
	CGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGG
	TTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAAT
	AGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTC
	CGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACG
	ACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGA**CGGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTC**
	TGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAA
	TAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCA
	CACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACT
	TTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGAAG
	ATATTACCTGGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCAAGAGTGCCCAAGA
	GCTTCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATATCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATG
	GGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTCATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGG
	AGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAAGAGGACGACAAGGTTTTCCCTGGCGGCAGCCACA
	CCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCCTATGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCAAGGAC
	CTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAAAACCCAGACACTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGC
ceDNAFVIII载体18 (SEQ ID NO: 209)	

[0780]



CGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACA
CCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACAACACCTGAG
GTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGCCACACCTTCCTCGTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATACCTTCCTGACCGCTCAGAC
CCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCACCACGCAGATGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCG
AAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGAT
AACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGC
TCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCGGTTCA
TGGCCTACACCGACGAGACATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGAATTCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTGGGCGATACACTG
CTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGG
CGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGGCGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTA
GATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAGAAAGCGTG
GACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTACGAGGACATCCA
GCGGTTTCTGCCCAATCCTGCGGGGTGCAACTGGAAGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCC
TGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTCTAGCGGCTACACC
TTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACCCTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAACCCCGGCCTGTGGATTCT
GGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCT
ATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCTCGGAGCTTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGCGAG
ATCACCAGAACAACCCTGCAGAGCGACCAAGAGGAAATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGGAGATTTCGACATCTACGACGA
GGACGAGAATCAGAGCCCCCAGAAGCTTTCAGAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAGCAGCC
CTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTG
TATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTGGGCCCTTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAG
CCGGCCTTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAGAAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTA
AGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAG
GACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTGTGCCACACCAACACTGAACCCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCT
GTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCA
CCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTAT
CTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAGAGGAGTACAAAATGGCCCTGTA
CAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAATGCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGAATGTCTGATTGGAGAGCACCCTCCACGCCG
GAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGC
CAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGA
CCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCC
TGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACAGCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATC
TTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAA
CAGCTGCTCTATGCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCC
CCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACC
ATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACAGGGCGTCAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAGAGTTCCTGATCTCCAGCAGCCAGGACGGCCATCA
GTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAGGTGTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAACTCTCTGGACCCTCCACTGCTGA
CCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGCACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATT
AAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCAT
TTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAA

[0781]

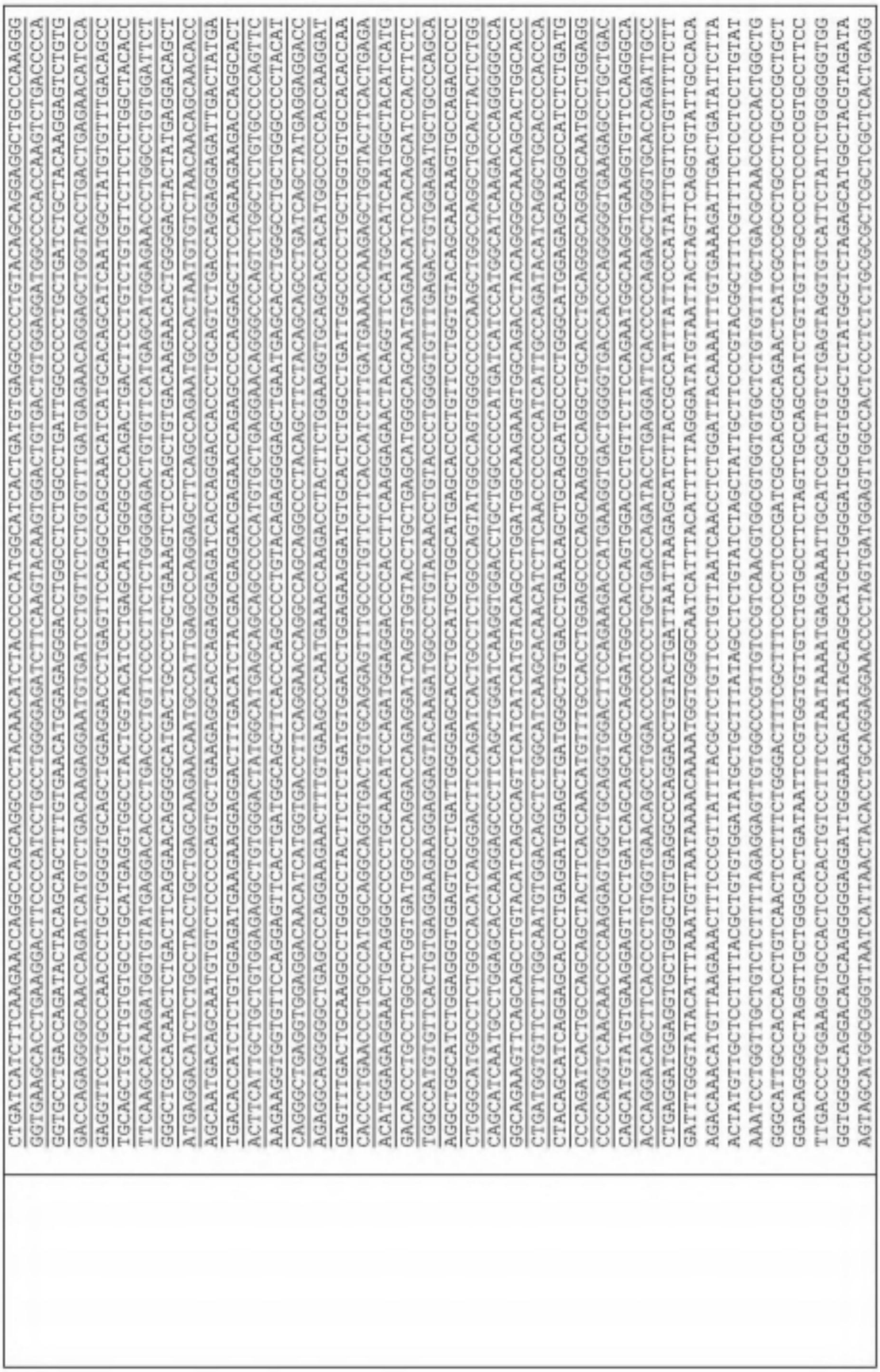


TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGT
ATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAA
CGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCT
CCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATGAATTCCGTGGTGTTGTCTGTGC
CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAA
ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC
TGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGT
GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCAGCAGGCTCCCTCAGTGAGCGAGCGA
GCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAG
GTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA
TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTT
ATCATGTCTGGATCTGATCACTGATATCGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTAATTTTCGTATT
AGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCCTCCCAGTTCCCAACTATTT
TGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCT
CTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGA
CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTT
TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTC
GACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAA
TAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAA
AAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCC
CCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTAT
GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATG
CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATG
ATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAA
CCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACT
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTG
CTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACG
GGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATA
TATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT
TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAA
CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
CCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGAC
TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCT
TTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGAC
CGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCG

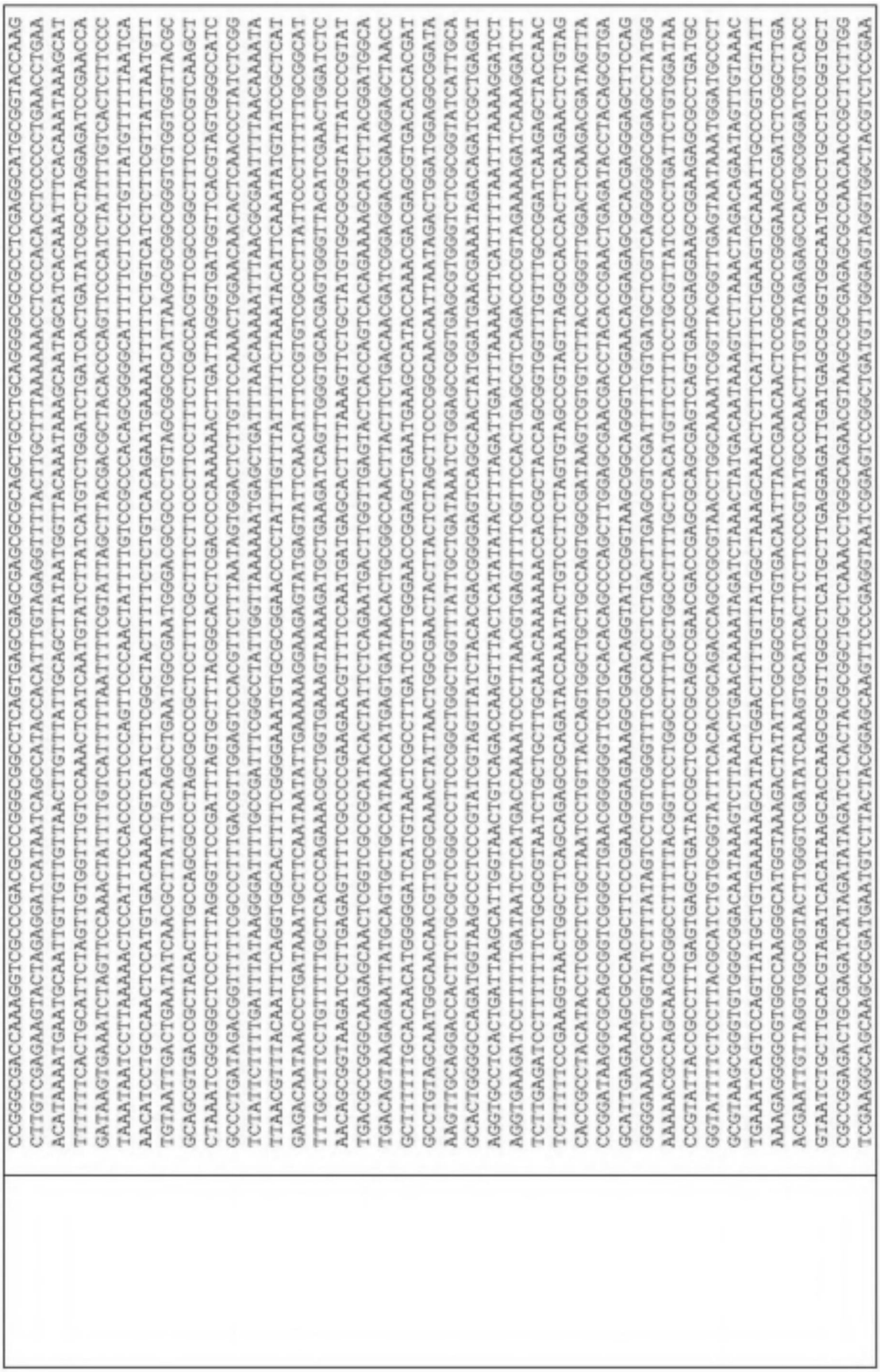
[0782]

	CGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGAT
	CTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGG
	CTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTG
	ACAATTTACCGAACAACTCCGCCCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCT
	TCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATG
	CTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAA
	ACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGG
	TAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGG
	GCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACA
	TCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACA
	AGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTAC
	GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTT
	CTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGA
	TCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGTGCGTCCGTTGCTGGTGGTCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGG
	AAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAA
	TGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAACCTATAAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCA
	CCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAG
	GGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGA**CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTC**
	TGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAA
	TAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCA
	CACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACT
	TTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCCAGGAG
	ATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGA
	GCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATG
	GGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGG
	GGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACA
	CCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGAC
	CTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCTCCTGCTTTTGC
	TGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACA
	CTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAG
	GTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGAC
	CCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTG
	AGGAGCCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGAC
	AACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGC
	CCCCCTGGTGCTGGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAAGGTCAGGTTCA
	TGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTG

[0783]



[0784]

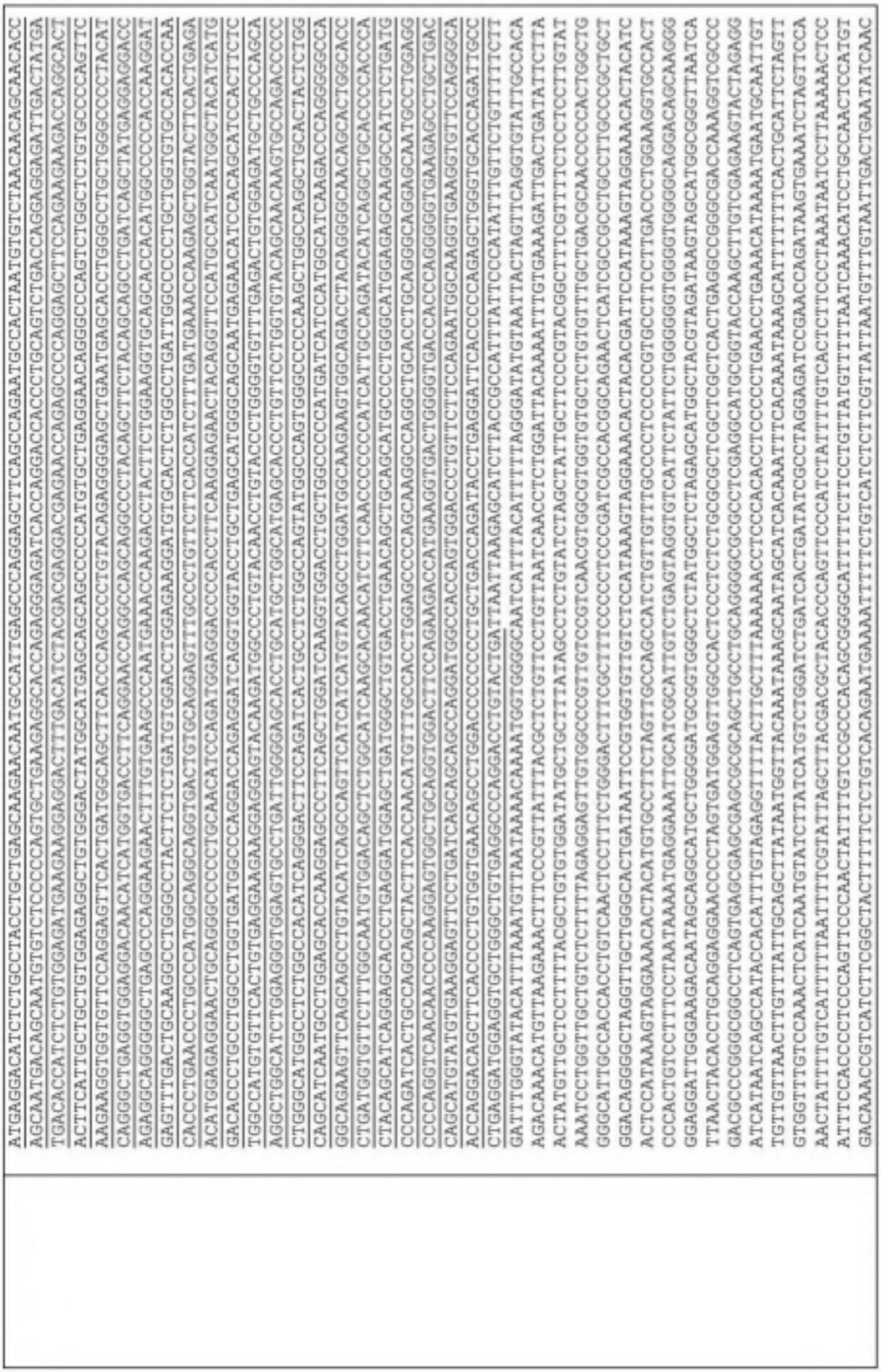


CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAG
CTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAA
ACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCAT
TTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGATGCCTAGGAGATCCGAACCA
GATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCC
TAAATAATCCTTATAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATTTTTAATCA
AACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTGTTATTAATGTT
TGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATC
GCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
TCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATA
TTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCAT
TTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT
TGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCA
TGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC
GCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT
GCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATA
AAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA
GCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGAT
AGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCT
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTA
CCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA
GCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGG
AAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGC
GGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCT
GCGTAAGCGGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAAC
TGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATT
AAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGA
ACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACC
GTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCT
CGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACACCGCTTCTTGG
TCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAA

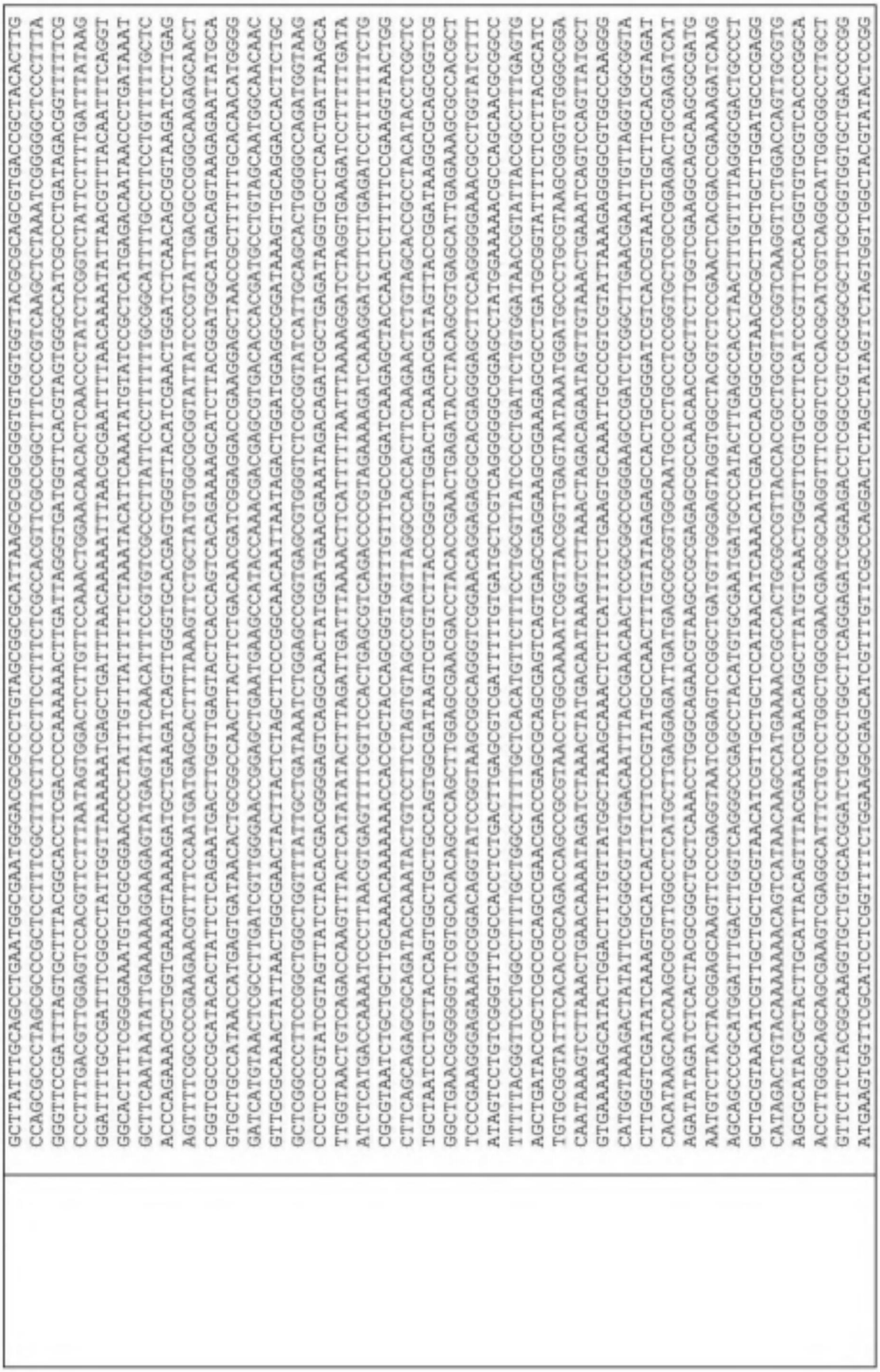
[0785]

	CTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACT
	TTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGC
	TTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCA
	AGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCGTTTC
	CACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCG
	TCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCT
	TGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGT
	GGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAAAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACA
	GTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGAGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCAC
	CATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGA**CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTC**
	TGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAA
	TAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCA
	CACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGTTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACT
	TTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAG
	ATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGA
	GCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGGATG
	GGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGG
	GGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACA
	CCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGAC
	CTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGC
	TGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACA
	CTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCCACCCTGAG
	GTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGAC
	CCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTG
	AGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGAC
	AACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGC
	CCCCCTGGTGCTGGCCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCA
	TGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTG
	CTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCCTGTACAGCAGGAGACTGCCCAAGGGG
	GGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCA
	GGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTG
	GACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCA
	GAGGTTCCTGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCC
	TGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTTTCTTCTGGCTACACC
	TTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCT
	GGGCTGCCACAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCT

[0786]



[0787]

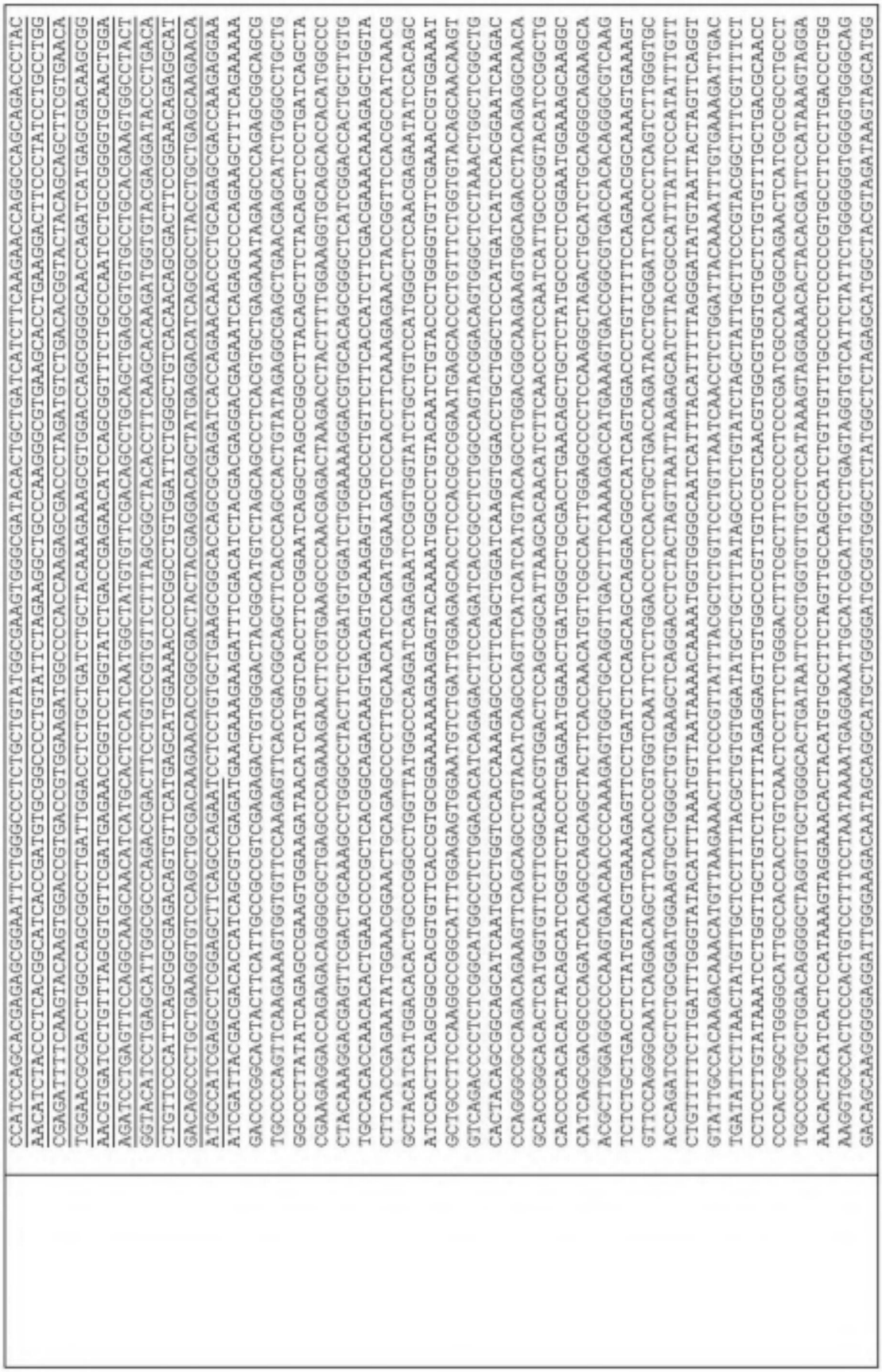


GCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA
GGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAG
GGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTC
ACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG
AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACT
CGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCA
GTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGG
GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGC
GCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG
CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
TTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA
ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTG
CGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGG
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC
TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCG
GGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTT
ATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCC
TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG
AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATC
TGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGA
CAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCT
GTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGCCAAGGG
CATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTA
CTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGAT
CACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCAT
AGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATG
AATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAG
AGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCT
GCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGG
CATAGACTGTAACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTG
AGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCA
ACCTTGGGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCT
GTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCTGGTTGTCTGACCCGG
ATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGG

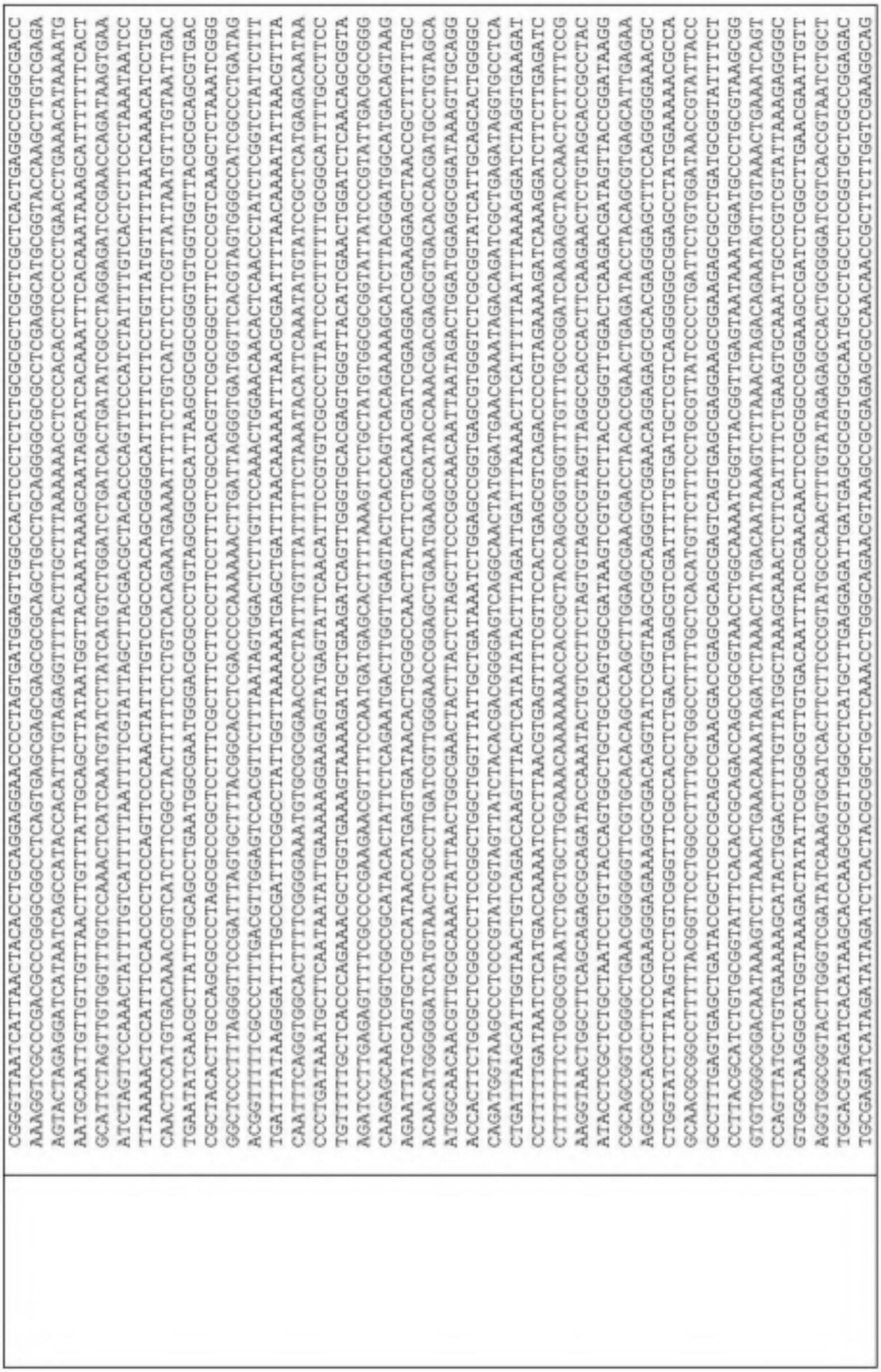
[0788]

ceDNAFVIII载体21 (SEQ ID NO: 212)	AATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTA
	TAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGAT
	ATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGAGCGGCCGCTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCT
	ATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT
	CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCA
	ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
	AGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTA
	CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG**TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCC**
	CCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATTTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGG
	GCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCT
	ATAAAAAGCGAAGCGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCGCCTCGCGCCCCGGCTCTG
	ACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGT
	GGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGTGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGCTGGGGAGCGCCGCC
	GTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG
	TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGC
	TGTAACCCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCC
	GGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCCGGCCCCCGGAGCGCCG
	GCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG
	AAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTC
	GCCGCGCCGCCGTCCCTTCTCCCTTCTCCTCTCCAGCCTCGGGGGCTGTCCGCGGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACAGGGCGGGGTTCGGCTTCT
	GGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATCGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTC
	CATCATTTGTCGACAGAATTCCTCGAAGATCCGAAGGGGTTCAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCAGTTTAAACGCCGCCACGCCATGCAG
	ATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGCTTCAGCGCCACCAGAAGATATTACCTGGGCGCCGTGGAACTGAGCTGGGACTA
	CATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCCGTGGACGCTAGATTTCCTCCAAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAA
	CCCTGTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAATATCGCCAAGCCTCGGCCTCCTTGGATGGGACTGCTGGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTAC
	GACACCGTGGTCATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCATCCTGTGTCTCTGCACGCCGTGGGAGTGTCTTATTGGAAGGCTTCTGAGGGCGCCGAGTA
	CGACGATCAGACAAGCCAGAGAGAGAAAGAGGACGACAAGGTTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAAAACGGCCCTA
	TGGCCTCCGATCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTGAATTCTGGCCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGT
	AGAGAAGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACACTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTCGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGAC
	AAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCCTCTGCTAGAGCTTGGCCTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCTGGAC
	TGATCGGCTGCCACAGAAAGTCCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACAACACCTGAGGTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGCCACACCTTCCTC
	GTGCGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCTCAGACCCTGCTGATGGATCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTG
	CCACATCAGCTCCCACCAGCACGATGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCCGAAGAACCCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAG
	CCGAGGACTACGACGACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTCGTCAGATTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCACGAAGCGTGGCC
	AAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCTCCTCTGGTGCTGGCCCCTGACGACAGAAGCTACAA
	GAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACCTTCAAGACCAGAGAGG

[0789]

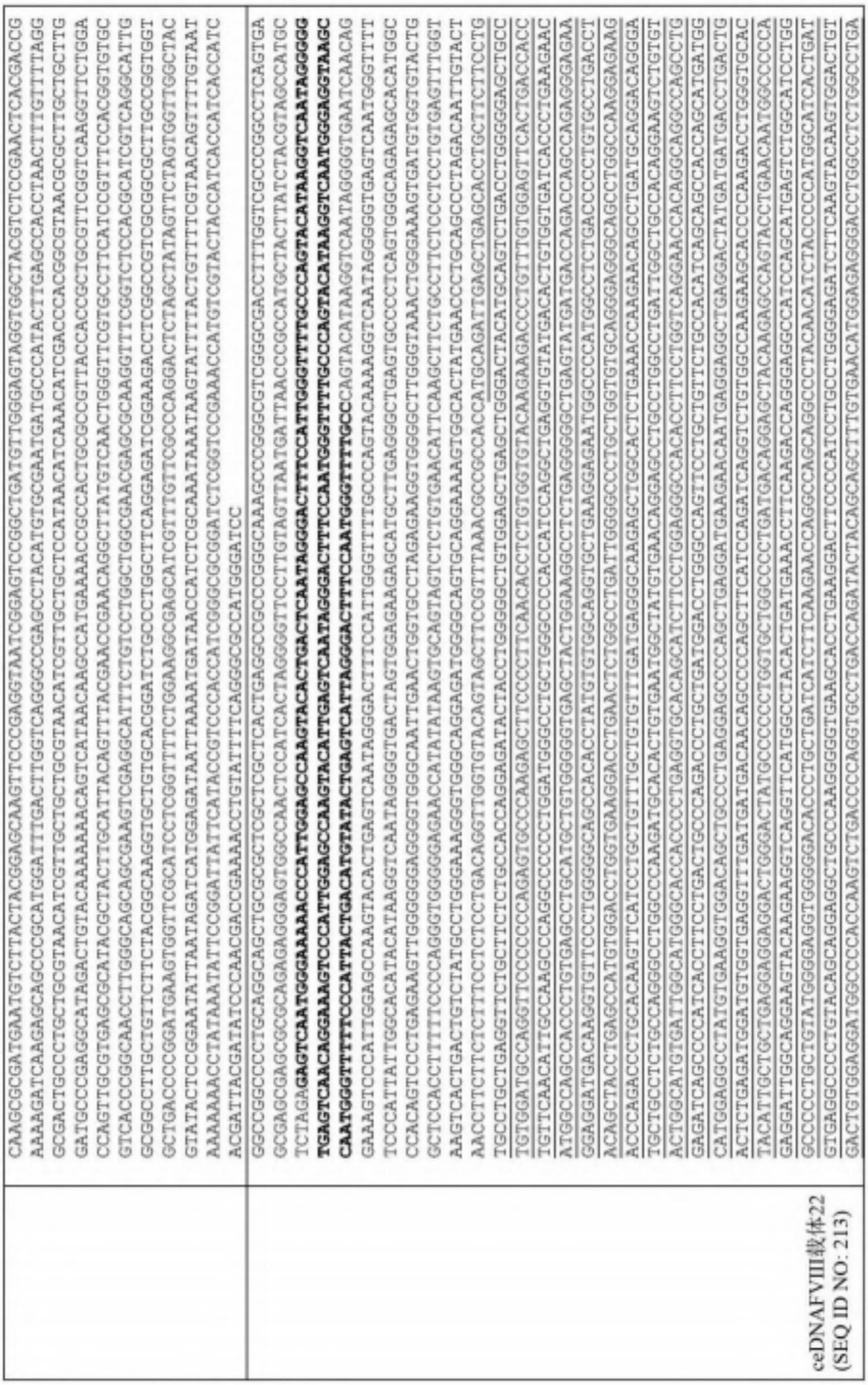

CCATCCAGCACGAGAGCCGGAAATTCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCCGAAGTGGGCGATACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTAC
AACATCTACCCTCACGGCATCACCGATGTGCGGCCCCTGTATTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTATCCTGCCTGG
CGAGATTTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCTAGATGTCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACA
TGGAACGCGACCTGGCCAGCGGCCTGATTGGACCTCTGCTGATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGG
AACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAATCCTGCCGGGGTGCAACTGGA
AGATCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAAGTGGCCTACT
GGTACATCCTGAGCATTGGCGCCCAGACCGACTTCCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGATACCCTGACA
CTGTTCCCATTCAGCGGCGAGACAGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGTCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCAT
GACAGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACA
ATGCCATCGAGCCTCGGAGCTTCAGCCAGAATCCTCCTGTGCTGAAGCGGCACCAGCGCGAGATCACCAGAACAACCCTGCAGAGCGACCAAGAGGAA
ATCGATTACGACGACACCATCAGCGTCGAGATGAAGAAGGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAATCAGAGCCCCAGAAGCTTTCAGAAAAA
GACCCCGGCACTACTTCATTGCCGCCGTCGAGAGACTGTGGGACTACGGCATGTCTAGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAATAGAGCCCAGAGCGGCAGCG
TGCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCCAAGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCACTGTATAGAGGCGAGCTGAACGAGCATCTGGGCCTGCTG
GGCCCTATATCAGAGCCGAAGTGGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCTAGCCGGCCTTCACAGCTCCCTGATCAGCTA
CGAAGAGGACCAGAGACAGGGCGCTGAGCCCAGAAGAACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCC
CTACAAAGGACGAGTTCGACTGCAAAGCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACAGCGGGCTCATCGGACCACTGCTTGTG
TGCCACACCAACACACTGAACCCGCTCACGGCAGACAAGTGACAGTGCAAGAGTTCGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTA
CTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTGCAGAGCCCCTTGCAACATCCAGATGGAAGATCCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACG
GCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCTGGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATATCCACAGC
ATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGCGGAAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAATCTGTACCCTGGGGTGTTCGAAACCGTGGAAAT
GCTGCCTTCCAAGGCCGGCATTTGGAGAGTGGNATGTCTGATTGGAGACACCTCCACGCCGGNAATGAGCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGT
GTCAGACCCCTCTCGGCATGGCCTCTGGACACATCAGAGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTACGGACAGTGGGCTCCTAAACTGGCTCGGCTG
CACTACAGCGGCAGCATCAATGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGAC
CCAGGGCGCCAGACAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGAGGCAACA
GCACCGGCACACTCATGGTGTTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCTCCAATCATTGCCCGGTACATCCGGCTG
CACCCCACACACTACAGCATCCGGTCTACCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCTCTATGCCCCCTCGGAATGGAAAGCAAGGC
CATCAGCGACGCCCAGATCACAGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACTTGGAGCCCCCTCCAAGGCTAGACTGCATCTGCAGGGCAGAAGCA
ACGCTTGGAGGCCCCAAGTGAACAACCCCAAAGAGTGGCTGCAGGTTGACTTTCAAAAGACCATGAAAGTGACCGGCGTGACCACACACAGGGCGTCAAG
TCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCCTGATCTCCAGCAGCCAGGACGGCCATCAGTGGACCCTGTTTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAAGT
GTTCCAGGGCAATCAGGACAGCTTCACACCCGTGGTCAATTCTCTGGACCCTCCACTGCTGACCAGATACCTGCGGATTCACCCTCAGTCTTGGGTGC
ACCAGATCGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGCTGTGAAGCTCAGGACCTCTACTAGTTAATTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTT
CTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGT
GTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGAC
TGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCT
CCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCC
CCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTTCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCT
TGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTTGTCTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGA
AACACTACATCATCCACATAAAGTAGGAAACACTACATGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG
AAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG
GACAGCAAGGGGGAGGATTGTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGG

[0790]



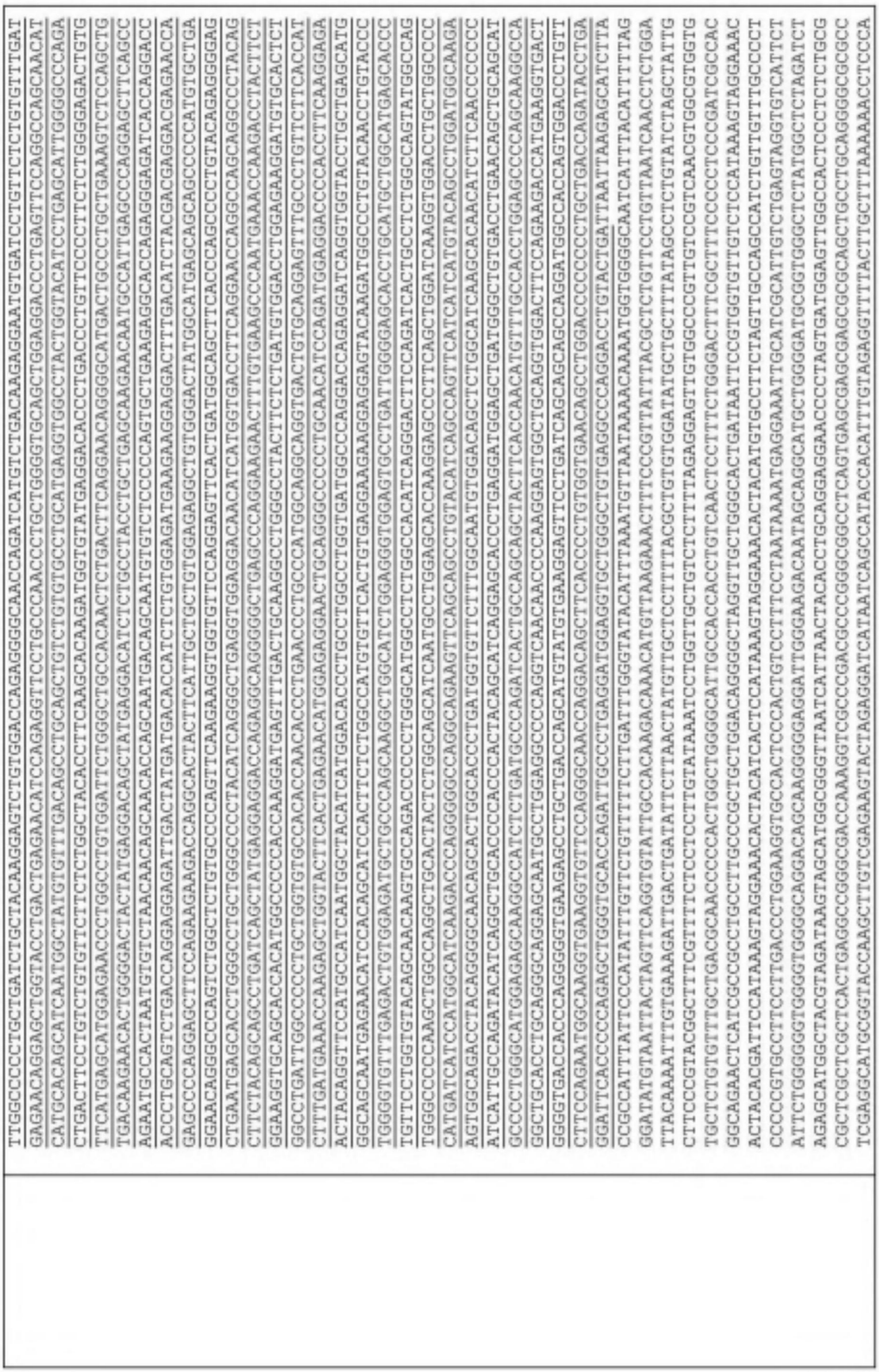
CGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCGCCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGTCGAGA
AGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATG
AATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGATCGCTTCGAACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCT
ATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCC
TTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGC
CAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTCTCCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTGAC
TGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGG
GGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAG
ACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTT
TGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTA
CAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCC
TGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTA
AGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG
CAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG
AGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
ACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCA
ATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGG
ACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGC
CAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCA
CTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGAT
CCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC
CTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAA
AGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC
CTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA
GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC
GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCT
CCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCGCCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGG
GTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGT
CCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGC
GTGGCCAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTT
AGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCT
TGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGAC
TGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAG

[0791]

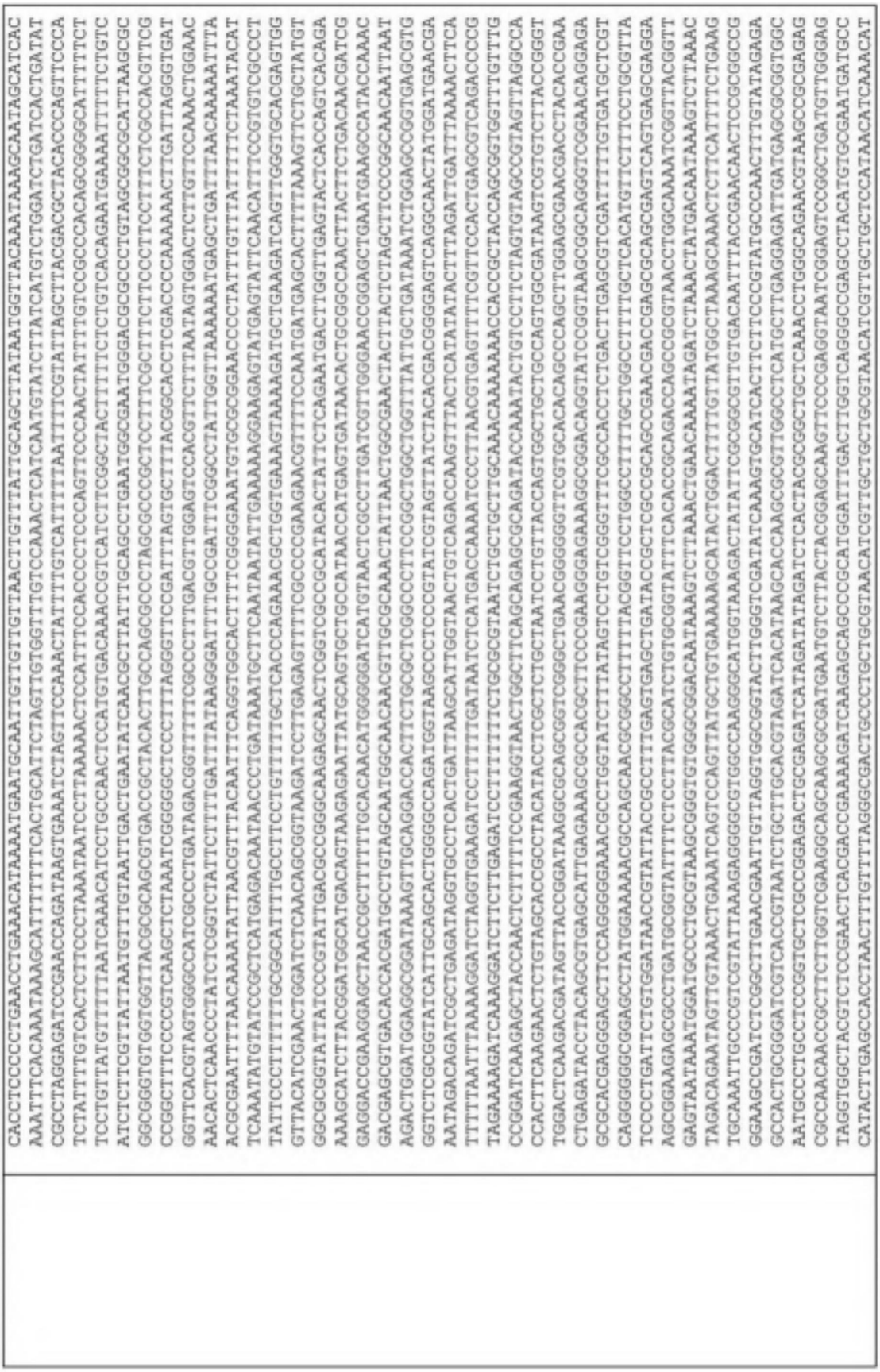


ceDNAFVIII载体22 (SEQ ID NO: 213)

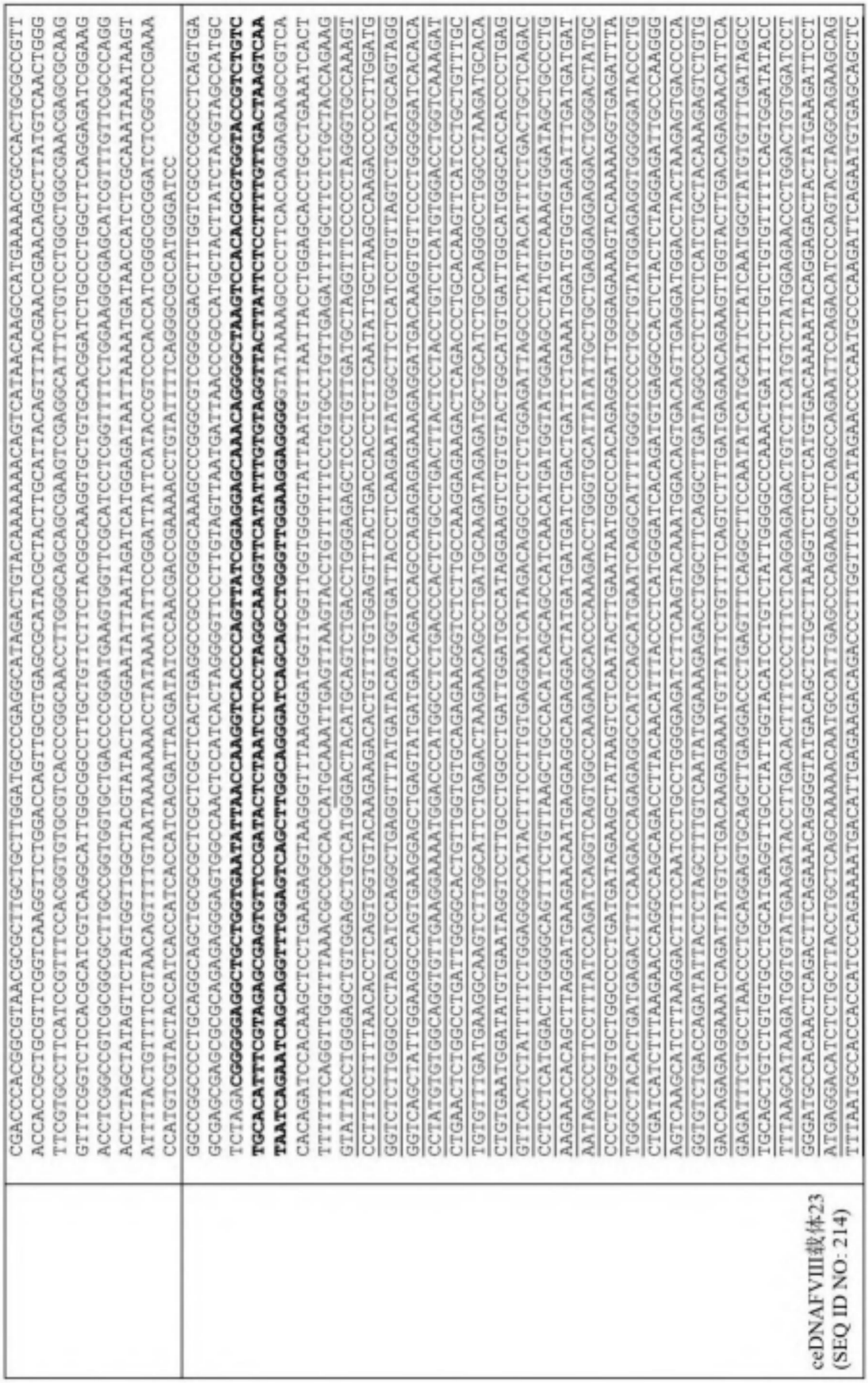
[0792]



[0793]

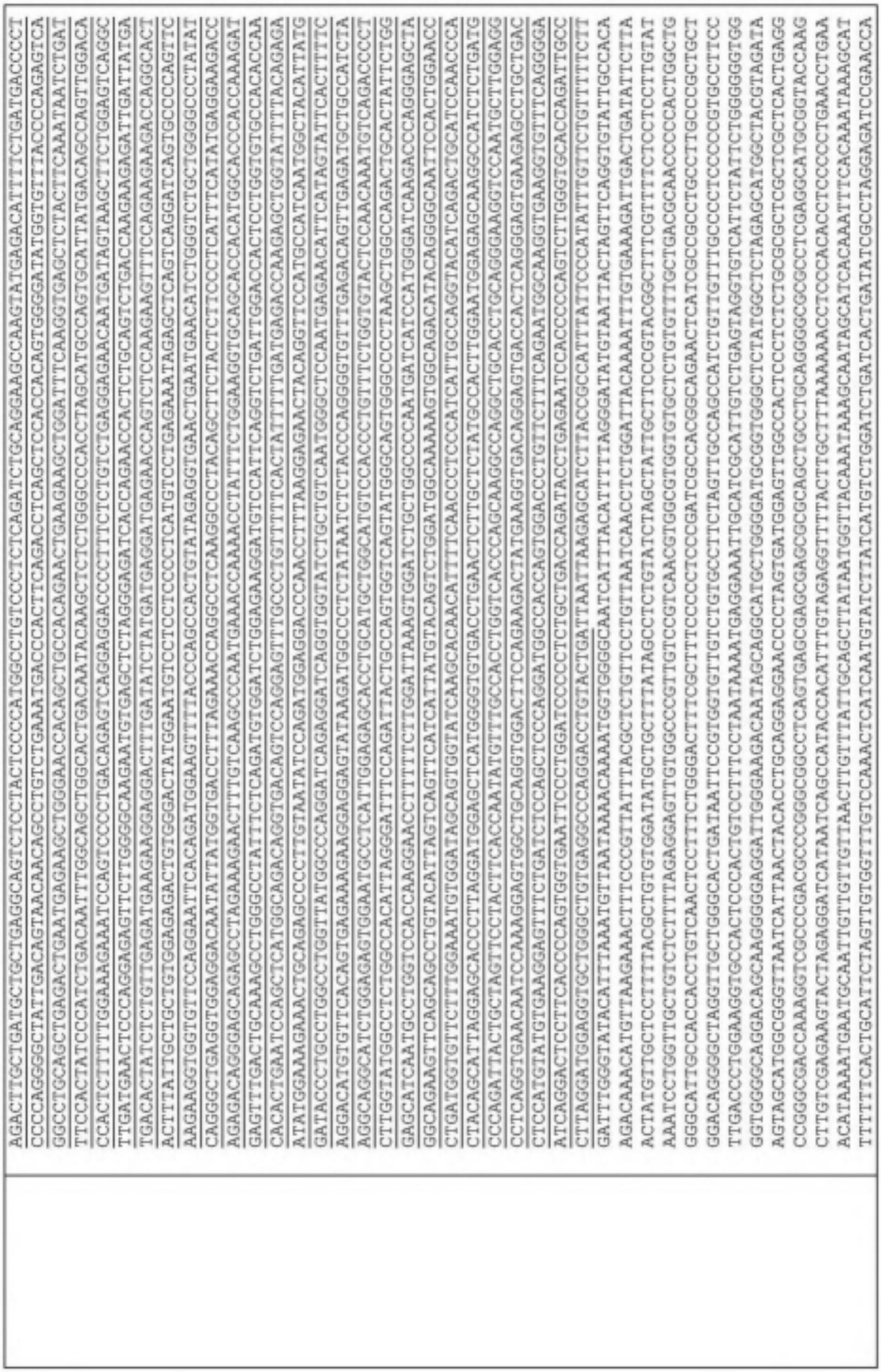


[0794]

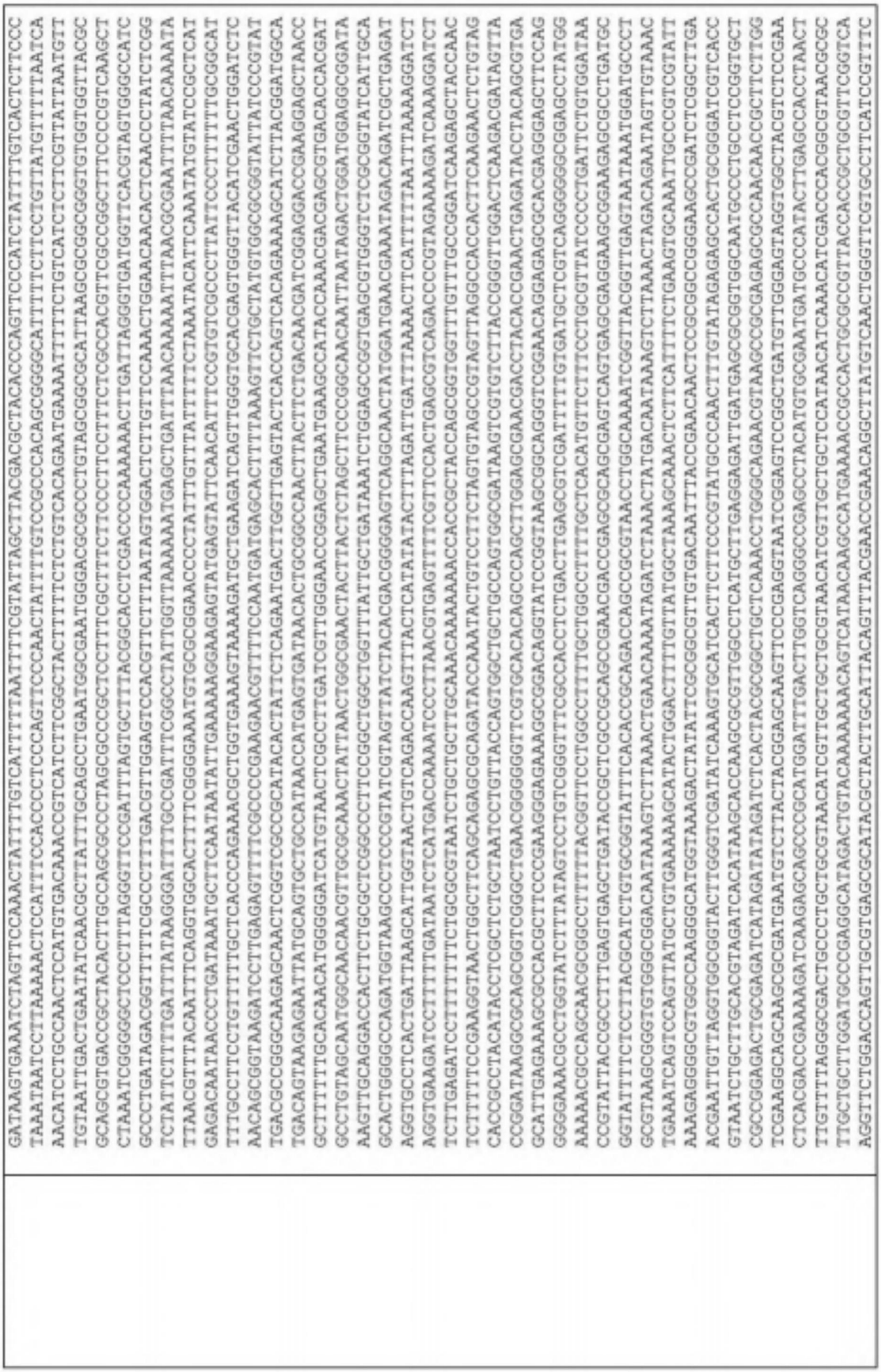


	CGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTT
	ACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGG
	TTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAG
	GTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAG
	ACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTGTTCGCCCAGG
	ACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGT
	ATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAA
	CCATGTCGTACTACCATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGA**CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGACAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTC**
	TGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAA
	TAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCA
	CACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACT
	TTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGCCACCATGCAAATTGAGTTAAGTACCTGTTTTTTCCTGTGCCTGTTGAGATTTTGCTTCTCTGCTACCAGAAG
	GTATTACCTGGGAGCTGTGGAGCTGTCATGGGACTACATGCAGTCTCGACCTGGGAGACGCTCCCTGTTGATGCTAGGTTTCCCCCTAGGGTGCCAAAGT
	CCTTTCCTTTTAACACCTCAGTGGTGTACAAGAAGACACTGTTTGTGGAGTTTACTGACCACCTCTTCAATATTGCTAAGCCAAGACCCCCTTGGATG
	GGTCTCTTGGGCCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTGATTACCCTCAAGAATATGGCTTCTCATCCTGTTAGTCTGCATGCAGTAGG
	GGTCAGCTATTGGAAGGCCAGTGAAGGAGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGAGAAAGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGATCACACA
	CCTATGTGTGGCAGGTGTTGAAGGGAAAATGGACCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACTTACTCCTACCTGTCTCATGTGGACCTGGTCAAAGAT
	CTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCACTGTTGGTGTGCAGAGAAGGGTCTCTTGCCAAGGAGAAGACTCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGC
	TGTGTTTGATGAAGGCAAGTCTTGGCATTCTGAGACTAAGAACAGCCTGATGCAAGATAGAGATGCTGCATCTGCCAGGGCCTGGCCTAAGATGCACA
	CTGTGAATGGATATGTGAATAGGTCCTTGCCTGGCCTGATTGGATGCCATAGGAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACACCCCTGAG
	GTTCACTCTATTTTTCTGGAGGGCCATACTTTCCTTGTGAGGAATCATAGACAGGCCTCTCTGGAGATTAGCCCTATTACATTCTGACTGCTCAGAC
	CCTCCTCATGGACTTGGGGCAGTTTCTGTTAAGCTGCCACATCAGCAGCCATCAACATGATGGTATGGAAGCCTATGTCAAAGTGGATAGCTGCCCTG
	AAGAACCACAGCTTAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCAGAGGACTATGATGATCTGACTGATTCTGAAATGGATGTGGTGAGATTTGATGATGAT
	AATAGCCCTTCCTTTATCCAGATCAGGTCAGTGGCCAAGAAGCACCCAAAGACCTGGGTGCATTATATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGC
	CCCTCTGGTGCTGGCCCCTGATGATAGAAGCTATAAGTCTCAATACTTGAATAATGGCCCACAGAGGATTGGGAGAAAGTACAAAAAGGTGAGATTTA
	TGGCCTACACTGATGAGACTTTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCATGAATCAGGCATTTTGGGTCCCCTGCTGTATGGAGAGGTGGGGGATACCCTG
	CTGATCATCTTTAAGAACCAGGCCAGACCTTACAACATTTACCCTCATGGGATCACAGATGTGAGGCCACTCTACTCTAGGAGATTGCCCAAGGG
	AGTCAAGCATCTTAAGGACTTTCCAATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAATGGACAGTGACAGTTGAGGATGGACCTACTAAGAGTGACCCCA
	GGTGTCTGACCAGATATTACTCTAGCTTTGTCAATATGGAAAGAGACCTGGCTTCAGGCTTGATAGGCCCTCTTCTCATCTGCTACAAAGAGTCTGTG
	GACCAGAGAGGAAATCAGATTATGTCTGACAAGAGAAATGTTATTCTGTTTCAGTCTTTGATGAGAACAGAAGTTGGTACTTGACAGAGAACATTCA
	GAGATTTCTGCCTAACCCTGCAGGAGTGCAGCTTGAGGACCCTGAGTTCAGGCTTCCAATATCATGCATTCTATCAATGGCTATGTGTTTGATAGCC
	TGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTTGCCTATTGGTACATCCTGTCTATTGGGGCCCAAACTGATTTCTTTGTCTGTGTTTTTCAGTGGATATACC
	TTTAAGCATAAGATGGTGTATGAAGATACCTTGACACTTTTCCCTTTCTCAGGAGAGACTGTCTTCATGTCTATGGAGAACCCTGGACTGTGGATCCT
	GGGATGCCACAACTCAGACTTCAGAAACAGGGGTATGACAGCTCTGCTTAAGGTCTCCTCATGTGACAAAAATACAGGAGACTACTATGAAGATTCCT
ceDNAFVIII载体23 (SEQ ID NO: 214)	ATGAGGACATCTCTGCTTACCTGCTCAGCAAAAACAATGCCATTGAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAATTCCAGACATCCCAGTACTAGGCAGAAGCAG
	TTTAATGCCACCACCATCCCAGAAAATGACATTGAGAAGACAGACCCTTGGTTTGCCCATAGAACCCCAATGCCCAAGATTCAGAATGTGAGCAGCTC

[0795]



[0796]

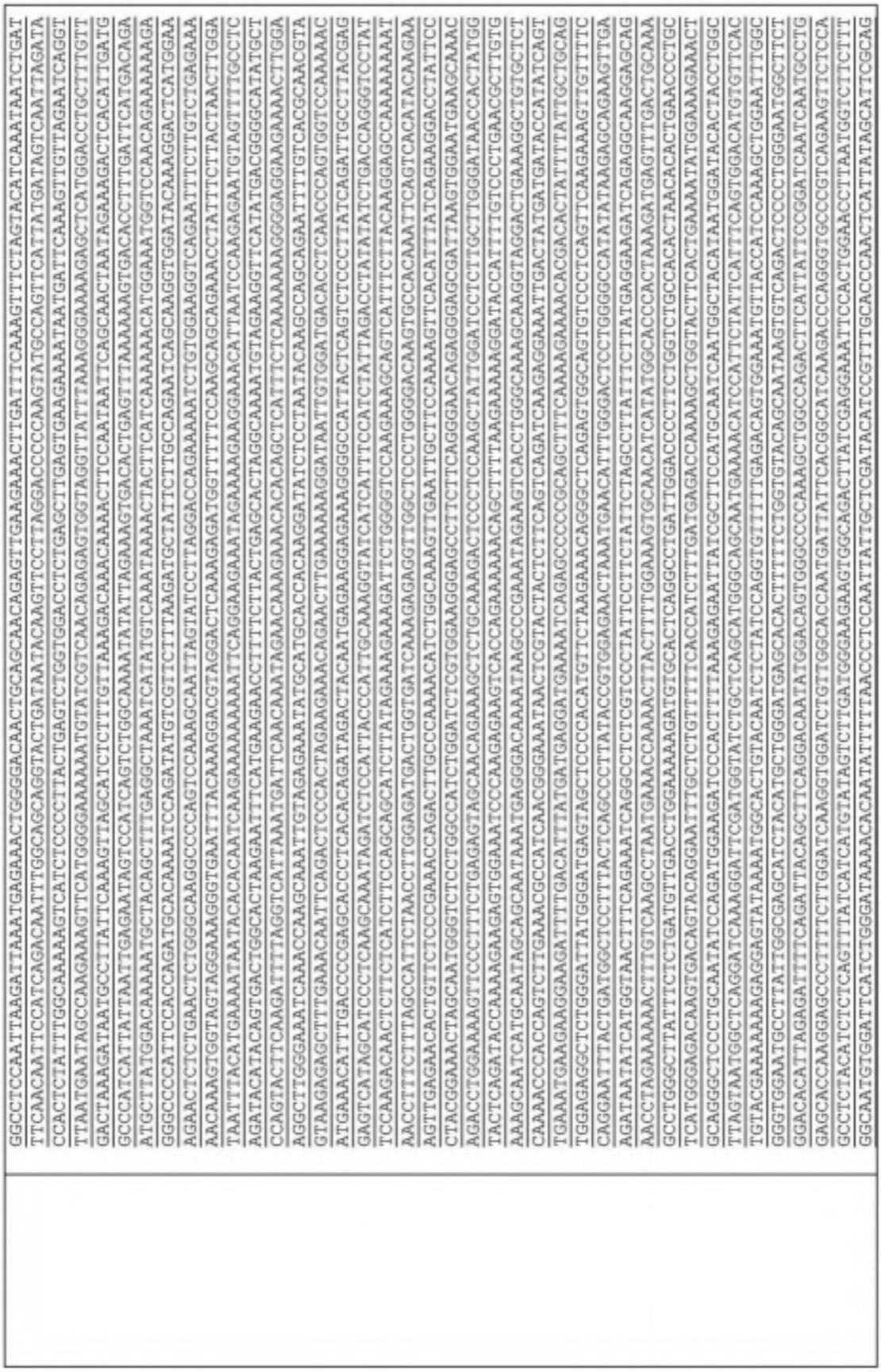

GATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCATTTTTAATTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTGTCACTCTTCCC
TAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACACCCTCCCAACTATTTGTCCGCCCACAGCGGGCATTTTCTTCCTGTTATGTTTTTAATCA
AACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTT
TGTAATTGACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATC
GCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
TCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATA
TTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCAT
TTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT
TGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCA
TGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC
GCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT
GCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATA
AAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA
GCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGAT
AGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCT
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
TCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTA
CCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA
GCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGG
AAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGC
GGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCT
GCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAAC
TGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATT
AAAGAGGGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGA
ACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACC
GTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCT
CGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGG
TCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAA
CTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACT
TTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAACATCGACCCACGGCGTAACGCGC
TTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCA
AGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTC

[0797]

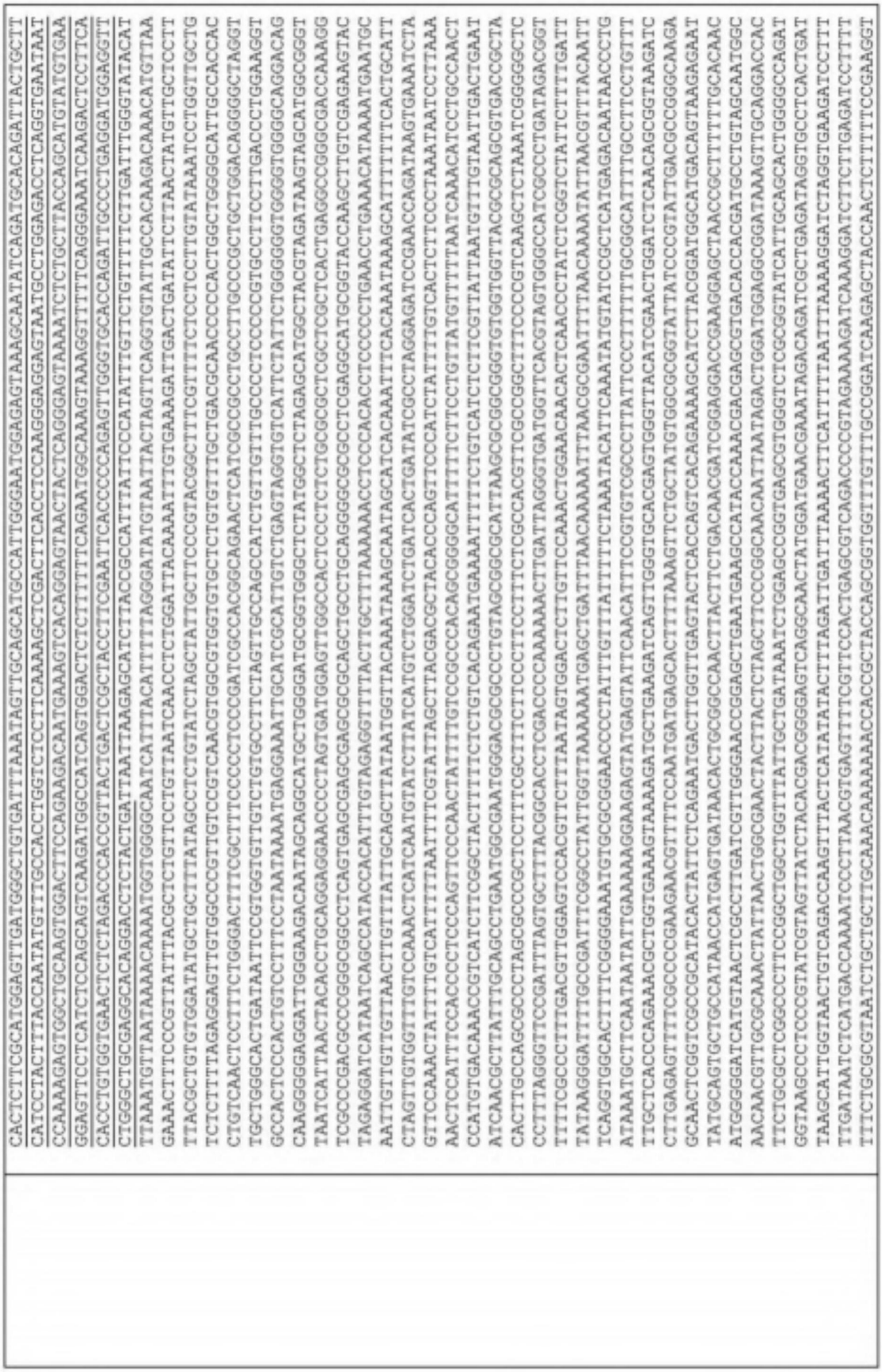
	CACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCG
	TCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCT
	TGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGT
	GGTTGGCTACGTATACTCCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAATATTTTACTGTTTTCGTAACA
	GTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTCGGTCCGAAACCATGTCGTACTACCATCAC
	CATCACCATCACGATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	GGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGA
	GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGC
	TCTAGA**CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGCGTGGTACCGTCTGTC**
	TGCACATTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTTCTCCTTTTGTTGACTAAGTCAA
	TAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCA
	CACAGATCCACACAAGCTCCTGAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACT
	TTTTTTCAGGTTGGTTTAAACGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGAAG
	ATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTCCTCCTAGAGTGCCAAAAT
	CTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATG
	GGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGG
	TGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATA
	CATATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTTCTCATGTGGACCTGGTAAAGAC
	TTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATACTACTTTTTGC
	TGTATTTGATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACA
	CAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAA
	GTGCACTCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTCTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTCCTACTGCTCAAAC
	ACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTTCCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAG
	AGGAACCCCAACTACGAATGAAAATATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATTCTGATTCTTACTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGATGATGAC
	AACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGC
	TCCCTTAGTCCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAAGTCCGATTTA
	TGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTG
	TTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCTTTGTATTCAAGGAGATTACCAAAAGG
	TGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTC
	GGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTA
	GATCAAAGAGGAAACCAGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACA
	ACGCTTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGATAGTT
	TGCAGTTGTCAGTTTGTTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTCTGGATATACC
	TTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCTATTCCCATTCTCAGGAGAAAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCT
	GGGGTGCCACAACTCAGACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTT
	ATGAAGATATTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCCTAGCACTAGGCAAAAGCAA
	TTTAATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTGGTTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTAG
	TGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTATCCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGATCCAT
	CACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACACACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCCTGAGTCA

ceDNAFVIII载体24 (SEQ ID NO: 215)

[0798]



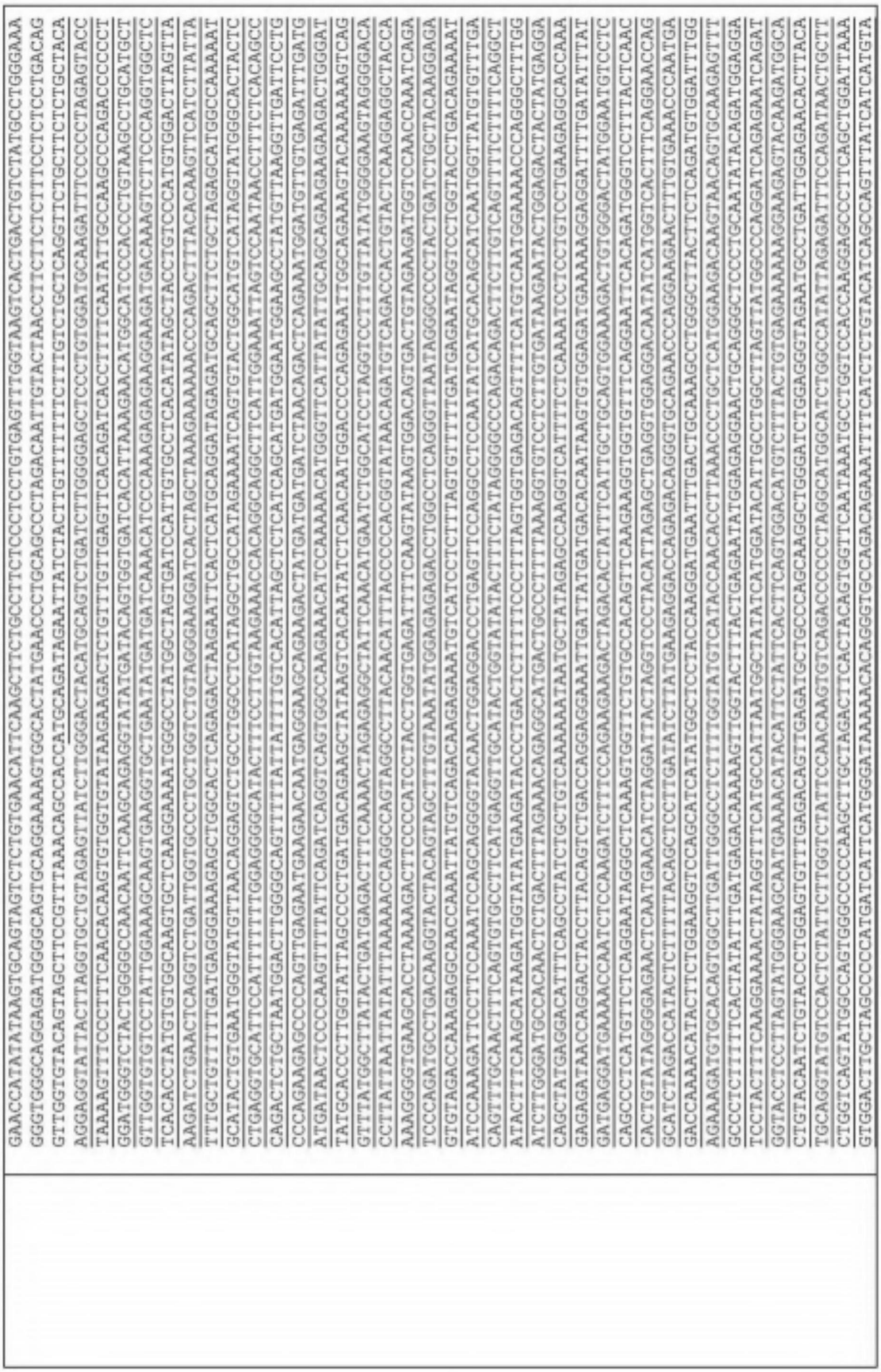
[0799]



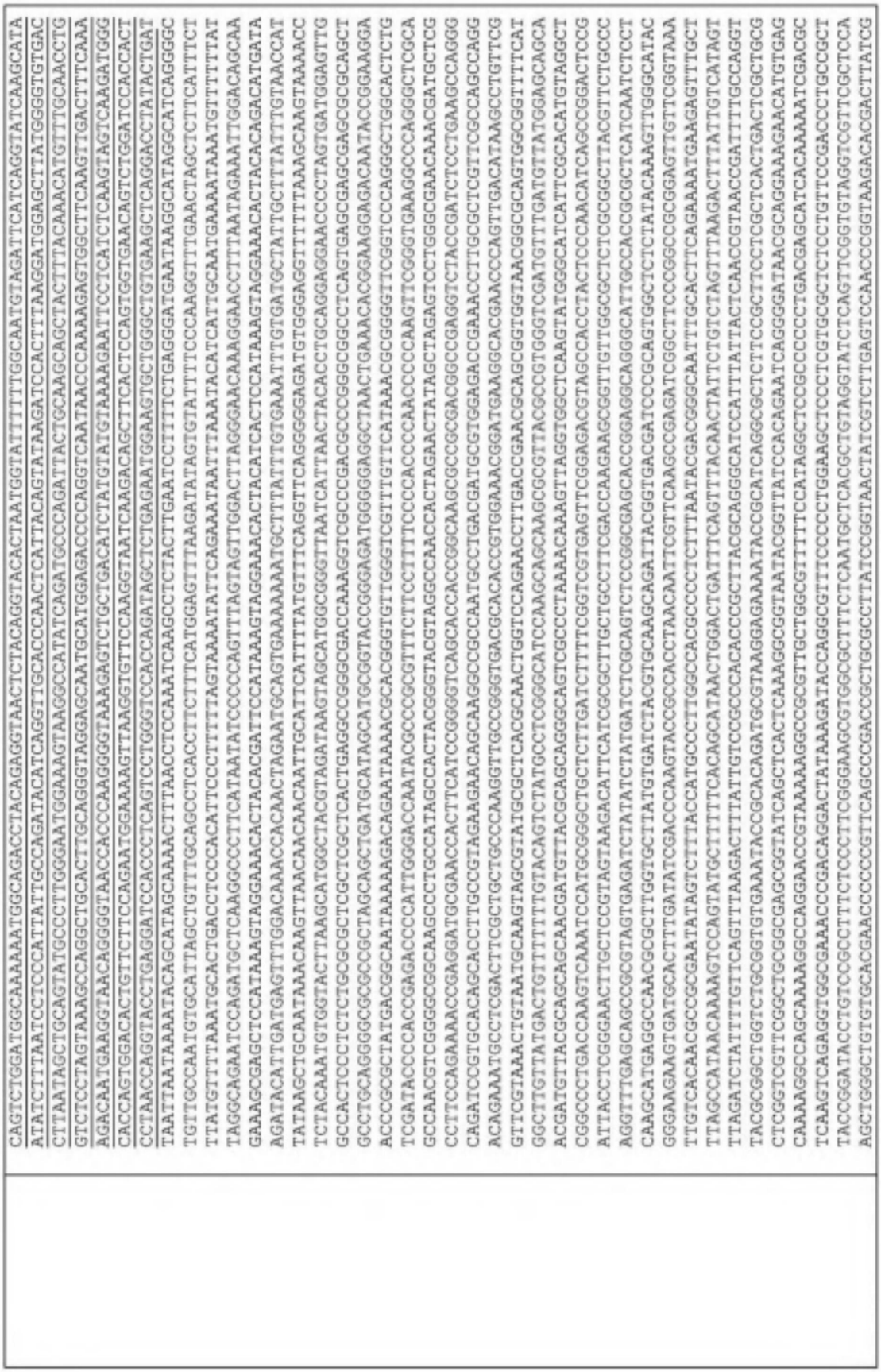
[0800]

	AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC
	TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAG
	CGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGC
	CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT
	ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
	GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTT
	TGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTA
	CGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTG
	GGCGGACAATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGACAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGT
	TATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTTATGGCTAAAGCAAACTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAGGGGCGTGGC
	CAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTG
	GCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCAC
	GTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGA
	GATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGC
	GCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAG
	ATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTGTTTTTAGGGCGAC
	TGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGC
	CCGAGGCATAGACTGTACAAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGT
	TGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCAC
	CCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGC
	CTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTCGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGA
	CCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTCTGGAAGGCGAGCATCGTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACGTATA
	CTCCGGAATATTAACGTTACACCATTTTCATGCCAGAACGAAGAAGCGCGATCACATGTCATCCGCATTGATCCTAAGCAGAATTGATCTGATAAAAAA
	AACCTATAAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGAGTCGGTCCCGAAACCATGTCGTACTACCATCACCATCACCATCACGAT
	TACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCC
	AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAAT
	AGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATATATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATA
	CGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCTCAAGCAGTGATCAGATCCAGACATGATAAGA
	TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT
	AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCT
	ACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTCTAGTACTTCTCGACAAGCTTGTCGAGACTGCAGGCTCTAGAGGCCGGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGC
	TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG
	CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCATATGGAGTCAATGGAAAAACCCATT
ceDNAFVIII载体25 (SEQ ID NO: 216)	GGAGCCAAGTACACTGACTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGC
	CAAGTACATTGAGTCAATAGGGACTTTCCAATGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTACTGACATGT
	ATACTGAGTCATTAGGGACTTTCCAATGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGCCAAGTACACTG
	AGTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACATAAAAGGTCAATAGGGGGTGAGTCAATGGGTTTTTCCCATTATTGGCACATACATAAGGTCA
	ATAGGGGTGACTAGTGGAGAAGAGCATGCTTGAGGGCTGAGTGCCCCTCAGTGGGCAGAGAGCACATGGCCCACAGTCCCTGAGAAGTTGGGGGGAGG
	GGTGGGCAATTGAACTGGTGCCTAGAGAAGGTGGGGCTTGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTGGTGTACTGGCTCCACCTTTTTCCCCAGGGTGGGGGA

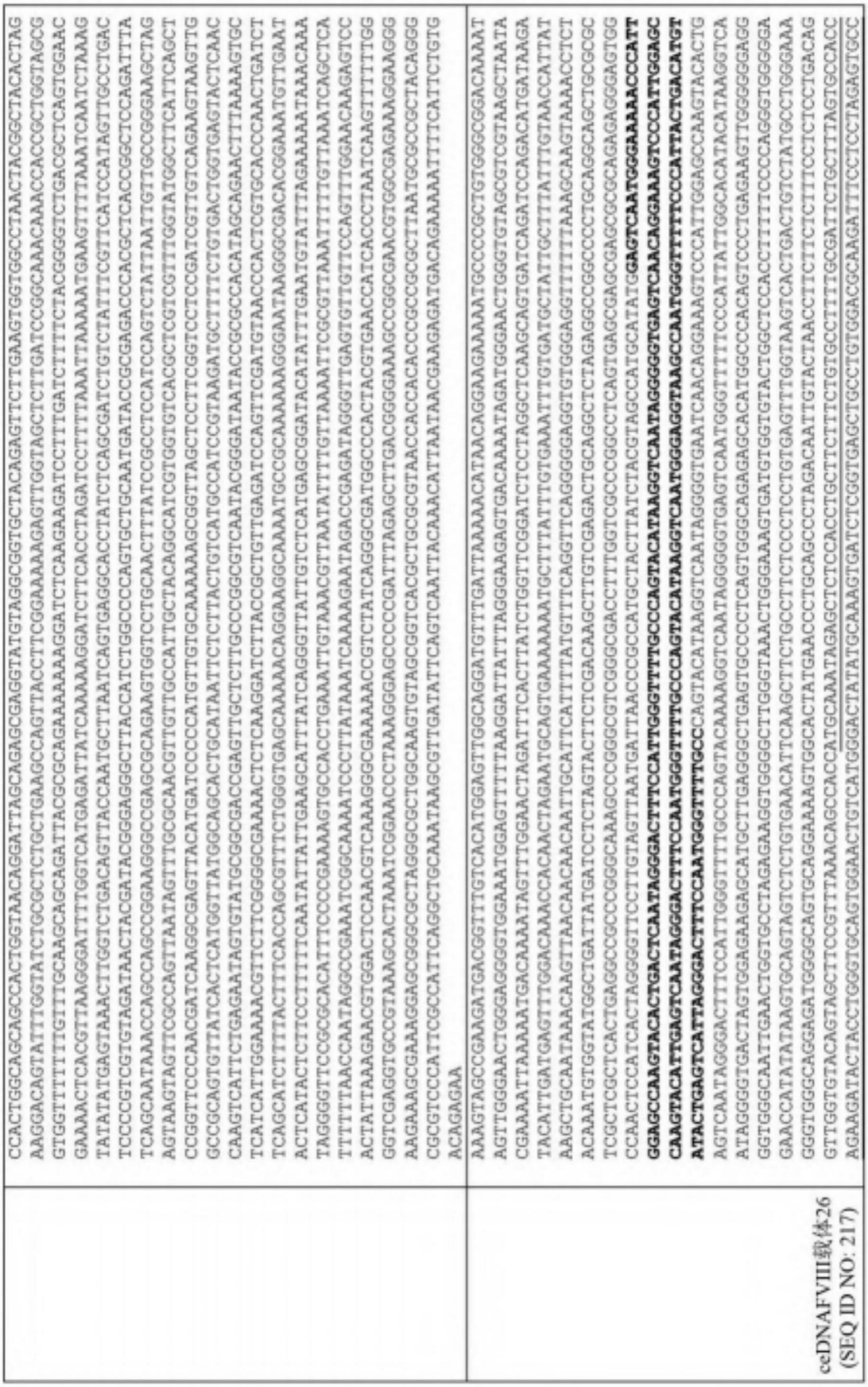
[0801]


GAACCATATAAGTGCAGTAGTCTCTGTGAACATTCAAGCTTCTGCCTTCTCCCTCCTGTGAGTTTGGTAAGTCACTGACTGTCTATGCCTGGGAAA
GGGTGGGCAGGAGATGGGGCAGTGCAGGAAAAGTGGCACTATGAACCCTGCAGCCCTAGACAATTGTACTAACCTTCTTCTCTTTCCTCTCCTGACAG
GTTGGTGTACAGTAGCTTCCGTTTAAACAGCCACCATGCAGATAGAATTATCTACTTGTTTTTTCTTTGTCTGCTCAGGTTCTGCTTCTCTGCTACA
AGGAGGTATTACTTAGGTGCTGTAGAGTTATCTTGGGACTACATGCAGTCTGATCTTGGGGAGCTCCCTGTGGATGCAAGATTTCCCCCTAGAGTACC
TAAAAGTTTCCCTTTCAACACAAGTGTGGTGTATAAGAAGACTCTGTTTGTTGAGTTCACAGATCACCTTTTCAATATTGCCAAGCCCAGACCCCCCT
GGATGGGTCTACTGGGGCCAACAATTCAAGCAGAGGTATATGATACAGTGGTGATCACATTAAGAACATGGCATCCCACCCTGTAAGCCTGCATGCT
GTTGGTGTCCTATTGGAAAGCAAGTGAAGGTGCTGAATATGATGATCAAACATCCCAAAGAGAGAAGGAAGATGACAAAGTCTTCCCAGGTGGCTC
TCACACCTATGTGTGGCAAGTGCTCAAGGAAAATGGGCCTATGGCTAGTGATCCATTGTGCCTCACATATAGCTACCTGTCCCATGTGGACTTAGTTA
AAGATCTGAACTCAGGTCTGATGGTGCCCTGCTGGTCTGTAGGGAAGGATCACTAGCTAAAGAAAAAACCCAGACTTTACACAAGTTCATCTTATTA
TTTGCTGTTTTTGATGAGGGAAAGAGCTGGCACTCAGAGACTAAGAATTCACTCATGCAGGATAGAGATGCAGCTCTGCTAGAGCATGGCCAAAAAT
GCATACTGTGAATGGGTATGTTAACAGGAGTCTGCCTGGCCTCATAGGCTGCCATAGGAAATCAGTGTACTGGCATGTCATAGGTATGGCACTACTC
CTGAGGTGCATTCCATTTTTTTGGAGGGGCATACTTCCTTGTAAGAACCACAGGCAGGCTTCATTGGAAATTAGTCCAATAACCTTCTCACAGCC
CAGACTCTGCTAATGGACTTGGGGCAGTTTTTATATTTTGTCACATTAGCTCTCATCAGCATGATGGAATGGAAGCCTATGTTAAGGTTGATTCCTG
CCCAGAAGAGCCCCAGTTGAGAATGAAGAACAATGAGGAAGCAGAAGACTATGATGATCTAACAGACTCAGAAATGGATGTTGTGTGAGATTTGATG
ATGATAACTCCCCCAAGTTTTATTCAGATCAGGTCAGTGGCCAAGAAACATCCAAAAACATGGGTTCATTATATTGCAGCAGAAGAAGACTGGGAT
TATGCACCCTTGGTATTAGCCCCTGATGACAGAAGCTATAAGTCACAATATCTCAACAATGGACCCCAGAGAATTGGCAGAAAGTACAAAAAAGTCAG
GTTTATGGCTTATACTGATGAGACTTTCAAAACTAGAGAGGCTATTCAACATGAATCTGGCATCCTTAGGTCCTTTGTTATATGGGGAAGTAGGGACA
CCTTATTAATTATATTTAAAAACCAGGCCAGTAGGCCTTACAACATTTACCCCCACGGTATAACAGATGTCAGACCACTGTACTCAAGGAGGCTACCA
AAAGGGGTGAAGCACCTAAAAGACTTCCCCATCCTACCTGGTGAGATTTTCAAGTATAAAGTGGACAGTGACTGTAGAAGATGGTCCAACCAAATCAGA
TCCCAGATGCCTGACAAGGTACTACAGTAGCTTTGTAAATATGGAGAGAGACCTGGCCTCAGGGTTAATAGGGCCCCCTACTGATCTGCTACAAGGAGA
GTGTAGACCAAAGAGGCAACCAAATTATGTCAGACAAGAGAAATGTCATCCTCTTTAGTGTTTTTGATGAGAATAGGTCCTGGTACCTGACAGAAAAT
ATCCAAAGATTCCTTCCAAATCCAGCAGGGGTACAACTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCTCCAATATCATGCCACAGCATCAATGGTTATGTGTTTGA
CAGTTTGCAACTTTCAGTGTGCCTTCATGAGGTTGCATACTGGTATATACTTCTTATAGGGGCCCAGACACAGACTTCTTGTCAGTTTCTTTTCAGGCT
ATACTTTCAAGCATAAGATGGTATATGAAGATACCCTGACTCTTTTTCCCTTTAGTGGTGAGACAGTTTTCATGTCAATGGAAAACCCAGGGCTTTGG
ATCTTGGGATGCCACAACTCTGACTTTAGAAACAGAGGCATGACTGCCCTTTTAAAGGTGTCCTCTTGTGATAAGAATACTGGAGACTACTATGAGGA
CAGCTATGAGGACATTTCAGCCTATCTGCTGTCAAAAAATAATGCTATAGAGCCAAGGTCATTTTCTCAAAATCCTCCTGTCCTGAAGAGGCACCAAA
GAGAGATACCAGGACTACCTTACAGTCTGACCAGGAGGAAATTGATTATGATGACACAATAAGTGTGGAGATGAAAAAGGAGGATTTTGATATTTAT
GATGAGGATGAAAACCAATCTCCAAGATCTTTCCAGAAGAAGACTAGACACTATTTCATTGCTGCAGTGGGAAAGACTGTGGGACTATGGAATGTCCTC
CAGCCCTCATGTTCTCAGGAATAGGGCTCAAAGTGGTTCTGTGCCACAGTTCAAGAAGGTGGTGTTTCAGGAATTCACAGATGGGTCCTTTACTCAAC
CACTGTATAGGGGAGAACTCAATGAACATCTAGGATTACTAGGTCCCTACATTAGAGCTGAGGTGGAGGACAATATCATGGTCACTTTCAGGAACCAG
GCATCTAGACCATACTCTTTTACAGCTCCTTGATATCTTATGAAGAGGACCAGAGACAGGGTGCAGAACCCAGGAAGAACTTTGTGAAACCCAATGA
GACCAAAACATACTTCTGGAAGGTCCAGCATCATATGGCTCCTACCAAGGATGAATTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTACTTCTCAGATGTGGATTTGG
AGAAAGATGTGCACAGTGGCTTGATTGGGCCTCTTTTGGTATGTCATACCAACACCTTAAACCCTGCTCATGGAAGACAAGTAACAGTGCAAGAGTTT
GCCCTCTTTTCACTATATTTGATGAGACAAAAAGTTGGTACTTTACTGAGAATATGGAGAGGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATACAGATGGAGGA
TCCTACTTTCAAGGAAAACTATAGGTTTCATGCCATTAATGGCTATATCATGGATACATTGCCTGGCTTAGTTATGGCCCAGGATCAGAGAATCAGAT
GGTACCTCCTTAGTATGGGAAGCAATGAAAACATACATTCTATTCACTTCAGTGGACATGTCTTTACTGTGAGAAAAAGGAAGAGTACAAGATGGCA
CTGTACAATCTGTACCCTGGAGTGTTTGAGACAGTTGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGGATCTGGAGGGTAGAATGCCTGATTGGAGAACACTTACA
TGCAGGTATGTCCACTCTATTCTTGGTCTATTCCAACAAGTGTCAGACCCCCCTAGGCATGGCATCTGGCCATATTAGAGATTTCCAGATAACTGCTT
CTGGTCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTTGCTAGACTTCACTACAGTGGTTCAATAAATGCCTGGTCCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATTAAA
GTGGACTTGCTAGCCCCCATGATCATTCATGGGATAAAAACACAGGGTGCCAGACAGAAATTTCATCTCTGTACATCAGCCAGTTTATCATCATGTA

[0802]

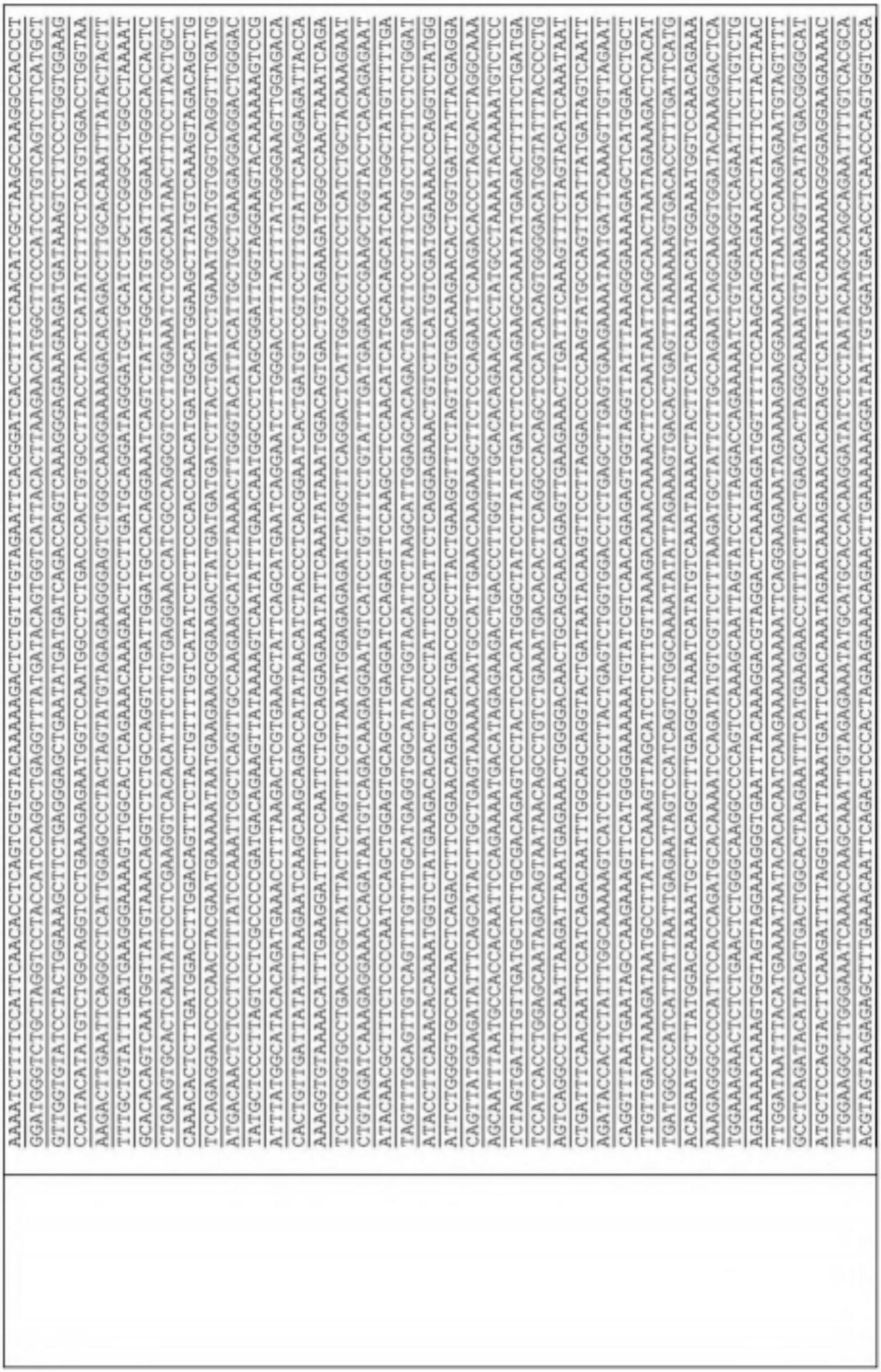


[0803]

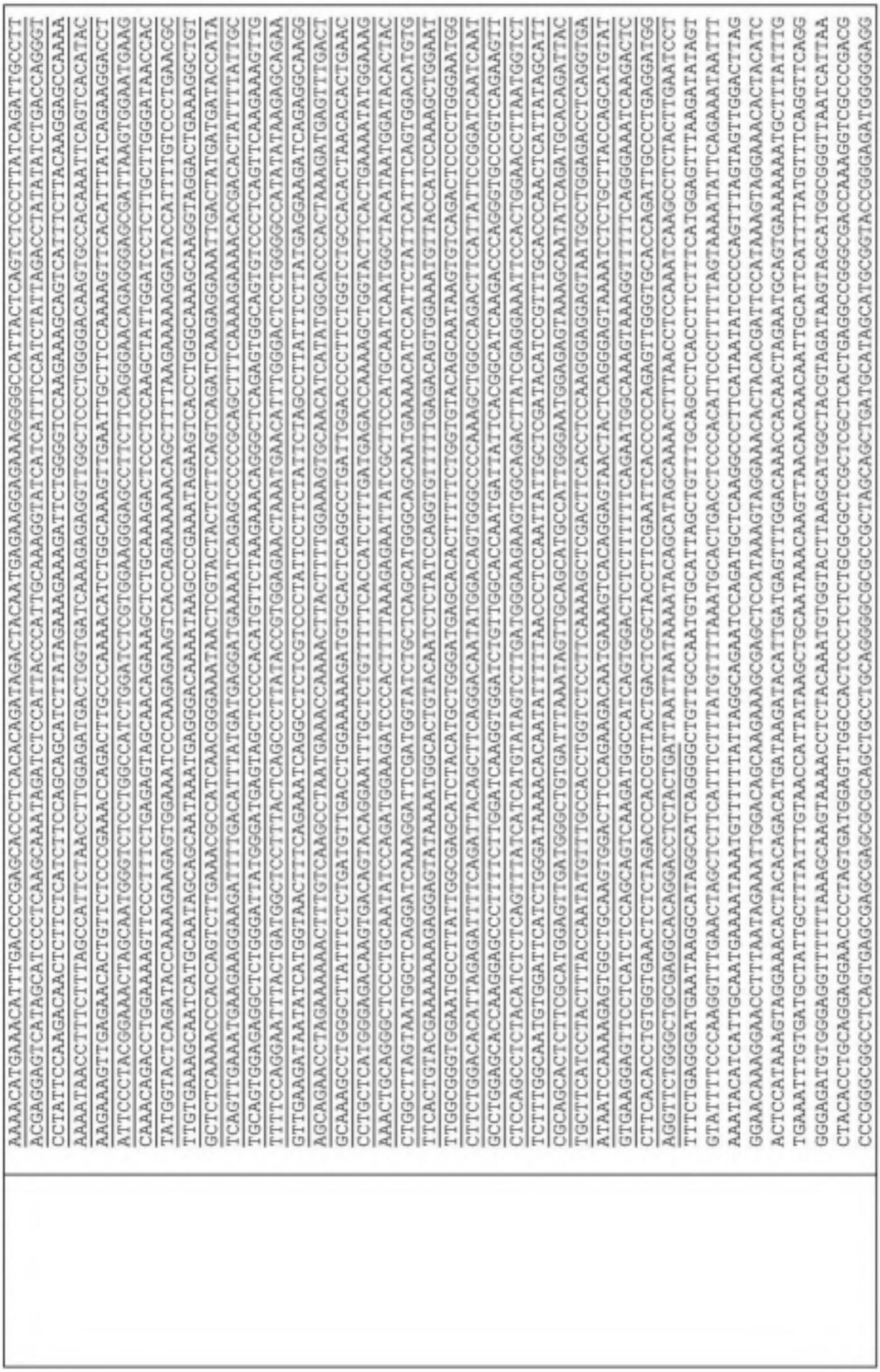


	CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
	AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
	GTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
	GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAG
	TATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGAC
	TCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTA
	TCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
	AGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCT
	CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTG
	GCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC
	CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGC
	TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCT
	TCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT
	ACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
	TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCA
	TTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCC
	ACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGG
	GGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAGG
	AAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGG
	CGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTAATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTG
	ACAGAGAA
	AAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGATTAAAAACATAACAGGAAGAAAAATGCCCCGCTGTGGGCGGACAAAAT
	AGTTGGGAACTGGGAGGGGTGGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTTAGGGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAACTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATA
	CGAAAATTAAAAATGACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTCGGATCTCCTAGGCTCAAGCAGTGATCCAGACATGATAAGA
	TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT
	AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCT
	ACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTCTAGTACTTCTCGACAAGCTTGTCGAGACTGCAGGCTCTAGAGGCCGGCCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGC
	TCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGG
	CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCATATGGAGTCAATGGGAAAACCCATT
	GGAGCCAAGTACACTGACTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATGGGGGTGAGTCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGC
	CAAGTACATTGAGTCAATAGGGACTTTCCAATGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATGGGAGGTAAGCCAATGGGTTTTTCCCATTACTGACATGT
	ATACTGAGTCATTTAGGGACTTTCCAATGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAATAGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGCCAAGTACACTG
	AGTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACAAAAGGTCAATAGGGGGTGAGTCAATGGGTTTTTCCCATTATTGGCACATACATAAGGTCA
	ATAGGGGTGACTAGTGGAGAAGAGCATGCTTGAGGGCTGAGTGCCCCTCAGTGGGCAGAGACATGGCCCACAGTCCCTGAGAAGTTGGGGGGAGAG
	GGTGGGCAATTGAACTGGTGCCTAGAGAAGGTGGGGCTTGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTGGTGTACTGGCTCCACCTTTTTCCCCAGGGTGGGGGA
	GAACCATATATAAGTGCAGTAGTCTCTGTGAACATTCAAGCTTCTGCCTTCTCCCCTCCTGTGAGTTTGGTAAGTCACTGACTGTCTATGCCTGGGAAA
	GGGTGGGCAGGAGATGGGGCAGTGCAGGAAAAGTGGCACTATGAACCCTGCAGCCCCTAGACAATTGTACTAACCTTCTTCTCTTTCCTCTCCTGACAG
ccDNAFVIII软体26 (SEQ ID NO: 217)	GTTGGTGTACAGTAGCTTCCGTTTAAACAGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTGCCACC
	AGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAGATTTCCTCCTAGAGTGCC

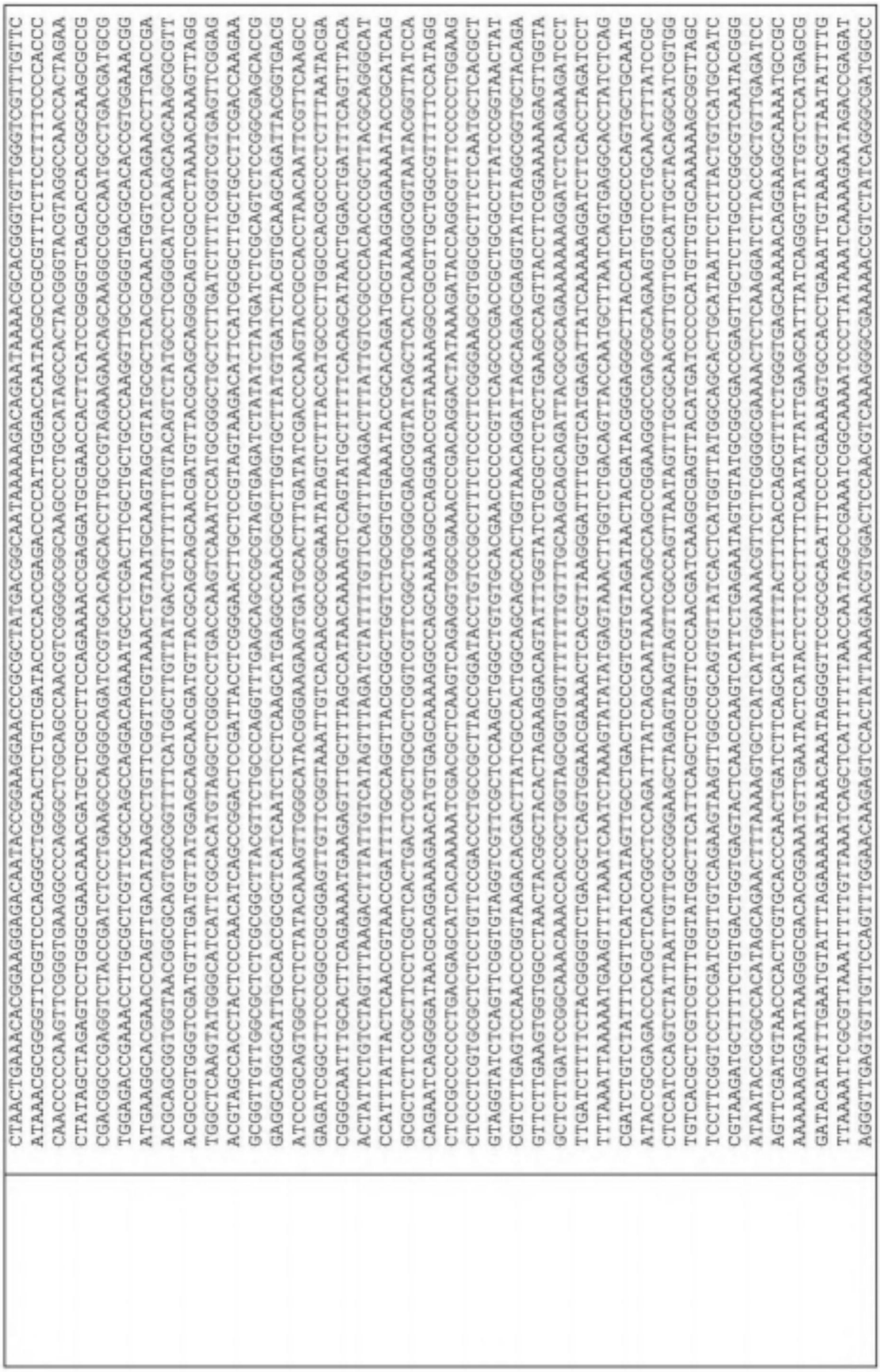
[0804]


AAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCCT
GGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCTTCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCT
GTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAG
CCATACATATGTCTGGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAA
AAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGCACACAAATTTATACTACTT
TTTGCTGTATTTGATGAAGGGAAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAAT
GCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTC
CTGAAGTGCACTCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCCTTGGAAATCTCGCCAATAACTTCCTTACTGCT
CAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTCCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTATGTCAAGTAGACAGCTG
TCCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTGAATCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTGATG
ATGACAACTCTCCTCCTTCCTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTCAAACTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGAC
TATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCCGATGACAGAAGTTATAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAAAAAAGTCCG
ATTTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACA
CACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTATTCAAGGAGATTACCA
AAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGA
TCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTAGTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTCTCCTCATCTCTGCTACAAAGAAT
CTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATAATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAAT
ATACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGA
TAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTCTTCTCTGGAT
ATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCCTATTCCCATTCTCAGGAGAAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGG
ATTCTGGGGGTGCCACAACTCAGACTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGA
CAGTTATGAAGATATTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCCTAGCACTAGGCAAA
AGCAATTTAATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTGGTTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCC
TCTAGTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTATCCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGA
TCCATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACACACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCCTG
AGTCAGGCCTCCAATTAAGATTAAATGAGAAACTGGGGACAACTGCAGCAACAGAGTTGAAGAAACTTGATTTCAAGTTTCTAGTACATCAAATAAT
CTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGGTACTGATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGATAGTCAATT
AGATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCATCTCCCCTTACTGAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAATAATGATTCAAAGTTGTTAGAAT
CAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAAAAAATGTATCGTCAACAGAGAGTGGTAGGTTATTTAAAGGGAAAAGAGCTCATGGACCTGCT
TTGTTGACTAAAGATAATGCCTTATTTAATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAAAAGTGACACCTTTGATTCATG
TGATGGCCCATCATTATTAATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAAAAGTGACACCTTTGATTCATG
ACAGAATGCTTATGGACAAAAATGCTACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTCATCAAAAAACATGGAAATGGTCCAACAGAAA
AAAGAGGGCCCCATTCCACCAGATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTTAAGATGCTATTCTTGCCAGAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCA
TGGAAAGAACTCTCTGAACTCTGGGCAAGGCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAGAAAAATCTGTGGAAGGTCAGAATTTCTTGTCTG
AGAAAAACAAGTGGTAGTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGAGATGGTTTTTCCAAGCAGCAGAACCTATTTCTTACTAAC
TTGGATAATTTACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAAAATTCAGGAAGAAATAGAAAAGAAGGTAATGTGATAGTTTT
GCCTCAGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTTCATGAAGAACCTTTTCTTACTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTCATATGACGGGGCAT
ATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATTAAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAAGGGGAGGAGAAAAC
TTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCACCACACAAGGATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTGTCACGCA
ACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAACCCAGTGGTCCA

[0805]


AAAACATGAAACATTTGACCCCGAGCACCCTCACACAGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCCTTATCAGATTGCCTT
ACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGATCTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTATATATCTGACCAGGGT
CCTATTCCAAGACAACTCTTCTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCATTTCTTACAAGGAGCCAAAA
AAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACCTTGGAGATGACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAGTGCCACAAATTCAGTCACATAC
AAGAAAGTTGAGAACACTGTTCTCCCGAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAAAAGTTCACATTTATCAGAAGGACCT
ATTCCCTACGGAAACTAGCAATGGGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGAAGGGAGCCTTCTTCAGGGAACAGAGGGAGCGATTAAGTGGAATGAAG
CAAACAGACCTGGAAAAGTTCCCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAAGCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAACCAC
TATGGTACTCAGATACCAAAAGAAGAGTGGAAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAAACAGCTTTTAAGAAAAAGGATACCATTTGTCCCTGAACGC
TTGTGAAAGCAATCATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGGACAAAATAAGCCCGAAATAGAAGTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGT
GCTCTCAAAACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATACTCGTACTACTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATA
TCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTATTGC
TGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTTG
TTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGCCATATATAAGAGCAGAA
GTTGAAGATAATATCATGGTAACTTTCAGAAATCAGGCCTCTCGTCCCTATTCCTCTATTCCTATTTCTTATTGAGGAAGATCAGAGGCAAGG
AGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAAACTTACTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACT
GCAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAAC
CCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGGAATTTGCTCTGTTTTTCACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAG
AAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGATCCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTAC
CTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCTATTTCATTTCAGTGGACATGTG
TTCACTGTACGAAAAAAAAGAGGAGTATAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTTACCATCCAAAGCTGGAAT
TTGGCGGGTGGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAATAAGTGTCAGACTCCCCTGGGAATGG
CTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAAT
GCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTCACGGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTT
CTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCCACTGGAACCTTAATGGTCT
TCTTTGGCAATGTGGATTCATCTGGGATAAAACACAATATTTTTTAACCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTTGCACCCAACTCATTATAGCATT
CGCAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACACAGATTAC
TGCTTCATCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGA
ATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGAGTAACTACTCAGGGAGTTTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTAT
GTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGTTTTTCAGGGAAATCAAGACTC
CTTCACACCTGTGGTGAACTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGG
AGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGATTAATTAATAAAATACAGCATAGCAAAACTTTAACCTCCAAATCAAGCCCTCTACTTGAATCCT
TTTCTGAGGGATGAATAAGGCATAGGCATCAGGGGCTGTTGCCAATGTGCATTAGCTGTTTGCAGCCTCACCTTCTTTCATGGAGTTTAAGATATAGT
GTATTTTCCCAAGGTTTGAACTAGCTCTCTTCATTTCTTTATGTTTTTAAATGCACTGACCTCCCACATTCCCTTTTTAGTAAAATATTCAGAAATAATTT
AAATACATCATTGCAATGAAAATAAATGTTTTTTATTAGGCAGAATCCAGATGCTCAAGGCCCTTCATAATATCCCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAG
GGAACAAAGGAACCTTTAATAGAAATTGGACAGCAAGAAAGCGAGCTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACATC
ACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTG
TGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGG
GGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTACTTAAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAA
CTACACCTGCAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACG
CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCGCCGCTAGCAGCTGATGCATAGCATGCGGTACCGGGAGATGGGGGAGG

[0806]


CTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTC
ATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGACCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTCCCCACCC
CAACCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAAGCCCTGCCATAGCCCACTACGGGTACGTAGGCCAACCACTAGAA
CTATAGCTAGAGTCCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCG
CGACGGCCGAGGTCTACCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCG
TGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGGCTCGTTCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGA
ATGAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGA
ACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTT
ACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAACAAAGTTAGG
TGGCTCAAGTATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTCGGTCGTGAGTTCGGAG
ACGTAGCCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACTTGCTCCGTAGTAAGACATTCATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAA
GCGGTTGTTGGCGCTCTCGGCGGCTTACGTTCTGCCCAGGTTTGAGCACGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCG
GAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTATGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGACG
ATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCACTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAACAATTCGTTCAAGCC
GAGATCGGCTTCCCGGCCGCGGAGTTGTTCGGTAAATTGTCACAACGCCGCGAATATAGTCTTTACCATGCCCTTCTTTAATACGA
CGGGCAATTTGCACTTCAGAAAATGAAGAGTTTGCTTTAGCCATAACAAAAGTCCAGTATGCTTTTTCACAGCATAACTGGACTGATTTCAGTTTACA
ACTATTCTGTCTAGTTTAAGACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTGTTCAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCCACACCCGCTTACGCAGGGCAT
CCATTTATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCCAGGTTACGCGGCTGGTCTGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAG
GCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTT
TTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATG
ATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGG
TGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC
TCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATC
CGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCC
AGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTG
TTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGAT
AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCC

[0807]

CACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGA
CGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAAC
CACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCAAATAAGCGTTGATATTCAGTCAATTACAAACATTA
ATAACGAAGAGATGACAGAAAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAA

[0808]

ceDNA 载体名称	从 5'到 3'排列的元素（从左 ITR 到右 ITR）
ceDNAFVIII 载体 1	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - hAAT_PromoterSet -PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hFactorVIII_WT_ORF_v2 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH -spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 2	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - hAAT_PromoterSet - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 3	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - LP1_Promoter_Set - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hFactorVIII_WT_ORF_v2 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 4	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - LP1_Promoter_Set - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 5	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - hEF1a_FullLength_Promoter - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hFactorVIII_WT_ORF_v2 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 6	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - hEF1a_FullLength_Promoter - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 7	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - LP1_Promoter_Set - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hFactorVIII_206variant_ORF_v1 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 8	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - hEF1a_FullLength_Promoter - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hFactorVIII_206variant_ORF_v1 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH -

[0809]

	spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 9	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v2.1 - CMV_enhancer - gB-actin_Promoter - Consensus_Kozak - XbaI_site - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - mir-142_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v2.1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 10	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v2.1 - hAAT_PromoterSet - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - mir-142_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v2.1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 11	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v2.1 - VandenDriessche_PromoterSet - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 12	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - BMN270_Enhancer - BMN270_Promoter - BMN270_5pUTR - BMN270_hFVIII-BDD-SQ - BMN270_polyA - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 13	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - SPK8011_Promoter - SPK8011_5pUTR - SPK8011_hFVIII-BDD-SQ - SPK8011_polyA - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 14	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - Minimum_Consensus_Kozak - TTR_liver_specific_Promoter - SangamoCRMSBS2-Intron3_5pUTR - SangamoCRMSBS2-Intron3_hFVIII-BDD-SQ - SangamoCRMSBS2_polyA - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 15	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - hAAT_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 16	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - hAAT_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - Nathwani_hFVIII-BDD-V3 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - hAAT_PromoterSet - PmeI_site -

[0810]

17	Consensus_Kozak - Nathwani_hFVIII-BDD-V3 - PacI_site - WPRE_3pUTR - mir-142_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 18	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - VandenDriessche_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 19	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - VandenDriessche_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - Nathwani_hFVIII-BDD-V3 - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 20	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - VandenDriessche_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - Nathwani_hFVIII-BDD-V3 - PacI_site - WPRE_3pUTR - mir-142_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 21	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - NotI_site - CAG_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - hVIII-BDD-SQ_codopOZ - PacI_site - WPRE_3pUTR - mir-142_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 22	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - CET_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - Nathwani_hFVIII-BDD-V3 - PacI_site - WPRE_3pUTR - mir-142_3pUTR - bGH - XbaI_site - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 23	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - VandenDriessche_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - hFVIII-226variant-F309S_CpGmin-codop_ORF - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 24	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v1 - VandenDriessche_PromoterSet - PmeI_site - Consensus_Kozak - Endo_hFVIII_cDNA - PacI_site - WPRE_3pUTR - bGH - spacer_right-ITR_v1 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII 载体 25	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v2 - NdeI_site - CET_PromoterSet - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak -

[0811]

	hFactorVIII-BDD_CpGmin-codop_ORF - PacI_site - HBB_3pUTR - mir-142_3pUTR - SV40_polyA - spacer_right-ITR_v2 - right-ITR_v1
ceDNAFVIII-载体26	left-ITR_v1 - spacer_left-ITR_v2 - NdeI_site - CET_PromoterSet - PmeI_site - Mod_Minimum_Consensus_Kozak - Endo_hFVIII_cDNA - PacI_site - HBB_3pUTR - mir-142_3pUTR - SV40_polyA - spacer_right-ITR_v2 - right-ITR_v1

[0812] 测试制品以浓缩原液形式提供，并在标称4℃下储存。制剂未产生涡旋或离心。各个组通过手术室中通风架上的接触垫料安置在透明的聚碳酸酯笼中。随意向动物提供用1N HCl酸化至目标pH值2.5-3.0的食物和过滤自来水。如下所述在中期和终末时间点收集血液：

[0813]

组编号	样品采集时间	
	— 隐静脉或眼眶出血	终末
	血浆	
1-10	第 3 天	第 7 天
体积/部分	120 μL 全血	MOV
加工/储存	120 μl，将全血加入预涂有 13.33 μL 的 3.2%柠檬酸钠的试管中并保持室温直至加工 在标称-70°C 下冷冻一（1）份等分试样	600 μl，将全血加入预涂有 66.6 μl 的 3.2%柠檬酸钠的试管中并保持室温直至加工 在标称-70°C 下冷冻四（4）份等分试样

[0814] 血样采集如下：

[0815]

体积（mL）全血	样品目的地	第-3 天（~）	第 3、7、14、21 天	第 28 天（终末）
0.15	细胞因子			
0.05	PHE 分析 X2	0.05	0.05	0.6
	总量/天（mL）	0.05	0.05	0.6

[0816] 研究详情如下：

[0817] 物种(数量、性别、年龄)：来自Jackson Laboratories的C57BL/6(JAX 000664)小鼠(N＝40，4只备用，雄性，到达时为6周龄)。

[0818] 化合物类别：ceDNA。

[0819] 笼侧观察:每天进行笼侧观察。

[0820] 临床观察:在第0天给药后1、5-6和24小时进行临床观察。

[0821] 体重:在第0、3和7天记录所有动物的体重,包括在安乐死之前。

[0822] 剂量配方:测试制品以浓缩原液形式提供。原液在使用前立即用PBS稀释。如果不立即进行给药,则将制备好的材料储存在～4℃(或湿冰上)。

[0823] 剂量施用:在第0天通过流体动力学IV施用,经由侧尾静脉(在5秒内给药)对测试材料给药,每只动物为设定体积90-100ml/kg(取决于组中最轻的动物)。

[0824] 采血:根据上表,在第3天采集动物的临时血液。每次采集后,动物皮下注射0.5-1.0mL乳酸林格氏液。根据以上采集表采集动物的血液。对于血浆采集,将全血采集到未涂敷的Eppendorf式样管中。立即取出120μL并放入含有13.33μL 3.2%柠檬酸钠的试管中。轻轻混合血液并保持室温直至处理为止。全血样品在环境条件(20-25℃)下以2,000g离心15分钟。血浆样品被取出,避免细胞堆积。制作一(1)份等分试样,并注意全血样品中的任何凝结或血浆中的溶血。所有样品均在标称-70℃下储存。所有样品均在标称-70℃下储存直至发货。

[0825] 麻醉恢复:在麻醉状态下、恢复期间和直到活动期间,对动物进行连续监测。

[0826] 安乐死和终末采血:在第7天,通过CO_2室息然后开胸和放血对动物实施安乐死。通过心脏穿刺收集最大可获得的血量,并根据设施SOPS处理为血清,并储存在两(2)份等分试样中。对于血浆采集,通过注射器采集600μL全血,立即放入含有66.66μL 3.2%柠檬酸钠的试管中。轻轻混合血液并保持室温直至处理为止。全血样品在环境条件(20-25℃)下以2,000g离心15分钟。取出血浆样品,避免细胞堆积,制成四(4)份等分试样。注意全血样品中的任何凝结或血浆中的溶血。

[0827] 结果:示于图12-15的结果显示了表达FVIII的各种ceDNA载体对血清FVIII水平的影响,其中血清中检测到FVIII表明ceDNA载体能够在注射后表达FVIII。图12是描绘流体动力学递送表达FVIII的各种ceDNA载体(ceDNAFVIII-载体4、ceDNAFVIII-载体6、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体14、ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体18、ceDNAFVIII-载体19、ceDNAFVIII-载体21、ceDNAFVIII-载体22)3天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。ceDNAFVIII-载体16、ceDNAFVIII-载体19和ceDNAFVIII-载体21在3天后显示出最高的血浆因子VIII浓度。仅使用媒介物作为对照。图13是描绘流体动力学递送表达FVIII的各种ceDNA载体(ceDNAFVIII-载体1、ceDNAFVIII-载体2、ceDNAFVIII-载体3、ceDNAFVIII-载体5、ceDNAFVIII-载体7、ceDNAFVIII-载体8、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体13、ceDNAFVIII-载体15)3天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。ceDNAFVIII-载体8在3天后显示出最高的血浆因子VIII浓度。仅使用媒介物作为对照。图14是描绘流体动力学递送表达FVIII的各种ceDNA载体(ceDNAFVIII-载体4、ceDNAFVIII-载体9、ceDNAFVIII-载体10、ceDNAFVIII-载体11、ceDNAFVIII-载体12、ceDNAFVIII-载体17、ceDNAFVIII-载体20、ceDNAFVIII-载体24、ceDNAFVIII-载体25、ceDNAFVIII-载体26)3天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。ceDNAFVIII-载体17和ceDNAFVIII-载体20在3天后显示出最高的血浆因子VIII浓度。仅使用媒介物作为对照。图15是描绘逐渐增加剂量的ceDNAFVIII-载体23(0.005-50μg)流体动力学递送1天后血浆FVIII浓度(IU/ml)的图。如图15所示,随着ceDNAFVIII-载体23的剂量增加,血浆FVIII以剂量依赖性方式增加。仅使用媒介物作为对照。

[0828] 实施例14:在雄性CD-1小鼠中LNP:ceDNA递送与激酶抑制剂联合后的FVIII表达

[0829] LNP:ceDNA载体如实施例6中所述制备。在雄性CD-1小鼠中测试了ceDNA:脂质制剂的作用。给药和抑制剂制备的媒介物是0.5%甲基纤维素。

[0830] LNP:ceDNA测试材料(ceDNAFVIII-载体23)按如下方式施用:

[0831]

组编号	每组动物	治疗	剂量水平（mg/kg）	剂量体积（mL/kg）	治疗方案，IV	终末时间点
1	5	PBS	2.0	5	第 0 天一次	第 7 天
2	5	ceDNAFVIII-载体 23	2.0			
测试制品储存（原液制剂）：在浓缩原液（1.0 mg/mL）中提供第 1-2 组的测试制品并在标称-80°C 下储存直至使用。不要将制剂涡旋或离心。			**注释：**稀释液和原液的剩余TA在标称4°C下储存直至给药完成，然后丢弃。			
安置：通过与手术室中通风架中的接触垫料将组安置在透明聚碳酸酯笼中。			**食物/水：**将小鼠饮食 5058 和用 1 N HCl 酸化至目标 pH 为 2.5-3.0 的过滤自来水随意提供给动物。			

[0832] No.＝编号;IV＝静脉内;ROA＝施用途径

[0833] 血液(临时和终末)样品收集如下:

[0834]

组编号	样品采集时间	
	全血（眼眶）	终末全血（心脏）
	柠檬酸钠血浆	
1-2	第 3 天	第 7 天
体积/部分	120A 全血	MOV
加工/储存	将全血加入预涂有 13.33 pi 3.2%柠檬酸钠的试管中并保持室温直至处理 在标称-70°C 下冷冻一（1）份等分试样	600 µl_，全血加入预涂有 66.6 1.µL 3.2%柠檬酸钠的试管中并保持室温直至处理 在标称-70°C 下冷冻二（2）份等分试样

[0835] 如下收集组织样品:

[0836]

组编号	样品采集时间
	肝脏
1-2	第 7 天
体积/部分	整个器官，分开
加工	整个器官重量 4x=单独称重和速冻的 25-50 毫克片 （莱克制药（Lake Pharma））
储存	在标称-70℃ 下冷冻

[0837] 研究详情如下：

[0838] 物种(数量、性别、年龄)：来自Charles River实验室的CD-1小鼠(N＝10+2只备用，雄性，到达时为4周龄)。

[0839] 笼侧观察：每天进行笼侧观察。

[0840] 临床观察：在第0天测试材料剂量后约1、5-6和24小时进行临床观察。

[0841] 体重：在第0、1、2、3和7天记录所有动物的体重，包括在安乐死之前。

[0842] 测试材料剂量配方：测试制品以浓缩原液形式提供。在使用前立即用PBS稀释原液。如果不立即进行给药，则将制备好的材料储存在～4℃(或湿冰上)。

[0843] 剂量施用：在第0天对于第1-2组通过侧尾静脉静脉内施用将测试制品以5mL/kg给药。

[0844] 采血：根据上述血液采集表，在第3天采集第1-2组所有动物的临时血液。每次收集后，动物皮下注射0.5-1.0mL乳酸林格氏液。对于血浆采集，根据设施SOPS在麻醉下通过眼眶窦穿刺将全血采集到未涂敷的Eppendorf式样管中。立即取出120μL并放入含有13.33pl的3.2％柠檬酸钠的试管中。轻轻混合血液并保持室温直至处理为止。全血样品在环境条件(20-25℃)下以2,000g离心15分钟。血浆样品被取出，避免细胞堆积。制作一(1)份等分试样，并注意全血样品中的任何凝结或血浆中的溶血。

[0845] 麻醉恢复：在麻醉状态下、恢复期间和直到活动期间，对动物进行连续监测。

[0846] 终末采血：在第7天，通过CO_2室息然后开胸和放血对动物实施安乐死。通过心脏穿刺收集最大可获得的血量并处理成血浆。对于血浆集合，通过注射器收集600μL全血，立即放置到含有66.66μL 3.2％柠檬酸钠的试管。轻轻混合血液并保持室温直至处理为止。全血样品在环境条件(20-25℃)下以2,000g离心15分钟。取出血浆样品，避免细胞堆积，制成两(2)份等分试样。注意全血样品中的任何凝结或血浆中的溶血。

[0847] 灌注：放血后，所有动物都接受生理盐水心脏灌注。简而言之，全身心内灌注是通过将连接到含有生理盐水的10mL注射器的23/21号针头插入左心室腔进行灌注。切开右心房为灌注液提供引流口。将针头置于心脏中后，向柱塞施加温和而稳定的压力以灌注动物。确保冲洗液的充分流动，直到流动的流出灌注液清澈(没有可见的血液)，表明冲洗液已经

浸透了身体并且该程序完成。

[0848] 组织收集:从在预定时间点之前被安乐死的垂死动物收集终末组织。如果可能,从发现死亡的动物身上收集和储存组织。

[0849] 安乐死和灌注后,收获肝脏。从肝脏中采集四(4)个25-50mg切片并称重。切片单独速冻,在标称-70℃下储存直至发货。

[0850] 结果:图16显示在施用LNP:ceDNAFVIII-载体23测试制品后7天的血浆FVIII浓度(IU/mL)。如图16所示,在用LNP:ceDNAFVIII-载体23测试制品处理的小鼠的血浆样品中容易检测到FVIII,但在仅用媒介物处理的小鼠中未观察到。

[0851] 参考文献

[0852] 在本说明书和本文的实施例中引用的所有出版物和参考文献,包括但不限于专利和专利申请,都以全文引用的方式并入本文中,如同每个单独的出版物或参考文献被明确且单独地指出像充分阐述一样,以引用的方式并入本文中一般。本申请要求优先权的任何专利申请也以上述针对出版物和参考文献的方式通过引用并入本文中。

序列表

<110> 世代生物公司（GENERATION BIO CO.）

<120> 非病毒 DNA 载体及其用于表达 FVIII 治疗剂的用途

<130> 131698-06020

<140>
<141>

<150> 62/817,904
<151> 2019-03-13

<150> 62/856,432
<151> 2019-06-03

<160> 190

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

[0001]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 1
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag ctgcctgcag g 141

<210> 2
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 2
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 3
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 3
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120

tgcctgcagg 130

<210> 4
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 4
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct 130

<210> 5
<211> 143
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 5
ttgcccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcggtgggg cctgcggacc aaaggtccgc 60

agacggcaga ggtctcctct gccggcccca ccgagcgagc gacgcgcgca gagagggagt 120

gggcaactcc atcactaggg taa 143

<210> 6
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 6
ttggccactc cctctatgcg cactcgctcg ctcggtgggg cctggcgacc aaaggtcgcc 60

agacggacgt gggtttccac gtccggcccc accgagcgag cgagtgcgca tagagggagt 120

ggccaactcc atcactagag gtat 144

<210> 7
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

[0003]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 7
ttggccactc cctctatgcg cgctcgctca ctcactcggc cctggagacc aaaggtctcc 60

agactgccgg cctctggccg gcagggccga gtgagtgagc gagcgcgcat agagggagtg 120

gccaact 127

<210> 8
<211> 166
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 8
tccccccctgt cgcgttcgct cgctcgctgg ctcgtttggg ggggcgacgg ccagagggcc 60

gtcgtctggc agctctttga gctgccaccc ccccaaacga gccagcgagc gagcgaacgc 120

gacaggggggg agagtgccac actctcaagc aaggggttt tgtaag 166

<210> 9
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 9
ttgcccactc cctctaatgc gcgctcgctc gctcggtggg gcctgcggac caaaggtccg 60

cagacggcag aggtctcctc tgccggcccc accgagcgag cgagcgcgca tagagggagt 120

gggcaactcc atcactaggg gtat 144

<210> 10
<211> 143
<212> DNA
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 10
ttaccctagt gatggagttg cccactccct ctctgcgcgc gtcgctcgct cggtggggcc 60

ggcagaggag acctctgccg tctgcggacc tttggtccgc aggccccacc gagcgagcga 120

gcgcgcagag agggagtggg caa 143

<210> 11
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 11
atacctctag tgatggagtt ggccactccc tctatgcgca ctcgctcgct cggtggggcc 60

ggacgtggaa acccacgtcc gtctggcgac ctttggtcgc caggccccac cgagcgagcg 120

agtgcgcata gagggagtgg ccaa 144

<210> 12
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 12
agttggccac attagctatg cgcgctcgct cactcactcg gccctggaga ccaaaggtct 60

ccagactgcc ggcctctggc cggcagggcc gagtgagtga gcgagcgcgc atagagggag 120

tggccaa 127

<210> 13
<211> 166
<212> DNA
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 13
cttacaaaac ccccttgctt gagagtgtgg cactctcccc cctgtcgcgt tcgctcgctc 60

gctggctcgt ttgggggggt ggcagctcaa agagctgcca gacgacggcc ctctggccgt 120

cgccccccca aacgagccag cgagcgagcg aacgcgacag ggggga 166

<210> 14
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 14
ataccccctag tgatggagtt gcccactccc tctatgcgcg ctcgctcgct cggtggggcc 60

ggcagaggag acctctgccg tctgcggacc tttggtccgc aggccccacc gagcgagcga 120

gcgcgcatta gagggagtgg gcaa 144

<210> 15
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 15
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

cgcacgcccg ggtttcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc tgcctgcagg 120

<210> 16
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
[0006] 多核苷酸

<400> 16
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 17
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 17
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct 120

gcctgcagg 129

<210> 18
<211> 101
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 18
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ctttgcctca gtgagcgagc gagcgcgcag ctgcctgcag g 101

<210> 19
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

[0007]

<400> 19
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgaca aagtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120

gcgcgcagct gcctgcagg 139

<210> 20
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 20
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgaaa atcgcccgac gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc 120

gcgcagctgc ctgcagg 137

<210> 21
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 21
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgaaa cgcccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 120

gcagctgcct gcagg 135

<210> 22
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
[0008] 多核苷酸

<400> 22
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcaaag cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 120

agctgcctgc agg 133

<210> 23
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 23
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gtttcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120

gcgcgcagct gcctgcagg 139

<210> 24
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 24
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg tttccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc 120

gcgcagctgc ctgcagg 137

<210> 25
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
[0009] 多核苷酸

<400> 25
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgt ttcgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 120

gcagctgcct gcagg 135

<210> 26
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 26
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccctt tgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 120

agctgcctgc agg 133

<210> 27
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 27
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccttt ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag 120

ctgcctgcag g 131

<210> 28
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
[0010] 多核苷酸

<400> 28
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgctttg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct 120

gcctgcagg 129

<210> 29
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 29
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgtttcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc 120

ctgcagg 127

<210> 30
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 30
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 31
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

[0011]

<400> 31
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120

tgcctgcagg 130

<210> 32
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 32
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct 120

<210> 33
<211> 122

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 33
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgt cgggcgacct ttggtcgccc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120

ct 122

<210> 34
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 34
[0012] cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120

ct 122

<210> 35
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 35
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgcc cgggcgtcgg gcgacctttg 60

gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta 120

ggggttcct 129

<210> 36
<211> 101

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 36
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcaaa gcctcagtga gcgagcgagc 60

gcgcagagag ggagtggcca actccatcac taggggttcc t 101

<210> 37
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 37
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

[0013] gggcgacttt gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac 120

tccatcacta ggggttcct 139

<210> 38
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 38
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgatttt cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc 120

catcactagg ggttcct 137

<210> 39
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 39
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgtttcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca 120

tcactagggg ttcct 135

<210> 40
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 40
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

[0014] gggctttgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120

actaggggtt cct 133

<210> 41
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 41
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtcgg 60

gcgacctttg gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac 120

tccatcacta ggggttcct 139

<210> 42
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 42
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccggaaaccg ggcgtcgggc 60

gacctttggt cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc 120

catcactagg ggttcct 137

<210> 43
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 43
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgaaacggg cgtcgggcga 60

[0015] cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca 120

tcactagggg ttcct 135

<210> 44
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 44
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccaaagggcg tcgggcgacc 60

tttggtcgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120

actaggggtt cct 133

<210> 45
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 45
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc caaaggcgtc gggcgacctt 60

tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac 120

taggggttcc t 131

<210> 46
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 46
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc aaagcgtcgg gcgacctttg 60

[0016] gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta 120

ggggttcct 129

<210> 47
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 47
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccga aacgtcgggc gacctttggt 60

cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc catcactagg 120

ggttcct 127

<210> 48
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 48
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 49
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 49
cgatcgttcg at 12

[0017]

<210> 50
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 50
atcgaaccat cg 12

<210> 51
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 51
atcgaacgat cg 12

<210> 52
<211> 165
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 52
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca tcactagggg ttcct 165

<210> 53
<211> 140
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

[0018]

<400> 53
cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc 60

cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg 120

cgcagagaga tcactagggg 140

<210> 54
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 54
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60

tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 91

<210> 55

<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 55
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc 60

ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 91

<210> 56
<211> 1662
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 56
gccgccacca tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatccgctg 60

[0019]

gaagatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctggttcct 120

ggaacaattg cttttacaga tgcacatatc gaggtggaca tcacttacgc tgagtacttc 180

gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga 240

atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cggtgttggg cgcgttattt 300

atcggagttg cagttgcgcc cgcgaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt 360

atgggcattt cgcagcctac cgtggtgttc gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg 420

aacgtgcaaa aaaagctccc aatcatccaa aaaattatta tcatggattc taaaacggat 480

taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc atctacctcc cggttttaat 540

gaatacgatt ttgtgccaga gtccttcgat agggacaaga caattgcact gatcatgaac 600

tcctctggat ctactggtct gcctaaaggt gtcgctctgc ctcatagaac tgcctgcgtg 660

agattctcgc atgccagaga tcctattttt ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt 720

ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata 780

tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgtttct gaggagcctt 840

caggattaca agattcaaag tgcgctgctg gtgccaaccc tattctcctt cttcgccaaa 900

agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tggtggcgct 960

cccctctcta aggaagtcgg ggaagcggtt gccaagaggt tccatctgcc aggtatcagg 1020

caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacacccga gggggatgat 1080

aaaccgggcg cggtcggtaa agttgttcca ttttttgaag cgaaggttgt ggatctggat 1140

accgggaaaa cgctgggcgt taatcaaaga ggcgaactgt gtgtgagagg tcctatgatt 1200

atgtccggtt atgtaaacaa tccggaagcg accaacgcct tgattgacaa ggatggatgg 1260

ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat cgttgaccgc 1320

ctgaagtctc tgattaagta caaaggctat caggtggctc ccgctgaatt ggaatccatc 1380

ttgctccaac accccaacat cttcgacgca ggtgtcgcag gtcttcccga cgatgacgcc 1440

ggtgaacttc ccgccgccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag 1500

atcgtggatt acgtcgccag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgcgg aggagttgtg 1560

[0020] tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag 1620

atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag atcgccgtgt aa 1662

<210> 57
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任何氨基酸

<400> 57
Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[0021] 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220

```
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
        355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430
```

[0022]

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 58
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多肽

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

[0023]

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

[0024] <210> 59
<211> 1310
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 59
ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga 60

ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc 120

atgcgctcag ggctgagcgc ggggagagca gagcacacaa gctcatagac cctggtcgtg 180

gggggagga ccggggagct ggcgcggggc aaactgggaa agcggtgtcg tgtgctggct 240

ccgccctctt cccgagggtg ggggagaacg gtatataagt gcggcagtcg ccttggacgt 300

tctttttcgc aacgggtttg ccgtcagaac gcaggtgagg ggcgggtgtg gcttccgcgg 360

gccgccgagc tggaggtcct gctccgagcg ggccgggccc cgctgtcgtc ggcggggatt 420

agctgcgagc attcccgctt cgagttgcgg gcggcgcggg aggcagagtg cgaggcctag 480

cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc tagcgtggtg tccgcgccgc 540

cgccgcgtgc tactccggcc gcactctggt ctttttttt tttgttgttg ttgccctgct 600

gccttcgatt gccgttcagc aataggggct aacaaaggga gggtgcgggg cttgctcgcc 660

cggagcccgg agaggtcatg gttggggagg aatggaggga caggagtggc ggctggggcc 720

cgcccgcctt cggagcacat gtccgacgcc acctggatgg ggcgaggcct ggggtttttc 780

ccgaagcaac caggctgggg ttagcgtgcc gaggccatgt ggccccagca cccggcacga 840

tctggcttgg cggcgccgcg ttgccctgcc tccctaacta gggtgaggcc atcccgtccg 900

gcaccagttg cgtgcgtgga aagatggccg ctcccgggcc ctgttgcaag gagctcaaaa 960

tggaggacgc ggcagcccgg tggagcgggc gggtgagtca cccacacaaa ggaagagggc 1020

ctggtccctc accggctgct gcttcctgtg accccgtggt cctatcggcc gcaatagtca 1080

cctcgggctt ttgagcacgg ctagtcgcgg cgggggggagg ggatgtaatg gcgttggagt 1140

ttgttcacat ttggtgggtg gagactagtc aggccagcct ggcgctggaa gtcatttttg 1200

gaatttgtcc ccttgagttt tgagcggagc taattctcgg gcttcttagc ggttcaaagg 1260

[0025] tatcttttaa accctttttt aggtgttgtg aaaaccaccg ctaattcaaa 1310

<210> 60
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 60
gcgcgctcgc tcgctc 16

<210> 61
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 61

ggttga 6

<210> 62
<211> 4
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 62
agtt 4

<210> 63
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0026]

<400> 63
ggttgg 6

<210> 64
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 64
agttgg 6

<210> 65
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 65
agttga 6

<210> 66
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 66
rrttrr 6

<210> 67
<211> 581
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

[0027]

<400> 67
gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggtatacat 60

ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt 120

actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttatttacgc 180

tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tgatattctt 240

aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct 300

attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt 360

ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac 420

gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct 480

ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca 540

ggggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt c 581

<210> 68
<211> 225
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 68
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 60

ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 120

gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 180

ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc 225

<210> 69
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0028]

<400> 69
actgaggc 8

<210> 70
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 70
gcctcagt 8

<210> 71
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 71
gagcgagcga gcgcgc 16

<210> 72
<211> 1923
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 72
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca tagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

[0029]

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg 540

cttcactctc cccatctccc ccccctcccc acccccaatt ttgtatttat ttatttttta 600

attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg 660

gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg 720

cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg 780

aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgac gctgccttcg ccccgtgccc cgctccgccg 840

ccgcctcgcg ccgcccgccc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc 900

gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg cttgtttctt 960

ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc 1020

ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgctgc 1080

ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc agtgtgcgcg 1140

aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag gggaacaaag 1200

gctgcgtgcg gggtgtgtgc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg gcggtcgggc 1260

tgtaaccccc ccctgcaccc ccctccccga gttgctgagc acggcccggc ttcgggtgcg 1320

gggctccgta cggggcgtgg cgcggggctc gccgtgccgg gcgggggggtg gcggcaggtg 1380

ggggtgccgg gcgggggcggg gccgcctcgg gccggggagg gctcgggggga ggggcgcggc 1440

ggcccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc gcagccattg ccttttatgg 1500

taatcgtgcg agagggcgca gggacttcct ttgtcccaaa tctgtgcgga gccgaaatct 1560

gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg cgcggggcga agcggtgcgg cgccggcagg 1620

aaggaaatgg gcgggggaggg ccttcgtgcg tcgccgcgcc gccgtcccct tctccctctc 1680

cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg 1740

ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggctct agagcctctg ctaaccatgt tttagccttc 1800

ttctttttcc tacagctcct gggcaacgtg ctggttattg tgctgtctca tcatttgtcg 1860

[0030] acagaattcc tcgaagatcc gaaggggttc aagcttggca ttccggtact gttggtaaag 1920

cca 1923

<210> 73
<211> 1272
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 73
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctattttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccggat 780

cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt 840

ggtactctcc cagagactgt ctgactcacg ccacccccctc caccttggac acaggacgct 900

gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg 960

cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 1020

cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc 1080

[0031] ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 1140

cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt 1200

tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac 1260

ctttggaact ga 1272

<210> 74
<211> 1177
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 74
ggctcagagg ctcagaggca cacaggagtt tctgggctca ccctgccccc ttccaacccc 60

tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaaac 120

ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac 180

agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggccca 240

tgccacctcc aacatccact cgacccctg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc 300

ctggcgtggt ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgct gggtggggag 360

tcgtcagtaa gtggctatgc cccgaccccg aagcctgttt ccccatctgt acaatggaaa 420

tgataaagac gcccatctga tagggttttt gtggcaaata aacatttggt ttttttgttt 480

tgttttgttt tgtttttga gatggaggtt tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtga 540

cacaatctca tctcaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca 600

agcatgtgcc accacacctg gctaattttc tatttttagt agagacgggt ttctccatgt 660

tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca cacccggcta 720

atttttttcta tttttgacag ggacggggtt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctagaggt 780

accggatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca 840

gctaagtggt actctcccag agactgtctg actcacgcca ccccctccac cttggacaca 900

ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg 960

[0032] tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg 1020

gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca 1080

gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 1140

tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt 1177

<210> 75
<211> 547
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 75
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggggaatga ctcctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240

gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga cttagcccct 300

gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggttaatatt caccagcagc ctcccccgtt 360

gcccctctgg atccactgct taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca 420

ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa 480

gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg 540

gaactga 547

<210> 76
<211> 556
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 76
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

[0033]

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt cggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt 180

agtgtgagag gggaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca ctgcccaggc 240

aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagcccctgt 300

ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct cccccgttgc 360

ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacactcg agggccctgt ctcctcagct 420

tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atccggacat cgattctaag gtaaatataa 480

aatttttaag tgtataattt gttaaactac tgattctaat tgtttctctc ttttagattc 540

caacctttgg aactga 556

<210> 77
<211> 1179
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 77
ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60

ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120

gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180

gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240

gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300

acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360

gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg 420

cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggtggcacc ttcgcgcctg tctcgctgct 480

ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg 540

caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc 600

[0034] gcgggcggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660

gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct 720

ggtctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca 780

gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg 840

acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900

tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat 960

tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg 1020

gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa 1080

ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttggt tcattctcaa gcctcagaca 1140

gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga 1179

<210> 78
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 78
aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttgtt 60

cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc 120

tgcggcgcgc gcagcacctt t 141

<210> 79
<211> 317
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 79
ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120

[0035] tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 180

ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 240

aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 300

gcctaggctt ttgcaaa 317

<210> 80
<211> 241
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 80
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtggaaagga 240

c 241

<210> 81
<211> 215
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 81
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60

cacccagcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120

tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg 180

gatttgggaa tcgtataaga actgtatgag accac 215

<210> 82
<211> 546
[0036] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 82
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggggaatga ctcctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240

gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga cttagccccc 300

gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggttaatatt caccagcagc ctcccccgtt 360

gcccctctgg atccactgct taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca 420

ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa 480

gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg 540

gaactg 546

<210> 83
<211> 576
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 83
tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 60

cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 120

atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 180

tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc 240

cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta 300

tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 360

[0037]

cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt 420

ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 480

aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag 540

gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcag 576

<210> 84
<211> 150
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 84
ataaacgata acgccgttgg tggcgtgagg catgtaaaag gttacatcat tatcttgttc 60

gccatccggt tggtataaat agacgttcat gttggttttt gtttcagttg caagttggct 120

gcggcgcgcg cagcaccttt gcggccatct 150

<210> 85
<211> 1313
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 85
ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga 60

ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc 120

atgcgcccag ggctgagcgc gggtagatca gagcacacaa gctcacagtc cccggcggtg 180

gggggagggg cgcgctgagc gggggccagg gagctggcgc ggggcaaact gggaaagtgg 240

tgtcgtgtgc tggctccgcc ctcttcccga gggtggggga gaacggtata taagtgcggt 300

agtcgccttg gacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgtc agaacgcagg tgagtggcgg 360

gtgtggcttc cgcgggcccc ggagctggag ccctgctctg agcgggccgg gctgatatgc 420

gagtgtcgtc cgcagggttt agctgtgagc attcccactt cgagtggcgg gcggtgcggg 480

[0038]

ggtgagagtg cgaggcctag cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc 540

tagcgtggtg tccgccgccg cgtgccactc cggccgcact atgcgttttt tgtccttgct 600

gccctcgatt gccttccagc agcatgggct aacaaaggga gggtgtgggg ctcactctta 660

aggagcccat gaagcttacg ttggatagga atggaagggc aggaggggcg actggggccc 720

gcccgccttc ggagcacatg tccgacgcca cctggatggg gcgaggcctg tggctttccg 780

aagcaatcgg gcgtgagttt agcctacctg ggccatgtgg ccctagcact gggcacggtc 840

tggcctggcg gtgccgcgtt cccttgcctc ccaacaaggg tgaggccgtc ccgcccggca 900

ccagttgctt gcgcggaaag atggccgctc ccggggccct gttgcaagga gctcaaaatg 960

gaggacgcgg cagcccggtg gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aagagggcct 1020

tgcccctcgc cggccgctgc ttcctgtgac cccgtggtct atcggccgca tagtcacctc 1080

gggcttctct tgagcaccgc tcgtcgcggc gggggggaggg gatctaatgg cgttggagtt 1140

tgttcacatt tggtgggtgg agactagtca ggccagcctg gcgctggaag tcattcttgg 1200

aatttgcccc tttgagtttg gagcgaggct aattctcaag cctcttagcg gttcaaaggt 1260

attttctaaa cccgtttcca ggtgttgtga aagccaccgc taattcaaag caa 1313

<210> 86
<211> 213
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 86
taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 60

tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 120

ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt 180

tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gta 213

[0039]

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
肽

<400> 87
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 88
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
肽

<400> 88
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 89
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
肽

<400> 89
Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
[0040] <213> 猿猴病毒 40

<400> 90
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> 猿猴病毒 40

<400> 91
cccaagaaga agaggaaggt g 21

<210> 92
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 对未知的描述：
核质蛋白双向 NLS 序列

<400> 92

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 对未知的描述：
C-myc NLS 序列

<400> 93
Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
1 5

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 对未知的描述：
[0041] C-myc NLS 序列

<400> 94
Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro
1 5 10

<210> 95
<211> 38
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95
Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
20 25 30

Arg Asn Gln Gly Gly Tyr
35

<210> 96

<211> 42
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 对未知的描述：
来自输入蛋白-α 序列的 IBB 域

<400> 96
Arg Met Arg Ile Glx Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys
20 25 30

Asp Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val
35 40

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知

[0042]

<220>
<223> 对未知的描述：
肌瘤 T 蛋白序列

<400> 97
Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro
1 5

<210> 98
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 对未知的描述：
肌瘤 T 蛋白序列

<400> 98
Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp
1 5

<210> 99
<211> 8

<212> PRT
<213> 智人

<400> 99
Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu
1 5

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 100
Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro
1 5 10

<210> 101
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
[0043] 寡核苷酸

<400> 101
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggaaacccgg gcgtgcgcct cagtgagcga 60

gcgagcgcgc 70

<210> 102
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 102
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcacgc ccgggtttcc cgggcggcct cagtgagcga 60

gcgagcgcgc 70

<210> 103
<211> 72
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 103
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgtcgg gcgacctttg gtcgcccggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 104
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 104
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60

[0044] gagcgagcgc gc 72

<210> 105
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 105
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 106
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 106
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 107
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 107
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg ctttgcccgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 108
<211> 83
<212> DNA
[0045] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 108
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca aagcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 109
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 109
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgaaac gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 60

tgagcgagcg agcgcgc 77

<210> 110
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 110
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgtt tcggcctcag 60

tgagcgagcg agcgcgc 77

<210> 111
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 111
[0046] gcgcgctcgc tcgctcactg aggcaaagcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 51

<210> 112
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 112
gcgcgctcgc tcgctcactg aggctttgcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 51

<210> 113
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 113

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 114
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 114
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 115
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

[0047] <220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 115
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 116
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 116
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcgcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 117

<211> 5
<212> PRT
<213> 流感病毒 NS1

<400> 117
Asp Arg Leu Arg Arg
1 5

<210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> 流感病毒 NS1

<400> 118
Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 119
<211> 10
<212> PRT
<213> 肝炎 δ 病毒

<400> 119
[0048] Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu
1 5 10

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 120
Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg
1 5 10

<210> 121
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121
Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys
20

<210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122
Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 123
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0049] <400> 123
gtttaaac 8

<210> 124
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 124
ttaattaa 8

<210> 125
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 125
aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttgtt 60

cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc 120

tgcggcgcgc gcagcacctt t 141

<210> 126
<211> 317
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 126
ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120

tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 180

[0050] ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 240

aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 300

gcctaggctt ttgcaaa 317

<210> 127
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 127
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 128
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 128
gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc cactggtgac 60

<210> 129
<211> 1260
<212> DNA
<213> 腺相关病毒-2

<400> 129
atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag 60

gaggaccagg cctcatacat ctccttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag 120

gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg 180

gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat tttggaacta 240

aacgggtacg atccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc 300

ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg 360

[0051]

gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgcgtaa actggaccaa tgagaacttt 420

cccttcaacg actgtgtcga caagatggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc 480

aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa 540

tgcaagtcct cggcccagat agacccgact cccgtgatcg tcacctccaa caccaacatg 600

tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg 660

atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag 720

gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc 780

tacgtcaaaa agggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtgag 840

cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc 900

aactacgcag acaggtacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg 960

tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga 1020

cagaaagact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa 1080

aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc 1140

actgcctgcg atctggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataaatgatt 1200

taaatcaggt atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga 1260

<210> 130
<211> 1932
<212> DNA
<213> 腺相关病毒-2

<400> 130
atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60

ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120

tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag 180

cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct tttctttgtg 240

caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg 300

aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360

taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac cagaaatggc 420

[0052]

gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctccccaaa 480

acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag cgcctgtttg 540

aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600

gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag atcaaaaact 660

tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac ctcggagaag 720

cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcgg 780

tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840

cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900

attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct gggatgggcc 960

acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac taccgggaag 1020

accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080

aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg 1140

aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc 1200

gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat cgtcacctcc 1260

aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320

ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga ctttgggaag 1380

gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440

gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc cagtgacgca 1500

gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560

gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620

aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc aaatatctgc 1680

ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc tcaacccgtt 1740

tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaaggtg 1800

ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa 1860

caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat cttccagatt ggctcgagga 1920

[0053] cactctctct ga 1932

<210> 131
<211> 1876
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 131
cgcagccacc atggcggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg 60

gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 120

gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga 180

gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 240

tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac 300

caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat 360

tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac 420

cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 480

gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 540

cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 600

gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag 660

atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac 720

ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc 780

caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 840

taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 900

gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct 960

gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac 1020

taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1080

aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg 1140

[0054] ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1200

caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat 1260

cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca 1320

ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga 1380

ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt 1440

ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc 1500

cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac 1560

gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca 1620

cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1680

aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc 1740

tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1800

gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg 1860

catctttgaa caataa 1876

<210> 132
<211> 1194
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 132

[0055]

```
atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag      60

gaggaccagg cctcatacat ctccttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag     120

gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg     180

gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat tttggaacta     240

aacgggtacg atccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc     300

ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg     360

gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgcgtaa actggaccaa tgagaacttt     420

cccttcaacg actgtgtcga caagatggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc     480

aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa     540

tgcaagtcct cggcccagat agacccgact cccgtgatcg tcacctccaa caccaacatg     600

tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg     660

atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag     720

gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc     780

tacgtcaaaa agggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtgag     840

cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc     900

aactacgcag accgctacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg     960

tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga    1020

cagaaagact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa    1080

aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc    1140

actgcctgcg atctggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataa          1194
```

<210> 133
<211> 1876
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 133
cgcagccacc atggcggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg 60

gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 120

gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga 180

gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 240

tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac 300

caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat 360

tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac 420

[0056] cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 480

gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 540

cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 600

gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag 660

atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac 720

ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc 780

caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 840

taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 900

gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct 960

gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac 1020

taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1080

aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg 1140

ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1200

caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat 1260

cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca 1320

ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga 1380

ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt 1440

ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc 1500

cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac 1560

gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca 1620

cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1680

aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc 1740

tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1800

gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg 1860

catctttgaa caataa 1876

[0057] <210> 134
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 134
ctaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg c 51

<210> 135
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 135
ctaggactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccggcct 60

cagtc 65

<210> 136
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 136
ggactgaggc cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 60

tcctgca 67

<210> 137
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0058] <400> 137
gtgcgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggcgcactc a 41

<210> 138
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 138
ggactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg cggcctcagt cctgca 56

<210> 139
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 139
ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc agtc 54

<210> 140
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 140
ggactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacggcctca gtcctgca 48

<210> 141
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
[0059] 寡核苷酸

<400> 141
ctaggactga ggccgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtc 46

<210> 142
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 142
ggactgaggc ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcgcctcag 60

tcctgca 67

<210> 143
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 143
atacctaggc acgcgtgtta ctagttatta atagtaatca attacgg 47

<210> 144
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 144
atacctaggg gccgcacgcg tgttactag 29

<210> 145
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

[0060]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 145
atacactcag tgcctgcagg cacgtggtcc ggagatccag ac 42

<210> 146
<211> 3754
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 146
cctaggtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct 60

tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatcgcggcc gctcaatatt ggccattagc 120

catattattc attggttata tagcataaat caatattggc tattggccat tgcatacgtt 180

gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt ccaatatgac cgccatgttg 240

gcattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 300

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 360

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 420

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 480

agtgtatcat atgccaagtc cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 540

gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 600

agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc 660

ccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttatttttt taattatttt gtgcagcgat 720

gggggcgggg ggggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 780

cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc 840

ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 900

agtcgctgcg acgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgccgcctcg cgccgcccgc 960

[0061] cccggctctg actgaccgcg ttactcccac aggtgagcgg gcgggacggc ccttctcctc 1020

cgggctgtaa ttagcgcttg gtttaatgac ggcttgtttc ttttctgtgg ctgcgtgaaa 1080

gccttgaggg gctccgggag ggccctttgt gcgggggggga gcggctcggg gggtgcgtgc 1140

gtgtgtgtgt gcgtggggag cgccgcgtgc ggcccgcgct gcccggcggc tgtgagcgct 1200

gcgggcgcgg cgcggggctt tgtgcgctcc gcagtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg 1260

gcggtgcccc gcggtgcggg gggggctgcg aggggaacaa aggctgcgtg cggggtgtgt 1320

gcgtgggggg gtgagcaggg ggtgtgggcg cggcggtcgg gctgtaaccc ccccctgcac 1380

ccccctcccc gagttgctga gcacggcccg gcttcgggtg cggggctccg tacggggcgt 1440

ggcgcggggc tcgccgtgcc gggcgggggg tggcggcagg tgggggtgcc gggcggggcg 1500

gggccgcctc gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg gcggcccccg gagcgccggc 1560

ggctgtcgag gcgcggcgag ccgcagccat tgccttttat ggtaatcgtg cgagagggcg 1620

cagggacttc ctttgtccca aatctgtgcg gagccgaaat ctgggaggcg ccgccgcacc 1680

ccctctagcg ggcgcggggc gaagcggtgc ggcgccggca ggaaggaaat gggcggggag 1740

ggccttcgtg cgtcgccgcg ccgccgtccc cttctccctc tccagcctcg gggctgtccg 1800

cgggggggacg gctgccttcg gggggggacgg ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg 1860

accggcggct ctagagcctc tgctaaccat gttttagcct tcttcttttt cctacagctc 1920

ctgggcaacg tgctggttat tgtgctgtct catcatttgt cgacagaatt cctcgaagat 1980

ccgaaggggt tcaagcttgg cattccggta ctgttggtaa agccagttta aacgccgcca 2040

ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg 2100

acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct 2160

acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca 2220

ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga 2280

agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct 2340

tcttcaagga cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc 2400

tggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc 2460

acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga 2520

[0062]

acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg 2580

ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc 2640

actacctgag cacccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg 2700

tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcactctcgg catggacgag ctgtacaagt 2760

aattaattaa gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt 2820

gggtatacat ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg 2880

atatgtaatt actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg 2940

ttatttacgc tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac 3000

tgatattctt aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct 3060

gtatctagct attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgtata aatcctggtt 3120

gctgtctctt ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt 3180

gtttgctgac gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg 3240

gactttcgct ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg 3300

ctgctggaca ggggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt ctgtgccttc 3360

tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc tggaaggtgc 3420

cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg 3480

tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa 3540

tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatggctcta gagcatggct acgtagataa 3600

gtagcatggc gggttaatca ttaactacac ctgcagcagg aacccctagt gatggagttg 3660

gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc cctgcaggac tgaggccggg cgaccaaagg 3720

tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtcctg cagg 3754

<210> 147
<211> 8418
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

[0063]

<400> 147
ggcagctgcg cgctcgctcg ctcacctagg ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcga 60

cctttggtcg cccggcctag gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca 120

tcactagggg ttccttgtag ttaatgatta acccgccatg ctacttatcg cggccgctca 180

atattggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata ttggctattg 240

gccattgcat acgttgtatc tatatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaat 300

atgaccgcca tgttggcatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 360

attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 420

tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 480

aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca 540

cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtccgccc cctattgacg tcaatgacgg 600

taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta cgggactttc ctacttggca 660

gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt 720

cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt 780

attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg 840

gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc 900

gctccgaaag tttccttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag 960

cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc tccgccgccg 1020

cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg agcgggcggg 1080

acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt gtttcttttc 1140

tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg ggggagcggc 1200

tcgggggggtg cgtgcgtgtg tgtgtgcgtg gggagcgccg cgtgcggccc gcgctgcccg 1260

gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt gtgcgcgagg 1320

ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg aacaaaggct 1380

gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggtgtgag caggggtgt gggcgcggcg gtcgggctgt 1440

[0064] aacccccccc tgcacccccc tccccgagtt gctgagcacg gcccggcttc gggtgcgggg 1500

ctccgtacgg ggcgtggcgc ggggctcgcc gtgccgggcg gggggtggcg gcaggtgggg 1560

gtgccgggcg gggcggggcc gcctcgggcc ggggagggct cgggggaggg gcgcggcggc 1620

ccccggagcg ccggcggctg tcgaggcgcg gcgagccgca gccattgcct tttatggtaa 1680

tcgtgcgaga gggcgcaggg acttcctttg tcccaaatct gtgcggagcc gaaatctggg 1740

aggcgccgcc gcacccccctc tagcgggcgc ggggcgaagc ggtgcggcgc cggcaggaag 1800

gaaatgggcg gggagggcct tcgtgcgtcg ccgcgccgcc gtcccccttct ccctctccag 1860

cctcggggct gtccgcgggg ggacggctgc cttcgggggg gacggggcag ggcggggttc 1920

ggcttctggc gtgtgaccgg cggctctaga gcctctgcta accatgtttt agccttcttc 1980

tttttcctac agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca tttgtcgaca 2040

gaattcctcg aagatccgaa ggggttcaag cttggcattc cggtactgtt ggtaaagcca 2100

gtttaaacgc cgccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca 2160

tcctggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg 2220

agggcgatgc cacctacggc aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc 2280

ccgtgccctg gcccaccctc gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct 2340

accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtccgc catgcccgaa ggctacgtcc 2400

aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc gaggtgaagt 2460

tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg 2520

gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg 2580

ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg 2640

gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc 2700

tgctgcccga caaccactac ctgagcaccc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga 2760

agcgcgatca catggtcctg ctggagttcg tgaccgccgc cgggatcact ctcggcatgg 2820

acgagctgta caagtaatta attaagagca tcttaccgcc atttattccc atatttgttc 2880

tgtttttctt gatttgggta tacatttaaa tgttaataaa acaaaatggt ggggcaatca 2940

tttacatttt tagggatatg taattactag ttcaggtgta ttgccacaag acaaacatgt 3000

[0065]

taagaaactt tcccgttatt tacgctctgt tcctgttaat caacctctgg attacaaaat 3060

ttgtgaaaga ttgactgata ttcttaacta tgttgctcct tttacgctgt gtggatatgc 3120

tgctttatag cctctgtatc tagctattgc ttcccgtacg gctttcgttt tctcctcctt 3180

gtataaatcc tggttgctgt ctcttttaga ggagttgtgg cccgttgtcc gtcaacgtgg 3240

cgtggtgtgc tctgtgtttg ctgacgcaac ccccactggc tggggcattg ccaccacctg 3300

tcaactcctt tctgggactt tcgctttccc cctcccgatc gccacggcag aactcatcgc 3360

cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc taggttgctg ggcactgata attccgtggt 3420

gttgtctgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt 3480

gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 3540

ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga 3600

ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg ctctagagca 3660

tggctacgta gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacacctgca gcaggaaccc 3720

ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctccctgc aggactgagg 3780

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tcctgcaggg agcgagcgag 3840

cgcgcagctg cctgcacggg cgcgccggta ccgggagatg ggggaggcta actgaaacac 3900

ggaaggagac aataccggaa ggaacccgcg ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa 3960

cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa cgcggggttc ggtcccaggg ctggcactct 4020

gtcgataccc caccgagacc ccattgggac caatacgccc gcgtttcttc cttttcccca 4080

ccccaacccc caagttcggg tgaaggccca gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaagc 4140

cctgccatag ccactacggg tacgtaggcc aaccactaga actatagcta gagtcctggg 4200

cgaacaaacg atgctcgcct tccagaaaac cgaggatgcg aaccacttca tccggggtca 4260

gcaccaccgg caagcgccgc gacggccgag gtctaccgat ctcctgaagc cagggcagat 4320

ccgtgcacag caccttgccg tagaagaaca gcaaggccgc caatgcctga cgatgcgtgg 4380

agaccgaaac cttgcgctcg ttcgccagcc aggacagaaa tgcctcgact tcgctgctgc 4440

ccaaggttgc cgggtgacgc acaccgtgga aacggatgaa ggcacgaacc cagttgacat 4500

[0066] aagcctgttc ggttcgtaaa ctgtaatgca agtagcgtat gcgctcacgc aactggtcca 4560

gaaccttgac cgaacgcagc ggtggtaacg gcgcagtggc ggttttcatg gcttgttatg 4620

actgtttttt tgtacagtct atgcctcggg catccaagca gcaagcgcgt tacgccgtgg 4680

gtcgatgttt gatgttatgg agcagcaacg atgttacgca gcagcaacga tgttacgcag 4740

cagggcagtc gccctaaaac aaagttaggt ggctcaagta tgggcatcat tcgcacatgt 4800

aggctcggcc ctgaccaagt caaatccatg cgggctgctc ttgatctttt cggtcgtgag 4860

ttcggagacg tagccaccta ctcccaacat cagccggact ccgattacct cgggaacttg 4920

ctccgtagta agacattcat cgcgcttgct gccttcgacc aagaagcggt tgttggcgct 4980

ctcgcggctt acgttctgcc caggtttgag cagccgcgta gtgagatcta tatctatgat 5040

ctcgcagtct ccggcgagca ccggaggcag ggcattgcca ccgcgctcat caatctcctc 5100

aagcatgagg ccaacgcgct tggtgcttat gtgatctacg tgcaagcaga ttacggtgac 5160

gatcccgcag tggctctcta tacaaagttg ggcatacggg aagaagtgat gcactttgat 5220

atcgacccaa gtaccgccac ctaacaattc gttcaagccg agatcggctt cccggccgcg 5280

gagttgttcg gtaaattgtc acaacgccgc gaatatagtc tttaccatgc ccttggccac 5340

gcccctcttt aatacgacgg gcaatttgca cttcagaaaa tgaagagttt gctttagcca 5400

taacaaaagt ccagtatgct ttttcacagc ataactggac tgatttcagt ttacaactat 5460

tctgtctagt ttaagacttt attgtcatag tttagatcta ttttgttcag tttaagactt 5520

tattgtccgc ccacacccgc ttacgcaggg catccattta ttactcaacc gtaaccgatt 5580

ttgccaggtt acgcggctgg tctgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5640

taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 5700

ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg 5760

gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 5820

gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg acgagcatca caaaaatcga 5880

cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccccct 5940

ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 6000

tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 6060

[0067]

gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 6120

tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca 6180

ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 6240

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 6300

ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc 6360

accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga 6420

tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca 6480

cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat 6540

taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 6600

caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt 6660

gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt 6720

gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag 6780

ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 6840

attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt 6900

gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 6960

tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcggtt 7020

agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg 7080

gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg 7140

actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct 7200

tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc 7260

attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 7320

tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 7380

tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg 7440

aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 7500

tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 7560

[0068] cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa attgtaaacg ttaatatttt gttaaaattc 7620

gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc 7680

ccttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag 7740

agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc 7800

gatggcccac tacgtgaacc atcaccctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa 7860

gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg 7920

aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt 7980

gtagcggtca cgctgcgcgt aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc 8040

gcgtcccatt cgccattcag gctgcaaata agcgttgata ttcagtcaat tacaaacatt 8100

aataacgaag agatgacaga aaaattttca ttctgtgaca gagaaaaagt agccgaagat 8160

gacggtttgt cacatggagt tggcaggatg tttgattaaa aacataacag gaagaaaaat 8220

gccccgctgt gggcggacaa aatagttggg aactgggagg ggtggaaatg gagtttttaa 8280

ggattattta gggaagagtg acaaaataga tgggaactgg gtgtagcgtc gtaagctaat 8340

acgaaaatta aaaatgacaa aatagtttgg aactagattt cacttatctg gttcggatct 8400

cctagtgagc tccctgca 8418

<210> 148
<211> 225
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 148
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 60

ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 120

gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 180

ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc 225

<210> 149
[0069] <211> 1177
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 149
ggctcagagg ctcagaggca cacaggagtt tctgggctca ccctgccccc ttccaacccc 60

tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaaac 120

ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac 180

agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggccca 240

tgccacctcc aacatccact cgacccccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc 300

ctggcgtggt ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgct gggtggggag 360

tcgtcagtaa gtggctatgc cccgaccccg aagcctgttt ccccatctgt acaatggaaa 420

tgataaagac gcccatctga tagggttttt gtggcaaata aacatttggt ttttttgttt 480

tgttttgttt tgtttttga gatggaggtt tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtga 540

cacaatctca tctcaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca 600

agcatgtgcc accacacctg gctaattttc tatttttagt agagacgggt ttctccatgt 660

tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca cacccggcta 720

atttttttcta tttttgacag ggacggggtt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctagaggt 780

accggatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca 840

gctaagtggt actctcccag agactgtctg actcacgcca ccccctccac cttggacaca 900

ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg 960

tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg 1020

gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca 1080

gcctccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 1140

tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt 1177

[0070]

<210> 150
<211> 1326
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 150
ctgcagggcc cactagtgga gccgagagta attcatacaa aaggagggat cgccttcgca 60

aggggagagc ccagggaccg tccctaaatt ctcacagacc caaatccctg tagccgcccc 120

acgacagcgc gaggagcatg cgcccagggc tgagcgcggg tagatcagag cacacaagct 180

cacagtcccc ggcggtgggg ggaggggcgc gctgagcggg ggccagggag ctggcgcggg 240

gcaaactggg aaagtggtgt cgtgtgctgg ctccgccctc ttcccgaggg tgggggagaa 300

cggtatataa gtgcggtagt cgccttggac gttctttttc gcaacgggtt tgccgtcaga 360

acgcaggtga gtggcgggtg tggcttccgc gggccccgga gctggagccc tgctctgagc 420

gggccgggct gatatgcgag tgtcgtccgc agggtttagc tgtgagcatt cccacttcga 480

gtggcgggcg gtgcgggggt gagagtgcga ggcctagcgg caaccccgta gcctcgcctc 540

gtgtccggct tgaggcctag cgtggtgtcc gccgccgcgt gccactccgg ccgcactatg 600

cgtttttttgt ccttgctgcc ctcgattgcc ttccagcagc atgggctaac aaagggaggg 660

tgtggggctc actcttaagg agcccatgaa gcttacgttg gataggaatg gaagggcagg 720

aggggcgact ggggcccgcc cgccttcgga gcacatgtcc gacgccacct ggatggggcg 780

aggcctgtgg ctttccgaag caatcgggcg tgagtttagc ctacctgggc catgtggccc 840

tagcactggg cacggtctgg cctggcggtg ccgcgttccc ttgcctccca acaagggtga 900

ggccgtcccg cccggcacca gttgcttgcg cggaaagatg gccgctcccg gggccctgtt 960

gcaaggagct caaaatggag gacgcggcag cccggtggag cgggcgggtg agtcacccac 1020

acaaaggaag agggccttgc ccctcgccgg ccgctgcttc ctgtgacccc gtggtctatc 1080

ggccgcatag tcacctcggg cttctcttga gcaccgctcg tcgcggcggg gggaggggat 1140

ctaatggcgt tggagtttgt tcacatttgg tgggtggaga ctagtcaggc cagcctggcg 1200

ctggaagtca ttcttggaat ttgccccttt gagtttggag cgaggctaat tctcaagcct 1260

[0071] cttagcggtt caaaggtatt ttctaaaccc gtttccaggt gttgtgaaag ccaccgctaa 1320

ttcaaa 1326

<210> 151
<211> 573
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 151
gtaagagttt tatgtttttt catctctgct tgtatttttc tagtaatgga agcctggtat 60

tttaaaatag ttaaattttc ctttagtgct gatttctaga ttattattac tgttgttgtt 120

gttattattg tcattatttg catctgagaa cccttaggtg gttatattat tgatatattt 180

ttggtatctt tgatgacaat aatgggggat tttgaaagct tagctttaaa tttcttttaa 240

ttaaaaaaaa atgctaggca gaatgactca aattacgttg gatacagttg aatttattac 300

ggtctcatag ggcctgcctg ctcgaccatg ctatactaaa aattaaaagt gtgtgttact 360

aattttataa atggagtttc catttatatt tacctttatt tcttatttac cattgtctta 420

gtagatattt acaaacatga cagaaacact aaatcttgag tttgaatgca cagatataaa 480

cacttaacgg gttttaaaaa taataatgtt ggtgaaaaaa tataactttg agtgtagcag 540

agaggaacca ttgccacctt cagattttcc tgt 573

<210> 152
<211> 1993
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 152
acgatcggga actggcatct tcagggagta gcttaggtca gtgaagagaa gaacaaaaag 60

cagcatatta cagttagttg tcttcatcaa tctttaaata tgttgtgtgg tttttctctc 120

cctgtttcca cagacaagag tgagatcgcc catcggtata atgatttggg agaacaacat 180

ttcaaaggcc tgtaagttat aatgctgaaa gcccacttaa tatttctggt agtattagtt 240

aaagttttaa aacacctttt tccaccttga gtgtgagaat tgtagagcag tgctgtccag 300

tagaaatgtg tgcattgaca gaaagactgt ggatctgtgc tgagcaatgt ggcagccaga 360

gatcacaagg ctatcaagca ctttgcacat ggcaagtgta actgagaagc acacattcaa 420

[0072]

ataatagtta attttaattg aatgtatcta gccatgtgtg gctagtagct cctttcctgg 480

agagagaatc tggagcccac atctaacttg ttaagtctgg aatcttattt tttatttctg 540

gaaaggtcta tgaactatag ttttgggggc agctcactta ctaactttta atgcaataag 600

atctcatggt atcttgagaa cattattttg tctctttgta gtactgaaac cttatacatg 660

tgaagtaagg ggtctatact taagtcacat ctccaacctt agtaatgttt taatgtagta 720

aaaaaatgag taattaattt atttttagaa ggtcaatagt atcatgtatt ccaaataaca 780

gaggtatatg gttagaaaag aaacaattca aaggacttat ataatatcta gccttgacaa 840

tgaataaatt tagagagtag tttgcctgtt tgcctcatgt tcataaatct attgacacat 900

atgtgcatct gcacttcagc atggtagaag tccatattcc tttgcttgga aaggcaggtg 960

ttcccattac gcctcagaga atagctgacg ggaagaggct ttctagatag ttgtatgaaa 1020

gatatacaaa atctcgcagg tatacacagg catgatttgc tggttgggag agccacttgc 1080

ctcatactga ggtttttgtg tctgcttttc agagtcctga ttgccttttc ccagtatctc 1140

cagaaatgct catacgatga gcatgccaaa ttagtgcagg aagtaacaga ctttgcaaag 1200

acgtgtgttg ccgatgagtc tgccgccaac tgtgacaaat cccttgtgag taccttctga 1260

ttttgtggat ctactttcct gctttctgga actctgtttc aaagccaatc atgactccat 1320

cacttaaggc cccgggaaca ctgtggcaga gggcagcaga gagattgata aagccagggt 1380

gatgggaatt ttctgtggga ctccatttca tagtaattgc agaagctaca atacactcaa 1440

aaagtctcac cacatgactg cccaaatggg agcttgacag tgacagtgac agtagatatg 1500

ccaaagtgga tgagggaaag accacaagag ctaaaccctg taaaaagaac tgtaggcaac 1560

taaggaatgc agagagaaga agttgccttg gaagagcata ccaactgcct ctccaatacc 1620

aatggtcatc cctaaaacat acgtatgaat aacatgcaga ctaagcaggc tacatttagg 1680

aatatacatg tatttacata aatgtatatg catgtaacaa caatgaatga aaactgaggt 1740

catggatctg aaagagagca agggggctta catgagaggg tttggaggga ggggttggag 1800

ggagggaggt attattcttt agttttacag ggaacgtagt aaaaacatag gcttctccca 1860

aaggagcaga gcccatgagg agctgtgcaa ggttccccag cttgatttta cctgctcctc 1920

[0073] aaattccctt gatttgtttt tattataatg actttactcc tagcttttag tgtcagatag 1980

aaaacatgga agg 1993

<210> 153
<211> 1350
<212> DNA
<213> 智人

<400> 153
taggaggctg aggcaggagg atcgcttgag cccaggagtt cgagaccagc ctgggcaaca 60

tagtgtgatc ttgtatctat aaaaataaac aaaattagct tggtgtggtg gcgcctgtag 120

tccccagcca cttggagggg tgaggtgaga ggattgcttg agcccgggat ggtccaggct 180

gcagtgagcc atgatcgtgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtga gaccctgtct 240

cacaacaaca acaacaacaa caaaaaggct gagctgcacc atgcttgacc cagtttctta 300

aaattgttgt caaagcttca ttcactccat ggtgctatag agcacaagat tttatttggt 360

gagatggtgc tttcatgaat tcccccaaca gagccaagct ctccatctag tggacaggga 420

agctagcagc aaaccttccc ttcactacaa aacttcattg cttggccaaa aagagagtta 480

attcaatgta gacatctatg taggcaatta aaaacctatt gatgtataaa acagtttgca 540

ttcatggagg gcaactaaat acattctagg actttataaa agatcacttt ttatttatgc 600

acagggtgga acaagatgga ttatcaagtg tcaagtccaa tctatgacat caattattat 660

acatcggagc cctgccaaaa aatcaatgtg aagcaaatcg cagcccgcct cctgcctccg 720

ctctactcac tggtgttcat ctttggtttt gtgggcaaca tgctggtcat cctcatcctg 780

ataaactgca aaaggctgaa gagcatgact gacatctacc tgctcaacct ggccatctct 840

gacctgtttt tccttcttac tgtccccttc tgggctcact atgctgccgc ccagtgggac 900

tttggaaata caatgtgtca actcttgaca gggctctatt ttataggctt cttctctgga 960

atcttcttca tcatcctcct gacaatcgat aggtacctgg ctgtcgtcca tgctgtgttt 1020

gctttaaaag ccaggacggt caccttggg gtggtgacaa gtgtgatcac ttgggtggtg 1080

gctgtgtttg cgtctctccc aggaatcatc tttaccagat ctcaaaaaga aggtcttcat 1140

tacacctgca gctctcattt tccatacagt cagtatcaat tctggaagaa tttccagaca 1200

[0074] ttaaagatag tcatcttggg gctggtcctg ccgctgcttg tcatggtcat ctgctactcg 1260

ggaatcctaa aaactctgct tcggtgtcga aatgagaaga agaggcacag ggctgtgagg 1320

cttatcttca ccatcatgat tgtttatttt 1350

<210> 154
<211> 1223
<212> DNA
<213> 智人

<400> 154
tgacagagac tcttgggatg acgcactgct gcatcaaccc catcatctat gcctttgtcg 60

gggagaagtt cagaaactac ctcttagtct tcttccaaaa gcacattgcc aaacgcttct 120

gcaaatgctg ttctattttc cagcaagagg ctcccgagcg agcaagctca gtttacaccc 180

gatccactgg ggagcaggaa atatctgtgg gcttgtgaca cggactcaag tgggctggtg 240

acccagtcag agttgtgcac atggcttagt tttcatacac agcctgggct gggggtgggg 300

tgggagaggt ctttttaaa aggaagttac tgttatagag ggtctaagat tcatccattt 360

atttggcatc tgtttaaagt agattagatc ttttaagccc atcaattata gaaagccaaa 420

tcaaaatatg ttgatgaaaa atagcaacct ttttatctcc ccttcacatg catcaagtta 480

ttgacaaact ctcccttcac tccgaaagtt ccttatgtat atttaaaaga aagcctcaga 540

gaattgctga ttcttgagtt tagtgatctg aacagaaata ccaaaattat ttcagaaatg 600

tacaactttt tacctagtac aaggcaacat ataggttgta aatgtgttta aaacaggtct 660

ttgtcttgct atggggagaa aagacatgaa tatgattagt aaagaaatga cacttttcat 720

gtgtgatttc ccctccaagg tatggttaat aagtttcact gacttagaac caggcgagag 780

acttgtggcc tgggagagct ggggaagctt cttaaatgag aaggaatttg agttggatca 840

tctattgctg gcaaagacag aagcctcact gcaagcactg catgggcaag cttggctgta 900

gaaggagaca gagctggttg ggaagacatg gggaggaagg acaaggctag atcatgaaga 960

accttgacgg cattgctccg tctaagtcat gagctgagca gggagatcct ggttggtgtt 1020

gcagaaggtt tactctgtgg ccaaaggagg gtcaggaagg atgagcattt agggcaagga 1080

gaccaccaac agccctcagg tcagggtgag gatggcctct gctaagctca aggcgtgagg 1140

[0075] atgggaagga gggaggtatt cgtaaggatg ggaaggaggg aggtattcgt gcagcatatg 1200

aggatgcaga gtcagcagaa ctg 1223

<210> 155
<211> 215
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 155
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60

cacccagcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120

tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg 180

gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accac 215

<210> 156
<211> 141

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 156
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca cctaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctaggtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac tagggttcc t 141

<210> 157
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 157
[0076] gcgcgctcgc tcgctcacc 19

<210> 158
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 158
ctaggtgagc gagcgagcgc gc 22

<210> 159
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 159

cctgcaggac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg 60

cctcagtcct gcagg 75

<210> 160
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 160
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagt 60

gcgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcactcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120

tgcctgcagg 130

<210> 161
<211> 142
<212> DNA
[0077] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 161
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctcc ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggcg 60

acctttggtc gcccggcctc agtcctaggg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc 120

aactccatca ctaggggttc ct 142

<210> 162
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 162
gcgcgctcgc tcgctcactg agtgcgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcgcact 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 163
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 163
gcgcgctcgc tcgctcactg a 21

<210> 164
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0078] <400> 164
gtgagcgagc gagcgcgc 18

<210> 165
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 165
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgactttgtc 60

gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 166
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成

寡核苷酸

<400> 166
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaagtcgc ccgacgcccg ggctttgccc 60

gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 167
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 167
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgattttcgc 60

ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 168
<211> 87
[0079] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 168
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaaatcgccc gacgcccggg ctttgcccgg 60

gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 169
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 169
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgtttcgccc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 170
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 170
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaacgcccga cgcccgggct ttgcccgggc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 171
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0080] <400> 171
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggaaacccgg gcgtcgggcg acctttggtc 60

gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 172
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 172
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggtttccc 60

gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 173
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 173
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg gaaaccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc 60

ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 174
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 174
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cggtttccgg 60

gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

[0081]
<210> 175
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 175
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg aaacgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 176
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 176

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgtttcgggc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 177
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 177
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccca aagggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 178
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

[0082] <220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 178
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc ctttgggcgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 179
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 179
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccaa aggcgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc 60

tcagtgagcg agcgagcgcg c 81

<210> 180

<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 180
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc tttggcggcc 60

tcagtgagcg agcgagcgcg c 81

<210> 181
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 181
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcaaa gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

[0083]

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 182
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 182
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgct ttgcggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 183
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成

寡核苷酸

<400> 183
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgaa acgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgca g 81

<210> 184
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 184
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg tttcggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgca g 81

<210> 185
<211> 72
[0084] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 185
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 186
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 186
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 187
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 187
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 188
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

[0085] <400> 188
ggagtcaaag ttctgtttgc cctgatctgc atcgctgtgg ccgaggcc 48

<210> 189
<211> 99
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成
寡核苷酸

<400> 189
attcatacca acttgaagaa aaagttcagc ctcttcatcc tggtctttct cctgttcgca 60

gtcatctgtg tttggaagaa agggagcgac tatgaggcc 99

<210> 190
<211> 588
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 190
gcccctctcc ctccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt 60

gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc 120

ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttccct ctcgccaaag 180

gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240

[0086]

aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300

tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc 360

acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca 420

aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 480

gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 540

gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacc 588

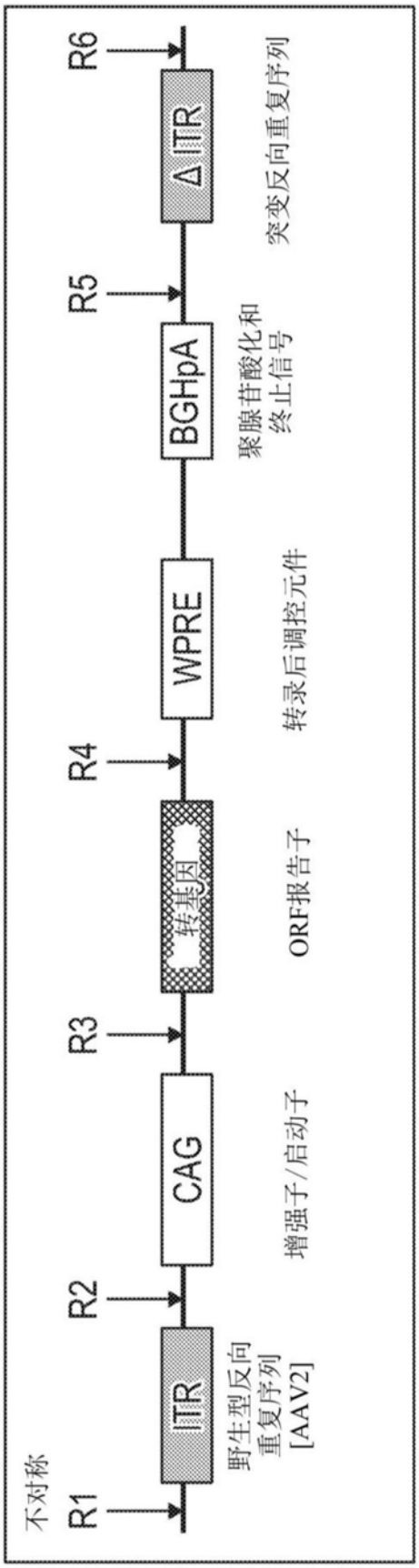

不对称
R1
ITR
野生型反向重复序列[AAV2]
R2
CAG
增强子/启动子
R3
转基因
ORF报告子
R4
WPRE
转录后调控元件
R5
BGHpA
聚腺苷酸化和终止信号
R6
ΔITR
突变反向重复序列

图1A

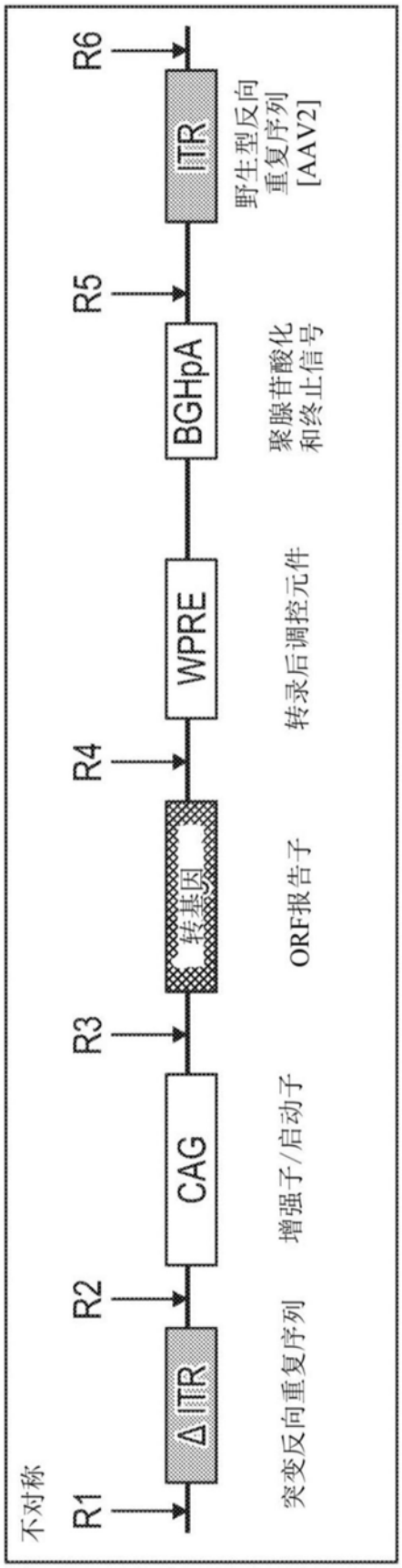

不对称
R1
R2
R3
R4
R5
R6
ΔITR
CAG
转基因
WPRE
BGHpA
ITR
突变反向重复序列
增强子/启动子
ORF报告子
转录后调控元件
聚腺苷酸化
和终止信号
野生型反向
重复序列
[AAV2]

图1B

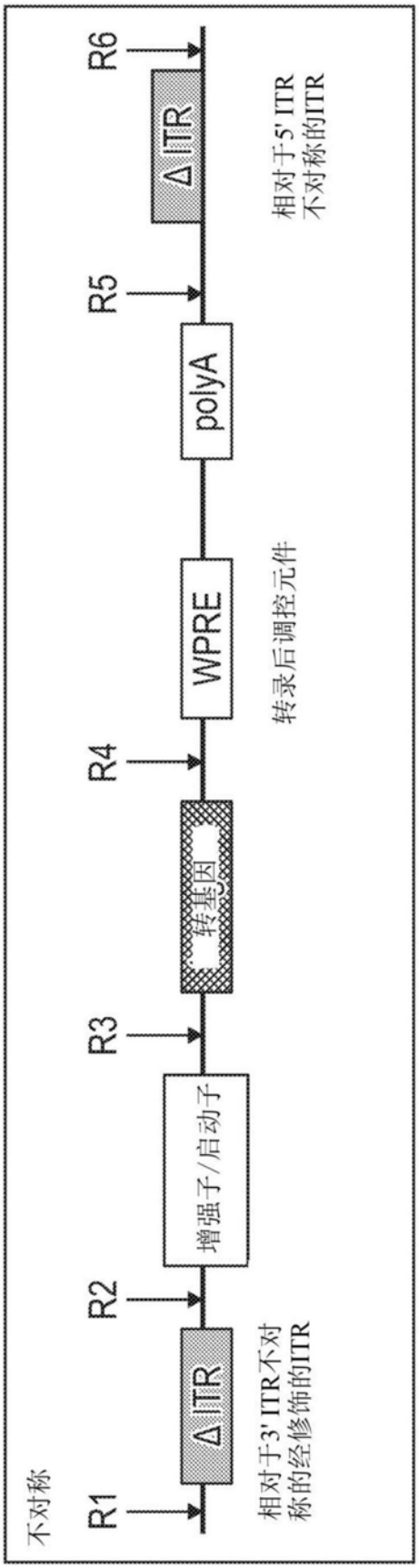

不对称
R1
ΔITR
相对于3' ITR不对称的经修饰的ITR
R2
增强子/启动子
R3
转基因
R4
WPRE
转录后调控元件
R5
polyA
R6
ΔITR
相对于5' ITR不对称的ITR

图1C

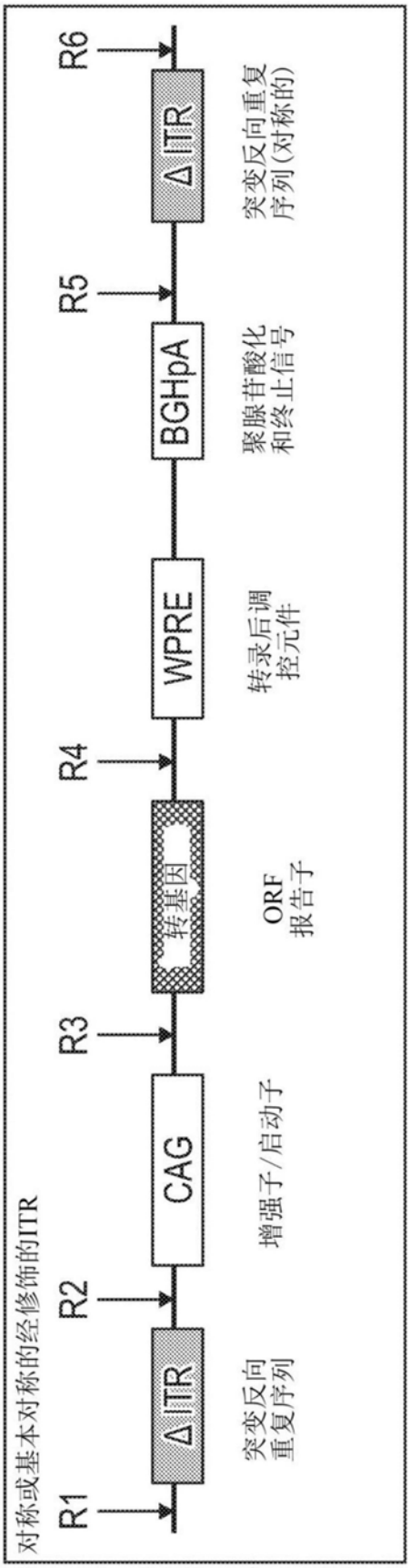

对称或基本对称的经修饰的ITR
R1
ΔITR
突变反向
重复序列
R2
CAG
增强子/启动子
R3
转基因
ORF
报告子
R4
WPRE
转录后调
控元件
R5
BGHpA
聚腺苷酸化
和终止信号
R6
ΔITR
突变反向重复
序列(对称的)

图1D

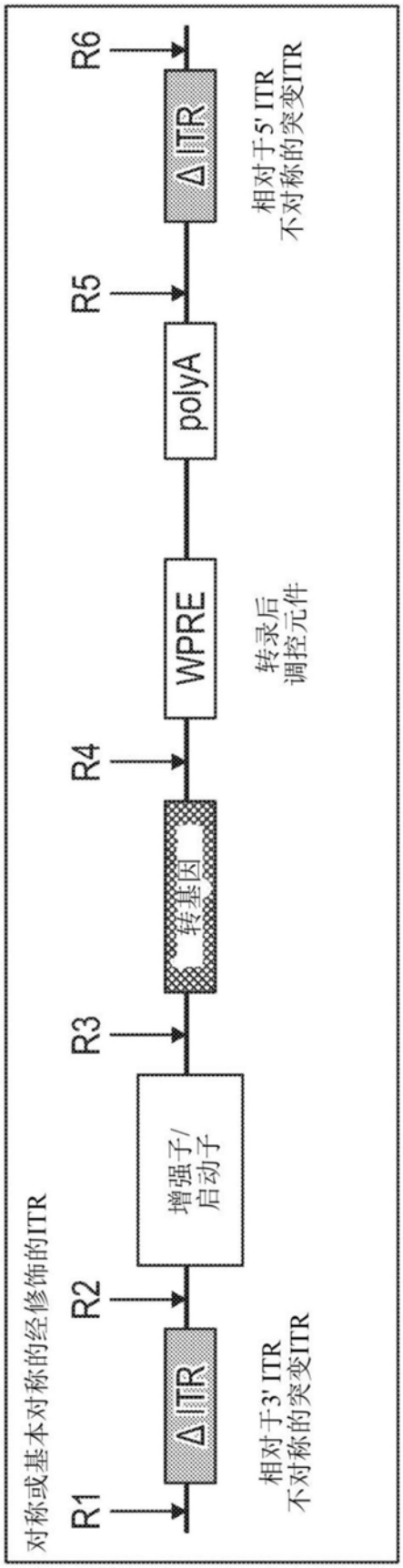

对称或基本对称的经修饰的ITR
R1
ΔITR
R2
增强子/
启动子
R3
转基因
R4
WPRE
R5
polyA
R6
ΔITR
相对于3' ITR
不对称的突变ITR
转录后
调控元件
相对于5' ITR
不对称的突变ITR

图1E

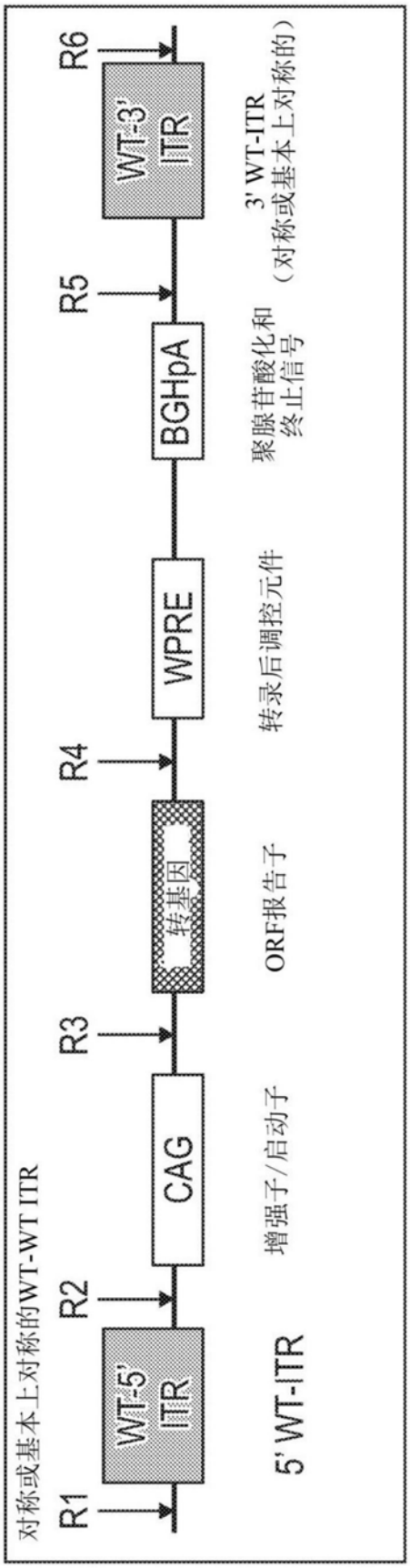

对称或基本上对称的WT-WT ITR
R1
R2
R3
R4
R5
R6
WT-5' ITR
CAG
转基因
WPRE
BGHpA
WT-3' ITR
5' WT-ITR
增强子/启动子
ORF报告子
转录后调控元件
聚腺苷酸化和终止信号
3' WT-ITR（对称或基本上对称的）

图1F

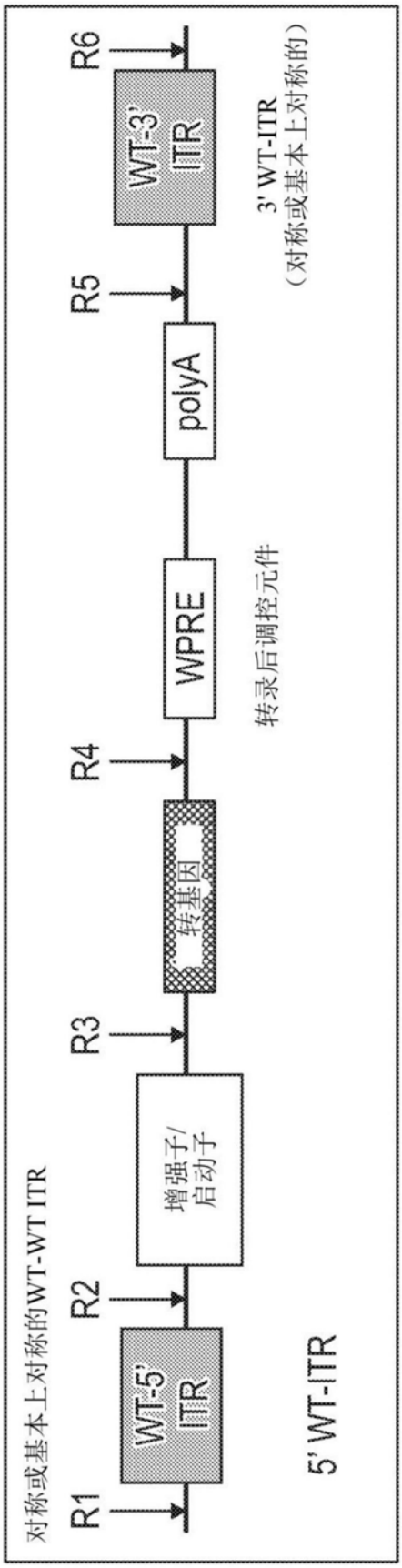

对称或基本上对称的WT-WT ITR
R1
WT-5' ITR
R2
增强子/启动子
R3
转基因
R4
WPRE
R5
polyA
R6
WT-3' ITR
5' WT-ITR
转录后调控元件
3' WT-ITR
（对称或基本上对称的）

图1G

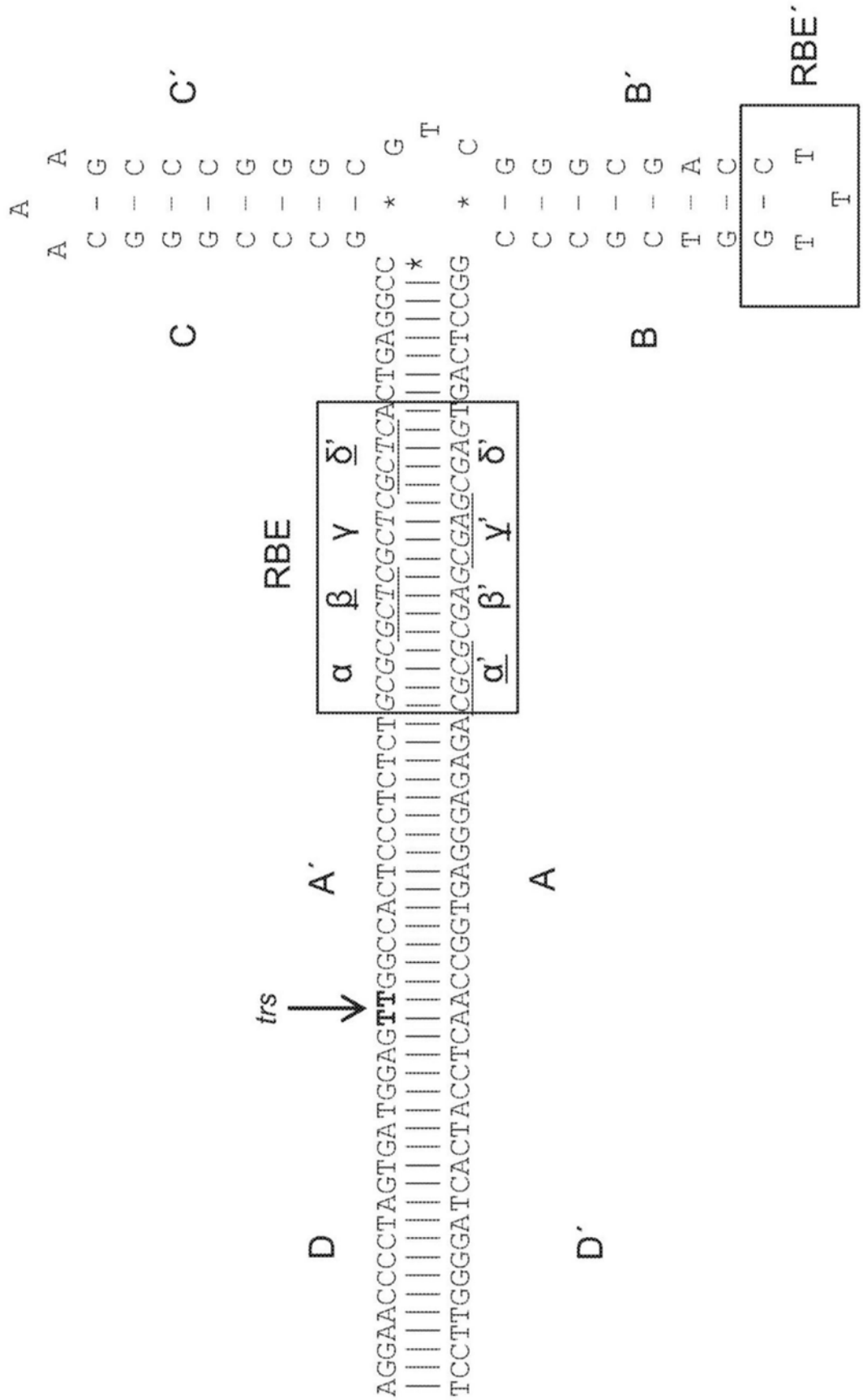


图2A

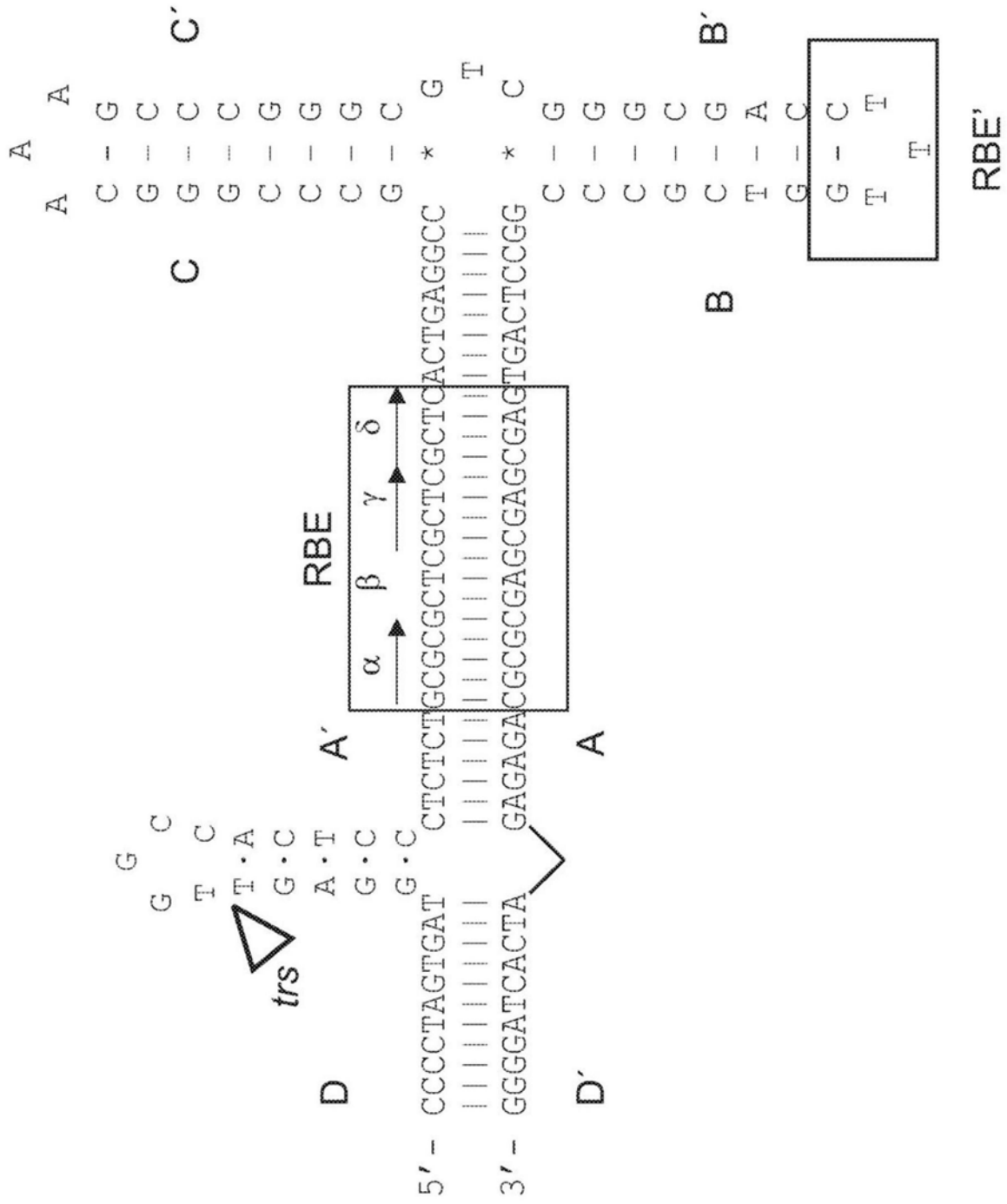

C′
C
B′
B
RBE′
RBE
A′
A
D
D′
trs
α
β
γ
δ
5′ – CCCCTAGTGAT
3′ – GGGGATCACTA
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC
GAGAGACGCGCGAGCGAGCGAGTGACTCCGG

图2B

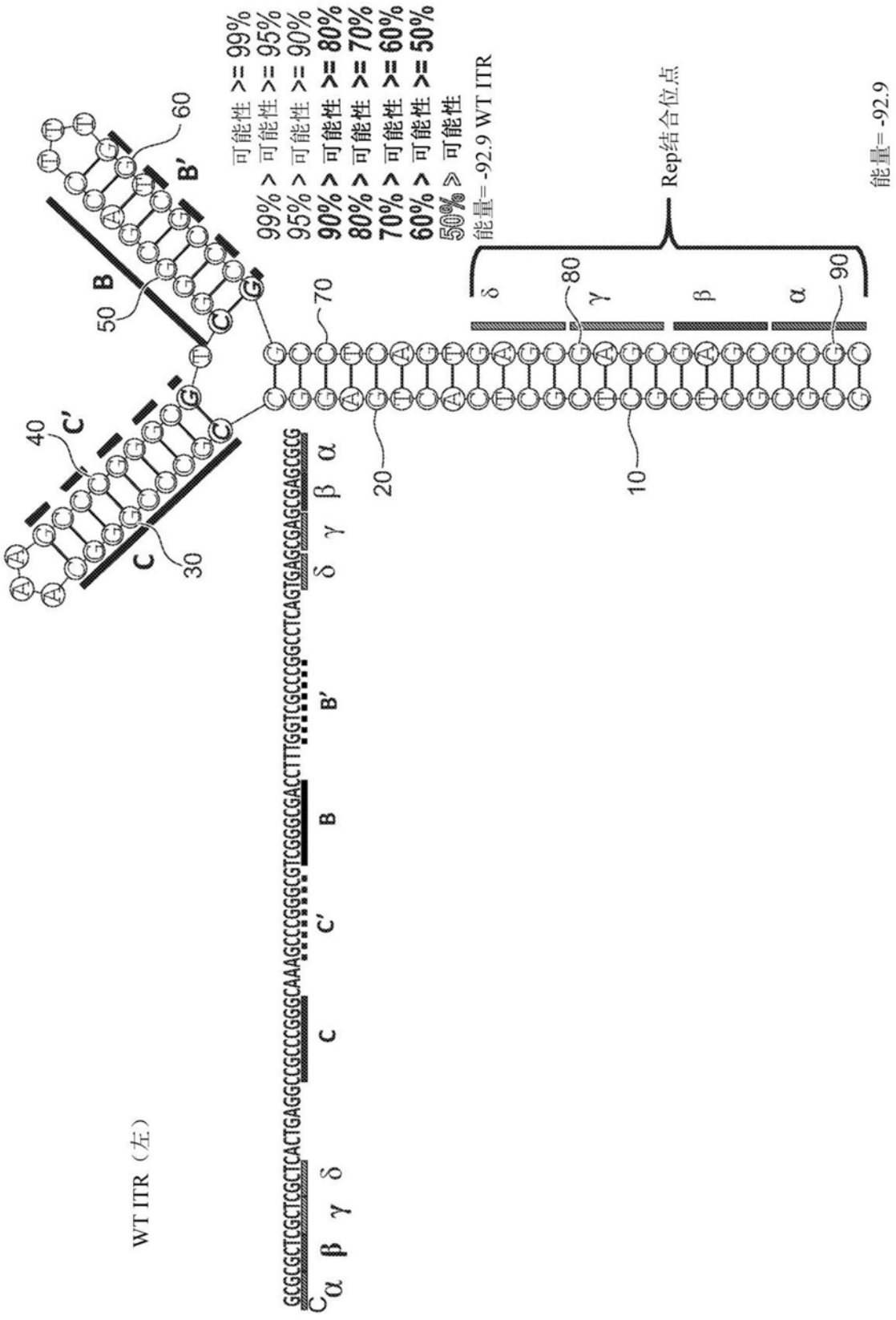

WT ITR（左）
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
α β γ δ
C
C'
B
B'
δ γ β α
可能性 >= 99%
99% > 可能性 >= 95%
95% > 可能性 >= 90%
90% > 可能性 >= 80%
80% > 可能性 >= 70%
70% > 可能性 >= 60%
60% > 可能性 >= 50%
50% ≥ 可能性
能量= -92.9 WT ITR
Rep结合位点
能量= -92.9
δ
γ
β
α
10
20
30
40
50
60
70
80
90

图3A

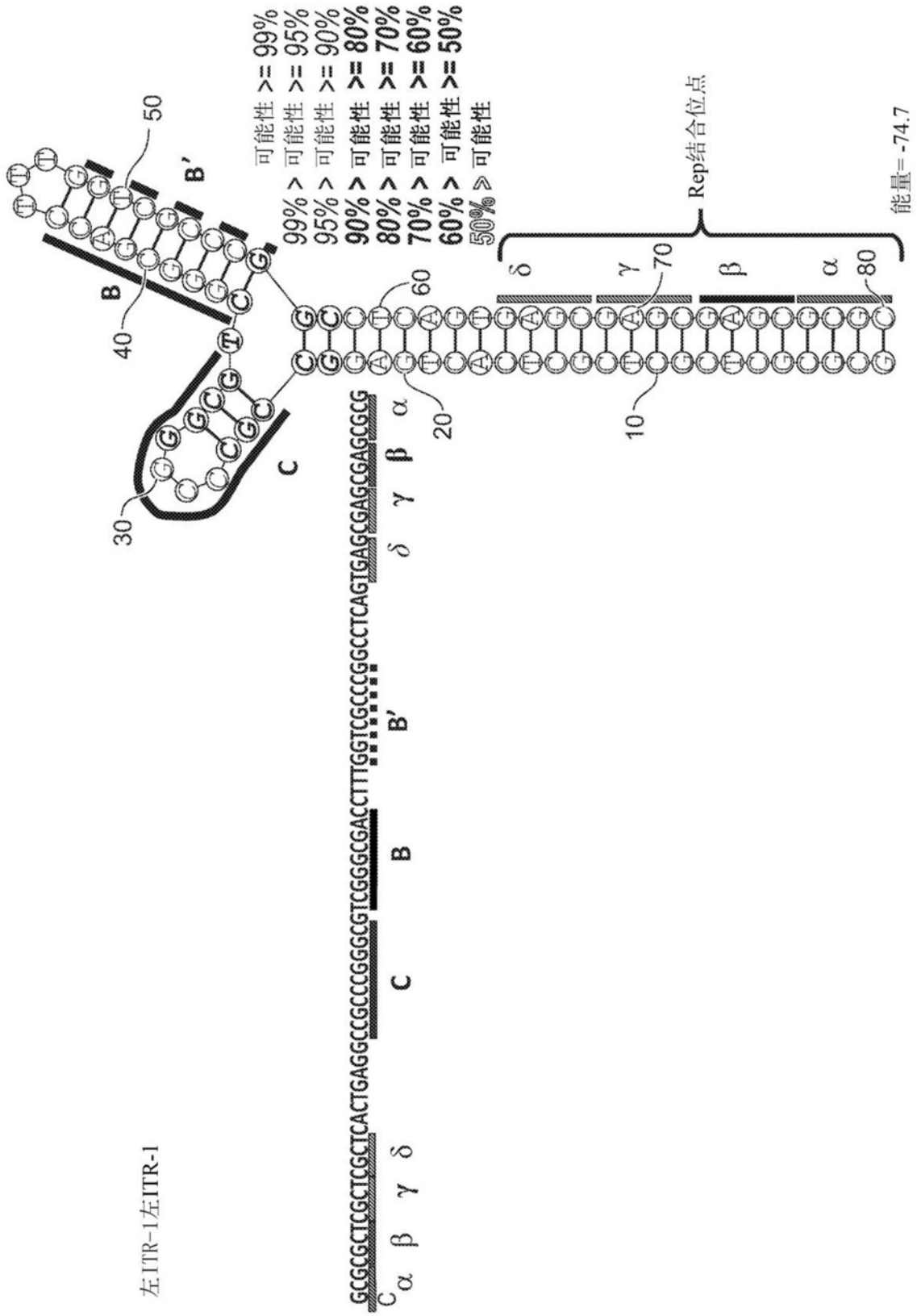

左ITR-1左ITR-1
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
α β γ δ
C
B
B'
δ γ β α
10
20
30
40
50
60
70
80
B
B'
C
可能性 >= 99%
99% > 可能性 >= 95%
95% > 可能性 >= 90%
90% > 可能性 >= 80%
80% > 可能性 >= 70%
70% > 可能性 >= 60%
60% > 可能性 >= 50%
50% ≥ 可能性
Rep结合位点
能量= -74.7

图3B

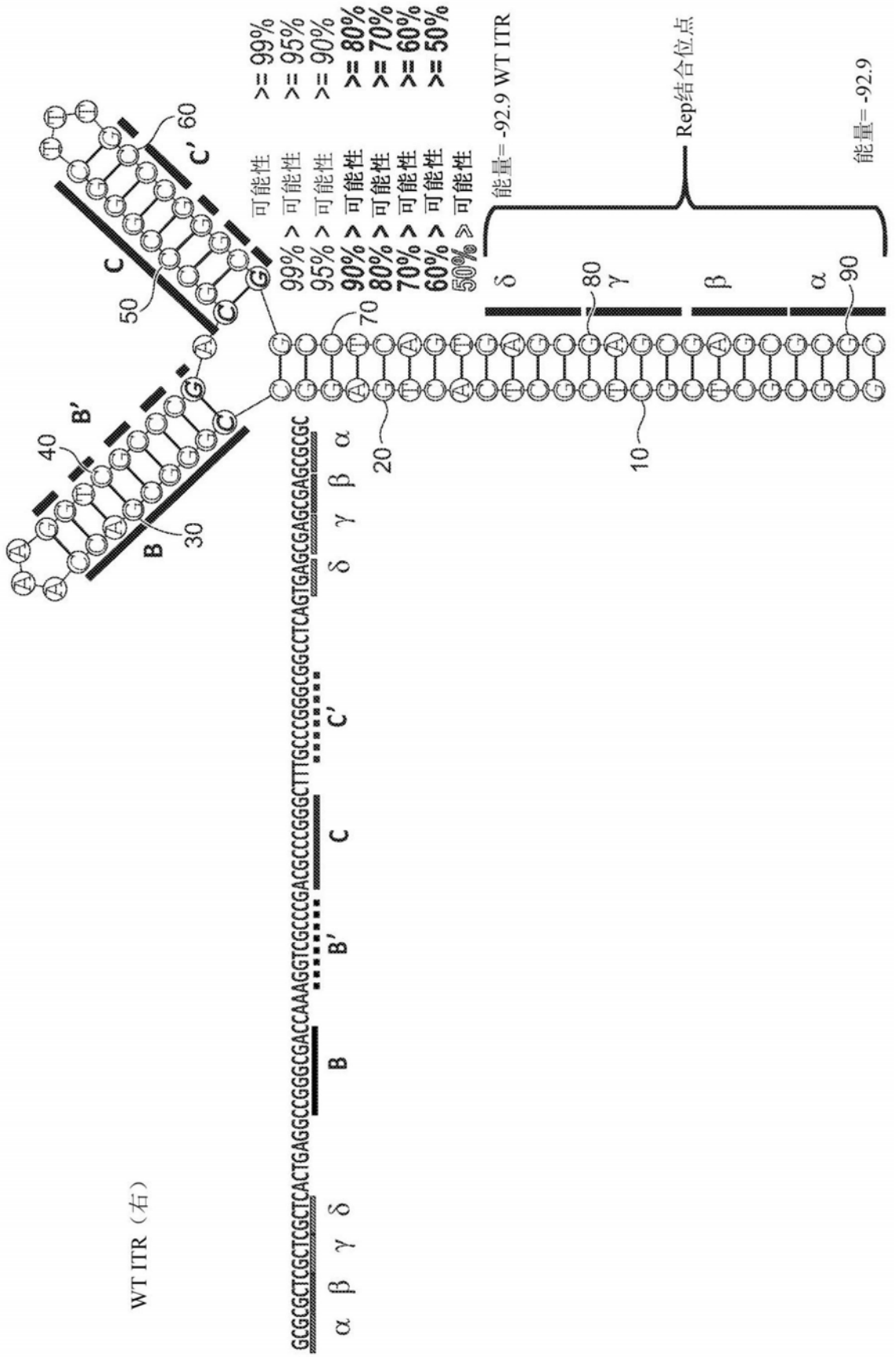

WT ITR（右）
α β γ δ
B
B′
C
C′
δ γ β α
>= 99%
>= 95%
>= 90%
>= 80%
>= 70%
>= 60%
>= 50%
可能性
99% > 可能性
95% > 可能性
90% > 可能性
80% > 可能性
70% > 可能性
60% > 可能性
50% ≥ 可能性
能量= -92.9 WT ITR
Rep结合位点
能量= -92.9
δ
γ
β
α
10
20
30
40
50
60
70
80
90

图3C

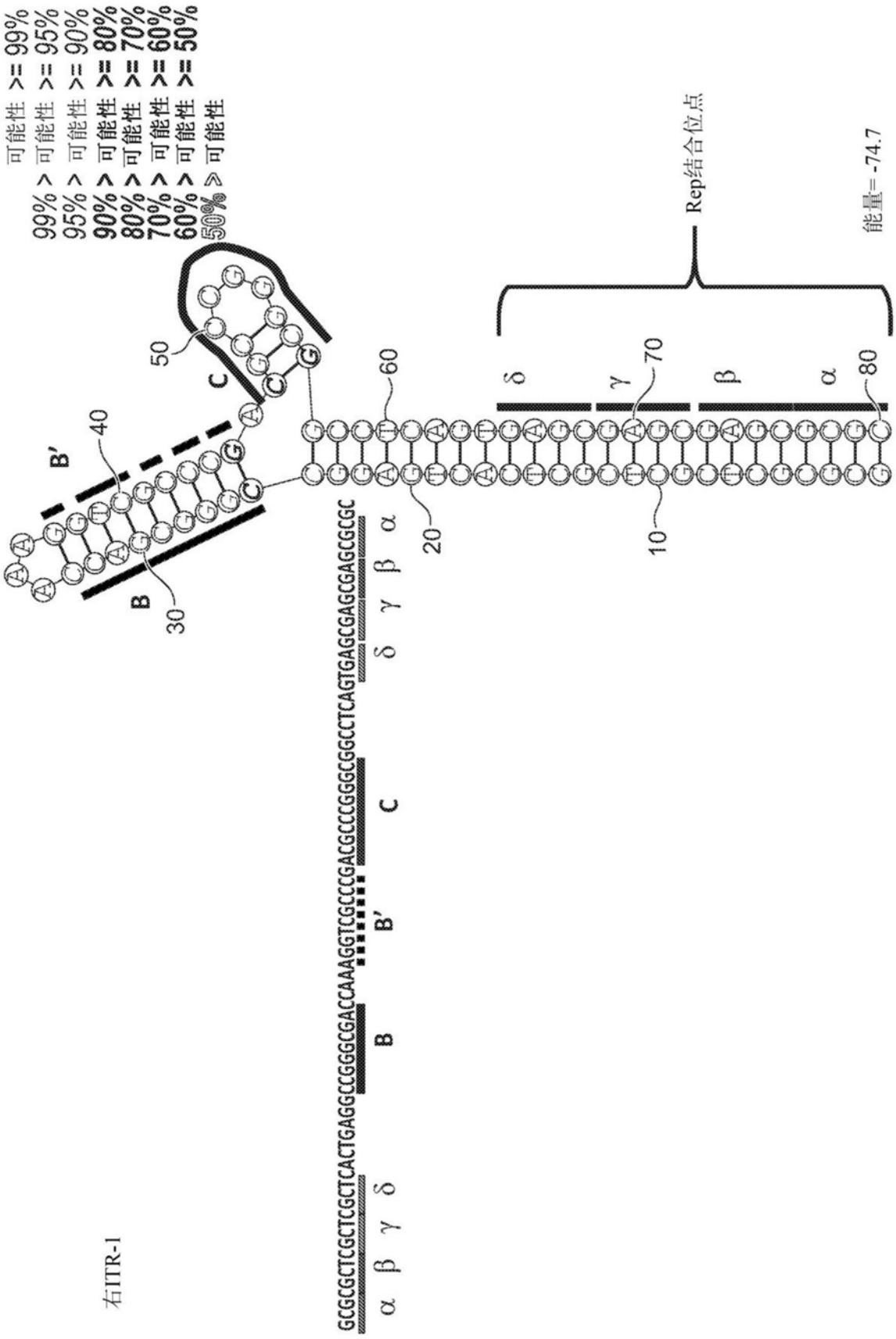

可能性 >= 99%
99% > 可能性 >= 95%
95% > 可能性 >= 90%
90% > 可能性 >= 80%
80% > 可能性 >= 70%
70% > 可能性 >= 60%
60% > 可能性 >= 50%
50% ≥ 可能性
Rep结合位点
能量= -74.7
右ITR-1
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
α β γ δ B B' C δ γ β α
10
20
30
40
50
60
70
80

图3D

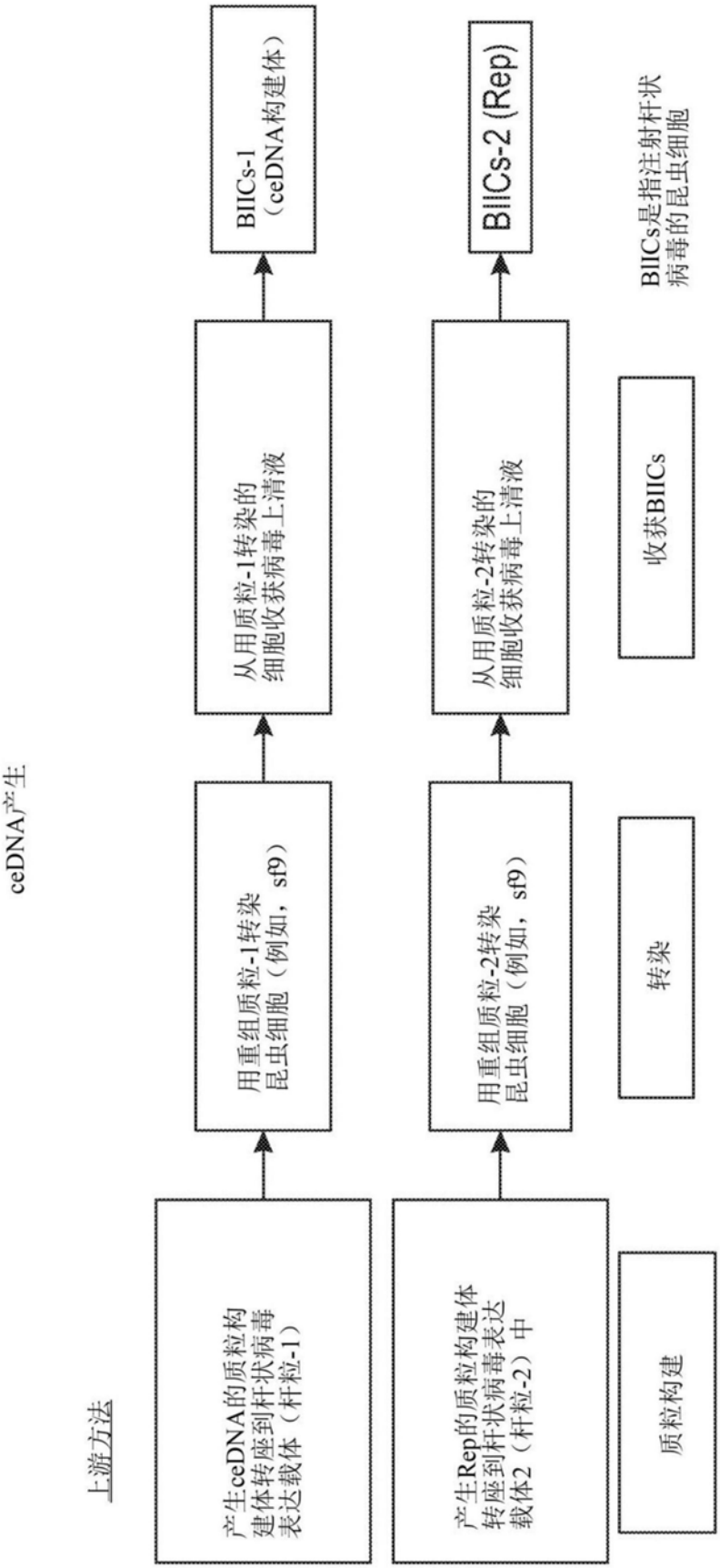

上游方法
质粒构建
产生Rep的质粒构建体转座到杆状病毒表达载体2（杆粒-2）中
产生ceDNA的质粒构建体转座到杆状病毒表达载体（杆粒-1）
转染
用重组质粒-2转染昆虫细胞（例如，sf9）
用重组质粒-1转染昆虫细胞（例如，sf9）
收获BIICs
从用质粒-2转染的细胞收获病毒上清液
从用质粒-1转染的细胞收获病毒上清液
BIICs-2 (Rep)
BIICs-1（ceDNA构建体）
ceDNA产生
BIICs是指注射杆状病毒的昆虫细胞

图4A

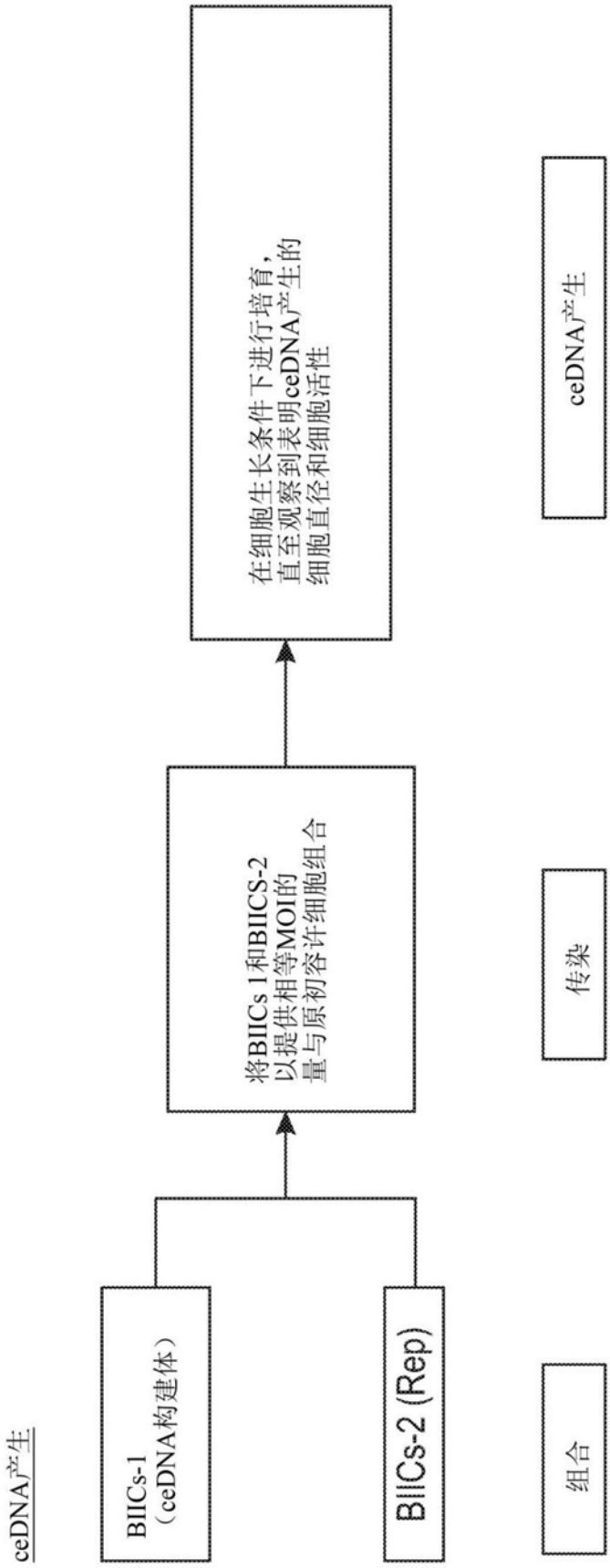

ceDNA产生
BIICs-1
（ceDNA构建体）
BIICs-2 (Rep)
组合
将BIICs 1和BIICS-2
以提供相等MOI的
量与原初容许细胞组合
传染
在细胞生长条件下进行培育，
直至观察到表明ceDNA产生的
细胞直径和细胞活性
ceDNA产生
ceDNA产生

图4B

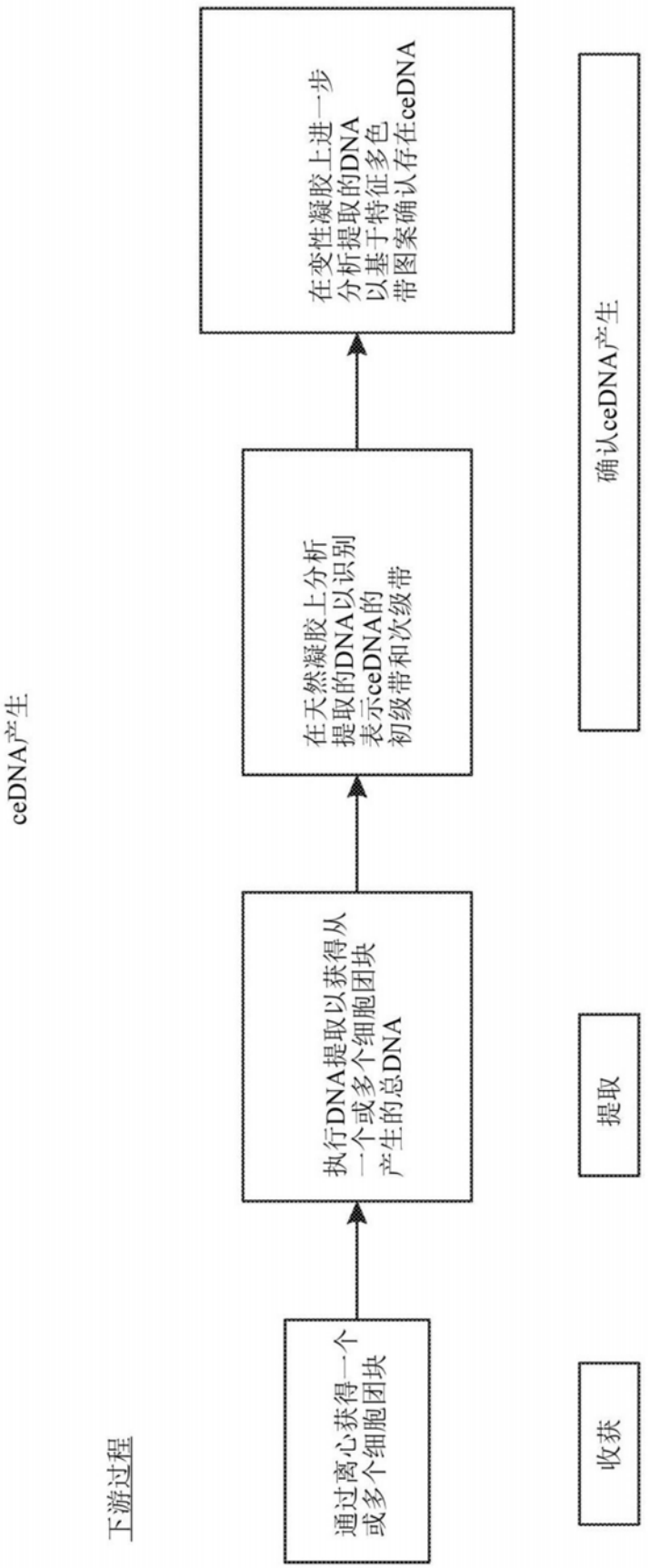

下游过程
通过离心获得一个或多个细胞团块
执行DNA提取以获得从一个或多个细胞团块产生的总DNA
在天然凝胶上分析提取的DNA以识别表示ceDNA的初级带和次级带
在变性凝胶上进一步分析提取的DNA以基于特征多色带图案确认存在ceDNA
ceDNA产生
收获
提取
确认ceDNA产生

图4C

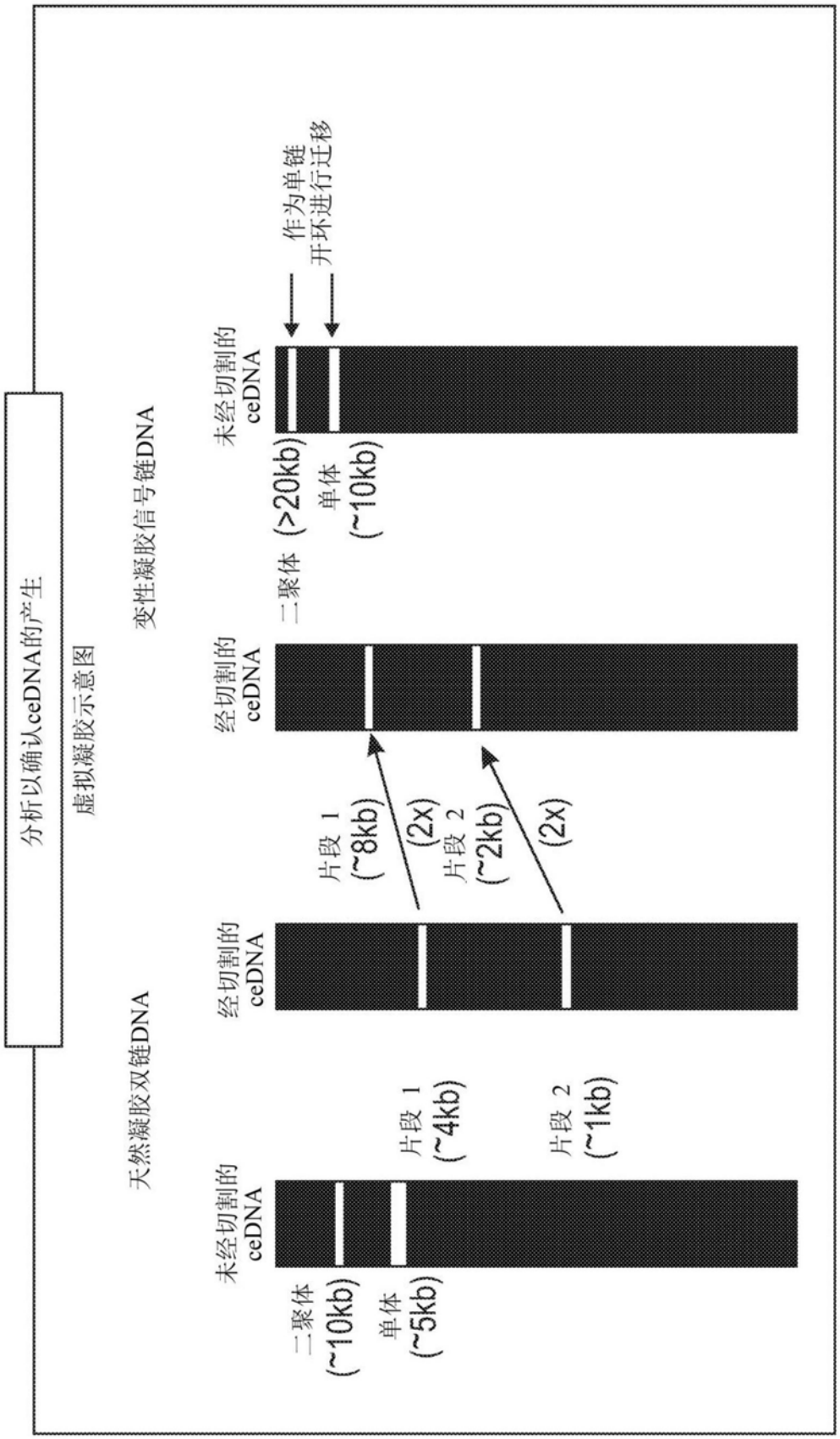

分析以确认ceDNA的产生
虚拟凝胶示意图
天然凝胶双链DNA
变性凝胶信号链DNA
未经切割的ceDNA
二聚体 (~10kb)
单体 (~5kb)
经切割的ceDNA
片段 1 (~4kb)
片段 2 (~1kb)
经切割的ceDNA
片段 1 (~8kb)
(2x)
片段 2 (~2kb)
(2x)
未经切割的ceDNA
二聚体 (>20kb)
单体 (~10kb)
作为单链开环进行迁移

图4D

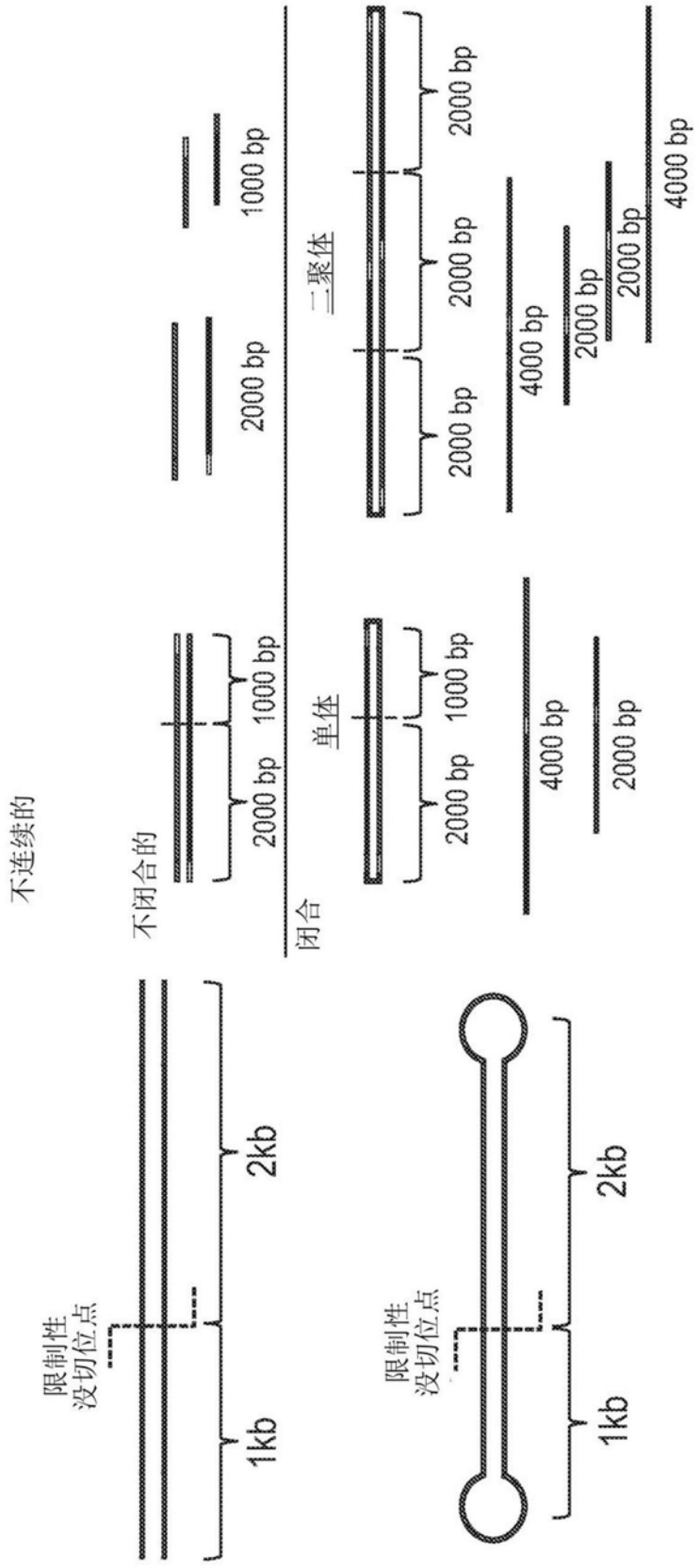

不连续的
不闭合的
2000 bp
1000 bp
闭合
单体
二聚体
2000 bp
1000 bp
2000 bp
2000 bp
2000 bp
2000 bp
4000 bp
4000 bp
2000 bp
2000 bp
4000 bp
线性连续的
限制性
没切位点
1kb
2kb
限制性
没切位点
1kb
2kb

图4E

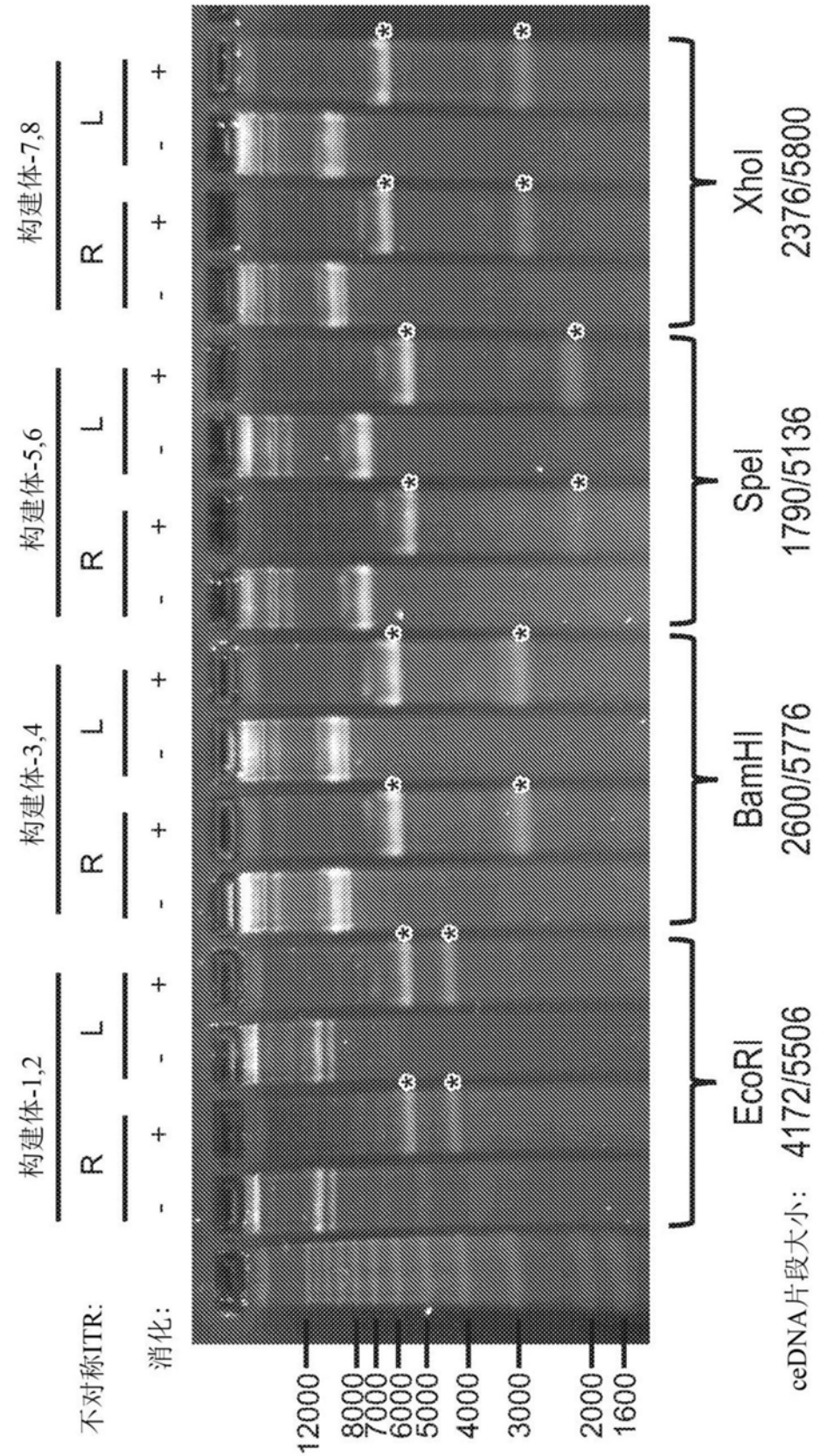

不对称ITR:
构建体-1,2
构建体-3,4
构建体-5,6
构建体-7,8
R
L
消化:
-
+
12000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1600
EcoRI
BamHI
SpeI
XhoI
ceDNA片段大小:
4172/5506
2600/5776
1790/5136
2376/5800

图5

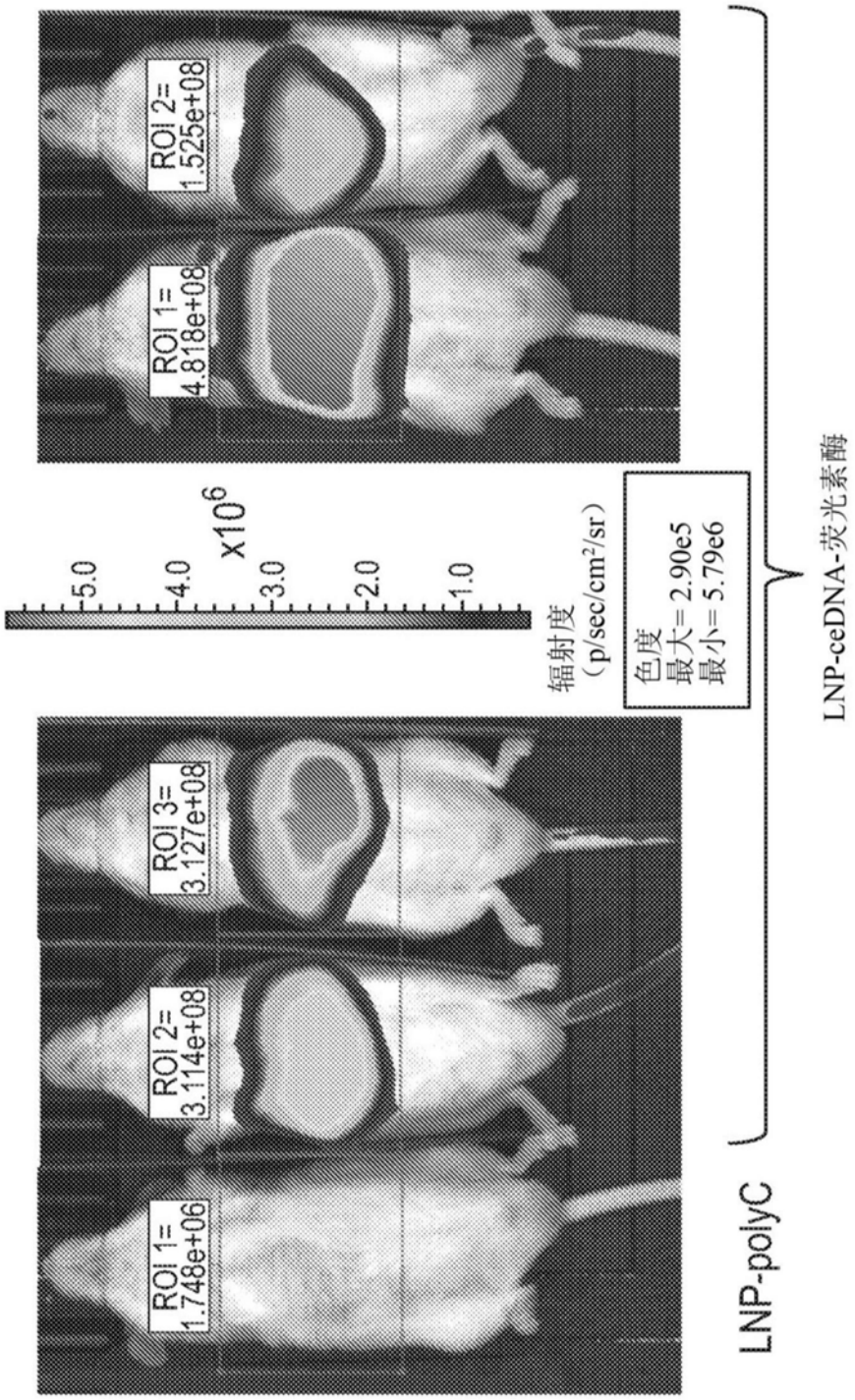

ROI 1= 1.748e+06
ROI 2= 3.114e+08
ROI 3= 3.127e+08
ROI 1= 4.818e+08
ROI 2= 1.525e+08
5.0
4.0
x10^6
3.0
2.0
1.0
辐射度
(p/sec/cm²/sr)
色度
最大= 2.90e5
最小= 5.79e6
LNP-polyC
LNP-ceDNA-荧光素酶

图6

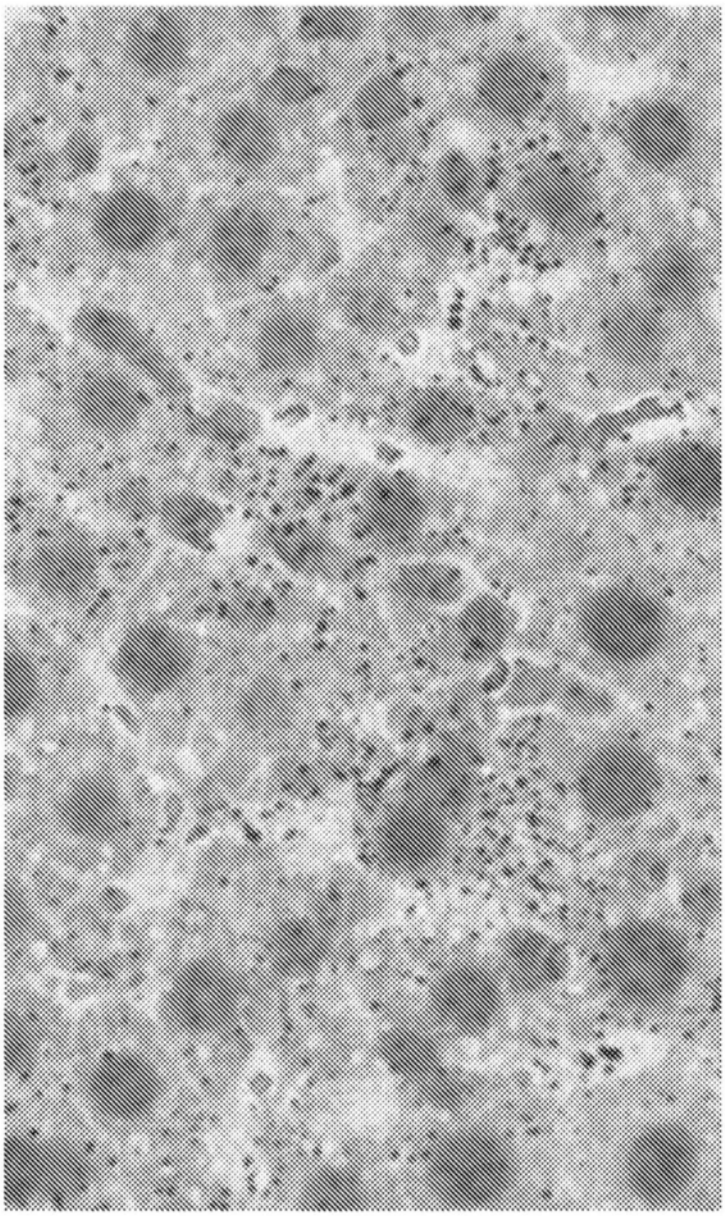


图7

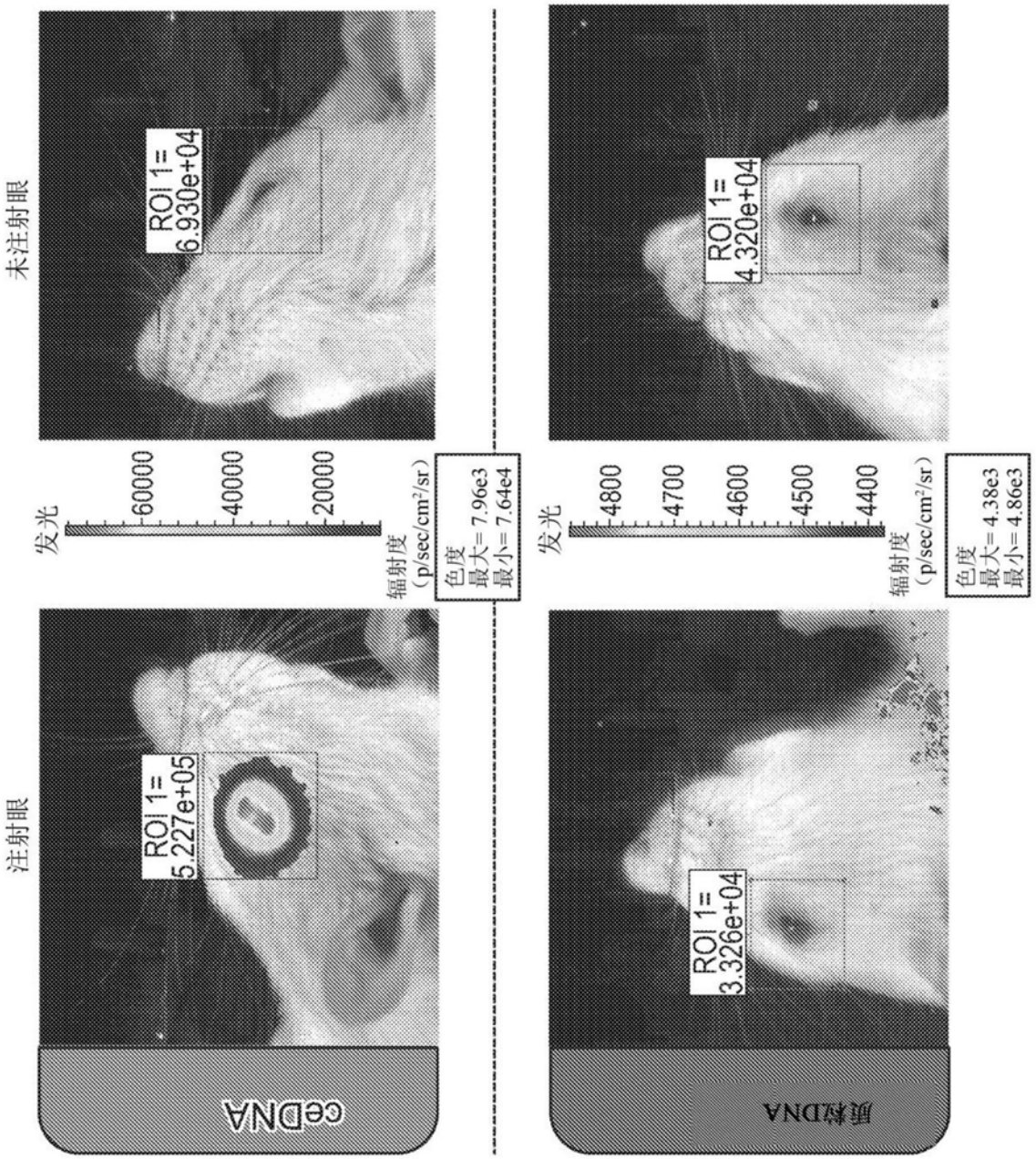

未注射眼
ROI 1=
6.930e+04
ROI 1=
4.320e+04
发光
60000
40000
20000
4800
4700
4600
4500
4400
辐射度
(p/sec/cm²/sr)
色度
最大= 7.96e3
最小= 7.64e4
色度
最大= 4.38e3
最小= 4.86e3
注射眼
ROI 1=
5.227e+05
ROI 1=
3.326e+04
ceDNA
质粒DNA

图8A

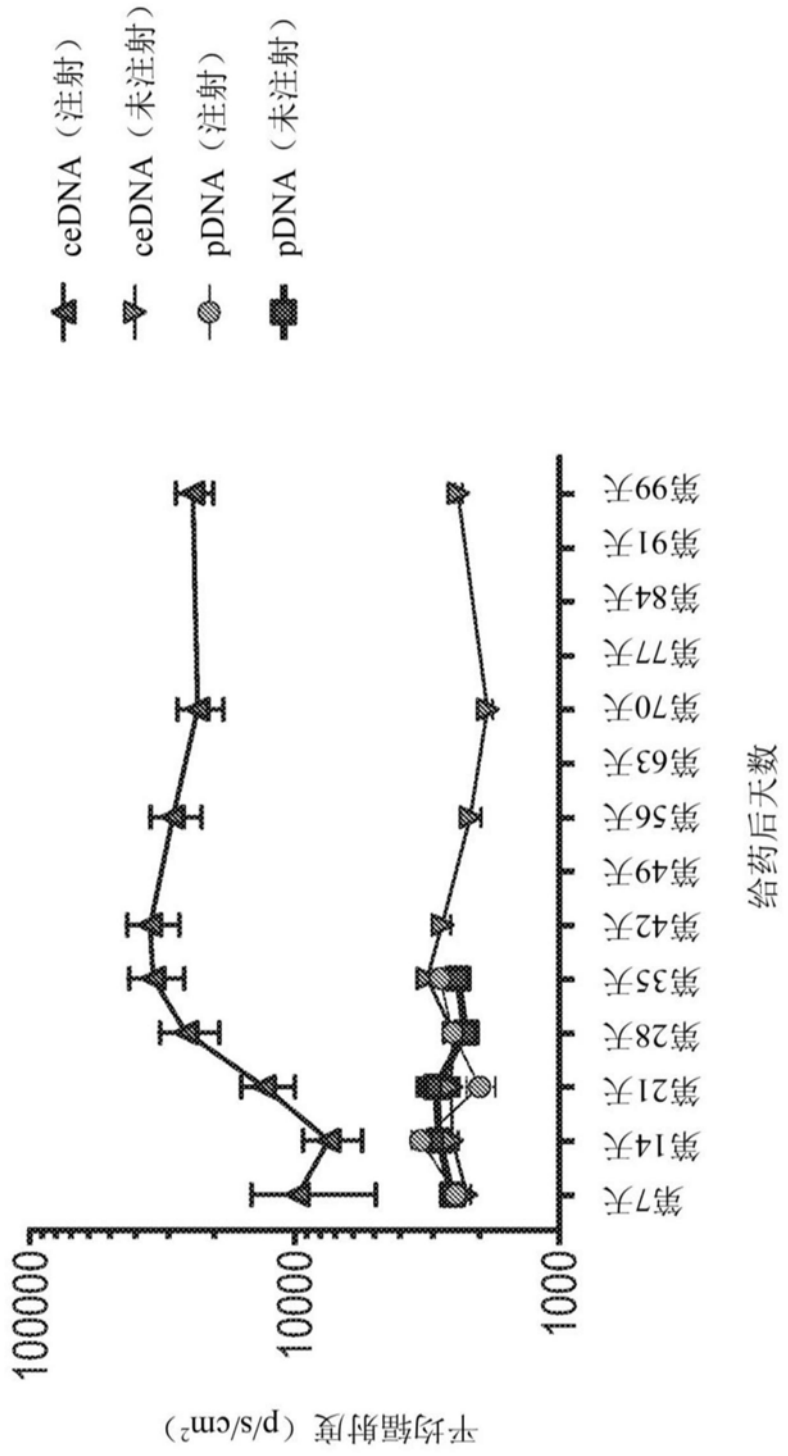

ceDNA（注射）
ceDNA（未注射）
pDNA（注射）
pDNA（未注射）
100000
10000
1000
平均辐射度（p/s/cm²）
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
第63天
第70天
第77天
第84天
第91天
第99天
给药后天数

图8B

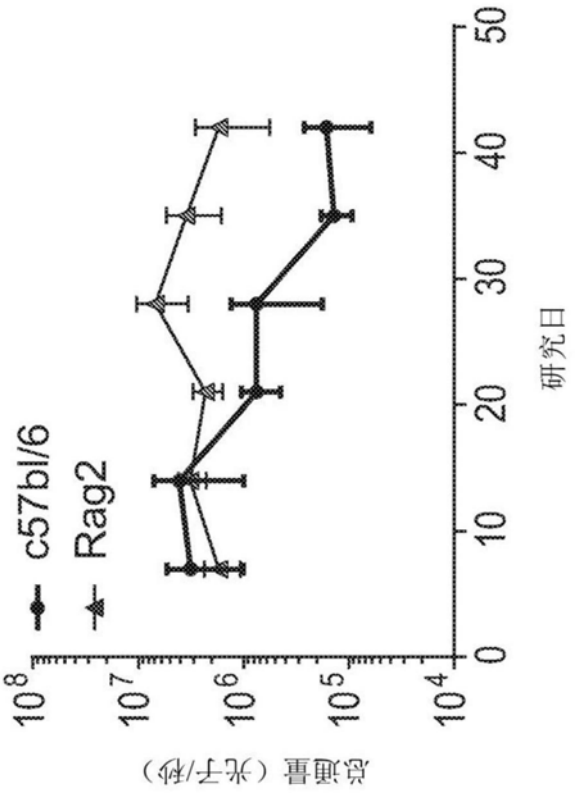


图9A

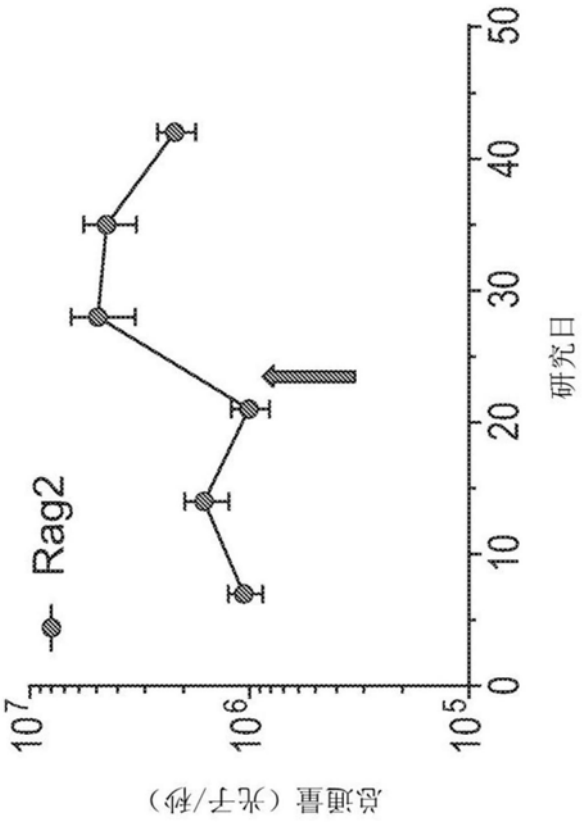


图9B

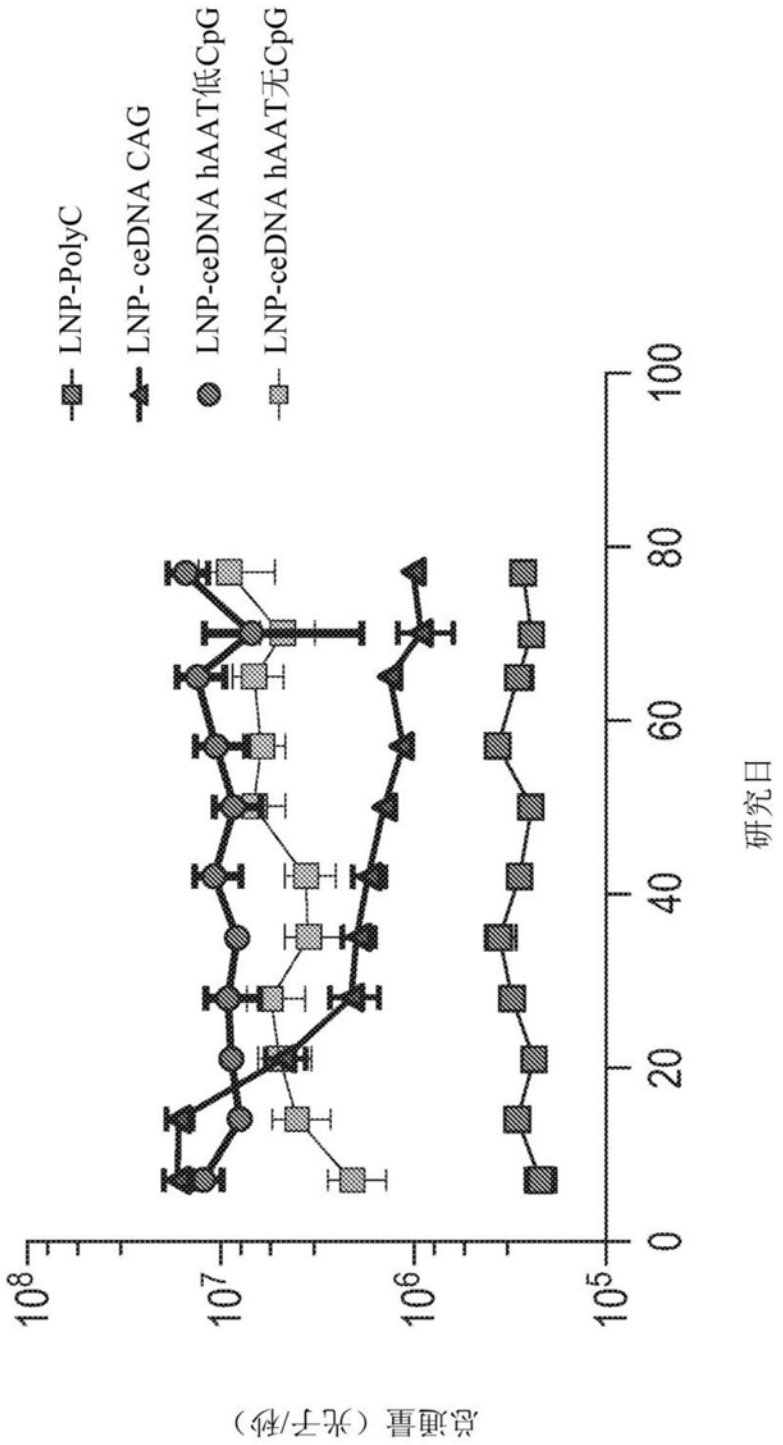

LNP-PolyC
LNP- ceDNA CAG
LNP-ceDNA hAAT低CpG
LNP-ceDNA hAAT无CpG
总通量（光子/秒）
10^8
10^7
10^6
10^5
0
20
40
60
80
100
研究日

图10

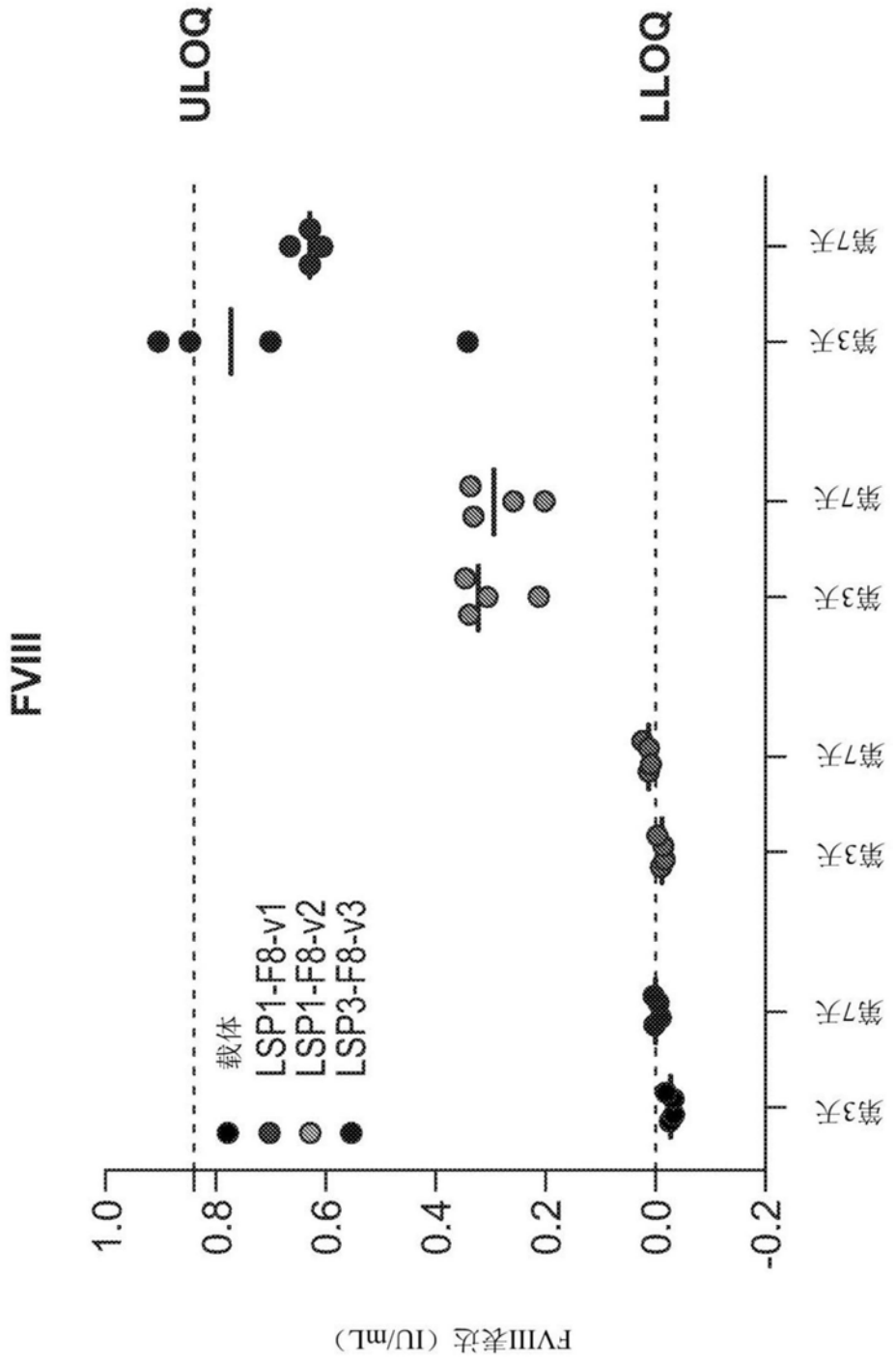

ULOQ
LLOQ
FVIII
载体
LSP1-F8-v1
LSP1-F8-v2
LSP3-F8-v3
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
第3天
第7天
第7天
第3天
第7天
第3天
第7天
第3天
FVIII表达（IU/mL）

图11A

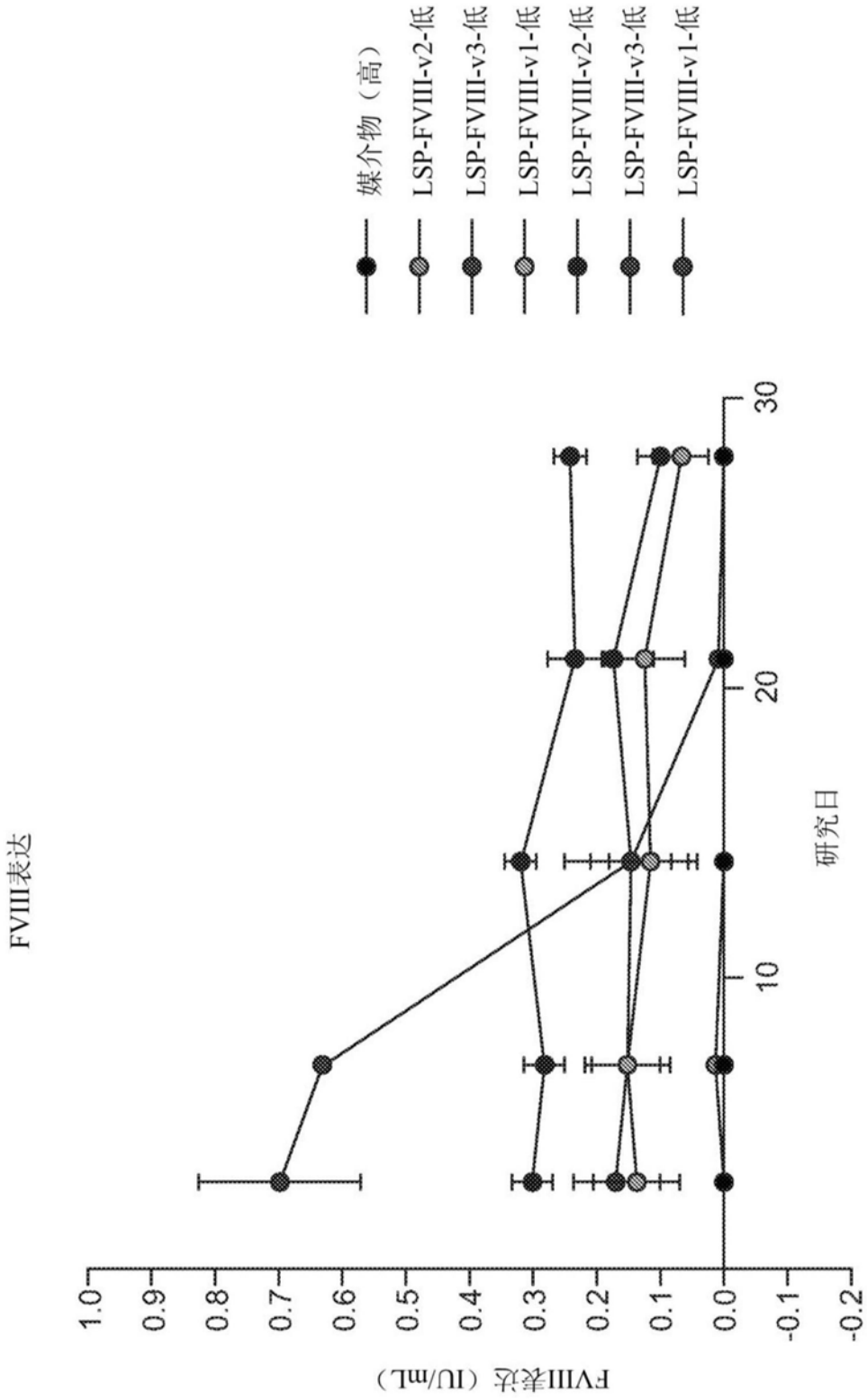

FVIII表达
媒介物（高）
LSP-FVIII-v2-低
LSP-FVIII-v3-低
LSP-FVIII-v1-低
LSP-FVIII-v2-低
LSP-FVIII-v3-低
LSP-FVIII-v1-低
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
FVIII表达（IU/mL）
10
20
30
研究日

图11B

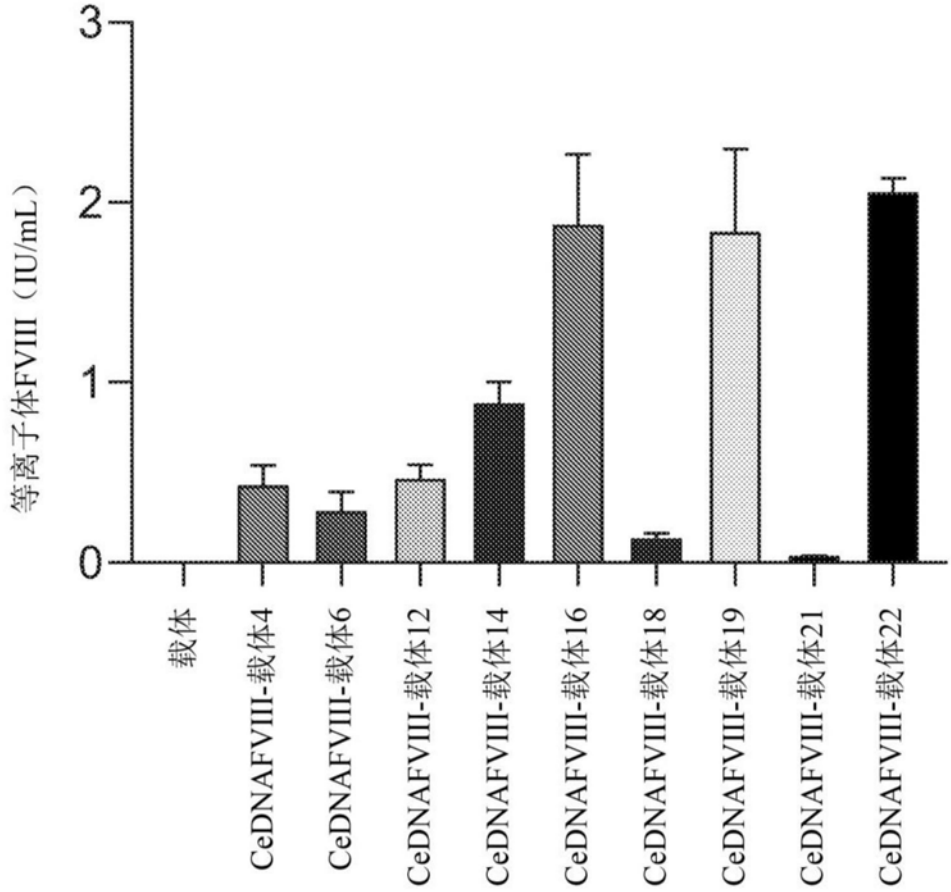

3
2
1
0
等离子体FVIII（IU/mL）
载体
CeDNAFVIII-载体4
CeDNAFVIII-载体6
CeDNAFVIII-载体12
CeDNAFVIII-载体14
CeDNAFVIII-载体16
CeDNAFVIII-载体18
CeDNAFVIII-载体19
CeDNAFVIII-载体21
CeDNAFVIII-载体22

图12

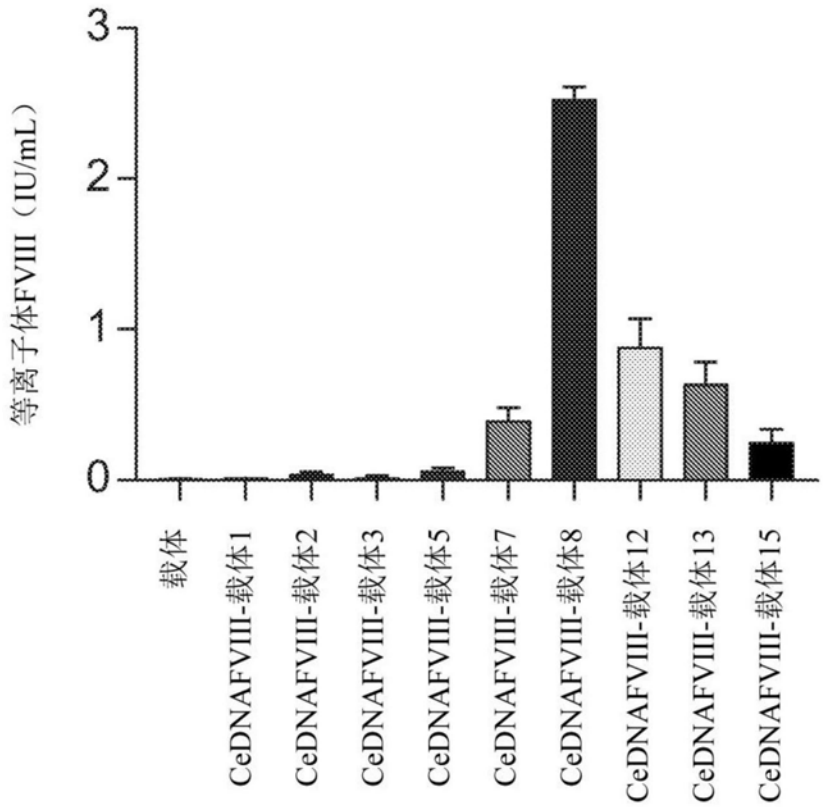

等离子体FVIII（IU/mL）
3
2
1
0
载体
CeDNAFVIII-载体1
CeDNAFVIII-载体2
CeDNAFVIII-载体3
CeDNAFVIII-载体5
CeDNAFVIII-载体7
CeDNAFVIII-载体8
CeDNAFVIII-载体12
CeDNAFVIII-载体13
CeDNAFVIII-载体15

图13

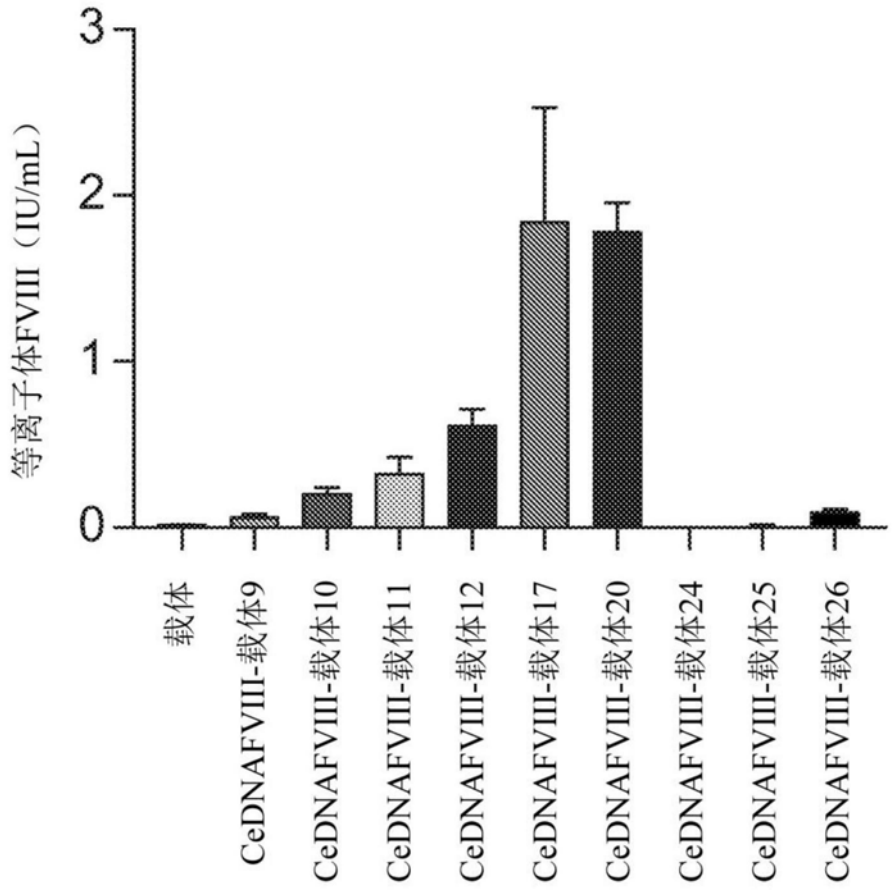

等离子体FVIII（IU/mL）
3
2
1
0
载体
CeDNAFVIII-载体9
CeDNAFVIII-载体10
CeDNAFVIII-载体11
CeDNAFVIII-载体12
CeDNAFVIII-载体17
CeDNAFVIII-载体20
CeDNAFVIII-载体24
CeDNAFVIII-载体25
CeDNAFVIII-载体26

图14

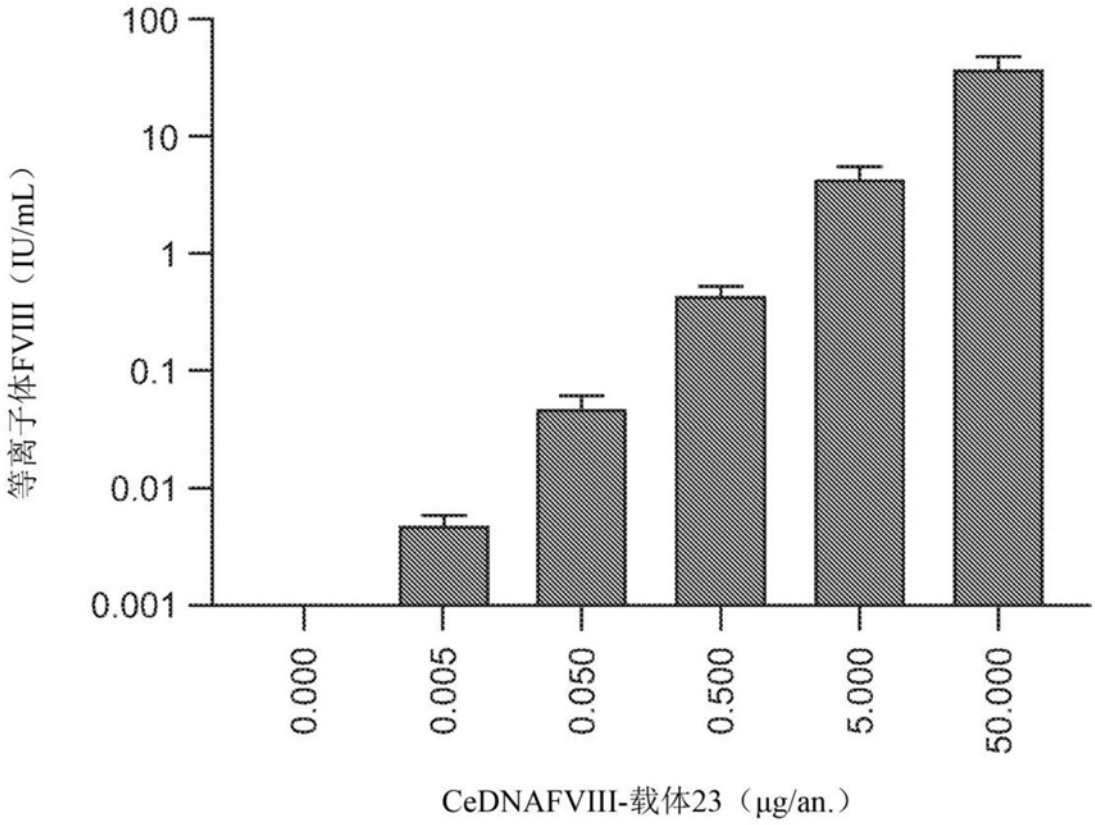

100
10
1
0.1
0.01
0.001
等离子体FVIII（IU/mL）
0.000
0.005
0.050
0.500
5.000
50.000
CeDNAFVIII-载体23（μg/an.）

图15

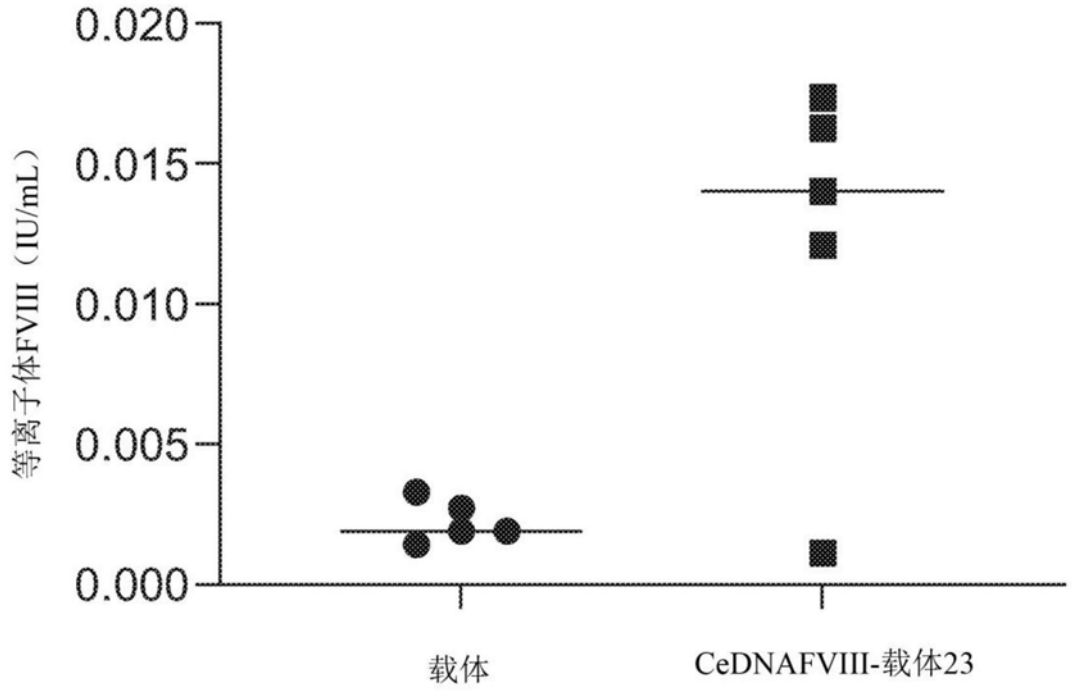

0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
等离子体FVIII（IU/mL）
载体
CeDNAFVIII-载体23

图16