



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0039314

(51)⁷ C07H 21/04; A61K 35/76; A61K 38/48; (13) B
A61K 48/00; A61P 7/04; A61K 31/7088;
C07K 14/005; C07K 14/745; C12N
15/62; C12N 15/85; C12N 15/86

(21) 1-2019-07221

(22) 22/05/2018

(86) PCT/US2018/033866 22/05/2018

(87) WO 2018/217731 29/11/2018

(30) 62/509,616 22/05/2017 US

(45) 25/04/2024 433

(43) 27/07/2020 388

(73) Takeda Pharmaceutical Company Limited (JP)

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan

(72) HORLING, Franziska (DE); LENGLER, Johannes (DE); FALKNER, Falko-Günter (DE); ROTTENSTEINER, Hanspeter (AT); SCHEIFLINGER, Friedrich (AT).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM AXIT NUCLEIC BAO GỒM POLYNUCLEOTIT YẾU TỐ IX MÃ HÓA PROTEIN YẾU TỐ IX VÀ PHƯƠNG PHÁP IN VITRO ĐỂ TẠO RA HẠT VIRUT LIÊN QUAN ĐẾN ADENO

(57) Sáng chế đề xuất, cùng với các khía cạnh khác, chế phẩm axit nucleic bao gồm polynucleotit Yếu tố IX mã hóa protein Yếu tố IX để điều trị bệnh máu khó đông typ B. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp *in vitro* để tạo ra hạt virus liên quan đến adeno bao gồm việc đưa chế phẩm axit nucleic vào trong tế bào chủ động vật có vú, trong đó chế phẩm axit nucleic này có khả năng sao chép trong tế bào chủ động vật có vú này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm axit nucleic bao gồm polynucleotit yếu tố IX mã hóa protein yếu tố IX và phương pháp *in vitro* để tạo ra hạt virus liên quan đến adeno.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự đông máu xảy ra qua một con đường sinh học phức tạp và chức năng gồm nhiều phản ứng sinh hóa phụ thuộc lẫn nhau, được gọi là dòng thác đông máu. Yếu tố đông máu VIII (FVIII) và Yếu tố đông máu IX (FIX) là thành phần chủ chốt trong dòng thác này. Yếu tố VIII được kết tập đến vị trí chảy máu, và tạo ra phức Xaza với Yếu tố IX và Yếu tố X (FX) đã hoạt hóa. Phức Xaza hoạt hóa FX, việc này tiếp theo lại hoạt hóa prothrombin thành thrombin, sau đó nó hoạt hóa các thành phần khác trong dòng thác đông máu để tạo ra cục máu ổn định (xem trong Saenko và đồng tác giả, Trends Cardiovasc. Med., 9:185-192 (1999); Lenting và đồng tác giả, Blood, 92:3983-3996 (1998)).

Bệnh máu khó đông typ B là rối loạn chảy máu bẩm sinh liên quan đến đột biến có đặc trưng bởi sự suy giảm hoạt tính yếu tố IX. Thông thường, hoạt tính Yếu tố VIII/Yếu tố IX suy giảm sẽ ức chế chu trình hồi tiếp tích cực trong dòng thác đông máu. Điều này gây ra sự đông máu không hoàn toàn, mà biểu hiện là các giai đoạn đông máu với thời gian tăng lên, bầm tím rộng, chảy máu mũi và miệng tự phát, cứng khớp và đau mãn tính, và có thể chảy máu trong và thiếu máu trong các trường hợp nặng. (Zhang và đồng tác giả, Clinic. Rev. Allerg. Immunol., 37:114-124 (2009)).

Thông thường, bệnh máu khó đông typ B được điều trị bởi liệu pháp thay thế yếu tố IX, liệu pháp này bao gồm việc sử dụng protein Yếu tố IX (ví dụ, Yếu tố IX từ huyết tương hoặc được tạo ra tái tổ hợp) cho cá thể mắc bệnh máu khó đông typ B. Yếu tố IX được sử dụng dự phòng để phòng hoặc làm giảm tần suất của các giai đoạn đông máu, để đáp lại giai đoạn đông máu cấp tính, và/hoặc sử dụng trong phẫu thuật để kiểm soát sự chảy máu trong phẫu thuật. Tuy nhiên, có nhiều đặc điểm không mong muốn của liệu pháp thay thế Yếu tố IX.

Đầu tiên, liệu pháp thay thế Yếu tố IX được sử dụng để điều trị hoặc kiểm soát bệnh máu khó đông typ B, nhưng không chữa trị việc suy giảm Yếu tố IX cơ bản. Do điều này, các cá thể mắc bệnh máu khó đông typ B đòi hỏi liệu pháp thay thế Yếu tố IX trong toàn bộ cuộc đời của họ. Việc điều trị liên tục là đắt đỏ và đòi hỏi cá thể phải duy trì sự tuân thủ nghiêm ngặt, do việc bỏ lỡ chỉ một vài liều dự phòng có thể có hậu quả nghiêm trọng cho các cá thể mắc bệnh máu khó đông typ B nặng.

Thứ hai, do các sản phẩm Yếu tố IX thông thường có thời gian bán thải in vivo tương đối ngắn, khoảng 24 giờ, liệu pháp thay thế Yếu tố IX dự phòng đòi hỏi việc sử dụng hai hoặc ba lần hàng tuần. Điều này là gánh nặng lên cá thể để tuân thủ trong suốt cuộc đời họ. Trong khi được chất Yếu tố IX thế hệ ba “tác dụng kéo dài” có thể làm giảm tần suất dùng thuốc, liệu pháp thay thế Yếu tố FIX dự phòng với các được chất này vẫn đòi hỏi việc sử dụng hằng tháng, hằng tuần, hoặc thường xuyên hơn vĩnh viễn. Ví dụ, việc điều trị dự phòng với Nonacog beta pegol [Yếu tố IX tái tổ hợp pegyl hóa] (Novo Nordisk, Quy định Mỹ và Châu Âu đang chờ được thông qua) vẫn đòi hỏi việc sử dụng hằng tuần (Collins P.W., và đồng tác giả, Blood, 124(26):3880-86 (2014)). Hơn nữa, tác dụng trong khoảng thời gian dài của các chất sinh học được biến đổi hóa học (ví dụ, polypeptit pegyl hóa) vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn.

Thứ ba, có đến 5% bệnh nhân mắc bệnh máu khó đông typ B nặng, liệu pháp thay thế Yếu tố IX tạo ra các kháng thể là chất ức chế kháng-yếu tố IX, khiến cho liệu pháp không có tác dụng (Osooli và Berntorp, J. Intern. Med., 277(1):1-15 (2015)). Không giống như liệu pháp không có Yếu tố VIII có thể được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh máu khó đông typ A mà những bệnh nhân này đã có các kháng thể ức chế kháng-yếu tố VIII, không có liệu pháp không có Yếu tố IX để điều trị bệnh máu khó đông typ B.

Thứ tư, liệu pháp thay thế Yếu tố IX là đắt đỏ, nằm trong khoảng từ 1.000 đôla đến khoảng 3.000 đôla mỗi liều, phụ thuộc vào cân nặng của bệnh nhân (tư liệu trực tuyến của Hemophilia Federation of America). Do đó, với liều hai lần hằng tuần, liệu pháp thay thế Yếu tố IX có thể tốn tới 300.000 đôla mỗi năm.

Liệu pháp gen là một hứa hẹn lớn để điều trị bệnh máu khó đông typ B do nó khắc phục được sự biểu hiện thấp cơ bản của hoạt tính Yếu tố IX chức năng (ví dụ, do sự đột biến sai nghĩa hoặc vô nghĩa), thay vì mang lại liều một lần của hoạt tính Yếu tố

IX cho cá thể. Do sự khác biệt về cơ chế để tạo ra Yếu tố IX, so với liệu pháp thay thế Yếu tố IX, việc sử dụng một lần vector liệu pháp gen Yếu tố IX có thể tạo ra ở cá thể với mức Yếu tố IX đủ trong vài năm, nếu không lâu hơn. Điều này làm giảm chi phí điều trị và làm giảm nhu cầu tuân thủ liên tục của bệnh nhân.

Bằng chứng về ý tưởng điều trị bằng liệu pháp gen Yếu tố IX của bệnh máu khó đông typ B đã được trình bày. Xem, ví dụ, Manno C.S., và đồng tác giả, *Nat Med.*, 12(3):342-47 (2006). Tuy nhiên, vẫn còn câu hỏi là liệu các lượng có hiệu quả điều trị của Yếu tố IX có thể được biểu hiện trong khoảng thời gian đủ hay không. Xem, ví dụ, Giangrande, *Semin Thromb Hemost.* 42(5):513-17 (2016).

Các nỗ lực đã thực hiện để xây dựng Yếu tố IX tối ưu hóa codon. Ví dụ, WO 2006/036502 bộc lộ vector liệu pháp gen AAV Yếu tố IX tối ưu hóa codon với gen tăng cường ApoE HCR-1 và gen khởi đầu alpha-1 antitrypsin (AAT). Tương tự, WO 2014/064277 và WO 2016/146757 bộc lộ các vector liệu pháp gen AAV Yếu tố VIII và Yếu tố IX tối ưu hóa codon mà chứa một hoặc nhiều bản sao của yếu tố điều hòa SERPIN đặc hiệu ở gan. Cuối cùng, WO 2016/210170 bộc lộ vector liệu pháp gen AAV Yếu tố IX tối ưu hóa codon có gen tăng cường ApoE HCR-1 và gen khởi đầu alpha-1 antitrypsin (AAT).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, có nhu cầu về cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX cải tiến. Ví dụ, có nhu cầu về axit nucleic biến đổi ở codon, tổng hợp mà mã hóa Yếu tố IX được đóng gói hiệu quả hơn vào trong, và được phân phối qua, vector liệu pháp gen. Cũng có nhu cầu về axit nucleic biến đổi ở codon, tổng hợp mà biểu hiện Yếu tố IX hiệu quả hơn. Cũng có nhu cầu về axit nucleic biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có đặc tính gấp nếp cải thiện, mức độ tiết tăng cao từ các tế bào biểu hiện, và/hoặc hoạt tính tăng, so với Yếu tố IX kiểu dại. Yếu tố IX như vậy mã hóa, axit nucleic biến đổi ở codon cho phép điều trị cải thiện chứng suy giảm Yếu tố IX (ví dụ, bệnh máu khó đông typ B). Các chứng suy giảm và các vấn đề khác liên quan đến việc điều trị chứng suy giảm Yếu tố IX (ví dụ, bệnh máu khó đông typ B) thuyên giảm hoặc yếu đi bởi axit nucleic biến đổi ở codon mã hóa protein Yếu tố IX.

Theo một khía cạnh, chế phẩm axit nucleic (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa các biến thể Yếu tố IX và Yếu tố IX được mô tả. Chế phẩm axit

nucleic bao gồm polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với trình tự CS02, CS03, CS04, CS05, và CS06 mã hóa Yếu tố IX, như được mô tả trong đây. Chế phẩm axit nucleic mô tả trong đây mang lại sự biểu hiện Yếu tố IX tăng lên so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại. Chế phẩm axit nucleic cũng cho phép sản sinh tăng lên các liệu pháp gen virion dựa trên AAV. Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic mô tả trong đây có tỷ lệ GC giảm và hoặc chứa ít dinucleotit CpG hơn, so với các trình tự kiểu đại mã hóa Yếu tố IX.

Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic bao gồm polynucleotit mã hóa Yếu tố IX mà có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% (ví dụ, độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) với trình tự bộ lọc được chọn từ CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5), CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13), CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6), CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14), CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7), CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15), CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8), CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16), CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9), và CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17).

Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic bao gồm polynucleotit mã hóa Yếu tố IX có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% (ví dụ, độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) với trình tự bộ lọc mã hóa chuỗi nhẹ Yếu tố IX (ví dụ, CS02-LC-NA (SEQ ID NO:42), CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44), CS04-LC-NA (SEQ ID NO:46), CS05-LC-NA (SEQ ID NO:48), hoặc CS06-LC-NA (SEQ ID NO:50)) và trình tự bộ lọc mã hóa chuỗi nặng Yếu tố IX (ví dụ, CS02-HC-NA (SEQ ID NO:41), CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43), CS04-HC-NA (SEQ ID NO:45), CS05-HC-NA (SEQ ID NO:47), hoặc CS06-HC-NA (SEQ ID NO:49)).

Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic bao gồm polynucleotit mà mã hóa polypeptit Yếu tố IX có chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng (ví dụ, peptit hoạt hóa). Chuỗi nhẹ của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất có độ tương đồng trình tự cao với trình tự của CS02-LC-NA (SEQ ID NO:42), CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44), CS04-LC-NA (SEQ ID NO:46), CS05-LC-NA (SEQ ID NO:48), và CS06-LC-NA (SEQ ID NO:50). Chuỗi nặng của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ hai có độ tương đồng trình tự cao với trình tự

của CS02-HC-NA (SEQ ID NO:41), CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43), CS04-HC-NA (SEQ ID NO:45), CS05-HC-NA (SEQ ID NO:47), và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:49). Trình tự polypeptit liên kết bao gồm vị trí tách proteaza (ví dụ, hai vị trí tách Yếu tố XIa).

Theo một số phương án về polynucleotit được mô tả trên, trình tự polypeptit liên kết có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự cao với peptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu đại FIX-AP-AA (SEQ ID NO:56; axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)). Theo một số phương án, trình tự polypeptit liên kết được mã hóa bởi trình tự axit nucleic thứ ba có độ tương đồng trình tự cao với trình tự của CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57), CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58), CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59), CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60), và CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61).

Theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, ví dụ, khi protein Yếu tố IX đã mã hóa chứa peptit tín hiệu và pro-peptit. Theo một số phương án, peptit tín hiệu, pro-peptit, hoặc cả peptit tín hiệu và pro-peptit được mã hóa bởi trình tự biến đổi ở codon. Theo một số phương án, peptit tín hiệu, pro-peptit, hoặc cả peptit tín hiệu và pro-peptit được mã hóa bởi trình tự kiểu đại, trong khi một phần của axit nucleic mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành (ví dụ, FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10); axit amin 47-461 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) được biến đổi codon.

Theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây mã hóa polypeptit của biến thể Yếu tố IX, ví dụ, có một hoặc nhiều đột biến thể axit amin so với trình tự axit amin Yếu tố IX kiểu đại (ví dụ, FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2) hoặc FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10)). Theo một số phương án, biến thể Yếu tố IX là biến thể Yếu tố IX siêu hoạt tính có hoạt tính Yếu tố IX tăng, so với Yếu tố IX kiểu đại. Theo một phương án cụ thể, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có đột biến thể axit amin 'Padua' R384L (so với trình tự pre-pro-polypeptit Yếu tố IX FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2), đột biến thể axit amin R338L so với trình tự sợi đơn Yếu tố IX trưởng thành FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10)).

Theo một khía cạnh, phương pháp điều trị bệnh máu khó đông typ B được mô tả. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân cần được điều trị chế phẩm axit nucleic (ví dụ, cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon) được mô tả

trong đây (ví dụ, polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với trình tự mã hóa Yếu tố IX CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06). Theo một số phương án, cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX là vectơ liệu pháp gen của động vật có vú, như được mô tả trong đây. Theo một phương án cụ thể, cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX là vectơ virut liên quan đến adeno (AAV-adeno-associated virus). Theo một số phương án, vectơ liệu pháp gen chứa một hoặc nhiều bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu ở gan (ví dụ, 1 đến 3 bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8).

Theo một khía cạnh, phương pháp tạo ra hạt virut AAV (adeno-associated virus) được mô tả. Phương pháp này bao gồm việc đưa chế phẩm axit nucleic (ví dụ, cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon) được mô tả trong đây (ví dụ, polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với trình tự mã hóa Yếu tố IX CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06) vào trong tế bào chủ động vật có vú, trong đó polynucleotit có khả năng sao chép trong tế bào chủ động vật có vú.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX ví dụ, phù hợp với một số phương án thực hiện. Các thành phần trình tự của vectơ tự bổ sung (A, B) và sợi đơn (C, D) được trình bày mà không có môđun điều hòa cấu hình cis đặc hiệu gan (A, C) và có môđun điều hòa cấu hình cis đặc hiệu gan (B, D) (CRM8).

Fig.2 trình bày trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (SEQ ID NO:1) với số lưu trữ CCDS14666.1 (“FIX-FL-NA”).

Fig.3 thể hiện trình tự axit amin của hai chất đồng dạng pre-pro-polypeptit Yếu tố IX kiểu đại được biểu hiện ở người. Fig.3A thể hiện trình tự axit amin kiểu đại của chất đồng dạng pre-pro-polypeptit Yếu tố IX thứ nhất, dài hơn (SEQ ID NO:2) tương ứng với số lưu trữ UniProt là P00740 và số lưu trữ NCBI là NP_000124.1 (“FIX-FL-AA”). Fig.3B thể hiện trình tự axit amin kiểu đại của chất đồng dạng pre-pro-polypeptit Yếu tố IX thứ hai, ngắn hơn (SEQ ID NO:3) tương ứng với số lưu trữ NCBI là NP_001300842.1 (“FIX2-FL-AA”).

Fig.4 thể hiện trình tự axit amin Yếu tố IX Padua (R384L) (SEQ ID NO:4; “FIXp-FL-AA”).

Fig.5 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS02 (SEQ ID NO:5) mã hóa biến thể Yếu tố IX có đột biến thể axit amin R384L (CS02-FL-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.6 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS03 (SEQ ID NO:6) mã hóa biến thể Yếu tố IX có đột biến thể axit amin R384L (CS03-FL-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.7 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS04 (SEQ ID NO:7) mã hóa biến thể Yếu tố IX có đột biến thể axit amin R384L (CS04-FL-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.8 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS05 (SEQ ID NO:8) mã hóa biến thể Yếu tố IX có đột biến thể axit amin R384L (CS05-FL-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.9 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS06 (SEQ ID NO:9) mã hóa biến thể Yếu tố IX có đột biến thể axit amin R384L (CS06-FL-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.10 minh họa mức kháng nguyên FIX ở chuột kiểu đại được tiêm cấu trúc liệu pháp gen CS02 có 0, 1, 2, hoặc 3 bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa cấu hình cis đặc hiệu gan CRM8, ở liều 2×10^{11} vg/kg khối lượng cơ thể.

Fig.11 thể hiện trình tự axit amin của chất đồng dạng protein Yếu tố IX kiểu đại, hai sợi đơn (ví dụ, không có trình tự tín hiệu và propeptit) được biểu hiện ở người. Fig.11A thể hiện trình tự axit amin kiểu đại của chất đồng dạng pre-pro-polypeptit Yếu tố IX thứ nhất, dài hơn (SEQ ID NO:10) tương ứng với số lưu trữ UniProt là P00740 và số lưu trữ NCBI là NP_000124.1 (“FIX-MA-AA”). Fig.11B thể hiện trình tự axit amin kiểu đại của chất đồng dạng pre-pro-polypeptit Yếu tố IX thứ hai, ngắn hơn (SEQ ID NO:11) tương ứng với số lưu trữ NCBI là NP_001300842.1 (“FIX2-MA-AA”).

Fig.12 thể hiện trình tự axit amin Yếu tố IX (R338L) sợi đơn “Padua” (SEQ ID NO:12; “FIXp-MP-AA”).

Fig.13 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS02 (SEQ ID NO:13) mã hóa biến thể Yếu tố IX sợi đơn có đột biến thể axit amin R338L (CS02-MP-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.14 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS03 (SEQ ID NO:14) mã hóa biến thể Yếu tố IX sợi đơn có đột biến thể axit amin R338L (CS03-MP-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.15 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS04 (SEQ ID NO:15) mã hóa biến thể Yếu tố IX sợi đơn có đột biến thể axit amin R338L (CS04-MP-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.16 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS05 (SEQ ID NO:16) mã hóa biến thể Yếu tố IX sợi đơn có đột biến thể axit amin R338L (CS05-MP-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.17 thể hiện trình tự nucleotit biến đổi ở codon CS06 (SEQ ID NO:17) mã hóa biến thể Yếu tố IX sợi đơn có đột biến thể axit amin R338L (CS06-MP-NA), phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.18 thể hiện trình tự axit nucleic (NA) mã hóa pre-pro-peptit (PPP) cho một số cấu trúc được mô tả trong đây, phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.19 thể hiện trình tự axit nucleic (NA) mã hóa peptit tín hiệu (SP) cho một số cấu trúc được mô tả trong đây, phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.20 thể hiện trình tự axit nucleic (NA) mã hóa pro-peptit (PP) cho một số cấu trúc được mô tả trong đây, phù hợp với một số phương án thực hiện.

Fig.21 thể hiện trình tự axit amin (AA) của pre-pro-peptit FIX (PPP).

Fig.22 thể hiện trình tự axit amin (AA) của peptit tín hiệu FIX (SP).

Fig.23 thể hiện trình tự axit amin (AA) của pro-peptit FIX (PP).

Fig.24 thể hiện trình tự axit nucleic của trình tự CRM8 (SEQ ID NO:39).

Fig.25A và Fig.25B thể hiện trình tự axit nucleic của cấu trúc CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Giới thiệu

Liệu pháp gen dựa trên AAV hứa hẹn lớn về việc điều trị bệnh máu khó đông. Đối với bệnh máu khó đông typ B, dữ liệu lâm sàng ban đầu là đáng khích lệ trong đó các mức FIX trong khoảng 10% có thể được duy trì ở ít nhất một số bệnh nhân trong hơn 1 năm. Ví dụ, trong các thử nghiệm ở người ban đầu chứng minh rằng việc thông động mạch gan của các cấu trúc AVV-FIX gây ra sự biểu hiện tạm thời Yếu tố IX in vivo. Kay M. và đồng tác giả, Nat Genet. 24(3):257-61 (2000). Tuy nhiên, sự tải nạp này gây ra mức hoạt hóa khiêm tốn trong hệ miễn dịch kháng lại các kháng nguyên capsit có nguồn gốc AAV. Manno C.S. và đồng tác giả, Nat Med. 12(3):342-47 (2006) và Mingozzi F. và đồng tác giả, Nat Med. 13(4):419-22 (2007).

Các vector không phải là virus có thể có tính sinh miễn dịch thấp hơn do chúng dựa trên sự phân phối ADN trần hoặc ADN liên quan đến chất mang không phải kháng nguyên (ví dụ, polyme trơ, lipid, hoặc hạt nano). Tuy nhiên, tốc độ chuyển nạp trong tế bào của vector không phải là virus là thấp hơn tốc độ của vector phân phối dạng virus. Ngoài ra, sự biểu hiện thời gian kéo dài từ vector không phải là virus bị cản trở bởi sự có mặt của trình tự vi khuẩn sử dụng để sản xuất quy mô lớn của các cấu trúc này.

Tuy nhiên, các thách thức này có thể không được giải quyết đơn giản bằng cách sử dụng các liều cao hơn của cấu trúc liệu pháp gen. Theo kiến thức hiện nay, liều vector của liệu pháp gen vector dựa trên AAV không nên tăng cao vượt 2×10^{12} vg/kg khối lượng cơ thể. Điều này là do ở các liều cao như vậy đáp ứng miễn dịch tế bào T được khởi động, điều này phá hủy tế bào đã được tải nạp và, kết quả là, sự biểu hiện biến đổi gen bị giảm hoặc thậm chí mất đi. Do đó, cần có chiến lược để tăng sự biểu hiện của FIX để khiến cho liệu pháp gen FIX là lựa chọn điều trị khả thi cho bệnh nhân mắc bệnh máu khó đông typ B.

Do đó, cấu trúc polypeptit Yếu tố IX cải tiến mà hỗ trợ sự biểu hiện và hoạt tính Yếu tố IX tăng cường sẽ cải thiện cả hai phương pháp điều trị. Ví dụ, phương pháp phân phối bằng virus sẽ được cải thiện bằng cách giảm liều ban đầu của cấu trúc này, bằng cách đó làm giảm sự kích thích hệ miễn dịch của đối tượng. Các phương pháp

dựa trên việc sử dụng ADN trần sẽ được cải thiện bằng cách tăng cường hoạt tính Yếu tố IX cao hơn với ít bản sao hơn của polynucleotit điều trị.

Sáng chế đề cập đến việc phát hiện trình tự mã hóa biến thể Yếu tố IX biến đổi ở codon giải quyết các vấn đề này và các vấn đề khác nữa liên quan đến liệu pháp gen Yếu tố IX. Ví dụ, polynucleotit bộc lộ trong đây mang lại sự biểu hiện và hoạt tính Yếu tố IX tăng đáng kể ở thể chủ động vật có vú. Theo một số phương án thực hiện, các lợi điểm được nhận thấy bằng cách sử dụng polynucleotit mã hóa Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với cấu trúc biến đổi ở codon CS02, CS03, CS04, CS05, và CS06. Theo một số phương án, các trình tự này bao gồm dinucleotit có ít CpG hơn đáng kể, so với các cấu trúc kiểu đại, như được mô tả đầy đủ sau đây.

Một cách thuận lợi, trình tự Yếu tố IX biến đổi ở codon CS02, CS03, CS04, CS05, và CS06 được mô tả trong đây mang lại sự biểu hiện Yếu tố IX in vivo vượt trội, so với các trình tự kiểu đại tương đương. Ví dụ, Ví dụ 1 chỉ ra rằng vector AAV tự bổ sung mang trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06 (R384L) làm tăng từ 20 lần đến 40 lần hoạt tính Yếu tố IX in vivo, so với vector AAV tự bổ sung mang trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại. Tương tự, đã quan sát thấy tăng từ 2 lần đến 4 lần mức biểu hiện Yếu tố IX so với vector AAV tự bổ sung mang trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (R384L) (Bảng 2).

Một cách thuận lợi, hoạt tính Yếu tố IX tăng cường có được từ trình tự biến đổi codon CS02, CS03, CS04, CS05, và CS06 còn có thể tăng hơn bằng cách đưa vào một hoặc nhiều bản sao của yếu tố điều hòa ngược dòng đặc hiệu gan của trình tự mã hóa Yếu tố IX. Ví dụ, như chứng minh trong Ví dụ 2 và 3, việc đưa vào một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu gan CRM8 trong vector tự bổ sung AAV Yếu tố IX còn làm tăng mức biểu hiện Yếu tố IX từ 2 lần đến 3 lần trong mô hình chuột và từ 2 lần đến 13 lần trong tế bào gan của người (lần lượt trong Bảng 3 và 4). Tương tự, việc đưa vào một hoặc nhiều bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu gan CRM8 trong vector sợi đơn AAV Yếu tố IX làm tăng hoạt tính Yếu tố IX in vivo 2 lần (mô hình chuột; Bảng 5) và đến 26 lần trong tế bào gan của người (Bảng 6).

Ngạc nhiên, trong khi vector AAV tự bổ sung mã hóa polypeptit Yếu tố IX biến đổi ở codon thiếu yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu gan CRM8 làm tăng mức biểu hiện Yếu tố IX cao hơn so với vector AAV sợi đơn tương tự (so sánh mức tăng 6,2 lần

hoạt tính FIX tạo ra bởi CS06-CRM.0-scV với mức tăng 3,9 lần hoạt tính Yếu tố IX tạo ra bởi CS06-CRM.0-ssV (SEQ ID NO:40) trong Bảng 6), thì vectơ AAV sợi đơn AAV Yếu tố IX chứa nhiều bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu gan CRM8 vượt trội đáng kể so với vectơ AAV tự bổ sung tương tự (so sánh mức tăng 12,8 lần hoạt tính Yếu tố IX tạo ra bởi CS02-CRM8.3-scV, so với CS02-CRM8.0-scV, trong Bảng 4 với mức tăng 16,8 lần hoạt tính Yếu tố IX tạo ra bởi CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40), so với CS06-CRM8.0-scV, trong Bảng 6).

II. Định nghĩa

Như sử dụng trong đây, các thuật ngữ sau có ý nghĩa như được mô tả đối với chúng trừ khi được định nghĩa khác.

Như sử dụng trong đây, các thuật ngữ “Yếu tố IX” và “FIX” (với “IX” để chỉ số La Mã có nghĩa là “chín”) được sử dụng thay thế cho nhau, và để chỉ protein có hoạt tính Yếu tố IX (ví dụ, FIX hoạt động, thường được gọi là “FIXa”) hoặc tiền chất protein (ví dụ, pro-protein hoặc pre-pro-protein, thường được gọi là pFIX và ppFIX) của protein có hoạt tính Yếu tố IX, cụ thể là hoạt tính tách Yếu tố X trong sự có mặt của Yếu tố VIII, ví dụ, như đo được bằng cách sử dụng thử nghiệm đông máu Yếu tố IX một bước được mô tả trong Chương 2.7.11 của Dược điển Châu Âu 9.0, nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Yếu tố IX được dịch mã thành một polypeptit sợi đơn, không hoạt động chứa peptit tín hiệu, propeptit, chuỗi nhẹ, peptit hoạt hóa, và chuỗi nặng, thường được gọi là pre-pro-polypeptit Yếu tố IX. Pre-pro-peptit Yếu tố IX trải qua quá trình xử lý sau dịch mã để tạo ra protein Yếu tố IX hoạt động (ví dụ, FIXa). Quá trình xử lý này bao gồm việc loại (ví dụ, bằng cách tách) peptit tín hiệu, sau đó loại (ví dụ, bằng cách tách) propeptit, để tạo ra polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, chứa chuỗi nhẹ Yếu tố IX và chuỗi nặng Yếu tố IX, vẫn không hoạt động. Polypeptit Yếu tố IX trưởng thành được tách tiếp để cắt peptit hoạt hóa giữa chuỗi nhẹ Yếu tố IX và chuỗi nặng Yếu tố IX, tạo ra protein Yếu tố IX hoạt động (ví dụ, FIXa). Chuỗi nhẹ Yếu tố IX và chuỗi nhẹ Yếu tố IX vẫn liên kết thông qua liên kết disulfua.

Ví dụ, pre-pro-protein Yếu tố IX người kiểu đại đầu tiên được tách ra để giải phóng peptit tín hiệu đã mã hóa (axit amin 1-28 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)), tạo ra pro-protein sợi đơn thứ nhất. Pro-peptit sợi đơn này sau đó được tách để giải phóng

propeptit (axit amin 29-46 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) để tạo ra pro-protein sợi đơn thứ hai (ví dụ, FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10), với ký hiệu “MP” là viết tắt cho “protein trưởng thành”). Pro-protein sợi đơn thứ hai sau đó được tách hai lần giữa FIX chuỗi nhẹ và FIX chuỗi nặng, bởi Yếu tố XIa, để giải phóng peptit hoạt hóa (axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)). Việc này tạo ra protein Yếu tố IXa hoạt động gồm có chuỗi nhẹ và chuỗi nặng riêng biệt liên kết thông qua liên kết disulfua. Thông tin thêm về cấu trúc, chức năng, và sự hoạt hóa Yếu tố IX xem, ví dụ, Brandstetter H. và đồng tác giả P.N.A.S. USA, 92(21):9796-800 (1995), Hopfner KP và đồng tác giả, Structure, 7(8):989-96 (1999), và Gailani D. và đồng tác giả, Thromb Res., 133 Suppl 1:S48-51 (2014), nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Như được mô tả trong đây, protein Yếu tố IXa hoạt động này có thể bao gồm một hoặc nhiều biến thể, với biến thể R338L đặc biệt hữu dụng theo một số phương án. Nó được gọi là “FIXp-MP-AA” (SEQ ID NO:12) với trình tự axit nucleic được gọi trong đây là “FIXp-MP-NA”; “FIXp” là viết tắt của sự đưa biến thể Padua R338L vào trong protein cuối cùng. Nên lưu ý rằng trình tự tối ưu hóa codon CS02-CS06, được minh họa trong đây, mã hóa protein FIXp, bao gồm biến thể R338L. Do đó, bao gồm cụ thể trong định nghĩa FIX là FIXp.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “polypeptit Yếu tố IX” và “polypeptit FIX” để chỉ polypeptit có hoạt tính serin proteaza với Yếu tố IX trong các điều kiện cụ thể, ví dụ, như đo được bằng thử nghiệm đông máu Yếu tố IX một bước được mô tả trong Chương 2.7.11 của Dược điển Châu Âu 9.0. Polypeptit Yếu tố IX bao gồm tiền chất polypeptit sợi đơn (bao gồm pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, pro-peptit Yếu tố IX, và polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành) mà, khi được hoạt hóa bởi quy trình xử lý sau dịch mã mô tả trên, trở thành protein Yếu tố IX hoạt động có hoạt tính serin proteaza với Yếu tố IX, cũng như chính các protein Yếu tố IX hoạt động. Bao gồm cụ thể trong định nghĩa polypeptit Yếu tố IX là polypeptit Yếu tố IX bao gồm biến thể R338L. Theo phương án minh họa, polypeptit Yếu tố IX của người để chỉ polypeptit bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 85%, 90%, 95%, 99%, hoặc hơn) với một phần của polypeptit Yếu tố IX của người kiểu đại bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10, nêu trong Fig.11A) hoặc

với một phần của polypeptit Yếu tố IX padua của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12, nêu trong Fig.12).

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “chuỗi nhẹ Yếu tố IX”, hoặc đơn giản là “chuỗi nhẹ”, để chỉ polypeptit trong protein Yếu tố IXa đã hoạt hóa có nguồn gốc từ phần ở đầu N của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, chứa môđun Gla, vùng chức năng tương tự EGF-1, và tương tự EGF-2 của Yếu tố IX. Theo phương án minh họa, axit amin 47-191 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) cấu tạo nên chuỗi nhẹ Yếu tố IX. Như sử dụng trong đây, trình tự axit amin của Yếu tố IX kiểu đại chuỗi nhẹ được gọi là FIX-LC-AA (SEQ ID NO:62).

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “chuỗi nặng Yếu tố IX”, hoặc đơn giản là “chuỗi nặng”, để chỉ polypeptit trong protein Yếu tố IXa đã hoạt hóa có nguồn gốc từ phần ở đầu C của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, chứa vùng chức năng peptidaza S1 của Yếu tố IX. Theo phương án minh họa, axit amin 227-461 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) cấu tạo nên chuỗi nặng Yếu tố IX. Như sử dụng trong đây, trình tự axit amin của chuỗi nặng Yếu tố IX kiểu đại được gọi là FIX-HC-AA (SEQ ID NO:63) và FIXp-HC-AA (SEQ ID NO:64) khi biến thể R338L được đưa vào.

Nói chung, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX được biểu hiện là chuỗi polypeptit đơn, ví dụ, cùng với peptit hoạt hóa. Tuy nhiên, theo một số phương án, chuỗi nhẹ Yếu tố IX và chuỗi nặng Yếu tố VIII được biểu hiện là các chuỗi polypeptit riêng biệt (ví dụ, đồng biểu hiện), và cấu tạo để tạo ra protein Yếu tố IX (ví dụ, in vivo hoặc in vitro). Nói chung, với mục đích của sáng chế, thậm chí nếu hai chuỗi được biểu hiện riêng biệt, chúng thường nằm trên cùng một vector biểu hiện (ví dụ, hệ gen virus), hơn là nằm trên các vector biểu hiện khác nhau.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “peptit hoạt hóa Yếu tố IX”, hoặc đơn giản là “peptit hoạt hóa”, để chỉ một peptit được cắt từ polypeptit Yếu tố IX sợi đơn khi hoạt hóa protein Yếu tố IXa. Theo phương án minh họa, axit amin 192-226 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) cấu tạo nên peptit hoạt hóa Yếu tố IX. Như sử dụng trong đây, trình tự axit amin của peptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu đại được gọi là FIX-AP-AA (SEQ ID NO:56).

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “peptit tín hiệu Yếu tố IX”, hoặc đơn giản là “peptit tín hiệu”, để chỉ peptit được cắt từ đầu tận cùng N của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX bởi peptidaza tín hiệu. Peptit tín hiệu hướng Yếu tố IX pre-pro-protein mới được dịch mã đến lưới nội bào. Theo phương án minh họa, axit amin 1-28 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) cấu tạo nên peptit tín hiệu Yếu tố IX. Như sử dụng trong đây, trình tự axit amin của peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại được gọi là FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37). Một số peptit tín hiệu theo sáng chế được nêu trong Fig.19 và Fig.22.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “pro-peptit Yếu tố IX”, hoặc đơn giản là “pro-peptit”, để chỉ peptit được cắt từ đầu tận cùng N của pro-polypeptit Yếu tố IX (ví dụ, sau khi tách peptit tín hiệu) bởi Furin. Pro-peptit bao gồm vị trí nhận dạng γ -carboxyl hóa sẽ kết tập carboxylaza đến môđun Gla gần kề, bằng cách đó thúc đẩy sự carboxyl hóa các gốc glutamin. Theo phương án minh họa, axit amin 29-46 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) cấu tạo nên pro-peptit Yếu tố IX. Như sử dụng trong đây, trình tự axit amin của pro-peptit Yếu tố IX kiểu đại được gọi là FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38).

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “pre-pro-peptit Yếu tố IX”, hoặc đơn giản là “pre-pro-peptit”, để chỉ dạng tổ hợp của peptit tín hiệu Yếu tố IX và pro-polypeptit. Theo phương án minh họa, axit amin 1-46 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) cấu tạo nên pre-pro-peptit Yếu tố IX. Như sử dụng trong đây, trình tự axit amin của Yếu tố IX kiểu đại pre-pro-peptit được gọi là FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36) với trình tự axit nucleic, nêu trong Fig.18, gọi là FIX-PPP-NA (SEQ ID NO:18) (với FIXp-PPP-AA và FIXp-PPP-NA tương ứng khi biến thể R338L được sử dụng).

Trừ khi được nêu cụ thể khác, việc đánh số axit amin trong Yếu tố IX để chỉ axit amin tương ứng trong trình tự pre-pro-polypeptit Yếu tố IX kiểu đại của người, chiều dài đầy đủ (FIX-FL-AA), được trình bày như SEQ ID NO:2 trong Fig.3A. Như vậy, khi nhắc đến đột biến thể axit amin trong polypeptit Yếu tố IX bộc lộ trong đây, số axit amin được đề cập để chỉ axit amin tương tự (ví dụ, tương đương cấu trúc hoặc chức năng) và/hoặc tương ứng (ví dụ, được bảo tồn trong tiến hóa trong trình tự axit amin ban đầu) trong trình tự pre-pro-polypeptit Yếu tố IX kiểu đại, chiều dài đầy đủ. Ví dụ, đột biến thể axit amin R384L để chỉ sự thể R thành L ở vị trí 384 của trình tự

pre-pro-peptit Yếu tố IX chiều dài đầy đủ, kiểu đại của người (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)), sự thế R thành L ở vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn kiểu đại, trưởng thành (FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10)), sự thế R thành L ở vị trí 346 của trình tự chất đồng dạng 2 của pre-pro-peptit Yếu tố IX chiều dài đầy đủ, kiểu đại của người (FIX2-FL-AA (SEQ ID NO:3)), sự thế R thành L ở vị trí 300 của trình tự chất đồng dạng 2 của pre-pro-peptit Yếu tố IX trưởng thành, kiểu đại của người (FIX2-FL-AA (SEQ ID NO:3)), và sự thế R thành L ở vị trí 158 của trình tự chuỗi nặng Yếu tố IX kiểu đại của người (FIX-HC-AA (SEQ ID NO:63)). Do đó, tất cả các danh pháp này mô tả cùng một đột biến thế axit amin “Padua”, trong các cấu trúc Yếu tố IX khác nhau.

Như được mô tả trong đây, hệ thống đánh số axit amin trong Yếu tố IX là phụ thuộc vào việc liệu pre-pro-peptit Yếu tố IX (ví dụ, axit amin 1-46 của trình tự Yếu tố IX chiều dài đầy đủ, kiểu đại của người, có bao gồm peptit tín hiệu và pro-peptit) được đưa vào hay không. Khi bao gồm pre-pro-peptit, việc đánh số được gọi là “bao gồm pre-pro-peptit” hoặc “PPI”. Khi không chứa pre-pro-peptit, việc đánh số được gọi là “pre-pro-peptit loại trừ” hoặc “PPE”. Ví dụ, R384L là số đánh PPI cho cùng một đột biến thế axit amin lại là R338L, trong cách đánh số PPE. Tương tự, việc đánh số axit amin Yếu tố IX cũng phụ thuộc vào chất đồng dạng Yếu tố IX. Ví dụ, R384L là cách đánh số chất đồng dạng 1 cho một đột biến thế axit amin lại là R346L, trong cách đánh số chất đồng dạng 2. Trừ khi được nêu rõ khác, tất cả các đánh số axit amin để chỉ axit amin tương ứng trong trình tự chất đồng dạng 1 của Yếu tố IX chiều dài đầy đủ, kiểu đại của người (FIX-FL-AA), nêu như SEQ ID NO:2 trong Fig.3A. Việc đánh số này là giống với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4), có trình tự axit amin tương tự, ngoài đột biến R384L “Padua”.

Ví dụ không hạn chế của polypeptit Yếu tố IX kiểu đại bao gồm pre-pro-Yếu tố IX của người (ví dụ, số lưu trữ GenBank là NP_000124.1 (FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) và NP_001300842.1 (FIX2-FL-AA (SEQ ID NO:3)), Yếu tố IX chuỗi đơn tương ứng mà không có peptit tín hiệu (axit amin 1-28 của pre-pro-protein) và/hoặc propeptit (axit amin 29-46 của pre-pro-protein), và biến thể tự nhiên của nó; pre-pro-Yếu tố IX lợn (ví dụ, số lưu trữ UniProt là P00741), Yếu tố IX sợi đơn tương ứng mà không có peptit tín hiệu, và biến thể tự nhiên của nó; pre-pro-Yếu tố IX chuột nhắt (ví dụ, số lưu trữ UniProt là P16294), Yếu tố IX sợi đơn tương ứng mà không có peptit tín hiệu, và biến thể tự nhiên của nó; pre-pro-Yếu tố IX chuột cống (ví dụ, số lưu trữ

UniProt P16296), Yếu tố IX sợi đơn tương ứng mà không có peptit tín hiệu, và biến thể tự nhiên của nó; và gen tương đồng Yếu tố VIII động vật có vú (ví dụ, tinh tinh, vượn, chuột túi má, chuột lang, v.v.).

Như sử dụng trong đây, polypeptit Yếu tố IX bao gồm biến thể tự nhiên và cấu trúc nhân tạo có hoạt tính tách Yếu tố X trong sự có mặt của Yếu tố VIII. Như sử dụng trong bản mô tả này, Yếu tố IX bao gồm biến thể tự nhiên bất kỳ, trình tự thay thế, chất đồng dạng, hoặc protein đột biến mà chúng giữ được một mức độ hoạt tính tách Yếu tố IX cơ bản (ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, hoặc hơn của hoạt tính kiểu đại tương ứng như được thử nghiệm trong thử nghiệm đông máu một giai đoạn theo Chương 2.7.11 của Dược điển Châu Âu 9.0, được đưa vào cụ thể trong đây bằng cách viện dẫn đến phần nội dung của Thử nghiệm về yếu tố đông máu IX của người (Assay of Human Coagulation Factor IX) trong Chương 2.7.11. Ví dụ về các biến thể axit amin Yếu tố IX (so với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)) tìm thấy trong quần thể người bao gồm, mà không hạn chế ở, I17N, L20S, C28R, C28Y, V30I, R43L, R43Q, R43W, K45N, R46S, R46T, N48I, S49P, L52S, E53A, E54D, E54G, F55C, G58A, G58E, G58R, E66V, E67K, F71S, E73K, E73V, R75Q, E79D, T84R, Y91C, D93G, Q96P, C97S, P101R, C102R, C102R, G106D, G106S, C108S, D110N, I112S, N113K, Y115C, C119F, C119R, E124K, G125E, G125R, G125V, C134Y, I136T, N138H, G139D, G139S, C155F, G160E, Q167H, S169C, C170F, C178R, C178W, R191C, R191H, R226G, R226Q, R226W, V227D, V227F, V228F, V228L, Q241H, Q241K, C252S, C252Y, G253E, G253R, A265T, C268W, A279T, N283D, E291V, R294G, R294Q, V296M, H302R, N306S, I316F, L318R, L321Q, N328K, N328Y, P333H, P333T, T342K, T342M, I344L, G351D, W356C, G357E, G357R, K362E, G363W, A366D, R379G, R379Q, C382Y, L392F, L383I, R384L, K387E, I390F, M394K, F395I, F395L, C396F, C396S, A397P, R404T, C407R, C407S, D410H, S411G, S411I, G412E, G413R, P414T, V419E, F424V, T426P, S430T, W431G, W431R, G432S, E433A, G433K, C435Y, A436V, G442E, G442R, I443T, R449Q, R449W, Y450C, W453R, và I454T. Như bản luận đầy đủ hơn dưới đây, việc đánh số là so với FIX kiểu đại của người. Các biến thể axit amin khác được xác định trong quần thể người đã biết và có thể tìm thấy, ví dụ, bằng cách sử dụng dữ liệu biến thể của Trung tâm Quốc gia về Dữ liệu Công nghệ sinh học ("NCBI"- National Center for

Biotechnology Information), số lưu trữ là GCF_000001405.25. Protein Yếu tố VIII cũng bao gồm các polypeptit chứa các biến đổi sau dịch mã.

Cụ thể được sử dụng trong bản mô tả này là protein FIX bao gồm đột biến có tên là “Padua”, thay đổi arginin thành leuxin ở vị trí 338 của protein Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành (R338L), vị trí 384 của pre-pro-polypeptit Yếu tố IX(R384L). Đột biến này mang lại hoạt tính siêu chức năng cho protein FIX. Ví dụ, như được chỉ ra là protein “Padua” (ví dụ, Yếu tố IX chứa đột biến R338L) hoạt động gấp 5 lần đến 10 lần so với Yếu tố IX kiểu dại in vivo. Patent Mỹ số 6,531,298; Simioni P. và đồng tác giả, N Engl J Med. 361(17):1671-75 (2009), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo đó, bản mô tả đề xuất các cấu trúc axit amin và axit nucleic mã hóa protein Padua-FIX, đôi lúc được gọi trong đây là “FIXp” hoặc “pFIX”.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “polynucleotit Yếu tố IX” và “polynucleotit FIX” để chỉ polynucleotit mã hóa polypeptit Yếu tố IX có hoạt tính serin proteaza với Yếu tố IX trong các điều kiện cụ thể, ví dụ, như đo được bằng thử nghiệm đông máu Yếu tố IX một bước được mô tả trong Chương 2.7.11 của Dược điển Châu Âu 9.0. Polynucleotit Yếu tố IX bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit tiền chất Yếu tố IX sợi đơn, bao gồm pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, pro-peptit Yếu tố IX, và polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, mà, khi được hoạt hóa bởi quy trình xử lý sau dịch mã được mô tả trên, trở thành protein Yếu tố IX hoạt động có hoạt tính serin proteaza với Yếu tố IX. Bao gồm cụ thể trong định nghĩa polynucleotit Yếu tố IX là polynucleotit mã hóa polypeptit Yếu tố IX mà chứa biến thể R338L. Theo phương án minh họa, polynucleotit Yếu tố IX của người để chỉ polynucleotit mà mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 85%, 90%, 95%, 99%, hoặc hơn) với một phần của polypeptit Yếu tố IX kiểu dại của người mà bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10, nêu trong Fig.11A) hoặc với một phần của polypeptit Yếu tố IX padua của người mà bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12, nêu trong Fig.12).

Như được mô tả trong đây, polynucleotit Yếu tố IX có thể bao gồm các yếu tố điều hòa, như gen khởi đầu, gen tăng cường, gen kết thúc, trình tự polyadenyl hóa, và intron, cũng như các yếu tố được bao bởi virus, như đoạn lặp kết thúc đảo chiều (“ITR”), và/hoặc các yếu tố hỗ trợ sự sao chép của polynucleotit trong tế bào chủ

không phải virus, ví dụ, đơn vị sao chép hỗ trợ sự di truyền của polynucleotit, ví dụ, trong tế bào chủ là vi khuẩn, nấm men, hoặc động vật có vú.

Đặc biệt được sử dụng trong bản mô tả này là polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon. Như được mô tả trong đây, polynucleotit FIX biến đổi ở codon mang lại sự biểu hiện Yếu tố IX biến đổi gen in vivo cao hơn, so với mức biểu hiện Yếu tố IX có được bởi cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên (ví dụ, polynucleotit mã hóa cùng một trình tự axit amin Yếu tố IX bằng codon kiểu đại của người). Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “mức biểu hiện tăng lên” để chỉ mức tăng lên của protein Yếu tố IX biến đổi gen trong máu của động vật được sử dụng polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa Yếu tố IX, so với mức của protein Yếu tố IX biến đổi gen trong máu của động vật sử dụng cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên. Mức biểu hiện tăng của protein dẫn đến sự tăng hoạt tính Yếu tố IX; do đó tăng mức biểu hiện dẫn đến tăng hoạt tính.

Theo một số phương án, mức biểu hiện tăng lên để chỉ ít nhất 25% polypeptit Yếu tố IX biến đổi gen tăng lên trong máu của động vật được sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với mức polypeptit Yếu tố IX biến đổi gen trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên. Với mục đích của bản mô tả này, mức biểu hiện tăng lên để chỉ một hiệu quả tạo ra bởi sự biến đổi trình tự codon, chứ không phải siêu hoạt tính gây ra bởi đột biến thể axit amin cơ bản, ví dụ, đột biến “Padua”. Tức là mức biểu hiện thu được từ trình tự tối ưu hóa codon mã hóa polynucleotit Yếu tố IX “Padua” được so sánh với mức biểu hiện thu được từ protein “Padua” được mã hóa tự nhiên. Theo một số phương án, mức biểu hiện tăng lên để chỉ polypeptit Yếu tố IX biến đổi gen cao hơn ít nhất 50%, cao hơn ít nhất 75%, cao hơn ít nhất 100%, cao hơn ít nhất 3 lần, cao hơn ít nhất 4 lần, cao hơn ít nhất 5 lần, cao hơn ít nhất 6 lần, cao hơn ít nhất 7 lần, cao hơn ít nhất 8 lần, cao hơn ít nhất 9 lần, cao hơn ít nhất 10 lần, cao hơn ít nhất 15 lần, cao hơn ít nhất 20 lần, cao hơn ít nhất 25 lần, cao hơn ít nhất 30 lần, cao hơn ít nhất 40 lần, cao hơn ít nhất 50 lần, cao hơn ít nhất 60 lần, cao hơn ít nhất 70 lần, cao hơn ít nhất 80 lần, cao hơn ít nhất 90 lần, cao hơn ít nhất 100 lần, cao hơn ít nhất 125 lần, cao hơn ít nhất 150 lần, cao hơn ít nhất 175 lần, cao hơn ít nhất 200 lần, cao hơn ít nhất 225 lần, hoặc cao hơn ít nhất 250 lần trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với mức polypeptit Yếu tố IX biến đổi gen ở máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX

được mã hóa tự nhiên. Mức polypeptit Yếu tố IX trong máu của động vật có thể được đo, ví dụ, bằng thử nghiệm ELISA cụ thể cho polypeptit Yếu tố IX.

“Hoạt tính Yếu tố IX” hoặc “hoạt tính serin proteaza với Yếu tố IX” trong đây có nghĩa là khả năng tách polypeptit Yếu tố X trong sự có mặt của đồng yếu tố Yếu tố VIIIa, ví dụ, thông qua sự thủy phân liên kết peptit Arg194-Ile195 trong Yếu tố IX kiểu dại, do đó hoạt hóa Yếu tố X thành Yếu tố Xa. Mức hoạt tính này có thể đo được bằng cách sử dụng hoạt tính Yếu tố IX đã biết bất kỳ trong lĩnh vực này; các thử nghiệm bất kỳ được nêu trong đây; thử nghiệm minh họa để chứng minh hoạt tính Yếu tố IX là thử nghiệm đông máu Yếu tố IX một bước được mô tả trong Chương 2.7.11 của Dược điển Châu Âu 9.0, sử dụng trong các ví dụ được minh họa trong đây. Theo một số phương án, sự suy giảm hoạt tính FIX trong huyết tương của người được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm đông máu một bước để xác định tính đặc hiệu Yếu tố IX.

Do một số biến thể Yếu tố IX có hoạt tính đặc biệt tăng so với Yếu tố IX kiểu dại *in vivo*, ví dụ, biến thể ‘Padua’ của người có hoạt tính serin proteaza Yếu tố IX cao hơn 5 lần đến 10 lần so với Yếu tố IX người được mã hóa tự nhiên, theo một số phương án, khả năng điều trị của chế phẩm polynucleotit Yếu tố IX được đánh giá bởi mức tăng hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX, ví dụ, thay vì hoặc ngoài mức biểu hiện Yếu tố IX tăng. Theo một số phương án, như sử dụng trong đây, hoạt tính Yếu tố IX tăng để chỉ sự tăng cao hơn trong hoạt tính Yếu tố IX trong máu động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với hoạt tính Yếu tố IX cơ bản trong máu của động vật trước khi sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với mức tăng hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên, so với hoạt tính Yếu tố IX cơ bản trong máu của động vật trước khi sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên. Theo một số phương án, hoạt tính Yếu tố IX tăng để chỉ mức tăng ít nhất 25% trong hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với mức ban đầu của hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật trước khi sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với mức tăng hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên, so với mức ban đầu của hoạt tính Yếu tố IX ở động vật trước khi sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên. Theo một số phương án, hoạt tính Yếu

tổ IX tăng để chỉ cao hơn ít nhất 50%, cao hơn ít nhất 75%, cao hơn ít nhất 100%, cao hơn ít nhất 3 lần, cao hơn ít nhất 4 lần, cao hơn ít nhất 5 lần, cao hơn ít nhất 6 lần, cao hơn ít nhất 7 lần, cao hơn ít nhất 8 lần, cao hơn ít nhất 9 lần, cao hơn ít nhất 10 lần, cao hơn ít nhất 15 lần, cao hơn ít nhất 20 lần, cao hơn ít nhất 25 lần, cao hơn ít nhất 30 lần, cao hơn ít nhất 40 lần, cao hơn ít nhất 50 lần, cao hơn ít nhất 60 lần, cao hơn ít nhất 70 lần, cao hơn ít nhất 80 lần, cao hơn ít nhất 90 lần, cao hơn ít nhất 100 lần, cao hơn ít nhất 125 lần, cao hơn ít nhất 150 lần, cao hơn ít nhất 175 lần, cao hơn ít nhất 200 lần, cao hơn ít nhất 225 lần, hoặc cao hơn ít nhất 250 lần mức tăng hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với mức ban đầu của hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật trước khi sử dụng polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, so với sự tăng mức hoạt tính Yếu tố IX trong máu của động vật sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên, so với mức ban đầu của hoạt tính Yếu tố IX ở động vật trước khi sử dụng polynucleotit Yếu tố IX được mã hóa tự nhiên. Hoạt tính được đo bởi thử nghiệm đông máu Yếu tố IX một bước được mô tả trong Chương 2.7.11 của Dược điển Châu Âu 9.0, như được mô tả trong đây.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "bệnh máu khó đông" để chỉ nhóm tình trạng bệnh có đặc trưng chủ yếu là sự đông máu hoặc tạo cục máu giảm. Bệnh máu khó đông có thể là bệnh máu khó đông Typ A, Typ B, hoặc Typ C, hoặc kết hợp cả ba typ bệnh này. Bệnh máu khó đông Typ A (bệnh máu khó đông dạng A) gây ra do sự giảm hoặc mất hoạt tính yếu tố VIII (FVIII) và là phân typ bệnh máu khó đông nổi bật nhất. Bệnh máu khó đông Typ B (bệnh máu khó đông dạng B) là do sự giảm hoặc mất chức năng đông máu yếu tố IX (FIX). Bệnh máu khó đông Typ C (bệnh máu khó đông dạng C) là kết quả của sự mất hoặc giảm hoạt tính đông máu của yếu tố XI (FXI). Bệnh máu khó đông dạng A và B là bệnh có liên quan đến đột biến gen, trong khi bệnh máu khó đông dạng C là thuộc nhiễm sắc thể thường. Việc điều trị thông thường đối với bệnh máu khó đông bao gồm cả việc dùng dự phòng và dùng theo yêu cầu các yếu tố gây đông máu, như FVIII, FIX, bao gồm Bebulin®-VH, và FXI, cũng như FEIBA-VH, desmopressin, và truyền huyết tương.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "liệu pháp gen Yếu tố IX", hoặc "liệu pháp gen FIX," bao gồm phương pháp điều trị bất kỳ mà cung cấp axit nucleic mã hóa Yếu tố IX cho bệnh nhân để làm giảm nhẹ, giảm bớt, hoặc ngăn ngừa sự tái phát một hoặc

nhiều triệu chứng (ví dụ, yếu tố lâm sàng) liên quan đến việc suy giảm Yếu tố IX (ví dụ, bệnh máu khó đông typ B). Thuật ngữ này bao gồm việc sử dụng hợp chất, được chất, quy trình, hoặc phác đồ bất kỳ bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa Yếu tố IX, bao gồm dạng biến đổi bất kỳ của Yếu tố IX (ví dụ, biến thể Yếu tố VIII R384L), để duy trì hoặc cải thiện sức khỏe của cá thể mắc chứng suy giảm Yếu tố IX (ví dụ, bệnh máu khó đông typ B). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có thể thay đổi thời gian của liệu pháp gen FIX hoặc liều của chất điều trị trong liệu pháp gen FIX, ví dụ, dựa trên kết quả thu được phù hợp với bản mô tả này.

Thuật ngữ "lượng hoặc liều có hiệu quả điều trị" hoặc "lượng hoặc liều đủ để có hiệu quả điều trị" hoặc "lượng hoặc liều đủ hoặc có hiệu quả" để chỉ liều mà gây ra được tác dụng điều trị cho đối tượng sử dụng nó. Ví dụ, lượng có hiệu quả điều trị của được chất hữu dụng để điều trị bệnh máu khó đông có thể là lượng có khả năng phòng hoặc giảm nhẹ một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh máu khó đông.

Theo một số phương án, việc điều trị có hiệu quả chữa bệnh dẫn đến việc giảm tần suất và/hoặc mức độ nặng của sự sơ ý chảy máu ở đối tượng.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "gen" để chỉ một đoạn phân tử ADN mà mã hóa chuỗi polypeptit (ví dụ, vùng mã hóa). Theo một số phương án, gen được định vị bởi các vùng ngay trước, sau, và/hoặc ở giữa vùng mã hóa có vai trò trong việc tạo ra chuỗi polypeptit (ví dụ, yếu tố điều hòa như gen khởi đầu, gen tăng cường, trình tự polyadenyl hóa, vùng 5' không dịch mã, vùng 3' không dịch mã, hoặc intron).

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "yếu tố điều hòa" để chỉ trình tự nucleotit, như gen khởi đầu, gen tăng cường, gen kết thúc, trình tự polyadenyl hóa, intron, v.v., mà mang lại sự biểu hiện trình tự mã hóa trong tế bào.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "yếu tố gen khởi đầu" để chỉ trình tự nucleotit mà hỗ trợ kiểm soát sự biểu hiện trình tự mã hóa. Thông thường, yếu tố gen khởi đầu được đặt ở đầu 5' của vị trí bắt đầu dịch mã của gen. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, yếu tố gen khởi đầu có thể được đặt trong trình tự intron, hoặc đầu 3' của trình tự mã hóa. Theo một số phương án, gen khởi đầu hữu dụng cho vector liệu pháp gen có nguồn gốc từ gen tự nhiên của protein đích (ví dụ, gen khởi đầu Yếu tố VIII). Theo một số phương án, gen khởi đầu hữu dụng cho vector liệu pháp gen là đặc hiệu với sự biểu hiện trong tế bào hoặc mô cụ thể của cơ quan đích (ví dụ, gen

khởi đầu đặc hiệu gan). Theo một số phương án khác nữa, một trong số nhiều yếu tố gen khởi đầu đã xác định rõ được sử dụng trong vector liệu pháp gen được mô tả trong đây. Ví dụ không hạn chế về yếu tố gen khởi đầu đã được xác định rõ bao gồm gen khởi đầu sớm CMV, gen khởi đầu β -actin, và gen khởi đầu protein gắn kết methyl CpG 2 (MeCP2). Theo một số phương án, gen khởi đầu là gen khởi đầu cấu trúc, nó thúc đẩy sự biểu hiện gần như không đổi của protein đích. Theo các phương án khác, gen khởi đầu là gen khởi đầu cảm ứng, nó thúc đẩy sự biểu hiện của protein đích đáp ứng lại với kích thích cụ thể (ví dụ, sự tiếp xúc với phương pháp điều trị hoặc chất điều trị cụ thể). Đánh giá về việc thiết kế gen khởi đầu cho liệu pháp gen do AAV, xem Gray và đồng tác giả (Human Gene Therapy 22:1143-53 (2011)), nội dung được đưa vào đây rõ ràng bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích.

Như sử dụng trong đây, yếu tố “CRM8” để chỉ môđun điều hòa tác động kiểu cis có nguồn gốc từ gen SERPINA1 (số lưu trữ NCBI là NM_000295.4) làm tăng cường sự biểu hiện của gen được liên kết điều khiển, ví dụ, trình tự mã hóa polypeptit Yếu tố IX, theo kiểu đặc hiệu gan có độ tương đồng trình tự cao với SEQ ID NO:39. Như sử dụng trong đây, yếu tố CRM8 để chỉ một bản sao của yếu tố điều hòa mà, theo một số phương án, được đưa vào trong một hoặc nhiều bản sao trong polynucleotit Yếu tố IX, ví dụ, 1, 2, 3 bản sao, hoặc nhiều hơn. Để có thêm thông tin về yếu tố CRM, như CRM8, xem Chuah MK và đồng tác giả, Mol Ther., 22(9):1605-13 (2014), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Như sử dụng trong đây, “MVM intron” để chỉ trình tự intron có nguồn gốc từ MVM (minute virus of mice) có độ tương đồng trình tự cao với SEQ ID NO:53. Để có thêm thông tin về chính MVM intron, xem Haut và Pintel, J Virol. 72(3):1834-43 (1998), và việc sử dụng MVM intron trong vector liệu pháp gen AAV, xem Wu Z và đồng tác giả, Mol Ther., 16(2):280-9 (2008), cả hai được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “liên kết điều khiển” để chỉ mối liên quan giữa trình tự nucleotit đối chứng thứ nhất (ví dụ, gen) và trình tự nucleotit thứ hai (ví dụ, yếu tố kiểm soát điều hòa) cho phép trình tự nucleotit thứ hai tác động đến một hoặc nhiều đặc điểm liên quan đến trình tự nucleotit đối chứng thứ nhất (ví dụ, tốc độ phiên mã). Trong phạm vi bản mô tả này, yếu tố kiểm soát điều hòa được liên kết điều khiển với gen biến đổi Yếu tố IX khi yếu tố điều hòa này được đặt trong vector liệu

pháp gen sao cho nó gây ảnh hưởng (ví dụ, tác động kích thích hoặc chọn lọc mô) lên sự phiên mã của Yếu tố IX gen biến đổi.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "vector" để chỉ cấu trúc axit nucleic bất kỳ sử dụng để chuyển axit nucleic Yếu tố IX vào trong tế bào chủ. Theo một số phương án, vector bao gồm đơn vị sao chép, có chức năng sao chép cấu trúc axit nucleic. Ví dụ không hạn chế về vector hữu dụng cho liệu pháp gen bao gồm plasmit, thực khuẩn thể, cosmit, nhiễm sắc thể nhân tạo, và virus, có chức năng là các đơn vị sao chép tự động in vivo. Theo một số phương án, vector là vector virus để đưa axit nucleic Yếu tố IX vào trong tế bào chủ. Nhiều virus nhân điển hình biến đổi hữu dụng cho liệu pháp gen đã được biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, virus liên quan đến adeno (AAV) là đặc biệt thích hợp để sử dụng trong liệu pháp gen ở người do người là thể chủ tự nhiên của virus, các virus tự nhiên chưa được biết có góp phần gây ra bệnh bất kỳ, và virus gây đáp ứng miễn dịch nhẹ.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “vector virus Yếu tố IX” để chỉ virus tái tổ hợp chứa polynucleotit Yếu tố IX, mã hóa polypeptit Yếu tố IX, đủ để biểu hiện polypeptit Yếu tố IX khi được đưa vào trong động vật chủ thích hợp (ví dụ, người). Cụ thể trong định nghĩa về vector virus Yếu tố IX là virus tái tổ hợp trong đó polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, mà mã hóa polypeptit Yếu tố IX, đã được lồng vào trong hệ gen của virus. Cũng cụ thể trong định nghĩa về vector virus Yếu tố IX là các virus tái tổ hợp trong đó hệ gen tự nhiên của virus đã được thay thế bởi polynucleotit Yếu tố IX, mà nó mã hóa polypeptit Yếu tố IX. Nằm trong định nghĩa về vector virus Yếu tố IX là virus tái tổ hợp chứa polynucleotit Yếu tố IX, mã hóa biến thể “Padua” của Yếu tố IX.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “hạt virus Yếu tố IX” để chỉ hạt virus bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX, mã hóa polypeptit Yếu tố IX, đặc hiệu để biểu hiện polypeptit Yếu tố IX khi được đưa vào trong động vật chủ thích hợp (ví dụ, người). Cụ thể trong định nghĩa về hạt virus Yếu tố IX là các hạt virus tái tổ hợp bao ngoài hệ gen trong đó polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, mã hóa polypeptit Yếu tố IX, đã được lồng vào. Cũng cụ thể trong định nghĩa về hạt virus Yếu tố IX là hạt virus tái tổ hợp bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX, mà mã hóa polypeptit Yếu tố IX, nó thay thế hệ gen tự nhiên của virus. Nằm trong định nghĩa về hạt virus Yếu tố IX là các hạt virus tái tổ hợp bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX, mã hóa biến thể “Padua” của Yếu tố IX.

“AAV” hoặc “virus liên quan đến adeno” trong đây có nghĩa là Dependoparvovirus nằm trong chi Parvoviridae của virus. Như sử dụng trong đây, AAV có thể chỉ virus có nguồn gốc từ hệ gen AAV “kiểu đại” có trong tự nhiên mà polynucleotit Yếu tố IX đã được lồng vào trong đó, virus tái tổ hợp có nguồn gốc từ polynucleotit Yếu tố IX tái tổ hợp được nhồi vào trong capsit bằng cách sử dụng các protein capsit được mã hóa bởi gen cap của AAV có trong tự nhiên, hoặc virus tái tổ hợp có nguồn gốc từ polynucleotit Yếu tố IX tái tổ hợp được nhồi vào trong capsit bằng cách sử dụng protein capsit được mã hóa bởi gen cap capsit có trong tự nhiên. Nằm trong định nghĩa về AAV là virus AAV typ 1 (AAV1), AAV typ 2 (AAV2), AAV typ 3 (AAV3), AAV typ 4 (AAV4), AAV typ 5 (AAV5), AAV typ 6 (AAV6), AAV typ 7 (AAV7), AAV typ 8 (AAV8), và AAV typ 9 (AAV9) bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX và virus được tạo ra bởi một hoặc nhiều biến thể protein capsit AAV bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX.

“AAV8”, “AAV-8”, hoặc “typ huyết thanh AAV 8” trong đây có nghĩa là virus được tạo ra bởi protein virus capsit AAV8 mà bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “CpG” để chỉ dinucleotit xytosin-guanin dọc theo sợi ADN đơn, với “p” là liên kết phosphat nằm giữa hai nucleotit.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “đảo CpG” để chỉ vùng nằm trong polynucleotit có mật độ dinucleotit CpG tăng có ý nghĩa thống kê. Như sử dụng trong đây, vùng polynucleotit (ví dụ, polynucleotit mã hóa protein Yếu tố IX biến đổi ở codon) là đảo CpG nếu, trên cửa sổ 200-cặp bazơ: (i) vùng này có hàm lượng GC cao hơn 50%, và (ii) tỷ lệ dinucleotit CpG quan sát được trên dinucleotit CpG dự tính ít nhất là 0,6, như xác định được bởi mối tương quan:

$$\frac{N[\text{CpG}] \cdot N[\text{chiều dài cửa sổ}]}{N[\text{C}] \cdot N[\text{G}]} \geq 0,6.$$

Về thông tin thêm của phương pháp xác định đảo CpG, xem Gardiner-Garden M. và đồng tác giả, J Mol Biol., 196(2):261-82 (1987), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "axit nucleic" để chỉ deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit và polyme của nó ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép, và các bộ thể của chúng.

Thuật ngữ này bao gồm các axit nucleic chứa các chất tương tự nucleotit hoặc các gốc hoặc liên kết có khung biến đổi, là tổng hợp, có trong tự nhiên, và không có trong tự nhiên, có đặc điểm gắn kết tương đương như axit nucleic đối chứng, và được chuyển hóa theo cách tương tự với nucleotit đối chứng. Ví dụ về các chất tương tự bao gồm, không hạn chế ở, phosphorothioat, phosphoramidat, etyl phosphonat, etyl phosphonat khảm, 2-O-etyl ribonucleotit, và peptit-axit nucleic (PNA). Tuy nhiên, các phương án đặc biệt hữu dụng, để sử dụng trong liệu pháp gen ở bệnh nhân, sử dụng các liên kết phosphodiester.

“Chế phẩm axit nucleic” trong đây có nghĩa là phân tử hoặc chế phẩm bất kỳ bao gồm polynucleotit Yếu tố IX, mã hóa polynucleotit Yếu tố IX. Nằm trong định nghĩa về chế phẩm axit nucleic là polynucleotit Yếu tố IX, dung dịch nước chứa polynucleotit Yếu tố IX, hạt virus bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX, và chế phẩm nước chứa hạt virus bao ngoài polynucleotit Yếu tố IX. Chế phẩm axit nucleic, như bộc lộ trong đây, bao gồm gen FIX biến đổi ở codon, mà mã hóa polypeptit FIX.

Thuật ngữ “axit amin” để chỉ axit amin có trong tự nhiên và axit amin không tự nhiên, bao gồm các chất tương tự axit amin và chất giả axit amin có chức năng theo cách tương tự với axit amin có trong tự nhiên. Axit amin có trong tự nhiên bao gồm các axit amin được mã hóa bởi mã di truyền, cũng như các axit amin mà được biến đổi sau đó, ví dụ, hydroxyprolin, γ -carboxyglutamat, và O-phosphoserin. Axit amin có trong tự nhiên có thể bao gồm, ví dụ, D- và L-axit amin. Theo trình tự axit amin, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ là các đột biến thế, xóa hoặc thêm cụ thể với trình tự axit nucleic hoặc peptit mà biến đổi, thêm hoặc xóa một axit amin hoặc một phần trăm nhỏ các axit amin trong trình tự được mã hóa là “biến thể biến đổi có tính bảo tồn” trong đó các thay đổi gây ra sự thế axit amin bởi một axit amin tương tự về hóa học. Bảng đột biến thế bảo tồn nêu axit amin tương tự về chức năng đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các biến thể biến đổi có tính bảo tồn như vậy là thêm vào và không loại trừ biến thể đa hình, gen tương đồng giao thoa giữa các loài, và alen theo sáng chế.

Đột biến thế axit amin bảo tồn tạo ra các axit amin tương đương về chức năng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phụ thuộc vào chức năng của axit amin cụ thể, ví dụ, axit amin quan trọng về xúc tác, cấu trúc, hoặc không gian, việc tạo nhóm khác nhau của các axit amin có thể được coi là đột biến thế bảo tồn cho nhau. .

Bảng 1 cung cấp các cách tạo nhóm axit amin được coi là đột biến thể bảo tồn dựa trên điện tích và độ phân cực của axit amin, độ kỵ nước của axit amin, sự tiếp xúc bề mặt/bản chất cấu trúc của axit amin, và xu hướng cấu trúc bậc hai của axit amin.

Bảng 1. Các tạo nhóm của đột biến thể axit amin bảo tồn dựa trên chức năng của gốc trong protein.

Đặc điểm quan trọng	Các tạo nhóm bảo tồn
Điện tích/Độ phân cực	1. H, R, và K 2. D và E 3. C, T, S, G, N, Q, và Y 4. A, P, M, L, I, V, F, và W
Độ kỵ nước	1. D, E, N, Q, R, và K 2. C, S, T, P, G, H, và Y 3. A, M, I, L, V, F, và W
Cấu trúc/Sự tiếp xúc bề mặt	1. D, E, N, Q, H, R, và K 2. C, S, T, P, A, G, W, và Y 3. M, I, L, V, và F
Xu hướng cấu trúc bậc hai	1. A, E, Q, H, K, M, L, và R 2. C, T, I, V, F, Y, và W 3. S, G, P, D, và N
Bảo tồn có tính tiến hóa	1. D và E 2. H, K, và R 3. N và Q 4. S và T 5. L, I, và V 6. F, Y, và W 7. A và G 8. M và C

Thuật ngữ “giống” hoặc phần trăm “tương đồng”, trong ngữ cảnh hai hoặc nhiều axit nucleic hoặc trình tự peptit, để chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con mà giống hoặc có phần trăm cụ thể gốc axit amin hoặc nucleotit giống (tức là, khoảng 60% tương đồng, tốt hơn là tương đồng 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc cao hơn so với một vùng xác định, khi so sánh và sắp hàng để có tương ứng tối đa trên cửa sổ so sánh hoặc vùng được chỉ định) như đo được bằng thuật toán so sánh trình tự BLAST hoặc BLAST 2.0 với các thông số mặc định được mô tả sau đây, hoặc bằng cách sắp hàng thủ công và kiểm tra bằng mắt thường.

Như đã biết trong lĩnh vực này, một số chương trình khác nhau có thể được sử dụng để xác định liệu một protein (hoặc axit nucleic như bàn luận dưới đây) có độ

tương đồng hoặc độ tương tự trình tự với trình tự đã biết hay không. Độ tương đồng và/hoặc độ tương tự trình tự được xác định bằng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuật toán độ tương đồng trình tự riêng của Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), thuật toán sắp xếp độ tương đồng trình tự của Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), việc tìm kiếm phương pháp nghiên cứu độ tương tự của Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:2444 (1988), bởi các thao tác máy tính hóa các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong gói phần mềm Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), chương trình trình tự Best Fit được mô tả bởi Devereux và đồng tác giả, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395 (1984), tốt hơn là sử dụng các thiết lập mặc định, hoặc bằng cách kiểm tra. Tốt hơn là, phần trăm tương đồng được tính bởi FastDB dựa trên các thông số sau: điểm phạt không khớp 1; điểm phạt khoảng cách là 1; điểm phạt kích thước khoảng cách là 0,33; và điểm phạt chỗ nối là 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, trang 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc, tất cả được đưa vào bằng cách viện dẫn.

Ví dụ về thuật toán hữu dụng là PILEUP. PILEUP tạo ra một sự sắp hàng nhiều trình tự từ một nhóm các trình tự cùng họ bằng cách sử dụng cách sắp xếp từng cặp, tiến dần. Cũng có thể vẽ một cây biểu đồ thể hiện mối quan hệ chùm sử dụng để tạo ra cách sắp hàng. PILEUP sử dụng cách đơn giản hóa phương pháp sắp hàng tiến dần của Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987); phương pháp này tương tự với phương pháp được mô tả bởi Higgins & Sharp *CABIOS* 5:151-153 (1989), cả hai được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các thông số PILEUP hữu dụng bao gồm khối lượng khoảng cách mặc định là 3,00, khối lượng chiều dài khoảng cách mặc định là 0,10, và các khoảng cách cuối có trọng số.

Ví dụ khác về thuật toán hữu dụng là thuật toán BLAST, được mô tả trong: Altschul và đồng tác giả, *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, (1990); Altschul và đồng tác giả, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997); và Karlin và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787 (1993), cả hai được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Chương trình BLAST đặc biệt hữu dụng là chương trình WU-BLAST-2 mà có được từ Altschul và đồng tác giả, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996); [http://blast.wustl.edu/blast/ README.html](http://blast.wustl.edu/blast/README.html)]. WU-BLAST-2 sử dụng nhiều thông số

tìm kiếm, hầu hết được đặt ở giá trị mặc định. Các thông số có thể điều chỉnh được được đặt với các giá trị sau: khoảng xếp chồng = 1, mảnh xếp chồng = 0,125, ngưỡng từ (T) = 11. Thông số HSP S và HSP S2 là giá trị động và được thiết lập sẵn bởi chương trình phụ thuộc vào cấu tạo của trình tự cụ thể và cấu tạo của dữ liệu cụ thể mà trình tự được quan tâm nghiên cứu dựa trên đó; tuy nhiên, các giá trị có thể thay đổi để làm tăng độ nhạy.

Một thuật toán hữu dụng khác là BLAST tạo khoảng trống, như được báo cáo bởi Altschul và đồng tác giả, Nucl. Acids Res., 25:3389-3402, viện dẫn đưa vào đây. BLAST tạo khoảng trống sử dụng điểm số thay thế BLOSUM-62; thông số ngưỡng T được đặt ở 9; phương pháp so khớp hai lần để khởi động các đoạn mở rộng không tạo khoảng trống; tính độ dài khoảng trống của giá trị k là $10+k$; Xu đặt ở giá trị 16, và Xg đặt ở giá trị 40 cho bước tìm kiếm dữ liệu và đến giá trị 67 cho bước xuất kết quả của thuật toán. Cách sắp hàng có khoảng trống được khởi động bởi điểm tương ứng với ~ 22 bit.

Giá trị % độ tương đồng trình tự axit amin được xác định bởi số gốc giống hết khớp nhau chia cho tổng số gốc của trình tự “dài hơn” trong vùng được sắp hàng. Trình tự “dài hơn” là trình tự có các gốc thực tế nhất trong vùng được sắp hàng (các khoảng cách được đưa vào bởi WU-Blast-2 để tối đa hóa điểm số sắp hàng được bỏ qua). Theo cách tương tự, “phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit nucleic” so với trình tự mã hóa của polypeptit xác định được định nghĩa là phần trăm các gốc nucleotit trong trình tự xem xét giống với các gốc nucleotit trong trình tự mã hóa của protein chu trình tế bào. Phương pháp ưu tiên sử dụng mô đun BLASTN của WU-BLAST-2 được đặt ở các thông số mặc định, với khoảng xếp chồng và mảnh xếp chồng lần lượt được đặt là 1 và 0,125.

Việc sắp hàng có thể bao gồm việc đưa vào các khoảng trống trong trình tự được sắp hàng. Ngoài ra, với trình tự chứa hoặc nhiều axit amin hơn hoặc ít axit amin hơn so với protein được mã hóa bởi trình tự Yếu tố IX kiểu đại của Fig.3A (SEQ ID NO:2), hiểu rằng theo một phương án, phần trăm độ tương đồng trình tự sẽ được xác định dựa trên số axit amin hoặc nucleotit giống hết so với tổng số axit amin hoặc nucleotit. Do đó, ví dụ, độ tương đồng trình tự của trình tự ngắn hơn trình tự nêu trong Fig.3A (SEQ ID NO:2), như bàn luận sau đây, sẽ được xác định bởi số nucleotit trong trình tự ngắn hơn, theo một phương án. Trong các phép tính về phần trăm tương đồng,

không gán khối lượng tương đối cho các thể hiện khác của phép biến đổi trình tự, như, đột biến xen, xóa, thế, v.v.

Theo một phương án, chỉ các phần giống nhau được tính điểm dương (+1) và tất cả các dạng biến đổi trình tự bao gồm đoạn cách được gán giá trị “0”, điều này tránh việc cần thiết phải dùng chỉ số đo hoặc thông số có trọng số như mô tả sau đây về phương pháp tính độ tương tự trình tự. Phần trăm độ tương đồng trình tự có thể được tính toán, ví dụ, bằng cách chia số gốc giống hết khớp nhau cho tổng số gốc của trình tự “ngắn hơn” trong vùng sắp hàng và nhân với 100. Trình tự “dài hơn” là trình tự có các gốc thực tế nhất trong vùng sắp hàng.

Thuật ngữ “biến thể alen” để chỉ dạng đa hình của gen ở locut gen cụ thể, cũng như các ADN vòng có nguồn gốc từ bản sao mRNA của gen, và các polypeptit được mã hóa bởi chúng. Thuật ngữ “codon động vật có vú được ưu tiên” để chỉ tập hợp con các codon từ trong tập hợp các codon mã hóa axit amin thường sử dụng nhất trong protein được biểu hiện trong tế bào động vật có vú như được chọn từ danh sách sau: Gly (GGC, GGG); Glu (GAG); Asp (GAC); Val (GTG, GTC); Ala (GCC, GCT); Ser (AGC, TCC); Lys (AAG); Asn (AAC); Met (ATG); Ile (ATC); Thr (ACC); Trp (TGG); Cys (TGC); Tyr (TAT, TAC); Leu (CTG); Phe (TTC); Arg (CGC, AGG, AGA); Gln (CAG); His (CAC); và Pro (CCC).

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ biến đổi ở codon để chỉ trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit (ví dụ, protein Yếu tố IX), trong đó ít nhất một codon của polynucleotit tự nhiên này mã hóa polypeptit đã được thay đổi để cải thiện đặc tính của trình tự polynucleotit. Theo một số phương án, đặc tính được cải thiện sẽ thúc đẩy sự phiên mã tăng lên của mRNA mã hóa polypeptit, độ ổn định tăng lên của mRNA (ví dụ, thời gian bán thải của mRNA được cải thiện), sự dịch mã tăng lên của polypeptit, và/hoặc sự nhồi polynucleotit vào trong vector tăng lên. Ví dụ không hạn chế về các thay đổi có thể được sử dụng để đạt được đặc tính cải thiện bao gồm thay đổi cách sử dụng và/hoặc phân bố của các codon đối với các axit amin cụ thể, điều chỉnh hàm lượng GC toàn bộ và/hoặc cục bộ, loại bỏ trình tự giàu AT, loại bỏ các phần tử trình tự lặp lại, điều chỉnh hàm lượng dinucleotit CpG toàn bộ và/hoặc cục bộ, loại bỏ yếu tố điều hòa chưa biết rõ (ví dụ, phần tử trong khung TATA và trong khung CCAAT), loại bỏ vị trí ghép intron/exon, cải thiện trình tự điều hòa (ví dụ, đưa trình tự liên ứng

Kozak vào), và loại các phần tử trình tự có khả năng tạo ra cấu trúc bậc hai (ví dụ, cấu trúc vòng-gốc) trong mARN được dịch mã.

Như bản luận trong đây, có các thuật ngữ khác nhau để chỉ các thành phần trong bản mô tả trong đây. “CS-số” (ví dụ “CS02”, “CS03”, “CS04”, “CS05”, “CS06”, v.v.) để chỉ polynucleotit biến đổi ở codon mà mã hóa polypeptit FIX và/hoặc polypeptit đã mã hóa, bao gồm biến thể. Ví dụ, CS02-FL để chỉ trình tự polynucleotit hoặc trình tự axit amin CS02 biến đổi ở codon chiều dài đầy đủ (Full Length) (đôi khi gọi là “CS02-FL-AA” cho trình tự Axit Amin và “CS02-FL-NA” (SEQ ID NO:5) cho trình tự Axit Nucleic) được mã hóa bởi trình tự polynucleotit CS02. Tương tự, “CS02-LC” để chỉ hoặc là trình tự axit nucleic biến đổi ở codon (“CS02-LC-NA” (SEQ ID NO:42)) mã hóa chuỗi nhẹ của polypeptit hoặc trình tự axit amin FIX (đôi khi cũng gọi trong đây là “CS02-LC-AA”) của chuỗi nhẹ FIX được mã hóa bởi trình tự polynucleotit CS02. Tương tự, CS02-HC, CS02-HC-AA, và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:41) là giống với chuỗi nặng FIX. Sẽ rõ ràng trong lĩnh vực này, đối với các cấu trúc như CS02, CS03, CS04, CS05, CS06, v.v., mà chúng chỉ biến đổi ở codon (ví dụ chúng không chứa các đột biến thể axit amin khác so với biến thể Yếu tố IX Padua), trình tự axit amin sẽ giống với, trình tự axit amin không bị biến đổi bằng cách tối ưu hóa codon. Do đó, các cấu trúc trình tự theo bản mô tả bao gồm, nhưng không giới hạn ở, CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5), CS02-FL-AA, CS02-LC-NA (SEQ ID NO:42), CS02-LC-AA, CS02-HC-AA, CS02-HC-NA (SEQ ID NO:41), CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6), CS03-FL-AA, CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44), CS03-LC-AA, CS03-HC-AA, CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43), CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7), CS04-FL-AA, CS04-LC-NA (SEQ ID NO:46), CS04-LC-AA, CS04-HC-AA, CS04-HC-NA, CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8), CS05-FL-AA, CS05-LC-NA (SEQ ID NO:48), CS05-LC-AA, CS05-HC-AA, CS05-HC-NA (SEQ ID NO:47), CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9), CS06-FL-AA, CS06-LC-NA (SEQ ID NO:50), CS06-LC-AA, CS06-HC-AA, và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:49). Nên chú ý rằng tất cả các cấu trúc “CS” trong đây mã hóa hoặc chứa trình tự axit amin FIXp, mặc dù nằm trong định nghĩa về cấu trúc CS là các cấu trúc mã hóa hoặc chứa trình tự axit amin FIX kiểu đại của người.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “biểu hiện đặc hiệu gan” để chỉ sự biểu hiện ưu tiên hoặc nổi trội in vivo của một gen cụ thể (ví dụ, gen Yếu tố IX biến đổi gen, biến đổi ở codon) trong mô gan, so với trong các mô khác. Theo một số phương án,

biểu hiện đặc hiệu gan có nghĩa là ít nhất 50% của tổng mức biểu hiện của gen cụ thể xảy ra trong các mô gan của đối tượng. Theo các phương án khác, biểu hiện đặc hiệu gan có nghĩa là ít nhất 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, hoặc 100% của tổng mức biểu hiện của gen cụ thể xảy ra trong mô gan của đối tượng. Theo đó, yếu tố điều hòa đặc hiệu gan là yếu tố điều hòa thúc đẩy sự biểu hiện đặc hiệu gan của gen trong mô gan.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “nhỏ hơn” X và “nhỏ hơn” X% để chỉ một khoảng từ 0 đến giá trị X, loại trừ giá trị X, ví dụ, từ 0% đến X%, loại trừ giá trị X%. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho khoảng bắt đầu từ 0 hoặc 0% cho đến, nhưng không bao gồm, giá trị X hoặc X%.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “không lớn hơn” X hoặc “không lớn hơn” X% để chỉ một khoảng từ 0 đến X, bao gồm cả giá trị X, ví dụ, từ 0% đến X%, bao gồm giá trị X%. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho một khoảng bắt đầu từ 0 hoặc 0% cho đến, và bao gồm, giá trị X hoặc X%.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “lớn hơn” X hoặc “lớn hơn” X% để chỉ một khoảng từ X đến giới hạn trên, loại trừ giá trị X, ví dụ, từ X% đến 100%, loại trừ giá trị X%. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho khoảng bắt đầu tại, nhưng không bao gồm, X hoặc X% cho đến giới hạn trên là 100% trong trường hợp phần trăm.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “ít nhất” X hoặc “ít nhất” X% để chỉ khoảng từ X đến giới hạn trên, bao gồm cả giá trị X, ví dụ, từ X% đến 100%, bao gồm cả X%. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ được sử dụng thay thế cho một khoảng bắt đầu tại, và bao gồm, X hoặc X% cho đến giới hạn trên là 100% trong trường hợp phần trăm.

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “nằm trong khoảng ‘X’ và ‘Y’”, “nằm giữa ‘X’% và ‘Y’%”, “từ ‘X’ đến ‘Y’”, và “từ ‘X’% đến ‘Y’%” để chỉ khoảng từ X đến Y, bao gồm cả giá trị X và Y, ví dụ, từ X% đến Y%, bao gồm X% và Y%. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho một khoảng bắt đầu tại X hoặc X% cho đến, và bao gồm, Y hoặc Y%.

III. Polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon

Theo một số phương án, bản mô tả này đề xuất chế phẩm axit nucleic biến đổi ở codon mã hóa Yếu tố IX hoặc biến thể Yếu tố IX (với FIXp hữu dụng trong các phương pháp cụ thể). Các polynucleotit biến đổi ở codon này tạo ra sự biểu hiện Yếu tố IX tăng đáng kể khi sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen dựa trên AAV. Polynucleotit biến đổi ở codon cũng chứng minh khả năng nhờ AAV-virion cải thiện, so với cấu trúc tối ưu hóa codon thông thường. Như được chứng minh trong Ví dụ 1, Người nộp đơn đã thu được các thuận lợi thông qua việc tìm ra một số polynucleotit biến đổi ở codon (ví dụ, CS02-FL-NA, CS03-FL-NA, CS04-FL-NA, CS05-FL-NA, và CS06-FL-NA (lần lượt là SEQ ID NO:5-9)) mã hóa polypeptit Yếu tố IXp có đột biến thể axit amin R338L siêu hoạt động (dựa trên trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành; R384L dựa trên trình tự pre-pro-protein Yếu tố IX). Như chứng minh trong Ví dụ 2 và 3, việc đưa một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu ở gan (ví dụ, CRM8) vào trong vectơ liệu pháp gen mã hóa phân tử Yếu tố IX làm tăng thêm mức biểu hiện in vivo và in vitro của Yếu tố IX và hoạt tính Yếu tố IX.

Yếu tố IX kiểu đại được mã hóa bởi peptit tín hiệu 28 axit amin (FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)) và pro-peptit 18 axit amin (FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)), được tách từ polypeptit đã mã hóa trước khi hoạt hóa Yếu tố IXa. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, các peptit tín hiệu và/hoặc pro-peptit có thể được gây đột biến, thay thế bởi peptit tín hiệu và/hoặc pro-peptit từ các gen khác hoặc sinh vật khác, hoặc loại bỏ hoàn toàn, mà không ảnh hưởng đến trình tự của polypeptit trưởng thành còn lại sau khi loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bởi chu trình tế bào.

Theo đó, theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon (ví dụ, chế phẩm axit nucleic) được đề xuất trong đây có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA, CS03-FL-NA, CS04-FL-NA, CS05-FL-NA, hoặc CS06-FL-NA (lần lượt là, SEQ ID NO:5-9) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, tức là, chuỗi nhẹ, peptit hoạt hóa, và chuỗi nặng Yếu tố IX (ví dụ, axit amin 47-461 của polypeptit chiều dài đầy đủ được mã hóa bởi gen Yếu tố IX kiểu đại; FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2)).

Ngoài ra, như đã biết trong lĩnh vực này, Yếu tố IX kiểu đại của người có peptit hoạt hóa 34 axit amin được đặt giữa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX được cắt từ

polypeptit Yếu tố IX sợi đơn khi hoạt hóa protein. Do peptit hoạt hóa bị loại bỏ khỏi polypeptit Yếu tố IX hoạt động, chính peptit này có khả năng phân tách đối với hoạt tính Yếu tố IX cuối cùng. Do đó, không đòi hỏi polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi polynucleotit biến đổi ở codon bậc lộ trong đây có độ tương đồng trình tự cao với trình tự peptit hoạt hóa kiểu đại của người (FIX-AP-AA (SEQ ID NO:56)). Tuy nhiên, peptit hoạt hóa đã mã hóa nên có thể cắt ra được khi hoạt hóa polypeptit Yếu tố IX. Ví dụ, theo một số phương án, peptit hoạt hóa đã mã hóa bao gồm vị trí tách Yếu tố XI ở đầu N và C của nó, vị trí này có thể nhận biết và tách bởi Yếu tố IX của người in-vivo.

Theo đó, theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon (ví dụ, chế phẩm axit nucleic) đề xuất trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn có độ tương đồng trình tự cao với trình tự chuỗi nhẹ FIX kiểu đại của người (FIX-LC-AA (SEQ ID NO:62)) và trình tự chuỗi nặng FIX kiểu đại của người (FIX-HC-AA (SEQ ID NO:63)), và còn mã hóa trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng (ví dụ, peptit hoạt hóa) có hai vị trí tách Yếu tố XI.

Theo một số phương án, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX được mã hóa bởi polynucleotit biến đổi ở codon lần lượt là chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX của người, bao gồm FIXp chuỗi nặng. Theo các phương án khác, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX được mã hóa bởi polynucleotit biến đổi ở codon là trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ động vật có vú khác (ví dụ, Yếu tố IX của lợn). Theo một số phương án khác nữa, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX là chuỗi nhẹ và chuỗi nặng khảm (ví dụ, kết hợp của trình tự người và trình tự động vật có vú thứ hai). Theo một số phương án khác nữa, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng Yếu tố IX là phiên bản được biến đổi cho phù hợp với người của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng từ động vật có vú khác, ví dụ, trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng từ động vật có vú khác trong đó các gốc của người được thế tại các vị trí được chọn để làm giảm tính gây miễn dịch của peptit thu được khi sử dụng cho người.

Hàm lượng GC của gen người biến đổi mạnh, từ nhỏ hơn 25% đến lớn hơn 90%. Tuy nhiên, nói chung, gen người có hàm lượng GC cao hơn được biểu hiện ở các mức độ cao hơn. Ví dụ, Kudla và đồng tác giả (PLoS Biol., 4(6):80 (2006)) chứng minh rằng sự tăng hàm lượng GC của gen làm tăng sự biểu hiện của polypeptit đã mã hóa, chủ yếu bởi sự tăng phiên mã và tạo ra mức độ ổn định cao hơn lên bản sao mARN. Thông thường, hàm lượng GC mong muốn của cấu trúc gen tối ưu hóa codon

được cho là bằng hoặc lớn hơn 60%. Ví dụ, gen Yếu tố IX trong vector liệu pháp gen scAAV8.FIXR338L được biến đổi đặc hiệu ở codon, sử dụng phần mềm GeneOptimizer (Geneart), để làm tăng hàm lượng GC của trình tự mã hóa kiểu đại từ 41% GC đến 61% GC. Xem, Wu Z. và đồng tác giả, *Mol Ther* 16:280–89 (2008) và Monahan PE và đồng tác giả, *Hum Gene Ther.*, 26(2):69-81 (2015). Tuy nhiên, hệ gen AAV tự nhiên có hàm lượng GC khoảng 56%.

Theo đó, theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon (ví dụ, chế phẩm axit nucleic) được đề xuất trong đây có hàm lượng CG khớp gần nhất với hàm lượng GC của virion AAV tự nhiên (ví dụ, GC với lượng khoảng 56%), hàm lượng này thấp hơn hàm lượng CG ưu tiên của polynucleotit mà được tối ưu hóa codon thông thường để biểu hiện trong tế bào động vật có vú (ví dụ, GC ở mức hoặc trên 60%). Ví dụ, CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC khoảng 54%, CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC khoảng 55%, CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC khoảng 54,5%, CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC khoảng 56,6%, và CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC khoảng 55%. Các cấu trúc này có khả năng nhồi virion cải thiện so với trình tự biến đổi ở codon tương tự có hàm lượng GC cao hơn.

Do đó, theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với một trong các trình tự mã hóa Yếu tố IX CS02-CS06) là nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là không lớn hơn 56%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là không lớn hơn 55%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là không lớn hơn 54%.

Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX nằm trong khoảng từ 53% đến 59%. Theo một số

[illegible]

Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là $54 \pm 0,5\%$. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là

54±0,4%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 54±0,3%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 54±0,2%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 54±0,1%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 54%.

Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 55±0,5%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 55±0,4%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 55±0,3%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 55±0,2%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 55±0,1%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 55%.

Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 56±0,5%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 56±0,4%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 56±0,3%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 56±0,2%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 56±0,1%. Theo một số phương án, hàm lượng GC tổng thể của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX là 56%.

Lý thuyết là các dinucleotit CpG (tức là, nucleotit xytosin sau đó là nucleotit guanin) gây ra các đáp ứng miễn dịch thông qua các thụ thể giống toll, in vivo. Một số bằng chứng gợi ý rằng các vector AAV nghèo CpG tránh được sự phát hiện miễn dịch ở chuột, trong một số trường hợp nhất định (Faust và đồng tác giả, J. Clin. Invest. 2013; 123, 2994-3001). Trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)) chứa 20 dinucleotit CpG.

Theo đó, theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) đề xuất trong đây được biến đổi ở codon để làm giảm số lượng dinucleotit CpG trong trình tự mã hóa Yếu tố IX. Ví dụ, CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) không có dinucleotit CpG, CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) không có dinucleotit CpG, CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) không có dinucleotit CpG, CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có 11 dinucleotit CpG, và CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có 3 dinucleotit CpG. Các cấu trúc này nên gây ra các đáp ứng miễn dịch ít hơn so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu dại và trình tự biến đổi ở codon tương tự có số dinucleotit CpG nhiều hơn.

Do đó, theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với một trong các trình tự mã hóa Yếu tố IX CS02-CS06) có ít hơn 20 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có ít hơn 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có ít hơn 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có ít hơn 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có ít hơn 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có ít hơn 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có nhiều hơn 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có không quá 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có không quá 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX không có dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX có không quá 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, hoặc không có dinucleotit CpG.

A. Đột biến thể axit amin Yếu tố IX

Để làm tăng hơn nữa hiệu lực biểu hiện dựa trên vector AAV của các cấu trúc Yếu tố IX được mô tả trong đây, đột biến thể axit amin đã biết là tăng sự tiết, tăng hoạt tính đặc hiệu, và/hoặc tăng độ ổn định của Yếu tố IX được đưa vào thêm, phù hợp với một số phương án thực hiện. Một số biến thể Yếu tố IX tiềm năng đã biết trong lĩnh vực này là làm tăng mức hoạt tính FIX trong huyết tương. Các biến thể này bao gồm đột biến thể axit amin làm tăng hoạt tính xúc tác Yếu tố IX (ví dụ, thể đột biến tăng hoạt tính), làm tăng tính kháng với antithrombin III và/hoặc heparin, làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh, và làm thay đổi mô hình biến đổi sau dịch mã.

Ví dụ, sự đột biến của gốc R338 (PPE) có thể làm tăng hoạt tính gây đông máu của Yếu tố IX. Về tổng quát, xem Patent Mỹ số 6,531,298, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả mục đích. Như bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,531,298, đột biến thể axit amin arginin thành leuxin ở vị trí này làm tăng hoạt tính của Yếu tố IX. Điều này đã được khẳng định sau đó *in vivo*, trong đó đột biến R338L (PPE) làm tăng hoạt tính Yếu tố IX từ 5 lần đến 10 lần *in vivo*. Về tổng quát, xem Simioni P. và đồng tác giả, N Engl J Med. 361(17):1671-75 (2009), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo đó, theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX có đột biến thể axit amin tại arginin 384 (PPI; gốc 338 (PPE)). Theo một phương án cụ thể, đột biến thể axit amin là R384L (PPI). Theo các phương án khác, đột biến thể axit amin ở gốc 384 (PPI)/338 (PPE) thành một gốc không phải leuxin. Ví dụ, đã báo cáo rằng đột biến thể axit amin R384A (PPI) gây ra hoạt tính cao hơn từ 2 đến 6 lần ở chuột. Schuettrumpf J và đồng tác giả, Blood, 105(6):2316-23 (2005), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Tương tự, đột biến ở các gốc Y305, K311, S365, và Y391 dẫn đến hoạt tính Yếu tố IX tăng trên cơ chất tổng hợp. Cụ thể là, đột biến đơn K311M và K311T gây tăng hoạt tính từ 2,8 lần đến 6,7 lần trên cơ chất tách tổng hợp. Sichler K. và đồng tác giả, J Biol Chem. 278(6):4121-26 (2003) (sử dụng cách đánh số gốc khác). Hơn nữa, đột biến bộ ba Y305F/K311T/Y391T gây tăng hoạt tính 7000 lần trên cơ chất tổng hợp. Id. Theo đó, theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX có đột biến thể axit amin ở một hoặc nhiều tyrosin 305 (PPI), lysin 311 (PPI), và tyrosin 391 (PPI). Theo một phương án cụ thể,

đột biến thế axit amin là K311M (PPI). Theo một phương án cụ thể, đột biến thế axit amin là K311T (PPI). Theo một phương án cụ thể khác, đột biến thế axit amin là Y305F/K311T/Y391T (PPI).

Đột biến thế axit amin khác mang lại các đặc tính cải thiện đã được biết trong lĩnh vực này và có thể được đưa vào trong polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon mô tả. Ví dụ, xem, Patent Mỹ số 8,778,870, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

B. Polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa Protein Yếu tố IX

Polynucleotit biến đổi ở codon CS02

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit tối ưu hóa codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất

99,9% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự pre-pro-protein Yếu tố IX kiểu đại FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2) và/hoặc trình tự pre-pro-protein Padua (hFIX(R384L)) FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được thành protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX

đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4).

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn (ví dụ, có hoạt tính serin proteaza), trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC giảm,

so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ

tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 1,0$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,8$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,6$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,5$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,4$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,3$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là

53,8%±0,2. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là 53,8%±0,1. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có hàm lượng GC là 53,8%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 9 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 8 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 7 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 6 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) còn bao gồm polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) còn bao gồm pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13) còn bao gồm pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự

axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA

(SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon đề xuất trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất có độ tương đồng trình tự cao với CS02-LC-NA (SEQ ID NO:42), nó là một phần của CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) mã hóa chuỗi nhẹ Yếu tố IX. Chuỗi nặng của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ hai có độ tương đồng trình tự cao với CS02-

HC-NA (SEQ ID NO:41), nó là một phần của CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5) mã hóa chuỗi nặng Yếu tố IX. Trình tự polypeptit liên kết bao gồm vị trí tách Yếu tố XI, điều này cho phép trưởng thành in vivo (ví dụ, sau khi biểu hiện tiền chất polypeptit Yếu tố IX sợi đơn).

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 96% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 97% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 98% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,5% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,9% lần lượt với CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai lần lượt là CS02-LC-NA và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:42 và 41).

Theo một số phương án, trình tự polypeptit liên kết của cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng trình tự cao với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57), là trình tự biến đổi ở codon mã hóa polypeptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu đại, ví dụ, axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 80% với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 90% với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 95% với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 96% với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 97% với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 98% với CS02-AP-NA (SEQ ID

NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 99% với CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba là CS02-AP-NA (SEQ ID NO:57).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa cũng bao gồm peptit tín hiệu (ví dụ, peptit tín hiệu Yếu tố IX) và/hoặc pro-peptit (ví dụ, pro-peptit Yếu tố IX). Theo một số phương án, peptit tín hiệu là peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại (FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)). Theo một số phương án, peptit tín hiệu được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo một số phương án, pro-peptit là pro-peptit Yếu tố IX kiểu đại (FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)). Theo một số phương án, pro-peptit peptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS02-LC-NA (SEQ ID NO:42) và CS02-HC-NA (SEQ ID NO:41), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một

phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc A, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc

100% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc B, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit

Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc C (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc D (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa

pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5).

Polynucleotit biến đổi ở codon CS03

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có hàm lượng GC là

phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự pre-pro-protein Yếu tố IX kiểu đại FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2) và/hoặc trình tự pre-pro-protein Padua (hFIX(R384L)) FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại peptit tín hiệu và pro-peptit, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một

phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4).

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn (ví dụ, có hoạt tính serin proteaza), trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu dại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số

phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu dại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 1,0$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,8$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,6$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,5$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,4$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,3$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,2$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là

53,8%±0,1. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có hàm lượng GC là 53,8%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 9 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 8 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 7 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 6 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) còn bao gồm polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX mã

hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) còn bao gồm pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14) còn bao gồm pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu

tổ IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon đề xuất trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất có độ tương đồng trình tự cao với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44), nó là một phần của CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) mã hóa chuỗi nhẹ Yếu tố IX. Chuỗi nặng của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ hai có độ tương đồng trình tự cao với CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43), nó là một phần của CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6) mã hóa chuỗi nặng Yếu tố IX. Trình tự polypeptit liên kết bao gồm vị trí tách Yếu tố XI, điều

này cho phép trưởng thành in vivo (ví dụ, sau khi biểu hiện tiền chất polypeptit Yếu tố IX sợi đơn).

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 96% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 97% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 98% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,5% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,9% lần lượt với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai lần lượt là CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43).

Theo một số phương án, trình tự polypeptit liên kết của cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng trình tự cao với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58), là trình tự biến đổi ở codon mã hóa polypeptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu đại, ví dụ, axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 80% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 90% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 95% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 96% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 97% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 98% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất

99% với CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba là CS03-AP-NA (SEQ ID NO:58).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa cũng bao gồm peptit tín hiệu (ví dụ, peptit tín hiệu Yếu tố IX) và/hoặc pro-peptit (ví dụ, pro-peptit Yếu tố IX). Theo một số phương án, peptit tín hiệu là peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại (FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)). Theo một số phương án, peptit tín hiệu được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo một số phương án, pro-peptit là pro-peptit Yếu tố IX kiểu đại (FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)). Theo một số phương án, pro-peptit peptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS03-LC-NA (SEQ ID NO:44) và CS03-HC-NA (SEQ ID NO:43), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất

99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc A, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một số phương án, phần trình tự mã

hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc B, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit

Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc C (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc D (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa

pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6).

Polynucleotit biến đổi ở codon CS04

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có hàm lượng GC là

phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự pre-pro-protein Yếu tố IX kiểu đại FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2) và/hoặc trình tự pre-pro-protein Padua (hFIX(R384L)) FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại peptit tín hiệu và pro-peptit, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một

phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4).

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn (ví dụ, có hoạt tính serin proteaza), trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu dại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số

phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu dại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 1,0$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,8$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,6$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,5$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,4$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,3$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,2$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là

53,8%±0,1. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có hàm lượng GC là 53,8%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 9 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 8 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 7 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 6 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) còn bao gồm polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX mã

hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) còn bao gồm pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15) còn bao gồm pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu

tổ IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trường thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon đề xuất trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất có độ tương đồng trình tự cao với CS04-LC-NA (SEQ ID NO:46), nó là một phần của CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) mã hóa chuỗi nhẹ Yếu tố IX. Chuỗi nặng của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ hai có độ tương đồng trình tự cao với CS04-HC-NA (SEQ ID NO:45), nó là một phần của CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7) mã hóa chuỗi nặng Yếu tố IX. Trình tự polypeptit liên kết bao gồm vị trí tách Yếu tố XI, điều

này cho phép trưởng thành in vivo (ví dụ, sau khi biểu hiện tiền chất polypeptit Yếu tố IX sợi đơn).

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 96% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 97% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 98% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,5% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,9% lần lượt với CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai lần lượt là CS04-LC-NA và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:46 và 45).

Theo một số phương án, trình tự polypeptit liên kết của cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng trình tự cao với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59), là trình tự biến đổi ở codon mã hóa polypeptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu dài, ví dụ, axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 80% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 90% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 95% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 96% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 97% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 98% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất

99% với CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba là CS04-AP-NA (SEQ ID NO:59).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa cũng bao gồm peptit tín hiệu (ví dụ, peptit tín hiệu Yếu tố IX) và/hoặc pro-peptit (ví dụ, pro-peptit Yếu tố IX). Theo một số phương án, peptit tín hiệu là peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại (FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)). Theo một số phương án, peptit tín hiệu được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo một số phương án, pro-peptit là pro-peptit Yếu tố IX kiểu đại (FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)). Theo một số phương án, pro-peptit peptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS04-LC-NA (SEQ ID NO:46) và CS04-HC-NA (SEQ ID NO:45), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất

99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc A, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, phần trình tự mã

hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc B, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit

Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc C (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc D (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa

pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7).

Polynucleotit biến đổi ở codon CS05

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có hàm lượng GC là

phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự pre-pro-protein Yếu tố IX kiểu đại FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2) và/hoặc trình tự pre-pro-protein Padua (hFIX(R384L)) FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại peptit tín hiệu và pro-peptit, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một

phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4).

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn (ví dụ, có hoạt tính serin proteaza), trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số

phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 1,0$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,8$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,6$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,5$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,4$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,3$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,2$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là

53,8%±0,1. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có hàm lượng GC là 53,8%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 9 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 8 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 7 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 6 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) còn bao gồm polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX mã

hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) còn bao gồm pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16) còn bao gồm pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu

tổ IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon đề xuất trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất có độ tương đồng trình tự cao với CS05-LC-NA (SEQ ID NO:48), nó là một phần của CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) bao gồm chuỗi nhẹ Yếu tố IX. Chuỗi nặng của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ hai có độ tương đồng trình tự cao với CS05-HC-NA (SEQ ID NO:47), nó là một phần của CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8) mã hóa chuỗi nặng Yếu tố IX. Trình tự polypeptit liên kết bao gồm vị trí tách Yếu tố XI, điều

này cho phép trưởng thành in vivo (ví dụ, sau khi biểu hiện tiền chất polypeptit Yếu tố IX sợi đơn).

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 96% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 97% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 98% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,5% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,9% lần lượt với CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai lần lượt là CS05-LC-NA và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:48 và 47).

Theo một số phương án, trình tự polypeptit liên kết của cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng trình tự cao với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60), là trình tự biến đổi ở codon mã hóa polypeptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu đại, ví dụ, axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 80% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 90% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 95% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 96% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 97% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 98% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất

99% với CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba là CS05-AP-NA (SEQ ID NO:60).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa cũng bao gồm peptit tín hiệu (ví dụ, peptit tín hiệu Yếu tố IX) và/hoặc pro-peptit (ví dụ, pro-peptit Yếu tố IX). Theo một số phương án, peptit tín hiệu là peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại (FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)). Theo một số phương án, peptit tín hiệu được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo một số phương án, pro-peptit là pro-peptit Yếu tố IX kiểu đại (FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)). Theo một số phương án, pro-peptit peptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS05-LC-NA (SEQ ID NO:48) và CS05-HC-NA (SEQ ID NO:47), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất

99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc A, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14). Theo một số phương án, phần trình tự mã

hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc B, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit

Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc C (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc D (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa

pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phân trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8).

Polynucleotit biến đổi ở codon CS06

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có hàm lượng GC là

phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự pre-pro-protein Yếu tố IX kiểu đại FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2) và/hoặc trình tự pre-pro-protein Padua (hFIX(R384L)) FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại peptit tín hiệu và pro-peptit, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một

phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4).

Theo một phương án, chế phẩm axit nucleic đề xuất trong đây bao gồm polynucleotit Yếu tố IX (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn (ví dụ, có hoạt tính serin proteaza), trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một số phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu đại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)). Theo một số

phương án, trình tự nucleotit của polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có số dinucleotit CpG giảm, so với trình tự mã hóa Yếu tố IX kiểu dại (FIX-FL-NA (SEQ ID NO:1)).

Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 95% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 96% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 97% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 98% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,5% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng ít nhất 99,9% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một phương án cụ thể khác, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon là CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17).

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nhỏ hơn 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 60%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 59%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 58%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 57%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 56%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 55%. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 50% đến 54%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 1,0$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,8$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,6$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,5$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,4$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,3$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là $53,8\% \pm 0,2$. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là

53,8%±0,1. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có hàm lượng GC là 53,8%.

Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 15 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 12 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 10 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 9 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 8 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 7 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 6 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 5 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 4 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 3 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 2 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) có không quá 1 dinucleotit CpG. Theo một số phương án, trình tự của polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) không có dinucleotit CpG.

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) còn bao gồm polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX mã

hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo một số phương án, polynucleotit tín hiệu Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) còn bao gồm pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34). Theo một số phương án, pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự cao với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17) còn bao gồm pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu

tổ IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22). Theo một số phương án, pre-pro-peptit polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon đề xuất trong đây mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và trình tự polypeptit liên kết nối đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ với đầu tận cùng N của chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất có độ tương đồng trình tự cao với CS06-LC-NA (SEQ ID NO:50), nó là một phần của CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) mã hóa chuỗi nhẹ Yếu tố IX. Chuỗi nặng của polypeptit Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ hai có độ tương đồng trình tự cao với CS06-HC-NA (SEQ ID NO:49), nó là một phần của CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9) mã hóa chuỗi nặng Yếu tố IX. Trình tự polypeptit liên kết bao gồm vị trí tách Yếu tố XI, điều

này cho phép trưởng thành in vivo (ví dụ, sau khi biểu hiện tiền chất polypeptit Yếu tố IX sợi đơn).

Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 95% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 96% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 97% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 98% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,5% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai có độ tương đồng trình tự ít nhất 99,9% lần lượt với CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai lần lượt là CS06-LC-NA và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:50 và 49).

Theo một số phương án, trình tự polypeptit liên kết của cấu trúc Yếu tố IX được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng trình tự cao với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61), là trình tự biến đổi ở codon mã hóa polypeptit hoạt hóa Yếu tố IX kiểu đại, ví dụ, axit amin 192-226 của FIX-FL-AA (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 80% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 90% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 95% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 96% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 97% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất 98% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba có độ tương đồng ít nhất

99% với CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61). Theo một số phương án, trình tự nucleotit thứ ba là CS06-AP-NA (SEQ ID NO:61).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa cũng bao gồm peptit tín hiệu (ví dụ, peptit tín hiệu Yếu tố IX) và/hoặc pro-peptit (ví dụ, pro-peptit Yếu tố IX). Theo một số phương án, peptit tín hiệu là peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại (FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)). Theo một số phương án, peptit tín hiệu được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, pro-peptit là pro-peptit Yếu tố IX kiểu đại (FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)). Theo một số phương án, pro-peptit peptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một số phương án, polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa, ví dụ, polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự cao với CS06-LC-NA (SEQ ID NO:50) và CS06-HC-NA (SEQ ID NO:49), có độ tương đồng trình tự cao với trình tự polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành, kiểu đại FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10) và/hoặc trình tự sợi đơn Padua trưởng thành (hFIX(R384L)) FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12). Polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa nên giữ được khả năng trở nên hoạt hóa được vào trong protein dung hợp Yếu tố IXa (ví dụ, bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu và pro-peptit bất kỳ, và bằng cách cắt polypeptit hoạt hóa).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất

99,5% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIX-MP-AA (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 85% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit (ví dụ, vị trí 338 của polypeptit Yếu tố IX sợi đơn trưởng thành FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12)). Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 90% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 95% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 96% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 97% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 98% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,5% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa có độ tương đồng ít nhất 99,9% với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12) và bao gồm leuxin ở vị trí 384 của pre-pro-polypeptit. Theo một phương án, trình tự của polypeptit Yếu tố IX đã mã hóa là FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc A, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một số phương án, phần trình tự mã

hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit tự bổ sung có cấu trúc B, trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit

Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc C (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).

Theo một số phương án, tham khảo Fig.1, chế phẩm axit nucleic được đề xuất bao gồm polynucleotit có cấu trúc D (ví dụ, polynucleotit sợi đơn), trong đó phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa polypeptit Yếu tố IX trưởng thành, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-SP-NA (SEQ ID NO:24), CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), và CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo một số phương án, phần trình tự mã hóa FIX của polynucleotit cũng bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa

pro-peptit Yếu tố IX (tùy chọn kết hợp với trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu Yếu tố IX, như được mô tả trên), mà có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với một trong số FIX-PP-NA (SEQ ID NO:30), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), và CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo một số phương án, phân trình tự mã hóa FIX của polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic, mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX, có độ tương đồng ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100% với CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).

C. Peptit tín hiệu và pro-peptit Yếu tố IX biến đổi ở codon

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX, pro-peptit Yếu tố IX, và cả hai (ví dụ, pre-pro-peptit Yếu tố IX). Các polynucleotit biến đổi ở codon cải thiện sự biểu hiện Yếu tố IX và có thể được đặt, ví dụ, ngược dòng với polynucleotit, được biến đổi ở codon hoặc cách khác, mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn (ví dụ, chuỗi nhẹ, peptit hoạt hóa, và chuỗi nặng Yếu tố IX). Nói chung, peptit đã mã hóa là peptit tín hiệu Yếu tố IX kiểu đại (ví dụ, FIX-SP-AA (SEQ ID NO:37)), pro-peptit (ví dụ, FIX-PP-AA (SEQ ID NO:38)), và pre-pro-peptit (FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36)).

Theo một số phương án nhất định, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu, pro-peptit, và pre-pro-peptit Yếu tố IX có trình tự có độ tương đồng cao (ví dụ, ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) với một trong số CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25), CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26), CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27), CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28), CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29), CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31), CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32), CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33), CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34), CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35), CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19), CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20), CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21), CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22), và CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

Peptit tín hiệu và pro-peptit CS02

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu

tổ IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-SP-NA (SEQ ID NO:25).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PP-NA (SEQ ID NO:31).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS02-PPP-NA (SEQ ID NO:19).

Peptit tín hiệu và pro-peptit CS03

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-SP-NA (SEQ ID NO:26).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PP-NA (SEQ ID NO:32).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS03-PPP-NA (SEQ ID NO:20).

Peptit tín hiệu và pro-peptit CS04

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-SP-NA (SEQ ID NO:27).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PP-NA (SEQ ID NO:33).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS04-PPP-NA (SEQ ID NO:21).

Peptit tín hiệu và pro-peptit CS05

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-SP-NA (SEQ ID NO:28).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PP-NA (SEQ ID NO:34).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu

tổ IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS05-PPP-NA (SEQ ID NO:22).

Peptit tín hiệu và pro-peptit CS06

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa peptit tín hiệu Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-SP-NA (SEQ ID NO:29).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PP-NA (SEQ ID NO:35).

Theo một phương án, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23). Theo các phương án khác, polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa pre-pro-peptit Yếu tố IX có độ tương đồng ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

IV. Vector biểu hiện Yếu tố IX

Theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây được hợp nhất vào trong vector biểu hiện. Như sẽ được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, nhiều dạng vector có thể được sử dụng để đem lại liệu pháp gen Yếu tố IX bằng cách sử dụng trình tự polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon bộc lộ trong đây. Ví dụ không hạn chế về vector biểu hiện bao gồm vector virus (ví dụ, vector thích hợp cho liệu pháp gen), vector plasmit, vector thể thực khuẩn, cosmit, phagomit, nhiễm sắc thể nhân tạo, và tương tự.

Theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây được hợp nhất vào trong vector virus liệu pháp gen. Ví dụ không hạn chế về vector virus bao gồm: retrovirus, ví dụ, virus Moloney bạch cầu ở chuột (MMLV-Moloney murine leukemia virus), virus Harvey gây bệnh sarkôm ở chuột, virus gây ung thư vú ở chuột,

và virus Rous gây bệnh sarcoma; adenovirus, virus liên quan đến adeno; virus SV40-typ; polyomavirus; virus Epstein-Barr; virus gây bệnh u nhú; virus herpes; virus đậu bò; và virus gây bệnh bại liệt.

In vivo, Yếu tố IX được tổng hợp chủ yếu trong gan. Do vậy, tế bào gan đã được chọn đích là tế bào chủ thích hợp cho cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX. Một số nhóm vector virus đã được chỉ ra là có hiệu lực phân phối chọn đích tại gan đối với cấu trúc liệu pháp gen, bao gồm vector retrovirus (xem, ví dụ, Axelrod và đồng tác giả, 1990; Kay và đồng tác giả, 1992; Van den Driessche và đồng tác giả, 1999, và Xu và đồng tác giả, 2003, 2005, bản mô tả của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả mục đích), lentivirus (Xem, ví dụ, Ward và đồng tác giả, 2011, Brown và đồng tác giả, 2007, và Matrai và đồng tác giả, 2011, bản mô tả của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả mục đích), virus liên quan đến adeno (AAV) (Xem, ví dụ, Herzog và đồng tác giả, 1999, bản mô tả của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả mục đích), và vector adenovirus (Xem, ví dụ, Brown và đồng tác giả, 2004 và Ehrhardt & Kay, 2002, bản mô tả của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả mục đích).

Theo một số phương án, vector liệu pháp gen là retrovirus, và cụ thể là retrovirus giảm khả năng sao chép. Quy trình tạo ra retrovirus giảm khả năng sao chép đã biết trong lĩnh vực này. Về tổng quát, xem Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) và Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

Theo một phương án, vector liệu pháp gen là liệu pháp gen vector dựa trên virus liên quan đến adeno (AAV). Hệ AAV đã được mô tả trước đây và được biết rõ trong lĩnh vực này (Kelleher và Vos, Biotechniques, 17(6):1110-17 (1994); Cotten và đồng tác giả, P.N.A.S. U.S.A., 89(13):6094-98 (1992); Curiel, Nat Immun, 13(2-3):141-64 (1994); Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97-129 (1992); và Asokan A, và đồng tác giả, Mol. Ther., 20(4):699-708 (2012), mỗi tài liệu được đưa vào đây toàn bộ bằng cách viện dẫn cho tất cả mục đích). Chi tiết liên quan đến việc tạo ra và sử dụng vector rAAV được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,139,941 và 4,797,368, mỗi tài liệu được đưa vào đây toàn bộ bằng cách viện dẫn cho tất cả mục đích. Theo một phương án cụ thể, vector AAV là vector AAV-8.

Vec tơ phân phối AAV ví dụ để biểu hiện Yếu tố IX đặc hiệu ở gan được mô tả trong WO 2009/130208, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả mục đích. Vector này là vector AAV sợi đơn mã hóa Yếu tố IX của người, và bao gồm trình tự điều hòa TTR Serp điều khiển yếu tố ADN vòng. Vector này cũng bao gồm intron I của gen Yếu tố IX của người và trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa.

Theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây được hợp nhất vào trong vector biểu hiện retrovirut. Các hệ này đã được mô tả trước đây, và được biết rõ trong lĩnh vực này (Mann và đồng tác giả, *Cell*, 33:153-159, 1983; Nicolas và Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez và Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, trang 494-513, 1988; Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, trang 149-188, 1986). Theo một phương án cụ thể, vector retrovirut là vector lentivirut (Xem, ví dụ, Naldini và đồng tác giả, *Science*, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey và đồng tác giả, *Nat Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997; Blomer và đồng tác giả, *J Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997; U.S. Pat. Nos. 6,013,516 và 5,994,136).

Theo một số phương án, polynucleotit biến đổi ở codon được mô tả trong đây có thể được sử dụng cho đối tượng bằng phương pháp không phải virut. Ví dụ, ADN trần có thể được đưa vào sử dụng trong tế bào bằng cách điện thấm, thấm thấu âm thanh, bắn phá hạt, hoặc phân phối thủy động. ADN cũng có thể được bọc nang hoặc kết hợp với polyme, ví dụ, liposom, polysom, polyplex, dendrime, và sử dụng cho đối tượng ở dạng phức. Tương tự, ADN có thể được kết hợp với hạt nano vô cơ, ví dụ, hạt vàng, silic dioxit, sắt oxit, hoặc canxi phosphat, hoặc được gắn với peptit thấm vào tế bào để phân phối in vivo đến tế bào.

Yếu tố IX biến đổi ở codon mã hóa polynucleotit cũng có thể được hợp nhất vào trong nhiễm sắc thể nhân tạo, như nhiễm sắc thể nhân tạo Expression (ACE) (Xem, ví dụ, Lindenbaum và đồng tác giả, *Nucleic Acids Res.*, 32(21):e172 (2004)) và nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú (MAC). Về tổng quát xem, ví dụ, Pérez-Luz và Díaz-Nido, *J Biomed Biotechnol*. 2010: Article ID 642804 (2010).

Nhiều loại vector có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit Yếu tố IX từ polypeptit biến đổi ở codon trong môi trường nuôi cấy tế bào, bao gồm vector biểu hiện nhân điển hình và nhân không điển hình. Theo một số phương án nhất định, vector

plasmid được dự tính để sử dụng trong việc biểu hiện polypeptit Yếu tố IX trong môi trường nuôi cấy tế bào. Nói chung, vectơ plasmid chứa trình tự kiểm soát và bản sao có nguồn gốc từ loài tương thích với tế bào chủ được sử dụng cùng với các thể chủ này. Các vectơ có thể mang vị trí sao chép, cũng như trình tự đánh dấu có khả năng tạo ra sự lựa chọn kiểu hình ở các tế bào biến đổi gen. Plasmid sẽ bao gồm polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa polypeptit Yếu tố IX, liên kết điều khiển với một hoặc nhiều trình tự kiểm soát, ví dụ, gen khởi đầu.

Ví dụ không hạn chế về vectơ để biểu hiện ở nhân không điển hình bao gồm plasmid như pRSET, pET, pBAD, v.v., trong đó gen khởi đầu sử dụng trong vectơ biểu hiện nhân không điển hình bao gồm lac, trc, trp, recA, araBAD, v.v. Ví dụ về vectơ để biểu hiện ở nhân điển hình bao gồm: (i) để biểu hiện trong nấm men, các vectơ như pAO, pPIC, pYES, pMET, sử dụng gen khởi đầu như AOX1, GAP, GAL1, AUG1, v.v.; (ii) để biểu hiện trong tế bào côn trùng, các vectơ như pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, v.v., sử dụng gen khởi đầu như PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, v.v., và (iii) để bình thường trong tế bào động vật có vú, các vectơ như pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, v.v., và vectơ có nguồn gốc từ các hệ virus như virus đậu bò, virus liên quan đến adeno, virus herpes, retrovirus, v.v., sử dụng gen khởi đầu như CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, và β -actin.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vectơ liệu pháp gen AAV bao gồm polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, như được mô tả trong đây, trình tự đoạn lặp kết thúc nội (ITR-inverted terminal repeat) ở các đầu 5' và 3' của vectơ, một hoặc nhiều trình tự gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường được liên kết điều khiển với polynucleotit Yếu tố IX, và trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa sau đầu 3' của trình tự polynucleotit Yếu tố IX. Theo một số phương án, một hoặc nhiều trình tự gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường bao gồm một hoặc nhiều bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu ở gan.

Fig.1 minh họa một vài cấu trúc minh họa cho vectơ liệu pháp gen Yếu tố IX, phù hợp với một số phương án thực hiện. Fig.1A minh họa vectơ AAV tự bổ sung có trình tự gen tăng cường/gen khởi đầu có TTR bị cắt, đột biến ở 5' ITR, trình tự intron virus MVM, trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon, trình tự poly-adenyl hóa, và 3'-ITR. Fig.1B minh họa vectơ AAV tự bổ sung mã hóa polypeptit Yếu tố IX tương tự như Fig.1A, nhưng còn bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, hoặc nhiều) yếu

tổ kiểm soát điều hòa đặc hiệu ở gan. Fig.1C minh họa vector sợi đơn có cùng các thành phần như Fig.1A, ngoại trừ 5'-ITR không bị gây đột biến, ngăn chặn khả năng tự bổ sung. Fig.1D minh họa vector mã hóa polypeptit Yếu tố IX sợi đơn AAV tương tự với Fig.1A, nhưng còn bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, hoặc nhiều hơn) yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu ở gan. Mặc dù được minh họa có việ dẫn đến protein Yếu tố IX mà chứa đột biến thế axit amin R384L 'Padua' trong Fig.1, theo một số phương án, cấu trúc nucleotit Yếu tố IX có cấu trúc chung như mô tả trong Fig.1 (ví dụ, cấu trúc A, B, C, hoặc D) mã hóa protein Yếu tố IX mà không chứa đột biến thế axit amin 'Padua' R384L.

Fig.25 thể hiện trình tự nucleotit của vector liệu pháp gen AAV Yếu tố IX CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40), minh họa cho cấu trúc vector liệu pháp gen được minh họa trong Fig.1D. Nucleotit 1-145 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40) là trình tự AAV2 5'-ITR (SEQ ID NO:51). Trình tự 5'-ITR sau đó là ba bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu gan CRM8 CRM8 (SEQ ID NO:39) ở nucleotit 165-236, 238-309, và 311-382. Sau trình tự CRM8 là trình tự gen tăng cường/gen khởi đầu bị cắt TTR (SEQ ID NO:52) ở nucleotit 383-712. Tiếp theo, vector này bao gồm intron MVM (minute virus of mice) (SEQ ID NO:53) ở nucleotit 724-800. Nucleotit 814-2199 của vector là trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon (R384L) CS06 (CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9)). Trình tự polynucleotit Yếu tố IX tiếp theo sau là trình tự tín hiệu BGH poly-adenyl hóa ở nucleotit 2208-2441 và, cuối cùng, trình tự AAV2 3'-ITR (SEQ ID NO:55) ở nucleotit 2458-2602.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự có độ tương đồng ít nhất 95% với nucleotit 1-2602 của SEQ ID NO:40. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự có độ tương đồng ít nhất 99% với nucleotit 1-2602 của SEQ ID NO:40. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự có độ tương đồng ít nhất 99,5% với nucleotit 1-2602 của SEQ ID NO:40. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit Yếu tố IX chứa trình tự nucleotit 1-2602 của SEQ ID NO:40.

Một số typ huyết thanh AAV đã được xác định, bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, và AAV9. Nói chung, typ huyết thanh AAV bất kỳ có thể được sử dụng cho cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây. Tuy nhiên, các typ huyết thanh có hướng tính khác nhau, ví dụ, chúng ưu

tiên lây nhiễm các mô khác nhau. Theo một phương án, do Yếu tố IX được tạo ra chủ yếu ở gan, typ huyết thanh AAV dành cho cấu trúc liệu pháp gen bọc lộ được chọn dựa trên tính hướng gan, được tìm thấy trong ít nhất các typ huyết thanh AAV7, AAV8, và AAV9. Theo đó, theo một phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX là vector typ huyết thanh AAV7. Theo phương án khác, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX là vector typ huyết thanh AAV8. Theo phương án khác nữa, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX là vector typ huyết thanh AAV9.

Cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây có thể là vector sợi đơn (ví dụ, vector ssAAV, như minh họa trong Fig.1C và 1D) hoặc tự bổ sung (ví dụ, vector scAAV, như minh họa trong Fig.1A và 1B). Mặc dù nghiên cứu và học thuyết đã gợi ý rằng vector AAV tự bổ sung sẽ thúc đẩy hơn sự biểu hiện biến đổi gen, bằng cách bỏ qua các yêu cầu tổng hợp sợi kép trước khi dịch mã, vector AAV sợi đơn thúc đẩy hơn sự biểu hiện Yếu tố IX mà vector tự bổ sung so sánh được xác định, như báo cáo trong Ví dụ 5.

Gen khởi đầu và gen tăng cường

Cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây thường bao gồm một hoặc nhiều yếu tố gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường mà điều khiển sự biểu hiện gen in vivo, ví dụ, yếu tố điều hòa. Theo một số phương án, yếu tố gen khởi đầu hoặc gen tăng cường điều khiển sự biểu hiện theo kiểu phụ thuộc mô, ví dụ, chủ yếu trong một mô cụ thể. Do Yếu tố IX được tổng hợp chủ yếu ở gan, theo một số phương án, vector liệu pháp gen được mô tả trong đây bao gồm yếu tố điều hòa đặc hiệu gan, điều này gần như hạn chế sự biểu hiện vector liệu pháp gen đến tế bào gan.

Nói chung, yếu tố điều hòa đặc hiệu gan có thể có nguồn gốc từ gen bất kỳ đã biết là được biểu hiện riêng biệt ở gan. WO 2009/130208 xác định một số gen được biểu hiện theo kiểu đặc hiệu gan, bao gồm, chất ức chế serpin peptidaza, chất họ A -1, cũng được biết là α -antitrypsin (SERPINA1; GeneID 5265), apolipoprotein C-I (APOC1; GeneID 341), apolipoprotein C-IV (APOC4; GeneID 346), apolipoprotein H (APOH; GeneID 350); transthyretin (TTR; GeneID 7276), albumin (ALB; GeneID 213), aldolaza B (ALDOB; GeneID 229), P450 trong nhiễm sắc thể, họ 2, phân họ E, polypeptit 1 (CYP2E1; GeneID 1571), fibrinogen chuỗi alpha (FGA; GeneID 2243), transferin (TF; GeneID 7018), protein liên quan đến haptoglobin (HPR; GeneID

3250). Theo một số phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm yếu tố điều hòa đặc hiệu gan có nguồn gốc từ ổ gen trong hệ gen của một hoặc nhiều protein này. Một vài ví dụ về các yếu tố này được mô tả trong WO 2009/130208, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Một ví dụ về yếu tố điều hòa đặc hiệu gan là từ gen transthyretin (TTR), thường được gọi là "TTR_{re}" hoặc "TTR_{enh}." Hsieh J.L., và đồng tác giả, Cancer Sci., 100(3):537-45 (2009), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích. Theo một số phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm yếu tố gen tăng cường và gen khởi đầu bị cắt TTR. Ví dụ về các yếu tố này được nêu ở nucleotit 383-712 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40), được nêu như trong Fig.25. Theo một số phương án, yếu tố gen tăng cường và gen khởi đầu bị cắt TTR có độ tương đồng trình tự ít nhất 85% với nucleotit 383-712 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40). Theo các phương án khác, yếu tố gen tăng cường và gen khởi đầu bị cắt TTR có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, hoặc 100% với nucleotit 383-712 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40).

Một ví dụ khác về yếu tố điều hòa đặc hiệu gan là từ gen SERPINA1, như được mô tả trong Công bố PCT số WO 2016/146757, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích. Một ví dụ về yếu tố này là yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8 (SEQ ID NO:39) được nêu ở nucleotit 165-236 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40). Theo một số phương án, yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc từ SERPINA1 có độ tương đồng trình tự ít nhất 85% với CRM8 (SEQ ID NO:39). Theo các phương án khác, yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc từ SERPINA1 bị cắt ngắn có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với CRM8 (SEQ ID NO:39).

Theo một số phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX bao gồm một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc SERPINA1, như được minh họa bởi các cấu trúc được minh họa trong Fig.1B và 1D. Theo một phương án, cấu trúc bao gồm một yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc SERPINA1 (ví dụ, CRM8). Theo phương án khác, cấu trúc chứa hai yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc SERPINA1 (ví dụ, CRM8). Theo phương án khác, cấu trúc chứa ba yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn

gốc SERPINA1 (ví dụ, CRM8). Theo một số phương án khác nữa, cấu trúc chứa 4, 5, 6 yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc SERPINA1, hoặc nhiều hơn (ví dụ, CRM8).

Theo một phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX chứa một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát điều hòa có nguồn gốc SERPINA1 (ví dụ, CRM8) và yếu tố gen tăng cường và gen khởi đầu bị cắt TTR, như minh họa trong Fig.1B, 1D, và 25.

Intron

Theo một số phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm intron, ví dụ, intron có nguồn gốc virut, để làm tăng sự biểu hiện của gen Yếu tố IX. Các intron thích hợp để biểu hiện cấu trúc liệu pháp gen đã được biết trong lĩnh vực này. Đặc trưng, intron được đặt ở vị trí 5' của trình tự mã hóa biến đổi gen, như được minh họa trong cấu trúc Yếu tố IX nêu trong Fig.1 và Fig.25. Tuy nhiên, theo một số phương án, intron có thể được đặt trong trình tự mã hóa biến đổi gen, ví dụ, ở điểm nối intron Yếu tố IX tự nhiên hoặc vị trí khác, hoặc ở vị trí 3' của trình tự mã hóa biến đổi gen. Ví dụ không hạn chế về intron có thể được sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm các intron có nguồn gốc từ intron MVM (Minute Virus of Mice), intron beta-globin (betaVS-II), intron A Yếu tố IX (FIX), intron virut Simian 40 (SV40) T nhỏ, và intron beta-actin.

Theo một phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm intron có nguồn gốc MVM, ví dụ, như minh họa trong Fig.1 và minh họa bởi intron MVM (SEQ ID NO:53) ở nucleotit 724-800 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40) trong Fig.25. Theo một số phương án, intron được sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen được mô tả trong đây có độ tương đồng trình tự ít nhất 85% với MVM (SEQ ID NO:53). Theo các phương án khác, intron sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen được mô tả trong đây có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với MVM (SEQ ID NO:53).

Trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa

Theo một số phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa, ví dụ, như minh họa trong Fig.1. Trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa điều khiển sự tổng hợp đuôi poly-A trên đầu 3' của gen sao chép mARN được tạo ra từ Yếu tố IX biến đổi gen. Theo đó, trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa được đặt ở đầu 3' so với trình tự mã hóa Yếu tố IX. Ví dụ không hạn chế

về trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa có thể được sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen. Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa có nguồn gốc từ gen mụn Simian virus 40 (SV40), trình tự tín hiệu polyadenyl hóa học mon tăng trưởng của bò (BGH-bovine growth hormone), và gen β -globin ngắn nhất của thỏ (mRBG).

Theo một phương án, cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX được mô tả trong đây bao gồm trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa có nguồn gốc từ trình tự tín hiệu polyadenyl hóa học mon tăng trưởng của bò (BGH), ví dụ, như minh họa trong Fig.1 và được minh họa bởi trình tự tín hiệu BGHPA (SEQ ID NO:54) ở nucleotit 2208-2441 của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40) trong Fig.25. Theo một số phương án, trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen được mô tả trong đây có độ tương đồng trình tự ít nhất 85% với trình tự tín hiệu BGHPA (SEQ ID NO:54). Theo các phương án khác, trình tự tín hiệu poly-adenyl hóa sử dụng trong cấu trúc liệu pháp gen được mô tả trong đây có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự tín hiệu BGHPA (SEQ ID NO:54).

V. Phương pháp

Phương pháp tạo ra

Polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon và vectơ virus được mô tả trong đây (ví dụ, chế phẩm axit nucleic) được tạo ra theo phương pháp thông thường để khuếch đại axit nucleic và tạo ra vectơ. Hai nền tảng nổi bật đã được phát triển để sản xuất ở quy mô lớn vectơ AAV tái tổ hợp. Nền tảng thứ nhất dựa trên sự sao chép ở tế bào động vật có vú, trong khi nền tảng thứ hai là dựa trên sự sao chép trong tế bào động vật không xương sống. Về tổng quát, xem, Kotin R.M., Hum. Mol. Genet., 20(R1):R2-6 (2011), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt virus liên quan đến adeno (AAV). Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc đưa cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự nucleotit cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100%) với một trong các trình tự CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06, như được mô tả trong đây, vào trong tế bào chủ trong đó cấu trúc polynucleotit có khả năng sao chép trong tế bào chủ.

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào chủ động vật có vú ví dụ, tế bào HEK, CHO, hoặc BHK. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là tế bào HEK 293. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào động vật không xương sống, ví dụ, tế bào côn trùng. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là tế bào SF9.

Chế phẩm

Chế phẩm sử dụng để điều trị các bệnh chảy máu được đề xuất trong đây. Chế phẩm như vậy chứa một lượng có hiệu quả điều trị của polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon, ví dụ, vector liệu pháp gen AAV bao gồm polynucleotit biến đổi ở codon mã hóa Yếu tố IX, như được mô tả trong đây. Lượng có hiệu quả điều trị của polynucleotit FIX biến đổi ở codon (ví dụ, vector liệu pháp gen AAV bao gồm trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon) được phối hợp với chất mang hoặc tá dược lỏng được dùng để sử dụng toàn thân, tại chỗ hoặc cục bộ. Chế phẩm cuối cùng chứa polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon bộc lộ trong đây sẽ nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Liều

Chế phẩm axit nucleic theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân cần được điều trị. Lượng hoặc liều của chất làm liệu pháp gen chữa bệnh được sử dụng phụ thuộc vào các yếu tố như cấu trúc polynucleotit FIX biến đổi ở codon cụ thể, vector phân phối sử dụng, mức độ nặng của bệnh, và đặc điểm tổng quát của đối tượng. Liều chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị, và sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng các kỹ thuật đã biết (Xem, ví dụ, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); và Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định liều và phác đồ liều cụ thể để điều trị cho bệnh nhân cụ thể.

Theo một số phương án, vector liệu pháp gen (ví dụ, hạt vector liệu pháp gen AAV) có polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều có hiệu quả điều trị cho đối tượng cần được điều trị (ví dụ, đối tượng mắc bệnh máu khó đông typ B nhẹ, trung bình, hoặc nặng). Theo một số phương án, liều có hiệu

quả điều trị nằm trong khoảng từ 2×10^{E11} đến 2×10^{E14} hệ gen vector trên mỗi kilogram khối lượng cơ thể của đối tượng. Theo một phương án cụ thể, liều có hiệu quả điều trị nằm trong khoảng từ 2×10^{E12} đến 2×10^{E13} hệ gen vector trên mỗi kilogram khối lượng cơ thể của đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng được sử dụng khoảng 2×10^{E11} , 3×10^{E11} , 4×10^{E11} , 5×10^{E11} , 6×10^{E11} , 7×10^{E11} , 8×10^{E11} , 9×10^{E11} , 1×10^{E12} , 2×10^{E12} , 3×10^{E12} , 4×10^{E12} , 5×10^{E12} , 6×10^{E12} , 7×10^{E12} , 8×10^{E12} , 9×10^{E12} , 1×10^{E13} , 2×10^{E13} , 3×10^{E13} , 4×10^{E13} , 5×10^{E13} , 6×10^{E13} , 7×10^{E13} , 8×10^{E13} , 9×10^{E13} , 1×10^{E14} , hoặc 2×10^{E14} hệ gen vector trên mỗi kilogram khối lượng cơ thể của đối tượng.

Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh suy giảm Yếu tố IX (ví dụ, bệnh máu khó đông typ B). Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân cần được điều trị cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự nucleotit cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100%) với một trong các trình tự CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06, như được mô tả trong đây. Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với trình tự mã hóa pre-pro-polypeptit Yếu tố IX biến đổi ở codon, ví dụ, tương đồng trình tự cao với trình tự của CS02-FL-NA (SEQ ID NO:5), CS03-FL-NA (SEQ ID NO:6), CS04-FL-NA (SEQ ID NO:7), CS05-FL-NA (SEQ ID NO:8), hoặc CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9). Theo một số phương án, polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự cao với trình tự mã hóa polypeptit Yếu tố IX biến đổi ở codon sợi đơn trưởng thành, ví dụ, tương đồng trình tự cao với trình tự của CS02-MP-NA (SEQ ID NO:13), CS03-MP-NA (SEQ ID NO:14), CS04-MP-NA (SEQ ID NO:15), CS05-MP-NA (SEQ ID NO:16), hoặc CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17).

Theo một số phương án, việc điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân cần được điều trị vector liệu pháp gen bao gồm cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự nucleotit cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100%) với một trong các trình tự CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06, như được mô tả trong đây. Theo một phương án, vector liệu pháp gen là vector liệu pháp gen của động vật có vú. Theo một phương án cụ thể, vector liệu pháp gen của động vật có vú là vector virus, ví dụ, lentivirus, retrovirus, adeno virus, hoặc vector virus liên quan đến adeno.

Theo một phương án, vector liệu pháp gen là hạt virus liên quan đến adeno (AAV) mang vector virus mã hóa trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon. Thông thường, vector virus bao gồm đoạn lặp kết thúc đảo chiều (ITR) ở mỗi đầu cuối, một hoặc nhiều yếu tố điều hòa biểu hiện, trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon, và trình tự tín hiệu poly-A. Theo một phương án cụ thể, vector liệu pháp gen bao gồm yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu ở gan (ví dụ, một hoặc nhiều bản sao của yếu tố CRM8).

Phương pháp tạo ra

Polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon và vector virus được mô tả trong đây (ví dụ, chế phẩm axit nucleic) được tạo ra theo các phương pháp thông thường để khuếch đại axit nucleic và tạo ra vector. Hai nền tảng nổi bật đã được phát triển để sản xuất quy mô lớn các vector AAV tái tổ hợp. Nền tảng thứ nhất là dựa trên sự sao chép trong tế bào động vật có vú, trong khi nền tảng thứ hai là dựa trên sự sao chép trong tế bào động vật không có xương sống. Về tổng quát, xem, Kotin R.M., Hum. Mol. Genet., 20(R1):R2-6 (2011), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt virus liên quan đến adeno (AAV). Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc đưa cấu trúc polynucleotit Yếu tố IX biến đổi ở codon có độ tương đồng trình tự nucleotit cao (ví dụ, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, hoặc 100%) với một trong các trình tự CS02, CS03, CS04, CS05, hoặc CS06, như được mô tả trong đây, vào trong tế bào chủ trong đó cấu trúc polynucleotit có khả năng sao chép trong tế bào chủ.

Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào chủ động vật có vú ví dụ, tế bào HEK, CHO, hoặc BHK. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là tế bào HEK 293. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào động vật không xương sống, ví dụ, tế bào côn trùng. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là tế bào SF9.

Điều trị

Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic (ví dụ, polynucleotit biến đổi ở codon) được mô tả trong đây được sử dụng cho đối tượng cần được điều trị, phù hợp với phương pháp sử dụng đã biết. Các phương pháp sử dụng vector liệu pháp gen đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, không hạn chế ở, sử

dụng trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, tiêm trong kẽ, và sử dụng trong gan (ví dụ, động mạch hoặc tĩnh mạch trong gan). Ví dụ, xem Chuah MK và đồng tác giả, Hum Gene Ther., 23(6):557-65 (2012); Chuah MK và đồng tác giả, J Thromb Haemost., 10(8):1566-69 (2012); Chuah MK và đồng tác giả, J Thromb Haemost. 11 Suppl 1:99-110 (2013); VandenDriessche và đồng tác giả, Hum Gene Ther. 23(1):4-6 (2012); High KA, Blood, 120(23):4482-87 (2012); Matrai và đồng tác giả, Mol Ther., 18(3):477-90 (2010); và Matrai và đồng tác giả, Curr Opin Hematol., 17(5):387-92 (2010), mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, về tổng quát.

Đánh giá hiệu quả điều trị

Hiệu quả điều trị của việc điều trị bệnh máu khó đông typ B có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách đo khả năng đông máu phụ thuộc Yếu tố IX của máu từ đối tượng đang được điều trị. Phép đo để đánh giá khả năng đông máu bao gồm, không hạn chế ở, thử nghiệm thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa (APPT-activated partial thromboplastin time assay) in vitro, thử nghiệm hoạt tính trên nhiễm sắc thể Yếu tố IX, thời gian máu đông, và mức kháng nguyên Yếu tố IX (ví dụ, sử dụng ELISA đặc hiệu với Yếu tố IX). Nên chú ý rằng liệu điều trị không cần gây ra các mức FIX kiểu dại ở bệnh nhân; mà, biểu hiện đủ để làm giảm triệu chứng theo cách có ý nghĩa hoặc đo được được xem là điều trị theo mục đích của sáng chế.

Theo Hiệp hội bệnh máu khó đông Quốc gia, đối tượng được phân nhóm là mắc bệnh máu khó đông typ B nhẹ khi huyết tương trong máu của họ có từ 6% đến 49% hoạt tính Yếu tố IX của huyết tương máu người bình thường. Đối tượng mắc bệnh máu khó đông typ B nhẹ đặc trưng có chảy máu chỉ sau khi tổn thương nặng, chấn thương hoặc phẫu thuật. Trong nhiều trường hợp, bệnh máu khó đông nhẹ không được chẩn đoán cho đến khi tổn thương, phẫu thuật hoặc nhổ răng gây ra chảy máu kéo dài. Giai đoạn đầu tiên có thể không xảy ra cho đến tuổi trưởng thành. Phụ nữ mắc bệnh máu khó đông nhẹ thường trải qua rong kinh, chu kỳ kinh nguyệt nặng, và có thể xuất huyết sau sinh.

Theo Hiệp hội bệnh máu khó đông Quốc gia, đối tượng được phân nhóm là mắc bệnh máu khó đông typ B trung bình khi huyết tương trong máu của họ có từ 1% đến 5% hoạt tính Yếu tố IX của huyết tương máu người bình thường. Đối tượng mắc bệnh máu khó đông typ B trung bình có xu hướng có giai đoạn chảy máu sau khi tổn

thương. Chảy máu xảy ra mà không có nguyên nhân rõ ràng được gọi là giai đoạn chảy máu tự phát.

Theo Hiệp hội bệnh máu khó đông Quốc gia, đối tượng được phân nhóm là mắc bệnh máu khó đông typ B nặng khi huyết tương trong máu của họ có ít hơn 1% hoạt tính Yếu tố IX của huyết tương máu người bình thường. Đối tượng mắc bệnh máu khó đông typ B nặng có chảy máu sau khi tổn thương và có thể có giai đoạn chảy máu tự phát thường xuyên, thường chảy vào trong khớp và cơ của họ.

Theo một số phương án, huyết tương máu người bình thường được xác định là chứa 1 IU hoạt tính Yếu tố IX trên mỗi mL. Do đó, theo một số phương án, huyết tương máu từ đối tượng được phân nhóm mắc bệnh máu khó đông typ B nhẹ có từ 0,06 đến 0,49 IU hoạt tính Yếu tố IX trên mỗi mL. Theo một số phương án, huyết tương máu từ đối tượng được phân nhóm mắc bệnh máu khó đông typ B trung bình có từ 0,01 đến 0,05 IU hoạt tính Yếu tố IX trên mỗi mL. Theo một số phương án, huyết tương máu từ đối tượng được phân nhóm mắc bệnh máu khó đông typ B nặng có từ 0,01 đến 0,05 IU hoạt tính Yếu tố IX trên mỗi mL.

Theo đó, theo một số phương án, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông typ B là có hiệu quả chữa bệnh khi nó nâng được mức hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng. Theo một số phương án, việc điều trị có hiệu quả chữa bệnh nâng mức hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương ít nhất 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, hoặc hơn. Theo một phương án cụ thể, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông có hiệu quả chữa bệnh làm tăng hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng ít nhất 5%. Theo một phương án cụ thể khác, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông có hiệu quả chữa bệnh làm tăng hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng ít nhất 10%. Theo một phương án cụ thể khác, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông có hiệu quả chữa bệnh làm tăng hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng ít nhất 15%. Theo một phương án cụ thể khác, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông có hiệu quả chữa bệnh làm tăng hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng ít nhất 20%. Theo một phương án cụ thể khác, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông có hiệu quả chữa bệnh làm tăng hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng ít nhất 25%. Theo một phương án cụ thể khác, liệu pháp điều trị bệnh máu khó đông có hiệu

quả chữa bệnh làm tăng hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu/huyết tương của đối tượng ít nhất 30%.

Theo một số phương án, việc điều trị có hiệu quả chữa bệnh làm tăng mức hoạt tính Yếu tố IX trung bình trong máu của đối tượng sao cho đối tượng này được phân nhóm sang dạng có mức độ nhẹ hơn của bệnh máu khó đông typ B. Ví dụ, theo một phương án, đối tượng ban đầu được phân nhóm mắc bệnh máu khó đông typ B nặng được phân nhóm lại là mắc bệnh máu khó đông typ B trung bình hoặc bệnh máu khó đông typ B nhẹ sau khi trải qua việc điều trị có hiệu quả chữa bệnh. Theo phương án khác, đối tượng ban đầu được phân nhóm là mắc bệnh máu khó đông typ B được phân nhóm lại là mắc bệnh máu khó đông typ B nhẹ sau khi trải qua việc điều trị có hiệu quả chữa bệnh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Trình tự biểu hiện Yếu tố IX biến đổi ở codon làm tăng mức biểu hiện FIX

Để tạo ra cấu trúc liệu pháp gen mang lại sự biểu hiện tăng của Yếu tố IX ngoại lai in vivo, bằng các vector dựa trên AAV8 tự bổ sung mã hóa preproprotein Yếu tố IX chiều dài đầy đủ có đột biến thế axit amin R384L (FIXp-FL-AA SEQ ID NO:4)) được xây dựng. Trình tự mã hóa Yếu tố IX của mỗi cấu trúc được thay đổi để tăng cường sự biểu hiện ở người qua một vài bước. Mỗi trình tự mã hóa Yếu tố IX được biến đổi theo một thuật toán thiết kế để tính đến môtip trình tự ưu tiên/không ưu tiên và để hướng việc sử dụng codon về các codon của người được ưu tiên. Một vài thuật toán được sử dụng cho bước đầu tiên này, như được báo cáo trong Bảng 2. Trình tự biến đổi ở codon trung gian, có được từ việc áp dụng thuật toán báo cáo trong Bảng 2, trong đó sau đó biến đổi tiếp thủ công để làm giảm hoặc loại bỏ dinucleotit CpG, điều chỉnh hàm lượng GC cuối cùng, điều chỉnh để cho phép cặp đôi codon ưu tiên, điều chỉnh để tránh các cặp codon không mong muốn, và điều chỉnh ứng dụng codon cuối cùng. Để có thêm thông tin về các cân nhắc này, xem, ví dụ, Fath S. và đồng tác giả, PLoS. One., 6, e17596 (2011); Haas J. và đồng tác giả, Curr. Biol., 6, 315-324 (1996); Tats A., BMC hệ genomics. 9:463 (2008), Grote A. và đồng tác giả, Nucleic Acids Research, 33(Web Server issue), W526–W531 (2005), Mirsafian H. và đồng tác giả, Scientific World Journal., 639682 (2014), và Pechmann S. và đồng tác giả, Nat Struct Mol Biol.

20(2):237-43 (2013), nội dung của chúng được đưa vào cụ thể trong đây, toàn bộ, cho tất cả mục đích, đặc biệt về phần lý thuyết về cân nhắc biến đổi codon.

Mỗi trình tự mã hóa biến đổi ở codon tạo ra được (ví dụ, CS02, CS03, CS04, CS05, và CS06, lần lượt nêu trong Fig.5 đến 9) mã hóa một protein FIX(R384L) giống nhau (FIXp-FL-AA (SEQ ID NO:4)). Các cấu trúc CS02, CS03, và CS04 không chứa motif CpG, trong khi CS05 và CS06 lần lượt chứa 11 và 3 CpG.

Để sử dụng làm đối chứng, các cấu trúc vector đưa trình tự mã hóa FIX kiểu dại, có và không có đột biến thế axit amin Padua R384L, cũng được tạo ra. Cấu trúc WH01 mã hóa preproprotein FIX kiểu dại mà không có đột biến Padua R384L, và bao gồm 20 dinucleotit CpG. Cấu trúc WH02 mã hóa preproprotein FIX kiểu dại có đột biến Padua R384L, và bao gồm 19 dinucleotit CpG.

Cấu trúc WH01 và WH02 bao gồm 20 và 19 CpG trong trình tự mã hóa của chúng, lần lượt. Ngược lại, cấu trúc CS02, CS03, và CS04 không chứa motif CpG, trong khi cấu trúc CS05 và CS06 lần lượt chứa 11 và 3 CpG.

Như nêu trong Fig.1A, trình tự mã hóa Yếu tố IX biến đổi ở codon được gài vào trong catset biến đổi gen virus liên quan đến adeno (“AAV”) chứa gen tăng cường/gen khởi đầu transthyrethrin của chuột (SEQ ID NO:52), intron MVM (“mouse minute virus”) (SEQ ID NO:53), cấu trúc FIX biến đổi ở codon chứa đột biến thế axit amin “Padua” R384L (Patent Mỹ số 6,531,298; Simione và đồng tác giả, NEJM 361:1671-75 (2009); đột biến R384L thường được báo cáo là đột biến R338L, đề cập đến vị trí của arginin kiểu dại trong protein FIX sợi đơn của người không có trình tự tín hiệu và propeptit), sau đó là yếu tố tăng trưởng hormone bò polyA (SEQ ID NO:54). Catset gen này được bao quanh bởi các đoạn lặp kết thúc đảo chiều AAV2 (“ITR”) (SEQ ID NO:51 và 55). Đoạn lặp ITR trái bao gồm đột biến ở vị trí phân giải chuỗi khảm cuối cùng dẫn đến kiểu hình tự bổ sung (sc) của các vector. Thiết kế vector cơ bản được mô tả chi tiết trong Wu và đồng tác giả, Mol. Ther. 16:280-89 (2008) và trong đơn PCT số WO 2014/064277 A1, nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, cho tất cả các mục đích.

Cấu trúc AAV Yếu tố IX là CS và WH được sử dụng cho chuột bất hoạt gen B6/129P2-F9tm1Dws FIX (được mô tả trong Lin và đồng tác giả, Blood, 90:3962-66 (1997), nội dung được đưa vào đây, toàn bộ, cho tất cả mục đích). Các nồng độ loãng

của vector AAV được tiêm vào trong động vật (4-8 con mỗi nhóm) qua tĩnh mạch đuôi bên dựa trên khối lượng cơ thể của mỗi con cụ thể (4×10^{11} hệ gen vector/kilogam (vg/kg) khối lượng cơ thể). Các mẫu máu được lấy ở các khoảng thời điểm cách nhau nhất định bằng cách chọc sau hốc mắt sau khi tiêm thuốc theo quy trình đã biết bằng mao quản thủy tinh. Sau đó máu được chuyển đến một ống đã được nạp đầy trước chất chống đông natri xitrat và huyết tương được thu lấy bởi quy trình chuẩn và đông lạnh ở -20°C .

Sự biểu hiện của các cấu trúc Yếu tố IX khác nhau được xác định và mức FIX trong huyết tương vào ngày 14 ở chuột bất hoạt FIX được sử dụng để đánh giá khả năng của các cấu trúc sau khi tiêm tĩnh mạch đuôi các vector vào trong chuột, như báo cáo trong Bảng 2. Vào ngày 14, mức biểu hiện của mô hình chuột bất hoạt đạt gần đến mức biểu hiện FIX tối đa. Như trình bày trong Bảng 2, cấu trúc đối chứng WH02 FIX(R384L) được biểu hiện ở 1,03 đơn vị FIX vào ngày 14 sau khi sử dụng 4×10^{11} hệ gen vector/kilogam (vg/kg) khối lượng cơ thể. Mức biểu hiện này được sử dụng tính trên mức cơ sở được xác định là tăng gấp nhiều lần cấu trúc Yếu tố IX biến đổi ở codon. Như báo cáo trong Bảng 2, cấu trúc biến đổi ở codon CS được đề xuất mức biểu hiện tăng lên từ khoảng 2 lần và 4 lần, so với cấu trúc đối chứng WH02, được mã hóa bởi trình tự polynucleotit kiểu đại. Đáng chú ý nhất là, cấu trúc biến đổi ở codon CS06 được đề xuất trong đây tăng hoạt tính Yếu tố IX 4,2 lần so với cấu trúc đối chứng WH02 và tăng hoạt tính Yếu tố IX 21,6 lần so với cấu trúc đối chứng WH01 (Yếu tố IX kiểu đại).

Bảng 2. Sự biểu hiện Yếu tố IX từ cấu trúc có trình tự codon kiểu đại (WH01 – wtFIX; WH02 – FIX(R384L) và trình tự biến đổi ở codon (CS02-CS06).

Cấu trúc AAV	Sự điều chỉnh hệ gen vector	Số CpG	Mức biểu hiện ngày 14 [% FIX người]	Số lần tăng mức biểu hiện so với WH01	Số lần tăng mức biểu hiện so với WH02
WH01	Trình tự FIX kiểu đại của người (GeneBank NM000133.3) không có đột biến R338L (Padua)	20	0,20	1,0	0,19
WH02	Trình tự FIX kiểu đại của người có đột biến R338L (Padua)	19	1,03	5,2	1,0
CS02	Trình tự FIX của người có đột biến R338L; thuật toán nền Geneart tối ưu hóa tiếp về codon albumin huyết thanh người.	0	2,12	10,6	2,1
CS03	Trình tự FIX của người có đột biến R338L; thuật toán nền Geneart tối ưu hóa tiếp về codon của người được sử dụng thường xuyên nhất (Haas và đồng tác giả, 1996. Curr Biol. 6, 315-324).	0	1,98	9,9	1,9
CS04	Trình tự FIX của người có đột biến R338L; thuật toán nền Geneart tối ưu hóa tiếp về hướng sử dụng codon ở gan như được mô tả trong Uhlen và đồng tác giả, 2015 Science 347, 6220.	0	2,77	13,9	2,7
CS05	Trình tự FIX của người có đột biến R338L; thuật toán JCAT sửa đổi để làm giảm CpG; (Grote và đồng tác giả, 2005. Nucleic Acids Res 1,33).	11	3,93	19,7	3,8
CS06	Trình tự FIX của người có đột biến R338L; thuật toán nền Geneart tối ưu hóa tiếp về codon của người được sử dụng thường xuyên nhất	3	4,32	21,6	4,2

	(Haas và đồng tác giả, 1996. Curr Biol. 6, 315-324).				
--	--	--	--	--	--

Ví dụ 2 — Yếu tố CRM8 đặc hiệu gan làm tăng sự biểu hiện của FIX ở chuột

Để làm tăng sự biểu hiện và hoạt tính Yếu tố IX từ các cấu trúc biến đổi ở codon, một đến ba bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa cấu hình cis đặc hiệu gan (CRM8 (SEQ ID NO:39)), như báo cáo trong Nair và đồng tác giả, Blood 123:3195-99 (2014) được đưa vào trong catset gen, tạo thành cấu trúc được vẽ biểu đồ trong Fig.1B. Vector AAV mang trình tự mã hóa FIX CS02 biến đổi ở codon với 0 (CS02-CRM8.0-V), một (CS02-CRM8.1-V), hai (CS02-CRM8.2-V), hoặc ba yếu tố kiểm soát CRM8 (CS02-CRM8.3-V) được tiêm vào chuột kiểu đại bằng đường tĩnh mạch đuôi. Kháng nguyên FIX người trong huyết tương chuột sau đó được đo theo thời gian với thử nghiệm ELISA đặc hiệu với FIX của người.

Như báo cáo trong Bảng 3, việc sử dụng yếu tố điều hòa CRM8 làm tăng mức biểu hiện Yếu tố IX in vivo khoảng 2 lần và 4 lần, so với mức biểu hiện từ cấu trúc đối chứng không có yếu tố CRM8, 21 ngày sau khi gây nhiễm. Ví dụ, vector CS02-CRM8.1-V, chứa yếu tố CRM8 đơn, gây ra mức biểu hiện FIX gấp hai lần so với vector đối chứng CS02-CRM8.0-V. Việc đưa vào nhiều bản sao của yếu tố CRM8 làm tăng cường hơn nữa mức biểu hiện này. Ví dụ, các vector chứa 2 bản sao của yếu tố CRM8 tạo ra mức biểu hiện gấp ba lần và vector chứa 3 bản sao của yếu tố CRM8 tạo ra mức biểu hiện gấp 3,4 lần, so với vector đối chứng.

Bảng 3. Mức biểu hiện Yếu tố IX trong huyết tương của chuột kiểu đại được tiêm vector AAV biến đổi ở codon có 0-3 bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8.

#	Cấu trúc AAV	# số yếu tố CRM8	FIX (ng/ml) Ngày 4	FIX (ng/ml) Ngày 11	FIX (ng/ml) Ngày 21	Số lần tăng vào Ngày 21
1	CS02-CRM8.0-scV	0	65,8	133,4	239,2	1,0
2	CS02-CRM8.1-scV	1	120,7	250,7	442,8	1,9
3	CS02-CRM8.2-scV	2	152,9	417,3	713,8	3,0
4	CS02-CRM8.3-scV	3	130,9	432,6	800,9	3,4

Ví dụ 3 – Yếu tố CRM8 đặc hiệu gan làm tăng sự biểu hiện FIX ở tế bào gan của người

Cấu trúc liệu pháp gen Yếu tố IX CS02 chứa 0-3 bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8 đặc hiệu ở gan, như được mô tả trong Ví dụ 2, được thử nghiệm tiếp bởi thử nghiệm hoạt lực sinh học in vitro được thực hiện với dòng tế bào gan người HepG2. Ngắn gọn, tế bào HepG2 được gây nhiễm bởi một trong các vector AAV CS02-CRM8-V, như được mô tả trong Ví dụ 2, và hoạt tính FIX được đo bởi thử nghiệm trên cơ chất nhiễm sắc thể 3 ngày sau khi gây nhiễm. Phù hợp với kết quả được báo cáo trong Ví dụ, 2, tất cả các vector chứa yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8 mang lại mức biểu hiện FIX cao hơn, như báo cáo trong Bảng 4. Nổi bật, hiệu quả của việc sử dụng nhiều yếu tố CRM8 thậm chí còn rõ rệt trong tế bào HepG2 người hơn trong mô hình chuột. Ví dụ, vector chứa 2 bản sao của yếu tố CRM8 tạo ra mức biểu hiện bằng 6,7 lần và vector chứa 3 bản sao của yếu tố CRM8 tạo ra mức biểu hiện bằng 12,8 lần, so với vector đối chứng. Điều này khẳng định tác động tích cực mà yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8 tác dụng lên mức biểu hiện FIX trong các vector này.

Bảng 4. Mức biểu hiện Yếu tố IX trong tế bào gan người HepG2 được gây nhiễm bởi vector AAV biến đổi ở codon có 0-3 bản sao của yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8.

Cấu trúc AAV	# số yếu tố CRM8	Hoạt tính FIX [Đơn vị hoạt lực sinh học]	Số lần tăng
CS02-CRM8.0-scV	0	0,35	1
CS02-CRM8.1-scV	1	0,82	2,3
CS02-CRM8.2-scV	2	2,36	6,7
CS02-CRM8.3-scV	3	4,48	12,8

Ví dụ 4 – Vector FIX AAV8 sợi đơn mang lại mức biểu hiện in vivo tương đương với vector tự bổ sung so sánh

Trong một số trường hợp, vector AAV tự bổ sung (sc) biểu hiện catset biến đổi gen hiệu quả hơn vector AAV sợi đơn (ss) tương tự. Điều này có thể là do sự hình

thành sợi kép nhanh hơn sau khi bỏ loại bỏ lớp vỏ của gen vector tự bổ sung trong nhân tế bào. Về tổng quát, xem, McCarty D., Mol. Ther., (16):1648-56 (2008), nội dung được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn, cho tất cả mục đích.

Một nghiên cứu gần đây khẳng định hiệu quả này bằng cách sử dụng vector EGFP. Bell và đồng tác giả, Hum. Gene Ther. Methods, (27):228-37 (2016). Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng hiệu quả này là sự biến đổi gen và phụ thuộc liều. Ví dụ, catset gen ornithin transcarbamylaza (hOTC-human ornithine transcarbamylase) của người trong vector tự bổ sung AAV8 thể hiện mức biểu hiện tốt hơn là liều thấp trong gan của chuột so với vector sợi đơn tương ứng. Tuy nhiên, việc không thể chứng minh hiệu quả này ở liều cao gợi ý rằng hiệu quả này, ít nhất trong gen chưa được tiết ra đang nghiên cứu, là biến đổi gen và phụ thuộc liều. Id.

Nhằm nghiên cứu các đặc điểm của cấu trúc gen FIX biến đổi ở codon được bộc lộ trong trường hợp thiết kế sợi đơn và tự bổ sung, cấu trúc sợi đơn mang gen FIX biến đổi ở codon (R338L) CS06 và hai ITR nguyên vẹn được xây dựng cấu trúc có và không có yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8, như lần lượt được vẽ sơ đồ trong Fig.1D và 1C. Các vector sợi đơn (ss) được tạo ra trong hệ tế bào HEK293, và mức biểu hiện Yếu tố IX được so sánh với mức biểu hiện của cấu trúc tự bổ sung được báo cáo trong Ví dụ 1-3.

Thứ nhất, cấu trúc tự bổ sung (sc) và sợi đơn (ss) CS06-CRM8.0-V được thử nghiệm in vivo sau khi tiêm vào trong chuột bất hoạt FIX B6/129P2-F9tm1Dws, như được mô tả ở trên. Ngạc nhiên, như báo cáo trong Bảng 5, các cấu trúc vector tự bổ sung (sc) và sợi đơn (ss) CS06 thể hiện mức hoạt tính FIX trong huyết tương rất giống nhau, gợi ý rằng lợi điểm đã báo cáo của vector sc, so với vector ss, là không giữ được đối với cấu trúc Yếu tố IX biến đổi ở codon được mô tả trong đây. Mức biểu hiện là phụ thuộc vào nhiều thông số bao gồm cấu trúc gen biến đổi, độ ổn định trong sao chép, (các) gen khởi đầu sử dụng trong cấu trúc, thời gian, và liều. Như thể hiện trong Bảng 5, trong các điều kiện được chọn để điều chỉnh sự chảy máu và thu được mức biểu hiện kéo dài ở chuột bất hoạt FIX, vector sc và ss tương ứng tạo ra các mức biểu hiện gần như tương đương.

Hiệu quả của yếu tố kiểm soát điều hòa đặc hiệu gan CRM8 lên mức biểu hiện FIX cũng được nghiên cứu trên cơ sở vector sợi đơn. Như báo cáo trong Bảng 5, việc

đưa vào một yếu tố CRM8 trong vector sợi đơn làm tăng mức biểu hiện FIX ở chuột bất hoạt FIX B6/129P2-F9tm1Dws. Việc đưa vào ba yếu tố CRM8 làm tăng hơn nữa mức biểu hiện FIX từ cấu trúc sợi đơn CS06, đến các mức độ nhẹ nhiều hơn 2 lần so với đối chứng tự bổ sung CS06, không có yếu tố CRM8. So với cấu trúc WH02 kiểu đại, vector sợi đơn CS06 tạo ra mức biểu hiện cao hơn đến 7 lần, khi cặp đôi với ba yếu tố kiểm soát điều hòa CRM8.

Bảng 5. Mức biểu hiện Yếu tố IX ở chuột bất hoạt FIX được tiêm các vector AAV Yếu tố IX sợi đơn (ss) và tự bổ sung (sc) khác nhau

Cấu trúc AAV	# số yếu tố CRM8	Mức biểu hiện ¹ (d7)	Mức biểu hiện (d14)	Mức biểu hiện (d28)	Số lần tăng so với CS06 (d7 / d14 / d28)	Số lần tăng so với WH02 (d7 / d14 / d28)
CS06-CRM8.0-ssV	0	1,38	2,73	2,99	0,7 / 0,9 / 0,9	1,5 / 2,7 / 2,7
CS06-CRM8.1-ssV	1	1,92	3,57	3,47	1,0 / 1,1 / 1,0	2,1 / 3,5 / 3,2
CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40)	3	4,43	6,65	7,78	2,3 / 2,1 / 2,2	4,9 / 6,5 / 7,1
CS06-CRM8.0-scV	0	1,89	3,17	3,50	1,0 / 1,0 / 1,0	2,1 / 3,1 / 3,2
WH02-CRM8.0-scV	0	0,90	1,03	1,10	0,5 / 0,3 / 0,3	1,0
¹ Hoạt tính FIX theo đơn vị quốc tế (trung bình của 7-8 chuột); d: ngày;						

Ví dụ 5 – Vector FIX AAV8 sợi đơn mang lại mức biểu hiện FIX cao hơn trong tế bào gan người so với vector tự bổ sung so sánh

Sự biểu hiện Yếu tố IX từ vector sợi đơn CS06 được mô tả trong Ví dụ 4 sau đó được nghiên cứu trong tế bào HepG2 của người và so sánh với cấu trúc vector tự bổ sung tương tự. Phù hợp với các kết quả in vivo báo cáo trong Ví dụ 4, vector sợi đơn CS06 không có yếu tố CRM8 mang lại sự biểu hiện FIX ở các mức hơi thấp hơn so với vector tự bổ sung so sánh trong tế bào HepG2. Tuy nhiên, việc đưa vào một yếu tố CRM8 làm tăng mức biểu hiện FIX từ vector sợi đơn CS06 đến mức biểu hiện lớn hơn 2,6 lần từ vector tự bổ sung CS06, như báo cáo trong Bảng 6.

Tuy nhiên, ngạc nhiên nhất là việc đưa vào ba yếu tố CRM8 trong vector sợi đơn CS06 làm tăng mức biểu hiện FIX đến mức biểu hiện lớn hơn 16,8 lần từ vector tự bổ sung CS06. Mức biểu hiện FIX tăng này là lớn hơn 100 lần mức biểu hiện FIX từ

vector đối chứng WH02. Tóm lại, vector sợi đơn CS06 chứa ba yếu tố CRM8 mang lại mức biểu hiện cao nhất trong cả thử nghiệm hoạt lực sinh học in-vivo và in-vitro.

Bảng 6. Mức biểu hiện Yếu tố IX từ vector sợi đơn (ss) và vector tự bổ sung trong tế bào gan người.

Cấu trúc AAV	# số yếu tố CRM8	Hoạt tính FIX [Đơn vị hoạt lực sinh học]	Số lần tăng so với CS06-CRM8.0-scV	Số lần tăng so với WH02-CRM8.0-scV
CS06-CRM8.0-ssV	0	0,24	0,6	3,9
CS06-CRM8.1-ssV	1	0,95	2,6	15,9
CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO: 40)	3	6,20	16,8	103,3
CS06-CRM8.0-scV	0	0,37	1,0	6,2
WH02-CRM8.0-scV	0	0,06	0,2	1,0

Vật liệu và phương pháp của Ví dụ 1-5

Thí nghiệm động vật. Đối với các thử nghiệm ở mô hình bất hoạt FIX, các chủng chuột FIX ko B6/129P2-F9tm1Dws (phát triển bởi Lin và đồng tác giả, 1997. Blood 90 :3962-6) được sử dụng. Trong mô hình chuột kiểu đại, chuột đực 4-5 tuần tuổi C57BL6-J B16 được sử dụng. Cả hai chủng chuột này có được từ nguồn lai tạo thương mại. Nồng độ loãng vector AAV được tiêm vào động vật (4-8 con mỗi nhóm) qua tĩnh mạch đuôi bên dựa trên khối lượng cơ thể động vật cụ thể. Việc lấy máu được thực hiện ở các khoảng cách thời gian xác định bằng cách đâm sau hốc mắt sau khi dùng thuốc theo quy trình đã biết bằng mao quản thủy tinh. Sau đó máu được chuyển vào trong ống đã được nạp sẵn chất chống đông natri xitrat và thu lấy huyết tương bằng các quy trình chuẩn và làm đông lạnh ở -20°C.

Thử nghiệm hoạt lực sinh học in vitro trong tế bào HepG2 bao gồm thử nghiệm cơ chất nhiễm sắc thể FIX. Thử nghiệm hoạt lực sinh học in vitro đối với chế phẩm vector liệu pháp gen được tiến hành trong dòng tế bào gan của người HepG2 (ATCC HB-8065). Sau khi được xử lý với hydroxyurea, tế bào được gây nhiễm bởi vector AAV8FIX và ủ trong khoảng 96 giờ. Trong thời gian ủ, FIX được biểu hiện và giải phóng vào trong chất nền tế bào và hoạt tính FIX được xác định bằng phương pháp đo

điểm cuối nhiễm sắc thể (Rossix AB, Sweden). Mỗi lần chạy thử nghiệm bao gồm đường cong chuẩn của vật liệu vectơ AAV-FIX tinh khiết sử dụng MOI nằm trong khoảng từ 700 đến 7000. Hoạt tính FIX của chất chuẩn ở MOI 3270 được lấy làm Đơn vị Hoạt lực Sinh học (BPU) là 1.

Định lượng FIX người trong huyết tương chuột. Để định lượng FIX người trong huyết tương của chuột bất hoạt, các thử nghiệm máu đông FIX được tiến hành sử dụng các chất phân tích đông máu FIX chuẩn. Để định lượng kháng nguyên FIX người trong huyết tương của chuột kiểu đại, kit ELISA có sẵn trên thị trường (ASSERACHROM IX:AG (số catalog 00943 Stago BNL) được sử dụng mà nó phát hiện đặc hiệu FIX của người.

Ví dụ 6 – Hiệu quả phiên mã cải thiện do sự đưa vào các yếu tố CRM8

Để đánh giá hiệu quả sinh học cải thiện của vectơ chứa CRM8 có dẫn đến hiệu quả phiên mã tăng lên hay không, dòng tế bào gan người (HepG2) và tế bào gan chuột (chuột bất hoạt FIX) được tải nạp vectơ sợi đơn CS06 chứa 0, 1, hoặc 3 yếu tố CRM8. Mức FIX mRNA và ADN được xác định và thể hiện là tỷ lệ giữa mức FIX mRNA và ADN bình thường.

Trong mô hình in vitro, việc đưa vào một yếu tố CRM8 (CS06-CRM8.1-ssV) hoặc ba yếu tố CRM8 (CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40)) gây các mức FIX mRNA của người lần lượt cao hơn 5 lần và 23 lần trong tế bào gan người được tải nạp so với tế bào được tải nạp bởi vectơ không có yếu tố CRM8 (CS06-CRM8.0-ssV) (Bảng 6). Tương tự, trong mô hình in vivo, mức biểu hiện FIX ở gan chuột từ các vectơ chứa một hoặc ba yếu tố CRM8 lần lượt cao hơn 2,0 lần và 2,8 lần mức biểu hiện FIX từ vectơ không có yếu tố CRM8 (Bảng 6). Cả hai mô hình ủng hộ một điều là (các) yếu tố CRM8 mang lại hiệu quả có lợi lên việc tăng hoạt tính phiên mã của cấu trúc FIX.

Bảng 7. Mức FIX mRNA sau khi tải nạp AAV8-FIX của tế bào gan người hoặc gan chuột.

Cấu trúc AAV	Dòng tế bào gan <i>in vitro</i> (HepG2)		Mô gan chuột <i>in vivo</i>	
	Tỷ lệ FIX chuẩn hóa: mARN/ADN	Số lần tăng so với CS06-CRM8.0-ssV	Tỷ lệ FIX chuẩn hóa: mARN/ADN	Số lần tăng so với CS06-CRM8.0-ssV
CS06-CRM8.0-ssV	0,025	1	0,38	1
CS06-CRM8.1-ssV	0,14	5,4	0,78	2,0
CS06-CRM8.3-ssV	0,58	23,4	1,09	2,8

Phương pháp của Ví dụ 6

Phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực định lượng bao gồm bước chiết ARN và ADN. ADN của hệ gen và toàn bộ ARN được chiết từ gan đông lạnh (xem thử nghiệm động vật) hoặc tế bào HepG2 (xem thử nghiệm hoạt lực sinh học *in vitro* trong tế bào HepG2) bằng các quy trình chuẩn. Để phân tích các thử nghiệm *in vivo*, một bộ ba con vật trong mỗi nhóm điều trị gần với giá trị hoạt tính FIX trung bình của nhóm tương ứng vào ngày 14 (trong khoảng giá trị trung bình $\pm$ SD) được chọn. ADN vòng được tổng hợp bằng đoạn môi oligo (dT20), enzym transcriptaza ngược SuperScript III (RT) và ARN toàn bộ được xử lý bằng DNaza theo hướng dẫn sử dụng (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Germany; RNeasy mini kit, Qiagen).

Số bản sao FIX-biến đổi gen trong các mẫu ADN_g (ADN hệ gen) và ADN vòng được xác định bằng phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực định tính dựa trên huỳnh quang (qPCR- quantitative real-time polymerase chain reaction), khuếch đại trình tự 96 bp của FIX exon 6. β -actin chuột được sử dụng làm đối chứng nội sinh và được định tính bằng thử nghiệm TaqMan có sẵn trên thị trường. Phân tích số liệu qPCR được tiến hành bằng cách sử dụng phần mềm của thiết bị chuyên dụng, tính số bản sao FIX hoặc β -actin trên mỗi phản ứng dựa trên các thông số hồi quy tuyến tính của đường cong chuẩn. Hơn nữa, các kết quả được chuẩn hóa đến mức 1 μ g của hoặc ARN hoặc ADN và tỷ lệ mARN:ADN được tính.

Hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong đây là chỉ nhằm mục đích minh họa và các điều chỉnh hoặc thay đổi khác nhau trong phạm vi của chúng được

gợi ý cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được đưa vào trong tinh thần và phạm vi xem xét của đơn sáng chế và phạm vi của yêu cầu bảo hộ đính kèm. Tất cả các công bố, Patent, và đơn Patent nêu trong đây được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả mục đích.

Tham khảo chéo đến đơn liên quan

Sáng chế yêu cầu quyền ưu tiên của Đơn tạm thời Mỹ số 62/509,616, nộp ngày 22, tháng Năm, năm 2017, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích.

Tham khảo “danh sách trình tự”, bảng, hoặc chương trình máy tính, phụ lục danh sách nộp kèm trên đĩa compact

Bản mô tả sáng chế đưa vào đây bằng cách viện dẫn bản sao văn bản Danh sách trình tự được nộp theo đây, được tạo ra vào ngày 21, tháng Năm, năm 2018, có tên là 008073_5117_WO_Sequence_Listing.txt cỡ 73 kilobyte.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm axit nucleic, bao gồm polynucleotit Yếu tố IX mã hóa protein Yếu tố IX, polynucleotit Yếu tố IX này bao gồm trình tự axit nucleic mà giống ít nhất 97% với trình tự axit nucleic của CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17).
2. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 1, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự axit nucleic mà giống ít nhất 99% với trình tự axit nucleic của CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17).
3. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polynucleotit Yếu tố IX có không quá 10 dinucleotit CpG.
4. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polynucleotit Yếu tố IX có không quá 3 dinucleotit CpG.
5. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 1, trong đó polynucleotit Yếu tố IX bao gồm trình tự axit nucleic của CS06-MP-NA (SEQ ID NO:17).
6. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó polynucleotit Yếu tố IX mã hóa leuxin ở vị trí axit amin tương ứng với gốc 346 của polypeptit Yếu tố IX kiểu dài chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO:2), mà là arginin trong polypeptit Yếu tố IX kiểu dài.
7. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó protein Yếu tố IX được mã hóa bởi polynucleotit Yếu tố IX có từ 1 đến 10 đột biến thế axit amin so với FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).
8. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó protein Yếu tố IX được mã hóa bởi polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit amin của FIXp-MP-AA (SEQ ID NO:12).
9. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó polynucleotit Yếu tố IX còn bao gồm pre-pro-polynucleotit dẫn đầu mã hóa pre-pro-peptit dẫn đầu, pre-pro-peptit dẫn đầu này bao gồm trình tự axit amin của FIX-PPP-AA (SEQ ID NO:36).
10. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 9, trong đó pre-pro-polynucleotit dẫn đầu có trình tự axit nucleic của CS06-PPP-NA (SEQ ID NO:23).

11. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic giống ít nhất 99% với trình tự axit nucleic của CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).
12. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó polynucleotit Yếu tố IX có trình tự axit nucleic của CS06-FL-NA (SEQ ID NO:9).
13. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, còn bao gồm yếu tố gen khởi đầu đặc hiệu gan liên kết điều khiển với polynucleotit Yếu tố IX.
14. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 13, trong đó yếu tố gen khởi đầu đặc hiệu gan bao gồm một bản sao của polynucleotit gen khởi đầu, polynucleotit gen khởi đầu này bao gồm trình tự axit nucleic giống ít nhất 95% với CRM8 (SEQ ID NO:39).
15. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 13, trong đó yếu tố gen khởi đầu đặc hiệu gan bao gồm ba bản sao của polynucleotit gen khởi đầu, polynucleotit gen khởi đầu này bao gồm trình tự axit nucleic giống ít nhất 95% với CRM8 (SEQ ID NO:39).
16. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 14 hoặc 15, trong đó polynucleotit gen khởi đầu bao gồm trình tự axit nucleic của CRM8 (SEQ ID NO:39).
17. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, còn bao gồm intron được liên kết điều khiển với polynucleotit Yếu tố IX.
18. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 17, trong đó intron bao gồm polynucleotit intron MVM bao gồm trình tự axit nucleic giống ít nhất 95% với MVMI (SEQ ID NO:53).
19. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 18, trong đó polynucleotit intron MVM bao gồm trình tự axit nucleic của MVMI (SEQ ID NO:53).
20. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 19, trong đó intron nêu trên được đặt giữa yếu tố gen khởi đầu và vị trí bắt đầu dịch mã của trình tự nucleotit mã hóa polypeptit Yếu tố IX.
21. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 1, bao gồm trình tự axit nucleic của CS06-CRM8.3-ssV (SEQ ID NO:40).
22. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, bao gồm vectơ liệu pháp gen của động vật có vú.

23. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 22, trong đó vector liệu pháp gen của động vật có vú là vector virus liên quan đến adeno (AAV- adeno-associated virus).
24. Chế phẩm axit nucleic theo điểm 23, trong đó vector virus liên quan đến adeno nêu trên là vector virus liên quan đến adeno typ huyết thanh 8 (AAV-8).
25. Chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 24, trong đó vector liệu pháp gen của động vật có vú bao gồm polynucleotit sợi đơn mã hóa protein Yếu tố IX.
26. Phương pháp tạo ra hạt virus liên quan đến adeno (AAV) bao gồm việc đưa chế phẩm axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25 vào trong tế bào chủ động vật có vú, trong đó chế phẩm axit nucleic này có khả năng sao chép trong tế bào chủ động vật có vú này.
27. Tế bào chủ chứa chế phẩm axit nucleic, bao gồm polynucleotit Yếu tố IX, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Baxalta Incorporated

Baxalta GmbH

Horling, Franziska

Lengler, Johannes

Falkner, Falko-Guenther

Rottensteiner, Hanspeter

Scheifflinger, Friedrich

<120> CHẾ PHẨM AXIT NUCLEIC BAO GỒM POLYNUCLEOTIT YẾU TỐ IX MÃ HÓA
PROTEIN YẾU TỐ IX VÀ PHƯƠNG PHÁP *IN VITRO* ĐỂ TẠO RA HẠT VIRUT LIÊN
QUAN ĐẾN ADENO

<130> 008073-5117-WO

<150> US 62/509,616

<151> 2017-05-22

<160> 64

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1386

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-FL-NA

<400> 1

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
60

ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt
120

ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt
180

gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac
240

actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat
300

ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc
360

tttggaatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga
420

tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctcctg tactgagggg
480

tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga
540

gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac
600

tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca
660

tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg
720

caggttggtt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa
780

tggattgtaa ctgctgcca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt
840

gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt
900

cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ctttctggaa
960

ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa
1020

tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc
1080

cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc
1140

acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat
1200

gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa
1260

gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tgggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa
1320

tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc
1380

acttaa
1386

<210> 2

<211> 461

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-FL-AA

<400> 2

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

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

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys

115

120

125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe

130

135

140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly

145

150

155

160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe

165

170

175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala

180

185

190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu

195

200

205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe

210

215

220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
 245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser

435

440

445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

450

455

460

<210> 3

<211> 423

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX2-FL-AA

<400> 3

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1

5

10

15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20

25

30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35

40

45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50

55

60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65

70

75

80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Val Thr Cys

85

90

95

Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp

100

105

110

Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn

115

120

125

Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser

130

135

140

Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
 145 150 155 160

Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile
 165 170 175

Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly
 180 185 190

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

Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile
 210 215 220

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

Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg
 245 250 255

Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn

260

265

270

Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val

275

280

285

Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr

290

295

300

Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg

305

310

315

320

Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val

325

330

335

Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile

340

345

350

Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser

355

360

365

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr

370

375

380

Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys

385

390

395

400

Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile

405

410

415

Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

420

<210> 4

<211> 461

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIXp-FL-AA

<400> 4

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

85 90 95

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

100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe

210		215		220													
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp		
225					230					235					240		
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile		
				245					250					255			
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly		
			260					265					270				
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu		
	275						280				285						
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn		
	290					295				300							
Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu		
305					310					315					320		

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser

435

440

445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

450

455

460

<210> 5

<211> 1385

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-FL-NA

<400> 5

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtcagcaga gtgcacagtg ttcttgacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaacaggg ccaagagata caactcaggc aagctggagg agtttgca gggcaacctg
180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc tttgaggagg ccagagaggt gtttgagaac
240

acagagagga ccacagagtt ctggaagcag tatgtggatg gagaccagtg tgagagcaac
300

ccttgccctga atggaggcag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgccct
360

tttggctttg agggcaagaa ctgtgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaatggcagg
420

tgtgagcagt tctgcaagaa ctcagctgac aacaaagtgg tgtgtagctg cacagagggc
480

tacagactgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgcccttccc ctgtggcaga
540

gtgtcagtgt cccagaccag caagctgacc agagctgaga cagtgttccc tgatgtggac
600

tatgtgaata gcacagaggc tgagaccatc ctggacaaca tcaccagag caccagtc
660

ttcaatgact tcaccagagt tgtgggagga gaggatgcc agcctggcca gttcccctgg
720

caggtggtgc tgaatggcaa agtggatgcc ttctgtggag gcagcattgt gaatgagaag
780

tggattgtga cagctgccca ctgtgtggag acaggagtga agatcacagt ggtggctgga
840

gaacacaata ttgaggagac agagcacaca gagcagaaga ggaatgtcat caggattatc
900

ccccaccaca actacaatgc tgccatcaac aagtacaacc atgacattgc cctgctggag
960

ctggatgagc ctctgggtgct gaatagctat gtgaccccca tctgcattgc tgacaaggag
1020

tacaccaaca tcttcctgaa gtttggctca ggctatgtgt caggctgggg cagagtgttc
1080

cacaagggca gatcagccct ggtgctgcag tacctgagag tgcccctggt ggacagagcc
1140

acctgcctgt tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgtgc tggcttccat
1200

gagggaggca gagacagctg ccaggagagac tcaggaggac cccatgtgac agaagtggag
1260

ggcaccagct tcctgacagg catcatcagc tggggagagg agtgtgccat gaagggcaag
1320

tatggcatct acaccaaagt gagcagatat gtgaactgga tcaaggagaa aaccaagctg
1380

acctg
1385

<210> 6

<211> 1386

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-FL-NA

<400> 6

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaacaggc ccaagagata caactctggc aagctggagg agtttgtgca gggcaacctg
180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc tttgaggagg ccaggggaagt gtttgagaac
240

actgagagga ccaactgagtt ctggaagcag tatgtggatg gggaccagtg tgagagcaac
300

ccttgccctga atgggggag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgccct
360

tttggctttg agggcaagaa ctgtgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaatggcagg
420

tgtgagcagt tctgcaagaa ctctgctgac aacaaagtgg tgtgtagctg cactgagggc
480

tacagactgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tggccttccc ctgtggcaga
540

gtgtctgtgt cccagaccag caagctgacc agagctgaga ctgtgttccc tgatgtggac
600

tatgtgaata gactgagggc tgagaccatc ctggacaaca tcaccagag caccagtc
660

ttcaatgact tcaccagagt ggtggggggg gaggatgcca agcctggcca gttcccctgg
720

caggtggtgc tgaatggcaa agtggatgcc ttctgtgggg gcagcattgt gaatgagaag
780

tggaattgtga ctgctgcca ctgtgtggag actggggtga agatcactgt ggtggctggg
840

gaacacaata ttgaggagac tgagcacact gagcagaaga ggaatgtcat caggattatc
900

ccccaccaca actacaatgc tgccatcaac aagtacaacc atgacattgc cctgctggag
960

ctggatgagc ctctgggtgct gaatagctat gtgaccccca tctgcattgc tgacaaggag
1020

tacaccaaca tcttcctgaa gtttggctct ggctatgtgt ctggctgggg cagagtgttc
1080

cacaagggca ggtctgccct ggtgctgcag tacctgagag tgcccctggt ggacagagcc
1140

acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgtgc tggcttccat
1200

gaggggggca gagacagctg ccagggggac tctggggggc cccatgtgac tgaagtggag
1260

ggcaccagct tcctgactgg catcatcagc tggggggagg agtgtgccat gaagggcaag
1320

tatggcatct acaccaaagt gagcaggtat gtgaactgga tcaaggagaa aaccaagctg
1380

acctga
1386

<210> 7

<211> 1386

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-FL-NA

<400> 7

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcacagtg ttcttgacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaacaggc ccaagagata caactctggc aagctggagg agtttgtgca gggcaacctg
180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc tttgaggagg ccaggagggt gtttgagaac
240

acagagagga ccacagagtt ctggaagcag tatgtggatg gtgaccagtg tgagagcaac
300

ccttgccctga atggaggcag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgccct
360

tttggtttg agggcaagaa ctgtgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaatggcagg
420

tgtgagcagt tctgcaagaa ctctgctgac aacaaggtgg tgtgtagctg cacagagggc
480

tacagactgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgccttccc ctgtggcaga
540

gtgtctgtgt cccagaccag caagctgacc agagctgaga cagtgttccc tgatgtggac
600

tatgtgaaca gcacagaggc tgagaccatc ctggacaaca tcaccagag caccagtc
660

ttcaatgact tcaccagagt ggtgggagga gaggatgcca agcctggcca gttcccctgg
720

caggtggtgc tgaatggcaa ggtggatgcc ttctgtggag gcagcattgt gaatgagaag
780

tggattgtga cagctgcca ctgtgtggag acaggagtga agatcacagt ggtggctgga
840

gagcacaaca ttgaggagac agagcacaca gagcagaaga ggaatgtgat caggatcatc
900

cctcaccaca actacaatgc tgccatcaac aagtacaacc atgacattgc cctgctggag
960

ctggatgagc ctctggtgct gaacagctat gtgacccta tctgcattgc tgacaaggag
1020

tacaccaaca tcttcctgaa gtttggctct ggctatgtgt ctggctgggg cagagtgttc
1080

cacaagggca ggtctgccct ggtgctgcag tacctgagag tgcccctggt ggacagagcc
1140

acctgcctgt tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tggtctgtgc tggcttccat
1200

gagggaggca gagacagctg ccagggtgac tctggaggac cccatgtgac agaggtggag
1260

ggcaccagct tcctgacagg catcatcagc tggggagagg agtgtgccat gaagggcaag
1320

tatggcatct acaccaaagt gagcagatat gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg
1380

acctga
1386

<210> 8

<211> 1386

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-FL-NA

<400> 8

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaaccgcc ccaagcgcta caactctggc aagctggagg agtttgtgca gggcaacctg
180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc tttgaggagg ccagggaggt gtttgagaac
240

actgagcgca ccactgagtt ctggaagcag tatgtggatg gggaccagtg tgagagcaac
300

ccctgcctga atgggggggag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgcccc
360

tttggttttg agggcaagaa ctgtgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaatggccgc
420

tgtgagcagt tctgcaagaa ctctgctgac aacaaggtgg tgtgctcttg cactgagggc
480

taccgcctgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgcccttccc ctgtggcagg
540

gtgtctgtga gccagaccag caagctgacc agggctgaga ctgtgttccc tgacgtggac
600

tatgtgaaca gcactgaggc tgagaccatc ctggacaaca tcacccagag caccagagc
660

ttcaatgact tcaccagggg ggtgggagga gaggatgcca agcctggcca gttcccctgg
720

caggtgggtgc tgaatggcaa ggtggatgcc ttctgtggag gcagcattgt gaatgagaag
780

tggattgtga ccgctgcccc ctgtgtggag actggagtga agatcactgt ggtggctggg
840

gagcacaaca ttgaggagac agagcacaca gagcagaagc gcaatgtgat caggatcatc
900

ccccaccaca actacaatgc tgccatcaac aagtacaacc atgacattgc cctgctggag
960

ctggatgagc ccctgggtgct gaacagctac gtgaccccca tctgcattgc agacaaggag
1020

tacaccaaca tcttcctgaa gtttggctct ggctatgtgt ctggctgggg caggggtgttc
1080

cacaagggca ggtctgccct ggtgctgcag tacctgaggg tgcccctggg ggacagggcc
1140

acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc tggcttccat
1200

gagggaggaa gggacagctg ccagggagac tctggaggcc cccatgtgac agaggtggag
1260

ggcaccagct tcctgacagg catcatcagc tggggggagg agtgtgccat gaagggcaag
1320

tatggcatct acaccaaagt gtcccgctat gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg
1380

acctga
1386

<210> 9

<211> 1386

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-FL-NA

<400> 9

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tcccctggcc tcatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtc ttccctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctcaacaggc ccaagagata caactctggc aaactggagg agtttgtcca gggcaacctg
180

gagagggagt gcatggagga gaagtgctcc tttgaggagg ccaggagggt ctttgagaac
240

actgagcgca ccactgagtt ctggaaacag tatgtggatg gggaccagtg tgagtccaac
300

ccctgcctga atggggggcag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgcccc
360

tttggttttg agggcaagaa ctgtgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaatggcaga
420

tgtgagcagt tctgcaagaa ctctgctgac aacaagggtg tgtgctcctg cactgagggc
480

taccgcctgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgccattccc atgtggcaga
540

gtctctgtga gccagaccag caagctcacc agggctgaga ctgtgttccc tgatgtggac
600

tatgtgaaca gcactgaggc tgaaaccatc ctggacaaca tcaccagag caccagagc
660

ttcaatgact tcaccagagt ggtgggagga gaggatgcca agcctggcca gttcccctgg
720

caagtgggtgc tcaatggcaa ggtggatgcc ttctgtgggg gctccattgt gaatgagaag
780

tggattgtca ctgctgccca ctgtgtggag actgggggtca agatcactgt ggtggctggg
840

gagcacaaca ttgaggagac tgagcacact gagcagaagc gcaatgtgat caggatcatc
900

ccccaccaca actacaatgc tgccatcaac aagtacaacc atgacattgc cctgctggag
960

ctggatgagc ccctggtcct caacagctat gtgaccccca tctgcattgc tgacaaggag
1020

tacaccaaca tcttcctcaa gtttggctct ggctatgtct ctggctgggg cagagtgttc
1080

cacaaaggca ggtctgccct ggtgctccag tacctgagag tgcccctggt ggacagggcc
1140

acctgcctct tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgtgc tggcttccat
1200

gagggaggaa gagacagctg ccagggggac tctggaggac cccatgtcac tgaggtggag
1260

ggcacctcct tcctcactgg catcatctcc tggggagagg agtgtgccat gaaaggcaaa
1320

tatggcatct acaccaaagt ctccagatat gtcaactgga tcaaggagaa gaccaagctg
1380

acctga
1386

<210> 10

<211> 415

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-MP-AA

<400> 10

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg

1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50

55

60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys

65

70

75

80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu

85

90

95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr

100

105

110

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

115

120

125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr

130

135

140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu

145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala

305

310

315

320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys

325

330

335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly

340

345

350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro

355

360

365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser

370

375

380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys

385

390

395

400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

405

410

415

<210> 11

<211> 377

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX2-MP-AA

<400> 11

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg

1

5

10

15

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

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

Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser
 50 55 60

Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala
 65 70 75 80

Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg
 85 90 95

Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe
 100 105 110

Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp
 115 120 125

Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val

130

135

140

Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu

145

150

155

160

Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys

165

170

175

Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr

180

185

190

Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln

195

200

205

Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala

210

215

220

Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro

225

230

235

240

Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu

245

250

255

Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp

260

265

270

Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu

275

280

285

Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe

290

295

300

Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg

305

310

315

320

Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu

325

330

335

Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala

340

345

350

Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn

355

360

365

Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

370

375

<210> 12

<211> 415

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIXp-MP-AA

<400> 12

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg

1

5

10

15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys

65

70

75

80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu

85

90

95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr

100

105

110

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

115

120

125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr

130

135

140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu

145

150

155

160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn

165

170

175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe

180

185

190

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

195

200

205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu

210

215

220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu

225

230

235

240

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

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

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285

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

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

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

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

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro

355

360

365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser

370

375

380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys

385

390

395

400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

405

410

415

<210> 13

<211> 1248

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-MP-NA

<400> 13

tacaactcag gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagaggga gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccagagag gtgtttgaga acacagagag gaccacagag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggagaccag tgtgagagca acccttgcct gaatggaggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggcct tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
300

aactcagctg acaacaaagt ggtgtgtagc tgcacagagg gctacagact ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtcagt gtcccagacc
420

agcaagctga ccagagctga gacagtgttc cctgatgtgg actatgtgaa tagcacagag
480

gctgagacca tcctggacaa catcaccagc agcaccagc cttcaatga cttcaccaga
540

gttgtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
600

aaagtggatg ccttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gacagctgcc
660

cactgtgtgg agacaggagt gaagatcaca gtggtggctg gagaacacaa tattgaggag
720

acagagcaca cagagcagaa gaggaatgtc atcaggatta tccccacca caactacaat
780

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
840

ctgaatagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
900

aagtttggct caggctatgt gtcaggctgg ggcagagtgt tccacaaggg cagatcagcc
960

ctggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gttgagcacc
1020

aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggagg cagagacagc
1080

tgccagggag actcaggagg accccatgtg acagaagtgg agggcaccag cttcctgaca
1140

ggcatcatca gctggggaga ggagtgtgcc atgaagggca agtatggcat ctacaccaaa
1200

gtgagcagat atgtgaactg gatcaaggag aaaaccaagc tgacctga
1248

<210> 14

<211> 1248

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-MP-NA

<400> 14

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggg gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccagggaa gtgtttgaga aactgagag gaccactgag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggggaccag tgtgagagca acccttgcct gaatgggggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggcct tgaggggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaaagt ggtgtgtagc tgcactgagg gctacagact ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc cctgtggca gagtgtctgt gtcccagacc
420

agcaagctga ccagagctga gactgtgttc cctgatgtgg actatgtgaa tagcactgag
480

gctgagacca tcctggacaa catcacccag agcacccagt ccttcaatga cttcaccaga
540

gtggtggggg gggaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
600

aaagtggatg ccttctgtgg gggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gactgctgcc
660

cactgtgtgg agactggggt gaagatcact gtggtggctg gggaacacaa tattgaggag
720

actgagcaca ctgagcagaa gaggaatgtc atcaggatta tccccacca caactacaat
780

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
840

ctgaatagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
900

aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcagagtgt tccacaaggg caggtctgcc
960

ctggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gctgagcacc
1020

aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggggg cagagacagc
1080

tgccaggggg actctggggg ccccatgtg actgaagtgg agggcaccag cttcctgact
1140

ggcatcatca gctgggggga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacaccaaa
1200

gtgagcaggt atgtgaactg gatcaaggag aaaaccaagc tgacctga
1248

<210> 15

<211> 1250

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-MP-NA

<400> 15

cstacaactc tggcaagctg gaggagtttg tgcagggcaa cctggagagg gagtgcattg
60

aggagaagtg cagctttgag gaggccaggg aggtgtttga gaacacagag aggaccacag
120

agttctggaa gcagtatttg gatggtgacc agtgtgagag caacccttgc ctgaatggag
180

gcagctgcaa ggatgacatc aacagctatg agtgctggtg cccttttggc tttaggggca
240

agaactgtga gctggatgtg acctgcaaca tcaagaatgg caggtgtgag cagttctgca
300

agaactctgc tgacaacaag gtggtgtgta gctgcacaga gggctacaga ctggctgaga
360

accagaagag ctgtgagcct gctgtgccct tcccctgtgg cagagtgtct gtgtcccaga
420

ccagcaagct gaccagagct gagacagtgt tccctgatgt ggactatgtg aacagcacag
480

aggctgagac catcctggac aacatcacc agagcaccca gtccttcaat gacttcacca
540

gagtgggtggg aggagaggat gccaagcctg gccagttccc ctggcaggtg gtgctgaatg
600

gcaagggtgga tgccttctgt ggaggcagca ttgtgaatga gaagtggatt gtgacagctg
660

cccactgtgt ggagacagga gtgaagatca cagtgggtggc tggagagcac aacattgagg
720

agacagagca cacagagcag aagaggaatg tgatcaggat catccctcac cacaactaca
780

atgctgccat caacaagtac aaccatgaca ttgccctgct ggagctggat ggcctctgg
840

tgctgaacag ctatgtgacc cctatctgca ttgctgacaa ggagtacacc aacatcttcc
900

tgaagtttgg ctctggctat gtgtctggct ggggcagagt gttccacaag ggcaggtctg
960

ccctgggtgct gcagtacctg agagtgtccc tgggtggacag agccacctgc ctgttgagca
1020

ccaagttcac catctacaac aacatgttct gtgctggctt ccatgaggga ggcagagaca
1080

gctgccaggg tgactctgga ggaccccatg tgacagaggt ggagggcacc agcttcctga
1140

caggcatcat cagctgggga gaggagtgtg ccatgaaggg caagtatggc atctacacca
1200

aagtgagcag atatgtgaac tggatcaagg agaagaccaa gctgacctga
1250

<210> 16

<211> 1248

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-MP-NA

<400> 16

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagaggga gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccaggag gtgtttgaga aactgagcg caccactgag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggggaccag tgtgagagca acccctgcct gaatggggg
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggctt tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggcc gctgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaaggt ggtgtgctct tgcactgagg gctaccgcct ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca ggggtgtctgt gagccagacc
420

agcaagctga ccagggctga gactgtgttc cctgacgtgg actatgtgaa cagcactgag
480

gctgagacca tcctggacaa catcaccag agcaccaga gcttcaatga cttcaccagg
540

gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
600

aaggtggatg ccttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gaccgctgcc
660

cactgtgtgg agactggagt gaagatcact gtggtggctg gggagcacaa cattgaggag
720

acagagcaca cagagcagaa gcgcaatgtg atcaggatca tccccacca caactacaat
780

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcccttggtg
840

ctgaacagct acgtgacccc catctgcatt gcagacaagg agtacaccaa catcttcctg
900

aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcaggggtgt tccacaaggg caggtctgcc
960

ctggtgctgc agtacctgag ggtgccctg gtggacaggg ccacctgcct gctgagcacc
1020

aagttcacca tctacaacaa catgttctgc gctggcttcc atgagggagg aagggacagc
1080

tgccagggag actctggagg ccccatgtg acagaggtgg agggcaccag cttcctgaca
1140

ggcatcatca gctgggggga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacaccaa
1200

gtgtcccgct atgtgaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacctga
1248

<210> 17

<211> 1248

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-MP-NA

<400> 17

tacaactctg gcaaactgga ggagtttgtc cagggcaacc tggagaggga gtgcatggag
60

gagaagtgct cctttgagga ggccaggag gtctttgaga aactgagcg caccactgag
120

ttctggaaac agtatgtgga tggggaccag tgtgagtcca acccctgcct gaatgggggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cctttggctt tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca gatgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaagggt ggtgtgctcc tgcactgagg gctaccgcct ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgccattc ccatgtggca gagtctctgt gagccagacc
420

agcaagctca ccagggtga gactgtgttc cctgatgtgg actatgtgaa cagcactgag
480

gctgaaacca tcctggacaa catcaccag agcaccaga gttcaatga cttcaccaga
540

gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttccct ggcaagtggg gctcaatggc
600

aaggtggatg ctttctgtgg gggctccatt gtgaatgaga agtggattgt cactgctgcc
660

cactgtgtgg agactggggg caagatcact gtggtggctg gggagcacia cattgaggag
720

actgagcaca ctgagcagaa ggcgaatgtg atcaggatca tccccacca caactacaat
780

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gccctggtc
840

ctcaacagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctc
900

aagtttggct ctggctatgt ctctggctgg ggcagagtgt tccacaaagg caggtctgcc
960

ctggtgctcc agtacctgag agtgcccctg gtggacaggg ccacctgcct cttgagcacc
1020

aagttcacca tctacaacia catgttctgt gctggcttcc atgagggagg aagagacagc
1080

tgccaggggg actctggagg accccatgtc actgaggtgg agggcacctc cttcctcact
1140

ggcatcatct cctggggaga ggagtgtgcc atgaaaggca aatatggcat ctacacaaaa
1200

gtctccagat atgtcaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacctga
1248

<210> 18

<211> 138

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-PPP-NA

<400> 18

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
60

ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt
120

ctgaatcggc caaagagg
138

<210> 19

<211> 138

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-PPP-NA

<400> 19

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtcagcaga gtgcacagtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaacaggc ccaagaga
138

<210> 20

<211> 138

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-PPP-NA

<400> 20

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaacaggc ccaagaga
138

<210> 21

<211> 138

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-PPP-NA

<400> 21

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcacagtg ttccctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaacaggc ccaagaga
138

<210> 22

<211> 138

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-PPP-NA

<400> 22

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctgaaccgcc ccaagcgc
138

<210> 23

<211> 138

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-PPP-NA

<400> 23

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tcccctggcc tcatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtc ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
120

ctcaacaggc ccaagaga
138

<210> 24

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-SP-NA

<400> 24

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccaat ctgcctttta
60

ggatatctac tcagtgctga atgt
84

<210> 25

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-SP-NA

<400> 25

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtcagcaga gtgc
84

<210> 26

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-SP-NA

<400> 26

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgc
84

<210> 27

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-SP-NA

<400> 27

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgc
84

<210> 28

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-SP-NA

<400> 28

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgc
84

<210> 29

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06--SP-NA

<400> 29

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tcccctggcc tcatcaccat ctgcctgctg
60

ggctacctgc tgtctgctga gtgc
84

<210> 30

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-PP-NA

<400> 30

acagtttttc ttgatcatga aaacgccaac aaaattctga atcggccaaa gagg
54

<210> 31

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-PP-NA

<400> 31

acagtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga acaggcccaa gaga
54

<210> 32

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-PP-NA

<400> 32

actgtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga acaggcccaa gaga
54

<210> 33

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-PP-NA

<400> 33

acagtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga acaggcccaa gaga
54

<210> 34

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-PP-NA

<400> 34

actgtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga accgccccaa gcgc
54

<210> 35

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-PP-NA

<400> 35

actgtcttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctca acaggcccaa gaga
54

<210> 36

<211> 46

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-PPP-AA

<400> 36

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1

5

10

15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20

25

30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg

35

40

45

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-SP-AA

<400> 37

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1

5

10

15

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

20

25

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-PP-AA

<400> 38

Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 39

<211> 72

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CRM8

<400> 39

gggggaggct gctggtgaat attaaccaag gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg
60

ggctaagtcc ac
72

<210> 40

<211> 5276

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-CRM8.3-ssV

<400> 40

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc
60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg
120

gccaactcca tctactagggg ttcctgagtt taaacttcgt cgacggggga ggctgctggt
180

gaatattaac caaggtcacc ccagttatcg gaggagcaaa caggggctaa gtccaccggg
240

ggaggctgct ggtgaatatt aaccaaggtc accccagtta tcggaggagc aaacaggggc
300

taagtccacc gggggaggct gctgggtgaat attaaccaag gtcaccccag ttatcggagg
360

agcaaacagg ggctaagtcc accgagggca ctgggaggat gttgagtaag atggaaaact
420

actgatgacc cttgcagaga cagagtatta ggacatgttt gaacaggggc cgggcgatca
480

gcaggtagct ctagaggatc cccgtctgtc tgcacatttc gtagagcgag tgttccgata
540

ctctaatttc cctaggcaag gttcatatth gtgtaggtta cttattctcc ttttgttgac
600

taagtcaata atcagaatca gcaggtttgg agtcagcttg gcagggatca gcagcctggg
660

ttggaaggag ggggtataaa agccccttca ccaggagaag ccgtcacaca gactaggcgc
720

gccctaaggt aagttggcgc cgtttaaggg atggttggtt ggtgggggat taatgtttaa
780

ttaccttttt tacaggcctg aagatctgcc accatgcaga gggtaacat gatcatggct
840

gagtcccctg gcctcatcac catctgcctg ctgggctacc tgctgtctgc tgagtgcact
900

gtcttcctgg accatgagaa tgccaacaag atcctcaaca ggccaagag atacaactct
960

ggcaaactgg aggagtttgt ccagggcaac ctggagaggg agtgcattga ggagaagtgc
1020

tcctttgagg aggccaggga ggtctttgag aacactgagc gcaccactga gttctggaaa
1080

cagtattgtg atggggacca gtgtgagtc aaccctgcc tgaatggggg cagctgcaag
1140

gatgacatca acagctatga gtgctggtgc ccctttggct ttgagggcaa gaactgtgag
1200

ctggatgtga cctgcaacat caagaatggc agatgtgagc agttctgcaa gaactctgct
1260

gacaacaagg tgggtgtgctc ctgcactgag ggctaccgcc tggctgagaa ccagaagagc
1320

tgtgagcctg ctgtgccatt cccatgtggc agagtctctg tgagccagac cagcaagctc
1380

accagggtg agactgtgtt ccctgatgtg gactatgtga acagcactga ggctgaaacc
1440

atcctggaca acatcaccca gagcaccag agcttcaatg acttcaccag agtggtggga
1500

ggagaggatg ccaagcctgg ccagttcccc tggcaagtgg tgctcaatgg caaggtggat
1560

gccttctgtg ggggctccat tgtgaatgag aagtggattg tcaactgctgc ccactgtgtg
1620

gagactgggg tcaagatcac tgtggtggct ggggagcaca acattgagga gactgagcac
1680

actgagcaga agcgcaatgt gatcaggatc atccccacc acaactacaa tgctgccatc
1740

aacaagtaca accatgacat tgccctgctg gagctggatg agcccctggt cctcaacagc
1800

tatgtgaccc ccatctgcat tgctgacaag gagtacacca acatcttcct caagtttggc
1860

tctggctatg tctctggctg gggcagagtg ttccacaaag gcaggtctgc cctgggtgctc
1920

cagtacctga gagtgcccct ggtggacagg gccacctgcc tcttgagcac caagttcacc
1980

atctacaaca acatgttctg tgctggcttc catgagggag gaagagacag ctgccagggg
2040

gactctggag gaccccatgt cactgaggtg gagggcacct ccttcctcac tggcatcatc
2100

tcttggggag aggagtgtgc catgaaaggc aaatatggca tctacaccaa agtctccaga
2160

tatgtcaact ggatcaagga gaagaccaag ctgacctgat gagcatgcct agagctcgct
2220

gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccgtagc
2280

cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg
2340

catcgcatthg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca
2400

agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga attaattaag ctgcggaagg
2460

aacccttagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg
2520

ggcgacaaaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgccggggc ggcctcagtg agcgagcgag
2580

cgcgagaga gggagtggcc aagacgattt aaatgacaag cttggcgtaa tcatgggtcat
2640

agctgtttcc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa
2700

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc
2760

gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgccca gctgcattaa tgaatcggcc
2820

aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact
2880

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tactcaaag gcggtatac
2940

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa
3000

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg
3060

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa
3120

gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttcg accctgccg
3180

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac
3240

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac
3300

ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccgag
3360

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt
3420

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa
3480

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct
3540

cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga
3600

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg
3660

ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggatcat gagattatca aaaaggatct
3720

tcacctagat ctttttaaatt taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt
3780

aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc
3840

tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg
3900

gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag
3960

atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt
4020

tatccgcctc catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag
4080

ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt
4140

ttggtatggc ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca
4200

tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagttgg
4260

ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat
4320

ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg
4380

tgcgggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca
4440

gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct
4500

taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat
4560

cttttacttt caccagcggt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa
4620

aggggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt
4680

gaagcattta tcaggggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa
4740

ataaacaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa
4800

ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc tttcgtctcg
4860

cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag
4920

cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgta gcgggtgttg
4980

gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc
5040

atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgccatt
5100

cgccattcag gctgcgcaac tggtgggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac
5160

gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt
5220

cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcct cgagatttaa atgacg
5276

<210> 41

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-HC-NA

<400> 41

gttggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttccctt ggcaggtggg gctgaatggc
60

aaagtggatg ccttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gacagctgcc
120

cactgtgtgg agacaggagt gaagatcaca gtgggtggctg gagaacacaa tattgaggag
180

acagagcaca cagagcagaa gaggaatgtc atcaggatta tccccacca caactacaat
240

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
300

ctgaatagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
360

aagtttggct caggctatgt gtcaggctgg ggcagagtgt tccacaaggg cagatcagcc
420

ctggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gttgagcacc
480

aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggagg cagagacagc
540

tgccagggag actcaggagg accccatgtg acagaagtgg agggcaccag cttcctgaca
600

ggcatcatca gctggggaga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacaccaaa
660

gtgagcagat atgtgaactg gatcaaggag aaaaccaagc tg
702

<210> 42

<211> 435

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-LC-NA

<400> 42

tacaactcag gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagaggga gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccagagag gtgtttgaga acacagagag gaccacagag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggagaccag tgtgagagca acccttgcct gaatggaggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggctt tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
300

aactcagctg acaacaaagt ggtgtgtagc tgcacagagg gctacagact ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtcagt gtcccagacc
420

agcaagctga ccaga
435

<210> 43

<211> 705

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-HC-NA

<400> 43

gtggtggggg gggaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
60

aaagtggatg ccttctgtgg gggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gactgctgcc
120

cactgtgtgg agactggggt gaagatcact gtggtggctg gggaacacaa tattgaggag
180

actgagcaca ctgagcagaa gaggaatgtc atcaggatta tccccacca caactacaat
240

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
300

ctgaatagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttctctg
360

aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcagagtgt tccacaaggg caggtctgcc
420

ctggtgctgc agtacctgag agtgccctg gtggacagag ccacctgcct gctgagcacc
480

aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggggg cagagacagc
540

tgccaggggg actctggggg ccccatgtg actgaagtgg agggcaccag cttcctgact
600

ggcatcatca gctgggggga ggagtgtgcc atgaagggca agtatggcat ctacaccaaa
660

gtgagcaggt atgtgaactg gatcaaggag aaaaccaagc tgacc
705

<210> 44

<211> 435

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-LC-NA

<400> 44

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggg gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccagggaa gtgtttgaga aactgagag gaccactgag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggggaccag tgtgagagca acccttgctt gaatgggggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggctt tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaaagt ggtgtgtagc tgactgagg gctacagact ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtctgt gtcccagacc
420

agcaagctga ccaga
435

<210> 45

<211> 705

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-HC-NA

<400> 45

gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
60

aaggtggatg ctttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gacagctgcc
120

cactgtgtgg agacaggagt gaagatcaca gtggtggctg gagagcaca cattgaggag
180

acagagcaca cagagcagaa gaggaatgtg atcaggatca tccctcacca caactacaat
240

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
300

ctgaacagct atgtgacccc tatctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
360

aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcagagtgt tccacaaggg caggtctgcc
420

ctggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gttgagcacc
480

aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggagg cagagacagc
540

tgccaggggtg actctggagg accccatgtg acagaggtgg agggcaccag cttcctgaca
600

ggcatcatca gctggggaga ggagtgtgcc atgaagggca agtatggcat ctacaccaa
660

gtgagcagat atgtgaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacc
705

<210> 46

<211> 435

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-LC-NA

<400> 46

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggg gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccagggag gtgtttgaga acacagagag gaccacagag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggtgaccag tgtgagagca accottgcct gaatggaggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggctt tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaaggt ggtgtgtagc tgcacagagg gctacagact ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtctgt gtcccagacc
420

agcaagctga ccaga
435

<210> 47

<211> 705

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-HC-NA

<400> 47

gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
60

aaggtggatg ccttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gaccgctgcc
120

cactgtgtgg agactggagt gaagatcact gtggtggctg gggagcaca cattgaggag
180

acagagcaca cagagcagaa gcgcaatgtg atcaggatca tccccacca caactacaat
240

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gccctggtg
300

ctgaacagct acgtgacccc catctgcatt gcagacaagg agtacaccaa catcttcctg
360

aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcaggggtg tccacaaggg caggtctgcc
420

ctggtgctgc agtacctgag ggtgcccctg gtggacaggg ccacctgcct gctgagcacc
480

aagttcacca tctacaacaa catgttctgc gctggcttcc atgagggagg aaggacagc
540

tgccagggag actctggagg ccccatgtg acagaggtgg agggcaccag cttcctgaca
600

ggcatcatca gctgggggga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacaccaaa
660

gtgtcccgct atgtgaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacc
705

<210> 48

<211> 435

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-LC-NA

<400> 48

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagaggga gtgcatggag
60

gagaagtgca gctttgagga ggccaggag gtgtttgaga aactgagcg caccactgag
120

ttctggaagc agtatgtgga tggggaccag tgtgagagca acccctgcct gaatggggg
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggctt tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggcc gctgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaaggt ggtgtgctct tgcactgagg gctaccgcct ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca ggggtgtctgt gagccagacc
420

agcaagctga ccagg
435

<210> 49

<211> 705

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-HC-NA

<400> 49

gtgggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaagtggg gctcaatggc
60

aaggtggatg ccttctgtgg gggctccatt gtgaatgaga agtggattgt cactgctgcc
120

cactgtgtgg agactggggg caagatcact gtgggtggctg gggagcacia cattgaggag
180

actgagcaca ctgagcagaa gcgcaatgtg atcaggatca tccccacca caactacaat
240

gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gccctggtc
300

ctcaacagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctc
360

aagtttggt ctggctatgt ctctggctgg ggcagagtgt tccacaaagg caggtctgcc
420

ctggtgctcc agtacctgag agtgcccctg gtggacaggg ccacctgcct cttgagcacc
480

aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggagg aagagacagc
540

tgccaggggg actctggagg accccatgtc actgaggtgg agggcacctc cttcctcact
600

ggcatcatct cctggggaga ggagtgtgcc atgaaaggca aatatggcat ctacaccaaa
660

gtctccagat atgtcaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacc
705

<210> 50

<211> 435

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-LC-NA

<400> 50

tacaactctg gcaaactgga ggagtttgtc cagggcaacc tggagagggga gtgcatggag
60

gagaagtgct cctttgagga ggccagggag gtctttgaga aactgagcg caccactgag
120

ttctggaac agtatgtgga tggggaccag tgtgagtcca acccctgcct gaatgggggc
180

agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cctttggcct tgagggcaag
240

aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca gatgtgagca gttctgcaag
300

aactctgctg acaacaaggt ggtgtgctcc tgcaactgagg gctaccgcct ggctgagaac
360

cagaagagct gtgagcctgc tgtgccattc ccatgtggca gagtctctgt gagccagacc
420

agcaagctca ccagg
435

<210> 51

<211> 145

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AAV2_5'-ITR

<400> 51

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc
60

cgacgcccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg
120

gccaaactcca tcactagggg ttcct
145

<210> 52

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> truncated_TTR_enhancer/promoter

<400> 52

cgagggcact gggaggatgt tgagtaagat ggaaaactac tgatgaccct tgcagagaca
60

gagtattagg acatgtttga acaggggccg ggcgatcagc aggtagctct agaggatccc
120

cgtctgtctg cacatttcgt agagcgagtg ttccgatact ctaatctccc taggcaaggt
180

tcatatttgt gtaggttact tattctcctt ttgttgacta agtcaataat cagaatcagc
240

aggtttggag tcagcttggc agggatcagc agcctggggt ggaaggaggg ggtataaaag
300

ccccttcacc aggagaagcc gtcacacaga
330

<210> 53

<211> 77

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MVM_intron

<400> 53

ctaaggtaag ttggcgccgt ttaagggatg gttggttggt ggggtattaa tgtttaatta
60

cctttttttac aggcctg
77

<210> 54

<211> 234

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu_poly-adenyl hóa_BGH

<400> 54

cctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc
60

ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa
120

aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtggggtg
180

gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgctgg ggaa
234

<210> 55

<211> 145

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AAV2 3'-ITR

<400> 55

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg
60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc
120

gagcgcgcag agagggagtg gccaa
145

<210> 56

<211> 35

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-AP-AA

<400> 56

Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala
 1 5 10 15

Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp
 20 25 30

Phe Thr Arg
 35

<210> 57

<211> 105

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS02-AP-NA

<400> 57

gctgagacag tgttccctga tgtggactat gtgaatagca cagaggctga gaccatcctg
 60

gacaacatca cccagagcac ccagtccttc aatgacttca ccaga
105

<210> 58

<211> 105

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS03-AP-NA

<400> 58

gctgagactg tgttccctga tgtggactat gtgaatagca ctgaggctga gaccatcctg
60

gacaacatca cccagagcac ccagtccttc aatgacttca ccaga
105

<210> 59

<211> 105

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS04-AP-NA

<400> 59

gctgagacag tgttccctga tgtggactat gtgaacagca cagaggctga gaccatcctg
60

gacaacatca cccagagcac ccagtccttc aatgacttca ccaga
105

<210> 60

<211> 105

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS05-AP-NA

<400> 60

gctgagactg tgttccctga cgtggactat gtgaacagca ctgaggctga gaccatcctg
60

gacaacatca cccagagcac ccagagcttc aatgacttca ccagg
105

<210> 61

<211> 105

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CS06-AP-NA

<400> 61

gctgagactg tgttccctga tgtggactat gtgaacagca ctgaggctga aaccatcctg
60

gacaacatca cccagagcac ccagagcttc aatgacttca ccaga
105

<210> 62

<211> 145

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-LC-AA

<400> 62

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

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys

65

70

75

80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu

85

90

95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr

100

105

110

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

115

120

125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr

130

135

140

Arg

145

<210> 63

<211> 235

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIX-HC-AA

<400> 63

Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val

1

5

10

15

Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn

20

25

30

Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys

35

40

45

Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr

50

55

60

Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn

65

70

75

80

Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp

85

90

95

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

100

105

110

Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser

115

120

125

Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln

130

135

140

Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr
 145 150 155 160

Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly
 165 170 175

Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu
 180 185 190

Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu
 195 200 205

Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr
 210 215 220

Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 225 230 235

<210> 64

<211> 235

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FIXp-HC-AA

<400> 64

Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp	Gln	Val
1				5					10					15	

Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile	Val	Asn
			20					25					30		

Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly	Val	Lys
		35					40						45		

Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu	His	Thr
	50						55					60			

Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn	Tyr	Asn
65					70					75				80	

Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp
 85 90 95

Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp
 100 105 110

Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser
 115 120 125

Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
 130 135 140

Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu Ser Thr
 145 150 155 160

Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly
 165 170 175

Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu
 180 185 190

Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu
195 200 205

Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr
210 215 220

Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
225 230 235

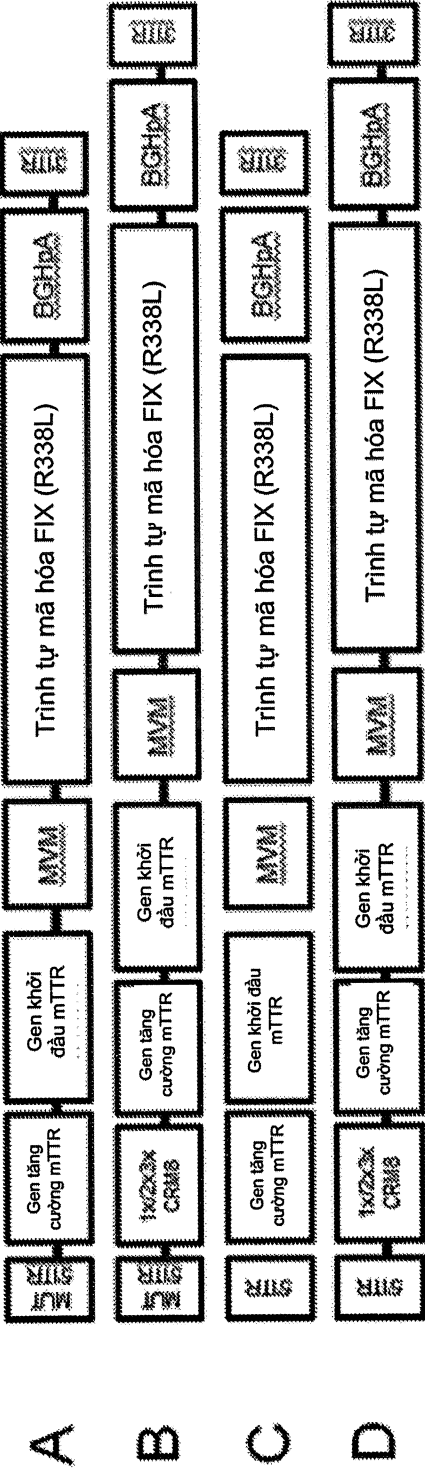


Fig.1

FIX-FL-NA

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTTAGGATATC
TACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAA
GAGGTATAATTTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAA
AAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGC
AGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACAT
TAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGT
AACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCT
GTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGG
AAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTGATGTGGACTAT
GTAAATTCCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACT
TCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGG
TAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCCCCACTGT
GTTGAAACTGGTGTAAATTTACAGTTGTTCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAG
AGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAA
CCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGC
ATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAA
GAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGC
CACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGA
GGTAGAGATTGATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGGAGGGACCAAGTTTCT
TAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGT
ATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAA (SEQ ID NO:1)

Fig.2

3/23

FIX-FL-AA

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
 KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
 PCLNGGSKCD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD
 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSQTSKLT RAETVFPDVD
 YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRI
 PHHYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS
 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSRY
 VNWIKEKTKL T (SEQ ID NO:2)

Fig.3A**FIX2-FL-AA**

mqrvmimae spgliticll gyllsaectv fldhenanki lnrpkrynsgr kleefvqgnl
 erecmeeckcs feearevfenn terttefwkq ydvdtcnikn grceqfckns adnkvvcsct
 egyrlaenqk scepavpfpc grvsvsqtsk ltraetvfpd vdyvnsteae tildnitqst
 qsfndftrvv ggedakpggf pwqvvlngkv dafcggsivn ekwivtaahc vetgvkitvv
 agehnieete hteqkrnvir iiphhnynaa inkynhdial leldeplvln syvtpiciad
 keytniflkf gsgyvgwgr vfhkgrsalv lqylrvplvd ratclrstkf tiynnmfcag
 fheggrdscq gdsggphvte vegtsfltgi iswgeecamk gkygiytkvs ryvnwikekt
 klt (SEQ ID NO:3)

Fig.3B

4/23

FIXp-FL-AA

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCTNIKNGR CEQFCKNSAD
NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSQTSLT RAETVFPDVD
YVNSTEAEIT LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRI
PHHYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS
GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLLSTKFTI YNNMFCAGFH
EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSRY
VNWIKEKTKL T (SEQ ID NO:4)

Fig.4

CS02-FL-NA

atgcagaggggtgaacatgatcatggctgagagccctggcctgatcaccatctgcctgctgggctac
ctgctgtcagcagagtgcacagtgttcctggaccatgagaatgccaacaagatcctgaacaggccc
aagagatacaactcaggcaagctggaggagtttgtgcagggcaacctggagagggagtgcatggag
gagaagtgcagctttgaggaggccagagaggtgtttgagaacacagagaggaccacagagttctgg
aagcagtatgtggatggagaccagtgtgagagcaacccttgccctgaatggaggcagctgcaaggat
gacatcaacagctatgagtgcctggccttttggctttgagggaagaactgtgagctggatgtg
acctgcaacatcaagaatggcaggtgtgagcagttctgcaagaactcagctgacaacaaagtgggtg
tgtagctgcacagagggctacagactggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgcccttc
ccctgtggcagagtgtcagtgtcccagaccagcaagctgaccagagctgagacagtggtccctgat
gtggactatgtgaatagcacagaggctgagaccatcctggacaacatcacccagagcacccagtcc
ttcaatgacttcaccagagttgtgggaggagaggatgccaagcctggccagttccctggcaggtg
gtgctgaatggcaaagtggatgccttctgtggaggcagcattgtgaatgagaagtggattgtgaca
gctgccactgtgtggagacaggagtgaagatcacagtgggtggctggagaacacaatattgaggag
acagagcacacagagcagaagaggaatgtcatcaggattatccccaccacaactacaatgctgcc
atcaacaagtacaaccatgacattgcctgctggagctggatgagcctctggtgctgaatagctat
gtgacccccatctgcattgctgacaaggagtacaccaacatcttcctgaagtttggtcaggctat
gtgtcaggctggggcagagtgttcacaaagggcagatcagccctggtgctgcagtacctgagagt
cccctggtggacagagccacctgcctgttgagcaccaagttcaccatctacaacaacatgttctgt
gctggcttccatgagggaggcagagacagctgccaggagagactcaggaggacccccatgtgacagaa
gtggagggcaccagcttctgacaggcatcatcagctggggagaggagtgtgccatgaagggaag
tatggcatctacaccaaagtgagcagatatgtgaactggatcaaggagaaaaccaagctgacctga
(SEQ ID NO:5)

Fig.5

6/23

CS03-FL-NA

atgcagaggggtgaacatgatcatggctgagagccctggcctgatcaccatctgcctgctgggctac
ctgctgtctgctgagtgcactgtgttcctggaccatgagaatgccaacaagatcctgaacaggccc
aagagatacaactctggcaagctggaggagtttgtgcagggcaacctggagagggagtgcatggag
gagaagtgcagctttgaggaggccagggaagtgtttgagaacactgagaggaccactgagttctgg
aagcagtatgtggatggggaccagtgtgagagcaacccttgccctgaatgggggagctgcaaggat
gacatcaacagctatgagtgtggtgcccttttggctttgagggcaagaactgtgagctggatgtg
acctgcaacatcaagaatggcaggtgtgagcagttctgcaagaactctgctgacaacaaagtgggtg
tgtagctgcactgagggctacagactggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgcccttc
ccctgtggcagagtgtctgtgtcccagaccagcaagctgaccagagctgagactgtgttcctgat
gtggactatgtgaatagcactgaggctgagaccatcctggacaacatcaccagagcaccagtc
ttcaatgacttcaccagagtgggtgggggggaggatgccaagcctggccagttcccctggcaggtg
gtgctgaatggcaaagtggatgccttctgtgggggagcattgtgaatgagaagtggattgtgact
gctgccactgtgtggagactgggggtgaagatcactgtggtggctggggaacacaatattgaggag
actgagcacactgagcagaagaggaatgtcatcaggattatccccaccacaactacaatgctgcc
atcaacaagtacaacatgacattgccctgctggagctggatgagcctctggtgctgaatagctat
gtgacccccatctgcattgctgacaaggagtacaccaacatcttcctgaagtttggctctggctat
gtgtctggctggggcagagtgttcacaagggcaggtctgccctggtgctgcagtaacctgagagt
cccctggtggacagagccacctgcctgctgagcaccaagttcaccatctacaacaacatgttctgt
gctggcttccatgaggggggagagacagctgccagggggactctgggggcccccatgtgactgaa
gtggaGggcaccagcttctgactggcatcatcagctggggggaggagtgtgcatgaagggaag
tatggcatctacaccaaagtgagcaggtatgtgaactggatcaaggagaaaaccaagctgacctga
(SEQ ID NO: 6)

Fig.6

CS04-FL-NA

atgcagaggggtgaacatgattatggctgagagccctggcctgatcaccatctgcctgctgggctac
ctgctgtctgctgagtgcacagtgttcctggaccatgagaatgccaacaagatcctgaacaggccc
aagagatacaactctggcaagctggaggagtttgtgcagggcaacctggagagggagtgcatggag
gagaagtgcagctttgaggaggccaggaggtgttgagaacacagagaggaccacagagttctgg
aagcagtatgtggatgggtgaccagtgtgagagcaacccttgccctgaatggaggcagctgcaaggat
gacatcaacagctatgagtgtgtggtgcccttttggctttgagggaagaactgtgagctggatgtg
acctgcaacatcaagaatggcaggtgtgagcagttctgcaagaactctgctgacaacaagggtggtg
tgtagctgcacagagggctacagactggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgcccttc
ccctgtggcagagtgtctgtgtcccagaccagcaagctgaccagagctgagacagtgttcctgat
gtggactatgtgaacagcacagaggctgagaccatcctggacaacatcaccagagcaccagtc
ttcaatgacttcaccagagtgggtgggaggagaggatgccaagcctggccagttcccctggcaggtg
gtgctgaatggcaagggtggatgccttctgtggaggcagcattgtgaatgagaagtggattgtgaca
gctgcccactgtgtggagacaggagtgaagatcacagtgggtggctggagagcacaacattgaggag
acagagcacacagagcagaagaggaatgtgatcaggatcatccctcaccacaactacaatgctgcc
atcaacaagtacaacatgacattgccctgctggagctggatgagcctctggtgctgaacagctat
gtgacccctatctgcattgctgacaaggagtacaccaacatcttcctgaagtttggctctggctat
gtgtctggctggggcagagtgttcacaagggcaggtctgccctgggtgctgcagtacctgagagt
cccctggtggacagagccacctgcctgttgagcaccaagtccaccatctacaacaacatgttctgt
gctggcttccatgagggaggcagagacagctgccagggtgactctggaggaccccatgtgacagag
gtggaGggcaccagcttcctgacaggcatcatcagctggggagaggagtgtgccatgaagggaag
tatggcatctacaccaaagtgagcagatatgtgaactggatcaaggagaagaccaagctgacctga
(SEQ ID NO:7)

Fig.7

CS05-FL-NA

atgcagaggggtgaacatgattatggctgagagccctggcctgatcaccatctgcctgctgggctac
ctgctgtctgctgagtgcaactgtgttcctggaccatgagaatgccacaagatcctgaaccgccc
aagcgctacaactctggcaagctggaggagtttgtgcagggcaacctggagagggagtgcatggag
gagaagtgcagctttgaggaggccaggagggtgtttgagaacactgagcgaccactgagttctgg
aagcagtatgtggatggggaccagtggtgagagcaacccctgcctgaatggggggagctgcaaggat
gacatcaacagctatgagtgctgggtgcccctttggctttgagggaagaactgtgagctggatgtg
acctgcaacatcaagaatggccgctgtgagcagttctgcaagaactctgctgacaacaagggtggtg
tgctcttgcaactgagggctaccgctggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgcccttc
ccctgtggcaggggtgtctgtgagccagaccagcaagctgaccagggctgagactgtgttccctgac
gtggactatgtgaacagcactgaggctgagaccatcctggacaacatcaccagagcaccagagc
ttcaatgacttcaccaggggtggtgggaggagaggatgccaaagcctggccagttccctggcaggtg
gtgctgaatggcaagggtggatgccttctgtggaggcagcattgtgaatgagaagtggattgtgacc
gctgcccactgtgtggagactggagtgagatcactgtggtggctggggagcacaacattgaggag
acagagcacacagagcagaagcgcaatgtgatcaggatcatccccaccacaactacaatgctgcc
atcaacaagtacaaccaatgacattgccctgctggagctggatgagcccctgggtgctgaacagctac
gtgacccccatctgcattgcagacaaggagtacaccaacatcttccctgaagtttggctctggotat
gtgtctggctggggcaggggtgttccacaagggcaggtctgccctgggtgctgcagtaacctgaggggtg
cccctgggtggacagggccacctgctgctgagcaccagttcaccatctacaacaacatgtttotgc
gctggcttccatgagggaggaagggaacagctgccaggagagactctggaggcccccatgtgacagag
gtggagggcaccagcttctgacaggcatcatcagctggggggaggagtggtgocatgaagggaag
tatggcatctacaccaagtgctccgctatgtgaactggatcaaggagaagaccaagctgacctga
(SEQ ID NO:8)

Fig.8

9/23

CS06-FL-NA

atgcagaggggtcaacatgatcatggctgagtgccctggcctcatcaccatctgcctgctgggctac
ctgctgtctgctgagtgcaactgtcttccctggaccaatgagaatgccaacaagatccctcaacaggccc
aagagatacaactctggcaaaactggaggagtttgccagggaacctggagaggggagtgcatggag
gagaagtgtcctttgaggaggccaggagggtctttgagaacactgagcgcaccactgagttctgg
aaacagtatgtggatggggaccagtgtgagtgcaacccctgcctgaatgggggcagctgcaaggat
gacatcaacagctatgagtgctgggtgcccctttggctttgagggaagaactgtgagctggatgtg
acctgcaacatcaagaatggcagatgtgagcagttctgcaagaactctgctgacaacaagggtggg
tgctcctgcactgagggctaccgctggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgccattc
ccatgtggcagagtctctgtgagccagaccagcaagctcaccagggtgagactgtgttccctgat
gtggactatgtgaacagcactgaggctgaaacctccctggacaacatcaccagagcaccagagc
ttcaatgacttaccagagtgggtgggaggagaggatgccaagcctggccagttcccctggcaagt
gtgctcaatggcaagggtggatgccttctgtgggggctccattgtgaatgagaagtggattgtcact
gctgcccactgtgtggagactgggggtcaagatcactgtgggtggctggggagcacaacattgaggag
actgagcacactgagcagaagcgcaatgtgatcaggatcatccccaccacaactacaatgctgcc
atcaacaagtacaacctgacattgccctgctggagctggatgagcccctggctcctcaacagctat
gtgacccccatctgcattgctgacaaggagtacaccaacatcttccctcaagtttggtctggctat
gtctctggctggggcagagtgttccacaaaggcaggtctgccctgggtgctccagtacctgagagt
cccctgggtggacagggccacctgcctcttgagcaccaagttcaccatctacaacaacatgttctgt
gctggcttccatgagggaggaagagacagctgccagggggactctggaggaccccatgtcactgag
gtggagggcacctccttccctcactggcatcatctcctggggagaggagtgtgccatgaaaggcaaa
tatggcatctacaccaaagtctccagatatgtcaactggatcaaggagaagaccaagctgacctga
(SEQ ID NO: 9)

Fig.9

10/23

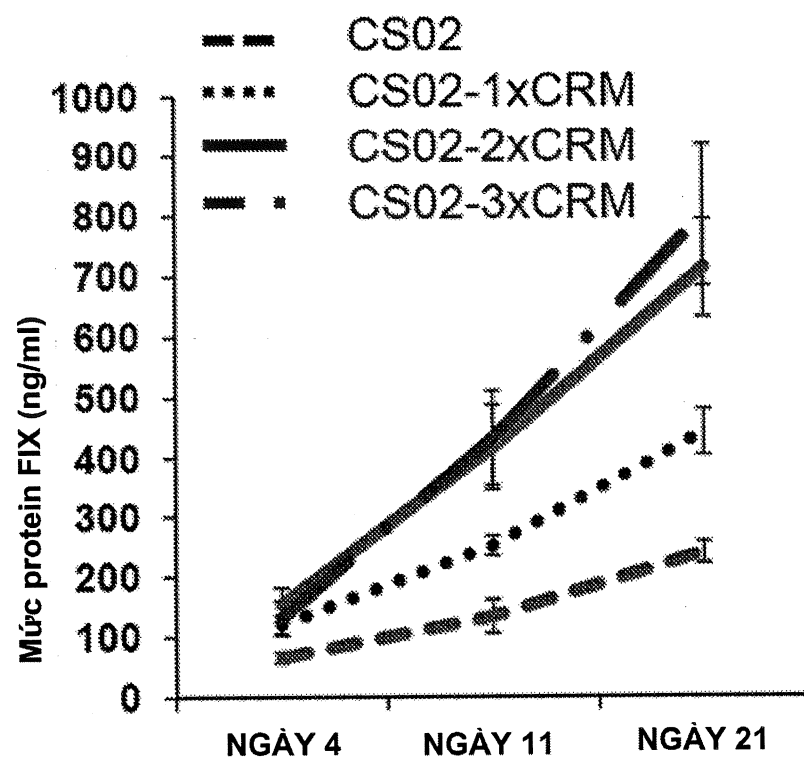


Fig.10

11/23

FIX-MP-AA

YNSG KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
 PCLNGGCKD DINSYECWCP FGFEGKNCCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD
 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSQTSLT RAETVFPDVS
 YVNSTEAEI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNIRII
 PHHYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS
 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSRY
 VNWIKEKTKL T (SEQ ID NO:10)

Fig.11A**FIX2-MP-AA**

ynsg kleefvqgnl erecmeecks feearevfen terttefwkq yvdtcnikn
 grceqfckns adnkvvcsct egyrlaenqk scepavpfpc grvsvsqtsk ltraetvfpd
 vdyvnsteae tildnitqst qsfndftrvv ggedakpgqf pwqvvlngkv dafcggsivn
 ekwivtaahc vetgvkitvv agehnieete hteqkrnvir iiphhynaa inkynhdial
 leldeplvln syvtpiciad keytniflkf gsgyvsgwgr vfhkgrsalv lqylrvplvd
 ratclrstkf tiynnmfcag fheggrdscq gdsaggphvte vegtsfltgi iswgeecamk
 gkygiytkvs ryvnwikekt klt (SEQ ID NO:11)

Fig.11B

12/23

FIXp-MP-AA

YNSG KLEEFVQGNL ERECMEEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD
NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSQTSLT RAETVFPDVA
YVNSTEAEI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNIRII
PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS
GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TLLSTKFTI YNNMFCAGFH
EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKKGK YGIYTKVSRV
VNWIKEKTKL T (SEQ ID NO:12)

Fig.12

CS02-MP-NA

tacaactcag gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggga gtgcatggag
 gagaagtgca gctttgagga ggccagagag gtgtttgaga acacagagag gaccacagag
 ttctggaagc agtatgtgga tggagaccag tgtgagagca acccttgcct gaatggaggc
 agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cttttggctt tgagggcaag
 aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
 aactcagctg acaacaaagt ggtgtgtagc tgcacagagg gctacagact ggctgagaac
 cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtcagt gtcccagacc
 agcaagctga ccagagctga gacagtgttc cctgatgtgg actatgtgaa tagcacagag
 gctgagacca tcctggacaa catcaccagc agcaccagc ccttcaatga cttcaccaga
 gttgtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcagggtgg gctgaatggc
 aaagtggatg ctttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gacagctgcc
 cactgtgtgg agacaggagt gaagatcaca gtggtggctg gagaacacaa tattgaggag
 acagagcaca cagagcagaa gaggaatgtc atcaggatta tccccacca caactacaat
 gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
 ctgaatagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
 aagtttggct caggctatgt gtcaggctgg ggcagagtgt tccacaaggg cagatcagcc
 ctggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gttgagcacc
 aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggagg cagagacagc
 tgccagggag actcaggagg accccatgtg acagaagtgg agggcaccag cttcctgaca
 ggcatcatca gctggggaga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacacaaaa
 gtgagcagat atgtgaactg gatcaaggag aaaaccaagc tgacctga
 (SEQ ID NO:13)

Fig.13

CS03-MP-NA

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggg gtgcatggag
 gagaagtgca gctttgagga ggccagggaa gtgtttgaga aactgagag gaccactgag
 ttctggaagc agtatgtgga tggggaccag tgtgagagca acccttgccct gaatgggggc
 agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctgggtgcc cttttggctt tgagggcaag
 aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
 aactctgctg acaacaaagt ggtgtgtagc tgcactgagg gctacagact ggctgagaac
 cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtctgt gtcccagacc
 agcaagctga ccagagctga gactgtgttc cctgatgtgg actatgtgaa tagcactgag
 gctgagacca tcctggacaa catcacccag agcacccagt ccttcaatga cttcaccaga
 gtgggtggggg gggaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggg gctgaatggc
 aaagtggatg ctttctgtgg gggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gactgctgcc
 cactgtgtgg agactggggg gaagatcact gtgggtggctg gggaacacaa tattgaggag
 actgagcaca ctgagcagaa gaggaatgtc atcaggatta tccccacca caactacaat
 gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
 ctgaatagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
 aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcagagtgt tccacaaggg caggtctgcc
 ctgggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gctgagcacc
 aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggggg cagagacagc
 tgccagggggg actctggggg ccccatgtg actgaagtgg agggcaccag cttcctgact
 ggcatcatca gctgggggga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacaccaa
 gtgagcaggt atgtgaactg gatcaaggag aaaaccaagc tgacctga
 (SEQ ID NO:14)

Fig.14

CS04-MP-NA

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggga gtgcatggag
 gagaagtgca gctttgagga ggccagggag gtgtttgaga acacagagag gaccacagag
 ttctggaagc agtatgtgga tggtgaccag tgtgagagca acccttgcct gaatggaggc
 agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctgggtgcc cttttggctt tgagggcaag
 aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca ggtgtgagca gttctgcaag
 aactctgctg acaacaaggt ggtgtgtagc tgcacagagg gctacagact ggctgagaac
 cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca gagtgtctgt gtcccagacc
 agcaagctga ccagagctga gacagtgttc cctgatgtgg actatgtgaa cagcacagag
 gctgagacca tcctggacaa catcaccagc agcaccagc cttcaatga cttcaccaga
 gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaggtggt gctgaatggc
 aaggtggatg ctttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gacagctgcc
 cactgtgtgg agacaggagt gaagatcaca gtggtggctg gagagcacia cattgaggag
 acagagcaca cagagcagaa gaggaatgtg atcaggatca tccctcacca caactacaat
 gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gcctctggtg
 ctgaacagct atgtgacccc tatctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttcctg
 aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcagagtgt tccacaaggg caggtctgcc
 ctggtgctgc agtacctgag agtgcccctg gtggacagag ccacctgcct gttgagcacc
 aagttcacca tctacaacaa catgtttctgt gctggcttcc atgagggagg cagagacagc
 tgccaggggtg actctggagg accccatgtg acagaggtgg agggcaccag cttcctgaca
 ggcacatcat gctggggaga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacacaaaa
 gtgagcagat atgtgaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacctga
 (SEQ ID NO:15)

Fig.15

CS05-MP-NA

```

tacaactctg gcaagctgga ggagtttgtg cagggcaacc tggagagggg gtgcatggag
gagaagtgca gctttgagga ggccagggag gtgtttgaga acactgagcg caccactgag
ttctggaagc agtatgtgga tggggaccag tgtgagagca acccctgcct gaatgggggg
agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgcctgggtgcc cctttggctt tgagggcaag
aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggcc gctgtgagca gttctgcaag
aactctgctg acaacaaggt ggtgtgctct tgcactgagg gctaccgcct ggctgagaac
cagaagagct gtgagcctgc tgtgcccttc ccctgtggca ggggtgtctgt gagccagacc
agcaagctga ccagggtga gactgtgttc cctgacgtgg actatgtgaa cagcactgag
gctgagacca tcctggacaa catcaccagc agcaccaga gcttcaatga cttcaccagg
gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcagggtgt gctgaatggc
aagggtgatg ccttctgtgg aggcagcatt gtgaatgaga agtggattgt gaccgctgcc
cactgtgtgg agactggagt gaagatcact gtggtggctg gggagcacia cattgaggag
acagagcaca cagagcagaa gcgcaatgtg atcaggatca tccccacca caactacaat
gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gccctggtg
ctgaacagct acgtgacccc catctgcatt gcagacaagg agtacaccaa catcttcctg
aagtttggct ctggctatgt gtctggctgg ggcagggtgt tccacaaggg caggctctgc
ctggtgctgc agtacctgag ggtgcccctg gtggacaggg ccacctgcct gctgagcacc
aagttcacca tctacaacaa catgttctgc gctggcttcc atgaggagg aagggacagc
tgccagggag actctggagg ccccatgtg acagaggtgg agggcaccag cttcctgaca
ggcatcatca gctgggggga ggagtgtgcc atgaaggga agtatggcat ctacaccaa
gtgtcccgct atgtgaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacctga
(SEQ ID NO:16)

```

Fig.16

CS06-MP-NA

```

tacaactctg gcaaactgga ggagtttgtc cagggcaacc tggagagggg gtgcatggag
gagaagtgtc cctttgagga ggccagggag gtctttgaga aactgagcg caccactgag
ttctggaac agtatgtgga tggggaccag tgtgagtcca acccctgcct gaatgggggc
agctgcaagg atgacatcaa cagctatgag tgctggtgcc cctttggctt tgagggcaag
aactgtgagc tggatgtgac ctgcaacatc aagaatggca gatgtgagca gttctgcaag
aactctgtctg acaacaaggt ggtgtgtctc tgcactgagg gctaccgcct ggctgagaac
cagaagagct gtgagcctgc tgtgccattc ccatgtggca gagtctctgt gagccagacc
agcaagctca ccagggctga gactgtgttc cctgatgtgg actatgtgaa cagcactgag
gctgaaacca tcctggacaa catcaccagc agcaccaga gcttcaatga cttcaccaga
gtggtgggag gagaggatgc caagcctggc cagttcccct ggcaagtggg gctcaatggc
aaggtggatg ccttctgtgg gggctccatt gtgaatgaga agtggattgt cactgctgcc
cactgtgtgg agactggggg caagatcact gtggtggctg gggagcaca cattgaggag
actgagcaca ctgagcagaa gcgcaatgtg atcaggatca tccccacca caactacaat
gctgccatca acaagtacaa ccatgacatt gccctgctgg agctggatga gccctggtc
ctcaacagct atgtgacccc catctgcatt gctgacaagg agtacaccaa catcttctc
aagtttggct ctggctatgt ctctggctgg ggcagagtgt tccacaaagg caggtctgcc
ctggtgtctc agtacctgag agtgcccctg gtggacaggg ccacctgcct cttgagcacc
aagttcacca tctacaacaa catgttctgt gctggcttcc atgagggagg aagagacagc
tgccaggggg actctggagg accccatgtc actgaggtgg agggcacctc cttcctcact
ggcatcatct cctggggaga ggagtgtgcc atgaaaggca aatatggcat ctacaccaaa
gtctccagat atgtcaactg gatcaaggag aagaccaagc tgacctga
(SEQ ID NO:17)

```

Fig.17

18/23

FIX-PPP-NA

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
ggatatctac tcagtgtga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt
ctgaatcggc caaagagg (SEQ ID NO:18)

CS02-PPP-NA

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgcagcaga gtgcacagt ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
ctgaacaggc ccaagaga (SEQ ID NO:19)

CS03-PPP-NA

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
ctgaacaggc ccaagaga (SEQ ID NO:20)

CS04-PPP-NA

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgcacagt ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
ctgaacaggc ccaagaga (SEQ ID NO:21)

CS05-PPP-NA

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
ctgaaccgcc ccaagcgc (SEQ ID NO:22)

CS06-PPP-NA

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tcccctggcc tcatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtc ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc
ctcaacaggc ccaagaga (SEQ ID NO:23)

Fig.18

19/23

FIX-SP-NA

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
ggatatctac tcagtgtga atgt (SEQ ID NO:24)

CS02-SP-NA

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgc (SEQ ID NO:25)

CS03-SP-NA

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgc (SEQ ID NO:26)

CS04-SP-NA

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgc (SEQ ID NO:27)

CS05-SP-NA

atgcagaggg tgaacatgat tatggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgc (SEQ ID NO:28)

CS06-SP-NA

atgcagaggg tcaacatgat catggctgag tcccctggcc tcatcaccat ctgcctgctg
ggctacctgc tgtctgctga gtgc (SEQ ID NO:29)

Fig.19

FIX-PP-NA

acagtttttc ttgatcatga aaacgccaac aaaattctga atcggccaaa gagg
(SEQ ID NO:30)

CS02-PP-NA

acagtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga acaggcccaa gaga
(SEQ ID NO:31)

CS03-PP-NA

actgtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga acaggcccaa gaga
(SEQ ID NO:32)

CS04-PP-NA

acagtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga acaggcccaa gaga
(SEQ ID NO:33)

CS05-PP-NA

actgtgttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctga accgccccaa gcgc
(SEQ ID NO:34)

CS06-PP-NA

actgtcttcc tggaccatga gaatgccaac aagatcctca acaggcccaa gaga
(SEQ ID NO:35)

Fig.20

21/23

FIX-PPP-AA

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKR (SEQ ID NO:36)

Fig.21**FIX-SP-AA**

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAEC (SEQ ID NO:37)

Fig.22**FIX-PP-AA**

TV FLDHENANKI LNRPKR (SEQ ID NO:38)

Fig.23**CRM8**gggggaggctgctggtgaatattaaccaaggtcaccccagttatcggaggagcaaacaggggctaag
tccac (SEQ ID NO:39)**Fig.24**

CS06-CRM8.3-ssV

ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggacgaccaaaggtcgcccgacgcc
 cgggctttgccccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggccaactccatcac
 tagggggttcctgagtttaaaacttcgtcgacgggggaggctgctggtgaatattaaccaaggtcacc
 cagttatcggaggagcaaacaggggctaagtccaccgggggaggctgctggtgaatattaaccaagg
 tcacccagttatcggaggagcaaacaggggctaagtccaccgggggaggctgctggtgaatatta
 ccaaggtcacccagttatcggaggagcaaacaggggctaagtccaccgggggaggctggtgaggatgt
 tgagtaagatggaaaactactgatgacccttgagagacagagtattaggacatgtttgaacagggg
 ccgggcatcagcaggtagctctagaggatccccgtctgtctgcacatttcgtagagcgagtgttcc
 gatactctaactctccctaggcaaggttcataatttgtgtaggttacttattctccttttgttgactaa
 gtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcagggatcagcagcctgggttgaaggag
 ggggtataaaagcccccttcaccaggagaagccgtcacacagactaggcgcgccctaaggtaagttgg
 cgccgtttaagggtggttgggtgggtggttattaatgtttaattaccttttttacaggcctgaaga
 tctgccaccatgcagaggggtaacatgatcatggctgagtcacctggcctcatcaccatctgcctgc
 tgggctacctgctgtctgctgagtgactgtcttctggaccatgagaatgccaacaagatcctcaa
 caggcccaagagatacaactctggcaactggaggagtttgtccaggggcaacctggagagggagtgc
 atggaggagaagtgtcctttgaggaggccaggagggtctttgagaacactgagcgaccactgagt
 tctggaaacagtatgtggatggggaccagtgtgagtcacacccctgctgaatgggggagctgcaa
 ggatgacatcaacagctatgagtgctggtgccccctttggctttgaggggcaagaactgtgagctggat
 gtgacctgcaacatcaagaatggcagatgtgagcagttctgcaagaactctgctgacaacaaggtgg
 tgtgctcctgactgagggctaccgctggctgagaaccagaagagctgtgagcctgctgtgccatt
 cccatgtggcagagtctctgtgagccagaccagcaagctcaccagggtgagactgtgttccctgat
 gtggactatgtgaacagcactgagggtgaaaccatcctggacaacatcacccagagcaccagagct
 tcaatgacttcaccagagtgggtgggaggagaggatgccaaagcctggccagttccccctggcaagtgg
 gctcaatggcaaggtggatgccttctgtgggggctccattgtgaatgagaagtggtgactgct
 gcccactgtgtggagactggggtaagatcactgtgggtggctggggagcacaacattgaggagactg
 agcacactgagcagaagcgcaatgtgatcaggatcatccccaccacaactacaatgctgccatcaa
 caagtacaaccatgacattgccctgctggagctggatgagccccctggctcctcaacagctatgtgacc
 cccatctgcattgctgacaaggagtacaccaacatcttccctcaagtttggctctggctatgtctctg
 gctggggcagagtgttccacaaaggcagggtctgccccctggctccagtagctgagagtccccctgg
 ggacagggccacctgacctcttgagcaccaggttcacatctacaacaacatgttctgtgctggcttc
 catgaggggaggaagagacagctgccagggggactctggaggacccccatgtcactgaggtggaggga
 cctccttccctactggcatcatctcctggggagaggagtgtgccatgaaaggcaaatatggcatcta
 caccaaagtctccagatatgtcaactggatcaaggagaagaccaagctgacctgatgagcatgccta
 gagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgccccctccccctg
 gccttcccttgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcg
 cattgtcTgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggatt
 gggagacaatagcaggcatgctgggggaattaattaagctcgcaaggaacccctagtgtgaggtt

(Tiếp tục)

Fig.25A

(Tiếp tục)

ggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgagggcgggcgaccaaaggctgccccgacgcccg
 ggctttgccccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgggccaagacgatttaaa
 tgacaagcttgcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattcc
 acacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaattgagtgagctaactcaca
 ttaattgcggttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcggtgccagctgcattaatgaa
 tcggccaacgcgcggggagagggcggtttgcgattggggcgctcttccgcttccctcgctcactgactc
 gctgcgctcggtcggttcggctgcgggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatcc
 acagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgta
 aaaaggcccggttgctggcggtttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaataatcgacg
 ctcaagtcagaggtggcgaaaccgcaggaactataaagataaccaggcggtttccccctggaagctcc
 ctcggtcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggataacctgtccgctttctcccttcgggaa
 gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcggttcgctccaagct
 gggctgtgtgcacgaaccccccggttcagccccgacggctgccccttatccggtaactatcgctcttgag
 tccaaccgggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcga
 ggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagt
 atttgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggc
 aaacaaaccaccgctggttagcggtgggttttttggtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaag
 gatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtta
 agggattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagt
 tttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgagg
 cacctatctcagcgatctgtctatttcggttcacatagttgcctgactccccgtcggtgtagataac
 tacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataaccgcgagacccacgctcaccg
 gctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgagcaagtggtcctgcaactt
 tatccgcctccatccagtcctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagtttaata
 tttgcgcaacggttggttgccattgctacaggcatcggtgtgacgctcgctggtttggtatggcttca
 ttcagctccgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtta
 gctccttcgggtcctccgatcggtgtcagaagtaagttggccgagtggttatcactcatggttatggc
 agcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactca
 accaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgacccagttgctccttgcccggtcaatacgggata
 ataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacggttcttcggggcgaaaact
 ctcaaggatcttaccgctggttgagatccagttcgatgtaaccactcggtgcacccaactgatcttca
 gcatcttttactttcaccagcggttctggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgcccgaaaaaagg
 gaataaggcgacacggaaatggtgaatactcactcttccctttttcaatattattgaagcattta
 tcagggttattgtctcatgagcggatacatatgtgaatgtatttagaaaaataaacaataggggtt
 ccgcgacattttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacct
 ataaaaataggcggtatcacgaggccctttcggtctcgcgcggtttcggtgatgacgggtgaaaacctctg
 acacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggtgcccgggagcagacaagcccgt
 cagggcgcgctcagcggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattg
 tactgagagtgaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcag
 gcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttggaaggcgatcggtgcgggcctcTtcgctatta
 cgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcaggggtttccagct
 cagcagcttgtaaaacgacggccagtgaaattcctcgagatttaaatgacg

(SEQ ID NO:40)

Fig.25B