



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109562191 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780023787.5

(22)申请日 2017.04.13

(30)优先权数据

62/323,336 2016.04.15 US

62/331,807 2016.05.04 US

62/428,866 2016.12.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/027396 2017.04.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/180857 EN 2017.10.19

(71)申请人 宾夕法尼亚州大学信托人

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 L.王 J.M.威尔逊 J.A.西德拉恩

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 黄登高 罗文锋

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/86(2006.01)

C07K 14/755(2006.01)

权利要求书2页 说明书31页

序列表62页 附图29页

(54)发明名称

用于治疗血友病A的基因疗法

(57)摘要

提供了可用于治疗血友病A的组合物和方案。所述组合物包括具有驱动人因子VIII表达的转甲状腺素蛋白增强子和启动子的重组腺相关病毒(rAAV)。

1. 一种可用作血友病A的肝脏定向治疗剂的重组腺相关病毒(rAAV), 所述rAAV包含AAV衣壳和包装在其中的载体基因组, 所述载体基因组包含:

- (a) AAV 5' 反向末端重复(ITR) 序列;
- (b) 转甲状腺素蛋白增强子(enTTR);
- (c) 转甲状腺素蛋白(TTR) 启动子;
- (d) 编码具有凝血功能的人因子VIII的编码序列;
- (e) AAV 3' ITR。

2. 根据权利要求1所述的rAAV, 其中所述人因子VIII是B结构域缺失的因子VIII SQ, 其长度为约1457个氨基酸残基。

3. 根据权利要求1或2所述的rAAV, 其中(d)的所述编码序列选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的rAAV, 其中所述rAAV衣壳为hu37衣壳。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的rAAV, 其中所述AAV5' ITR和/或AAV3' ITR来自AAV2。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的rAAV, 其中所述载体基因组还包含大小为约75bp的polyA。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的rAAV, 其中所述载体基因组的大小为约5千碱基至约5.5千碱基。

8. 一种适合向血友病A患者施用的水性悬浮液, 所述悬浮液包含水性悬浮液体和约 1×10^{12} GC/mL至约 1×10^{14} GC/mL的可用作血友病A的肝脏定向治疗剂的重组腺相关病毒(rAAV), 所述rAAV具有AAV衣壳并且具有包装在其中的载体基因组, 所述载体基因组包含:

- (a) AAV 5' 反向末端重复(ITR) 序列;
- (b) 转甲状腺素蛋白增强子(enTTR);
- (c) 转甲状腺素蛋白(TTR) 启动子;
- (d) 编码具有凝血功能的人因子VIII的编码序列;
- (e) AAV 3' ITR。

9. 根据权利要求8所述的悬浮液, 其中所述悬浮液适合静脉内注射。

10. 根据权利要求8或9所述的悬浮液, 其中所述悬浮液还包含溶解在所述水性悬浮液体中的表面活性剂、防腐剂和/或缓冲液。

11. 一种用根据权利要求1所述的rAAV治疗患有血友病A的患者的方法, 其中所述rAAV为在水性悬浮液中约 1×10^{12} 至约 1×10^{14} 个基因组拷贝(GC)/kg进行递送, 其中所述GC如基于oqPCR所确定的那样计算。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述rAAV在稍后的时间点再次施用。

13. 根据权利要求1所述的rAAV, 其中所述载体基因组包含SEQ ID NO:13的nt 1-5110。

14. 根据权利要求13所述的rAAV, 其中所述rAAV衣壳为hu37衣壳。

15. 根据权利要求1所述的rAAV, 其中

所述enTTR为SEQ ID NO:5;

所述TTR启动子为SEQ ID NO:7;

所述编码序列为SED ID NO:2。

16. 根据权利要求15所述的rAAV, 其中所述AAV 5' ITR为SEQ ID NO:11, 并且所述AAV 3' ITR为SEQ ID NO:12。

17. 根据权利要求15或16中任一项所述的rAAV, 其还包含polyA序列SEQ ID NO:10。

18. 根据权利要求15至17中任一项所述的rAAV, 其中所述rAAV衣壳为hu37衣壳。

用于治疗血友病A的基因疗法

[0001] 以引用的方式结合以电子形式提交的材料

[0002] 申请人在此将以引用的方式结合以电子形式提交的序列表材料。该文件标记为“UPN-16-7798PCT_ST25.txt”。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2016年4月15日提交的美国临时专利申请62/323,336、2016年5月4日提交的美国临时专利申请62/331,807和2016年12月1日提交的美国临时专利申请62/428,866的优先权。这些申请以引用的方式整体并入本文。

[0005] 引言

[0006] 本申请涉及可用于用以治疗血友病A的基因疗法的实施方案。

[0007] 发明背景

[0008] 血友病A (HA或HemA) 是最常见的遗传性出血性病症。根据美国疾病控制和预防中心,血友病A在5,000个活产婴儿约有1例。美国约有20,000人患有血友病A。血友病A通常是血友病B的四倍,超过一半的血友病A患者患有严重的血友病。HA由因子VIII (FVIII) 缺乏引起,并且非常适合基因置换方法,主要是因为FVIII水平的适度增加(大于正常水平的1%)可以改善严重的出血表型。腺相关病毒 (AAV) 载体目前显示出最大的基因疗法应用前景,因为它们具有优异的安全概况和从有丝分裂后组织如肝脏中引导长期转基因表达的能力。

[0009] 然而,由于人FVIII (“hFVIII”) 的独特分子和生物化学特性,将AAV载体用于HA基因治疗提出了新的挑战。与其他类似大小的蛋白质相比,hFVIII的表达效率非常低。FVIII分子的生物工程化引起FVIII表达的改善。例如,辅因子活性不需要的hFVIII B结构域已被删除(BDD)并被短的14个氨基酸接头(FVIII SQ)替代,导致mRNA水平比全长野生型FVIII增加17倍并且分泌蛋白增加30%。参见,Ward,Natalie J.等人“Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression.”Blood 117.3(2011): 798-807和美国专利9,393,323,还公布为WO 2011/005968。重组FVIII-BDD-SQ在临床上用作替代重组FVIII产物(Refacto,Wyeth Pharma;Xyntha,Pfizer)。

[0010] AAV介导的HA基因疗法基因转移的另一个障碍是FVIII编码序列的大小,其在7.0kb时远远超过AAV载体的正常包装能力。已经报道了将大表达盒包装到AAV载体中,但是这是一种高度不一致的过程,导致载体粒子的收率低,感染性降低并且需要可能诱导肝损伤的高剂量。参见,例如Sarkar,R.,W.Xiao和H.H.Kazazian.“A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype.”Journal of Thrombosis and Haemostasis 1.2(2003):220-226;和McIntosh,Jenny等人,“Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant.”Blood 121.17(2013):3335-3344。

[0011] 因此,HA治疗需要更高效的AAV.FVIII载体。

发明内容

[0012] 本文所述的实施方案涉及一种AAV基因疗法载体,其用于在静脉内施用该载体后将正常人FVIII递送至有此需要的受试者,产生出血缺陷的临床有意义的长期,可能是10年或更长时间的校正。受试者患者群体是患有中度至重度血友病A的患者。预期的载体剂量旨在递送约3%至10%或5%的FVIII血液水平。AAV载体治疗的目标在于将重症血友病A患者转变为中度或轻度血友病A,从而减轻这些患者对于进行预防方案的需要。

[0013] 本文所述的基因疗法产品为目前可用于管理严重血友病A的预防性方法提供了多种重要优势。首先,研究产品的临床前结果与其实现因子VIII循环水平为正常水平的10%或更高一致,这在目标患者群体中具有变革性。其次,该产品将导致有效恒定的因子VIII血液水平,避免目前在施用外源因子时见到的谷水平。第三,仅需要单次施用,就可以降低对于频繁静脉内施用的要求达延长的一段时间,可能长达十年或更长时间。

[0014] 本申请提供复制缺陷型腺相关病毒(AAV)用于将人因子VIII(hFVIII或hF8)基因递送至被诊断患有血友病A的患者(人类受试者)的肝细胞的用途。使用重组AAV载体(rAAV)来递送hFVIII基因(“rAAV.hFVIII”)应该具有肝脏的趋向性(例如,携带AAVhu.37或AAVrh.10衣壳的rAAV),并且hFVIII转基因应该通过肝脏特异性表达控制元件来控制。在一个实施方案中,表达控制元件包括以下一种或多种:转甲状腺素蛋白增强子(enTTR);转甲状腺素蛋白(TTR)启动子;和polyA信号。在另一个实施方案中,表达控制元件包括以下一种或多种:缩短的 α 1-微球蛋白/双库尼茨前体(bikunin precursor,ABPS)增强子和enTTR;转甲状腺素蛋白(TTR)启动子;和polyA信号。在一个实施方案中,表达控制元件包括以下一种或多种:转甲状腺素蛋白增强子(enTTR); α 1抗胰蛋白酶(A1AT)启动子;和polyA信号。在另一个实施方案中,表达控制元件包括以下一种或多种:ABPS增强子和enTTR;A1AT启动子;和polyA信号。这类元件在本文中进一步描述。

[0015] 在一个实施方案中,hFVIII基因编码因子VIII的B结构域缺失(BDD)形式,其中B结构域被短氨基酸接头替代(FVIII-BDD-SQ,本文也称为hFVIII)。在一个实施方案中,FVIII-BDD-SQ蛋白序列示于SEQ ID NO:3中。在一个实施方案中,FVIII-BDD-SQ编码序列示于SEQ ID NO:1中。在一个实施方案中,hFVIII的编码序列经密码子优化以在人中表达。此类序列可以与天然hFVIII编码序列(SEQ ID NO:1)共有低于80%同一性。在一个实施方案中,hFVIII编码序列是SEQ ID NO:2中所示的序列。

[0016] 另一方面,本文提供一种适合对血友病A患者施用的水性悬浮液,其包含本文所述的rAAV。在一些实施方案中,该悬浮液包含水性悬浮液体和约 1×10^{12} 至约 1×10^{14} 个rAAV基因组拷贝(GC)/mL。在一个实施方案中,悬浮液适合静脉内注射。在其他实施方案中,悬浮液还包含溶解在水性悬浮液中的表面活性剂、防腐剂和/或缓冲液。

[0017] 在另一个实施方案中,本文提供一种用如本文所述的rAAV治疗患有血友病A的患者的方法。在一个实施方案中,将约 1×10^{11} 至约 3×10^{13} 个rAAV基因组拷贝(GC)/kg患者体重以水性悬浮液递送至患者。

[0018] 治疗的目标是通过基于rAAV的肝脏定向基因疗法作为可行方法在功能上替代患者的缺陷性hFVIII以治疗该疾病并改善对当前疗法的应答。本申请中描述的实施方案部分地基于研发治疗组合物和允许安全递送有效剂量的方法;和改善的制造方法,以满足人受试者中对有效剂量的纯化生产要求。

附图说明

[0019] 图1是pAAV.E03.P3.hF8co-SQ.PA75顺式质粒的示意图。

[0020] 图2是pAAV.E12.P3.hF8co-SQ.PA75顺式质粒的示意图。

[0021] 图3是pAAV.E03.P2.hF8co-SQ.PA75顺式质粒的示意图。

[0022] 图4是pAAV.E12.P2.hF8co-SQ.PA75顺式质粒的示意图。

[0023] 图5显示在FVIII KO小鼠中产生抗体之前hFVIII活性的变化。FVIII KO小鼠用来自42种增强子/启动子组合之一的表达hFVIIIco-SQ的AAVrh10载体的 10^{10} GC进行静脉内施用。将每种增强子排列(表示为E01-E14,表1)与TBG-S1(来自每个分组的左群组)、A1AT(中间群组)和TTR(右群组)启动子组合。分别通过COATEST测定和抗hFVIII IgG ELISA确定hFVIII活性(A)和抗hFVIII IgG滴度(B)。对载体施用后第2周分离的小鼠血浆执行测定。对小鼠单独绘图,显示活性的平均值 \pm SEM值($n=10$ 只/组)。

[0024] 图6显示在FVIII KO小鼠中静脉内施用载体后第8周的hFVIII活性和抗hFVIII抗体滴度。FVIII KO小鼠用来自42种增强子/启动子组合之一的表达hFVIIIco-SQ的AAVrh10载体的 10^{10} GC进行静脉内施用。将每种增强子排列(表示为E01-E14,表1)与TBG-S1(来自每个分组的左群组)、A1AT(中间群组)和TTR(右群组)启动子组合。分别通过COATEST测定和抗hFVIII IgG ELISA确定hFVIII活性(A)和抗hFVIII IgG滴度(B)。对载体施用后第8周分离的小鼠血浆执行测定。对小鼠单独绘图,显示活性的平均值 \pm SEM值($n=10$ 只/组)。

[0025] 图7显示静脉内施用42种增强子/启动子组合载体随时间推移后FVIII KO小鼠中的hFVIII活性。FVIII KO小鼠用来自42种增强子/启动子组合之一的表达hFVIIIco-SQ的AAVrh10载体的 10^{10} GC进行静脉内施用。将每种增强子排列(表示为E01-E14,表1)与TBG-S1(来自每个分组的左群组)、A1AT(中间群组)和TTR(右群组)启动子组合。通过对载体施用后每两周分离的小鼠血浆进行COATEST测定确定hFVIII活性。对小鼠单独绘图,绘出平均值 \pm SEM值($n=10$ 只/组)。

[0026] 图8显示静脉内施用42种增强子/启动子组合载体随时间推移后FVIII KO小鼠中的抗hFVIII抗体滴度。FVIII KO小鼠用来自42种增强子/启动子组合之一的表达hFVIIIco-SQ的AAVrh10载体的 10^{10} GC进行静脉内施用。将每种增强子排列(表示为E01-E14,表1)与TBG-S1(左群组)、A1AT(中间群组)和TTR(右群组)启动子组合。通过对每两周分离的小鼠血浆进行抗hFVIII IgG ELISA确定抗hFVIII IgG滴度。对小鼠单独绘图($n=10$ 只/组)。

[0027] 图9提供通过各种载体衣壳静脉内施用E06.TTR.hFVIIIco-SQ基因组后hFVIII活性和抗hFVIII抗体滴度的比较。对FVIII KO小鼠静脉内施用来自E06.TTR的表达hFVIIIco-SQ的AAVrh10、AAV8、AAV9、AAVhu37或AAVrh64R1载体的 10^{10} GC。每两周收集血浆并分别通过COATEST测定和抗hFVIII IgG ELISA确定hFVIII活性(A)和抗hFVIII IgG滴度(B)。对小鼠单独绘图,显示活性的平均值 \pm SEM值($n=10$ 只/组)。

[0028] 图10提供hFVIII在初步非人灵长类动物(NHP)研究中的表达。(A)对两只雄性恒河猴静脉内施用 3×10^{12} GC/kg的AAVrh10.ABP2.TBG-S1.hFVIIIco-SQ。(B)对两只雄性食蟹猴静脉内施用 3×10^{12} GC/kg的AAVhu37.ABP2.TBG-S1.hFVIIIco-SQ。每周或每两周对猕猴放血以评价hFVIII表达和针对hFVIII转基因的抗体的存在。通过ELISA(实线)测量血浆中的hFVIII表达,并将值表示为平均值 \pm SEM。还通过ELISA(虚线)确定血浆中的抗hFVIII IgG滴度。

[0029] 图11提供食蟹猴中hFVIII的表达。对五只雄性恒河猴静脉内施用 1.2×10^{13} GC/kg的AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75或AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75中的一种。每两周对猕猴放血以通过ELISA评价血浆中的hFVIII表达,并将值表示为平均值 \pm SEM。

[0030] 图12显示食蟹猴中抗hFVIII抗体的产生。对五只雄性恒河猴静脉内施用 1.2×10^{13} GC/kg的AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75或AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75中的一种。每两周对猕猴放血以评价针对hFVIII转基因的抗体的存在。通过ELISA评价血浆中的抗hFVIII IgG滴度。统计分析示于图14中。

[0031] 图13提供制造方案。

[0032] 图14提供图12中所示的抗FVIII抗体产生的时间事件分析。使用对数秩 (Mantel-Cox) 检验在AAVrh.10和AAVhu.37之间看到统计学上显著的差异。

[0033] 图15显示由AAVrh10、AAV8、AAV3B和AAV5载体(第一次载体注射)实现的rhCG表达水平的比较。

[0034] 图16A-16D显示在不同时间点肝脏中的rhCG载体DNA拷贝数(AAVrh10,图16A; AAV8,图16B; AAV3B,图16C; AAV5,图16D)。

[0035] 图17A-17B显示再次施用(第二次载体注射)表达rhAFP的AAV3B(图17A)或AAV5(图17B)载体后的rhAFP水平。

[0036] 图18A-18B显示肝脏中的rhAFP载体基因组拷贝数(图18A, AAV3B.TBG.rhAFP;图18B, AAV5.TBG.rhAFP)。

[0037] 图19显示猕猴中的差异AAV Nab反应。

[0038] 图20A-20B提供静脉内注射了表达hFVIIIco的AAVrh10增强子/启动子载体的小鼠的肝脏中的肝脏载体GC(图20A)或RNA转录物水平(图20B),如第6.3.8节所述。

[0039] 图21提供静脉内注射表达hFVIIIco的AAVrh10增强子/启动子载体的小鼠的肌肉(右腓肠肌)、右睾丸、胰腺、右肾、脾、右肺和心脏中的hFVIII RNA转录物水平,如第6.3.8节所述。

[0040] 图22是显示在以 3×10^{12} GC/kg单次静脉内注射AAVhu37TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75后,在食蟹猴(35个月)中人FVIII的长期稳定表达的图。

[0041] 图23是显示图22的猕猴中的肝酶水平(ALT,U/mL,正方形;AST,U/mL,圆圈)的图。

[0042] 图24是显示针对AAVhu.37衣壳的中和抗体(Nab)应答的图。

[0043] 图25是hFVIIIco序列(SEQ ID NO:2)对hFVIII天然(SEQ ID NO:1)序列的比对。

具体实施方式

[0044] 本申请中描述的实施方案涉及复制缺陷型腺相关病毒(AAV)将人因子VIII(hFVIII)基因递送至诊断患有血友病A(HA)的患者(人受试者)的肝细胞的用途。用于递送hFVIII基因(“rAAV.hFVIII”)的重组AAV载体(rAAV)应该具有肝脏的趋向性(例如,携带AAVhu.37或AAVrh.10衣壳的rAAV),并且hFVIII转基因应该是由肝特异性表达控制元件控制。在一个实施方案中,表达控制元件包括以下一种或多种:转甲状腺素蛋白(TTR)增强子;转甲状腺素蛋白(TTR)启动子;和polyA信号。这类元件在本文中进一步描述。

[0045] 如本文所用,“AAVhu.37衣壳”是指具有GenBank登录号:AAS99285的氨基酸序列SEQ ID NO:17的hu.37,其以引用的方式并入本文中。允许自该编码序列的一些变异,其可以包括与AAS99285和US 2015/0315612(其以引用的方式并入本文中)中的参考氨基酸序列具有约99%同一性的序列(即,自该参考序列的变异小于约1%)。已经描述了产生衣壳、其编码序列的方法,以及产生rAAV病毒载体的方法。参见,例如,Gao等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100(10),6081-6086(2003)和US 2015/0315612。

[0046] 如本文所用,“AAVrh10衣壳”是指具有GenBank登录号:AA088201的氨基酸序列SEQ ID NO:18的rh.10,其以引用的方式并入本文中。允许自该编码序列的一些变异,其可以包括与AA088201和US2013/0045186A1中的参考氨基酸序列具有约99%同一性的序列(即,自参考序列的变异小于约1%),条件是保持用于亲和捕获纯化的配体结合位点的完整性,并且序列的变化基本上不改变用于离子交换树脂纯化的衣壳的pH范围(如本文进一步讨论)。已经描述了产生衣壳、其编码序列的方法,以及产生rAAV病毒载体的方法。参见,例如,Gao等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100(10),6081-6086(2003)和US 2013/0045186A1。

[0047] 如本文所用,术语“NAb滴度”是产生多少中和抗体(例如,抗AAV Nab)的量度,该中和抗体中和其靶向表位(例如,AAV)的生理效应。抗AAV Nab滴度可以如例如Calcedo,R.等人,Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses.Journal of Infectious Diseases,2009.199(3):第381-390页中所述进行测量,该文献以引用的方式并入本文中。

[0048] 在氨基酸序列的上下文中,术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比相同”是指两个序列中的残基在一致地比对时相同。可以容易地确定蛋白质、多肽、约32个氨基酸、约330个氨基酸或其肽片段或相应的核酸序列编码序列的全长上的氨基酸序列的百分比同一性。合适的氨基酸片段长度可以是至少约8个氨基酸,并且可以是至多约700个氨基酸。通常,当提及两个不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“相似性”时,参考“比对”序列确定“同一性”、“同源性”或“相似性”。“比对”序列或“比对”是指多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列,与参考序列相比,其通常含有缺失或额外地碱基或氨基酸的校正。使用多种公开或可商购获得的多序列比对程序中的任一种执行比对。对于氨基酸序列,可利用序列比对程序,例如“Clustal Omega”、“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。通常,这些程序中的任何程序都在默认设置下使用,但是本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。或者,本领域的技术人员可以利用另一种算法或计算机程序,该算法或计算机程序至少提供由参考算法和程序提供的同一性或比对水平。参见,例如,J.D.Thomson等人,Nucl.Acids.Res.,“A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”,27(13):2682-2690(1999)。

[0049] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指与所关注的基因邻接的表达控制序列和反式或远距离起作用以控制所关注的基因的表达控制序列。

[0050] “复制缺陷型病毒”或“病毒载体”是指重组、合成或人工病毒粒子,其中含有所关注的基因的表达盒包装在病毒衣壳或包膜中,其中同样包装在病毒衣壳或包膜内的任何病毒基因组序列是复制缺陷的;即,它们不能产生子代病毒体,但保留感染靶细胞的能力。在一个实施方案中,病毒载体的基因组不包括编码复制所需酶的基因(基因组可以被工程化成“无肠的”-仅含有所关注的转基因,其侧翼是扩增和包装人工基因组所需的信号),但这

些基因可以在生产期间供应。因此,认为用于基因疗法是安全的,因为除了存在复制所需的病毒酶之外,不会发生由于子代病毒体引起的复制和感染。

[0051] 应注意,术语“一个”或“一种”是指一个/种或多个/种。因此,术语“一个”(或“一种”)、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。

[0052] 词语“包括”、“包含(comprise)”和“包含(comprising)”应该是包含在内而不是排他性地解释。单词“由...组成(consist)”、“由.....组成(consisting)”及其变体应该排他性地解释,而不是包含在内。虽然说明书中的各种实施方案是使用“包含”语言呈现的,但在其他情况下,相关实施方案也旨在使用“由...组成”或“基本上由.....组成”语言来解释和描述。

[0053] 除非另有说明,否则本文所用的术语“约”是指与给定参考值相差10%。

[0054] 除非在本说明书中另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员并且参考公开的文本通常理解的含义相同的含义,其为本领域技术人员提供了对本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0055] 5.1基因疗法载体

[0056] 在一个方面,提供带有人凝血因子8(hF8或hFVIII)基因的重组腺相关病毒(rAAV)载体用于基因疗法。rAAV.hFVIII载体应该具有肝脏的趋向性(例如,携带AAVhu.37或AAVrh.10衣壳的rAAV),并且hFVIII转基因应该由肝脏特异性表达控制元件控制。将载体在适于在人受试者中输注的缓冲液/载剂中配制。缓冲液/载剂应包含防止rAAV粘附到输注管但不干扰体内rAAV结合活性的组分。

[0057] 5.1.1.rAAV.hFVIII载体

[0058] 5.1.1.1.hFVIII序列

[0059] 人凝血因子VIII作为具有结构域结构A1-A2-B-A3-C1-C2的大的330-kDa糖蛋白产生,其中A结构域和C结构域具有内部序列同源性并且与因子V(FV)的A结构域和C结构域具有约40%的序列同一性,它们共有相同的域结构。占总序列的38%的B结构域对于促凝血活性是不必要的。其中缺失B结构域(BDD)并被短的14个氨基酸接头替代的FVIII(FVIII-SQ)在临床上用作替代重组FVIII产物,并且已经显示导致mRNA水平相对于全长野生型FVIII增加17倍并且在分泌蛋白中增加30%。参见,McIntosh等人,单次外周静脉内施用编码新的人因子VIII变体的rAAV载体后的FVIII的治疗水平(Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant),Blood,121(17):3335-44(2013年2月)和Ward等人,人因子VIII的密码子优化导致高水平表达(Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression),Blood,117(3):798-807(2011年1月),它们以引用的方式并入本文中。

[0060] 在一个实施方案中,hFVIII基因编码SEQ ID NO:3中所示的hFVIII蛋白,其是缺失B结构域(BDD)并被短的14个氨基酸接头替代的FVIII(FVIII-BDD-SQ)。因此,在一个实施方案中,hFVIII转基因可包括但不限于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2提供的一种或多种序列,这些序列提供在随附的序列表中,其以引用的方式并入本文。SEQ ID NO:1提供天然人FVIII-BDD-SQ的cDNA。SEQ ID NO:2提供人FVIII-BDD-SQ的工程化cDNA,其已被密码子优化以在人中表达(本文有时称为hFVIIIco-SQ或hFVIIIco-BDD-SQ)。应理解,在一些实施方案

中,本文对hFVIII的提及可以指hFVIII-BDD-SQ天然或密码子优化的序列。可选地或另外地,基于网络或可商购获得的计算机程序以及基于服务的公司可以用于将氨基酸序列反向翻译成核酸编码序列,包括RNA和/或cDNA。参见,例如,backtranseq by EMBOSS, www.ebi.ac.uk/Tools/st/; Gene Infinity (www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html); ExPasy (www.expasy.org/tools/)。旨在涵盖编码所述hFVIII多肽序列的所有核酸,包括已经优化用于在期望的靶受试者中表达的核酸序列(例如,通过密码子优化)。在一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:1的天然hFVIII编码序列共有至少95%的同一性。在另一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:1的天然hFVIII编码序列共有至少90%、85%、80%、75%、70%或65%的同一性。在一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:1的天然hFVIII编码序列共有约77%的同一性。在一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列是SEQ ID NO:2。在另一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的hFVIII编码序列共有至少99%、97%、95%、90%、85%、80%、75%、70%或65%的同一性。在另一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列是SEQ ID NO:19。在另一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:19的hFVIII编码序列共有至少90%、85%、80%、75%、70%或65%的同一性。在又一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的hFVIII编码序列共有40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在又一个实施方案中,编码hFVIII的核酸序列与SEQ ID NO:19的hFVIII编码序列共有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。参见Ward等人,人因子VIII cDNA的密码子优化导致高水平表达,Blood, 117(3):798-807(2011年1月),其的关于FVIII-SQ的各种变体,包括密码子优化的变体的讨论以引用的方式并入本文。

[0061] 密码子优化的编码区可以通过各种不同的方法设计。该优化可以使用可以在线获得的方法(例如, GeneArt)、公开的方法或提供密码子优化服务的公司例如作为DNA2.0 (Menlo Park, CA) 执行。例如,在国际专利公布WO 2015/012924中描述了一种密码子优化方法,其以引用的方式并入本文。还参见例如美国专利公布2014/0032186和美国专利公布2006/0136184。适当地,改进产品的开放阅读框(ORF)的整个长度。然而,在一些实施方案中,可以仅改变ORF的片段。通过使用这些方法中的一种,可以将频率应用于任何给定的多肽序列,并产生编码多肽的密码子优化的编码区的核酸片段。

[0062] 许多选择可用于执行密码子的实际变化或用于合成如本文所述设计的密码子优化的编码区。可以使用本领域普通技术人员熟知的标准和常规分子生物学操作执行这类修

饰或合成。在一种方法中,通过标准方法合成一系列长度各自为80至90个核苷酸且跨越期望序列的长度的互补低聚核苷酸对。合成这些低聚核苷酸对,使得它们在退火时形成80至90个碱基对的双链片段,其含有粘性末端,例如,合成该对中的每个低聚核苷酸以延伸3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基超出与该对中的其他核苷酸互补的区域。设计每对低聚核苷酸的单链末端以与另一对低聚核苷酸的单链末端一起退火。使低聚核苷酸对退火,然后使这些双链片段中的约5至6个通过粘性单链末端一起退火,然后将它们接合在一起并克隆到标准细菌克隆载体中,例如,可从Thermo Fisher Scientific Inc.购得的**TOPO®**载体。然后通过标准方法对构建体进行测序。制备这些构建体中的几种,其由接合在一起的80至90个碱基对片段的5至6个片段组成,即约500个碱基对的片段,使得整个期望的序列在一系列质粒构建体中表示。然后用适当的限制酶切割这些质粒的插入物并将其接合在一起以形成最终的构建体。然后将最终构建体克隆到标准细菌克隆载体中,并测序。其他方法对于技术人员来说是显而易见的。此外,基因合成在商业上很容易获得。

[0063] 5.1.1.2.rAAV载体

[0064] 因为hFVIII在肝脏中天然表达,所以期望使用显示肝脏趋向性的AAV。在一个实施方案中,供应衣壳的AAV是AAVrh.37。在另一个实施方案中,供应衣壳的AAV是AAVrh.10。然而,可以使用许多具有肝脏趋向性的rAAV载体中的任何一种。

[0065] 在下文实施例中描述的具体实施方案中,基因疗法载体是在称为rAAVhu.37.TTR.hFVIII的转甲状腺素蛋白启动子控制下表达hFVIII转基因的AAVhu.37载体。外部AAV载体组分是血清型hu.37,T=1二十面体衣壳,由3种AAV病毒蛋白VP1、VP2和VP3以比率1:1:10的60个拷贝组成。衣壳含有单链DNA rAAV载体基因组。

[0066] rAAVhu.37.TTR.hFVIII基因组含有侧翼为两个AAV反向末端重复序列(ITR)的hFVIII转基因。hFVIII转基因包括增强子、启动子、hFVIII编码序列和多腺苷酸化(polyA)信号。这些控制序列与hFVIII基因序列“可操作地连接”。可以将表达盒工程化到质粒上,该质粒用于产生病毒载体。

[0067] ITR是在载体生产期间负责基因组复制和包装的遗传元件,并且是产生rAAV所需的唯一病毒顺式元件。将表达盒包装到AAV病毒粒子中所需的最小序列是AAV 5'和3' ITR,其可以与衣壳具有相同的AAV来源,或者不同的AAV来源(以产生AAV假型)。在一个实施方案中,使用来自AAV2的ITR序列或其缺失版本(Δ ITR)。然而,可以选择来自其他AAV源的ITR。当ITR的来源来自AAV2并且AAV衣壳来自另一个AAV来源时,所得载体可以称为假型。通常,AAV载体的表达盒包含AAV 5' ITR、hFVIII编码序列和任何调节序列以及AAV 3' ITR。然而,这些元件的其他构造可能是合适的。已经描述了缩短版本的5' ITR,称为 Δ ITR,其中删除了D-序列和终端分解位点(trs)。在其他实施方案中,使用全长AAV 5'和3' ITR。在一个实施方案中,5' ITR序列示于SEQ ID NO:11中。在一个实施方案中,3' ITR序列示于SEQ ID NO:12中。

[0068] hFVIII编码序列的表达由肝特异性启动子驱动。由于hFVIII转基因的大小,期望使用相对小尺寸的启动子。本文所述的示例性质粒和载体使用转甲状腺素蛋白(TTR)(本文也称为P3)启动子或其修饰形式。TTR启动子序列示于SEQ ID NO:7中。或者,可以使用其他肝特异性启动子,诸如甲状腺素结合球蛋白(TBG)(在本文中也称为P1)启动子或其缩短版本TBG-S1,其序列示于SEQ ID NO:8中。另一种合适的启动子是 α 1抗胰蛋白酶(A1AT),或其

上的修饰版本(在本文中也称为P2),如SEQ ID NO:9所示。其他合适的启动子包括人白蛋白(Miyatake等人,J.Virol.,71:5124-32(1997)),humAlb;和乙型肝炎病毒启动子(Sandig等人,Gene Ther.,3:1002-9(1996)。参见,例如,The Liver Specific Gene Promoter Database,Cold Spring Harbor,rulai.schl.edu/LSPD,其以引用的方式并入。尽管不太理想,但可以使用其他启动子,诸如病毒启动子、组成型启动子、可调节的启动子[参见例如W0 2011/126808和W0 2013/04943]或可对生理信号有应答的启动子可以用于本文所述的载体中。

[0069] 在一个实施方案中,表达控制序列包括一种或多种增强子。在一个实施方案中,包括转甲状腺素蛋白(enTTR)(来自转甲状腺素蛋白的100bp增强子序列),该序列示于SEQ ID NO:5中。参见,Wu等人,Molecular Therapy,16(2):280-289,2008年2月,其以引用的方式并入本文。在另一个实施方案中,包括En34增强子(来自人载脂蛋白肝脏控制区域的34bp增强子),其示于SEQ ID NO:4中。在另一个实施方案中,包括ABPS(来自 α 1-微球蛋白/双库尼茨前体[ABP]的100bp远端增强子缩短成42bp的版本)增强子。这样的序列示于SEQ ID NO:6中。在另一个实施方案中,存在一种以上的增强子。此类组合可以包括本文所述的任何增强子的一个以上拷贝,和/或多于一种类型的增强子。在各种实施方案中,增强子以以下组合之一存在:

[0070] 表1:增强子组合

		净长			
组合名称		En34	ABPS	EnTTR	(bp)
[0071]	E01	1	0	0	34
	E02	0	1	0	42
	E03	0	0	1	100
	E04	1	1	0	76
	E05	0	1	1	142
	E06	1	0	1	134
	E07	2	0	0	68
	E08	0	2	0	84
	E09	0	0	2	200
	E10	1	1	1	176
	E11	2	0	1	168
[0072]	E12	0	2	1	184
	E13	1	2	0	118
	E14	2	1	0	110

[0073] 在一个实施方案中,增强子按以下顺序组合:5'-EnTTR-ABPS-En34-启动子-3'。在另一个实施方案中,增强子按以下顺序组合:5'-启动子-EnTTR-ABPS-En34-3'。在一个实施方案中,表达控制序列包括enTTR。在另一个实施方案中,表达控制序列包括两个ABPS拷贝和1个enTTR拷贝。

[0074] 除启动子外,表达盒和/或载体还可以含有其他适当的转录起始、终止、增强子序列和高效的RNA加工信号。这类序列包括剪接和多腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及在期望时增强编码产物分泌的序列。在一个实施方案中,包括聚腺苷酸化(polyA)信号以介导hFVIII mRNA转录物的终止。可用于本文的polyA信号是人工polyA,其大小约为75bp

(PA75), 如SEQ ID NO:10所示。其他合适的polyA序列的实例包括例如牛生长激素、SV40、兔β珠蛋白和TK polyA等。

[0075] 在一个实施方案中, 选择调节序列使得总rAAV载体基因组的大小为约5千碱基至约5.5千碱基。在另一个实施方案中, 选择调节序列使得总rAAV载体基因组的大小为约5.1kb。在另一个实施方案中, 选择调节序列使得总rAAV载体基因组的大小为约5.2kb。在另一个实施方案中, 总rAAV载体基因组的大小小于5kb。

[0076] 在一个实施方案中, 载体基因组是SEQ ID NO:13的nt 1至nt 5110。在一个实施方案中, 载体基因组是SEQ ID NO:14的nt 1至nt 5194。在一个实施方案中, 载体基因组是SEQ ID NO:15的nt 1至nt 5138。在另一个实施方案中, 载体基因组是SEQ ID NO:16的nt 1至nt 5222。

[0077] 5.1.2.rAAV.hFVIII制剂

[0078] 在一个实施方案中, rAAV.hFVIII载体以药物组合物形式提供, 该药物组合物包含水性载剂、赋形剂、稀释剂或缓冲剂。在一个实施方案中, 该缓冲剂为PBS。在一个具体的实施方案中, rAAV.hFVIII制剂是含有悬浮在含有在TMN200 (200mM氯化钠、1mM氯化镁、20mM Tris, pH 8.0) 中的0.001% Pluronic F-68的水溶液中的有效量的rAAV.hFVIII载体的悬浮液。然而, 已知各种合适的溶液, 包括包含以下一种或多种的溶液: 缓冲盐水、表面活性剂和调节至相当于约100mM氯化钠 (NaCl) 至约250mM氯化钠的离子强度的生理学相容的盐或盐的混合物或调节至等效离子浓度的生理学相容盐。

[0079] 例如, 本文提供的悬浮液可以含有NaCl和KCl。pH可以在6.5至8.5, 或7至8.5, 或7.5至8的范围内。合适的表面活性剂或表面活性剂的组合可以选自泊洛沙姆, 即由侧翼为两个聚氧乙烯 (聚 (环氧乙烷)) 亲水链的聚氧丙烯 (聚 (环氧丙烷)) 的中心疏水链组成的非离子三嵌段共聚物; Solutol HS 15 (Macrogol-15羟基硬脂酸); Labrasol (聚氧辛酸甘油酯); 聚氧10油基醚; Tween (聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯); 乙醇和聚乙二醇。在一个实施方案中, 制剂含有泊洛沙姆。这些共聚物通常用字母“P” (对于泊洛沙姆) 命名, 后面跟三个数字: 前两个数字×100给出聚氧丙烯芯的近似分子量, 最后一个数字×10给出聚氧乙烯含量百分比。在一个实施方案中, 选择泊洛沙姆188。表面活性剂的含量可以高达悬浮液的约0.0005%至约0.001%。在另一个实施方案中, 将载体悬浮在含有180mM氯化钠、10mM磷酸钠、0.001%泊洛沙姆188, pH7.3的水溶液中。

[0080] 在一个实施方案中, 该制剂适用于人受试者并且是静脉内施用的。在一个实施方案中, 制剂通过推注注射经外周静脉递送。在一个实施方案中, 制剂通过输注在约10分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。在一个实施方案中, 制剂通过输注在约90分钟 (±10分钟) 内经外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约20分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约30分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约40分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约50分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约60分钟 (±5分钟) 内经15外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约70分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。在另一个实施方案中, 制剂通过输注在约80分钟 (±5分钟) 内经外周静脉递送。然而, 可以根据需要或期望调节该时间。可以使用任何合适的方法或途径来施用如本文所述的含有AAV的组合物, 并且任选地, 与本文所述的hFVIII的

AAV介导的递送结合共同施用其他活性药物或疗法。施用途包括例如全身、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内和其他肠胃外施用途。

[0081] 在一个实施方案中,制剂可以含有例如约 1.0×10^{11} 个基因组拷贝/千克患者体重(GC/kg)至约 1×10^{14} GC/kg、约 5×10^{11} 个基因组拷贝/千克患者体重(GC/kg)至约 3×10^{13} GC/kg,或约 1×10^{12} 至约 1×10^{14} GC/kg,如通过例如M.Lock等人,Hum Gene TherMethods.2014年4月;25(2):115-25.doi:10.1089/hgtb.2013.131.增刊2014年2月14日中所述的oqPCR或数字液滴PCR(ddPCR)测量,该文献以引用的方式并入本文。在一个实施方案中,rAAV.hFVIII制剂是含有至少 1×10^{13} 个基因组拷贝(GC)/mL或更高的悬浮液,如通过例如M.Lock等人,上文所述的oqPCR或数字液滴PCR(ddPCR)所测量。

[0082] 为了确保从施用到患者的AAV.hFVIII剂量中除去空衣壳,在载体纯化期间,例如使用本文讨论的方法,将空衣壳与载体粒子分离。在一个实施方案中,使用2016年12月9日提交的国际专利申请PCT/US2016/066013和2016年4月13日提交且题为“Scalable Purification Method for AAVrh.10”的美国专利申请62/322,055中描述的方法,从空衣壳中纯化含有包装的基因组的载体粒子,这些专利申请以引用的方式并入本文中。简言之,描述了两步纯化方案,其从rAAV生产细胞培养物的澄清的浓缩上清液中选择性地捕获并分离含有基因组的rAAV载体粒子。该方法利用在高盐浓度下执行的亲和捕获方法,然后在高pH下执行阴离子交换树脂方法,以提供基本上不含rAAV中间体的rAAV载体粒子。类似的纯化方法可用于基于AAVhu.37的载体。其他纯化方法描述于例如美国专利申请62/266,347、62/266,357、62/322,071、62/266,351、62/322,083、62/266,341和62/322,098中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0083] 虽然可以使用任何常规的制造方法,但本文(以及国际专利申请PCT/US2016/066013)所述的方法产生载体制剂,其中50%至70%的粒子具有载体基因组,即50%至70%的全粒子。因此,对于 1.6×10^{12} GC/kg的示例性剂量,总粒子剂量将在 2.3×10^{12} 个粒子和 3×10^{12} 个粒子之间。在另一个实施方案中,所提出的剂量高一半对数,或为 5×10^{12} GC/kg,并且总粒子剂量将在 7.6×10^{12} 个粒子和 1.1×10^{13} 个粒子之间。在一个实施方案中,制剂的特征在于rAAV原液的“空”与“全”的比率为1或更小,优选小于0.75,更优选0.5,优选小于0.3。

[0084] 简言之,在一个实施方案中,提供一种从AAV衣壳中间体分离AAV病毒粒子的方法,其包括:对包含重组AAV病毒粒子和AAV衣壳中间体的混合物执行快速液相色谱,其中AAV病毒粒子和AAV中间体结合到在约10.0的pH下平衡的阴离子交换树脂并执行盐梯度,同时对于约260和约280的紫外吸光度监测洗脱液,其中AAV全衣壳是在A260/A280的比率到达拐点时洗脱的部分中收集。

[0085] 在一个实施方案中,该方法还包括(a)混合包含重组AAV病毒粒子和AAV衣壳中间体的悬浮液和包含20mM至50mM Bis-Tris丙烷(BTP)和pH为约10.0的缓冲液A;(b)将(a)的悬浮液加载到强阴离子交换树脂柱上;(c)用缓冲液1%B洗涤加载的阴离子交换树脂,该缓冲液1%B包含离子强度为10mM至40mM NaCl的盐和BTP,pH为约10.0;(d)对加载并洗涤的阴离子交换树脂施加增加的盐浓度梯度,其中盐梯度相当于约10mM至约40mMNaCl;和(e)从在相当于至少70mMNaCl的盐浓度下获得的洗脱液中收集rAAV粒子,其中rAAV粒子从AAV中间体中纯化至少约90%。在一个实施方案中,这通过基因组拷贝数确定。

[0086] 在一个实施方案中,当盐浓度相当于大于约50mM NaCl时,中间体从阴离子交换树

脂洗脱。在又一个实施方案中,将缓冲液A进一步与NaCl混合至终浓度为1M,以形成或制备缓冲液B。在另一个实施方案中,盐梯度具有等于10mM至约190mM NaCl的离子强度。洗脱梯度可以是1%缓冲液B至约19%缓冲液B。任选地,含有阴离子交换树脂的容器是整料柱,并且其中缓冲液A、缓冲液B和盐梯度以约60倍柱体积。

[0087] 当原液中的rAAV粒子占原液中的rAAV的至少约75%至约100%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少99%时,rAAV粒子(包装的基因组)的原液或制剂“基本上不含”AAV空衣壳(和其他中间体),并且“空衣壳”小于原液或制剂中的rAAV的约1%、小于约5%、小于约10%、小于约15%。

[0088] 在另一个实施方案中,rAAV粒子的平均收率为至少约70%。这可以通过确定加载到柱上的混合物中的滴度(基因组拷贝数)和最终洗脱液中存在的量来计算。另外,这些可以基于q-PCR分析和/或SDS-PAGE技术如本文所述的那些技术或本领域已经描述的那些技术来确定。

[0089] 例如,为了计算空粒子和全粒子的含量,将所选样品(例如,碘克沙醇梯度纯化的制剂,其中GC的数量=粒子的数量)的VP3带体积相对于加载的GC粒子绘图。所得线性方程($y=mx+c$)用于计算测试制品峰的带体积中的粒子数。然后将每20 μ L加载的粒子数(pt)乘以50,得到粒子(pt)/mL。Pt/mL除以GC/mL得到粒子与基因组拷贝数的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL得到空的pt/mL。空的pt/mL除以pt/mL并乘以100得到空粒子的百分比。

[0090] 通常,用于测定空衣壳和具有包装的基因组的AAV载体粒子的方法是本领域已知的。参见,例如Grimm等人,Gene Therapy (1999) 6:1322-1330;Sommer等人,Molec. Ther. (2003) 7:122-128。为了测试变性衣壳,该方法包括对经处理的AAV原液执行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,其由能够分离三种衣壳蛋白的任何凝胶如在缓冲液中含有3%至8%Tris-乙酸盐的梯度凝胶组成,然后运行凝胶直至样品材料分离,并将凝胶印迹到尼龙或硝酸纤维素膜上,优选尼龙上。然后将抗AAV衣壳抗体用作结合变性衣壳蛋白的一次抗体,优选抗AAV衣壳单克隆抗体,最优选B1抗AAV-2单克隆抗体(Wobus等人,J. Virol. (2000) 74:9281-9293)。然后使用二次抗体,其结合一次抗体并含有检测与一次抗体的结合的手段,更优选含有与其共价键合的检测分子的抗IgG抗体,最优选与辣根过氧化物酶共价连接的抗体绵羊抗小鼠IgG抗体。检测结合的方法用于半定量确定一次抗体和二次抗体之间的结合,优选能够检测放射性同位素发射、电磁辐射或比色变化的检测方法,最优选化学发光检测试剂盒。例如,对于SDS-PAGE,可以从柱级分中取出样品并在含有还原剂(例如,DTT)的SDS-PAGE加载缓冲液中加热,并在预流延梯度聚丙烯酰胺凝胶(例如,Novex)上解析衣壳蛋白。可以使用SilverXpress (Invitrogen, CA) 根据制造商的说明执行银染色。在一个实施方案中,可以通过定量实时PCR (Q-PCR) 测量柱级分中AAV载体基因组(vg)的浓度。将样品稀释并用DNase I (或另一种合适的核酸酶) 消化以除去外源DNA。在灭活核酸酶后,将样品进一步稀释并使用引物和对引物之间的DNA序列具有特异性的TaqManTM荧光探针扩增。在Applied Biosystems Prism 7700序列检测系统上测量每个样品达到确定荧光水平所需的循环数(阈值循环,Ct)。使用含有与AAV载体中所含序列相同的序列的质粒DNA以在Q-PCR反应中产生标准曲线。从样品获得的循环阈值(Ct)值用于通过将其标准化为质粒标准曲线的Ct值来确定载体基因组滴度。也可以使用基于数字PCR的终点测定。

[0091] 在一个方面,本文提供了优化的q-PCR方法,其使用广谱丝氨酸蛋白酶,例如蛋白

酶K (诸如可从Qiagen商购获得)。更具体地讲,优化的qPCR基因组滴度测定与标准测定相似,除了在DNase I消化后,将样品用蛋白酶K缓冲液稀释并用蛋白酶K处理,然后加热灭活。适当地用蛋白酶K缓冲液稀释样品,其量等于样品大小。蛋白酶K缓冲液可以浓缩至2倍或更高。通常,蛋白酶K处理为约0.2mg/mL,但可以在0.1mg/mL至约1mg/mL之间变化。处理步骤通常在约55℃下执行约15分钟,但可以在较低温度(例如,约37℃至约50℃)下执行较长时间(例如,约20分钟至约30分钟),或在较高温度(例如,高达约60℃)下执行较短时间(例如,约5分钟至10分钟)。类似地,热灭活通常在约95℃下持续约15分钟,但温度可以降低(例如,约70℃至约90℃)并且时间可以延长(例如,约20分钟至约30分钟)。然后将样品稀释(例如,1000倍)并如标准测定中所述进行TaqMan分析。

[0092] 另外或替代地,可以使用液滴数字PCR(ddPCR)。例如,已经描述了通过ddPCR确定单链和自身互补AAV载体基因组滴度的方法。参见,例如M.Lock等人,Hu Gene Therapy Methods,Hum Gene Ther Methods.2014年4月;25(2):115-25.doi:10.1089/hgtb.2013.131.增刊,2014年2月14日。

[0093] 5.1.3制造

[0094] rAAV.hFVIII载体可以如图13所示的流程图所示制造。简言之,细胞(例如,HEK293细胞)在合适的细胞培养系统中繁殖并转染用于载体产生。然后可以收获rAAV.hFVIII载体,将其浓缩并纯化以制备大量载体,然后将其填充并在下游过程中完成。

[0095] 制造本文所述的基因疗法载体的方法包括本领域熟知的方法,诸如产生用于产生基因疗法载体的质粒DNA、产生载体和纯化载体。在一些实施方案中,基因疗法载体是AAV载体,并且产生的质粒是编码AAV基因组和所关注的基因的AAV顺式质粒、含有AAV rep和cap基因的AAV反式质粒以及腺病毒辅助质粒。载体产生过程可包括以下方法步骤,诸如细胞培养的开始、细胞的传代、细胞的接种、用质粒DNA转染细胞、转染后培养基更换为无血清培养基以及收获含有载体的细胞和培养基。含有收获载体的细胞和培养基在本文中称为粗细胞收获物。

[0096] 此后,可以对粗细胞收获物执行以下方法步骤,诸如载体收获物的浓缩、载体收获物的渗滤、载体收获物的微流化、载体收获物的核酸酶消化、微流化中间体的过滤、色谱纯化、超速离心纯化、通过切向流过滤进行缓冲液交换以及配制和过滤以制备大量载体。

[0097] 在一个实施方案中,生产质粒是SEQ ID NO:13中所示的质粒。在一个实施方案中,生产质粒是SEQ ID NO:14中所示的质粒。在一个实施方案中,生产质粒是SEQ ID NO:15中所示的质粒。在另一个实施方案中,生产质粒是SEQ ID NO:16中所示的质粒。

[0098] 在一个具体的实施方案中,用于制造基因疗法载体的方法描述于下文第8节中。

[0099] 5.2患者人群

[0100] 由于几个原因,严重或中度血友病A(HemA)患者是所选择的研究人群。严重血友病A患者被定义为具有小于1%的正常因子VIII(FVIII)活性,因此需要频繁输注FVIII以控制其出血素质。这对于进行正常生活而言代表着显著的负担,此外,FVIII的血液水平经历熟知的峰和谷模式,这不是最佳的。严重患者的FVIII血液水平低于1%的事实使得在施用rAAV.hFVIII后可以可靠地测量FVIII血液水平的低至中等增加。最近的临床试验证实了这种方法的有效性。中度HemA患者被定义为血液中的FVIII水平为1%至5%。

[0101] 作为治疗候选者的患者优选是被诊断患有中度/重度或严重的血友病A的≥18岁

的成年男性。在一个实施方案中,患者具有 $\leq 2\%$ 的正常水平的基线FVIII活性或记录的FVIII活性 $\leq 2\%$ 。在一些实施方案中,可以治疗 <18 岁的患者。治疗候选者包括每年至少发生3次需要用FVIII进行按需治疗的出血事件的受试者。其他治疗候选者包括用FVIII预防方案治疗的受试者。证明受试者适合治疗的其他标准包括至少100天的FVIII暴露史;没有关于外源性FVIII的抑制剂(中和抗体)的记录;对外源性FVIII或rAAV.FVIII载体组合物的任何组分没有已知的过敏反应。

[0102] 在治疗之前,应评估血友病A患者对用于递送hFVIII基因的AAV血清型(例如,AAVhu.37或AAVrh.10)的NAb。此类NAb可干扰转导效率并降低治疗功效。具有基线血清NAb滴度 $\leq 1:5$ 的血友病A患者是用rAAV.hFVIII基因疗法方案治疗的良好候选者。

[0103] 可以允许受试者在其护理医师的判断下在基因疗法治疗之前和同时继续其标准护理治疗(例如,重组FVIII疗法)。在替代方案中,医师可能更喜欢在施用基因疗法治疗之前停止标准护理疗法,并且任选地,在施用基因疗法后作为共同疗法恢复标准护理疗法。

[0104] 基因疗法方案的期望终点是在施用基因疗法治疗后,直至52周,FVIII活性从基线增加至正常水平的3%。在一个实施方案中,患者在用rAAV.hFVIII单独治疗和/或与使用辅助治疗组合治疗后实现期望的循环FVIII水平(例如,5%或更高)。在另一个实施方案中,患者在用rAAV.hFVIII单独治疗和/或与使用辅助治疗组合治疗后实现10%、15%、20%或更高的循环FVIII水平。在另一个实施方案中,患者在用rAAV.hFVIII单独治疗和/或与使用辅助治疗组合治疗后实现25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、95%或更高的循环FVIII水平。

[0105] 然而,具有以下一种或多种特征的患者可能会被其护理医师自行决定排除在治疗之外:

[0106] 1. 显著肝病(即,门静脉高压症)的病史。

[0107] 2. 显著的肝脏炎症或肝硬化。

[0108] 3. 活跃的乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)感染的证据。

[0109] 4. 人免疫缺陷病毒(HIV)感染史和以下任何一种情况:CD4+细胞计数 <350 个细胞/ mm^3 ,在第0天之前6个月内抗逆转录病毒疗法方案改变,或血浆病毒载量 >200 个拷贝/毫升,在2个不同的场合,如通过PCR测量。

[0110] 5. 抗AAVhu.37(或抗AAVrh10,在适当的情况下)中和抗体滴度 $>1:5$ 或 $\geq 1:10$ 。

[0111] 6. 参与(当前或以前)另一项基因疗法研究。

[0112] 7. 在筛选前3个月内参与另一项研究性医学研究。

[0113] 在其他实施方案中,护理医师可以确定这些身体特征(病史)中的一种或多种的存在不应排除如本文提供的治疗。

[0114] 5.3. 施用的剂量和途径

[0115] 在一个实施方案中,rAAV.hFVIII载体对每位患者以单剂量递送。在另一个实施方案中,rAAV.hFVIII载体对每位患者以多剂量递送。在进一步的实施方案中,rAAV.hFVIII载体对每位患者以两剂量递送。在一个实施方案中,向受试者递送最小有效剂量(MED)(通过本文实施例中描述的临床前研究确定)。如本文所用,MED是指实现5%正常因子VIII活性所需的rAAV.hFVIII剂量。

[0116] 通常,载体滴度是基于载体制剂的DNA含量确定的。在一个实施方案中,如实施例

中所述的定量PCR或优化的定量PCR用于确定rAAV.hFVIII载体制剂的DNA含量。在一个实施方案中,如实施例中所所述的数字液滴PCR用于确定rAAV.hFVIII载体制剂的DNA含量。在一个实施方案中,剂量为约 1×10^{11} 个基因组拷贝(GC)/kg体重至约 1×10^{13} GC/kg,包括端点。在一个实施方案中,剂量为 5×10^{11} GC/kg。在另一个实施方案中,剂量为 5×10^{12} GC/kg。在具体的实施方案中,对患者施用的rAAV.hFVIII的剂量为至少 5×10^{11} GC/kg、 1×10^{12} GC/kg、 1.5×10^{12} GC/kg、 2.0×10^{12} GC/kg、 2.5×10^{12} GC/kg、 3.0×10^{12} GC/kg、 3.5×10^{12} GC/kg、 4.0×10^{12} GC/kg、 4.5×10^{12} GC/kg、 5.0×10^{12} GC/kg、 5.5×10^{12} GC/kg、 6.0×10^{12} GC/kg、 6.5×10^{12} GC/kg、 7.0×10^{12} GC/kg或 7.5×10^{12} GC/kg。此外,复制缺陷型病毒组合物可以配制成剂量单位,以含有范围在约 1.0×10^9 GC至约 1.0×10^{15} GC内的量的复制缺陷型病毒。如本文所用,术语“剂量”可以指在治疗过程中递送给受试者的总剂量,或者以单次(多次)施用递送的量。

[0117] 在另一个实施方案中,该组合物在以后再次施用。任选地,允许多于一次再次施用。这种再次施用可以使用与本文所述相同类型的载体或不同的病毒载体。在一个实施方案中,在第一次施用后约6个月再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约1年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约2年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约3年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约4年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约5年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约6年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约7年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约8年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约9年再次施用载体。在另一个实施方案中,在第一次施用后约10年或更久再次施用载体。

[0118] 在一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的1%。在一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的2%。在一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的3%。在另一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的4%。在另一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的5%。在另一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高。

[0119] 在一些实施方案中,rAAV.hFVIII与一种或多种用于治疗血友病A的疗法组合施用,诸如施用重组FVIII。

[0120] 5.4. 测量临床目标

[0121] 可以通过如通过血浆因子VIII水平和因子VIII活性确定的转基因表达和活性来测量治疗功效的测量。可通过临床评估替代因子VIII需求和自发性出血事件的频率来确定对功效的进一步评估。这样的评估可以在施用产品后每周进行两次持续4周,从第6周到第12周每周进行,在第一年的剩余时间内每月进行,以及以6个月的间隔进行持续总共5年。

[0122] 施用后基因疗法载体的安全性可以通过在载体施用后直至约52周的多个时间点评估的不良事件的数量、体检中记录的变化和/或临床实验室参数来评估。虽然可以更早地,例如在约一周内观察到生理效应,但在一个实施方案中,约12周达到稳态水平表达水

平。以下评估可以在施用产品后每周进行两次持续4周,从第6周到第12周每周进行,在第一年的剩余时间内每月进行,以及以6个月的间隔进行持续总共5年。此类评估包括:

[0123] a. 体检

[0124] b. ECG

[0125] c. 生化评估:血清电解质、BUN、肌酐、钙、磷酸盐、总蛋白、白蛋白、LDH、CPK、AST、ALT、碱性磷酸酶、胆红素

[0126] d. 血液学评估:CBC和差异凝血概况

[0127] e. 验尿

[0128] f. 免疫学评估:

[0129] g. 对hu.37衣壳(或rh.10衣壳,视情况而定)和因子VIII的血清学应答

[0130] h. T细胞对hu.37衣壳(或rh.10衣壳,视情况而定)和因子VIII抗原的应答

[0131] i. 载体DNA的评估;血浆、尿液和唾液中的qPCR测量。

[0132] 与未患有血友病A的患者的hFVIII水平,即约100%的所谓的正常hFVIII水平相比,用rAAV.hFVIII施用实现的hFVIII增加可以评估为在约12周或在其他期望的时间点hFVIII的确定的百分比变化。在另一个实施方案中,将该变化与患者的基线hFVIII水平进行比较。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的3%。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的4%。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的5%。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的6%。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的7%。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的8%。在一个实施方案中,期望的功效是患者中因子VIII水平增加至正常水平的9%。在另一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的10%。在另一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的15%。在另一个实施方案中,剂量足以将患者中的因子VIII水平增加至正常水平的20%或更高。在一个实施方案中,凝固操作盘作为标准测试的一部分执行以推断FVIII活性。

[0133] 如本文所用,当患者表达足够水平的FVIII以实现这些临床终点中的至少一个时,本文中的rAAV.hFVIII载体用活性FVIII在功能上“替换”或“功能性补充”患者的缺陷型FVIII。在非血友病患者中实现低至正常野生型临床终点水平的约1%至低于100%的hFVIII的表达水平可以提供功能性替代。

[0134] 在一个实施方案中,可以在给药后早至约8小时至约24小时观察到表达。可以在给药后数天至数周内观察到上述一种或多种期望的临床效应。

[0135] 在rAAV.hFVIII施用后,可以评估长期(高达260周)安全性和功效。

[0136] 在一个方面,提供了用于将hFVIII基因产物递送至人患者的方案。该方案包括(a)递送包含如本文所述的表达盒的第一rAAV.hFVIII载体;(b)递送包含如本文所述的表达盒的第二rAAV.hFVIII载体,其中第一重组AAV载体或第二AAV载体具有AAV3B衣壳。AAV3B的序列示于SEQ ID NO:20和登记号AAB95452.1中。在一个实施方案中,第一或第二AAV载体中的另一种具有rh.10衣壳。在另一个实施方案中,第一或第二AAV载体中的另一种具有AAVhu.37衣壳。这些方案描述于国际专利申请PCT/US16/42472中,其以引用的方式并入本文中。

[0137] 本文所述的病毒载体可以用于制备药物,该药物用于将hFVIII递送至有此需要的受试者(例如,人受试者),向受试者供应功能性hFVIII,和/或用于治疗血友病A疾病。

[0138] 另一方面,提供如本文所述的rAAV.hFVIII载体用于治疗血友病A。在一个实施方案中,提供多剂量用于治疗血友病A。在另一方面,提供如本文所述的rAAV.hFVIII载体用于制造治疗血友病A的药物。

[0139] 在一个实施方案中,进行rAAV.hFVIII载体的第二次施用。在一个实施方案中,第二次施用的rAAV.hFVIII载体具有与第一次施用所提供的相同的AAV衣壳。在一个实施方案中,第二次施用的rAAV.hFVIII载体具有AAVrh.10衣壳。在另一个实施方案中,第二次施用的rAAV.hFVIII载体具有与第一剂量的载体不同的AAV衣壳。在一个实施方案中,第二次施用的rAAV.hFVIII载体具有肝脏的趋向性。在一个实施方案中,第二次施用的rAAV.hFVIII载体具有AAV3B衣壳。

[0140] 在另一方面,本发明涉及靶向患者的肝细胞。

[0141] 在一个方面,第一rAAV和第二rAAV的递送在时间上间隔至少约一个月,至少约三个月,或约1年至约10年。

[0142] 以下实施例仅是说明性的,并不意图限制本发明。

[0143] 实施例

[0144] 6.实施例1:临床前测试

[0145] 6.1hFVIII载体

[0146] 与人因子FIX(hFIX)不同,hFVIII的cDNA要大得多,并且需要进行调整以使该转基因适合标准AAV基因组。由于B结构域缺失(BDD)的hFVIII转基因是1457个氨基酸并且在包含其他必需的转录元件的情况下,AAV载体仍然处于其包装容量的极限下。因此,已经采取步骤来减小包括转基因表达控制元件的其他元件的大小。

[0147] 为了限制hFVIII在肝脏中的表达,同时保持元件的大小尽可能小,将几个强肝脏特异性启动子缩短并组合,其中组合最多三个肝脏特异性增强子序列,以产生42种增强子/启动子组合。在施用AAV载体后,评估FVIII KO小鼠中的转基因的hFVIII活性和免疫原性。

[0148] 6.1.1用于临床前测试的AAV载体产生

[0149] 产生42种含有增强子/启动子组合之一的质粒。使用以下三种增强子序列产生14种增强子组合:En34(来自人载脂蛋白肝脏控制区域的34bp增强子)、ABPS(来自 α 1-微球蛋白/双库尼茨前体[ABP]的100bp远端增强子缩短到42bp的版本)和EnTTR(来自转甲状腺素蛋白的100bp增强子序列)。由于总ITR-ITR大小和通过以下列顺序组合增强子,增强子组合的数量受到限制:5'-EnTTR-ABPS-En34-启动子-3'。表1.将14种增强子组合中的每一种插入以下三种启动子之一的上游:TBG-S1(P1,肝脏特异性甲状腺素结合球蛋白或TBG启动子的缩短版本)、A1AT(P2,修饰的SERINA1[α 1-抗胰蛋白酶]启动子)和TTR(P3,转甲状腺素蛋白启动子)。设计所得构建体以表达人因子VIII蛋白的密码子优化形式,其中B结构域缺失并被短的14个氨基酸的接头替代,hFVIIIco-SQ(SEQ ID NO:2)。

[0150] 所有AAV载体如Gao G、Lu Y、Calcedo R等人AAV血清型载体在肝脏定向基因转移到非人灵长类动物中的生物学(Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates.)Mol Ther.2006;13(1):77-87中所述,该文献以引用的方式并入本文。简言之,将来自42种增强子/启动子组合之一的表达hFVIII的质粒与

AAVrh10病毒衣壳一起包装。来自E06.TTR的表达hFVIII的质粒也包装在AAV8、AAV9、AAVhu37和AAVrh64R1病毒衣壳中。

[0151] 6.1.2载体的SDS-PAGE分析

[0152] 对该研究中使用的AAVrh10增强子/启动子组合载体批次进行通过如Lock M、Alvira M、Vandenberghe LH等人,大规模快速、简单且灵活地制造重组腺相关病毒载体(Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale.) Hum Gene Ther. 2010; 21 (10) :1259-1271所述的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行的纯度评估,该文献以引用的方式并入本文中。简言之,加载含有 5×10^9 GC的变性且还原的载体样品用于SDS-PAGE。在固定后通过SYPRO红宝石染色(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)对蛋白质进行染色,可视化,然后使用Syngene成像分析系统和GeneTool软件(Syngene, Frederick, MD)进行定量。计算衣壳(VP1、VP2和VP3蛋白质相对于总蛋白质指示)的纯度百分比。42种载体的纯度百分比范围为29% (AAVrh10.E12.P3)至100%,平均纯度为90% (数据未显示)。

[0153] 6.1.3小鼠

[0154] FVIII KO小鼠繁殖对自The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)获得,并且菌落保持在宾夕法尼亚大学的转化研究实验室中,在特定的无病原体条件下封装。所有动物程序和方案均由宾夕法尼亚大学的机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准。对6至12周龄的雄性FVIII KO以 10^{10} GC载体/小鼠静脉内注射到尾静脉中。将载体在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释,并注射100 μ l的载体稀释液。通过眼眶后出血每两周收集血浆到柠檬酸钠收集管中。

[0155] 6.1.4hFVIII活性的确定

[0156] 根据制造商的方案(DiaPharma, OH, USA),通过COATEST SP4试剂盒测量血浆中的hFVIII活性。在注射后第2周,小鼠显示hFVIII活性的大范围为0.12 IU/ml至2.12 IU/ml (图5)。

[0157] 五种构建体展示相对于其他而言显著增加的活性水平:E03.TTR、E05.A1AT、E05.TTR、E06.TTR和E12.A1AT (图5A)。在第2周观察到的hFVIII活性水平的变化是在产生针对转基因的抗体之前(图5B)。因此,存在活性水平的构建体依赖性显著差异。

[0158] 6.1.5小鼠血浆中抗hFVIII IgG的检测

[0159] 通过ELISA测量小鼠血浆中针对hFVIII的IgG抗体,其中除非另有说明,否则所有试剂均来自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。用在0.1M碳酸盐缓冲液(pH9.6)中的1 μ g/ml BDD-hFVIII-SQ (Xyntha, Wyeth Pharmaceuticals Inc., Dallas, TX, USA) 涂覆ELISA板,并在4°C下温育过夜。将孔用在PBS中的0.05%吐温20洗涤五次,并用在PBS中的5%脱脂乳(Bio Rad, Hercules, CA, USA)在室温下封闭1小时。除去封闭缓冲液后,将在5%脱脂乳中稀释的血浆样品添加到板中,并在室温下温育1小时。将来自幼稚小鼠的血浆样品用作对照。然后将板洗涤五次,并在非脂乳中以1:1000稀释度添加HRP缀合的抗小鼠IgG。在室温下温育90分钟后,将板洗涤8次并添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)用于检测。在室温下5分钟后使用2N硫酸停止反应,并使用BioTek μ Quant读板仪(Winooski, VT, USA)在450nm下读板。

[0160] FVIII KO小鼠在载体施用后第4周显示针对hFVIII的抗体产生,并且至第8周,在42个载体组中的大多数中的小鼠具有可检测的抗hFVIII IgG水平,其中hFVIII活性水平相

应降低(图6)。通过滴度定量的hFVIII活性和抗体产生的时间过程分别呈现在图7和图8中。超过50%的注射构建体E05.A1AT、E10.A1AT和所有具有E06增强子组合的启动子的小鼠在第8周时具有针对转基因的抗体。然而,在所有组中均未见到针对转基因的抗体。对于42个载体组中的6个(E11.TTR、E13.TBG-S1、E13.A1AT和使用E01的所有构建体),在第8周末检测到hFVIII抗体(图6),并且两组(E01.A1AT和E11.TTR)在整个12周研究期间没有可检测的抗体。还执行了用于产生针对hFVIII的抗体的事件分析的时间。用使用用以表达的E01.A1AT、E11.TTR、E01.TBG-S1、E11.A1AT和E13.TBG-S1的载体注射的小鼠具有最长的抗体表达时间,而含有E06.TTR、E06.A1AT、E05.A1AT、E09.TBG-S1和E14.TTR的构建体具有最短的抗体表达时间。

[0161] 6.1.6统计分析

[0162] 为了在第2周根据血浆中的hFVIII活性鉴定相似的治疗组,使用具有Tukey事后检验的单一固定因子ANOVA模型分析数据,以鉴定彼此不同的组平均活性水平。执行事件分析时间以产生针对hFVIII的抗体。

[0163] 6.1.9各种AAV衣壳的活性和免疫原性的比较

[0164] 接着,确定活性水平的差异,并确定使用的AAV衣壳对免疫原性的潜在贡献。对于该研究,选择了来自先前研究的最具免疫原性的基因组-E06.TTR。有趣的是,该构建体在第2周产生显著高于大多数其他构建体的表达,但是在接下来的几周中,在80%注射的小鼠中产生针对hFVIII转基因的抗体。

[0165] 使用E06增强子与肝脏特异性TTR启动子组合的相同载体基因组与以下五种AAV衣壳中的一种一起包装:AAVrh10、AAV8、AAV9、AAVhu37和AAVrh64R1。再次,以 10^{10} GC/小鼠的剂量静脉内注射FVIII KO小鼠,并且在整个12周的研究中跟踪血浆hFVIII活性水平和抗hFVIII IgG滴度。基于用于基因转移的AAV载体,观察到转基因的表达和免疫原性的明显差异(图9)。在载体施用后第2周,血浆中的hFVIII活性从在AAVrh64R1施用后的0.51IU/ml变化至施用AAVrh10后的1.26IU/ml(图9A)。在研究过程期间,数只小鼠产生抗hFVIII抗体,范围从20%的施用AAV8或AAV9载体的小鼠到63%的接受AAVrh10的小鼠(图9B)。因此,即使用高度免疫原性的增强子和启动子组合,对转基因的免疫应答也可以基于用于基因转移的AAV衣壳而变化。

[0166] 6.1.10讨论

[0167] 在使用HLP启动子进行表达的FVIII KO小鼠中的先前研究在整个研究期间未检测到针对转基因的抗体。HLP启动子序列类似于E01.A1AT增强子/启动子组合的序列,其中施用该AAVrh10载体的小鼠在12周研究的整个持续期间没有可检测的抗体。不幸的是,在FVIII KO小鼠中来自该载体的活性相对较低,在载体施用后第2周在血浆中仅可检测到0.189IU/ml,并且在第6周时峰值水平为0.303IU/ml。

[0168] 有趣的是,用于相同转基因盒的基因转移的AAV衣壳显著影响对hFVIII的免疫原性和峰值hFVIII活性。为了研究衣壳对抗hFVIII抗体产生的影响,使用最具免疫原性的转基因盒(E06.TTR)。研究的五种载体衣壳可分为两组: $\leq 20\%$ 的小鼠产生抗hFVIII抗体(AAV8和AAV9); $>20\%$ 的小鼠产生体液免疫应答(AAVrh10、AAVhu37和AAVrh64R1)。对于与AAV8衣壳相关的hFVIII转基因的耐受性可能并不令人惊讶,因为先前的研究表明该衣壳的静脉内递送可以在肝的致耐受性的情况下激活转基因特异性调节性T细胞。此外,我们先前

已经表明,在血友病B小鼠中肌肉内注射AAV8后没有可检测的FIX抑制剂。因此,即使用高度免疫原性的增强子和启动子组合,对转基因的免疫应答也可以基于用于基因转移的AAV衣壳而变化。

[0169] 施用五种不同的AAV衣壳后血浆中的hFVIII活性水平也在载体施用后第2周从用AAVrh64R1的0.51IU/ml显著变化至用AAVrh10的1.26IU/ml。与AAV8相比,来自AAVrh10载体的表达显著升高,并且与63%的小鼠中抗hFVIII抗体的产生一致。该衣壳比较研究使用高免疫原性转基因盒执行,并且可能不模拟在人类中看到的,其中约30%的血友病A患者产生针对重组蛋白的抗体。因此,施用AAVrh10载体后产生的较高表达水平可能对临床情况更有益,其中将需要较低剂量的载体以显著改善出血事件的发生率和补充重组hFVIII蛋白。

[0170] 根据本研究的结果,选择E03.TTR(图1;SEQ ID NO:13)、E03.A1AT(FIG.3;SEQ ID NO:15)、E12.TTR(FIG.2;SEQ ID NO:14)和E12.A1AT(FIG.4;SEQ ID NO:16)构建体用于进一步测试。

[0171] 6.2剂量研究

[0172] 6.2.1在FVIII KO小鼠中进行研究以通知近似MED

[0173] C57BL/6和129背景中的FVIII KO小鼠接受尾静脉注射AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75的四种载体剂量中的一种。此类载体剂量为 5×10^{10} GC/kg、 5×10^{11} GC/kg、 5×10^{12} GC/kg和 5×10^{13} GC/kg。包括仅接受对照制品(载体缓冲液)的动物群作为载体对照。在载体施用后,每天对于一般观察来监测动物。在适当的时间点从动物收集血液以捕获hFVIII活性水平。在给药后第60天处死子集A中的动物,在给药后第28天处死子集B中的动物,并在给药后第3天处死子集C中的动物。在尸检时也收集血液用于血清化学小组和血液学。牺牲的动物将被尸体解剖;收获器官,诸如右腹股沟淋巴结、右睾丸、胰腺、十二指肠、结肠、脑、右腓肠肌、胃、右肾、右肺、脾、心脏、肝脏和大部分病变(如果有的话),用于生物分布和组织病理学检查。对于接受最高剂量载体的小鼠和接受对照制品的小鼠,提取总细胞DNA和RNA。对提取的DNA/RNA执行qPCR和RT-qPCR测定,以分别测量器官中的载体基因组拷贝数和转录物水平。通过COATEST测定,由血浆中的hFVIII蛋白活性水平确定测试制品的功效。此外,通过抗hFVIII IgG ELISA测定再次监测抗hFVIII抗体,并通过凝血酶原时间(PT)测定评价凝血的外在途径。

[0174] 6.3非人灵长类动物的研究

[0175] 6.3.1 NHP中的表达研究

[0176] 这项非GLP研究的主要目的是评价NHP中的潜在载体相关毒性和生物分布。

[0177] 雄性恒河猴和食蟹猴用于该研究。由于血友病A是X连锁遗传病症,因此在研究中仅使用雄性动物。在如前所述确定的研究开始时,所有猕猴的NAb滴度都小于1:5(CALCEDO et al.(2009) Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. J Infect Dis, 199, 381-90)。在载体施用之前,用肌内注射的开他敏(10mg/kg至15mg/kg)和右美托咪定(0.05mg/kg至0.10mg/kg)的混合物麻醉猕猴。通过隐静脉向猕猴静脉内施用载体。在研究开始之前采集血液样品,并且在研究期间每两周通过股静脉的静脉穿刺采集血液样品。所有血液样品的临床病理学测试均由Antech Diagnostics(Irvine, CA)进行,包括完整的血细胞计数和差异、完整的临床化学和凝血组。

[0178] 执行对于在NHP中表达hFVIII的初步研究。两只恒河猴和两只食蟹猴分别以 $3 \times$

10^{12} GC/kg的来自ABP2.TGB-S1增强子/启动子组合的表达hFVIII的AAVrh10(图10A)和AAVhu37(图10B)载体静脉内施用。在所有动物中但是至第6至8周观察到高峰值表达。看到注射AAVrh10的猕猴对hFVIII的体液免疫应答。抗hFVIII抗体的发展在接受AAVhu37的一只动物中延迟,发生在载体施用后12周,并且对于其他动物,在整个研究过程中并没有发展。接受AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA7的猕猴在注射后跟踪35个月(图22至图24)。

[0179] 基于FVIII K0小鼠研究和这种小型初步恒河猴猕猴研究,选择原始42种增强子/启动子组合中的两种,使用两种不同的Clade E衣壳进行表达,以在食蟹猴中进一步评价。

[0180] 6.3.2 NHP的进一步研究

[0181] 随后对20只雄性食蟹猴给予四种载体中的一种:AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75、AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75和AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75($n=5$ 只猕猴/载体)。以 1.2×10^{13} GC/kg的剂量静脉内施用载体(基于中间oqPCR滴度)。使用一种衣壳加增强子/启动子组合,在载体施用后第2周看到37%的正常FVIII水平的峰值表达,然后在20%的正常水平处达到平稳(图11)。虽然到第8周在大多数猕猴中检测到针对hFVIII的抗体,但是在载体施用后第30周,在两只动物中仍未检测到抗体(图12)。方法讨论如下。通过对于抗体产生使用事件发生时间分析,确定AAVrh10和AAVhu37之间存在显著差异(图14)。

[0182] 6.3.3 NHP血浆中hFVIII表达的确定

[0183] 通过ELISA测量hFVIII表达,其中除非另有说明,否则所有试剂均来自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)。用在0.1M碳酸盐缓冲液(pH9.6)中以1:500稀释的抗hFVIII IgG(Green Mountain Antibodies,VT,USA)涂覆ELISA板,并将其在4℃下温育过夜。将孔用在PBS中的0.1%吐温20洗涤四次,并在室温下用在PBS中的5%脱脂乳(Bio Rad,Hercules,CA,USA)封闭1小时。除去封闭缓冲液后,将在5%脱脂乳中稀释的血浆样品添加到板中,并在室温下温育1小时。然后将板洗涤四次,并在脱脂乳中在1:1000稀释度下添加抗FVIII IgG(ThermoFisher Scientific,MA,USA)。在室温下温育1小时后,将板洗涤四次,并在脱脂乳中在1:1000稀释度下添加HRP-缀合的抗绵羊IgG。在室温下温育90分钟后,将板洗涤五次并添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)用于检测。在室温下5分钟后使用2N硫酸停止反应,并使用BioTek μ Quant读板仪(Winooski,VT,USA)在450nm下读板。图11。

[0184] 单次静脉内注射AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75后,在食蟹猴(35个月)中人FVIII的长期稳定表达的结果显示在图22中。结果显示稳定表达,直至35个月尸检。肝酶测试结果显示在图23中。结果显示肝酶水平在正常范围内,肝活检后短暂升高除外。对AAVhu.37衣壳的中和抗体(Nab)应答显示在图24中。

[0185] 使用单细胞技术来检测上文讨论的NHP M11269的肝细胞中的AAV载体DNA和RNA,其接受以 3×10^{12} GC/kg的AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75的静脉内施用。对于AAV基因组的存在和表达来评价单细胞肝细胞。载体后150周,通过灌注胶原酶/蛋白酶的混合物从肝楔中分离肝细胞。将单细胞分选到96孔板的各个孔中。来自一个96孔板的细胞是全基因组扩增的(WGA),并且使用针对人FVIII的探针通过数字PCR定量细胞中的AAV基因组。对第二个96孔板进行全转录组扩增(WTA)以评价FVIII表达。

[0186] 结果显示在下表3中。可以在约25%的所评价的单细胞中检测到AAV基因组。仅在约4%或20%的摄取DNA的细胞中检测到RNA表达。RNA表达细胞可以分为低和高两种类型。

目前尚不清楚为什么大量细胞摄取载体而不能表达转基因。通过CMC芯执行的原位杂交研究证实了这些结果(数据未显示)。

[0187] 表3:DNA和RNA阳性单细胞百分比

[0188]	单细胞(w152)	样品	阳性/总	阳性百分比
		DNA	23/96	24%
		RNA	4/96	4%
		RNA/DNA 阳性细胞	4/23	17%

[0189]	肝匀浆	样品	w42 活检	w152 尸检
		DNA(GC/细胞)	10	7.6 +/-1.1
		hFVIII RNA(拷贝 ug RNA)	4.4 +/- 1.1 E4	6.4 +/- 0.7E4

[0190] 6.3.4 NHP血浆中抗hFVIII IgG的检测

[0191] 如前所述,通过ELISA测量NHP血浆中针对hFVIII的IgG抗体,不同之处在于,在非脂肪乳中在1:2000稀释度下添加HRP缀合的抗NHP IgG用于检测(图12)。

[0192] 6.3.5 NHP血浆中Bethesda滴度的检测

[0193] 通过Nijmegen改进的Bethesda测定测量抗人FVIII的抑制性抗体(Giles等人,1998)。一个Bethesda单位表示对正常人血浆的凝固活性抑制50%。

[0194] 6.3.6肝脏活检

[0195] 来自每组的两个NHP在通过微型剖腹手术执行的载体施用后第5周接受肝脏活检。动物的选择基于第4周血浆中的hFVIII表达。选择的第一只动物是具有中值hFVIII水平的动物,所选择的第二只动物是hFVIII水平最接近或次接近(如果最接近的是中值hFVIII水平)平均水平的动物。取肝组织样品进行组织病理学、载体生物分布和转基因mRNA分析。在肝活检后第3天,采集血液用于完全血细胞计数和分化、完整的临床化学和凝血组。

[0196] 6.3.7免疫抑制方案

[0197] 在动物中根据需要启动免疫抑制方案,其中在载体施用后,在存在可检测的hFVIII抗体(Bethesda单位>1)的情况下,检测hFVIII表达的能力丧失。免疫抑制方案用利妥昔单抗(250mg/m²,静脉注射,每隔4周,总共输注4次)和环磷酰胺(300mg/m²,每15天缓慢静脉输注,4个月内总共8次剂量)执行,如前所述(Mcintosh et al. (2013) Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant.Blood,121,3335-44.)。

[0198] 6.3.8载体生物分布

[0199] 将来自C57BL/6J小鼠的组织样品(腹股沟淋巴结、腰部淋巴结、肌肉[右腓肠肌]、右睾丸、胰腺、右肾、脾、右肺、心脏和肝脏)在尸体解剖时快速冷冻,并且使用QIAamp DNA Mini试剂盒(Qiagen,Valencia,CA,USA)提取DNA。如前所述,通过实时PCR执行提取的DNA中的载体基因组拷贝(GC)和提取的RNA中的相对hFVIII转录物表达的检测和定量。简言之,使用针对载体的hFVIII转基因序列设计的引物/探针定量载体GC和RNA。对来自每只小鼠(n=3只/组)的一个肝脏样品执行来自肝脏的GC的定量。使用归一化至18S表达的每个样品的Δ

Δ CT确定RNA相对转录物表达。

[0200] 对于18种AAVrh10增强子/启动子载体的子集评价载体生物分布。将表达hFVIIIco的AAVrh10载体以 10^{11} GC/小鼠的剂量静脉内施用到6至8周龄的C57BL/6J野生型小鼠。在载体施用后第14天对小鼠进行尸检,并收集肌肉(右腓肠肌)、右睾丸、胰腺、右肾、脾、右肺、心脏和肝脏。提取DNA和RNA,并使用针对载体的hFVIII转基因序列设计的引物/探针分别定量载体GC和RNA转录物水平。在载体施用组中肝脏载体GC(图20A)或RNA转录物水平(图20B)没有显著差异,而在对照(PBS)施用组中没有可检测的GC或RNA。然而,对于使用A1AT启动子进行表达的载体,存在肝脏中RNA转录物水平较高的趋势,而不管增强子序列如何(图20B)。对于收集的其他组织,hFVIII RNA转录物水平平均起来比肝脏中低1000倍,但在施用E01.TBG-S1、E02.A1AT、E09.A1AT和E09.TTR后在C57BL/6J小鼠的肌肉和心脏中看到高肝外表达(图21)。

[0201] 6.4.载体的测试

[0202] 执行表征测定,其包括血清型识别、空粒子含量和转基因产物识别。所有测定的描述如下所示。

[0203] 6.4.1基因组拷贝(GC)滴度

[0204] 使用优化的定量PCR(oqPCR)测定以通过与同源质粒标准比较来确定基因组拷贝滴度。oqPCR测定使用DNase I和蛋白酶K的连续消化,然后进行qPCR分析以测量封装的载体基因组拷贝。使用靶向PA75 polyA区的序列特异性引物与杂交到该相同区域的荧光标记探针组合完成DNA检测。与质粒DNA标准曲线的比较允许滴度确定,而无需任何PCR后样品操作。已经将许多标准物、验证样品和对照物(用于背景和DNA污染)引入测定中。该测定已通过建立和限定测定参数来合格化,所述测定参数包括灵敏度、检测基线、资格范围以及测定内和测定间精确度。建立了内部AAVrh.10参考批次并将其用于执行资格研究。

[0205] 6.4.2载体衣壳识别:VP3的AAV衣壳质谱

[0206] 通过基于通过质谱(MS)分析VP3衣壳蛋白的肽的测定来实现载体的AAV2/hu.37或AAV2/rh.10血清型的确认。该方法涉及从SDS-PAGE凝胶中切除的VP3蛋白条带的多酶消化(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和内切蛋白酶Glu-C),然后在Q-Exactive Orbitrap质谱仪上的UPLC-MS/MS上进行表征以对衣壳蛋白进行测序。开发了串联质谱(MS)方法,其允许鉴定某些污染蛋白并从质谱中导出肽序列。

[0207] 6.4.3空粒子与全粒子的比率

[0208] 载体粒子图谱使用分析超速离心(AUC)如在分析超速离心机中测量的沉降速度是获得关于大分子结构异质性、确认差异和缔合或聚集状态的信息的优异方法。将样品加载到细胞中并在Beckman Coulter Proteomelab XL-I分析型超速离心机中以12000RPM沉降。每两分钟记录折射率扫描,持续3.3小时。通过c(s)模型(Sedfit程序)分析数据并计算绘出的沉降系数与标准化c(s)值的关系。应观察到代表单体载体的主峰。迁移速度慢于主单体峰的峰的出现指示空/错误组装的粒子。使用空AAV8粒子制剂建立空粒子峰的沉降系数。主单体峰和先前峰的直接定量允许确定空粒子与全粒子的比率。

[0209] 6.4.4感染滴度

[0210] 使用感染单位(IU)测定来确定RC32细胞(表达rep2的HeLa细胞)中载体的生产摄取和复制。简言之,96孔板中的RC32细胞通过连续稀释的载体和均匀稀释的Ad5共同感染,

每次稀释rAAV时重复12份。感染后72小时,使细胞裂解,并执行qPCR以检测rAAV载体扩增溢出。执行终点稀释TCID₅₀计算(Spearman-Kärber)以确定以IU/ml表示的复制滴度。由于“感染性”值取决于与细胞接触的粒子、受体结合、内化、向细胞核的转运和基因组复制,所述它们受到测定几何结构以及在所用细胞系中适当受体的存在和后结合途径的影响。对AAV载体导入至关重要的受体和后结合途径通常保持在永生化细胞系中,因此感染性测定滴度不是“感染性”粒子的存在数量的绝对量度。然而,封装的GC与“感染单位”的比率(描述为GC/IU比率)可用作衡量批次之间产品一致性的量度。

[0211] 7. 实施例2:治疗人受试者的方案

[0212] 该实施例涉及治疗由于凝血因子8(FVIII)基因的突变引起的遗传证实的X-连锁的血友病A的患者的基因疗法。在该实施例中,将基因治疗载体AAVhu.37.hFVIII,一种表达hFVIII的复制缺陷型腺相关病毒载体hu.37(AAVhu.37)施用到血友病A的患者。可以使用FVIII水平作为转基因表达的替代来评估治疗的功效。主要功效评估包括治疗后约12周的FVIII水平,其后效果持续至少1年。在肝脏活检样品中,可以在治疗后测量转基因表达的长期安全性和持久性。

[0213] 7.1. 基因疗法载体-AAV.hFVIII

[0214] 7.1.1. AAVhu.37.hFVIII

[0215] AAVhu.37.hFVIII载体由AAV载体活性成分和制剂缓冲液组成。外部AAV载体组分是血清型hu.37,T=1二十面体衣壳,由3种AAV病毒蛋白VP1、VP2和VP3以预测比率1:1:10的60个拷贝组成。衣壳含有单链DNA重组AAV(rAAV)载体基因组(图1至图4)。

[0216] 基因组含有侧翼为两个AAV反向末端重复序列(ITR)的人因子VIII(FVIII)转基因。增强子、启动子、人因子VIII(hFVIII)编码序列和多腺苷酸化(polyA)信号包含B结构域缺失的密码子优化的人FVIII转基因。ITR是在载体生产期间负责基因组复制和包装的遗传元件,并且是产生rAAV所需的唯一病毒顺式元件。在一个实施方案中,人FVIII编码序列的表达由转甲状腺素蛋白启动子(SEQ ID NO:7)驱动。在另一个实施方案中,人FVIII编码序列的表达由修饰的A1AT启动子(SEQ ID NO:9)驱动。该构建体包括至少一种增强子元件以刺激启动子活性。在一个实施方案中,包括enTTR增强子(SEQ ID NO:5)。在另一个实施方案中,ABP-S增强子(SEQ ID NO:6)的两个拷贝接续enTTR增强子(SEQ ID NO:5)的一个拷贝。包括约75nt的合成polyA信号(SEQ ID NO:10)以介导人FVIII mRNA转录物的终止。

[0217] 载体作为AAVhu.37.hFVIII载体在制剂缓冲液中的悬浮液提供。在一个实施方案中,制剂缓冲液是在TMN200(200mM氯化钠、1mM氯化镁、20mM Tris,pH 8.0)中的0.001% Pluronic F-68。

[0218] 载体制造和载体表征的细节在下面的部分中描述。

[0219] 7.1.2. AAVrh.10.hFVIII

[0220] AAVrh.10.hFVIII载体由AAV载体活性成分和制剂缓冲液组成。外部AAV载体组分是血清型hu.10,T=1二十面体衣壳,由三种AAV病毒蛋白VP1、VP2和VP3以预测比率1:1:10的60个拷贝组成。衣壳含有单链DNA重组AAV(rAAV)载体基因组(图1至图4)。

[0221] 基因组含有侧翼为两个AAV反向末端重复序列(ITR)的人因子VIII(FVIII)转基因。增强子、启动子、人因子VIII(hFVIII)编码序列和多腺苷酸化(polyA)信号包含B结构域缺失的密码子优化的人FVIII转基因。ITR是在载体生产期间负责基因组复制和包装的遗传

元件,并且是产生rAAV所需的唯一病毒顺式元件。在一个实施方案中,人FVIII编码序列的表达由转甲状腺素蛋白启动子(SEQ ID NO:7)驱动。在另一个实施方案中,人FVIII编码序列的表达由修饰的A1AT启动子(SEQ ID NO:9)驱动。该构建体包括至少一种增强子元件以刺激启动子活性。在一个实施方案中,包括enTTR增强子(SEQ ID NO:5)。在另一个实施方案中,ABP-S增强子(SEQ ID NO:6)的两个拷贝接续enTTR增强子(SEQ ID NO:5)。包括约75nt的合成polyA信号(SEQ ID NO:10)以介导人FVIII mRNA转录物的终止。

[0222] 载体作为AAVrh.10.hFVIII载体在制剂缓冲液中的悬浮液提供。在一个实施方案中,制剂缓冲液是在TMN200 (200mM氯化钠、1mM氯化镁、20mM Tris,pH 8.0)中的0.001% Pluronic F-68。

[0223] 7.2. 患者群体

[0224] 由于几个原因,严重血友病A患者是所选择的研究人群。严重血友病A患者被定义为具有小于1%的正常因子VIII (FVIII) 活性,因此需要频繁输注FVIII以控制其出血素质。这对于进行正常生活而言代表着显著的负担,此外,FVIII的血液水平经历熟知的峰和谷模式,这不是最佳的。严重患者的FVIII血液水平低于1%的事实使得在施用AAV.hFVIII后可以可靠地测量FVIII血液水平的低至中等增加。最近的临床试验证实了这种方法的有效性。

[0225] 作为治疗候选者的患者优选是被诊断患有中度/重度或严重的血友病A的 ≥ 18 岁的成年男性。在一个实施方案中,患者具有 $\leq 2\%$ 的正常水平的基线FVIII活性或记录的FVIII活性 $\leq 2\%$ 。在一些实施方案中,可以治疗 < 18 岁的患者。治疗候选者包括每年至少发生3次需要用FVIII进行按需治疗的出血事件的受试者。其他治疗候选者包括用FVIII预防方案治疗的受试者。证明受试者适合治疗的其他标准包括至少100天的FVIII暴露史;没有关于外源性FVIII的抑制剂(中和抗体)的记录;对外源性FIX或AAV.hFVIII载体组合物的任何组分没有已知的过敏反应。

[0226] 接受治疗的患者可以具有基线血清AAVhu.37或AAVrh.10(如对于所选载体适当的)中和抗体(Nab)滴度 $\leq 1:5$ 。

[0227] 可以允许受试者在其护理医师的判断下在基因疗法治疗之前和同时继续其标准护理治疗(例如,替代FVIII)。在替代方案中,医师可能更喜欢在施用基因疗法治疗之前停止标准护理疗法,并且任选地,在施用基因疗法后作为共同疗法恢复标准护理疗法。

[0228] 7.3. 施用的剂量和途径

[0229] 患者通过输注经由外周静脉接受施用的单剂量AAVrh.10.hFVIII或AAVhu.37.hFVIII。施用到患者施的AAVrh.10.hFVIII或AAVhu.37.hFVIII的剂量为约 5×10^{11} GC/kg或 1.6×10^{12} GC/kg或 5×10^{12} GC/kg或 1×10^{13} GC/kg。为了确保从施用到患者的AAVrh.10.hFVIII或AAVhu.37.hFVIII剂量除去空衣壳,通过氯化铯梯度超速离心或在载体纯化过程期间通过离子交换色谱法将空衣壳与载体粒子分离,如上所述。

[0230] 7.4. 测量临床目标

[0231] 初步评估是针对所施用产品的安全性进行。以下评估在施用产品后每周进行两次持续4周,从第6周到第12周每周进行,在第一年的剩余时间内每月进行,以及以6个月的间隔进行持续总共5年。

[0232] a. 体检

[0233] b. ECG

- [0234] c. 生化评估: 血清电解质、BUN、肌酐、钙、磷酸盐、总蛋白、白蛋白、LDH、CPK、AST、ALT、碱性磷酸酶、胆红素
- [0235] d. 血液学评估: CBC和差异凝血概况
- [0236] e. 验尿
- [0237] f. 免疫学评估:
- [0238] g. 对hu.37或rh.10衣壳和因子VIII的血清学应答
- [0239] h. T细胞对hu.37或rh.10衣壳和因子VIII抗原的应答
- [0240] i. 载体DNA的评估; 血浆、尿液和唾液中的qPCR测量
- [0241] 二次评估基于转基因表达和活性的测量, 如通过以下确定:
- [0242] a. 血浆因子VIII水平和因子VIII活性
- [0243] b. 替代因子VIII需求和自发性出血事件的频率的临床评估
- [0244] 8. 实施例3: AAV.hFVIII的制造
- [0245] 8.1. 用以产生AAV.hFVIII的质粒
- [0246] AAVrh.10.hFVIII通过以下3种质粒DNA转染人HEK 293MCB细胞产生:
- [0247] (i) 如第8.2.1.1-8.2.1.4节中描述的载体质粒
- [0248] (ii) AAV辅助质粒, 称为pAAV2.rh10.KanR, 其含有第8.2.2.1节中描述的AAV rep2和cap rh10野生型基因和
- [0249] (iii) 第8.2.3节中描述的称为pAdDeltaF6 (Kan) 的辅助腺病毒质粒
- [0250] AAVhu.37.hFVIII通过以下3种质粒DNA转染人HEK 293 MCB细胞产生:
- [0251] (i) 如第8.2.1.1-8.2.1.4节中描述的载体质粒
- [0252] (ii) AAV辅助质粒, 称为pAAV2.hu37.KanR, 其含有第8.2.2.2节中描述的AAV rep2和cap hu.37野生型基因和
- [0253] (iii) 第8.2.3节中描述的称为pAdDeltaF6 (Kan) 的辅助腺病毒质粒
- [0254] 8.2.1顺式质粒(载体基因组表达构建体):
- [0255] 8.2.1.1含有人FVIII表达盒的pAAV.E03.p3.hF8co-SQ.PA75(图1)。该顺式质粒编码rAAV载体基因组。由TTR启动子与enTTR增强子一起驱动人FVIII-SQco cDNA的表达。表达盒的polyA信号是约75nt的人工polyA序列。
- [0256] 序列元件的描述
- [0257] 1. 反向末端重复序列(ITR): AAV ITR是两端相同但取向相反的序列。当AAV和腺病毒(ad)辅助功能以反式提供时, AAV2 (GenBank#NC001401) ITR序列既作为载体DNA复制的起源又作为载体基因组的包装信号。因此, ITR序列代表载体基因组复制和包装所需的唯一顺式作用序列。示例性载体中使用的5' ITR序列显示在SEQ ID NO:11中。示例性载体中使用的3' ITR序列显示在SEQ ID NO:12中。
- [0258] 2. TTR启动子: 转甲状腺素蛋白启动子(SEQ ID NO:7)并用于驱动高水平肝脏特异性hFVIII基因表达。
- [0259] 3. TTR增强子(enTTR): 来自转甲状腺素蛋白的100bp的增强子序列(SEQ ID NO:5)存在于载体表达盒中以增加FVIII的表达。
- [0260] 4. 人凝血因子VIII(FVIII) cDNA(SEQ ID NO:1显示天然序列; SEQ ID NO:2显示密码子优化的序列)。人凝血因子8(FVIII) cDNA编码对血凝块形成必不可少的凝血因子。

hFVIII是B结构域缺失的序列,其中B结构域已被短的“SQ”序列替代,如本文所述。hFVIII cDNA经密码子优化以在人中表达。

[0261] 5.人工多腺苷酸化信号:(SEQ ID NO:10) 75bp人工多腺苷酸化信号提供用于hFVIII mRNA的高效多聚腺苷酸化的顺式序列。该元件用作转录终止的信号,即,在新生转录物的3'末端发生特异性裂解事件,然后加入聚腺苷酸尾。

[0262] 8.2.1.2含有人FVIII表达盒的pAAV.E12.p3.hF8co-SQ.PA75(图2)。该顺式质粒编码rAAV载体基因组。由TTR启动子与ABPS和enTTR增强子一起驱动人FVIII-SQco cDNA的表达。表达盒的polyA信号是约75nt的人工polyA序列。

[0263] 序列元件的描述

[0264] 1.反向末端重复序列(ITR):与8.2.1.1相同

[0265] 2.TTR启动子:与8.2.1.1相同

[0266] 3.增强子:来自 α 1-微球蛋白/双库尼茨前体[ABP]的100bp远端增强子缩短到42bp的版本(SEQ ID NO:6)以及转甲状腺素蛋白的100bp增强子序列(enTTR)(SEQ ID NO:5)的两个拷贝存在于载体表达盒中以增加FVIII的表达。

[0267] 4.人凝血因子VIII(FVIII) cDNA:与8.2.1.1相同

[0268] 5.人工多腺苷酸化信号:与8.2.1.1相同

[0269] 8.2.1.3含有人FVIII表达盒的pAAV.E03.p2.hF8co-SQ.PA75(图3)。该顺式质粒编码rAAV载体基因组。人FVIII-SQco cDNA的表达由修饰的A1AT启动子与enTTR增强子一起驱动。表达盒的polyA信号是约75nt的人工polyA序列。

[0270] 序列元件的描述

[0271] 1.反向末端重复序列(ITR):与8.2.1.1相同

[0272] 2.A1AT启动子:修饰的SERINA1[α 1-抗胰蛋白酶]启动子(SEQ ID NO:9)并用于驱动高水平的肝脏特异性hFVIII基因表达。

[0273] 3.TTR增强子(enTTR):来自转甲状腺素蛋白的100bp增强子序列存在于载体表达盒中以增加FVIII的表达。

[0274] 4.人凝血因子VIII(FVIII) cDNA:与8.2.1.1相同

[0275] 5.人工多腺苷酸化信号:与8.2.1.1相同

[0276] 8.2.1.4含有人FVIII表达盒的pAAV.E12.p2.hF8co-SQ.PA75(图4)。该顺式质粒编码rAAV载体基因组。由TTR启动子与ABPS和enTTR增强子一起驱动人FVIII-SQco cDNA的表达。表达盒的polyA信号是约75nt的人工polyA序列。

[0277] 序列元件的描述

[0278] 1.反向末端重复序列(ITR):与8.2.1.1相同

[0279] 2.A1AT启动子:与8.2.1.3相同

[0280] 3.增强子:与8.2.1.1相同

[0281] 4.人凝血因子VIII(FVIII) cDNA:与8.2.1.1相同

[0282] 5.人工多腺苷酸化信号:与8.2.1.1相同

[0283] 8.2.2辅助质粒

[0284] 8.2.2.1 AAVrh10辅助质粒pAAV2.rh10.KanR

[0285] 该AAVrh10辅助质粒(8,036bp)编码来自血清型rh10的4种野生型AAV2 rep蛋白和

3种野生型AAV VP衣壳蛋白。从恒河猴的肝组织DNA获得新的AAV序列并将其命名为AAV血清型rh10。为了产生嵌合包装构建体,从质粒p5E18中除去AAV2 cap基因,并用从灵长类动物肝脏DNA扩增的AAVrh10 cap基因的PCR片段替代,得到质粒p5E18VD2/rh10。注意,通常驱动rep表达的AAV p5启动子在该构建体中从rep的5'末端移动到rh10cap基因的3'末端。这种排列用于在启动子和rep基因(即,质粒骨架)之间引入间隔区以下调rep的表达并增加支持高滴度载体产生的能力。p5E18中的质粒骨架来自pBluescript KS。质粒的所有组成部分已通过直接测序验证。最后,用卡那霉素抗性基因替代氨苄青霉素抗性基因,得到pAAV2/rh10 (Kan)。

[0286] 8.2.2.2 AAVhu.37辅助质粒pAAV2.hu.37.KanR

[0287] 该AAVhu.37辅助质粒(8,036bp)编码来自血清型hu.37的4种野生型AAV2rep蛋白和3种野生型AAV VP衣壳蛋白。pAAV2.rh10.KanR质粒的示意图如下所示。为了产生嵌合包装构建体,从质粒p5E18中除去AAV2 cap基因,并用从灵长类动物肝脏DNA扩增的AAVhu.37 cap基因的PCR片段替代,得到质粒p5E18VD2/hu.37。p5E18中的质粒骨架来自pBluescript KS。质粒的所有组成部分已通过直接测序验证。最后,用卡那霉素抗性基因替代氨苄青霉素抗性基因,得到pAAV2/hu.37 (Kan)。

[0288] 8.2.3 pAdDeltaF6 (Kan) 腺病毒辅助质粒

[0289] 质粒pAdDeltaF6 (Kan) 的大小为15,774bp。质粒含有对AAV复制重要的腺病毒基因组的区域,即E2A、E4和VA RNA (腺病毒E1功能由293细胞提供),但不含其他腺病毒复制或结构基因。该质粒不含有对复制至关重要的顺式元件,诸如腺病毒反向末端重复序列,因此预计不会产生感染性腺病毒。它来源于Ad5的E1、E3缺失的分子克隆(pBHG10,基于pBR322的质粒)。在Ad5DNA中引入缺失以除去不必要的腺病毒基因的表达并将腺病毒DNA的量从32kb减少到约12kb。最后,用卡那霉素抗性基因替代氨苄青霉素抗性基因,得到pAd Δ F6 (kan)。通过Qiagen Genomic Services对质粒源原液执行的DNA质粒测序证实这3种腺病毒基因的识别,该质粒源原液被送至Aldevron Inc.用于质粒DNA制造。DNA分析显示与3个腺病毒5型基因区域(GenBank登录号AF369965)具有100%同源性。

[0290] 8.2.4细菌主细胞库(MCB)

[0291] 用于支持DTX101制造的三种DNA生产质粒的细菌MCB由Aldevron Inc.产生。细胞库由选择的培养物的扩增制成,并且遵循Aldevron SOP并根据CBER建议执行大量测试以确定每种细菌MCB的资格。执行并记录关于细菌MCB产生和测试三种质粒中的每一种的具体细节的信息。

[0292] 8.2.5质粒DNA制造

[0293] 生产过程中使用的所有质粒均由Aldevron Inc.在其GMP-STM质量系统和利用cGMP制造的最突出特征:可追溯性、文件控制和材料隔离的基础设施产生。执行并记录关于质粒DNA产生和测试每种质粒的具体细节的信息。

[0294] 8.2.6人胚胎肾(HEK)293主细胞库(MCB)

[0295] HEK 293细胞最初通过Frank Graham及其同事用剪切的腺病毒5型DNA转化HEK细胞产生。细胞表达高滴度rAAV产生所需的E1a和E1b基因产物。HEK293细胞是附着性的并且是高度可转染的,在DNA质粒转染后产生高滴度的rAAV。

[0296] 8.3重组AAV载体制造

[0297] 8.3.1制造过程的描述

[0298] 1.细胞接种:将合格的人胚胎肾293细胞系用于生产过程。将细胞在由杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)组成的补充有10% γ 照射的胎牛血清(FBS)的培养基中培养。细胞具有锚定依赖性,并且使用非动物细胞解离试剂TrypLE Select完成细胞解离。将细胞保持在37°C (+/-1°C)下在5% (+/-0.5%) CO₂气氛中。

[0299] 2.瞬时转染:在生长3天(DMEM培养基+10%FBS)后,用新鲜的无血清DMEM培养基替代Hyperstack细胞培养基,并使用优化的PEI沉淀方法用3种生产质粒转染。

[0300] 在BSC中制备足够的DNA质粒转染复合物以转染20个Corning 36层HyperStacks(每个BDS批次)。最初制备含有3.0mg pDTX.hFIX.101载体质粒、60mg pAdDeltaF6(Kan)、30mg pAAV2.rh10.KanR AAV辅助质粒和GMP级PEI(PEIPro,PolyPlus Transfection SA)的DNA/PEI混合物。充分混合后,将溶液在室温下静置25分钟,然后将其添加到无血清的培养基中以猝灭反应,然后添加到Corning 36层Hyperstacks中。将转染混合物在Hyperstack的所有36层之间均衡,并将细胞在37°C (+/-2°C)下在5% (+/-0.5%) CO₂气氛中温育5天。

[0301] 3.细胞培养基收获:使用一次性生物过程袋通过无菌方式将培养基排出单元自每个Hypertack收获转染的细胞和培养基。收获培养基后,将约80升体积用MgCl₂补充至终浓度为2M(全能核酸酶(Benzonase)的辅因子)并且添加全能核酸酶(登录号:1.016797.0001, Merck Group)达到终浓度为25单位/毫升。将产物(在一次性生物过程袋中)在37°C下在培养箱中温育2至3小时,以提供足够的时间用于酶消化由于转染程序而存在于收获物中的残留细胞和质粒DNA。执行该步骤以最小化最终载体DP中残留DNA的量。温育期后,添加NaCl,达到终浓度为500mM,以帮助在过滤和下游切向流过滤期间回收产物。

[0302] 4.澄清:使用深度过滤器胶囊(1.2 μ m/0.22 μ m)从产物中除去细胞和细胞碎片,该深度过滤器胶囊串联连接为由蠕动泵驱动的无菌封闭管和袋组。使培养基经过Sartorius Sartoguard PES胶囊过滤器(1.2 μ m/0.22 μ m)(Sartorius StedimBiotech Inc.)。

[0303] 5.大规模切向流过滤:使用切向流过滤(TFF)使用由Spectrum Labs生产的定制的无菌封闭生物加工管、袋和膜组,实现澄清产物的体积减少(10至20倍)。

[0304] 8.4用第二载体进行再次施用

[0305] 8.4.1 AAV3B或AAV5的再次施用

[0306] 评价使用AAV3B或AAV5的载体进行的再次施用在先前用AAVrh10或AAV8载体处理的恒河猴中的效率。如前所述产生如表4中所示的载体,其中在HEK293细胞中三次转染后从上清液中回收载体,并在碘克沙醇梯度上纯化。通过数字PCR方法确定载体滴度。

[0307] 基于先前存在的NAb的状态,将24只雄性恒河猴(3至5岁)纳入8组(n=3/组;表1)的研究中。在第0天用 1.0×10^{13} GC/kg AAV.TBG.hCG.WPRE注射猕猴,AAV载体如表4所示。在第12周,猕猴接受用 1.0×10^{13} GC/kg AAV.TBG.hCG.WPRE的第二次注射,AAV载体如表4所示。在第2周和第14周执行肝脏活检,并在第26周执行尸检。

[0308] 表4:群组 and 载体概述

群组	动物编号	第一次注射	第二次注射
G1A	RA0931	PBS	AAV3B.TBG.rhAFP
	RA1388		
	RQ9745		
G1B	RA0923	PBS	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1275		
	RQ9383		
G2A	RA0985	AAVrh10.TBG.rhCG.WPRE	AAV3B.TBG.rhAFP
	RQ9638		
	RQ9746		
G2B	RA0992	AAVrh10.TBG.rhCG.WPRE	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1322		
	RA1417		
G3A	RA1234	AAV8.TBG.rhCG.WPRE	AAV3B.TBG.rhAFP
	RQ9737		
	RQ9751		
G3B	RA1339	AAV8.TBG.rhCG.WPRE	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1390		
	RQ9805		
G4	RA0548	AAV3B.TBG.rhCG.WPRE	N/A
	RA0658		
	RQ9840		
G5	RA0968	AAV5.TBG.rhCG.WPRE	N/A
	RA1208		
	RA1239		

[0310] 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量血清中转基因 (rhCG-恒河猴绒毛膜促性腺激素b亚基; rhAFP-恒河猴甲胎蛋白) 的表达水平。为了测量肝脏中的载体DNA拷贝数, 对从肝脏活检和尸检期间收集的肝脏样品中提取的总细胞DNA执行QPCR测定。如前所述执行AAVNab测定。肝切片用抗CG抗体染色用于成像。

[0311] 图15显示AAVrh10、AAV8、AAV3B和AAV5载体实现的rhCG表达水平的比较 (第一次载体注射)。图16A-16D显示在不同时间点在肝脏中的rhCG载体DNA拷贝数。图17A-17B显示再次施用 (第二次载体注射) 表达rhAFP的AAV3B (图17A) 或AAV5 (图17B) 载体后的rhAFP水平。图18A和图18B显示肝脏中的rhAFP载体基因组拷贝数。图19显示猕猴中的差异AAV Nab应答。

[0312] 在幼稚动物中, 进化枝E载体 (AAVrh10和AAV8) 展示最高水平的门静脉基因转移, 其中AAV5载体具有最低水平; 周围区最接近进入血管供应, 接收最多氧合血液, 并且是代谢过程的肝脏的重要区域。与AAV8和AAV3B相比, AAVrh10和AAV5引发更高水平的中和抗体 (NAb)。在血清阴性动物中用AAV3B注意到转基因表达的显著动物间变化。在测试的短时间框架内, 自AAVrh10引发的NAb似乎已经抑制了用血清学上不同的AAV3B血清型的随后体内转导; 先前暴露于AAV8不会干扰AAV3B转导。

[0313] 本说明书中引用的所有出版物以及美国临时专利申请62/323,336、62/331,807和62/428,866都以引用的方式并入本文。类似地, 本文引用并且出现在所附序列列表中的SEQ ID NO和序列列表本身都以引用的方式并入本文。虽然已经参考特定实施方案描述了本发明, 但是应该理解, 可以在不脱离本发明的精神的情况下进行修改。这类修改旨在属于随附权利要求书的范围。

[0314] (序列列表自由文本)

[0315] 为数字标识符<223>下包含自由文本的序列提供以下信息。

[0316]

SEQ ID NO: (包含自由文本)	<223>下的自由文本
4	<223>构建的序列
5	<223>构建的序列
6	<223>构建的序列
7	<223>构建的序列
8	<223>构建的序列
9	<223>构建的序列
10	<223>构建的序列
11	<223>构建的序列
12	<223>构建的序列
13	<223>构建的序列
14	<223>构建的序列
15	<223>构建的序列
16	<223>构建的序列
17	<223>AAVhu.37衣壳
18	<223>AAVrh.10衣壳
19	<223>构建的序列
20	<223>AAV3B衣壳

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学的受托人
<120> 用于治疗血友病 A 的基因疗法
<130> UPN-16-7798PCT
<150> US 62/323,336
<151> 2016-04-15
<150> US 62/331,807
<151> 2016-05-04
<150> US 62/428,866
<151> 2016-12-01
<160> 20
<170> PatentIn 3.5 版

[0001]

<210> 1
<211> 4371
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
ggtagagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgtgttt 360
gggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tcttttctcat 540

	gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatcaggag ccctactagt atgtagagaa	600
	gggagtcttg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgcgtga	660
	tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
	gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
	ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
	accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
	cgccaggcgt ccttggaat ctgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
	gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
	gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
	gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
	gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
[0002]	tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
	cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gatttgtagg	1320
	aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cttttaagac tcgtgaagct	1380
	attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
	ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
	gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
	ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
	actaaatcag atcctcggtg cctgaccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
	gatctagctt caggactcat tgccctctc ctcatctgct acaaagaatc ttagatcaa	1740
	agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
	aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttc tcccaatcc agctggagtg	1860

	cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
	tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtag catactggta cattctaagc	1980
	attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
	atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
	atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
	atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
	agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
	ttctcccaga atccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
	cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
	gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
	cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
[0003]	catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
	caggaattta ctgatggctc ctttactcag cctttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
	ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
	agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat	2760
	cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac ttgttcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
	ttttggaaag tgcaacatca tatggcacc ctaaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
	gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940
	ctggtctgcc aactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtac agtacaggaa	3000
	tttgcctgt ttttcacat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg	3060
	gaaagaaact gcagggtcc ctgcaatatc cagatggaag atcccacttt taaagagaat	3120
	tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180

[0004]

caggatcaaa ggattcgaatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240
 attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300
 tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt 3360
 tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg 3420
 gtgtacagca ataagtgtca gactccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480
 cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat 3540
 tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600
 ttggcaccaa tgattattca cggcacaaag acccaggggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660
 ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720
 cgaggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780
 aaacacaata tttttaacc tccaattatt gctcgatata tccgtttgca cccaactcat 3840
 tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggtg gtgatttaa tagttgcagc 3900
 atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacctac 3960
 tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg 4020
 agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttcag 4080
 aagacaatga aagtcacagg agtaactact caggagtaa aatctctgct taccagcatg 4140
 tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt 4200
 cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ctttcacacc tgtggtgaac 4260
 tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320
 cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta c 4371

<210> 2

<211> 4374

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 2	
	atgcagatcg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggttctg cttctccgcc	60
	acccggcggt actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg	120
	ggagagctgc cagtggatgc ccggttccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac	180
	accagcgtgg tgtacaagaa gacctgttc gtggagtcca ccgatcacct gttcaacatc	240
	gccaaagccac ggccaccctg gatgggactg ctgggaccaa ccatccaggc cgaggtgtac	300
	gataccgtgg tgatcacctt gaagaacatg gcctctcatc ctgtgtccct gcacgccgtg	360
	ggagtgaact actggaaggc cagcgaggga gccgagtacg atgatcagac cagccagcgg	420
[0005]	gagaaggagg atgataaggt gttcccagga ggaagccaca cctacgtgtg gcaggtgctg	480
	aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac	540
	gtggatctgg tgaaggatct gaacagcgga ctgatcggag ccctgctggt gtgccgggag	600
	ggaagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcacctctgt gttcgccgtg	660
	ttcgatgagg gaaagagctg gcacagcgag accaagaaca gcctgatgca ggatcgggat	720
	gccgccagcg ccggggcctg gccaaagatg cacaccgtga acggatacgt gaaccggagc	780
	ctgccaggac tgatcggatg ccaccggaag agcgtgtact ggcacgtgat cggaatggga	840
	accacccag aggtgcactc tatcttctctg gagggacaca ctttctggt gcggaaccac	900
	cggcaggcca gcctggagat cagcccaatc accttctga ccgccagac cctgctgatg	960
	gatctgggac agttctctgt gttctgccat atcagcagcc accagcacga tggaatggag	1020
	gcctacgtga aggtggatag ctgccagag gagccacagc tgcggatgaa gaacaacgag	1080
	gaggccgagg attacgatga tgatctgacc gatagcgaga tggatgtggt gcggttcgat	1140

	gatgataaca gccaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaagacc	1200
	tgggtgcact acatcgccgc cgaggaggag gattgggatt acgccccact ggtgctggcc	1260
	cctgatgatc ggagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gaccacagcg gatcggacgg	1320
	aagtacaaaa aagtgcggtt catggcctac accgatgaga cttcaagac ccgggaggcc	1380
	atccagcacg agagcggaat cctgggacca ctgctgtacg gagaggtagg agataccctg	1440
	ctgatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccatacaaca tctaccaca cggaatcacc	1500
	gatgtcgggc cactgtacag ccggcggtg ccaaaggag tgaagcacct gaaggatttc	1560
	ccaatcctgc caggagagat cttcaagtac aagtggacag tgacagtga ggatggacca	1620
	accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	1680
	gacctggcct ctggactgat tggaccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag	1740
	agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag	1800
[0006]	aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaacc agccggagt	1860
	cagctggagg atccagagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cggatacgtg	1920
	ttcगतagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cagcaggtgg cctattggta tatcctgagc	1980
	atcggagccc agaccgattt cctgagcgtg ttcttcagcg gatacacctt caagcacaag	2040
	atggtgtacg aggataccct gacctgttc ccattctccg gagagaccgt gttcatgagc	2100
	atggagaacc caggactgtg gatcctggga tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2160
	atgactgccc tgctgaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatta ctatgaggat	2220
	agctatgagg atatctctgc ctacctgtg agcaagaaca atgccattga gccaagaagc	2280
	ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccacctg	2340
	cagtctgatc aggaggagat tgattatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2400
	gattttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccaa gaagcttcca gaagaagacc	2460

	agacactact tcatcgctgc agtggagaga ctgtgggatt atggaatgag cagcagccca	2520
	cacgtgctga gaaacagagc ccagagcgga tctgtgccac agttcaagaa ggtggtgttc	2580
	caggagtcca ccgatggaag cttcaccag ccactgtacc ggggagagct gaacgagcac	2640
	ctgggactgc tgggaccata catccgggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc	2700
	cggaaccagg ccagccggcc atacagcttc tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggat	2760
	cagcggcagg gagccgagcc acggaagaac ttcgtgaagc caaacgagac caagacctac	2820
	ttctggaagg tgcagcacca catggcccca accaaggatg agttcgattg caaggcctgg	2880
	gcctacttca gcgatgtgga tctggagaag gatgtgcaca gcggactgat cggaccactg	2940
	ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccca gccacggac ggcaggtgac cgtgcaggag	3000
	ttcgccctgt tcttcacat cttcgatgag accaagagct ggtacttcac cgagaacatg	3060
	gagcggaaact gccgggcccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3120
[0007]	taccggttcc acgccatcaa cggatacatc atggataccc tgccaggact ggtgatggcc	3180
	caggatcagc ggatccggtg gtacctgctg agcatgggaa gcaacgagaa catccacagc	3240
	atccacttca gcggacacgt gttcacctg cggaagaagg aggagtacaa gatggccctg	3300
	tacaacctgt acccaggagt gttcgagacc gtggagatgc tgccaagcaa ggccggaatc	3360
	tggcgggtgg agtgcctgat cggagagcac ctgcacgccg gaatgagcac cctgttctctg	3420
	gtgtacagca acaagtgcc gacccactg ggaatggcca gcggacacat ccgggatttc	3480
	cagatcaccg ccagcggaca gtacggacag tgggccccaa agctggcccg gctgcactac	3540
	agcgggaagca tcaacgcctg gagcaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg	3600
	ctggccccaa tgatcatcca cggaatcaag acccaggag cccggcagaa gttcagcagc	3660
	ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtg gcagacctac	3720
	cggggaaaca gcaccggaac cctgatggtg ttcttcggaa acgtggatag cagcggaatc	3780

```

aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gcccgatata tccggtgca cccaacccac      3840

tacagcatca gaagcacccct gcggatggag ctgatgggat gtgatctgaa cagctgctcc      3900

atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgccc agatcacccgc cagcagctac      3960

ttcaccaaca tgttgcceac ctggagccca agcaaggccc ggctgcacct gcagggacgg      4020

agcaacgcct ggcggccaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggatttccag      4080

aagaccatga aggtgaccgg agtgaccacc caggagtgta agagcctgct gactagcatg      4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagtggac cctgttcttc      4200

cagaacggaa agtgaaggt gttccaggga aaccaggata gtttcacccc agtggatgaac      4260

agcctggatc caccactgct gaccgatac ctgcggatcc acccacagag ctgggtgcac      4320

cagatcgccc tgagaatgga ggtgctggga tgcgaggccc aggatctgta ctga      4374

```

[0008]

<210> 3
 <211> 1457
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

	Tyr	Lys	Lys	Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	
	65					70					75					80	
	Ala	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	
					85					90						95	
	Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	
				100					105						110		
	His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	
				115					120					125			
	Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	
		130					135					140					
[0009]	Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	
	145					150					155					160	
	Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	
					165					170					175		
	Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	
				180					185					190			
	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	
			195					200					205				
	Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	
		210					215					220					
	Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	
	225					230					235				240		

	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	
		595						600					605				
	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	
	610						615					620					
	Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	
	625					630					635					640	
	Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	
				645					650							655	
	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	
			660						665							670	
[0012]	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	
		675						680					685				
	Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	
	690						695					700					
	Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	
	705					710					715					720	
	Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	
				725						730					735		
	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	
			740						745						750		
	Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	
		755						760					765				

	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	
	770						775					780					
	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	
	785					790					795					800	
	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	
				805						810					815		
	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	
				820					825						830		
	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	
		835						840					845				
[0013]	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	
	850					855						860					
	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	
	865					870					875				880		
	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	
					885					890					895		
	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	
				900					905					910			
	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg	
		915						920					925				
	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	
	930						935					940					

	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp
	945					950					955					960
	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu
					965					970					975	
	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His
				980					985					990		
	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe
		995						1000					1005			
	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	
	1010						1015					1020				
[0014]	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	
	1025						1030					1035				
	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	
	1040						1045					1050				
	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	
	1055						1060					1065				
	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	
	1070						1075					1080				
	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	
	1085						1090					1095				
	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	
	1100						1105					1110				

	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly
	1115						1120					1125			
	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser
	1130						1135					1140			
	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg
	1145						1150					1155			
	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro
	1160						1165					1170			
	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser
	1175						1180					1185			
[0015]	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro
	1190						1195					1200			
	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe
	1205						1210					1215			
	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
	1220						1225					1230			
	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu
	1235						1240					1245			
	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn
	1250						1255					1260			
	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
	1265						1270					1275			

	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly
	1280						1285					1290			
	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys
	1295						1300					1305			
	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
	1310						1315					1320			
	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln
	1325						1330					1335			
	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu
	1340						1345					1350			
[0016]	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val
	1355						1360					1365			
	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys
	1370						1375					1380			
	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu
	1385						1390					1395			
	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp
	1400						1405					1410			
	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr
	1415						1420					1425			
	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala
	1430						1435					1440			

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1445 1450 1455

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建的序列

<400> 4

tgtttgctgc ttgcaatggt tgcccatttt aggg 34

<210> 5

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

[0017] <220>

<223> 构建的序列

<400> 5

ctacctcgtg atcgcccggc ccctgttcaa acatgtccta atactctgtc tctgcaaggg 60

tcatacagtag ttttccatct tactcaacat cctcccagtg 100

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建的序列

<400> 6

aggttaatTT ttaaactggt tgctctggtt aataatctca gg 42

<210> 7

	<211> 190	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 7	
	atttcataga acgaatgttc cgatgctcta atctctctag acaaggttca tatttgtatg	60
	ggttacttat tctctctttg ttgactaagt caataatcag aatcagcagg ttgacagtca	120
	gattggcagg gataagcagc ctagctcagg agaagtgagt ataaaagccc caggctggga	180
	gcagccatca	190
	<210> 8	
	<211> 176	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0018]	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 8	
	actcaaagtt caaaccttat ctttttttgc ttgtttcttc ttggccttgg ttttgtacat	60
	cagctttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggtta atttataact aagagtgtct	120
	tagttttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat gttgctttct gagaga	176
	<210> 9	
	<211> 218	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 9	
	tggacacagg acgctgtggt ttctgagcca gggggcgact cagatcccag ccagtggact	60

	tagccccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatatcca ccagcagcct	120
	cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct	180
	cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaata	218
	<210> 10	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 10	
	aataaagtct gagtgggcgg cagcctgtgt gtgcctgggt tctctctgtc ccggaatgtg	60
	caaacaatgg aggtg	75
[0019]	<210> 11	
	<211> 168	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 11	
	ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt	60
	ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
	aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgtact tatctact	168
	<210> 12	
	<211> 164	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	

	<400> 12	
	gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc	60
	actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgcgc	120
	ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcag	164
	<210> 13	
	<211> 7920	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 13	
	ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt	60
	ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact	120
	[0020] aggggttctt tgtagttaat gattaaccg ccatgctact tatctactta agctacctcg	180
	tgatcgcccg gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
	agttttccat ctactcaac atcctcccag tggaattcat ttcatagaac gaatgttccg	300
	atgctctaata ctctctagac aaggttcata ttgtatggg ttacttattc tctctttgtt	360
	gactaagtca ataatacagaa tcagcaggtt tgcagtcaga ttggcaggga taagcagcct	420
	agctcaggag aagtgagtat aaaagcccca ggctgggagc agccatcagc ggccgccacc	480
	atgcagatcg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggttctg cttctccgcc	540
	acccggcggg actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gacgatctg	600
	ggagagctgc cagtggatgc ccggttccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac	660
	accagcgtgg tgtacaagaa gaccctgttc gtggagtcca ccgatcacct gttcaacatc	720
	gccaaagccac ggccaccctg gatgggactg ctgggaccaa ccatccaggc cgaggtgtac	780

	gataccgtgg tgatcaccct gaagaacatg gcctctcatc ctgtgtccct gcacgccgtg	840
	ggagtgagct actggaaggc cagcgaggga gccgagtacg atgatcagac cagccagcgg	900
	gagaaggagg atgataaggt gttcccagga ggaagccaca cctacgtgtg gcaggtgtg	960
	aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac	1020
	gtggatctgg tgaaggatct gaacagcgga ctgatcggag ccctgctggt gtgccgggag	1080
	ggaagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gttcgccgtg	1140
	ttcgatgagg gaaagagctg gcacagcgag accaagaaca gcctgatgca ggatcgggat	1200
	gccgccagcg cccgggcctg gccaaagatg cacaccgtga acggatacgt gaaccggagc	1260
	ctgccaggac tgatcggatg ccaccggaag agcgtgtact ggcacgtgat cggaatggga	1320
	accaccccag aggtgcactc tatcttcctg gagggacaca cttttctggt gcggaaccac	1380
	cggcaggcca gcctggagat cagcccaatc accttcctga ccgcccagac cctgctgatg	1440
[0021]	gatctgggac agttcctgct gttctgccat atcagcagcc accagcacga tggaatggag	1500
	gcctacgtga aggtggatag ctgccagag gagccacagc tgcggatgaa gaacaacgag	1560
	gaggccgagg attacgatga tgatctgacc gatagcgaga tggatgtggt gcggttcgat	1620
	gatgataaca gccaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaagacc	1680
	tgggtgcact acatgccgc cgaggaggag gattgggatt acgccccact ggtgctggcc	1740
	cctgatgata ggagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gaccacagcg gatcggacgg	1800
	aagtacaaaa aagtgcggtt catggcctac accgatgaga cttcaagac ccgggaggcc	1860
	atccagcacg agagcggaat cctgggacca ctgctgtacg gagaggtggg agataccctg	1920
	ctgatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccatacaaca tctaccaca cggaatcacc	1980
	gatgtcggc cactgtacag ccggcggtg ccaaaggag tgaagcacct gaaggatttc	2040
	ccaatcctgc caggagagat cttcaagtac aagtggacag tgacagtgga ggatggacca	2100

[0022]

accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	2160
gacctggcct ctggactgat tggaccactg ctgatctgct acaaggagtc tgttgatcag	2220
agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc tgttctctgt gtttgatgag	2280
aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaaccc agccggagtg	2340
cagctggagg atccagagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cggatacgtg	2400
ttcगतagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cagcaggtgg cctattggta tatcctgagc	2460
atcggagccc agaccgattt cctgagcgtg ttcttcagcg gatacacctt caagcacaag	2520
atggtgtacg aggataccct gacctgttc ccattctccg gagagaccgt gttcatgagc	2580
atggagaacc caggactgtg gatcctggga tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2640
atgactgccc tgctgaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatta ctatgaggat	2700
agctatgagg atatctctgc ctacctgtg agcaagaaca atgccattga gccaagaagc	2760
ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2820
cagtctgac aggaggagat tgattatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2880
gattttgata tctatgatga ggatgagaac cagagcccaa gaagcttcca gaagaagacc	2940
agacactact tcatcgctgc agtggagaga ctgtgggatt atggaatgag cagcagccca	3000
cacgtgctga gaaacagagc ccagagcgga tctgtgccac agttcaagaa ggtggtgttc	3060
caggagtcca ccgatggaag cttcaccag ccactgtacc ggggagagct gaacgagcac	3120
ctgggactgc tgggaccata catccgggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccttc	3180
cggaaccagg ccagccggcc atacagcttc tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggat	3240
cagcggcagg gagccgagcc acggaagaac ttcgtgaagc caaacgagac caagacctac	3300
ttctggaagg tgcagacca catggcccca accaaggatg agttcgattg caaggcctgg	3360
gcctacttca gcgatgtgga tctggagaag gatgtgcaca gcggactgat cggaccactg	3420

	ctggtgtgcc acaccaacac cctgaaccca gcccacggac ggcaggtgac cgtgcaggag	3480
	ttcgcctgt tcttcacat cttcatgag accaagagct ggtacttcac cgagaacatg	3540
	gagcggaact gccgggcccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3600
	taccggttcc acgcatcaa cggatacatc atggataccc tgccaggact ggtgatggcc	3660
	caggatcagc ggatccggtg gtacctgctg agcatgggaa gcaacgagaa catccacagc	3720
	atccacttca gcggacacgt gttcacctg cggaagaagg aggagtacaa gatggccctg	3780
	tacaacctgt acccaggagt gttcagacc gtggagatgc tgccaagcaa ggccggaatc	3840
	tggcgggtgg agtgcctgat cggagagcac ctgcacgccg gaatgagcac cctgttctg	3900
	gtgtacagca acaagtgcc aacccactg ggaatggcca gcggacacat ccgggatttc	3960
	cagatcacccg ccagcggaca gtacggacag tgggccccaa agctggcccc gctgcactac	4020
	agcgggaagca tcaacgcctg gagcaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg	4080
[0023]	ctggccccaa tgatcatcca cggaatcaag acccaggag cccggcagaa gttcagcagc	4140
	ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtg gcagacctac	4200
	cggggaacaa gcaccggaac cctgatggtg ttcttcggaa acgtggatag cagcggaaatc	4260
	aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gccgataca tccggctgca cccaaccac	4320
	tacagcatca gaagcaccct gcggatggag ctgatgggat gtgatctgaa cagctgctcc	4380
	atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgccc agatcacccg cagcagctac	4440
	ttcaccaaca tgttcgccac ctggagccca agcaaggccc ggctgcacct gcagggacgg	4500
	agcaacgcct ggccggccaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggatttccag	4560
	aagaccatga aggtgaccgg agtgaccacc caggagtgga agagcctgct gactagcatg	4620
	tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagtggac cctgttcttc	4680
	cagaacggaa aggtgaaggt gttccaggga aaccaggata gcttcacccc agtgggtgaac	4740

	agcctggatc caccactgct gacccgatac ctgcggatcc acccacagag ctgggtgcac	4800
	cagatcgccc tgagaatgga ggtgctggga tgcgaggccc aggatctgta ctgatgagca	4860
	tgcaataaag tctgagtggg cggcagcctg tgtgtgcctg ggttctctct gtcccggaat	4920
	gtgcaaacaa tggaggtgct cgagtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca	4980
	aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgtcgcctcg ctactgagg	5040
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccgg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc	5100
	gagcgcgcag ccttaattaa cctaattcac tggcgcctgt tttacaacgt cgtgactggg	5160
	aaaaccctgg cgttacceaa cttaatgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc	5220
	gtaatagcga agaggcccg accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg	5280
	aatgggacgc gccctgtagc ggcgcatata gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg	5340
	tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttccttc	5400
[0024]	tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttaggttcc	5460
	gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttaggtgat ggttcacgta	5520
	gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta	5580
	atagtggaact cttgttccaa actggaacaa cactcaacce tatctcggtc tattcttttg	5640
	atttataagg gatthttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa	5700
	aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcggg	5760
	aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgt	5820
	catgagacaa taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat	5880
	tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc	5940
	tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg	6000
	ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg	6060

	ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga	6120
	cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta	6180
	ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	6240
	tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc	6300
	gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg	6360
	ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc	6420
	aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag ctccccgca	6480
	acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccactctgc gctcgccct	6540
	tccggctggc tggtttattg ctgataaate tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat	6600
	cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg	6660
	gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat	6720
[0025]	taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact	6780
	tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat	6840
	cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	6900
	ttcttgagat ctttttttgc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct	6960
	accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg	7020
	cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca	7080
	cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	7140
	tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga	7200
	taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	7260
	gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga	7320
	agggagaaag gcggacaggt atccggtgaa cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	7380

	ggagcttcca gggggaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg	7440
	acttgagcgt cgatTTTTgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag	7500
	caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc	7560
	tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc	7620
	tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgcgc	7680
	aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag	7740
	gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca	7800
	ttaggcaccc cagcctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag	7860
	cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccagat ttaattaagg	7920
[0026]	<210> 14	
	<211> 8004	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 14	
	ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
	ggtcggccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
	aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctactta agctacctcg	180
	tgatcgcccg gcccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
	agttttccat ctactcaac atcttcccag tgaggttaat ttttaaactg tttgctctgg	300
	ttaataatct caggaggtta atttttaaac tgtttgctct ggttaataat ctgagggaat	360
	tcatttcata gaacgaatgt tccgatgctc taatctctct agacaaggtt catatttgta	420
	tgggttactt attctctctt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca ggtttgcagt	480

	cagattggca gggataagca gcctagctca ggagaagtga gtataaaagc cccaggctgg	540
	gagcagccat cagcggccgc caccatgcag atcgagctga gcacctgctt cttcctgtgc	600
	ctgctgcggt tctgcttctc cgccaccgag cggtactacc tgggagccgt ggagctgagc	660
	tgggattaca tgcagagcga tctgggagag ctgccagtgg atgcccgtt cccaccacgg	720
	gtgcaaaga gcttccatt caacaccagc gtggtgtaca agaagaccct gttcgtggag	780
	ttcaccgatc acctgttcaa catcgccaag ccacggccac cctggatggg actgctggga	840
	ccaaccatcc aggccgaggt gtacgatacc gtggtgatca ccctgaagaa catggcctct	900
	catcctgtgt ccctgcacgc cgtgggagtg agctactgga aggccagcga gggagccgag	960
	tacgatgatc agaccagcca gcgggagaag gaggatgata aggtgttccc aggaggaagc	1020
	cacacctacg tgtggcaggt gctgaaggag aacggaccaa tggccagcga tccactgtgc	1080
	ctgacctaca gctacctgag ccacgtggat ctggtgaagg atctgaacag cggactgatc	1140
[0027]	ggagccctgc tgggtgtgccg ggagggaagc ctggccaagg agaagacca gaccctgcac	1200
	aagtcatcc tgctgttcgc cgtgttcgat gagggaaaga gctggcacag cgagaccaag	1260
	aacagcctga tgcaggatcg ggatgccgcc agcggccggg cctggccaaa gatgcacacc	1320
	gtgaacggat acgtgaaccg gagcctgcca ggactgatcg gatgccaccg gaagagcgtg	1380
	tactggcacg tgatcggaat gggaaccacc ccagaggtgc actctatctt cctggaggga	1440
	cacacctttc tgggtgcgaa ccaccggcag gccagcctgg agatcagccc aatcaccttc	1500
	ctgaccgccc agacctgct gatggatctg ggacagtcc tgctgttctg ccatatcagc	1560
	agccaccagc acgatggaat ggaggcctac gtgaaggtgg atagctgcc agaggagcca	1620
	cagctgcgga tgaagaacaa cgaggaggcc gaggattacg atgatgatct gaccgatagc	1680
	gagatggatg tgggtgcggtt cgatgatgat aacagcccaa gcttcatcca gatccggagc	1740
	gtggccaaga agcacccaaa gacctgggtg cactacatcg ccgccgagga ggagattgg	1800

	gattacgccc cactggtgct ggcccctgat gatcggagct acaagagcca gtacctgaac	1860
	aacggaccac agcggatcgg acggaagtac aaaaaagtgc ggttcatggc ctacaccgat	1920
	gagaccttca agacccggga ggccatccag cacgagagcg gaatcctggg accactgctg	1980
	tacggagagg tgggagatac cctgctgatac atcttcaaga accaggccag ccggccatac	2040
	aacatctacc cacacggaat caccgatgtg cggccactgt acagccggcg gctgccaaag	2100
	ggagtgaagc acctgaagga tttcccaatc ctgccaggag agatcttcaa gtacaagtgg	2160
	acagtgcagc tggaggatgg accaaccaag tctgatccaa gatgcctgac cagatactac	2220
	agcagctttg tgaacatgga gagagacctg gcctctggac tgattggacc actgctgatac	2280
	tgctacaagg agtctgtgga tcagagagga aaccagatca tgtctgataa gagaaatgtg	2340
	atcctgttct ctgtgtttga tgagaacaga agctgggtacc tgacagagaa catccagaga	2400
	ttcctgccaa acccagccgg agtgcagctg gaggatccag agttccaggc cagcaacatc	2460
[0028]	atgcacagca tcaacggata cgtgttcgat agcctgcagc tgagcgtgtg cctgcacgag	2520
	gtggcctatt ggtatatacct gagcatcgga gccagaccg atttcctgag cgtgttcttc	2580
	agcggataca ccttcaagca caagatggtg tacgaggata ccctgaccct gtteccattc	2640
	tccggagaga ccgtgttcat gagcatggag aaccagagc tgtggatcct gggatgccac	2700
	aactctgatt tcagaaacag aggaatgact gcctgtctga aagtgtccag ctgtgataag	2760
	aacactggag attactatga ggatagctat gaggatatct ctgcctacct gctgagcaag	2820
	aacaatgcca ttgagccaag aagcttcagc cagaaccac cagtgtctga gagacaccag	2880
	agagagatca ccagaaccac cctgcagtct gatcaggagg agattgatta tgatgatacc	2940
	atctctgtgg agatgaagaa ggaggatctt gatatctatg atgaggatga gaaccagagc	3000
	ccaagaagct tccagaagaa gaccagacac tacttcatcg ctgcagtgga gagactgtgg	3060
	gattatggaa tgagcagcag cccacacgtg ctgagaaaca gagcccagag cggatctgtg	3120

	ccacagttca agaaggtggt gttccaggag ttcaccgatg gaagcttcac ccagccactg	3180
	taccggggag agctgaacga gcacctggga ctgctgggac catacatccg ggccgaggtg	3240
	gaggataaca tcatggtgac cttccggaac caggccagcc ggccatacag cttctacagc	3300
	agcctgatca gctacgagga ggatcagcgg caggagccg agccacggaa gaacttcgtg	3360
	aagccaaacg agaccaagac ctacttctgg aaggtgcagc accacatggc cccaaccaag	3420
	gatgagttcg attgcaaggc ctgggcctac ttcagcgatg tggatctgga gaaggatgtg	3480
	cacagcggac tgateggacc actgctggtg tgccacacca acacctgaa cccagcccac	3540
	ggacggcagg tgacctgca ggagtgcgc ctgttcttca ccattctga tgagaccaag	3600
	agctggtact tcaccgagaa catggagcgg aactgccggg ccccttgaa catccagatg	3660
	gaggatccaa ccttcaagga gaactaccgg ttccacgcca tcaacggata catcatgat	3720
	acctgccag gactggtgat ggcccaggat cagcggatcc ggtggtacct gctgagcatg	3780
[0029]	ggaagcaacg agaacatcca cagcatccac ttcagcggac acgtgttcac cgtgcggaag	3840
	aaggaggagt acaagatggc cctgtacaac ctgtaccag gagtgttcga gaccgtggag	3900
	atgctgcaa gcaaggccgg aatctggcgg gtggagtgc tgatcggaga gcacctgcac	3960
	gccggaatga gcacctgtt cctggtgtac agcaacaagt gccagacccc actgggaatg	4020
	gccagcggac acatccggga tttccagatc accgccagcg gacagtacgg acagtgggcc	4080
	ccaaagctgg cccggctgca ctacagcgga agcatcaacg cctggagcac caaggagcca	4140
	ttcagctgga tcaaagtgga tctgtggcc ccaatgatca tccacggaat caagaccag	4200
	ggagcccgcc agaagttcag cagcctgtac atcagccagt tcatcatcat gtacagcctg	4260
	gatggaaaga agtggcagac ctaccgggga aacagcaccg gaacctgat ggtgttcttc	4320
	ggaaacgtgg atagcagcgg aatcaagcac aacatcttca accaccaat catgccccga	4380
	tacatccggc tgcacccaac ccactacagc atcagaagca ccctgcggat ggagctgatg	4440

	ggatgtgata tgaacagctg ctccatgcc a ctgggaatgg agagcaaggc catcagcgat	4500
	gcccagatca ccgccagcag ctacttcacc aacatgttcg ccacctggag cccaagcaag	4560
	gccccgctgc acctgcaggg acggagcaac gcctggcggc cacaggtgaa taaccctaaag	4620
	gagtggctgc aggtggattt ccagaagacc atgaaggtga ccggagtga caccagggga	4680
	gtgaagagcc tgctgactag catgtatgtg aaggagttcc tgatcagcag cagccaggat	4740
	ggacaccagt ggacctgtt cttccagaac ggaaaggtga aggtgttcca gggaaaccag	4800
	gatagcttca cccagtggt gaacagcctg gatccaccac tgctgacctg atacctgcgg	4860
	atccaccac agagctgggt gcaccagatc gccctgagaa tggaggtgct gggatgcgag	4920
	gcccaggatc tgtactgatg agcatgcaat aaagtctgag tgggcggcag cctgtgtgtg	4980
	cctgggttct ctctgtcccg gaatgtgcaa acaatggagg tgctcgagta gataagtagc	5040
	atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggc actccctctc	5100
[0030]	tgcgcgctcg ctgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cggccgacgc cgggctttg	5160
	ccggggcggc ctcatgagc gagcgagcgc gcagccttaa ttaacctaat tcatggccg	5220
	tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaactaat cgccttgacg	5280
	cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc	5340
	aacagttgcg cagcctgaat ggcgaaatgg acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg	5400
	cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc	5460
	ctttcgcttt ctcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa	5520
	atcgggggct ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctgac cccaaaaaac	5580
	ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt	5640
	tgacgttga gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca	5700
	accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt	5760

	taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta	5820
	caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta	5880
	aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata	5940
	ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttcccggtgc gcccttattc cttttttgc	6000
	ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	6060
	agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	6120
	tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg	6180
	tggcgcggtta ttatcccgta ttgacgcgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta	6240
	ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	6300
	gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt	6360
	actctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	6420
[0031]	tcattgaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	6480
	gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat taactggcga	6540
	actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc	6600
	aggaccactt ctgcgctcgg cccttcggc tggttggttt attgctgata aatctggagc	6660
	cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	6720
	tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	6780
	cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag ttactcata	6840
	tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct	6900
	ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	6960
	ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg	7020
	cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc	7080

	aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag ataccaaata ctgtttctt	7140
	agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	7200
	tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	7260
	ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg	7320
	cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct	7380
	atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	7440
	ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	7500
	tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	7560
	gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttctg	7620
	gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac	7680
	cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt	7740
[0032]	gagcgaggaa gcggaagagc gccaatacag caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat	7800
	tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc	7860
	aattaatgtg agttagctca ctcatagga accccaggct ttacacttta tgcttccggc	7920
	tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca	7980
	tgattacgcc agatttaatt aagg	8004
	<210> 15	
	<211> 7948	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建的序列	
	<400> 15	
	ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt	60

	ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
	aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactta agctacctcg	180
	tgatcgcccc gcccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
	agttttccat cttactcaac atcctcccag tggaattctg gacacaggac gctgtggttt	300
	ctgagccagg gggcgactca gatcccagcc agtggactta gcccctgttt gctcctccga	360
	taactggggt gaccttggtt aatattcacc agcagcctcc cccgttgecc ctctggatcc	420
	actgcttaaa tacggacgag gacagggecc tgtctctca gcttcaggca ccaccactga	480
	cctgggacag tgaatagcgg ccgccacat gcagatcgag ctgagcacct gcttcttcct	540
	gtgcctgctg cggttctgct tctccgccac ccggcgttac tacctgggag ccgtggagct	600
	gagctgggat tacatgcaga gcgatctggg agagctgcca gtggatgccc ggttcccacc	660
	acgggtgcca aagagcttcc cattcaacac cagcgtggtg tacaagaaga cctgtttcgt	720
[0033]	ggagttcacc gatcacctgt tcaacatcgc caagccacgg ccaccctgga tgggactgct	780
	gggaccaacc atccaggccg aggtgtacga taccgtggtg atcacctga agaacatggc	840
	ctctcatcct gtgtccctgc acgccgtggg agtgagctac tggaaggcca gcgagggagc	900
	cgagtacgat gatcagacca gccagcggga gaaggaggat gataaggtgt tcccaggagg	960
	aagccacacc tacgtgtggc aggtgtctgaa ggagaacgga ccaatggcca gcgatccact	1020
	gtgcctgacc tacagctacc tgagccacgt ggatctggtg aaggatctga acagcggact	1080
	gatcggagcc ctgctggtgt gccgggaggg aagcctggcc aaggagaaga cccagaccct	1140
	gcacaagttc atcctgctgt tcgccgtgtt cgatgaggga aagagctggc acagcgagac	1200
	caagaacagc ctgatgcagg atcgggatgc cgccagcgc cgggcctggc caaagatgca	1260
	caccgtgaac ggatactga accggagcct gccaggactg atcggatgcc accggaagag	1320
	cgtgtactgg cacgtgatcg gaatgggaac caccacagag gtgcactcta tcttcttgga	1380

[0034]	gggacacacc tttctggtgc ggaaccaccg gcaggccagc ctggagatca gccaatcac	1440
	cttcctgacc gcccagaccc tgctgatgga tctgggacag ttctgctgt tctgccatat	1500
	cagcagccac cagcacgatg gaatggaggc ctacgtgaag gtggatagct gcccagagga	1560
	gccacagctg cggatgaaga acaacgagga ggccgaggat tacgatgatg atctgaccga	1620
	tagcgagatg gatgtggtgc ggttcgatga tgataacagc ccaagcttca tccagatccg	1680
	gagcgtggcc aagaagcacc caaagacctg ggtgcactac atcgccgccg aggaggagga	1740
	ttgggattac gcccactgg tgctggcccc tgatgatcgg agctacaaga gccagtacct	1800
	gaacaacgga ccacagcgga tcggacggaa gtacaaaaaa gtgcggttca tggcctacac	1860
	cgatgagacc ttcaagaccc gggaggccat ccagcacgag agcggaatcc tgggaccact	1920
	gctgtacgga gaggtgggag ataccctgct gatcatcttc aagaaccagg ccagccggcc	1980
	atacaacatc taccacacg gaatcaccga tgtgcggcca ctgtacagcc ggcggtgcc	2040
	aaagggagtg aagcacctga aggatttccc aatcctgccg ggagagatct tcaagtacaa	2100
	gtggacagtg acagtggagg atggaccaac caagtctgat ccaagatgcc tgaccagata	2160
	ctacagcagc tttgtgaaca tggagagaga cctggcctct ggactgattg gaccactgct	2220
	gatctgctac aaggagtctg tggatcagag aggaaaccag atcatgtctg ataagagaaa	2280
	tgtgatcctg ttctctgtgt ttgatgagaa cagaagctgg tacctgacag agaacatcca	2340
	gagattcctg ccaaaccag ccggagtgca gctggaggat ccagagttcc aggccagcaa	2400
	catcatgcac agcatcaacg gatacgtgtt cgatagcctg cagctgagcg tgtgcctgca	2460
	cgagggtggc tatttgtata tctgagcat cggagcccag accgatttcc tgagcgtgtt	2520
	cttcagcgga tacaccttca agcacaagat ggtgtacgag gataccctga cctgtttccc	2580
	attctccgga gagaccgtgt tcatgagcat ggagaaccca ggactgtgga tcctgggatg	2640
	ccacaactct gatttcagaa acagaggaat gactgccctg ctgaaagtgt ccagctgtga	2700

	taagaacact ggagattact atgaggatag ctatgaggat atctctgcct acctgctgag	2760
	caagaacaat gccattgagc caagaagctt cagccagaac ccaccagtgc tgaagagaca	2820
	ccagagagag atcaccagaa ccacctgca gtctgatcag gaggagattg attatgatga	2880
	taccatctct gtggagatga agaaggagga ttttgataac tatgatgagg atgagaacca	2940
	gagcccaaga agcttccaga agaagaccag acactacttc atcgctgcag tggagagact	3000
	gtgggattat ggaatgagca gcagcccaca cgtgctgaga aacagagccc agagcggatc	3060
	tgtgccacag ttcaagaagg tgggtgtcca ggagttcacc gatggaagct tcaccagcc	3120
	actgtaccgg ggagagctga acgagcacct gggactgctg ggaccataca tccgggccga	3180
	ggtggaggat aacatcatgg tgaccttccg gaaccaggcc agccggccat acagcttcta	3240
	cagcagcctg atcagctacg aggaggatca gcggcaggga gccgagccac ggaagaactt	3300
	cgtgaagcca aacgagacca agacctactt ctggaagggt cagcaccaca tggccccaac	3360
[0035]	caaggatgag ttcgattgca aggcctgggc ctacttcagc gatgtggatc tggagaagga	3420
	tgtgcacagc ggactgatcg gaccactgct ggtgtgccac accaacaccc tgaaccagc	3480
	ccacggacgg caggtgaccg tgcaggagtt cgccctgttc ttcaccatct tcgatgagac	3540
	caagagctgg tacttcaccg agaacatgga gcggaactgc cgggcccctt gcaacatcca	3600
	gatggaggat ccaaccttca aggagaacta ccggttccac gccatcaacg gatacatcat	3660
	ggataccctg ccaggactgg tgatggccca ggatcagcgg atccggtggt acctgctgag	3720
	catgggaagc aacgagaaca tccacagcat ccacttcagc ggacacgtgt tcaccgtgcg	3780
	gaagaaggag gagtacaaga tggccctgta caacctgtac ccaggagtgt tcgagaccgt	3840
	ggagatgctg ccaagcaagg ccggaatctg gcgggtggag tgcctgatcg gagagcacct	3900
	gcacgccgga atgagcacc tgttcctggt gtacagcaac aagtgccaga cccactggg	3960
	aatggccagc ggacacatcc gggatttcca gatcaccgcc agcggacagt acggacagt	4020

	ggccccaag ctggcccgc tgcactacag cggaagcatc aacgcctgga gcaccaagga	4080
	gccattcagc tggatcaaag tggatctgct ggccccaatg atcatccacg gaatcaagac	4140
	ccaggagacc cggcagaagt tcagcagcct gtacatcagc cagttcatca tcatgtacag	4200
	cctggatgga aagaagtggc agacctaccg gggaaacagc accggaaccc tgatggtgtt	4260
	cttcggaaac gtggatagca gcggaatcaa gcacaacatc ttcaaccac caatcatcgc	4320
	ccgatacatc cggtgcacc caaccacta cagcatcaga agcaccctgc ggatggagct	4380
	gatgggatgt gatctgaaca gctgtccat gccactggga atggagagca aggccatcag	4440
	cgatgccag atcaccgcca gcagctactt caccaacatg ttgccacct ggagcccaag	4500
	caagccccgg ctgcacctgc agggacggag caacgcctgg cggccacagg tgaataaccc	4560
	aaaggagtgg ctgcaggtgg atttccagaa gaccatgaag gtgaccggag tgaccacca	4620
	gggagtgaag agcctgctga ctagcatgta tgtgaaggag ttctgatca gcagcagcca	4680
[0036]	ggatggacac cagtggaccc tgttcttcca gaacggaaag gtgaagggtt tccagggaaa	4740
	ccaggatagc ttcaccccag tggatgaacag cctggatcca ccatgctga cccgatacct	4800
	gcggatccac ccacagagct ggggtcacca gatcgccctg agaatggagg tgctgggatg	4860
	cgaggcccag gatctgtact gatgagcatg caataaagtc tgagtgggcg gcagcctgtg	4920
	tgtgcctggg ttctctctgt cccggaatgt gcaacaatg gaggtgctcg agtagataag	4980
	tagcatggcg ggtaaatcat taactacaag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc	5040
	tctctgcgcg ctgctcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc	5100
	tttccccggg cgccctcagt gagcgagcga gcgcgcagcc ttaattaacc taattcactg	5160
	gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatgcctt	5220
	gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgac cgatcgccct	5280
	tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc	5340

	gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc ctagcgccc	5400
	gctcctttcg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc cgtcaagct	5460
	ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgacccaaa	5520
	aaacttgatt agggatgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc	5580
	cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca	5640
	ctcaacccta tctcgttcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat	5700
	tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg	5760
	cttacaattt aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccttatt tgtttattt	5820
	tctaaataca ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata acctgataa atgcttcaat	5880
	aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attcccttt	5940
	ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	6000
[0037]	ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	6060
	tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc	6120
	tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatc	6180
	actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat ctacggatg	6240
	gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat gagtataac actgcggcca	6300
	acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgttttttg cacaacatgg	6360
	gggatcatgt aactgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	6420
	acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg	6480
	gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	6540
	ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggttggtg gtttatgtg gataaatctg	6600
	gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	6660

	cccgatatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	6720
	agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	6780
	catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	6840
	tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	6900
	cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	6960
	gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc	7020
	taccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	7080
	ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	7140
	tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	7200
	ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	7260
	cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	7320
[0038]	agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat ccggtaaagc	7380
	gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt	7440
	atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	7500
	gggggcggag cctatgaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt	7560
	gctggccttt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	7620
	ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat	7680
	cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	7740
	cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgaactg gaaagcgggc agtgagcga	7800
	acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc	7860
	cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	7920
	accatgatta cgccagattt aattaagg	7948

<210> 16
 <211> 8032
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 构建的序列

<400> 16
 ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
 ggtcgcgccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
 aggggttcct ttagttaat gattaaccgc ccatgtact tatctactta agctacctcg 180
 tgatgcgccg gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt 240
 agttttccat ctactcaac atcctccag tgaggttaat ttttaactg tttgctctgg 300
 ttaataatct caggaggtta atttttaaac tgtttgctct ggttaataat ctccaggaat 360
 [0039] tctggacaca ggacgtgtg gtttctgagc cagggggcga ctccagatccc agccagtgga 420
 cttagcccct gtttctcct ccgataactg gggtagacctt ggttaatat caccagcagc 480
 ctccccgtt gccctcttg atccactgt taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc 540
 ctccagctca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaata gcggccgcca ccatgcagat 600
 cgagctgagc acctgttct tctgtgcct gctgcggttc tgcttctccg ccacccggcg 660
 gtactacctg ggagccgttg agctgagctg ggattacatg cagagcgatc tgggagagct 720
 gccagtggat gcccggttc caccacgggt gccaaagagc ttccattca acaccagcgt 780
 ggtgtacaag aagacctgt tcgtggagtt caccgatcac ctgttcaaca tcgccaagcc 840
 acggccaccc tggatgggac tgctgggacc aaccatccag gccgaggtgt acgataccgt 900
 ggtgatcacc ctgaagaaca tggcctctca tctgtgtcc ctgcacgccg tgggagttag 960
 ctactggaag gccagcgagg gagccgagta cgatgatcag accagccagc gggagaagga 1020

	ggatgataag gtgttcccag gaggaagcca cacctacgtg tggcaggtgc tgaaggagaa	1080
	cggaccaatg gccagcgatc cactgtgcct gacctacagc tacctgagcc acgtggatct	1140
	ggtgaaggat ctgaacagcg gactgatcgg agccctgctg gtgtgccggg agggaagcct	1200
	ggccaaggag aagaccaga ccctgcacaa gtctatcctg ctgttcgccg tgttcgatga	1260
	gggaaagagc tggcacagcg agaccaagaa cagcctgatg caggatcggg atgccgccag	1320
	cggccgggcc tggccaaaga tgcacaccgt gaacggatac gtgaaccgga gcctgccagg	1380
	actgatcgga tgccaccgga agagcgtgta ctggcacgtg atcggaatgg gaaccacccc	1440
	agaggtgcac tctatcttcc tggagggaca cacccttctg gtgcggaacc accggcaggc	1500
	cagcctggag atcagcccaa tcaccttctt gaccgcccag accctgctga tggatctggg	1560
	acagttcctg ctgttctgcc atatcagcag ccaccagcac gatggaatgg aggcctacgt	1620
	gaaggtggat agctgcccag aggagccaca gctgcggatg aagaacaacg aggaggccga	1680
[0040]	ggattacgat gatgatctga ccgatagcga gatggatgtg gtgcggttcg atgatgataa	1740
	cagcccaagc ttcattcaga tccggagcgt ggccaagaag cacccaaaga cctgggtgca	1800
	ctacatcgcc gccgaggagg aggattggga ttacgcccc a ctggtgctgg cccctgatga	1860
	tcggagctac aagagccagt acctgaacaa cggaccacag cggatcggac ggaagtacaa	1920
	aaaagtgcgg ttcattgcct acaccgatga gaccttcaag acccgggagg ccatccagca	1980
	cgagagcgga atcctgggac cactgctgta cggagaggtg ggagataccc tgctgatcat	2040
	cttcaagaac caggccagcc ggccatacaa catctacca cacggaatca ccgatgtgcg	2100
	gccactgtac agccggcggc tgccaaaggg agtgaagcac ctgaaggatt tcccaatcct	2160
	gccaggagag atcttcaagt acaagtggac agtgacagtg gaggatggac caaccaagtc	2220
	tgatccaaga tgcctgacca gatactacag cagctttgtg aacatggaga gagacctggc	2280
	ctctggactg atttgaccac tgctgatctg ctacaaggag tctgtggatc agagaggaaa	2340

	ccagatcatg tctgataaga gaaatgtgat cctgttctct gtgtttgatg agaacagaag	2400
	ctggtacctg acagagaaca tccagagatt cctgccaaac ccagccggag tgcagctgga	2460
	ggatccagag ttccaggcca gcaacatcat gcacagcatc aacggatacg tgttcgatag	2520
	cctgcagctg agcgtgtgcc tgcacgaggt ggcctattgg tatatcctga gcatcggagc	2580
	ccagaccgat ttcttgagcg tgttcttcag cggatacacc ttcaagcaca agatggtgta	2640
	cgaggatacc ctgaccctgt tccattctc cggagagacc gtgttcatga gcatggagaa	2700
	cccaggactg tggatcctgg gatgccacaa ctctgatttc agaaacagag gaatgactgc	2760
	cctgtctaaa gtgtccagct gtgataagaa cactggagat tactatgagg atagctatga	2820
	ggatatctct gcctacctgc tgagcaagaa caatgccatt gagccaagaa gcttcagcca	2880
	gaacccacca gtgctgaaga gacaccagag agagatcacc agaaccaccc tgcagtctga	2940
	tcaggaggag attgattatg atgataccat ctctgtggag atgaagaagg aggattttga	3000
[0041]	tatctatgat gaggatgaga accagagccc aagaagcttc cagaagaaga ccagacacta	3060
	cttcacgct gcagtggaga gactgtggga ttatggaatg agcagcagcc cacacgtgct	3120
	gagaaacaga gcccagagcg gatctgtgcc acagttcaag aaggtggtgt tccaggagtt	3180
	caccgatgga agcttcaccc agccactgta ccggggagag ctgaacgagc acctgggact	3240
	gctgggacca tacatccggg ccgaggtgga ggataacatc atggtgacct tccggaacca	3300
	ggccagccgg ccatacagct tctacagcag cctgatcagc tacgaggagg atcagcggca	3360
	gggagccgag ccacggaaga acttcgtgaa gccaaacgag accaagacct acttctggaa	3420
	ggtgcagcac cacatggccc caaccaagga tgagttcgat tgcaaggcct gggectactt	3480
	cagcgatgtg gatctggaga aggatgtgca cagcggactg atcggaccac tgctggtgtg	3540
	ccacaccaac accctgaacc cagcccacgg acggcaggtg accgtgcagg agttcgccct	3600
	gttcttcacc atcttcgatg agaccaagag ctggtacttc accgagaaca tggagcggaa	3660

	ctgccgggcc ccttgcaaca tccagatgga ggatccaacc ttcaaggaga actaccggtt	3720
	ccacgccatc aacggataca tcatggatac cctgccagga ctggtgatgg cccaggatca	3780
	gcggatccgg tggtagctgc tgagcatggg aagcaacgag aacatccaca gcatccactt	3840
	cagcggacac gtgttcaccg tgcggaagaa ggaggagtac aagatggccc tgtacaacct	3900
	gtaccacagga gtgttcgaga ccgtggagat gctgccaagc aaggccggaa tctggcgggt	3960
	ggagtgcctg atcggagagc acctgcacgc cggaatgagc accctgttcc tgggtgtacag	4020
	caacaagtgc cagaccccac tgggaatggc cagcggacac atccgggatt tccagatcac	4080
	cgccagcggg cagtacggac agtgggcccc aaagctggcc cggctgcact acagcgggaag	4140
	catcaacgcc tggagcacca aggagccatt cagctggatc aaagtggatc tgctggcccc	4200
	aatgatcatc cacggaatca agaccaggg agcccggcag aagttcagca gcctgtacat	4260
	cagccagttc atcatcatgt acagcctgga tggaaagaag tggcagacct accggggaaa	4320
[0042]	cagcaccgga accctgatgg tgttcttcgg aaacgtggat agcagcggaa tcaagcaca	4380
	catcttcaac ccaccaatca tcgcccagata catccggctg cacccaacct actacagcat	4440
	cagaagcacc ctgcggatgg agctgatggg atgtgatctg aacagctgct ccatgccact	4500
	gggaatggag agcaaggcca tcagcgatgc ccagatcacc gccagcagct acttcaccaa	4560
	catgttcgcc acctggagcc caagcaaggc ccggctgcac ctgcagggac ggagcaacgc	4620
	ctggcggcca caggtgaata acccaaagga gtggctgcag gtggatttcc agaagacat	4680
	gaaggtgacc ggagtgacca cccagggagt gaagagcctg ctgactagca tgtatgtgaa	4740
	ggagtctctg atcagcagca gccaggatgg acaccagtgg accctgttct tccagaacgg	4800
	aaagtggaag gtgttcagg gaaaccagga tagcttcacc ccagtggatga acagcctgga	4860
	tccaccactg ctgacccgat acctgcggat ccaccacag agctgggtgc accagatcgc	4920
	cctgagaatg gaggtgctgg gatgcgaggc ccagatctg tactgatgag catgcaataa	4980

	agtctgagtg ggcggcagcc tgtgtgtgcc tgggttctct ctgtcccga atgtgcaaac	5040
	aatggaggtg ctcgagtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta caaggaaccc	5100
	ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgtcgtc cgctcactga ggccgggcga	5160
	ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc	5220
	agccttaatt aacctaatc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacct	5280
	ggcgttacc aacttaatcg cttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc	5340
	gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcga gcctgaatgg cgaatgggac	5400
	gcgcccgtga gcggcgcat aagcgcggcg ggtgtgtgg ttacgcgcag cgtgaccgt	5460
	acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg	5520
	ttcgccggtt tccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt ccgatttagt	5580
	gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggt atggttcacg tagtgggcca	5640
[0043]	tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga	5700
	ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa	5760
	gggattttgc cgatttcggc ctattgttta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	5820
	gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc	5880
	gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac	5940
	aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt	6000
	tccgtgtcgc ccttattccc tttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gtcacccag	6060
	aaacgttgtt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg	6120
	aactggatct caacagcggc aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa	6180
	tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgcgggc	6240
	aagagcaact cggctgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag	6300

	tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa	6360
	ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc	6420
	taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ctttgatcgt tgggaaccgg	6480
	agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa	6540
	caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa	6600
	tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg	6660
	gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag	6720
	cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg	6780
	caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt	6840
	gtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt	6900
[0044]	aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac	6960
	gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag	7020
	atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg	7080
	tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca	7140
	gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga	7200
	actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca	7260
	gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc	7320
	agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca	7380
	ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa	7440
	aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc	7500
	cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc	7560
	gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg	7620

cctttttacg gtctctggcc ttttctggc cttttgtca catgttcttt cctgcgttat 7680
ccccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 7740
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 7800
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg 7860
actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac 7920
cccaggtttt acactttatg cttccgctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac 7980
aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccag atttaattaa gg 8032

<210> 17
<211> 738
<212> PRT
<213> 未知

[0045] <220>
<223> AAVhu. 37 衣壳

<400> 17

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

	Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	
						85				90						95	
	Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	
					100				105						110		
	Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	
					115				120					125			
	Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	
			130					135					140				
	Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	
						145			150			155				160	
[0046]	Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	
					165					170					175		
	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	
					180					185					190		
	Pro	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly	
					195				200				205				
	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	
					210				215				220				
	Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	
					225				230			235			240		
	Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	
					245					250					255		

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335

[0047] Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510

[0048] Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Thr Asn Thr Gly
 580 585 590

Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

[0049] Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 18

<211> 738

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> AAVrh. 10 衣壳

<400> 18

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

[0050]

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln

165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
[0051]		
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315 320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		

	340		345		350
Leu Pro Tyr Val	Leu Gly Ser	Ala His Gln Gly	Cys Leu Pro Pro	Phe	
355		360		365	
Pro Ala Asp Val	Phe Met Ile	Pro Gln Tyr Gly	Tyr Leu Thr Leu	Asn	
370		375		380	
Asn Gly Ser Gln	Ala Val Gly	Arg Ser Ser	Phe Tyr Cys Leu	Glu Tyr	
385		390		395	400
Phe Pro Ser Gln	Met Leu Arg Thr	Gly Asn Asn Phe	Glu Phe Ser Tyr		
	405		410		415
Gln Phe Glu Asp	Val Pro Phe	His Ser Ser Tyr	Ala His Ser Gln	Ser	
	420		425		430
[0052]					
Leu Asp Arg Leu	Met Asn Pro	Leu Ile Asp Gln	Tyr Leu Tyr Tyr	Leu	
	435		440		445
Ser Arg Thr Gln	Ser Thr Gly	Gly Thr Ala Gly	Thr Gln Gln Leu	Leu	
	450		455		460
Phe Ser Gln Ala	Gly Pro Asn	Asn Met Ser Ala	Gln Ala Lys Asn	Trp	
465		470		475	480
Leu Pro Gly Pro	Cys Tyr Arg	Gln Gln Arg Val	Ser Thr Thr Leu	Ser	
	485		490		495
Gln Asn Asn Asn	Ser Asn Phe	Ala Trp Thr Gly	Ala Thr Lys Tyr	His	
	500		505		510
Leu Asn Gly Arg	Asp Ser Leu	Val Asn Pro Gly	Val Ala Met Ala	Thr	

515	520	525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val		
545	550	555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala		
580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
[0053]		
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		

690

695

700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp
705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 19

<211> 4371

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0054] <223> 构建的序列

<400> 19

atgcagatcg agctgtctac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggttctg cttcagcgcc	60
accagacggt actatctggg cgccgtggaa ctgagctggg actacatgca gagcgacctg	120
ggcgagctgc cctgtggacgc cagattccct ccaagagtgc ccaagagctt ccccttcaac	180
acctccgtgg tgtacaagaa aaccctgttc gtggaattca cgcaccacct gtccaatata	240
gccaaagcca gacccccctg gatgggcctg ctgggacctg caattcaggc cgaggtgtac	300
gacaccgtcg tgatcacctt gaagaacatg gccagccacc ccgtgtctct gcacgccgtg	360
ggagtgtcct actggaaggc ctctgagggc gccgagtacg acgatcagac cagccagcgc	420
gagaaagagg acgacaaggt gttccctggc ggcagccaca cctacgtgtg gcaggtgctg	480
aaagaaaacg gccccatggc ctccgacctt ctgtgectga catacagcta cctgagccac	540
gtggacctcg tgaaggacct gaacagcggc ctgatcggag ccctgctcgt gtgtagagag	600

	ggcagcctgg ccaaagagaa aaccagacc ctgcacaagt tcattcctgct gttcgccgtg	660
	ttcgacgagg gcaagagctg gcacagcgag acaaagaaca gcctgatgca ggaccgggac	720
	gccgcctctg ctagagcctg gcccaaatg cacaccgtga acggctacgt gaacagaagc	780
	ctgcccggac tgatcggctg ccaccggaag tctgtgtact ggcacgtgat cggcatgggc	840
	accacccttg aggtgcacag catctttctg gaaggacaca cttttctcgt gcggaaccac	900
	cggcaggcca gcctggaaat cagccctatc accttctga cggcccagac actgctgatg	960
	gacctgggcc agtttctgct gttctgccac atcagctccc accagcacga cggcatggaa	1020
	gcctacgtga aggtggacag ctgccccgag gaacccagc tgcggatgaa gaacaacgag	1080
	gaagccgagg actacgacga cgacctgacc gacagcgaga tggacgtggt gcgcttcgac	1140
	gacgataaca gcccagctt catccagatc agaagcgtgg ccaagaagca cccaagacc	1200
	tgggtgcact atatcgccgc cgaggaagag gactgggatt acgcccctct ggtgctggcc	1260
[0055]	cccagcgaca gaagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gccccagcg gatcggccgg	1320
	aagtataaga aagtgcggtt catggcctac accgacgaga cattcaagac cagagaggcc	1380
	atccagcacg agagcggcat cctgggccct ctgctgtatg gcgaagtggg cgacacctg	1440
	ctgatcatct tcaagaacca ggccagcaga ccctacaaca tctaccctca cggcatcacc	1500
	gacgtgcggc ccctgtactc tagaaggctg cccaaggcg tgaaacacct gaaggacttc	1560
	cccatcctgc ccggcgagat cttcaagtac aagtggaccg tgaccgtgga agatggcccc	1620
	accaagagcg accccagatg cctgacacgg tactatagca gcttcgtgaa catggaacgg	1680
	gacctggcct ccggcctgat tgcccactg ctgatctgct acaaagaaag cgtggaccag	1740
	cggggcaacc agatcatgag cgacaagcgg aacgtgatcc tgtttagcgt gttcgatgag	1800
	aaccggtcct ggtatctgac cgagaatata cagcggttcc tgcccaacce tgccggcgtg	1860
	cagctggaag atcctgagtt ccaggcctcc aacatcatgc actccatcaa tggctatgtg	1920

	ttcgacagcc tgcagctgag cgtgtgcctg caccaggtgg cctactggta catcctgagc	1980
	atcggggccc agaccgactt cctgtccgtg ttctttctccg gctacacctt caagcacaag	2040
	atggtgtacg aggataccct gaccctgttc cccttttagcg gcgaaaccgt gtcatgagc	2100
	atggaaaacc ccggcctgtg gatcctgggc tgccacaaca gcgacttccg gaacagaggc	2160
	atgaccgccc tgctgaaggt gtccagctgc gacaagaaca ccggcgacta ctacaggagc	2220
	agctatgagg acatcagcgc ctacctgtg agcaagaaca acgcatcga gcccagaagc	2280
	ttcagccaga accccccctg gctgaagcgg caccagagag agatcacccg gaccacctg	2340
	cagtccgacc aggaagagat cgattacgac gacaccatca gcgtggaaat gaagaaagaa	2400
	gatttcgaca tctacgacga ggacgagaac cagagccccc ggtcctttca gaaaaagacc	2460
	cggcactact tcattgccgc tgtggaacgg ctgtgggact acggcatgag cagcagccct	2520
	cacgtgctga gaaacagggc ccagagcggc agcgtgcccc agttcaagaa agtgggtgtc	2580
[0056]	caggaattca cagacggcag cttcaccag cctctgtacc gcggcgagct gaacgagcac	2640
	ctgggactgc tgggccccta tatcagagcc gaagtggaag ataacatcat ggtcaccttc	2700
	cggaatcagg cctcccggcc ctacagcttc tacagctccc tgatcagcta cgaaggagc	2760
	cagagacagg gcgctgagcc ccggaagaac ttcgtgaagc ccaacgagac taagacctac	2820
	ttttggaagg tgcagcacca catggcccct acaaaggacg agttcgactg caaggcctgg	2880
	gcctacttct ccgacgtgga cctggaaaag gacgtgcact ctgggctgat cgccccctg	2940
	ctcgtgtgcc acaccaacac cctgaatccc gccacggca gacaggtgac agtgcaggaa	3000
	ttcgccctgt tcttcacat cttcgacgaa acaaagagct ggtacttcac cgaaaacatg	3060
	gaaagaaact gccgggtccc ctgcaacatc cagatggaag atcccacctt caaagagaac	3120
	taccggttcc acgcatcaa cggtacatc atggacacac tgcccggcct cgtgatgget	3180
	caggatcagc ggatccggtg gtatctgctg tccatgggct ccaacgagaa catccacagc	3240

	atccacttca gcggccacgt gttcacccgtg cggaaaaaag aagagtacaa aatggccctg	3300
	tacaacctgt accctgggggt gttcgagaca gtggaaatgc tgcccagcaa ggccggcatc	3360
	tggcgggtgg agtgtctgat cggcgagcac ctgcacgctg ggatgagcac actgtttctg	3420
	gtgtacagca acaagtcca gacacctctg ggcatggcct ctggccacat ccgggacttt	3480
	cagatcacag ccagcggcca gtacggccag tgggccccaa aactggccag actgcactac	3540
	agcggcagca tcaacgcctg gtccacaaa gagcccttca gctggatcaa ggtggacctg	3600
	ctggctccca tgatcatcca cggaatcaag acccagggcg ccagacagaa gttcagcagc	3660
	ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggacg gcaagaagtg gcagacctac	3720
	cggggcaata gcaccggcac cctgatggtg ttcttcggca acgtggactc cagcggcatt	3780
	aagcacaaca tcttcaaccc ccccatcatt gcccgggtaca tccggctgca cccacccac	3840
	tacagcatcc ggtccaccct gagaatggaa ctgatgggct gcgacctgaa ctctgtctcc	3900
[0057]	atgcccctgg ggatggaaag caaggccatc tccgacgcc agatcacgc ctccagctac	3960
	ttcaccaaca tgttcgccac ctggtcccca tccaaggccc ggctgcacct gcagggcaga	4020
	agcaatgctt ggaggcctca ggtgaacaac cccaaagagt ggctgcaggt ggacttccag	4080
	aaaaccatga aagtgaccgg cgtgaccacc cagggcgtga agtctctgct gacctctatg	4140
	tacgtgaaag agttctgat ctccagcagc caggacggcc accagtggac cctgtttttc	4200
	cagaacggca aagtgaaagt gtttcagggg aaccaggact cttcacccc cgtcgtgaat	4260
	agcctggacc ctccactgct gaccagatac ctgcggatcc accctcagag ttgggtgcac	4320
	cagattgctc tgcggatgga agtgcctggga tgcgaggccc aggacctgta c	4371
	<210> 20	
	<211> 736	
	<212> PRT	
	<213> 未知	

<220>

<223> AAV3B 衣壳

<400> 20

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

[0058] Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly
145 150 155 160

	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr	
					165					170					175		
	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro	
				180					185					190			
	Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	
			195						200					205			
	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ser	
		210					215					220					
	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	
	225					230					235					240	
[0059]	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	
					245					250					255		
	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His	Tyr	
				260						265					270		
	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His	
			275						280					285			
	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp	
		290						295				300					
	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Lys	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	
	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu	
					325					330					335		

	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	
				340					345					350			
	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Asp	
		355						360					365				
	Val	Phe	Met	Val	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	
	370						375					380					
	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	
	385					390					395					400	
	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	
				405					410						415		
[0060]	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	
			420						425					430			
	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	
		435						440					445				
	Gln	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Gln	Ser	Arg	Leu	Leu	Phe	Ser	
	450						455					460					
	Gln	Ala	Gly	Pro	Gln	Ser	Met	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Asn	Trp	Leu	Pro	
	465					470				475					480		
	Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Leu	Ser	Lys	Thr	Ala	Asn	Asp	Asn	
				485					490					495			
	Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Pro	Trp	Thr	Ala	Ala	Ser	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	
			500						505					510			

	Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn	
	690						695					700					
[0062]	Tyr	Asn	Lys	Ser	Val	Asn	Val	Asp	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Asn	Gly	Val	
	705					710					715				720		
	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Asn	Leu	
					725					730					735		

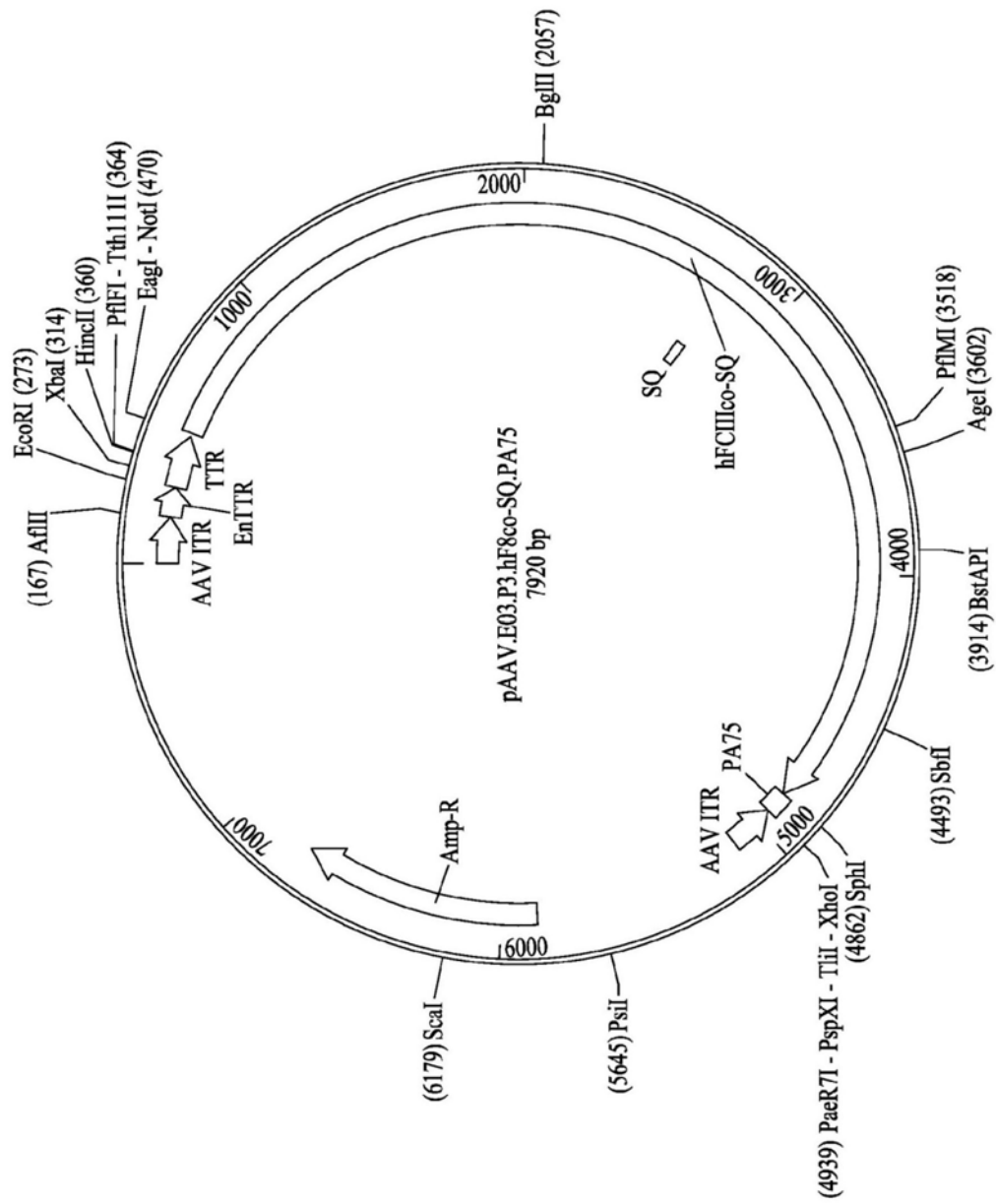


图1

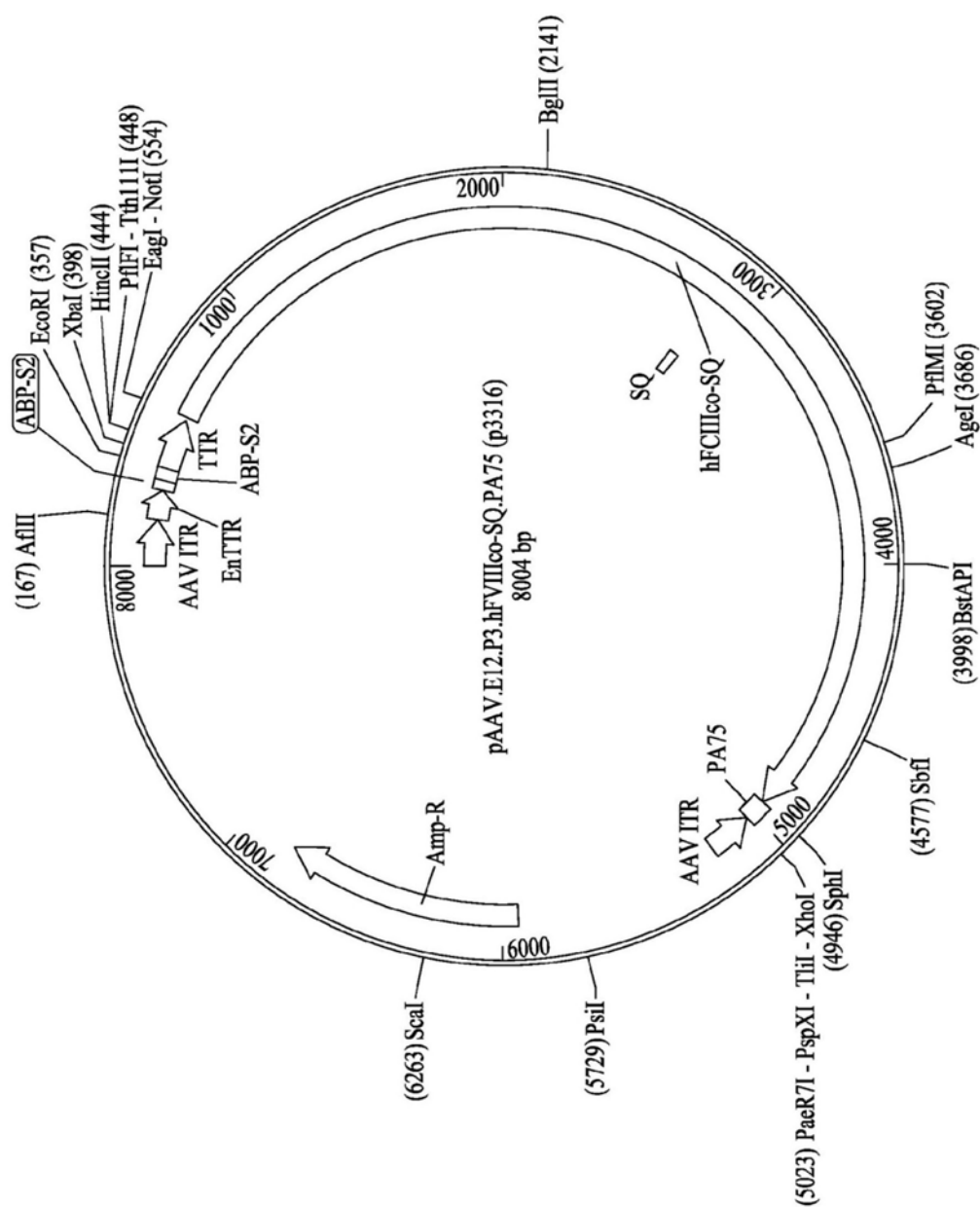


图2

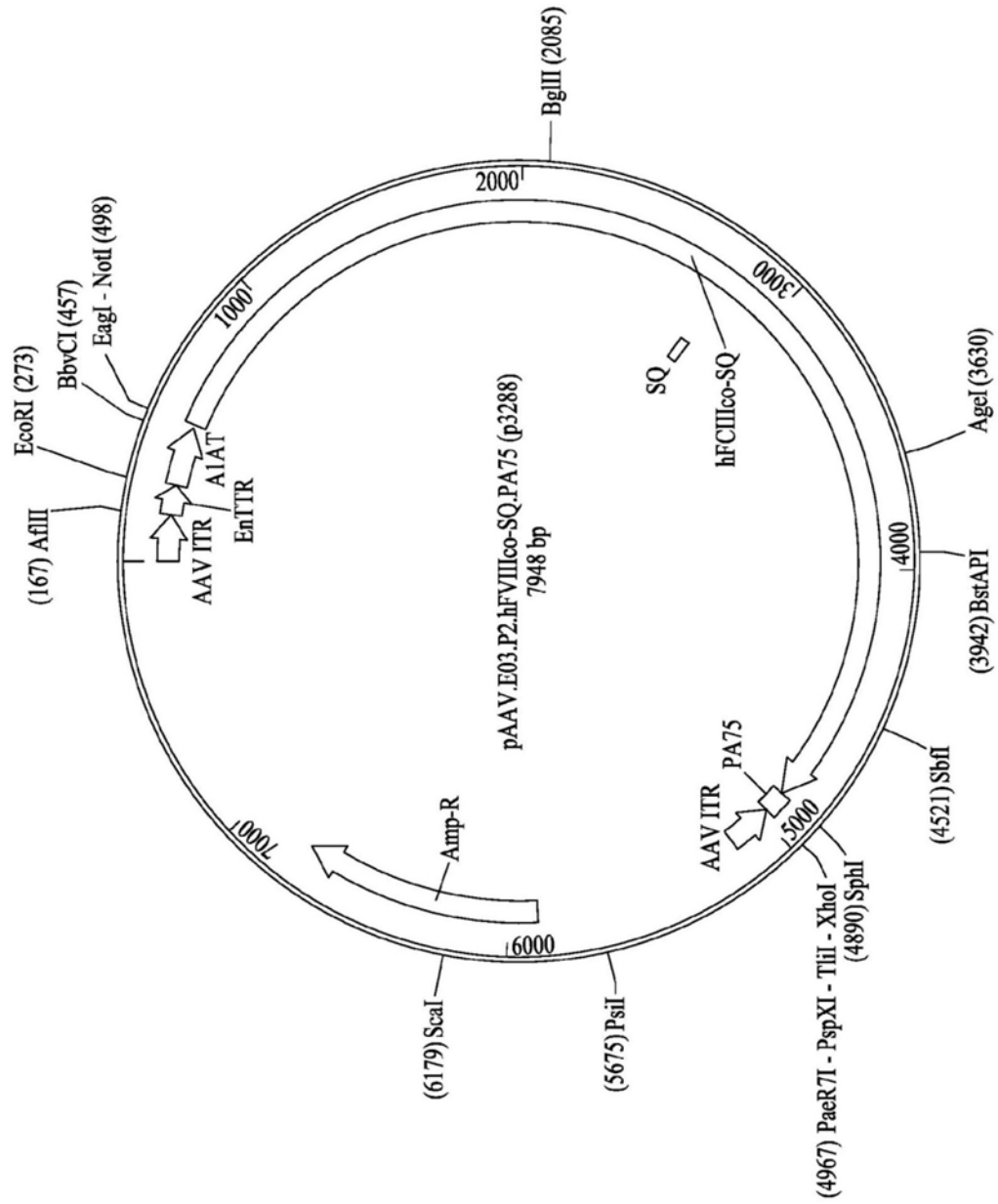


图3

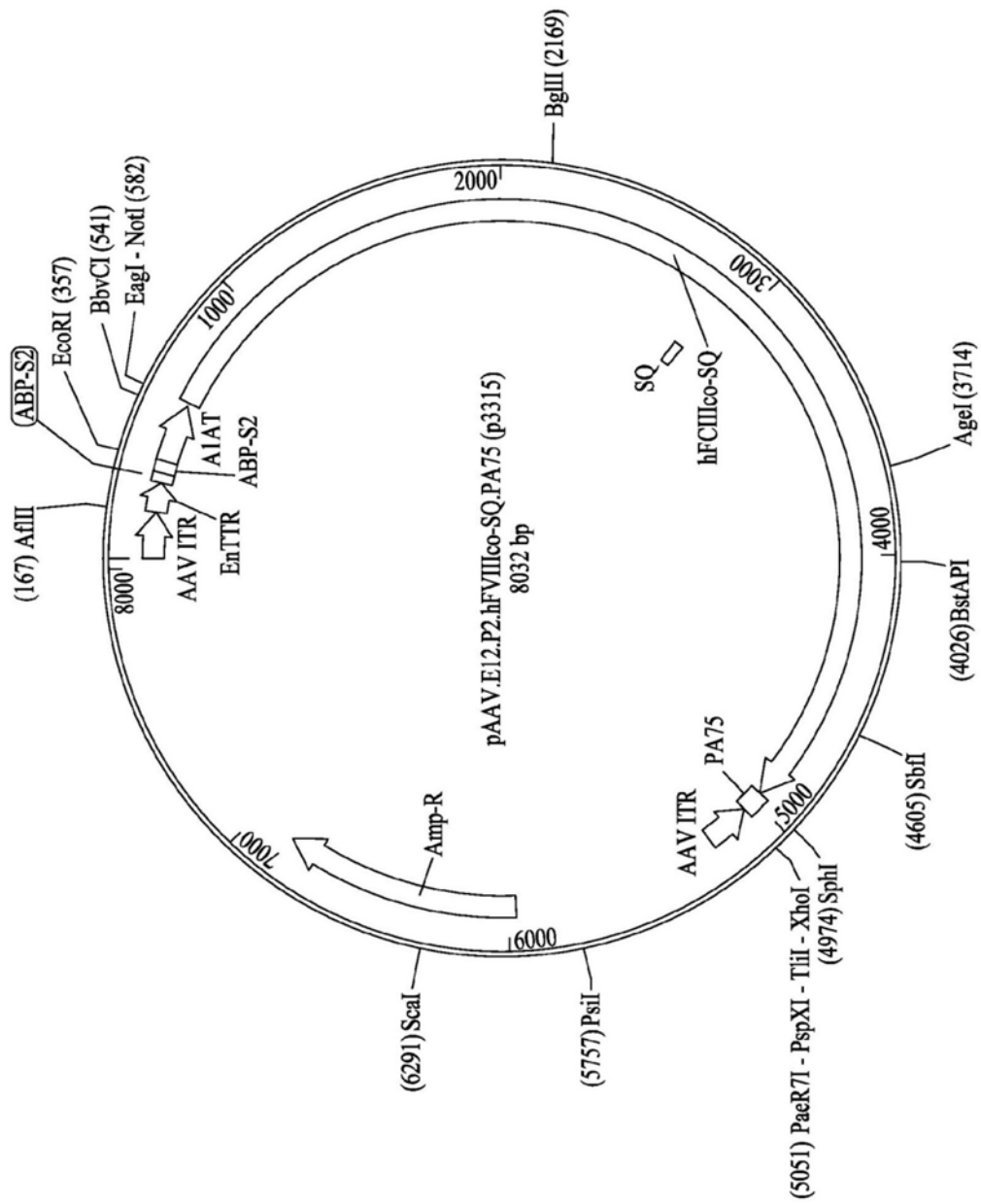


图4

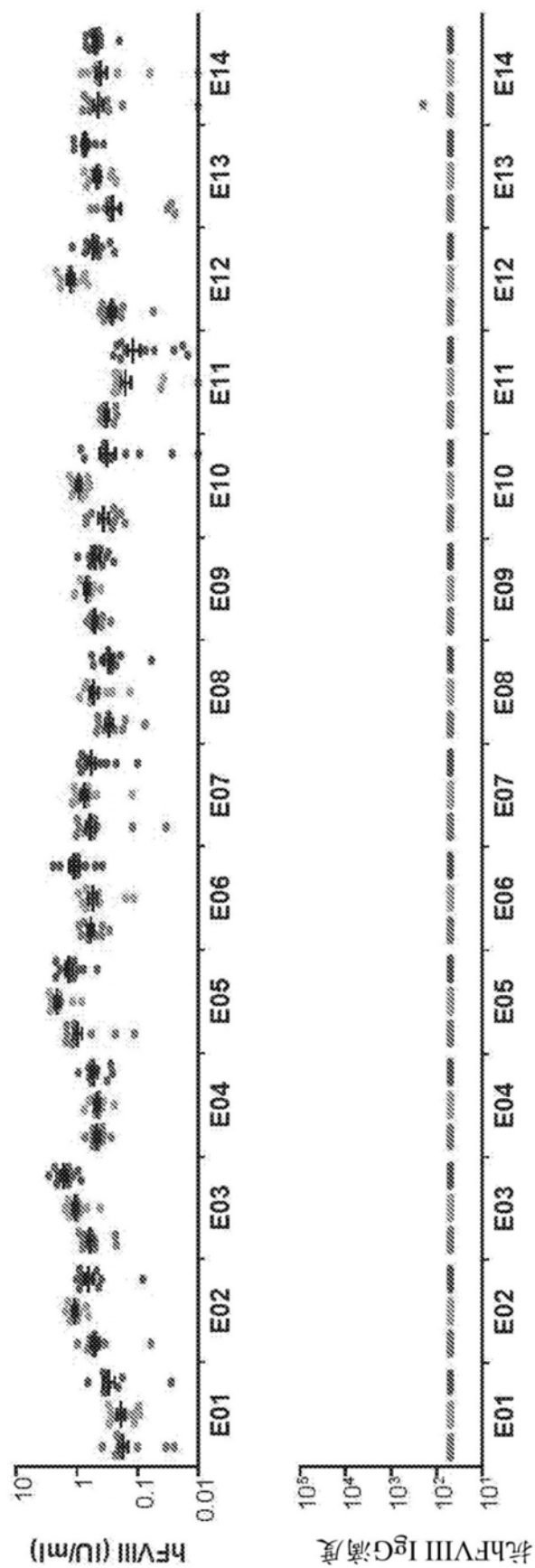


图5

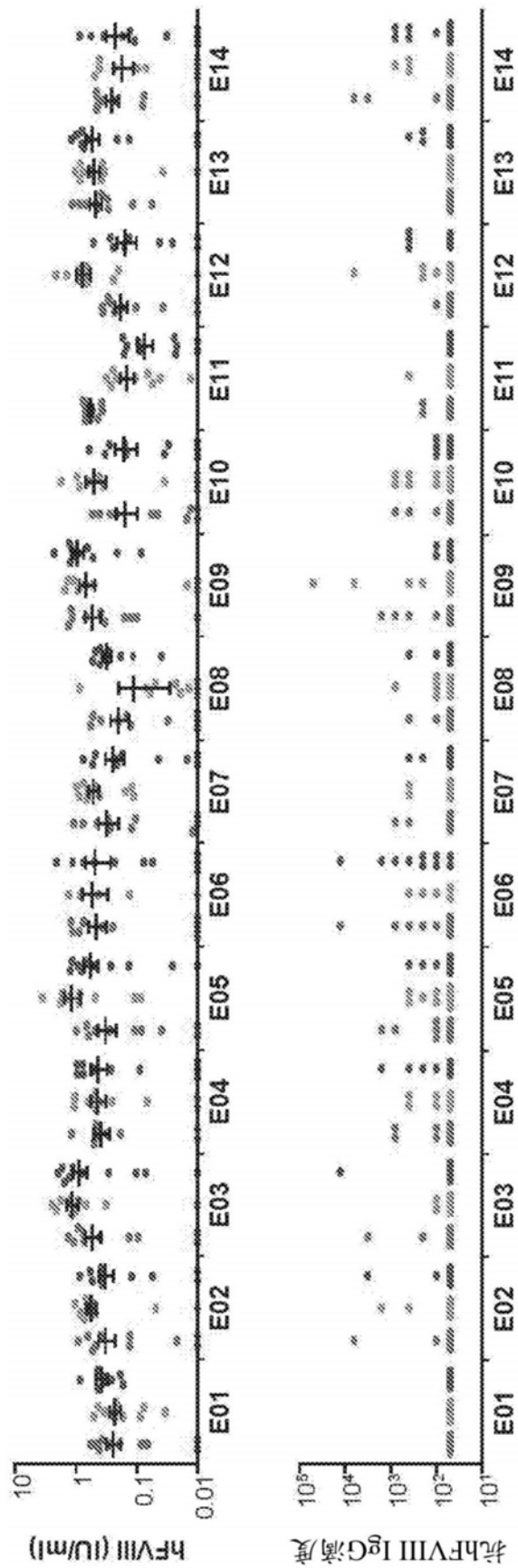


图6

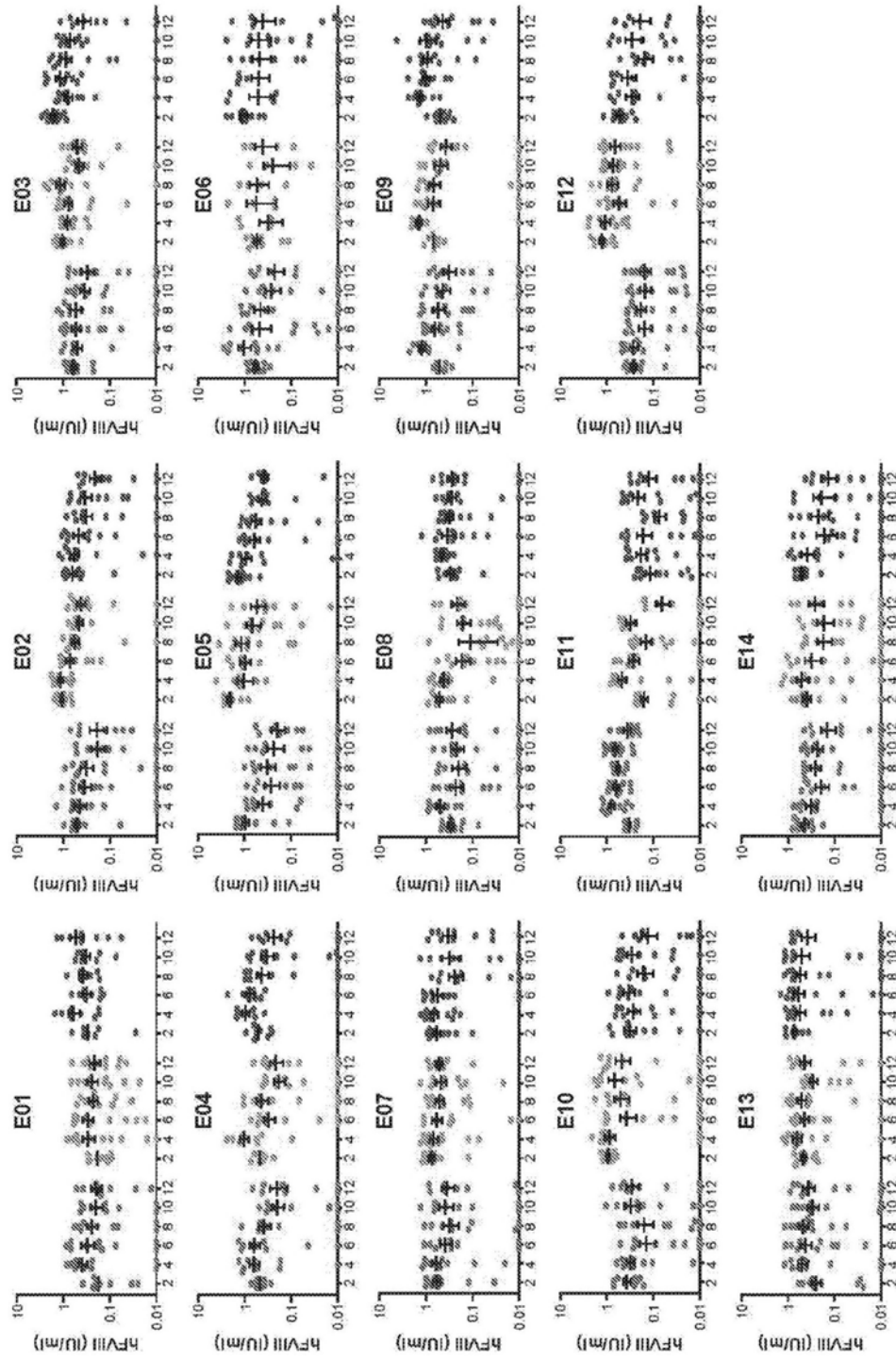


图7

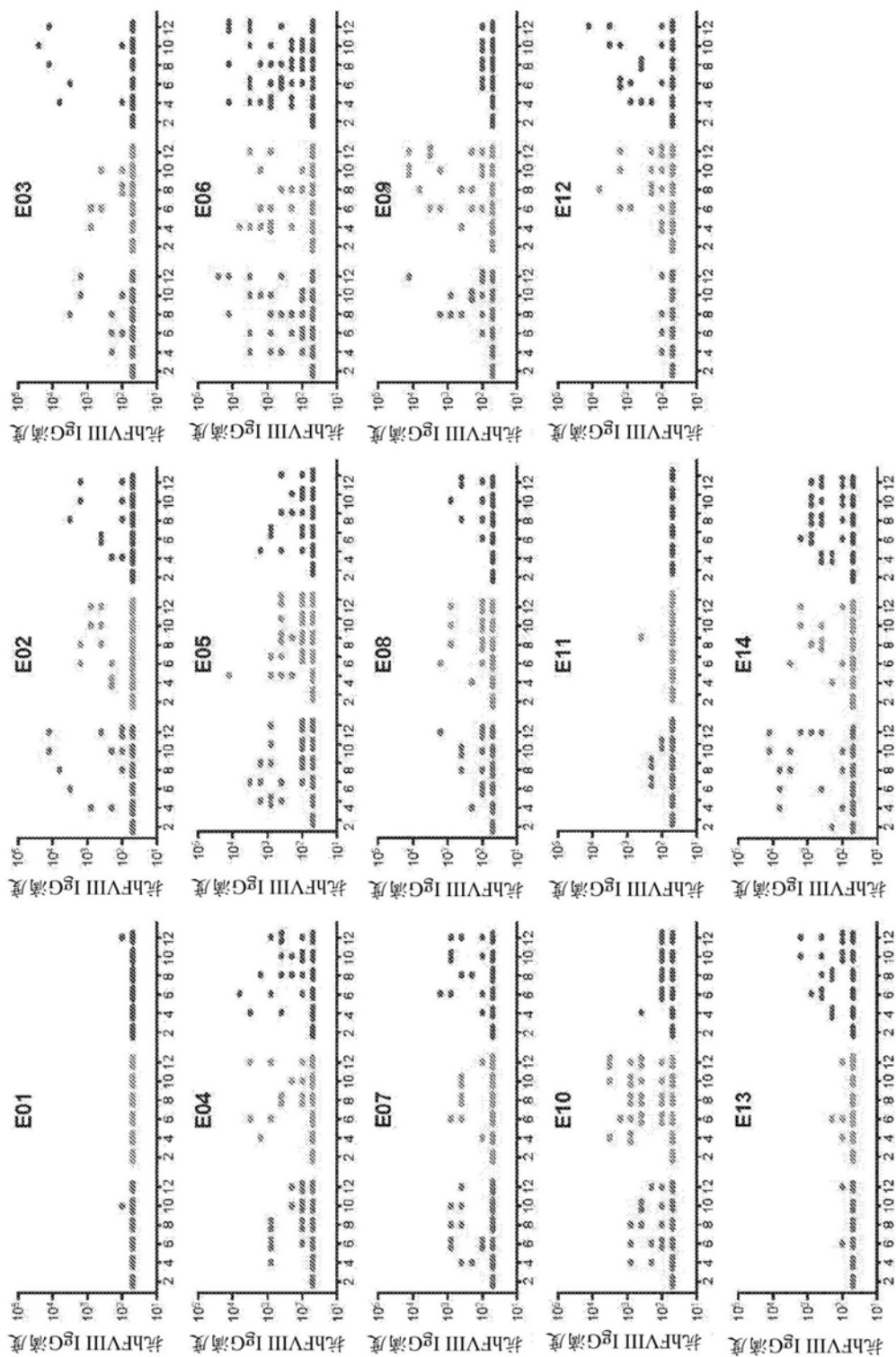


图8

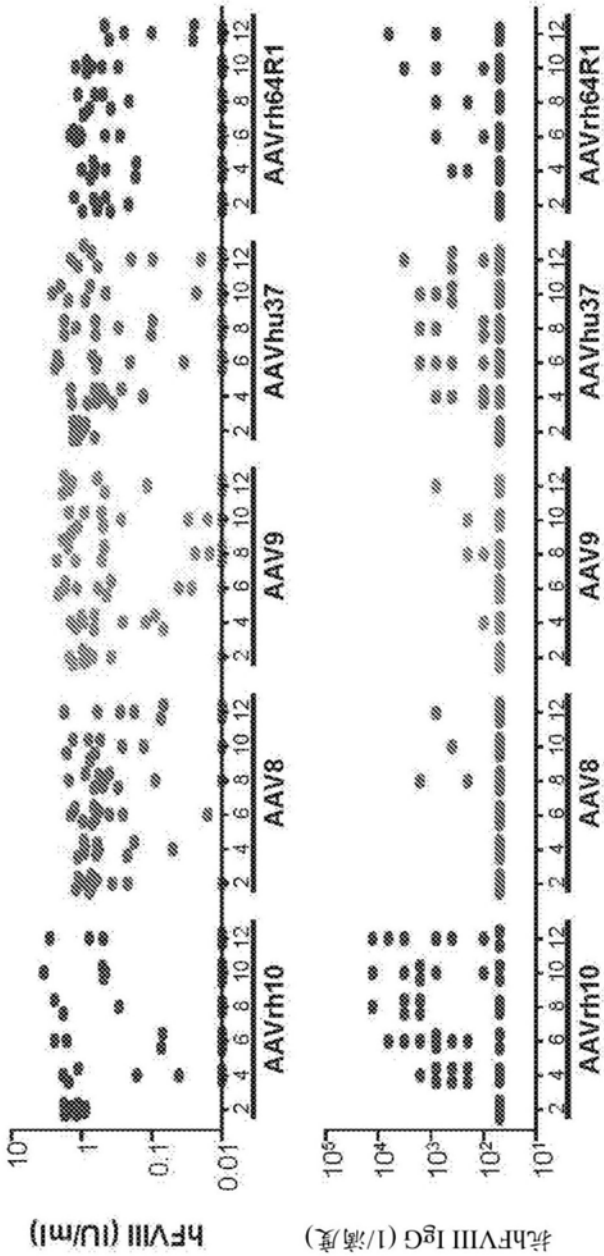


图9

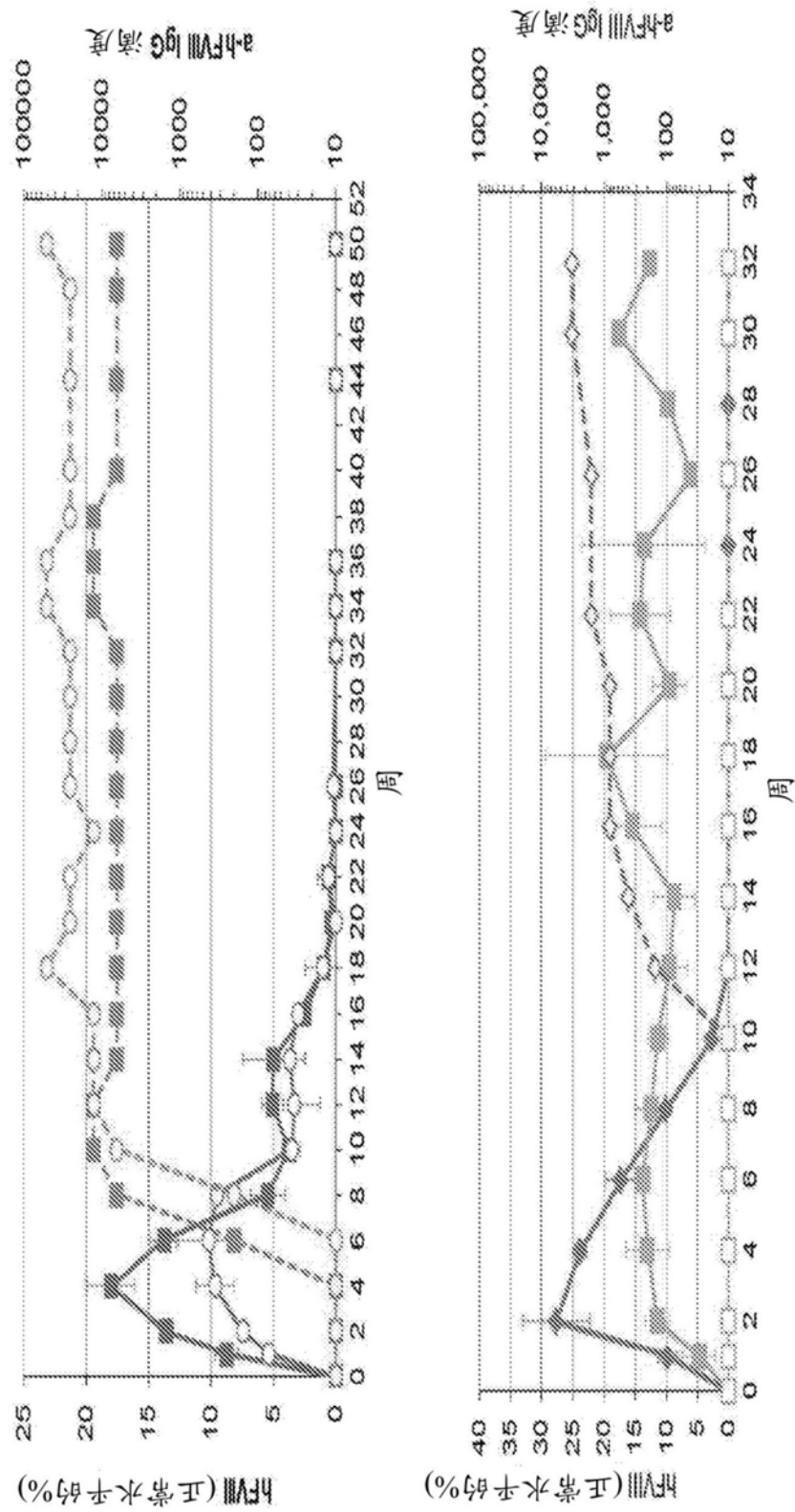


图10

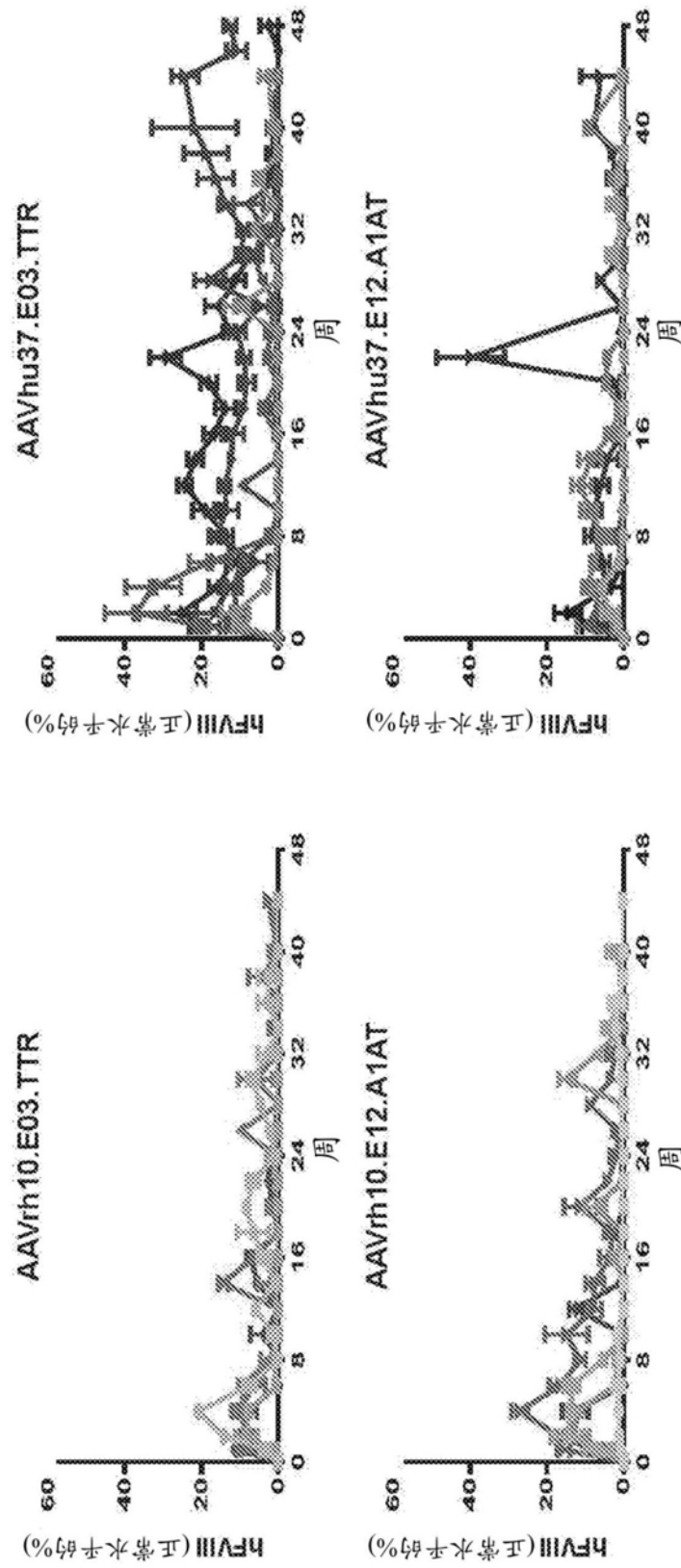


图11

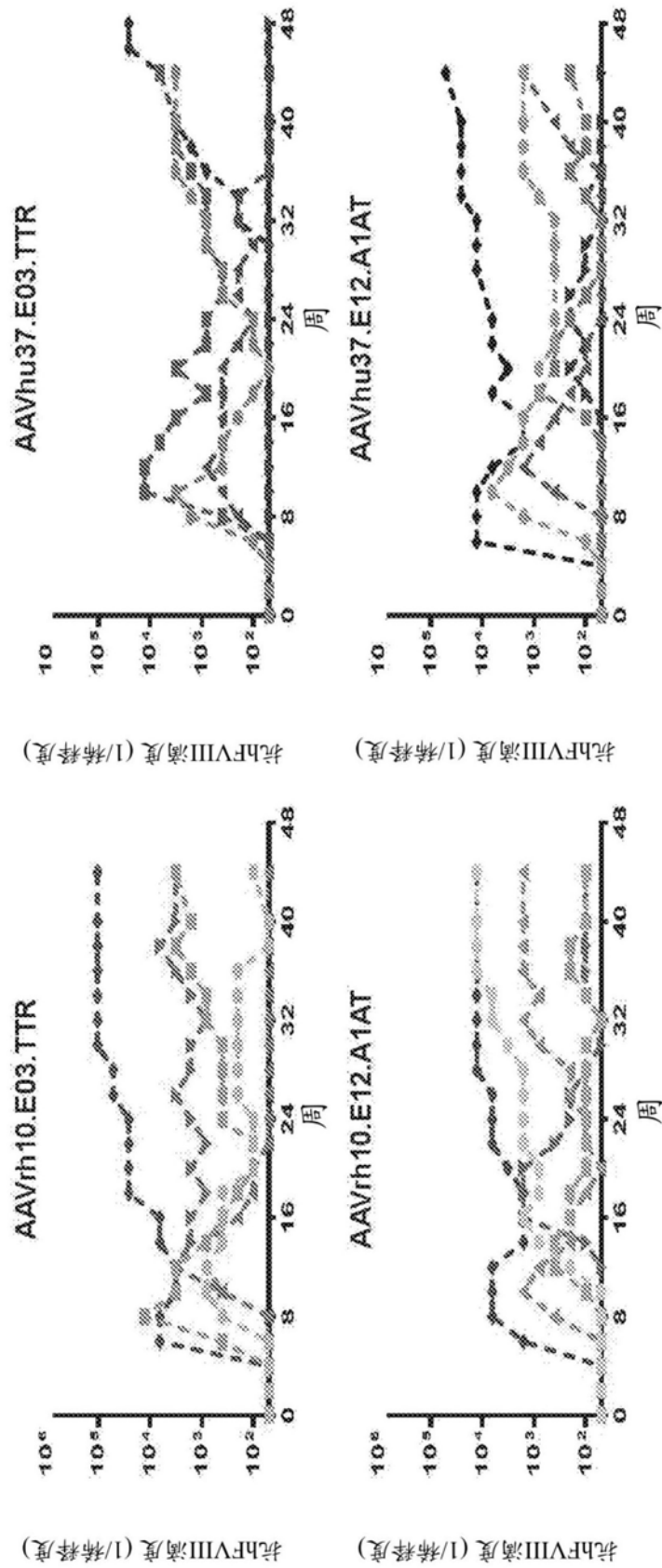


图12

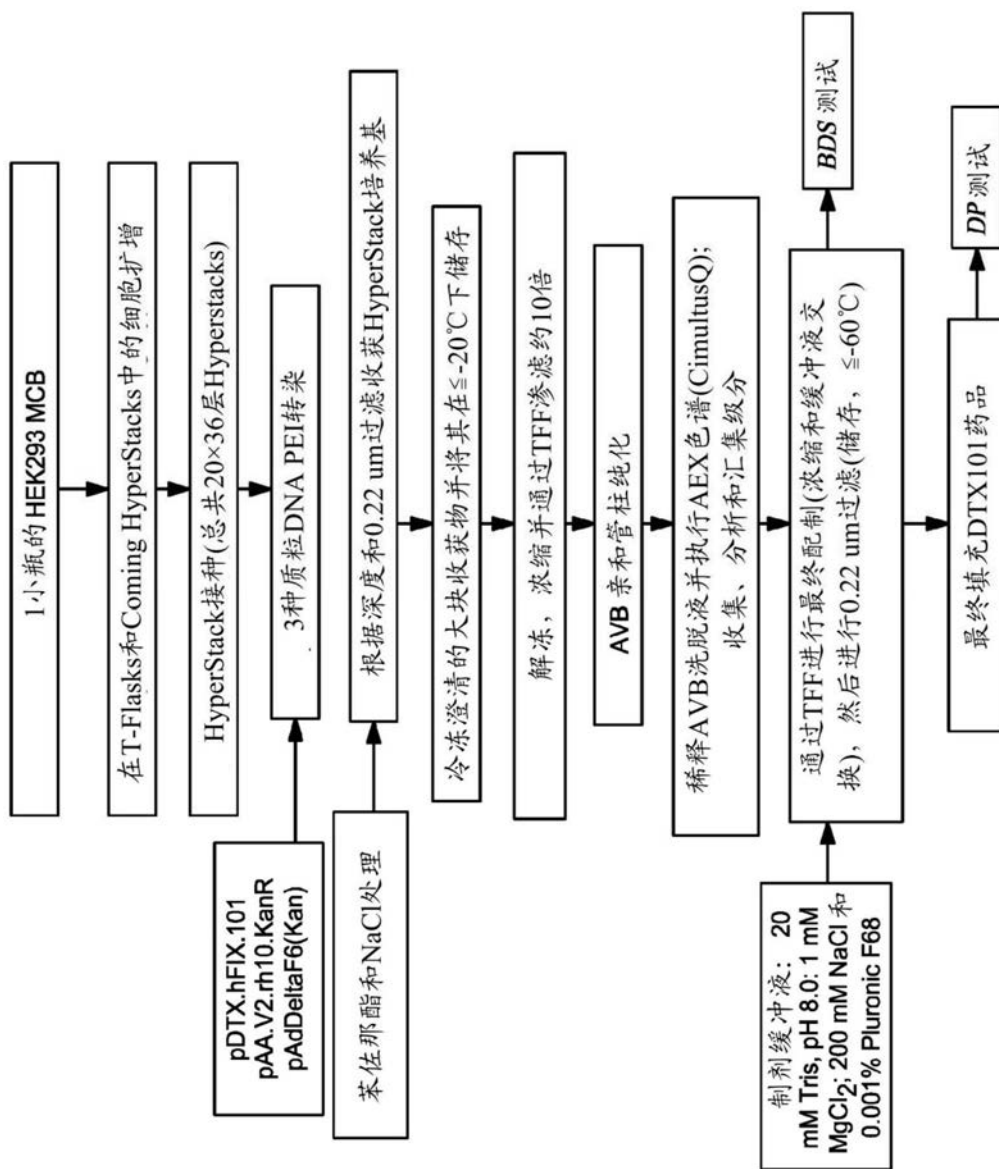


图13

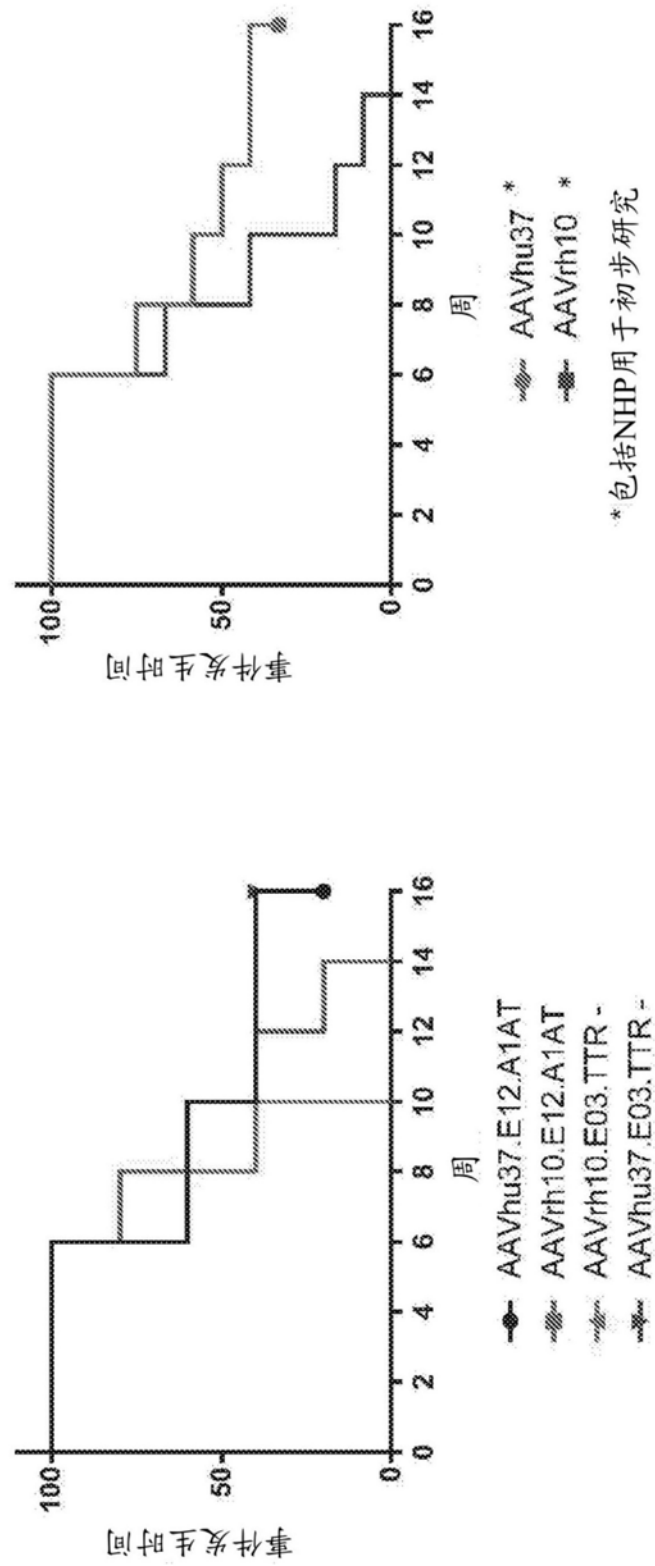


图14

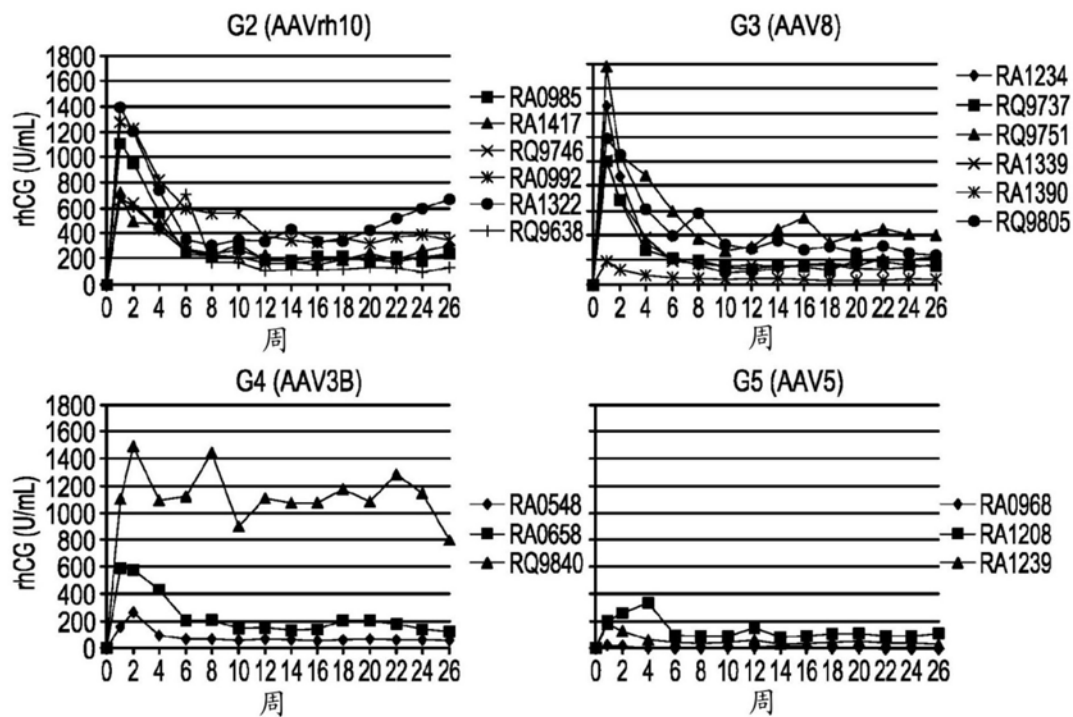


图15

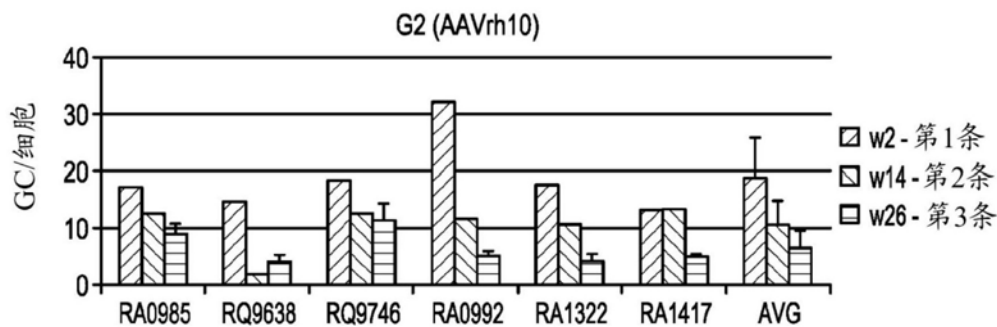


图16A

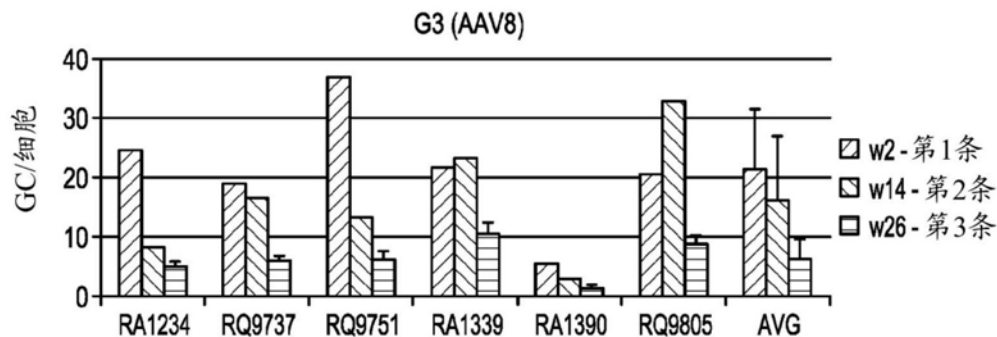


图16B

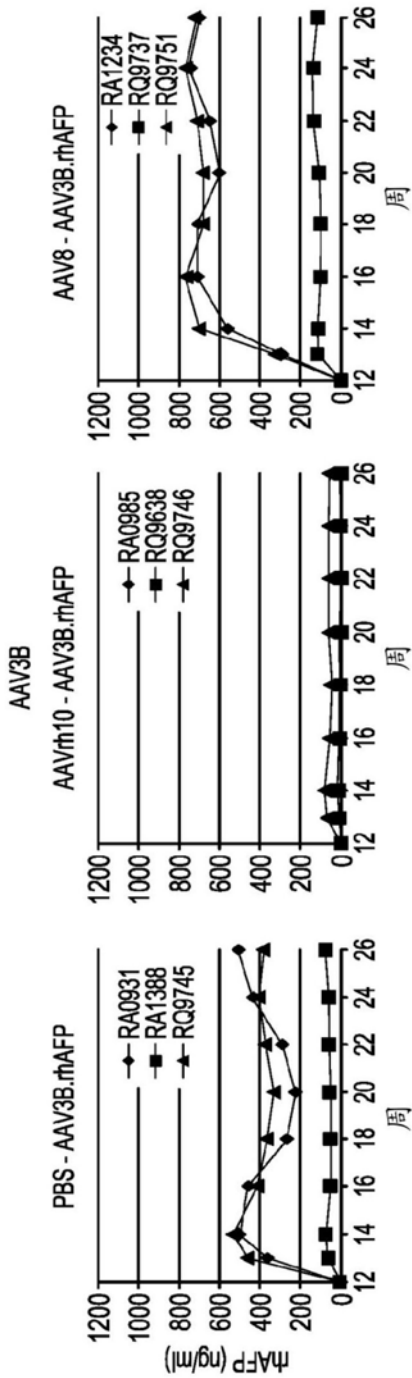


图17A

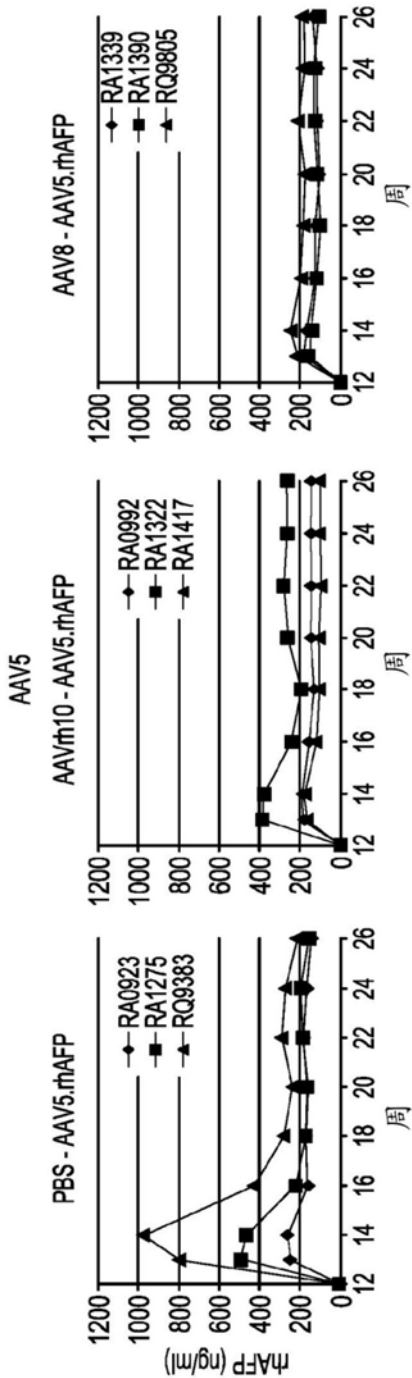


图17B

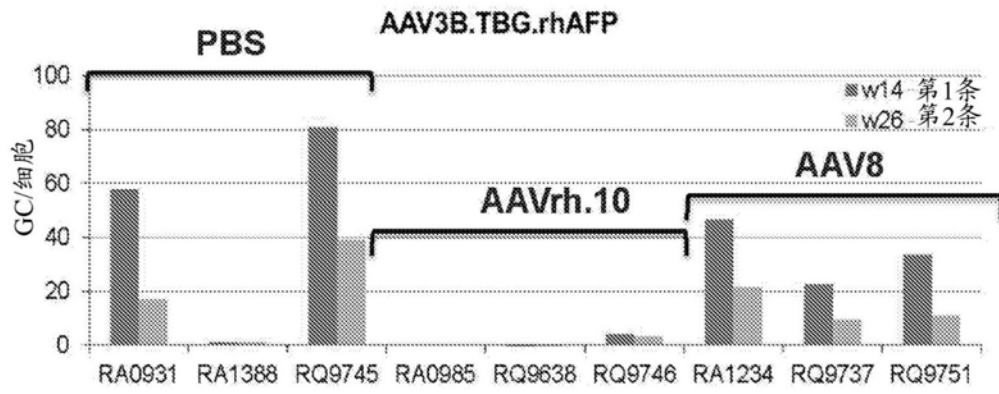


图18A

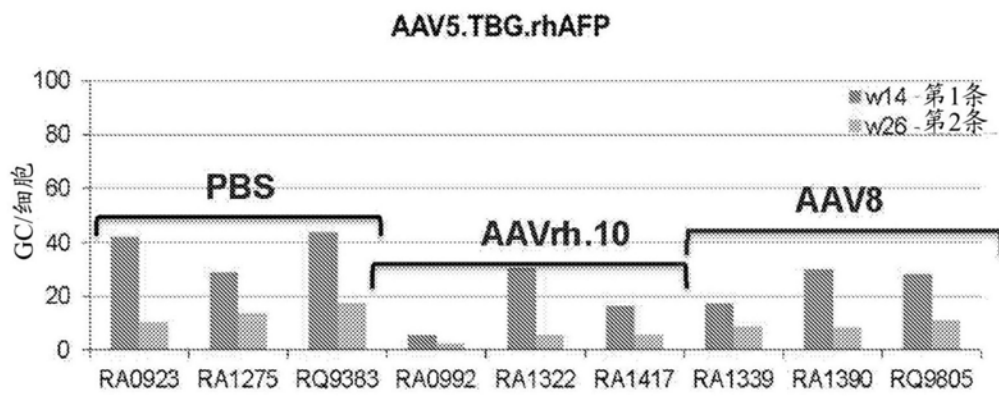


图18B

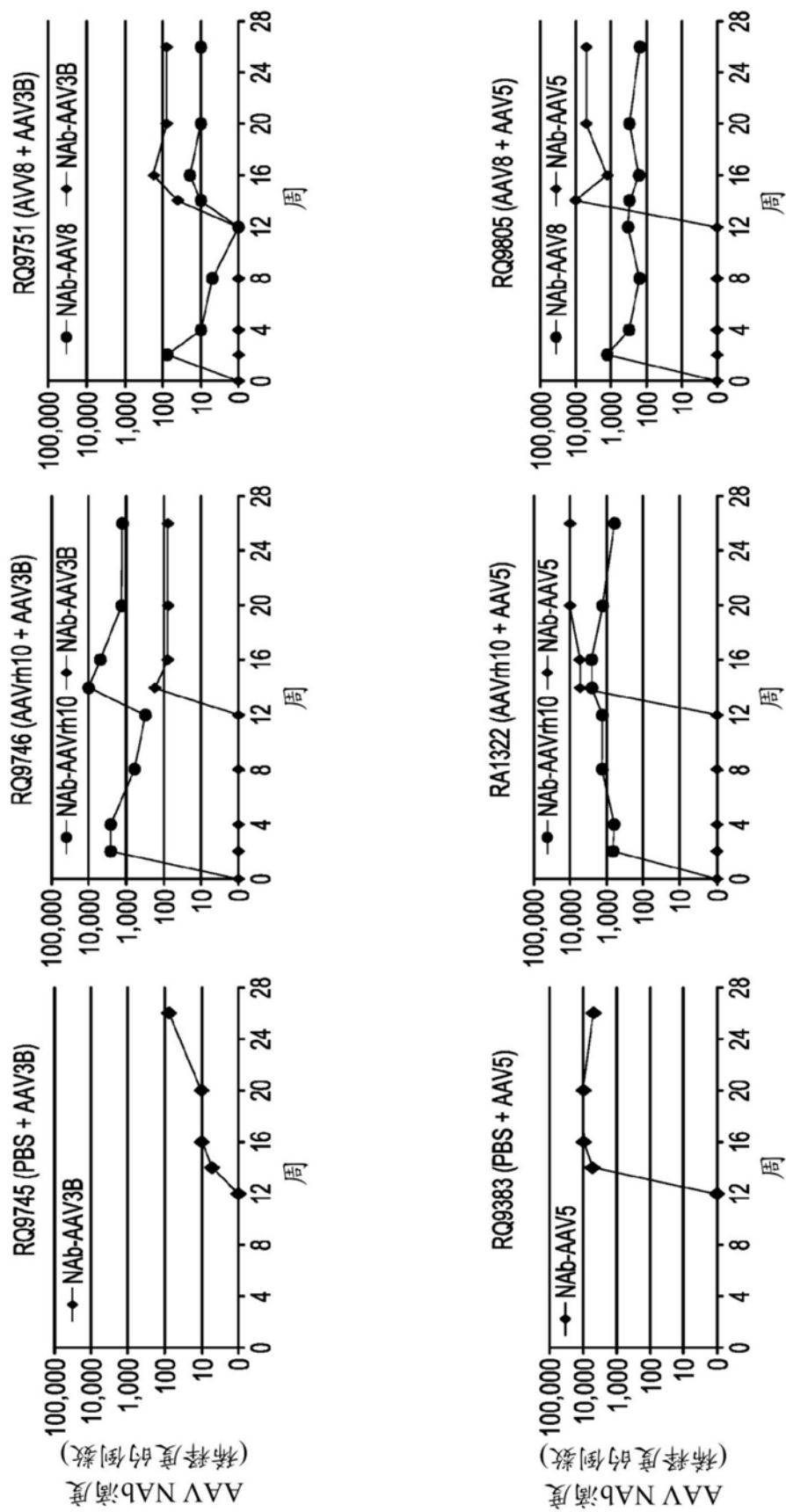


图19

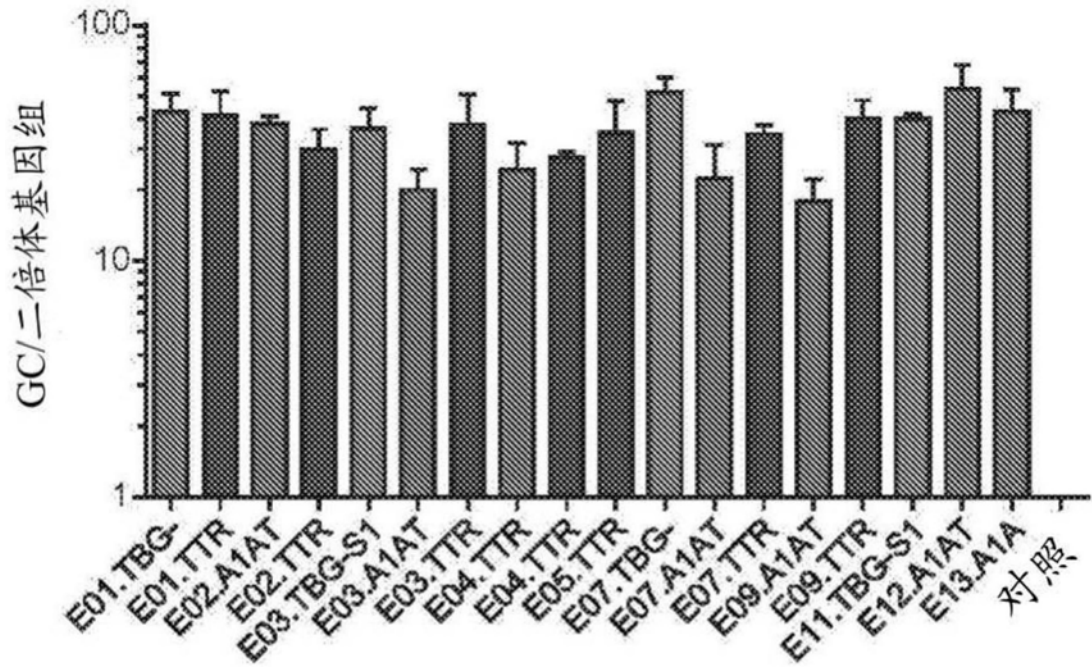


图20A

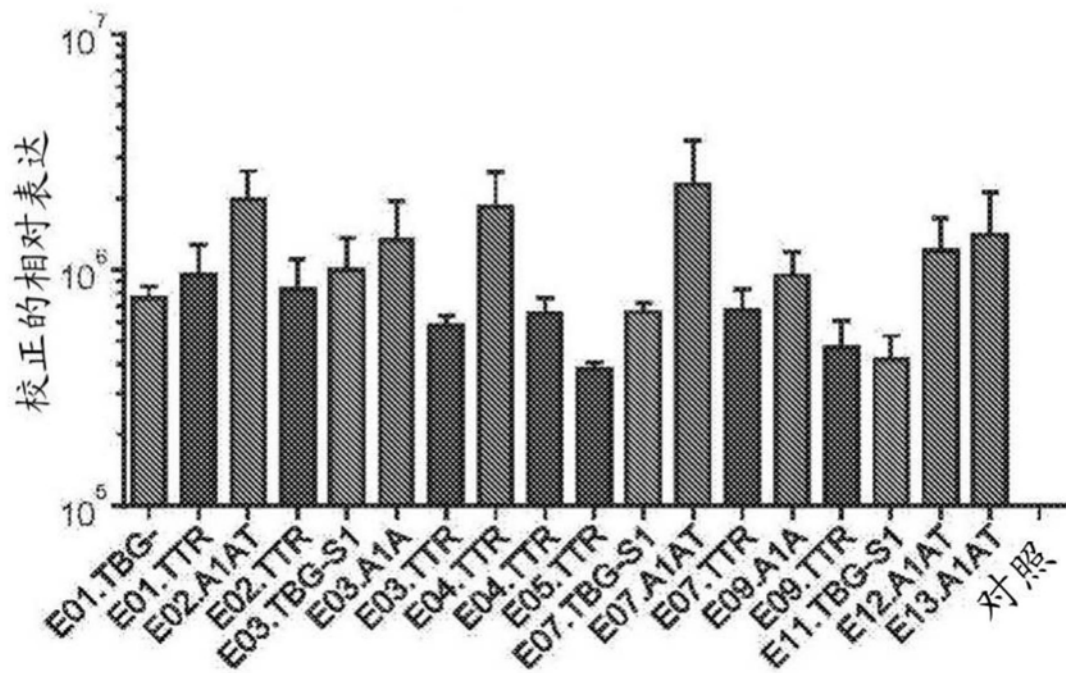


图20B

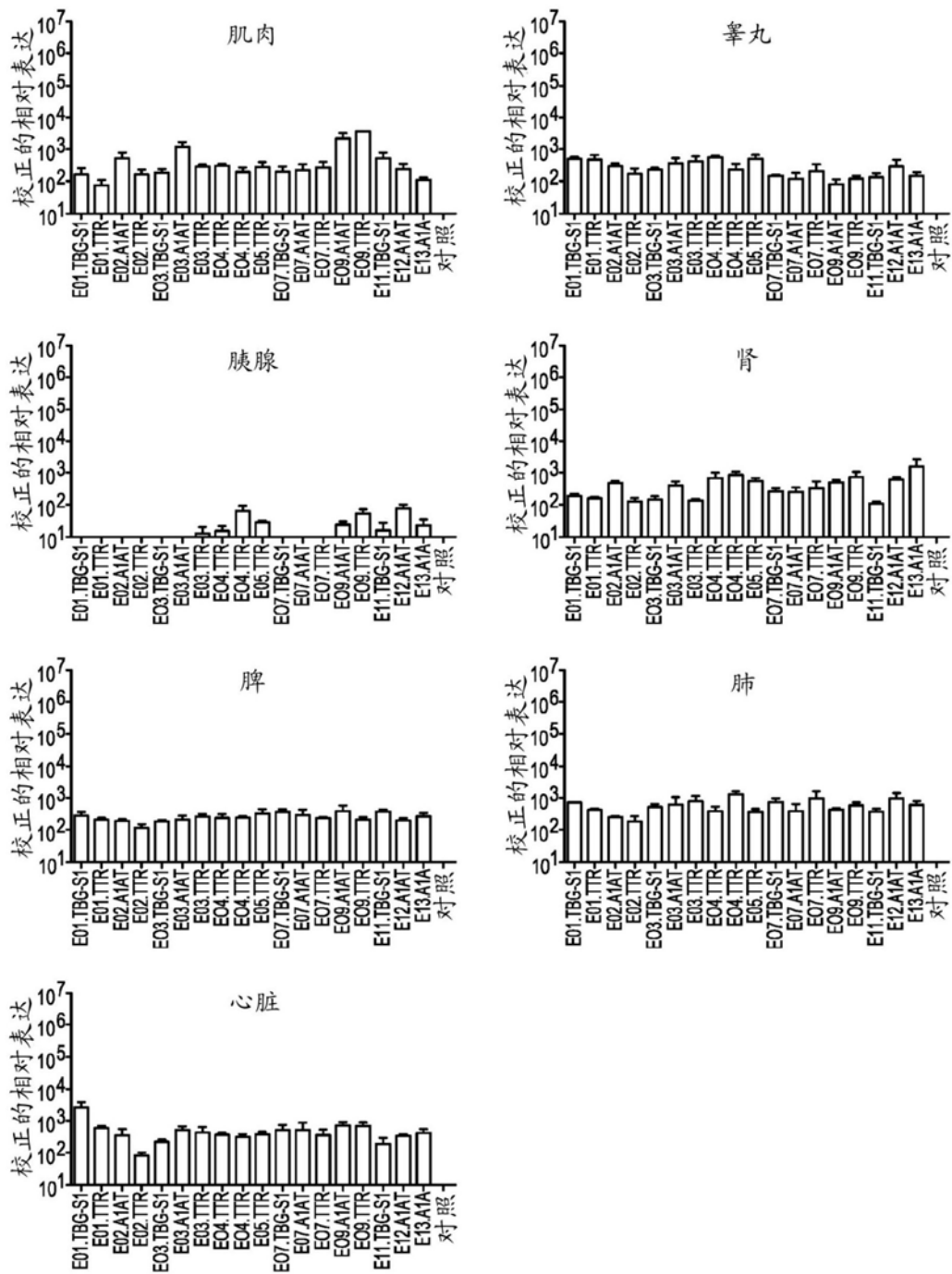


图21

AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3x10¹² GC/kg)

M11269

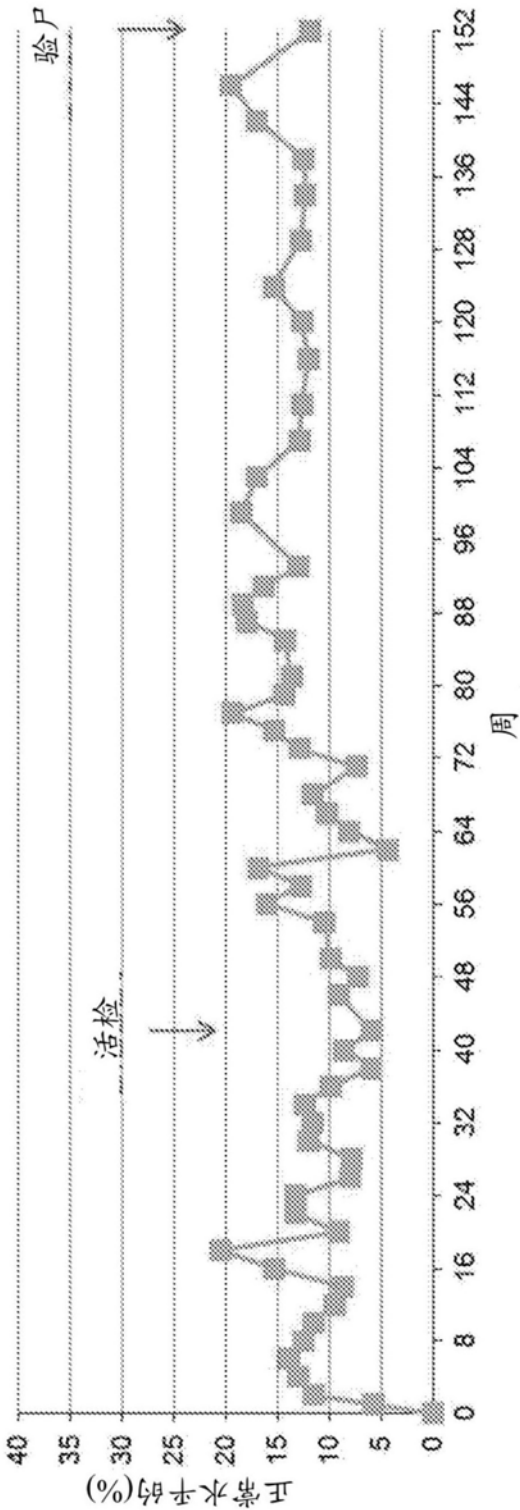


图22

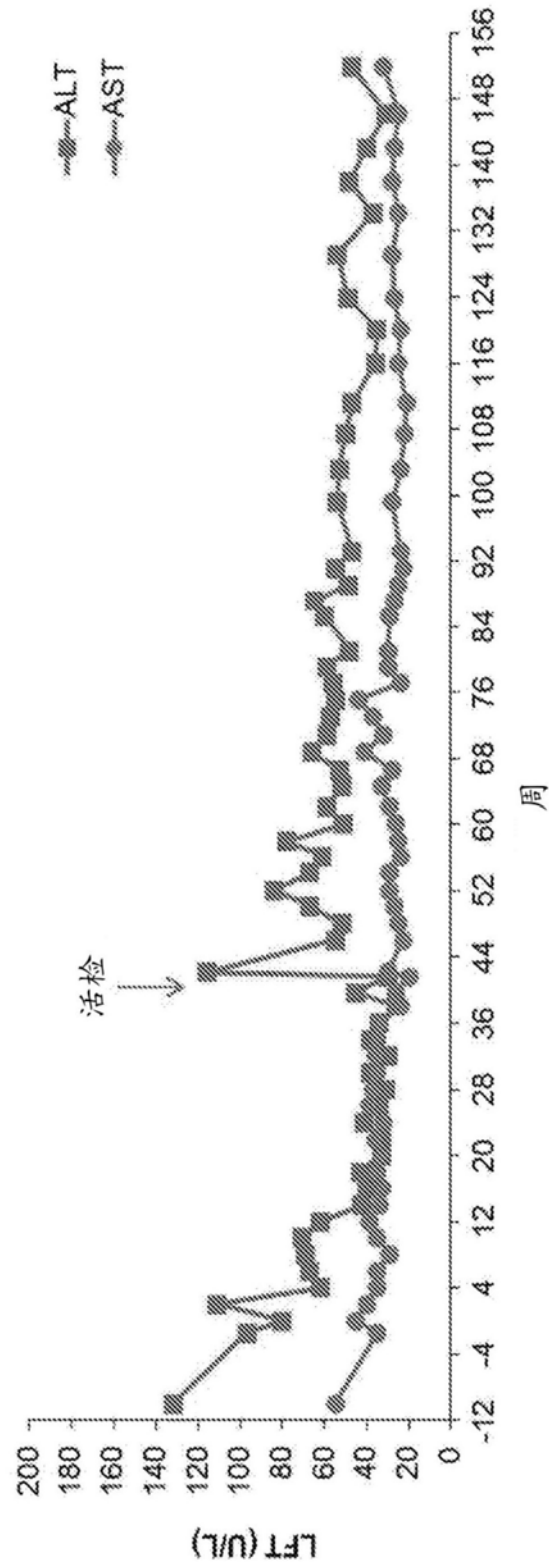
AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3×10^{12} GC/kg)

图23

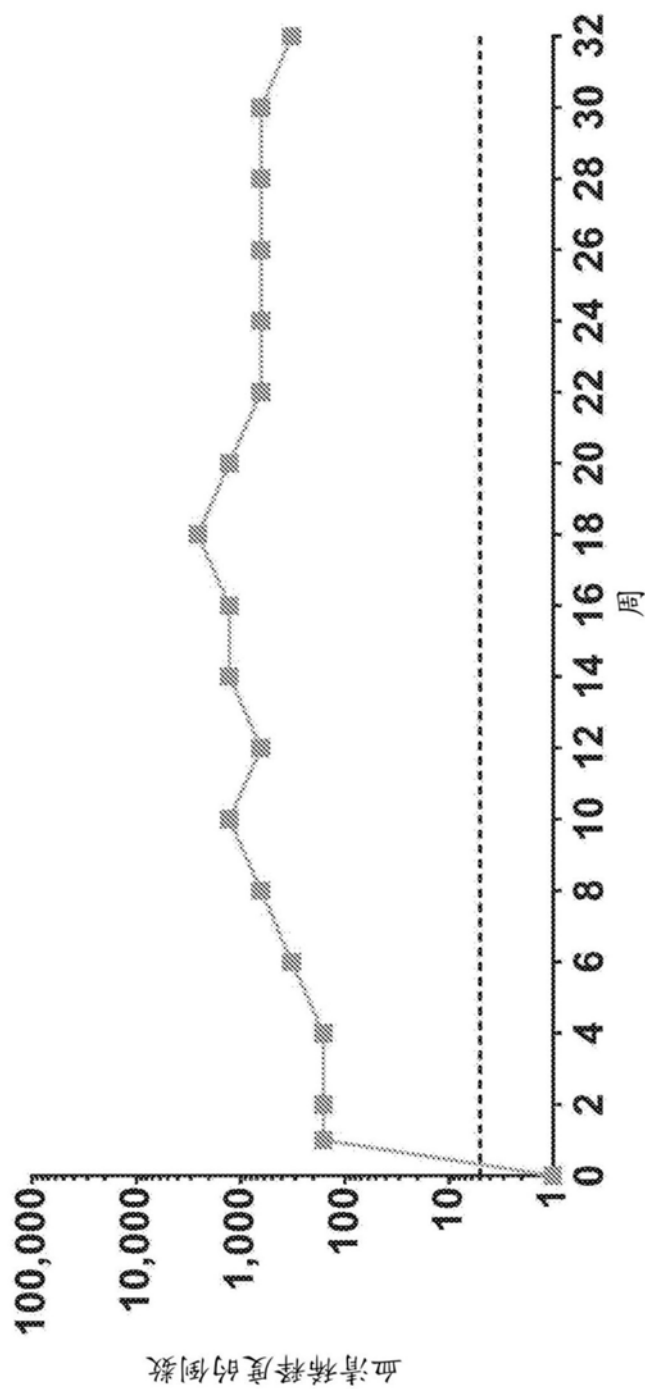


图24

百分比同一性矩阵-由Clustal2.1创建

1: hFVIIIco	100.00	77.24 (SEQ ID NO: 2)
2: hFVIII	77.24	100.00 (SEQ ID NO: 1)
hfVIIIco	atgcagatcgagctgagcacctgcttcttctgtgcctgctgcggttctgcttctccgcc	60
hfVIII	atgcaaatagagctctccacctgcttcttctgtgccttttgcgattctgctttagtgcc	60
	*** *	
hfVIIIco	acccggcgggtactacctgggagccgtggagctgagctgggattacatgcagagcgatctg	120
hfVIII	accagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactatatgcaaagtgatctc	120
	*** *	
hfVIIIco	ggagagctgccagtggtgcccgggtcccaccacgggtgccaaagagcttcccattcaac	180
hfVIII	ggtgagctgctgtggacgcaagatttctcctagagtgcacaaatctttccattcaac	180
	*** *	
hfVIIIco	accagcgtggtgtacaagaagacctgttctgtggagttcacggtacacctgttcaacatc	240
hfVIII	acctcagtcgtgtacaaaagactctgtttttagaattcacggatcaccttttcaacatc	240
	*** *	
hfVIIIco	gccaagccacggccacctggatgggactgctgggaccaacaatccaggccgaggtgtac	300
hfVIII	gctaagccaagccacacctggatgggtatgctaggtcctaccatccaggctgaggtttat	300
	** *	
hfVIIIco	gataccgtggtgatcacctgaagaacatggcctctcatcctgtgtccctgcacgcccgtg	360
hfVIII	gatacagtggtcattacacttaagaacatggcttccatcctgtcagtcctcatgctgtt	360
	***** *	
hfVIIIco	ggagtgagctactggaagccagcagggagccgagtagcatgatcagaccagccagcgg	420
hfVIII	ggtgtatcctactggaagcttctgagggagctgaatatgatgatcagaccagtcacagg	420
	** *	
hfVIIIco	gagaagggagatgataaggtgttcccaggagggaagccacacctaactgtgtggcaggtgtg	480
hfVIII	gagaagaagatgataaagtcttccctgggtggaagccatacatatgtctggcaggtctg	480
	***** *	
hfVIIIco	aaggagaacggaccaatggccagcgatccactgtgcctgacctacagctacctgagccac	540
hfVIII	aaagagaatggtccaatggcctctgacccactgtgccttacctactcatatcttttctcat	540
	** *	
hfVIIIco	gtggatctggtgaaggatctgaacagcggactgatcgagccctgctggtgtgccgggag	600
hfVIII	gtggacctggtaaaagacttgattcaggcctcattggagccctactagtagtgtagagaa	600
	***** *	
hfVIIIco	ggaagcctggccaaggagaagaccagaccctgcacaaagttcatcctgctgttcgcccgtg	660
hfVIII	gggagctctggccaaggaaaagacacagaccttgacaaaattatactactttttgctgta	660
	** *	
hfVIIIco	ttcgatgagggaaagagctggcacagcgagaccaagaacagcctgatgcaggatcgggat	720
hfVIII	tttgatgaagggaaggttgccactcagaaacaaagaaactccttgatgcaggatagggat	720
	** *	
hfVIIIco	gccgccagcgccccggcctggccaaagatgcacaccgtgaacggatacgtgaaccggagc	780
hfVIII	gctgcactgtctcgccctggcctaaaatgcacacagtcattgggtatgtcaacaggtct	780
	** *	

图25

hfVIIco	ctgccaggactgatcggaatgccaccggaagagcgtgtactggcagtgatcggaatggga	840
hfVIII	ctgccaggctgtgattggatgccaccggaatcagtgattggcatgtgattggaatgggc	840
	***** **	
hfVIIco	accacccagaggtgcactctatcttctggaggacacacctttctggtgcggaaccac	900
hfVIII	accactcctgaagtgcactcaatattcctcgaaggtcacacatttctgtgaggaaccat	900
	***** **	
hfVIIco	cggcaggccagcctggagatcagcccaatcaccttctgaccgccagaccctgctgatg	960
hfVIII	cgccaggcgccttggaatctcgccaataactttcttactgctcaaacactcttgatg	960
	** *****	
hfVIIco	gatctgggacagttcctgctgttctgccatatcagcagccaccagcacgatggaatggag	1020
hfVIII	gacctggacagtttctaatgtttgtcatatctcttccaccaacatgatggcatggaa	1020
	** ** *****	
hfVIIco	gcctacgtgaggtggatagctgcccagaggagccacagctgcggtgaagaacaacgag	1080
hfVIII	gcttatgtcaaagtagacagctgtccagaggaaccccaactacgaatgaaaaataatgaa	1080
	** ** * * * * *	
hfVIIco	gaggccgaggattacgatgatgatctgaccgatagcgagatggatgtggtgcggttcgat	1140
hfVIII	gaagcggagactatgatgatgatcttactgattctgaaatggatgtggtcagggttgat	1140
	** ** * * * * *	
hfVIIco	gatgataacagcccaagcttcatccagatccggagcgtggccaagaagcaccacaaagacc	1200
hfVIII	gatgacaactctccttcttcttccaaattcgctcagttgccagaagcatcctaaact	1200
	***** **	
hfVIIco	tgggtgcactacatcgccgccgaggaggaggtgggattacgccccactggtgctggcc	1260
hfVIII	tgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgctcccttagtctcgcc	1260
	***** **	
hfVIIco	cctgatgatcgagctacaagagccagtagctgaacaacggaccacagcggatcgagcgg	1320
hfVIII	cccgatgacagaagttataaaagtcaatatttgaacaatggccctcagcggattggtagg	1320
	** *****	
hfVIIco	aagtaccccaaagtgcggttcatggcctacaccgatgagaccttcaagacccggaggcc	1380
hfVIII	aagtacaaaaaagtcggatttatggcatacacagatgaacctttaagactcgtgaagct	1380
	***** **	
hfVIIco	atccagcacgagagcggaatcctgggaccactgctgtacggagaggtgggagataccctg	1440
hfVIII	attcagcatgaatcaggaatcttgggaccttactttatggggaagtggagacacactg	1440
	** *****	
hfVIIco	ctgatcatcttcaagaaccaggccagcggccatacaacatctaccacacggaatcacc	1500
hfVIII	ttgatttatattaagaatcaagcaagcagaccatataacatctaccctcacggaatcact	1500
	**** * * *	
hfVIIco	gatgtgcggccactgtacagcggcggtgccaaggagtgagacacctgaaggatttc	1560
hfVIII	gatgtccgtcctttgtattcaaggagattacaaaagggtgaaaacatttgaggatttt	1560
	***** **	
hfVIIco	ccaatcctgccaggagagatcttcaagtacaagtggacagtgcagtgaggatggacca	1620
hfVIII	ccaattctgccaggagaaatattcaaatataaatggacagtgcagtgtagaagatgggcca	1620
	***** *****	
hfVIIco	accaagtctgatccaagatgcctgaccagatactacagcagctttgtgaacatggagaga	1680
hfVIII	actaaatcagatcctcggtgcctgaccgctattactctagtttcgttaatatggagaga	1680
	** * * *	

图25 (续)

hfVIIIco	gacctggcctctggactgattggaccactgctgatctgctacccggagtctgtggatcag	1740
hfVIII	gatctagcttcaggactcattggccctctcctcatctgctacaaagaatctgtagctcaa	1740
	** ** *	
hfVIIIco	agaggaaaccagatcatgtctgataagagaaatgtgatcctgttctctgtgtttgatgag	1800
hfVIII	agaggaaaccagataaatgtcagacaagaggaatgtcatcctgtttctgtatttgatgag	1800
	* *	
hfVIIIco	aacagaagctggtacctgacagagaacatccagagattcctgccaaaccagccggagt	1860
hfVIII	aaccgaagctggtacctcacagagaatatacaacgctttctcccaatccagctggagt	1860
	* *	
hfVIIIco	cagctggaggatccagagttccaggccagcaacatcatgcacagcatcaacggatacgt	1920
hfVIII	cagcttgaggatccagagttccaagcctccaacatcatgcacagcatcaatggctatgt	1920
	* *	
hfVIIIco	ttcgatagcctgcagctgagcgtgtgctgcaggagggtggcctattggtatatcctgagc	1980
hfVIII	tttgatagtttgagttgtcagttgtgttgcatgaggtggcactggtagattctaaagc	1980
	* *	
hfVIIIco	atcggagcccagaccgatttctgagcgtgttcttcagcggatacaccttcaagcacaag	2040
hfVIII	attggagcacagactgacttcttctgtcttcttctgtgataccttcaaacacaaa	2040
	* *	
hfVIIIco	atggtgtacaggagataccctgacccgtgttccattctccggagagaccgtgttcatgagc	2100
hfVIII	atggtctatgaagacacactcacctattccattctcaggagaaactgtcttcatgtcg	2100
	* *	
hfVIIIco	atggagaaccaggactgtggatcctgggatgccacaactctgatttcagaacagagga	2160
hfVIII	atggaaaaccaggctctatggattctgggtgccacaactcagactttcgaacagaggc	2160
	* *	
hfVIIIco	atgactgcctgctgaaagtgtccagctgtgataagaacactggagattactatgaggat	2220
hfVIII	atgaccgccttactgaaggtttctcgttgtgacaagaacactggtgattcttacgaggac	2220
	* *	
hfVIIIco	agctatgaggatatctctgcctacctgctgagcaagaacaatgccattgagccaagaagc	2280
hfVIII	agttatgaagatatttcagcatacttgctgagtataaaacaatgccattgaaccaagaagc	2280
	* *	
hfVIIIco	ttcagccagaaccaccagtgctgaagagacaccagagagagatcaccagaaccaccctg	2340
hfVIII	ttctcccagaatccaccagttcttgaacgcccataacgggaataactcgtactactctt	2340
	* *	
hfVIIIco	cagctctgatcaggaggagattgattatgatgataccatctctgtggagatgaagaaggag	2400
hfVIII	cagtcagatcaagaggaaattgactatgatgataccatcatcagttgaaatgaagaaggaa	2400
	* *	
hfVIIIco	gattttgatatactatgatgaggatgagaaccagagcccaagaagcttccagaagaagacc	2460
hfVIII	gattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagccccgcagctttcaaaagaaaaca	2460
	* *	
hfVIIIco	agacactacttcatcgctgcagtgagagactgtgggattatggaatgagcagcagccca	2520
hfVIII	cgacactattttattgctgcagtgagagggctctggattatgggatgagtagctcccca	2520
	* *	
hfVIIIco	cacgtgctgagaaacagagcccagagcggatctgtgccacagttcaagaaggtgtgttc	2580
hfVIII	catgttctaagaaacagggtcagagtggtgctcctcagttcaagaaggtgtgttc	2580
	* *	

图25 (续)

hfVIIco	caggagttcaccgatggaagcttcacccagccactgtaccggggagagctgaacgagcac	2640
hfVIII	caggaatttactgatggctcctttactcagcccttataccgtggagaactaaatgaacat	2640
	***** ** ** ***** ** ** ***** * ***** ***** ** ** **	
hfVIIco	ctgggactgctgggaccatacatccgggcccaggtggaggataaacatcatggtgaccttc	2700
hfVIII	ttgggactcctggggccatatataagagcagaagttgaagataatatcatggttaactttc	2700
	***** ***** ***** ** * ** ** ** ** ***** ***** ** **	
hfVIIco	cggaaccaggccagccggccatacagcttctacagcagcctgatcagctacgaggaggat	2760
hfVIII	agaaatcaggcctctcgtccctattccttctattctagccttatttcttatgaggaagat	2760
	* ** ***** ** ** ** ***** ***** ** ***** **	
hfVIIco	cagcggcagggagccgagccaggaagaacttcgtgaagccaaacgagaccaagacctac	2820
hfVIII	cagaggcaaggagcagaacctagaaaaaactttgtcaagcctaataaaccaaaacttac	2820
	*** ***** ** ** * ** ***** ** ***** ** ***** ** **	
hfVIIco	ttctggaaggtgcagcaccacatggccccaaccaaggatgagttcgattgcaaggcctgg	2880
hfVIII	tttggaagtgcaacatcatatggcaccactaaagatgagtttgactgcaaggcctgg	2880
	** ***** ***** ** ** ***** ** ** ***** ***** ** *****	
hfVIIco	gcctacttcagcgatgtggatctggagaaggatgtgcacagcggactgatcggacctg	2940
hfVIII	gcttatttctctgatgttgacctggaaaaagatgtgcactcaggcctgattggaccctt	2940
	** ** ** ***** ** ***** ** ***** ***** ** ***** *****	
hfVIIco	ctggtgtgccacaccaacacctgaacccagccacggacggcaggtgacctgcaggag	3000
hfVIII	ctggtctgccacactaacacactgaacctgctcatgggagacaagtacagtacaggaa	3000
	***** ***** ***** ***** ***** ** ** * ** ***** ** *****	
hfVIIco	ttcgccctgtttcttaccatcttctgatgagaccaagagctggtacttcaccgagaacatg	3060
hfVIII	tttctctgtttttaccatcttctgatgagacaaaagctggtacttcactgaaaatatg	3060
	** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** ** **	
hfVIIco	gagcggaactgccggggcccttgaacatccagatggaggatccaaccttcaaggagaac	3120
hfVIII	gaaagaaactgcagggctccctgcaatatccagatggaagatcccacttttaagagaat	3120
	** * ***** ** ** ***** ***** ***** ***** ** ** *****	
hfVIIco	taccggttccacgcatcaacggatacatcatggataccctgccaggactggtgatggcc	3180
hfVIII	tatcgcttccatgcaatcaatggctacataatggatacactacctggcttagtaatggct	3180
	** ** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** ** ** * ** *****	
hfVIIco	caggatcagcggatccggtggtacctgctgagcatgggaagcaacgagaacatccacagc	3240
hfVIII	caggatcaaaggattcgatggtatctgctcagcatggcagcaatgaaaacatccattct	3240
	***** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
hfVIIco	atccacttcagcggacacgtgttcaccggtgcggaagaaggaggagtacaagatggccctg	3300
hfVIII	attcatttcagtgacatgtgttcactgtacgaaaaaaggaggagtataaatggcactg	3300
	** ** ***** ***** ***** ***** ** ** ** ***** ***** *****	
hfVIIco	tacaacctgtaccaggagtgttcgagaccgtggagatgctgccaaagcaaggccggaatc	3360
hfVIII	tacaatctctatccagggtgttttgagacagtggaaatgttaccatccaaagctggaatt	3360
	***** ** ** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** *****	
hfVIIco	tggcgggtggagtgcctgatcgagagacacctgcacgcccgaatgagcacctgttcctg	3420
hfVIII	tggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacactttttctg	3420
	***** ***** ***** ** ** ***** ** ** ***** ***** *****	
hfVIIco	gtgtacagcaacaagtgtccagacccactgggaatggccagcggacacatccgggatttc	3480
hfVIII	gtgtacagcaataagtgtcagactccctgggaatggcttctggacacattagagatttc	3480
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	

图25 (续)

hfVIIco	cagatcacgcagcggacagtagcggacagtgggcccaagctggccggctgcactac	3540
hfVIII	cagattacagcttcaggacaatatggacagtgggcccaagctggccagacttcattat	3540
	***** ** **	
hfVIIco	agcggaaagcatcaacgcctggagcaccaaggagccattcagctggatcaaagtggatctg	3600
hfVIII	tccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagcccttttcttgatcaagtggtgctg	3600
	***** **	
hfVIIco	ctggcccaatgatcatccacggaatcaagaccaggagcccggcagaagttcagcagc	3660
hfVIII	ttggcaccaatgattattcacggcatcaagaccagggtgcccgtcagaagttctccagc	3660
	**** ***** ** *****	
hfVIIco	ctgtacatcagccagttcatcatcatgtacagcctggatggaagaagtggcagacctac	3720
hfVIII	ctctacatctctcagtttatcatcatgtatagcttgatgggaagaagtggcagacttat	3720
	** ***** ***** ** *****	
hfVIIco	cggggaaacagcacgggaacctgatggtgttcttcggaaacgtggatagcagcgggaatc	3780
hfVIII	cgaggaaattccactggaaccttaattggtcttcttggcaatgtggattcatctgggata	3780
	** ***** ** ***** * *****	
hfVIIco	aagcacaacatcttcaaccaccaaactcatcgccgatacatccggctgcacccaacccac	3840
hfVIII	aaacacaatatttttaacctccaattatgtctcgatacatccgtttgcaccaactcat	3840
	** ***** ** ** ***** ***** ** *****	
hfVIIco	tacagcatcagaagcacctcgcgatggagctgatgggatgtgatctgaacagctgctcc	3900
hfVIII	tatagcattcgagcactcttcgcctggagttgatgggctgtgatttaaatagttgcagc	3900
	** ***** * ***** ** ***** ***** ***** * ** ** *	
hfVIIco	atgccactgggaatggagagcaaggccatcagcgatgccagatcacgcagcagctac	3960
hfVIII	atgccattgggaatggagagtaaaagcaatatcagatgcacagattactgttcatctac	3960
	***** ***** ** ** ***** ***** ***** ** ** *	
hfVIIco	ttcaccaacatgttcgccacctggagcccaagcaaggcccgctgcacctgcaggagcgg	4020
hfVIII	tttacaatatgtttgccacctggtctctcttcaaaagctcgacttcacctcaaggaggg	4020
	** ***** ***** ***** ** ***** ** ***** ** ** *	
hfVIIco	agcaacgcctggcgccacaggtgaataacccaagagtggtgcaggtggatttccag	4080
hfVIII	agtaatgcctggagacctcaggtgaataatccaaaagagtggtgcaagtggacttccag	4080
	** * ***** * ** ***** ***** ***** ***** *****	
hfVIIco	aagaccatgaaggtgaccggagtaccacccaggagtgaaagagcctgtgactagcatg	4140
hfVIII	aagacaatgaaagtcacaggagtaactactcaggagtaaaatctctgttaccagcatg	4140
	***** ***** ** ** ***** ** ***** ***** *****	
hfVIIco	tatgtgaaggagttcctgatcagcagcagccaggatggacaccagtggaacctgttcttc	4200
hfVIII	tatgtgaaggagttcctcatctccagcagtcagatggccatcagtggaactctcttttt	4200
	***** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ** *	
hfVIIco	cagaacggaaaggtgaaggtgttcagggaaccaggatagcttcaccccagtggtgaac	4260
hfVIII	cagaatggcaaagtaaaggtttttcagggaatcaagactccttcacacctgtggtgaac	4260
	***** ** ** ** ***** ** ***** ** ***** ***** *****	
hfVIIco	agcctggatccaccactgtgaccgatacctgcggatccaccacagagctgggtgcac	4320
hfVIII	tctctagaccacggttactgactcgctaccttcgaattcaccccagagttgggtgcac	4320
	** ** ***** * ***** ** ***** ** ***** ***** *****	
hfVIIco	cagatcgccctgagaatggaggtgctgggatgcgagggccaggatctgtactga	4374
hfVIII	cagattgccctgaggtggaggttctgggctgcgaggcacaggacctctac---	4371
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** *	

图25 (续)