



(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

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22)申请日 2017.04.13

72001

(30)优先权数据

代理人 黄登高 罗文锋

62/323,336 2016.04.15 US

(51)Int.Cl.

62/331,807 2016.05.04 US

A61K 48/00(2006.01)

62/428,866 2016.12.01 US

C12N 15/86(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/755(2006.01)

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

权利要求书2页 说明书31页

(72)发明人 L.王 J.M.威尔逊 J.A.西德拉恩

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(ITS)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'ITS。

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'ITS和/或AAV3'ITS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(ITS)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'ITS。

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SEQ 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在临幊上用作替代重组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 K0小鼠中产生抗体之前hFVIII活性的变化。FVIII K0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±SEM值(n=10只/组)。
- [0024] 图6显示在FVIII K0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 K0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±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 K0小鼠中的hFVIII活性。FVIII K0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±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 K0小鼠中的抗hFVIII抗体滴度。FVIII K0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 K0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±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±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±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的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/载体中配制。缓冲液/载体应包含防止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)在临幊上用作替代重组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(5'LTR)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'LTR,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LTR序列或其缺失版本(Δ LTR)。然而,可以选择来自其他AAV源的LTR。当LTR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'LTR、hFVIII编码序列和任何调节序列以及AAV 3'LTR。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'LTR,称为Δ LTR,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'LTR。在一个实施方案中,5'LTR序列示于SEQ ID NO:11中。在一个实施方案中,3'LTR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α1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;和乙型肝炎病毒芯启动子(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WO 2011/126808和WO 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芯增强子),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

组合名称	En34	ABPS	EnTTR	净长 (bp)
[0071]	E01	1	0	34
	E02	0	1	42
	E03	0	0	100
	E04	1	1	76
	E05	0	1	142
	E06	1	0	134
	E07	2	0	68
	E08	0	2	84
	E09	0	0	200
	E10	1	1	176
[0072]	E11	2	0	168
	E12	0	2	184
	E13	1	2	118
	E14	2	1	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体、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KC1。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。施用途径包括例如全身、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径。

[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 Ther Methods*. 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40mM NaCl;和(e)从在相当于至少70mM NaCl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.Viro1.(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°C下执行约15分钟,但可以在较低温度(例如,约37°C至约50°C)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°C)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°C下持续约15分钟,但温度可以降低(例如,约70°C至约90°C)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.hVIII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≤2%的正常水平的基线FVIII活性或记录的FVIII活性≤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≤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%、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/mm³,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≥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的序列表示于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.hFIII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.hFIII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 K0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芯增强子)、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、Vandenbergh 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 (BarHarbor, 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0.12IU/ml至2.12IU/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 μQuant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] C 5 7 B L / 6 和 1 2 9 背 景 中 的 F V I I I K O 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.TBG-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°C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 μQuant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3E12 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Ni jmeggen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-Karber)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(ITS)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。ITS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(ITS)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。ITS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≤2%的正常水平的基线FVIII活性或记录的FVIII活性≤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≤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 293 MCB 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] AA Vhu.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(LTR):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(LTR):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(LTR):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培养基代替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 Stedim Biotech 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 \times 10¹³GC/kgAAV.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 \times 10¹³GC/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: 群组和载体概述

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		
[0309]	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表中的SEQ ID NO和序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

atgcaaata gactctccac ctgcttctt ctgtgcctt tgcgattctg cttagtgcc 60

accagaagat actacactggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaatctt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtatcaattca cggatcacct tttcaacatc 240

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggttat 300

gatacagtgg tcattacact taagaacatg gttccatc ctgtcagtc tcatgtgtt 360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420

gagaaagaag atgataaaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctcg 480

aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctt cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgttagagaa	600	
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgcgtta	660	
tttgatgaag ggaaaagtig gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggataggat	720	
gctgcacatcg ctgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggct	780	
ctgccaggc tgattggatg ccacaggaaa tcagtcattt ggcatgtgat tggaatggc	840	
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat	900	
cgccaggcgt ctttggaaat ctgcacaata actttcctt ctgctaaac actttgatg	960	
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctttccc accaacatga tggcatggaa	1020	
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080	
gaagcggaaag actatgtatg tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140	
gatgacaact ctcccttcatt tatccaaatt cgctcagttt ccaagaagca tcctaaaact	1200	
[0002]	tgggtacatt acattgtgc tgaagaggag gactggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
	cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
	aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa ccttaagac tcgtgaagct	1380
	attcagcatg aatcaggaat ctgggacct ttactttatg gggaaagtgg agacacactg	1440
	ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
	gatgtccgtc ctttgttattc aaggagatta ccaaaggatg taaaacattt gaaggatttt	1560
	ccaaattctgc caggagaat attcaaataat aaatggacag tgactgtaga agatggcca	1620
	actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gttcgtaa tatggagaga	1680
	gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcattgtct acaaagaatc tgttagatcaa	1740
	agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgtttctgt atttgatgag	1800
	aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcattc tcccaatcc agctggagtg	1860

cagcttggagg atccagagtt ccaaggctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920	
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgggg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980	
atggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatataccctt caaacacaaa	2040	
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100	
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagacttcg gaacagaggc	2160	
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctgggtgatta ttacgaggac	2220	
agttatgaag atatttcage atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280	
ttctcccaga atccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactacttt	2340	
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgtat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400	
gattttgaca tttatgtatgaa ggtatgaaaat cagagcccc gcagcttca aaagaaaaca	2460	
cgacactatt ttattgtgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccc	2520	
[0003]	catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agtttttc	2580
	caggaattta ctgatggc tc ttactcag cccttataacc gtggagaact aaatgaacat	2640
	ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
	agaaatcagg cctctcgcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat	2760
	cagaggcaag gaggcagaacc tagaaaaaac ttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
	ttttggaaag tgcaacatca tatggcaccc actaaagatg agtttgactg caaaggctgg	2880
	gttttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact cagggctgat tggacccctt	2940
	ctggctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggg gacaagtgc agtacaggaa	3000
	tttgctctgt ttttaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg	3060
	gaaagaaaact gcagggctcc ctgcaatatc cagatggaaat atcccacttt taaagagaat	3120
	tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180

caggatcaa ggattcgatg gatatcgctc agcatggca gcaatgaaaa catccattct	3240
attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctct atccaggtgt tttttagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt	3360
tggcgggtgg aatgccttat tggcagcat ctacatgctg ggtatgagcac acttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactccctg ggaatggctt ctggacacat tagagattt	3480
cagattacag cttcaggaca atatggacag tggccccc aa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc	3660
ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtgcagacttat	3720
cgagggaaatt ccactggAAC cttaatggTC ttctttggCA atgtggattc atctgggata	3780
aaacacaata ttttaaccc tccaattatt gctcgataca tccgTTGCA cccaaCTcat	3840
[0004] tatacgattc gcagcactct tcgcatggag ttgatggct gtgatttaaa tagttgcagc	3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatcctac	3960
tttaccaata tgTTTGCAC ctggTCTCT tcaaaAGCTC gacttcaccc ccaaggggagg	4020
agtaatgcct ggagaccta ggtgaataat cccaaAGAGT ggctgcaagt ggacttccag	4080
aagacaatga aagtccacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg	4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctttttt	4200
cagaatggca aagtaaagg tttcaggga aatcaagact cttcacacc tgtggtaac	4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac	4320
cagattgccc tgaggatgga gttctggc 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 tgccgttctg cttctccgccc 60

acccggcggt actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg 120

ggagagctgc cagtggatgc ccgggttccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac 180

accagcgtgg tgttacaagaaa gaccctgttc gtggagttca ccgatcacct gttcaacatc 240

gccaaggccac ggccacccctg gatgggactg ctgggaccaa ccatccaggc cgagggtgtac 300

gataccgtgg tgatcacctt gaagaacatg gcctctcatc ctgtgtccct gcacggcgtg 360

ggagtgagct actggaaaggc cagcgaggga gccgagtagc atgatcagac cagccagcgg 420

gagaaggagg atgataaggt gttcccgagga ggaagccaca cctacgtgt gcagggctg 480

[0005]

aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac 540

www.english-test.net

Digitized by srujanika@gmail.com

gatgataaca gcccaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaaagacc	1200	
tgggtgcact acatcgccgc cgaggaggag gattgggatt acgccccact ggtgctggcc	1260	
cctgatgatc ggagctacaa gagccagtagc ctgaacaacg gaccacagcg gatcgacgg	1320	
aagtacaaaa aagtgcggtt catggctac accgatgaga cttcaagac ccggaggcc	1380	
atccagcacg agagcggaat cctggacca ctgctgtacg gagaggtggg agataccctg	1440	
ctgatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccataacaaca tctaccacca cggaatcacc	1500	
gatgtgcggc cactgtacag ccggccgtg ccaaaggag tgaagcacct gaaggattc	1560	
ccaaatcctgc caggagagat cttaagtac aagtggacag tgacagtggaa ggttggacca	1620	
accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	1680	
gacctggcct ctggactgtat tggaccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag	1740	
agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc ttttctgtt gtttcatgag	1800	
[0006]	aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaaccc agccggagtg	1860
	cagctggagg atccagagtt ccagggcagc aacatcatgc acagcatcaa cggatacgtg	1920
	ttcgatagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cacgaggtgg cctattgta tattctgagc	1980
	atcggagccc agaccgattt cctgagcgtg ttttcagcg gatacacctt caagcacaag	2040
	atgggtacg aggataccct gaccctgttc ccattctccg gagagaccgt gttcatgagc	2100
	atggagaacc caggactgtg gatcctggga tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2160
	atgactgccc tgcgtaaagt gtcagctgt gataagaaca ctggagatta ctatgaggat	2220
	agctatgagg atatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gccaagaagc	2280
	ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2340
	cagtctgatc aggaggagat tgattatgat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2400
	gattttgata tctatgatga ggatgagaac cagagccaa gaagcttcca gaagaagacc	2460

agacactact tcatacgctgc agtggagaga ctgtggatt atggaatgag cagcagccca	2520
cacgtgctga gaaacagagc ccagagcggc tctgtgccac agttcaagaa ggtgggttcc	2580
caggagttca ccgatggaaag cttcacccag ccactgtacc ggggagagct gaacgagcac	2640
ctgggactgc tgggaccata catccggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccc	2700
cggaaccagg ccagccggcc atacagcttc tacagcagcc tgcgtcgtca cgaggaggat	2760
cagcggcagg gagccgagcc acggaagaac ttgcgtcgtca caaacgagac caagaccc	2820
ttcttggagg tgcagcacca catggccca accaaggatg agttcgattt caaggcctgg	2880
gcctacttca gcgtatgttgc tctggagaag gatgtgcaca gctggactgtat cggaccactg	2940
ctgggtgtcc acaccaacac cctgaacccca gcccacggac ggcagggtgac cgtgcaggag	3000
ttcgccctgt tcttcaccat cttcgatgatg accaaggatg ggtacttcac cgagaacatg	3060
gagcggact gcccggcccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3120
[0007]	
taccgggtcc acgccccatcaa cggatacatc atggatacccg tgccaggact ggtgtatggcc	3180
caggatcagc ggatccggtg gtacccgtc agcatggaa gcaacgagaa catccacagc	3240
atccacttca gcccggactgt gttcacccgtc cggaaagaagg aggaggatcaa gatggccctg	3300
tacaacctgt acccaggagt gttcgagacc gtggagatgc tgccaaagcaa gcccggaaatc	3360
tggcgggtgg agtgcctgtat cggagagcac ctgcacgcccgaatgagcac cctgttcc	3420
gtgtacagca acaagtggca gacccactg ggaatggca gcccggacat ccgggatttc	3480
cagatcacccg ccagcggaca gtacggacag tggggccca agctggcccg gctgcactac	3540
agcggaaagca tcaacgcctg gagcaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg	3600
ctggcccaatgatcatcca cgaaatcaag acccaggagg cccggcagaa gttcagcagc	3660
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaatgt gcagaccc	3720
cggggaaaca gcacccggaaac cctgtatggtg ttcttcggaa acgtggatag cagcggaaatc	3780

aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gcccgataca tccggctgca cccaaacccac	3840
tacagcatca gaagcacccct gcggatggag ctgatggat gtgatctgaa cagctgctcc	3900
atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgccc agatcaccgc cagcagctac	3960
ttcaccaaca tggcgccac ctggagccc agcaaggccc ggctgcaccc gcagggacgg	4020
agcaacgcct ggccgcaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggattccag	4080
aagaccatga aggtgaccgg agtgaccacc cagggagtga agagcctgct gactagcatg	4140
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagttggac cctgttcttc	4200
cagaacggaa aggtgaaggt gttccaggga aaccaggata gcttcacccc agtggtaac	4260
gcctggatc caccactgct gaccgatac ctgcggatcc acccacagag ctgggtgcac	4320
cagatcgccc tgagaatgga ggtgctggaa 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

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

[0010] Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495

[0011] His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670

[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
tgtttgcgtc ttgcaatgtt tgcccatttt aggg

<210> 5
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列

[0017] <220>
<223> 构建的序列

<400> 5 ctacctcgtaatcgccccggccccctgttcaaacatgtcctaatactctgtctctgcaaggg 60

tcatcagtag tttccatct tactcaacat cctcccaagtg 100

<210> 6
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 构建的序列

<400> 6
aggtaattt ttaaactgtt tgctctgggtt aataatctca gg

<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 tctctcttg ttgactaagt caataatcag aatcagcagg tttgcagtca 120

gattggcagg gataagcage 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 catttttgc tttgttcctc ttggccttgg ttttgtacat 60

cagcttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggta atttataact aagagtgctc 120

tagtttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat gttgcttct gagaga 176

<210> 9

<211> 218

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建的序列

<400> 9

tggacacagg acgctgtggc ttctgagcca gggggcgact cagatccag ccagtggact 60

tagccccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgacacctgg ttaatattca ccagcagcct	120
cccccggtgc 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	
aataaaagtct gagtgccgg 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	
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggccacctt	60
ggtcgccccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgccaa ctccatca	120
agggttctc tgtatataat gattaacccg ccatgtact tatctact	168
<210> 12	
<211> 164	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 构建的序列	

<400> 12		
gataaggtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtat ggagttggcc	60	
actccctctc tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggccggc gaccaaaggc cgcccgacgc	120	
ccgggcttg cccggcgcc ctcagtgagc gagcggcgc gcag	164	
<210> 13		
<211> 7920		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 构建的序列		
<400> 13		
ctgcgcgctc gctcgctac tgaggccgcc cggcaaaagc ccggcgctcg ggcgacctt	60	
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120	
[0020] aggggttcct ttagttat gattaacccg ccatgctact tatctactta agtacacctg	180	
tgatcgcccg gcccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240	
agttttccat cttaactcaac atcctccag tggattcat ttcatagaac gaatgttccg	300	
atgctctaatt ctctctagac aaggttcata ttgttatggg ttacttattc tctttgtt	360	
gactaagtca ataatcagaa tcagcagggt tgcagtcaga ttggcaggaa taagcagcct	420	
agtcaggag aagttagtat aaaagccca ggctggagc agccatcagc ggccgccacc	480	
atgcagatcg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgccgttctg cttctccgcc	540	
acccggcggt actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg	600	
ggagagctgc cagtgatgc ccgggtccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac	660	
accagcgtgg tgtacaagaa gaccctgttc gtggagttca ccgatcacct gttcaacatc	720	
gccaagccac ggccaccctg gatggactg ctggaccaa ccatccagcc cgaggtgtac	780	

gataccgtgg tgcgtccctt gaagaacatg gcctctcatc ctgtgtccct gcacgcccgtg	840	
ggagttagct actggaaaggc cagcgaggga gccgagtagc atgatcagac cagccagcgg	900	
gagaaggagg atgataaggt gttcccaagga ggaagccaca cctacgtgt gcaggtgctg	960	
aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac	1020	
gtggatctgg tgaaggatctt gaacagcggc ctgatcgag ccctgcttgtt gtgccggag	1080	
ggaaggcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgtt gttcccgctg	1140	
ttcgatgagg gaaagagctg gcacagcggc accaagaaca gcctgatgca ggateggat	1200	
gccgccagcg cccgggcctg gccaaagatg cacaccgtga acggatacgt gaaccggagc	1260	
ctgccaggac tgatcgatg ccaccggaa agcgtgtact ggcacgtat cggaatggga	1320	
accacccag aggtgcactc tatcttcctg gagggacaca ccttcttgtt gcgaaaccac	1380	
cgccaggcca gcctggagat cagccaaatc accttcctga ccgcccagac cctgctgtat	1440	
[0021]	gatctggac agttcctgtt gttctgcattt atcagcagcc accagcacga tggaatggag	1500
	gcctacgtga aggtggatag ctgcccagag gagccacagc tgccgtgaa gaacaacgag	1560
	gaggccgagg attacgtatgatgatc tgatctgacc gatagcgaga tggatgttgtt gcggttcgtat	1620
	gatgataaca gccaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaaagacc	1680
	tgggtgcact acatgcgcgc cgaggaggag gattgggatt acgccccact ggtgctggcc	1740
	cctgatgatc ggagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gaccacagcg gatcgacgg	1800
	aagtacaaaa aagtgcgtt catggctac accgatgaga cttcaagac ccgggaggcc	1860
	atccagcacg agagcggaaat cctggacca ctgctgtacg gagaggtggg agataccctg	1920
	ctgatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccatacaaca tctacccaca cggaatcacc	1980
	gatgtgcggc cactgtacag cggcggtgtt ccaaaggag tgaagcacctt gaaggatttc	2040
	ccaatcctgc caggagagat cttcaagtac aagtggacag tgacagtgaa ggatggacca	2100

accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	2160	
gacctggcct ctggactgat tggaccactg ctgatctgct acaaggagtc tgtggatcag	2220	
agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtatcc tggatctgt gtggatgag	2280	
aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaaccc agccggagtg	2340	
cagctggagg atccagagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cggatacgt	2400	
ttcgatagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cacgaggtgg cctattggta tattctgagc	2460	
atcgagcccc agaccgattt cctgagcgtg ttcttcagcg gatacacctt caagcacaag	2520	
atgggttacg aggataccct gaccctgttc ccattctcg gagagaccgt gttcatgagc	2580	
atggagaacc caggactgtg gatcctggga tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2640	
atgactgccc tgctgaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatta ctatgaggat	2700	
agctatgagg atatctctgc ctacccgtcg agcaagaaca atgccattga gccaagaagc	2760	
[0022]	ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2820
	cagtctgatc aggaggagat tgattatgtat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2880
	gattttgata tctatgtatgaa ggatgagaac cagagccaa gaagcttcca gaagaagacc	2940
	agacactact tcatcgctgc agtggagaga ctgtgggatt atggaatgag cagcagccca	3000
	cacgtgtcgaa gaaacagagc ccagagcgaa tctgtgccac agttcaagaa ggtgggttcc	3060
	caggagttca ccgatgaaag cttcacccag ccactgtacc gggagagct gaacgagcac	3120
	ctggactgc tgggaccata catccgggccc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccc	3180
	cgaaaccagg ccagccggcc atacagcttac tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggat	3240
	cagcggcagg gagcccgagcc acggaagaac ttcgtgaagc caaacgagac caagaccc	3300
	ttcttggagg tgcagcacca catggccca accaaggatg agttcgattt caaggcctgg	3360
	gcctacttca gcgatgtgga tctggagaag gatgtgcaca gcccgtatc cgaccactg	3420

ctgggtgtgcc acaccaaacac cctgaaccca gcccacggac ggcaggtgac cgtgcaggag	3480
ttcgccctgt ttttacccat cttcgatgag accaagagct ggtacttcac cgagaacatg	3540
gagcggaaact gccggggcccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3600
taccggttcc acgccatcaa cgatcacatc atggataccc tgccaggact ggtgatggcc	3660
caggatcagc ggatccggtg gtacctgctg agcatggaa gcaacgagaa catccacagc	3720
atccacttca gcggacacgt gttcaccgtg cgaaagaagg aggagtacaa gatggccctg	3780
tacaacctgt acccaggagt gttcgagacc gtggagatgc tgccaagcaa ggccgaaatc	3840
tggcgggtgg agtgcctgat cggagagcac ctgcacgccc gaatgagcac cctgttcctg	3900
gtgtacagca acaagtgcc aacccactg ggaatggcca gggacacat ccggatttc	3960
cagatcaccg ccagcggaca gtacggacag tggcccaa agctggcccg gtcactac	4020
agcggaaagca tcaacgcctg gaggaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg	4080
[0023] ctggcccaa tgcatcatcca cgaaatcaag acccaggag cccggcagaa gttcagcagc	4140
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtgc gagacctac	4200
cgggaaaca gcacggaaac cctgatggtg ttctcgaa acgtggatag cagcggaaatc	4260
aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gcccataca tccggctgca cccaaacccac	4320
tacagcatca gaagcacccct gggatggag ctgatggat gtatctgaa cagctgctcc	4380
atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgccc agatcaccgc cagcagctac	4440
ttcaccaaca tggcgecac ctggagccca agcaaggccc ggctgcacct gcagggacgg	4500
agcaacgcct ggccggccaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggattccag	4560
aagaccatga aggtgaccgg agtggaccacc cagggagtga agagcctgct gactagcatg	4620
tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagtggac ccttttttc	4680
cagaacggaa aggtgaaggt gttccaggga aaccaggata gttcaccccc agtggtaac	4740

agcctggate caccactgct gacccgatac ctgcggatcc acccacagag ctgggtgcac	4800
cagatcgccc tgagaatgga ggtgctggga tgcgaggccc aggatctgta ctgatgagca	4860
tgcataaaag tctgagtggtt cggcagcctg tgtgtgcctg gtttctctt gtcccgaaat	4920
gtgcaaacaa tggaggtgct cgagtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca	4980
aggaaccctt agtgtatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg	5040
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccgg ggcggccctca gtgagcgagc	5100
gagcgcgcag ccttaattaa cctaattcac tggccgttgtt tttacaacgt cgtgactggg	5160
aaaaccctgg cgttacccaa cttaaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc	5220
gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttccaaaca gttgcgcagc ctgaatggcg	5280
aatgggacgc gcccgttagc ggcgcattaa ggcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg	5340
tgaccgctac acttgcgcgc gcccgtgcgc cgcgtccctt cgcttttttc ctttttttc	5400
[0024] tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc	5460
gatttagtgc ttacggcac ctgcacccca aaaaacttga ttagggtgat gttcacgtt	5520
gtggggccatc gcccgtatag acggtttttc gcccgttgc gttggagtcc acgttcttta	5580
atagtggact ctgttccaa actgaaacaa cactcaaccc tatctcggtc tatttttttgc	5640
atttataagg gattttggcg atttcggctt attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa	5700
aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttgggg	5760
aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct	5820
catgagacaa taaccctgat aaatgttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagttat	5880
tcaacatttc cgtgtcgcccc ttattccctt tttgcggca tttgccttc ctgttttgc	5940
tcacccagaa acgctggtaa aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg	6000
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgcg agttttcgcc ccgaagaacg	6060

tttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggatttat cccgtattga	6120	
cggcggcaa gagcaactcg gtcggccat acactattct cagaatgact tggttgagta	6180	
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	6240	
tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc	6300	
gaaggagcta accgctttt tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcggt	6360	
ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtac	6420	
aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttccggca	6480	
acaattaata gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttctgc gctggccct	6540	
tccggctggc tggtttattt ctgataaaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcgtat	6600	
cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg	6660	
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggta cctcaactgat	6720	
[0025]	taagcattgg taactgtcag accaagttt ctcataatata ctttagattt attaaaaact	6780
	tcattttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatcctttt gataatctca tgacaaaaat	6840
	cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggata	6900
	ttctttagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgctt gaaacaaaaa aaccaccgt	6960
	accagcggtg gtttgggcg cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg	7020
	cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgtat taggccacca	7080
	cttcaagaac tctgtageac cgcctacata cctcgctctg ctaatctgt taccagtggc	7140
	tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac tcaagacgt agttaccgga	7200
	taaggcgcag cggtcggtt gaaacgggggg ttctgtcaca cagccagct tggagcgaac	7260
	gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgctcccgaa	7320
	agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	7380

ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtccgtcgggttgcaccctctg	7440
acttgagcgt cgattttgt gatgctcgta agggggcgg agcctatgaa aaaacgccag	7500
caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcctt tttgctcaca tggtttcc	7560
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc	7620
tcgcgcgcgc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgc	7680
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgcacag	7740
gttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca	7800
ttaggcaccc caggcttac actttatgct tcggctcgat atgtgtgtg 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		
ctgcgcgcctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcaccc		60
ggtcgcgcgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatca		120
aggggttcct ttagttat gattaacccg ccatgctact tatctactta agtaccc		180
tgatgcgcgc gcccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgaaat ggtcatc		240
agttttccat cttactcaac atcctccag tgaggtaat tttaaaactg ttgtctgg		300
ttaataatct caggaggta attttaaac tggatgtct ggttaataat ctcaggaa		360
tcatttcata gaacgaatgt tccgatgtc taatctctt agacaaggaa catattgt		420
tgggttactt attctcttt tggactaa gtcataatc agaatcagca ggtttgcagt		480

cagattggca gggataagca gcctagctca ggagaagtga gtataaaagc cccaggctgg	540	
gagcagccat cagcggccgc caccatgcag atcgagctga gcacctgctt cttcctgtgc	600	
ctgctgcggt tctgcttctc cgccacccgg cggtactacc tgggagccgt ggagctgagc	660	
tgggattaca tgcagagcga tctggagag ctgccagtgg atgcccgtt cccaccacgg	720	
gtgccaaaga gcttcccatt caacaccagc gtggtgtaca agaagacct gttcgtggag	780	
ttcaccgatc acctgttcaa catcgccaag ccacggccac cctggatggg actgctggga	840	
ccaaccatcc agggcgaggt gtacgatacc gtggtgatca ccctgaagaa catggctct	900	
catcctgtgt ccctgcacgc cgtggagtg agctactgga aggccagcga gggagccgag	960	
tacgatgatc agaccagcca gcgggagaag gaggatgata aggtgttccc aggaggaagc	1020	
cacacctacg tgtggcaggt gctgaaggag aacggaccaa tggccagcga tccactgtgc	1080	
ctgacctaca gctacctgag ccacgtggat ctggtaagg atctgaacag cggactgatc	1140	
[0027]	ggagccctgc tgggtgtcccg ggagggaaagc ctggccaagg agaagaccca gaccctgcac	1200
	aagttcatcc tgctgttcgc cgtgttcgat gaggaaaga gctggcacag cgagaccaag	1260
	aacagcctga tgcaggatcg ggatgccgcc agcgccccgg cctggccaaa gatgcacacc	1320
	gtgaacggat acgtgaaccg gacgcgtcc ggactgatcg gatgccaccc gaagagcgtg	1380
	tactggcacg tgatcggaat ggaaaccacc ccagaggtgc actctatctt cctggaggga	1440
	cacaccttcc tgggtcgaa ccacggcag gccagcctgg agatcagccc aatcaccttc	1500
	ctgaccgccc agacccctgt gatggatctg ggacagtcc tgcgtttctg ccatatcage	1560
	agccaccagc acgtatggaaat ggaggcctac gtgaagggtgg atagctgccc agaggagcca	1620
	cagctgcgga tgaagaacaa cgaggaggcc gaggattacg atgatgatct gaccgatagc	1680
	gagatggatg tgggtcggtt cgtatgtatgaaacagccaa gcttcatcca gatccggagc	1740
	gtggccaaga agcacccaaa gacctgggtg cactacatcg ccggcgagga ggaggattgg	1800

gattacgcc cactgggtct ggcccctgat gatcgagct acaagagcca gtacctgaac	1860
aacggaccac agcggatcg acggaagtac aaaaaagtgc gttcatggc ctacaccgat	1920
gagacccatca agacccggga gcccattcag cacgagagcg gaatcctggg accactgctg	1980
tacggagagg tgggagatac cctgctgatc atcttcaaga accaggccag cggccatac	2040
aacatctacc cacacggaat caccgatgtg cggccactgt acagccggcg gctccaaag	2100
ggagtgaagc acctgaagga tttcccaatc ctgccaggag agatctcaa gtacaagtgg	2160
acagtgacag tggaggatgg accaaccaag tctgatccaa gatgcctgac cagatactac	2220
agcagcttg tgaacatgga gagagacctg gcctctggac tgattggacc actgctgate	2280
tgctacaagg agtctgtgga tcagagagga aaccagatca tgtctgataa gagaatgtg	2340
atcctgttct ctgtgttga tgagaacaga agctggtacc tgacagagaa catccagaga	2400
ttcctgccaa acccagccgg agtgcagctg gaggatccag agttccaggc cagcaacatc	2460
[0028]	
atgcacagca tcaacggata cgtttcgat agcctgcagc tgagcgtgtg cctgcacgag	2520
gtggcctatt ggtatatcct gagcatcgga gcccagacccg atttcctgag cgtttttc	2580
agcggataca cttcaagca caagatggtg tacgaggata ccctgaccct gttccatc	2640
tccggagaga ccgtgttcat gagcatggag aaccaggac tgtggatccct gggatgccac	2700
aactctgatt tcagaaacag aggaatgact gccctgctga aagtgtccag ctgtgataag	2760
aacactggag attactatga ggatactat gaggatatct ctgcctacct gctgagcaag	2820
aacaatgcca ttgagccaaag aagttcagc cagaacccac cagtgtgaa gagacaccag	2880
agagagatca ccagaaccac cctgcagct gatcaggagg agattgatta tgatgatacc	2940
atctctgtgg agatgaagaa ggaggatccat gatctatg atgaggatga gaaccagagc	3000
ccaagaagct tccagaagaa gaccagacac tacttcatcg ctgcagtgga gagactgtgg	3060
gattatggaa tgagcagcag cccacacgtg ctgagaaaca gagccagag cggatctgt	3120

ccacagttca agaagggtgg tttccaggag ttcaccgatg gaagcttcac ccagccactg	3180
taccggggag agctgaacga gcacctggga ctgctggac catacatcg ggccgagggtg	3240
gaggataaca tcatggtgac ctccggAAC cagggcagcc ggccatacag cttctacagc	3300
agcctgatca gctacgagga ggatcagcgg cagggagccg agccacggaa gaacttcgtg	3360
aagccaaacg agaccaagac ctacttctgg aaggtgcagc accacatggc cccaaaccaag	3420
gatgagttcg attgcaaggc ctgggcctac ttcaagcgatg tggatctgga gaaggatgtg	3480
cacagcggac tgateggacc actgctggtg tgccacacca acaccctgaa cccagcccac	3540
ggacggcagg tgaccgtgca ggagttcgcc ctgttcttca ccatcttgcg tgagaccaag	3600
agctggtaact tcaccgagaa catggagcgg aactgcccgg ccccttgcaa catccagatg	3660
gaggatccaa cttcaagga gaactaccgg ttccacgcca tcaacggata catcatggat	3720
accctgccag gactggtgat ggcccaggat cagcggatcc ggtggtaact gctgaggatg	3780
[0029] ggaagcaacg agaacatcca cagcatccac ttcaagcgac acgtgttgc acgtgcggaaag	3840
aaggaggagt acaagatggc cctgtacaac ctgtacccag gagtgttgcg gaccgtggag	3900
atgctccaa gcaaggccgg aatctggcgg gtggagtggcc tgatcgaga gcacctgcac	3960
gccggaatga gcaccctgtt cctgggtgtac agcaacaagt gccagacccc actggaaatg	4020
gccagcggac acatccggaa tttccagatc accggcagcg gacagtacgg acagtggcc	4080
ccaaagctgg cccggctgca ctacagcgga agcatcaacg cctggagcac caaggagcca	4140
ttcagctgga tcaaagtgg tctgtggcc ccaatgtatca tccacggaaat caagacccag	4200
ggagccggc agaagtttag cagcctgtac atcagccagt tcatcatcat gtacagcctg	4260
gatggaaaga agtggcagac ctaccggga aacagcaccg gaaccctgtat ggtgttcttgc	4320
ggaaacgtgg atagcagcgg aatcaagcac aacatttca accccaccaat catggccgg	4380
tacatccggc tgcacccaac ccactacagc atcagaagca ccctgcggat ggagctgtat	4440

ggatgtgatec tgaacagctg ctccatgcc a ctggaatgg agagcaaggc catcagcgat	4500
gcccagatca cgcgcaggc ctacttcacc aacatgttcg ccacctggag cccaaaggc	4560
gcccggtgc acctgcaggc acggagcaac gcctggcggc cacaggtgaa taacccaaag	4620
gagtggctgc aggtggattt ccagaagacc atgaaggta ccggagtgcac caccaggaa	4680
gtgaagagcc tgctgactag catgtatgt aaggagttcc tgatcagcag cagccaggat	4740
ggacaccagt ggaccctgtt cttccagaac gaaaggta aggtgttcca gggaaaccag	4800
gatagcttca ccccaagggtt gaacagcctg gatccaccac tgctgaccgc atacgtcgg	4860
atccacccac agagctgggt gcaccagatc gcctgagaa tggaggtgc gggatgcgag	4920
gcccaggatc tgtactgtatc agcatgcaat aaagtctgag tggcgccag cctgtgtgt	4980
cctgggttct ctctgtcccg gaatgtca acaatggagg tgctcgagta gataagtagc	5040
atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtatc ggagttggcc actccctctc [0030]	5100
tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggccggc gaccaaggc cgccgcacgc cgggcttt	5160
ccggccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagcctaa ttaacctaat tcactggccg	5220
tcttttaca acgtcgatc tggaaaacc ctggcgatc ccaacttaat cgccttgcag	5280
cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc	5340
aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggg acgcgcctg tagcggcgc ttaagcgg	5400
cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttcg cagcgccta ggcggcgtc	5460
cttcgtctt ctcccttcc tttctcgcc a cttcgccgg cttccctgt caagctctaa	5520
atcggggcct cccttaggg ttccgattt gtcttacg gcacctcgac cccaaaaaac	5580
ttgattaggg tggatgttca cgtatggc catgcctg atagacggtt ttgcctt	5640
tgacgttggc gtccacgttc ttatagtg gactttgtt ccaaactgga acaacactca	5700
accctatctc ggtctattt tttgattt aaggattt gccgatttcg gcctattgg	5760

taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta	5820	
caatttaggt ggcactttc gggaaatgt gcgcgaaacc cctatttgg tattttctta	5880	
aatacattca aatatgtata cgctcatgag acaataaccc tgataaaatgc ttcaataata	5940	
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttccgtgtc gcccttattc cctttttgc	6000	
ggcattttgc cttcctgtt ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	6060	
agatcagttt ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	6120	
tgagagttt egccccgaag aacgtttcc aatgatgagc actttaaag ttctgctatg	6180	
tggcgcgta ttatccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctggcgcc gcatacacta	6240	
ttctcagaat gacttggtt agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	6300	
gacagtaaga gaattatgca gtgctccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt	6360	
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct ttttgacaca acatggggga	6420	
[0031]	tcatgttaact cgccttgate gttggaaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	6480
	gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacggtt cgcaaactat taactggcga	6540
	actacttact ctagttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc	6600
	aggaccactt ctgcgctcg ccctccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	6660
	cggtgagcgt gggctcggt gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	6720
	tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	6780
	cgttgatata ggtgccteac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata	6840
	tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct	6900
	ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	6960
	ccccgtagaa aagatcaaag gatcttctt agatccttt tttctgcgca taatctgctg	7020
	cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt ttgccggatc aagagctacc	7080

aactttttt ccgaaggtaa ctggttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct	7140
agtgttagccg tagtttaggc accacttcaa gaactctgt agcaccccta cataacctgc	7200
tctgctaatac ctgttaccag tggctgtgc cagtggcgat aagtctgtc ttaccgggtt	7260
ggactcaaga cgatagttac cggtataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgt	7320
cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agataacctac agcgtgagct	7380
atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	7440
ggtcggaaca ggagagcgea cgaggagact tccaggggg aacgcctggg atctttatag	7500
tcctgtcggtt ttcgcccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	7560
gcggagcccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta cggttccctgg cctttgctg	7620
gcctttgct cacatgttct ttcctgcgtt atccctgat tctgtggata accgtattac	7680
cgcccttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgcgca gcgagtcagt	7740
[0032] gagcgaggaa gcggaagagc gccaaatacg caaaccgcct ctcccgccg gttggccgat	7800
tcattaatgc agctggcacg acaggttcc cgactggaaa gcccggcgtg agcgcacgc	7860
aattaatgtg agtttagctca ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgctccggc	7920
tcgtatgttgc tggtggattt tgaggcgata 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	
ctgcgcgtc gtcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctcg ggcgaccctt	60

ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcatcgagg gagtggccaa ctccatca	120
aggggttcct ttagttat gattaacccg ccatgtact tatctactta agtacactcg	180
tgatcgccccg gcccccttttcc aaacatgtcc taataactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
agttttccat cttaactcaac atcctccag tggattctg gacacaggac gctgtggttt	300
ctgagccagg gggcgactca gatcccagcc agtggactta gcccctgtt gctccctcgaa	360
taactgggtt gacattgggtt aatattcacc agcagccctcc cccgttgcctt ctctggatcc	420
actgcttaaa tacggacgg gacagggccc tgcctctca gttcaggca ccaccactga	480
cctgggacag tgaatagcgg ccgcacccat gcagatcgag ctgagcacct gtttttctt	540
gtgcctgctg cggttctgtct tctccgcac ccggcggtac tacctggag ccgtggagct	600
gagctggat tacatgcaga gcgatctggg agagctgcca gtggatgcgc gttttccacc	660
acgggtgcca aagagttcc cattcaaacac cagcgtggtg tacaagaaga ccctgttcgt	720
[0033]	
ggagttcacc gatcacctgt tcaacatcgc caagccacgg ccaccctgga tggactgt	780
gggaccaacc atccaggccg aggtgtacga taccgtggtg atcaccctga agaacatggc	840
ctctcatcct gtgtccctgc acgcgtggg agttagctac tgaaaggcca gcggaggagc	900
cgagtacgtat gatcagacca gccagcggga gaaggaggat gataagggtt tcccaggagg	960
aagccacacc tacgtgtggc aggtgtgaa ggagaacggc ccaatggca gcgttccact	1020
gtgcctgacc tacagctacc tgagccacgt ggatctggtg aaggatctga acagcgact	1080
gatcgaggcc ctgtgtgtt gcccggagg aaggctggcc aaggagaaga cccagaccct	1140
gcacaagttc atcctgtgt tgcgtgtttt cgtgaggaa aagagctggc acagcgagac	1200
caagaacagc ctgtatgcagg atcggatgc cggcagcgcc cggccctggc caaagatgca	1260
caccgtgaac ggatacgtga accggaggct gccaggactg atcggatgcc accgaaagag	1320
cgtgtactgg cacgtatcg gaatggaaac cacccagag gtgcactcta tcttcctggaa	1380

gggacacacc	tttctggtgc	ggaaccaccc	gcaggccagc	ctggagatca	gcccaatcac	1440	
cttcctgacc	gcccagaccc	tgctgatgga	tctggacag	ttcctgctgt	tctgccatat	1500	
cagcagccac	cagcacgatg	gaatggaggc	ctacgtgaag	gtggatagct	gcccagagga	1560	
gccacagctg	cggatgaaga	acaacgagga	ggccgaggat	tacgtatgt	atctgaccga	1620	
tagcgagatg	gatgtggtgc	ggttcgatga	tgataacagc	ccaagcttca	tccagatccg	1680	
gagcgtggcc	aagaagcacc	caaagacctg	ggtgcactac	atcgccgccg	aggaggagga	1740	
ttgggattac	gccccactgg	tgctggcccc	tgatgatcgg	agctacaaga	gccagtacct	1800	
gaacaacgga	ccacagcgga	tcggacggaa	gtacaaaaaa	gtgcggttca	tggctacac	1860	
cgatgagacc	ttcaagaccc	gggaggccat	ccagcacgag	agcggaatcc	tggaccact	1920	
gctgtacgga	gaggtggag	ataccctgct	gatcatctt	aagaaccagg	ccagccggcc	1980	
ataacaacatc	tacccacacg	gaatcaccga	tgtcgccca	ctgtacagcc	ggcggtgcc	2040	
[0034]	aaaggagtg	aagcacctga	aggattccc	aatcctgcca	ggagagatct	tcaagtacaa	2100
	gtggacagtg	acagtggagg	atggaccaac	caagtctgat	ccaagatgcc	tgaccagata	2160
	ctacagcagc	tttgtgaaca	tggagagaga	cctggctct	ggactgattg	gaccactgct	2220
	gatctgctac	aaggagtctg	tggatcagag	aggaaaccag	atcatgtctg	ataagagaaa	2280
	tgtgatcctg	ttctctgtgt	ttgatgagaa	cagaagctgg	tacctgacag	agaacatcca	2340
	gagattcctg	ccaaacccag	ccggagtgca	gctggaggat	ccagagttcc	aggccagcaa	2400
	catcatgcac	agcateaacg	gatacgttt	cgatagcctg	cagctgagcg	tgtgcctgca	2460
	cgaggtggcc	tattggata	tcctgagcat	cggagccag	accgattcc	tgagcgtgtt	2520
	cttcagcgga	tacaccttca	agcacaagat	ggtgtacgag	gataccctga	ccctgttccc	2580
	attctccgga	gagaccgtgt	tcatgagcat	ggagaaccca	ggactgtgga	tcctggatg	2640
	ccacaactct	gatttcagaa	acagaggaat	gactgccctg	ctgaaagtgt	ccagctgtga	2700

taagaacact ggagattact atgaggatag ctatgaggat atctctgcct acctgctgag	2760	
caagaacaat gccattgagc caagaagctt cagccagaac ccaccagtgc tgaagagaca	2820	
ccagagagag atcaccagaa ccaccctgca gtctgatcag gaggagattt attatgtga	2880	
taccatctct gtggagatga agaaggagga tttgatcattatc tatgtatgagg atgagaacca	2940	
gagcccaaga agcttccaga agaagaccag acactacttc atcgctgcag tggagagact	3000	
gtgggattat ggaatgagca gcagcccaca cgtgctgaga aacagagccc agagcggatc	3060	
tgtgccacag ttcaagaagg tgggtttcca ggagttcacc gatggaagct tcacccagcc	3120	
actgtaccgg ggagagctga acgagcacct gggactgctg ggaccataca tccggccga	3180	
ggtggaggat aacatcatgg tgaccttcgg gaaccaggcc agccggccat acagttcta	3240	
cagcagcctg atcagctacg aggaggatca gcggcaggga gccgagccac ggaagaactt	3300	
cgtgaagcca aacgagacca agacctactt ctggaaggtg cagcaccaca tggcccaac	3360	
[0035]	caaggatgag ttcgattgca aggcctggc ctacttcagc gatgtggatc tggagaagga	3420
	tgtgcacagc ggactgatcg gaccactgct ggtgtgccac accaacaccc tgaacccagc	3480
	ccacggacgg caggtgaccg tgcaggagtt cgccctgttc ttaccatct tcgatgagac	3540
	caagagctgg tacttcaccc agaacatgga gcggaaactgc cggccctt gcaacatcca	3600
	gatggaggat ccaacccatca aggagaacta ccgggtccac gccatcaacg gatacatcat	3660
	ggataccctg ccaggactgg tcatggccca ggatcagcgg atccgggtt acctgctgag	3720
	catggaaagc aacgagaaca tccacagcat ccacttcage ggacacgtgt tcaccgtgc	3780
	gaagaaggag gagtacaaga tggccctgtt caacctgtac ccaggagtgt tcgagaccgt	3840
	ggagatgctg ccaagcaagg ccggaaatctg gcgggtggag tgcctgatcg gagagcacct	3900
	gcacggcggaa atgagcaccc tggccctgtt gtacagcaac aagtgccaga ccccaactggg	3960
	aatggccagc ggacacatcc gggatttcca gatcaccggc agcggacagt acggacagt	4020

ggccccaaag ctggccggc tgcactacag cggaaagcatc aacgcctgga gcaccaagga	4080
gccattcagc tggatcaaag tggatctgct ggccccaaatg atcatccacg gaatcaagac	4140
ccagggagcc cggcagaagt tcagcagcct gtacatcagc cagttcatca tcatgtacag	4200
cctggatgga aagaagtggc agacctaccg gggaaacagc accggaaccc tcatgtacag	4260
cttcggaaac gtggatagca gcggaatcaa gcacaacatc ttcaacccac caatcatcgc	4320
ccgatacatc cggctgcacc caacccacta cagcatcaga agcaccctgc ggatggagct	4380
gatggatgt gatctgaaca gctgctccat gccactggga atggagagca aggccatcag	4440
cgatgccca gatcaccgcca gcagctactt caccaacatg ttgccaccc ggagcccaag	4500
caaggcccg ctgcacctgc agggacggag caacgcctgg cggccacagg tgaataaccc	4560
aaaggagtgg ctgcagggtgg atttccagaa gaccatgaag gtgaccggag tgaccaccca	4620
gggagtgaag agcctgctga ctagcatgta tgtgaaggag ttccctgatca gcagcagcca	4680
[0036] ggatggacac cagtgaccc ttgtttcca gaacggaaag gtgaagggt tccaggaaa	4740
ccaggatagc ttccccccag ttgtgaacag cctggatcca ccactgctga cccgataacct	4800
cgccatccac ccacagagct gggcacca gatgcctg agaatggagg tgctggatg	4860
cgaggccca gatctgtact gatgagcatg caataaagtc tgagtggcg gcagcctgt	4920
tgtgcctggg ttctctctgt cccggaaatgt gcaaacaatg gaggtgctcg agtagataag	4980
tagcatggcg ggttaatcat taactacaag gaacccctag tggatggagtt ggccactccc	5040
tctctgcgct ctgcgtcgact cactgaggcc gggcgaccaa aggtgcggcg aegccgggc	5100
tttgcggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagcc ttaattaacc taattcactg	5160
gccgtcggtt tacaacgtcg tgactggaa aaccctggcg ttacccaact taatgcctt	5220
gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgtaatagcgaag aggccgcac cgatgcctt	5280
tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggacgcgc cctgtacgg cgcatcataagc	5340

gccccgggtg tggggttac gcgcgcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc	5400
gctccttcg ctttcttccc ttccttctc gccacgttcg ccggcttcc ccgtcaagct	5460
ctaaatcggtt ggctccctt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaa	5520
aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggttttcgc	5580
ccttgacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tggccaaac tggaacaaca	5640
ctcaacccta tctcggtcta ttctttgat ttataaggga ttttgcgat ttccgcstat	5700
tggtaaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga atttaacaa aatattaacg	5760
cttacaattt aggtggact ttccgggaa atgtgcgcgg aaccctatt tggatgtttt	5820
tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttaat	5880
aatattgaaa aaggaagagt atgagttttt aacattccg tgcgcctt attccctttt	5940
ttgcggcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaagatg	6000
[0037] ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatgaaact ggatctcaac agcgtaaga	6060
tccttgagag ttttcgcggc gaagaacgtt ttccatgtat gagcactttt aaagttctgc	6120
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac	6180
actattctca gaatgacttg gttgagttact caccagtac agaaaagcat cttacggatg	6240
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgt ccataaccat gagtgataac actgcggcca	6300
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttg cacaacatgg	6360
gggatcatgt aactcgctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	6420
acgagcgtga caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	6480
gcgaactact tactctagct tcccgcaac aattataga ctggatggag gcgatggaaag	6540
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	6600
gagccggta gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact gggccagat ggttaagccct	6660

ccccgtatcgta agtttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	6720	
agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	6780	
catatatact ttagatttat ttaaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	6840	
tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttgcgttc cactgagcgt	6900	
cagaccccgta agaaaagatc aaaggatctt cttagagatcc ttttttctg cgcgtaatct	6960	
gctgcttgca aacaaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc	7020	
taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	7080	
ttcttagtgta gccgtagttt ggccaccact tcaagaactc tgttagcacccg cctacatacc	7140	
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttaccg	7200	
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt	7260	
cgtdcacaca gcccagttt gaggcaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgt	7320	
[0038]	agctatgaga aagcgccacg cttcccgaaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg	7380
	gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatctt	7440
	atagtccctgt cgggtttcgc cacctctgac tttagcgtcg atttttgta tgctcgtcag	7500
	gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggccttt	7560
	gctggcctt tgctcacatg ttcttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	7620
	ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgt	7680
	cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcacaa tacgcaaaacc gcctctcccc gcgcggtggc	7740
	cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgc	7800
	acgcaattaa tgtgagttt ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgctt	7860
	cggtcgat gttgtgtgaa 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 gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagg ccggcgctcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatca	120
aggggttcct ttagttat gattaacccg ccatgctact tatctactta agtacactcg	180
tgatcgcccg gcccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
agtttccat cttactcaac atcccccag tgaggtaat tttaaactg tttgctctgg	300
ttaataatct caggaggta attttaaac tgttgctct ggttaataat ctcaggaaat	360
[0039] tctggacaca ggacgctgtg gtttctgagc cagggggcga ctcagatccc agccagtgga	420
cttagccct gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggttaatatt caccagcagc	480
ctccccgtt gcccctctgg atccactgct taaatacggg cgaggacagg gcctgtctc	540
ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaata gcgccgcca ccatgcagat	600
cgagctgagc acctgcttct tcctgtgcct gctcggttc tgttctccg ccacccggcg	660
gtactacgt ggagccgtgg agctgagctg ggattacatg cagagcgatc tggagagct	720
gccagtggat gcccggttcc caccacgggt gccaaagagc ttccattca acaccagcgt	780
ggtgtacaag aagaccctgt tcgtggagtt caccgatcac ctgttcaaca tcgccaagcc	840
acggccaccc tggatgggac tgctgggacc aaccatccag gccgaggtgt acgataaccgt	900
ggtgatcacc ctgaagaaca tggcctctca tcctgtgtcc ctgcacgccc tggagtgag	960
ctactggaag gccagcgagg gagccgagta cgatgatcag accagccagc gggagaagga	1020

ggatgataag gtgttccag gaggaagcca cacctacgtg tggcaggtgc tgaaggagaa	1080
cggaccaatg gccagcgatc cactgtgcct gacctacagc tacctgagcc acgtggatct	1140
ggtaaggat ctgaacagcg gactgatcg agccctgctg gtgtgccggg agggaaagcct	1200
ggccaaggag aagaccaga ccctgcacaa gttcatcctg ctgtcggccg tgttcgatga	1260
ggaaagagc tggcacagcg agaccaagaa cagcctgatg caggatcggg atgccgcccag	1320
cgcggggcc tggccaaaga tgcacaccgt gaacggatac gtgaaccgga gcctgccagg	1380
actgatcgga tgccacccgga agagcgtgta ctggcacgtg atcggaatgg gaaccacccc	1440
agaggtgcac tctatcttcc tggagggaca caccttctg gtgcggacc accggcaggc	1500
cagcctggag atcagccaa tcacccctt gaccggccag accctgctga tggatctggg	1560
acagttcctg ctgttctgcc atatcagcag ccaccagcac gatggaatgg aggctacgt	1620
gaaggtggat agctgcccag aggagccaca gctgcggatg aagaacaacg aggagggcga	1680
[0040]	
ggattacgt gatgatctga ccgatagcga gatggatgtg gtgcggatcg atgatgataa	1740
cagcccaagc ttcatccaga tccggagcgt ggccaagaag cacccaaaga cctgggtgca	1800
ctacatcgcc gccgaggagg aggattggga ttacccccca ctgggtctgg cccctgtatga	1860
tcggagctac aagagccagt acctgaacaa cggaccacag cggatcggac ggaagtacaa	1920
aaaagtgcgg ttcatggcct acaccgatga gacccatcaag accccggagg ccatccagca	1980
cgagagcgg atcctggac cactgctgta cggagaggtg ggagataccc tgctgtatcat	2040
cttcaagaac cagggcagee ggccatacaa catctaccca cacggatca ccgatgtgctg	2100
gccactgtac agccggcggc tgccaaaggg agtgaagcac ctgaaggatt tcccaatcct	2160
gccaggagag atcttcaagt acaagtggac agtgacagtg gaggatggac caaccaagtc	2220
tgatccaaga tgcctgacca gatactacag cagcttgcgt aacatggaga gagacctggc	2280
ctctggactg attggaccac tgctgatctg ctacaaggag tctgtggatc agagaggaaa	2340

ccagatcatg tctgataaga gaaatgtat cctgttctt gtgtttgatg agaacagaag	2400	
ctggcacatg acagagaaca tccagagatt cctgccaac ccagccggag tgcagctgga	2460	
ggatccagag ttccaggcca gcaacatcat gcacagcatc aacggatacg tggtcgatag	2520	
cctgcagctg agcgtgtgcc tgcacgaggt ggcctattgg tatatcctga gcatcgagc	2580	
ccagaccgat ttccctgagcg ttttttcag cggatacacc ttcaagcaca agatgggtta	2640	
cgaggatacc ctgaccctgt tccattctc cggagagacc gtgttcatga gcatggagaa	2700	
cccaggactg tggatctgg gatgccacaa ctctgatttc agaaacagag gaatgactgc	2760	
cctgctgaaa 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]	tatctatgtat gaggatgaga accagagccc aagaagctt cagaagaaga ccagacacta	3060
	cttcatcgct gcagtggaga gactgtggaa ttatgaaatg agcagcagcc cacacgtct	3120
	gagaaacaga gcccagagcg gatctgtgcc acagttcaag aaggtgggt tccaggagtt	3180
	caccgatgga agcttcaccc agccactgta ccggggagag ctgaacgagc acctgggact	3240
	gctgggacca tacatccggg ccgaggtgga ggataacatc atggtgacct tccggaacca	3300
	ggccagccgg ccatacagct tctacagcag cctgatcagc tacgaggagg atcagccgca	3360
	gggagccgag ccacggaaga acttcgtgaa gccaaacgag accaagaccc acttctggaa	3420
	ggtgcagcac cacatggccc caaccaagga tggatcgat tgcaaggcct gggctactt	3480
	cagcgatgtg gatctggaga aggatgtca cagcgactg atcggaccac tgctgggtgt	3540
	ccacaccaac accctgaacc cagccacgg acggcaggtg accgtgcagg agttcgccct	3600
	gttcttcacc atcttcgatg agaccaagag ctggtacttc accgagaaca tggagcggaa	3660

ctgccgggcc ccttgcaca tccagatgga ggatccaacc ttcaaggaga actaccggtt	3720	
ccacgccatc aacggataca tcatggatac cctgccagga ctggtgatgg cccaggatca	3780	
gcggatccgg tggtacctgc tgagcatggg aagcaacgag aacatccaca gcatccactt	3840	
cagcggacac gtgttcacccg tgccgaagaa ggaggagttac aagatggccc tgtacaacct	3900	
gtacccagga gtgttcgaga ccgtggagat gctgccaaggc aaggccggaa tctggcgggt	3960	
ggagtgcctg atcggagagc acctgcacgc cggaaatgagc accctgttcc tggtgtacag	4020	
caacaagtgc cagacccac tggaaatggc cagcggacac atccggatt tccagatcac	4080	
cggcagcggc cagtacggac agtggggccc aaagctggcc cggctgcact acagcggaaag	4140	
catcaacgcc tggagcacca aggagccatt cagctggatc aaagtggatc tgctggcccc	4200	
aatgatcatc cacggaatca agacccaggc agcccgccag aagttcagca gcctgtacat	4260	
cagccagttc atcatcatgt acagcctgga tggaaagaag tggcagaccc accggggaaa	4320	
[0042]	cagcaccggc accctgtatgg ttttttcgg aacgtggat agcagcggaa tcaagcacaa	4380
	catcttcaac ccaccaatca tggccgata catccggctg caccaccc actacagcat	4440
	cagaaggacc ctgcggatgg agctgatggg atgtgatctg aacagctgtct ccatgccact	4500
	ggaaatggag agcaaggcca tcagcgatgc ccagatcacc gccagcagct acttcaccaa	4560
	catgttcgcc acctggagcc caagcaaggc cggctgcac ctgcaggac ggagcaacgc	4620
	ctggcggcca caggtgaata acccaaagga gtggctgcag gtggatttcc agaagaccat	4680
	gaaggtgacc ggagtgacca cccaggaggt gaagagctg ctgactagca tgtatgtcaa	4740
	ggagttcctg atcagcagca gccaggatgg acaccagtgg accctgttct tccagaacgg	4800
	aaaggtgaag gtgttccagg gaaaccagga tagttcacc ccagtggta acagcctgga	4860
	tccaccactg ctgaccggat acctgcggat ccacccacag agctgggtgc accagatcgc	4920
	cctgagaatg gaggtgctgg gatgcgaggc ccaggatctg tactgatgag catgcaataa	4980

agtctgagt ggcggcagcc tgtgtgtgcc tggttctct ctgtccgga atgtcaaac	5040	
aatggaggtg ctcgagtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta caaggaaccc	5100	
ctagtgtatgg agttggccac tccctctcg cgcgctcgct cgctcaactga ggccgggcga	5160	
ccaaaggctcg cccgacgccc gggcttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc	5220	
agcctaatt aacctaattc actggccgtc gtttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct	5280	
ggcggttaccc aacttaatcg cttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc	5340	
gaagaggccc gcacccgatcg ccctcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggac	5400	
gcgcctgtta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct	5460	
acacttgcca gcgccttagc gcccgtcct ttgcgtttct tcccttcctt tctgcacgc	5520	
ttcgccggct ttcccgatca agctctaaat cggggctcc cttagggtt ccgattttagt	5580	
gccttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattagggtg atggttcacg tagtggcca	5640	
[0043]	tcgcctgtat agacggtttt tcgcctttt acgtggagtc acgtttttt taatagtgg	5700
	ctcttggccaa aactggaac aacactcaac cctatctgg tctattcttt tgatttataa	5760
	gggattttgc cgatttcggc ctattggta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	5820
	gcgaattttt aaaaaatatt aacgcttaca atttaggtgg cactttcgg ggaaatgtgc	5880
	gcggaaacccc tatttggta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac	5940
	aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt	6000
	tccgtgtcgc ctttatcccc tttttgcgg cattttgcct tcgtttttt gtcacccag	6060
	aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gttacatcg	6120
	aactggatct caacagcggt aagatccttgc agagtttcg ccccgaaagaa cgttttccaa	6180
	tgtatgacac ttttaaagtt ctgctatgtg ggcggattt atcccgattt gacggggc	6240
	aagagcaact cggtcgcgcg atacactatt ctcagaatga cttgggttag tactcaccag	6300

tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa	6360
ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc	6420
taaccgctt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ctttgatcgt tggaaaccgg	6480
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa	6540
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttccgg caacaattaa	6600
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgcctggcc cttccggctg	6660
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag	6720
cactggggcc agatggtaag ccctccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg	6780
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaaggcatt	6840
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt	6900
aatttaaaag gatcttaggtg aagatcctt ttgataatct catgacccaaa atcccttaac	6960
[0044]	
gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag	7020
atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccc ctaccagcgg	7080
tggtttgtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttcc gaaggttaact ggcttcagca	7140
gagcgcagat accaaatact gttctctag ttagccgta gttaggccac cacttcaaga	7200
actctgttagc accgcctaca tacctcgctc tgctaattct gttaccagt gctgctgcca	7260
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccc gataaggcgc	7320
agcggtcggg ctgaacgggg gttcgtgca cacagcccg cttggagcga acgacacctaca	7380
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaagcgc cacgcttccc gaaggagaa	7440
aggcggacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagctc	7500
cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcgggtt tgcccacctc tgacttgagc	7560
gtcgattttt gtgatgctcg tcagggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg	7620

ccttttacg gttcctggcc tttgctggc ctttgctca catgttctt cctgcgttat	7680
ccctgattc tgtggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc gctgccgca	7740
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca	7800
aaccgcctct ccccgcgctt tgccgattc attaatgcag ctggcacgac aggttcccg	7860
actggaaagc gggcagttag cgcaacgcaa ttaatgttag ttagctact cattaggcac	7920
cccaggctt acacttatg cttccggctc gtagttgtg tgaaattgtg agcggataac	7980
aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccag atttaattaa gg	8032

<210> 17

<211> 738

<212> PRT

<213> 未知

<220>

[0045] <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 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 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 Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro 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
 [0049] 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 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 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 gagcgacactg 120

ggcgagctgc ccgtggacgc cagattccct ccaagagtgc ccaagagctt ccccttcaac 180

acctccgtgg tgtacaagaa aaccctgttc gtggaattca ccgaccacct gttcaatatc 240

gccaagccca gaccccccctg gatgggcctg ctgggaccta caattcaggc cgaggtgtac 300

gacaccgtcg tgcgtcacct gaagaacatg gccagccacc ccgtgtctct gcacgcccgtg 360

ggagtgtcct actggaaggc ctctgagggc gccgagtagc acgatcagac cagccagcgc 420

gagaaagagg acgacaaggt gttccctggc ggcagccaca cctacgtgtc gcaggtgctg 480

aaagaaaaacg gccccatggc ctccgaccct ctgtgcctga catacagcta cctgagccac 540

gtggacctcg tgaaggacct gaacagcggc ctgatcggag ccctgctcgt gtgttagagag 600

ggcagcctgg ccaaagagaa aaccaggacc ctgcacaagt tcatcctgct gttcgccgtg	660	
ttcgacgagg gcaagagctg gcacagcgag acaaagaaca gcctgatgca ggaccggac	720	
gccgcctctg ctagagcctg gcccaaatacg cacaccgtga acggctacgt gaacagaagc	780	
ctgcccggac tgatcggtcg ccaccggaag tctgtgtact ggcacgtgat cggcatggc	840	
accacccctg aggtgcacag catcttctg gaaggacaca cctttctcgat gcgaaaccac	900	
cggcaggcca gcctggaaat cagccctatc accttcctga ccgcccagac actgctgatg	960	
gacctgggccc agtttctgt gttctgccac atcagctccc accagcacga cggcatggaa	1020	
gcctacgtga aggtggacag ctgccccgag gaaccccagc tgccgatgaa gaacaacgag	1080	
gaagccgagg actacgacga cgacctgacc gacagcgaga tggacgtgg tgcgttcgac	1140	
gacgataaca gccccagctt catccagatc agaagcgtgg ccaagaagca ccccaagacc	1200	
tgggtgcact atatcgccgc cgaggaagag gactgggatt acgcccctt ggtgctggcc	1260	
[0055]	cccgacgaca gaagctacaa gagccagttac ctgaacaacg gccccagcg gatcgccgg	1320
	aagtataaga aagtgcggtt catggctac accgacgaga cattcaagac cagagaggcc	1380
	atccagcacg agagcggcat cctggccct ctgctgtatg gcaagtggtt cgacaccctg	1440
	ctgatcatct tcaagaacca ggccagcaga ccctacaaca tctaccctca cggcatcacc	1500
	gacgtgcggc ccctgtactc tagaaggctg cccaaaggcg tggaaacacct gaaggacttc	1560
	cccatcctgc cggcgagat cttcaagttac aagtggaccg tgaccgtgg agatggcccc	1620
	accaagagcg accccagatg cctgacacgg tactatagca gtttgcgtgaa catggAACGG	1680
	gacctggcct ccggcctgat tggccactg ctgatctgat acaaagaaag cgtggaccag	1740
	cggggcaacc agatcatgag cgacaaggcg aacgtgatcc tggatcgatgatgatgatg	1800
	aaccggctt ggtatctgac cgagaatatc cagcggttcc tgcccaaccc tgccggcgtg	1860
	cagcttggaaat atcctgatgtt ccaggcctcc aacatcatgc actccatcaa tggctatgt	1920

ttcgacagcc	tgcagctgag	cgtgtgcctg	cacgaggtgg	cctactggta	catcctgagc	1980	
atcggggccc	agaccgactt	cctgtccgtg	ttcttctccg	gctacacccctt	caagcacaag	2040	
atgggtgtacg	aggataccct	gaccctgttc	cccttagcg	gcgaaaccgt	gttcatgagc	2100	
atggaaaacc	ccggcctgtg	gatcctgggc	tgccacaaca	gcgacttccg	gaacagaggc	2160	
atgaccgccc	tgctgaaggt	gtccagctgc	gacaagaaca	ccggcgacta	ctacgaggac	2220	
agctatgagg	acatcagcgc	ctacctgctg	agcaagaaca	acgccatcga	gcccagaagc	2280	
ttcagccaga	accccccgt	gctgaagcgg	caccagagag	agatcacccg	gaccaccctg	2340	
cagtccgacc	aggaagagat	cgattacgac	gacaccatca	gcgtggaaat	gaagaaagaa	2400	
gatttcgaca	tctacgacga	ggacgagaac	cagagccccc	ggtccttca	aaaaaagacc	2460	
cgccactact	tcattgccgc	tgtggAACGG	ctgtggact	acggcatgag	cagcagccct	2520	
cacgtgctga	gaaacagggc	ccagagcggc	agcgtgcccc	agttcaagaa	agtgggttcc	2580	
[0056]	caggaattca	cagacggcag	cttcacccag	cctctgtacc	gcggcgagct	2640	
	ctgggactgc	tgggccccta	tatcagagcc	gaagtggaaag	ataacatcat	ggtcaccttc	2700
	cggaatcagg	cctccggcc	ctacagcttc	tacagctccc	tgatcagcta	cgaagaggac	2760
	cagagacagg	gcgctgagcc	ccggaagaac	ttcgtgaagc	ccaacgagac	taagacctac	2820
	ttttggaagg	tgcagcacca	catggcccct	acaaaggacg	agttcgactg	caaggcctgg	2880
	gcctacttct	ccgacgtgga	cctggaaaag	gacgtgcact	ctgggctgat	cggccccctg	2940
	ctcgtgtgcc	acaccaaacac	cctgaatccc	gcccacggca	gacaggtgac	agtgcaggaa	3000
	ttcgcctgt	tcttaccat	cttcgacgaa	acaaagagct	ggtacttcac	cgaaaacatg	3060
	gaaagaaaact	gccgggctcc	ctgcaacatc	cagatggaaag	atcccaccc	caaagagaac	3120
	taccgggttcc	acgccatcaa	cggtacatc	atggacacac	tgcccgccct	cgtgtatggct	3180
	caggatcagc	ggatccggtg	gtatctgctg	tccatggct	ccaacgagaa	catccacagc	3240

atccacttca	gcggccacgt	gttcaccgtg	cggaaaaaaag	aagagtacaa	aatggccctg	3300				
tacaacctgt	accctgggt	gttcgagaca	gtggaaatgc	tgcccagcaa	ggccggcata	3360				
tggcgggtgg	agtgtctgt	cggcgagcac	ctgcacgctg	ggatgagcac	actgtttctg	3420				
gtgtacagca	acaagtgc	gacac	c	ctggccacat	ccgggacttt	3480				
cagatcacag	ccagcggcca	gtacggccag	tggcc	aactggccag	actgcactac	3540				
agcggcagca	tcaacgc	gtcc	gatcaa	gac	ggtggac	3600				
ctggctccca	tgateatcca	cggaatcaag	acc	ccagg	ccagacagaa	gtt	ca	g	3660	
ctgtacatca	gccagttcat	catcatgtac	agc	ctgg	acg	gcaaga	atg	gc	3720	
cggggcaata	gcaccggcac	cctgatgg	ttctt	cg	ac	gtgg	actc	ca	3780	
aagcacaaca	tcttcaaccc	ccccatcatt	gccc	gg	taca	ccgg	ctg	ca	3840	
tacagcatcc	ggtccac	ctt	gagaatgg	aa	ctgatgg	g	cgac	ctgaa	3900	
[0057]	atgccc	ctgg	ggatgg	aaag	caagg	ccatc	tccg	acgccc	agatcaccgc	3960
	ttc	accaaca	tgtt	cgccac	ctgg	tccca	agg	ccc	ggcac	4020
	agcaat	gctt	ggagg	cctca	ggt	gaaca	ac	ccaa	aaagagt	4080
	aaaaccat	ga	aagt	gacc	cgt	gacc	acc	agg	cgta	4140
	tacgt	gaaag	at	ttcct	gtat	ctcc	aggc	aggc	accgtggac	4200
	cagaac	ggca	aagt	gaaagt	gtt	cagg	gg	aa	acc	4260
	agc	cttgg	gacc	cttca	ctt	gat	ggat	cc	cc	4320
	cagatt	gctc	tg	cggat	tg	gt	gg	gg	cc	4371
	<210>	20								
	<211>	736								
	<212>	PRT								
	<213>	未知								

<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															
															15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 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

Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
 530 535 540

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln
 565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
 580 585 590

[0061] Thr Arg Thr Val Asn Asp Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

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

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

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670

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

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

[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

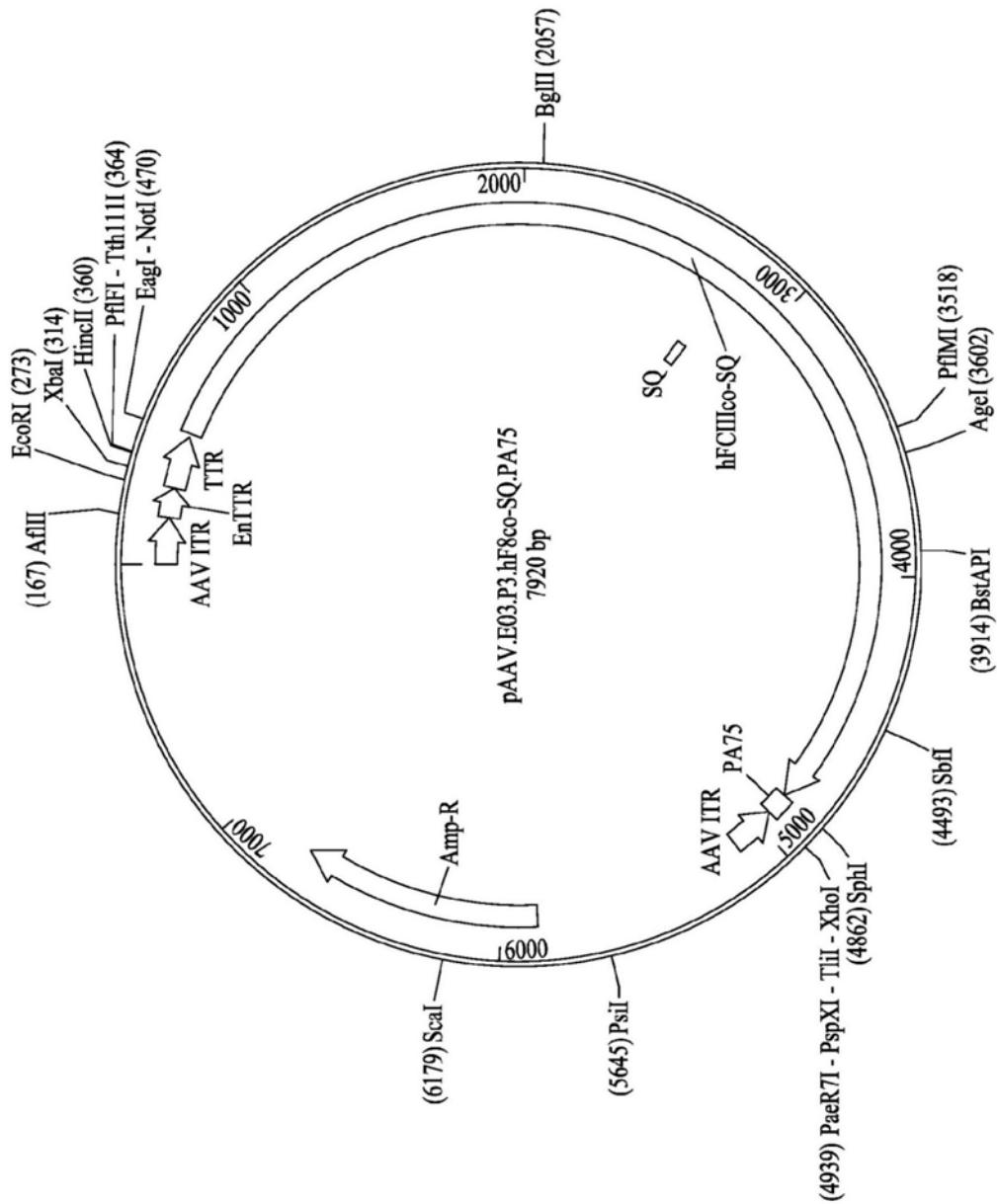


图1

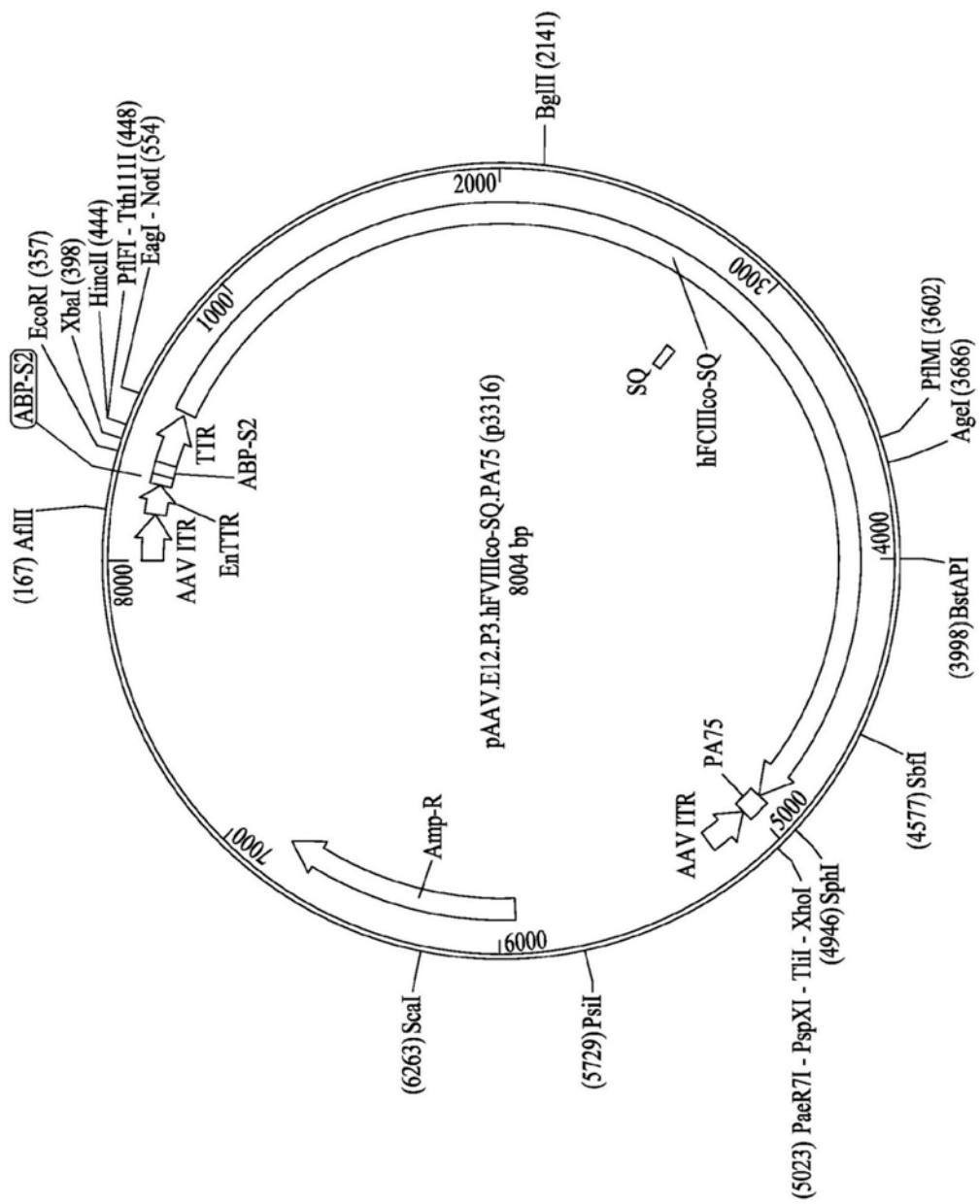
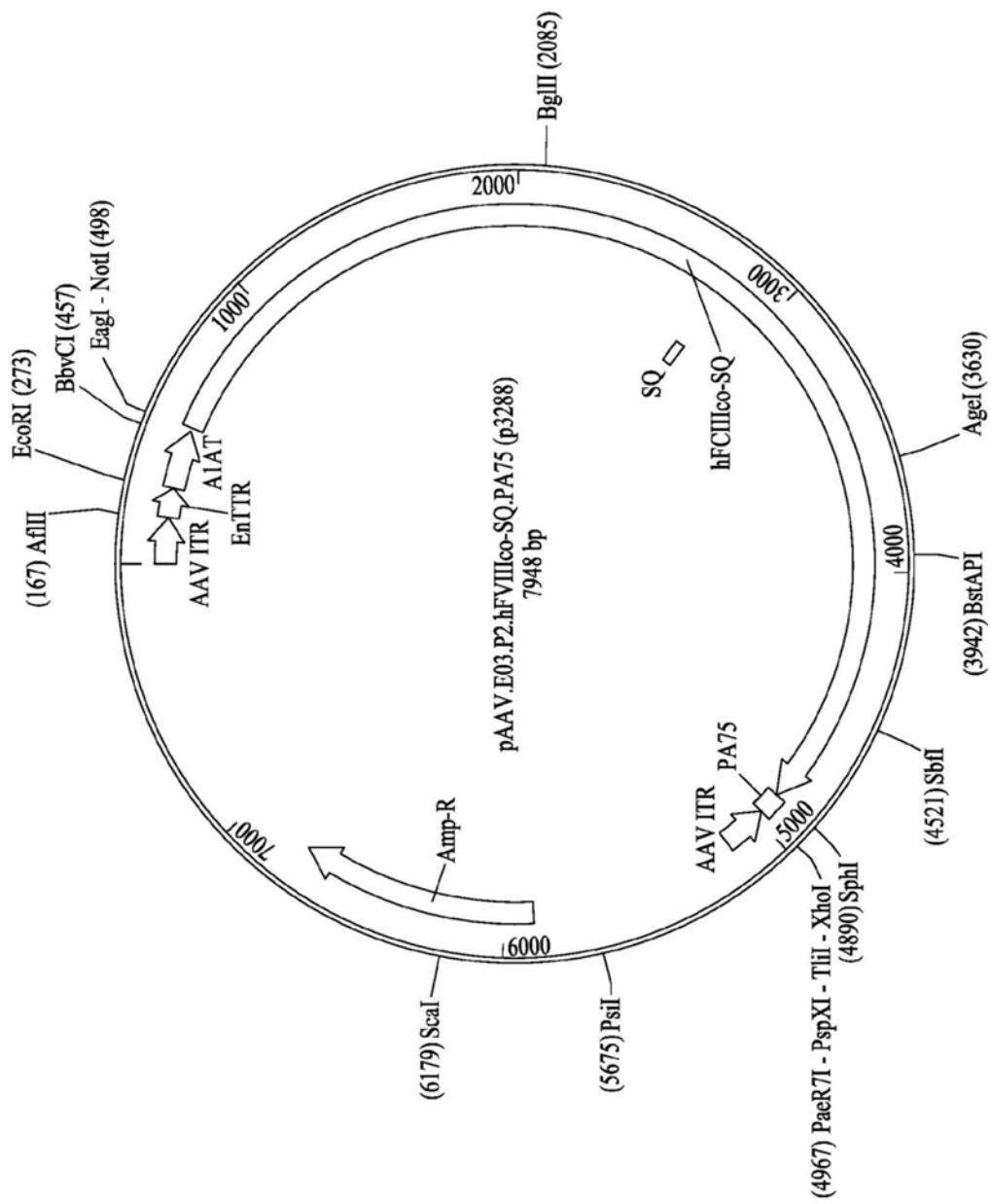
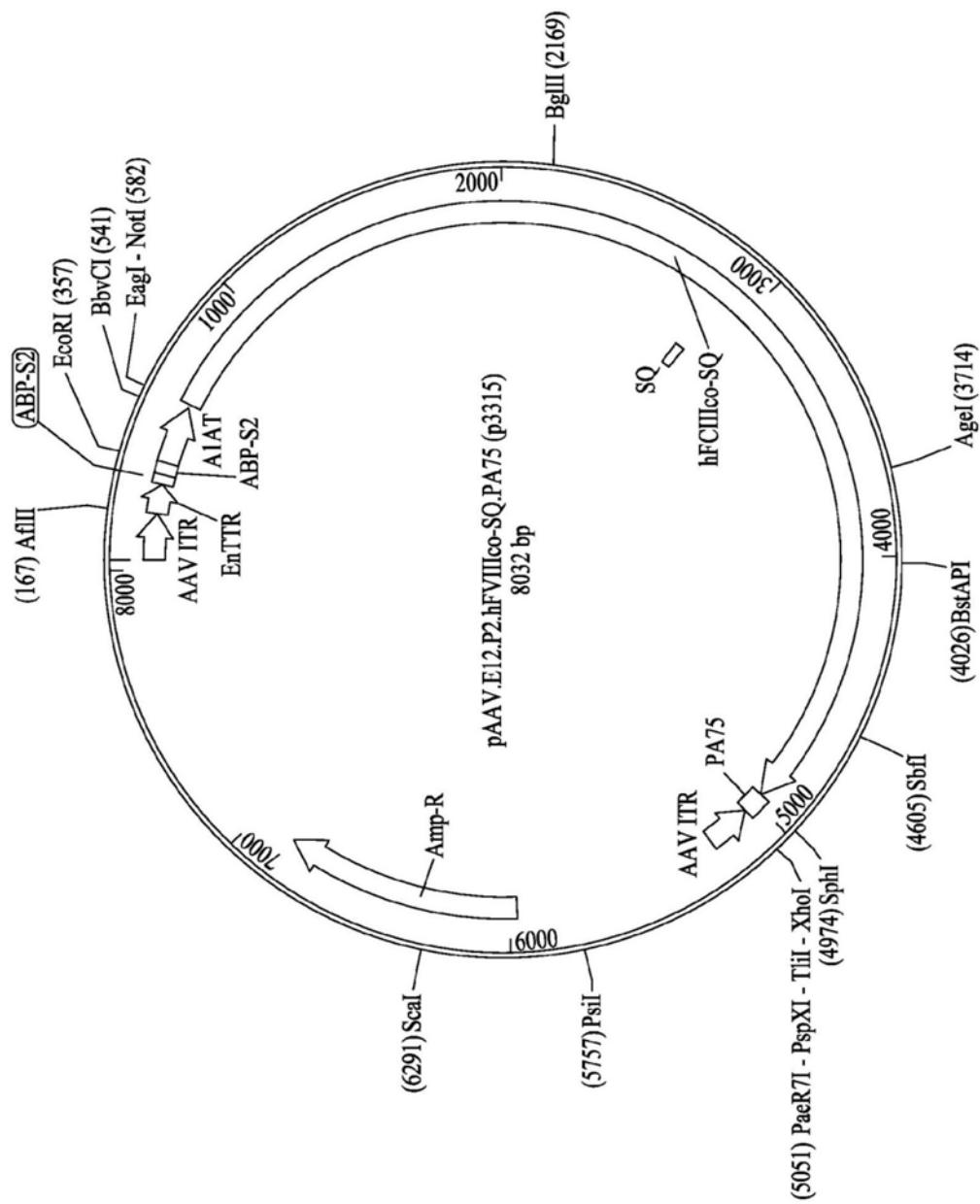


图2





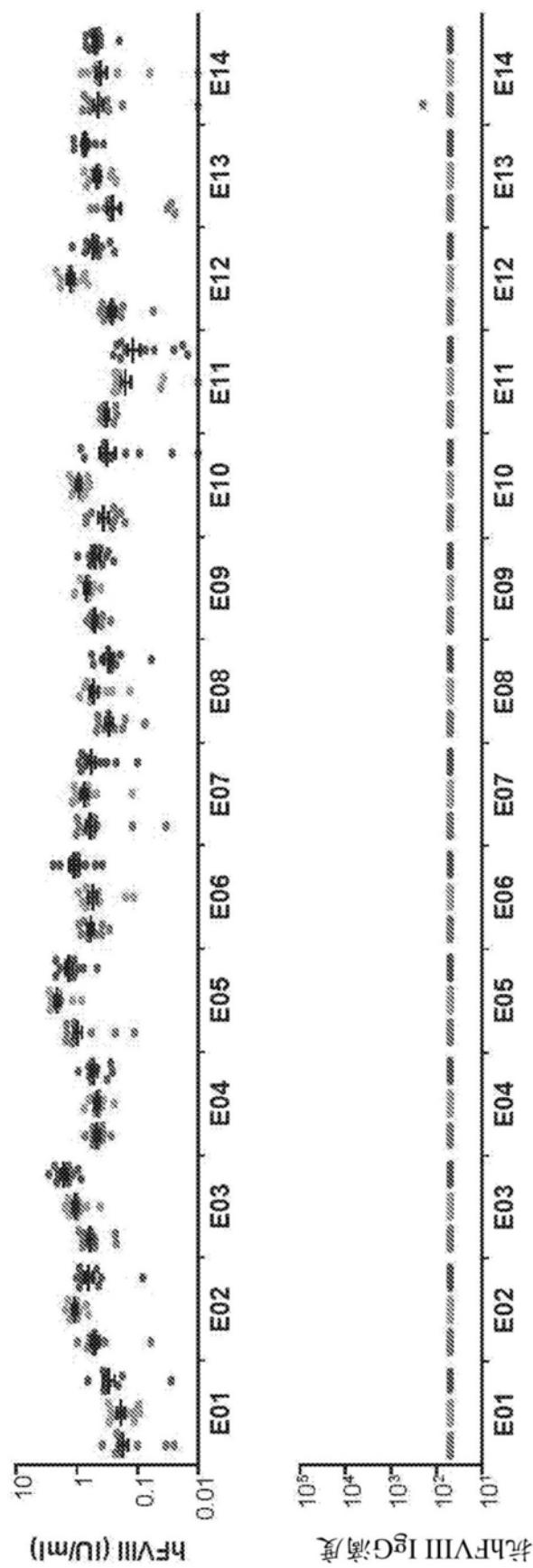


图5

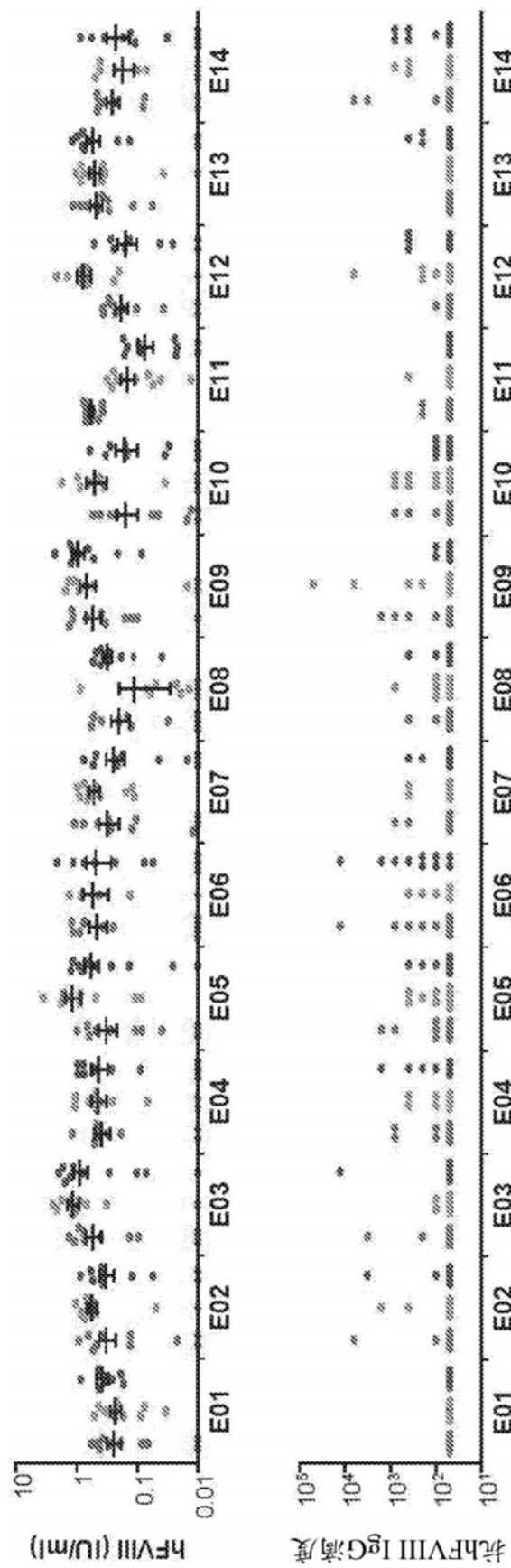


图6

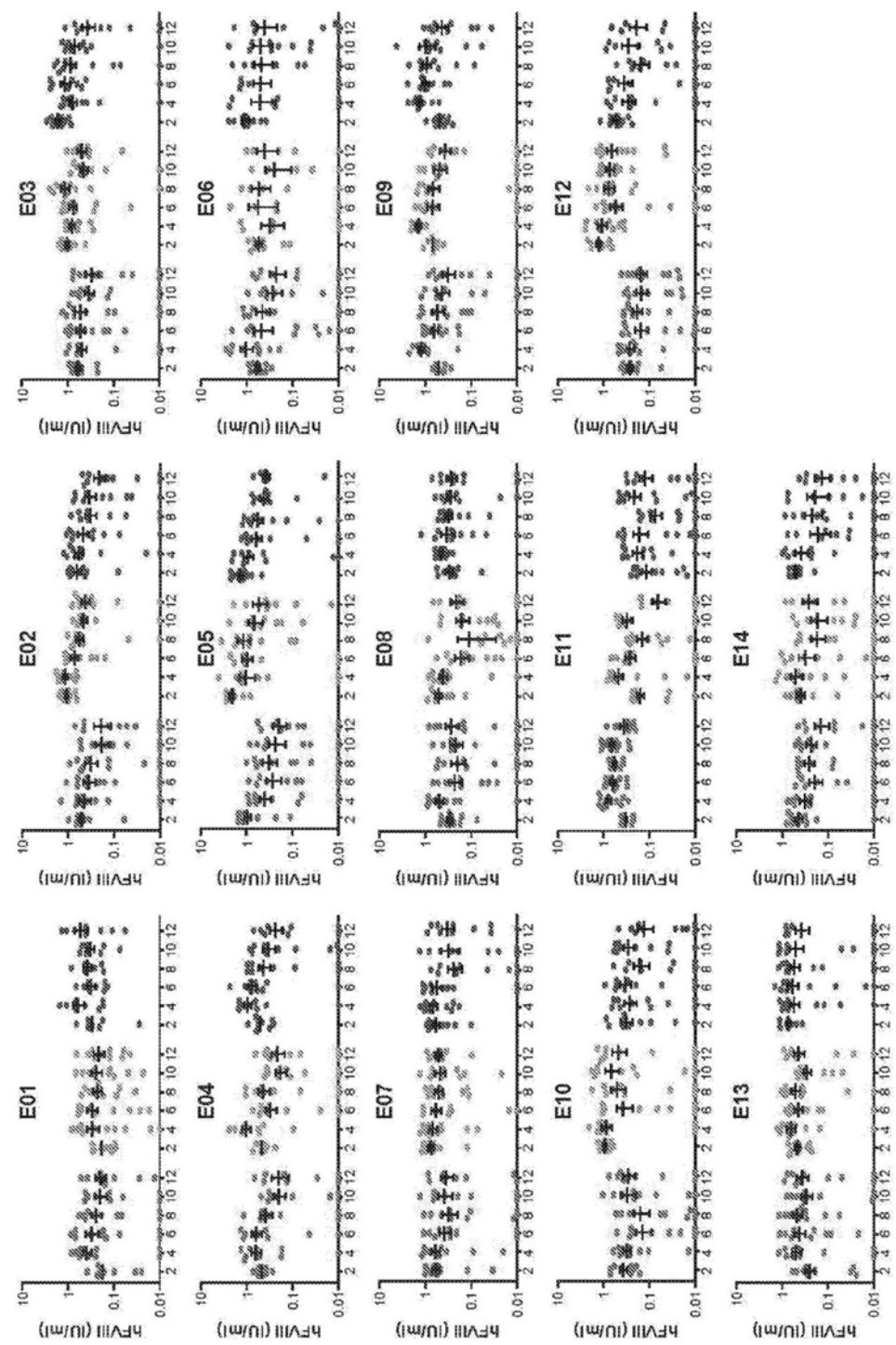


图7

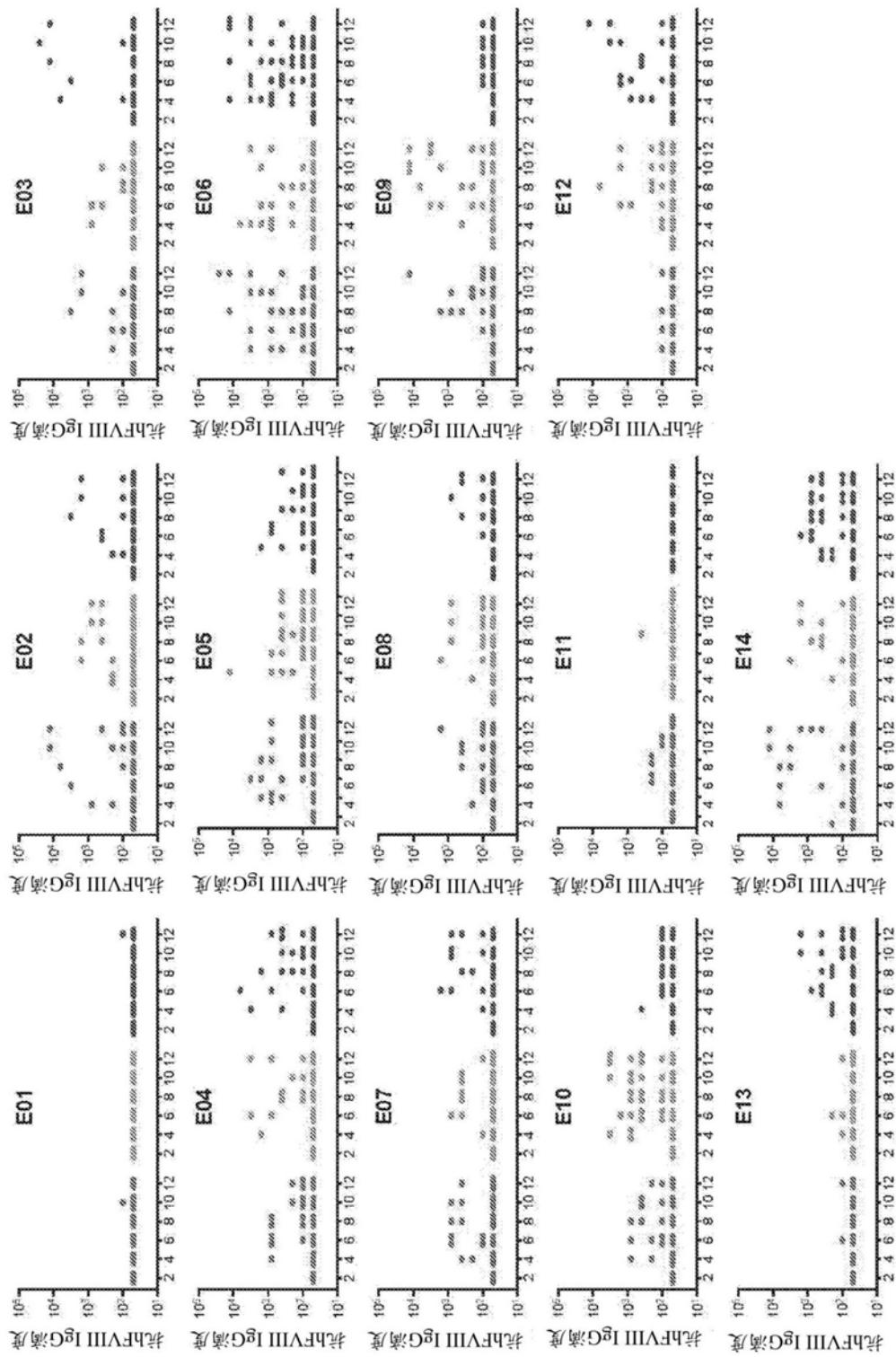


图8

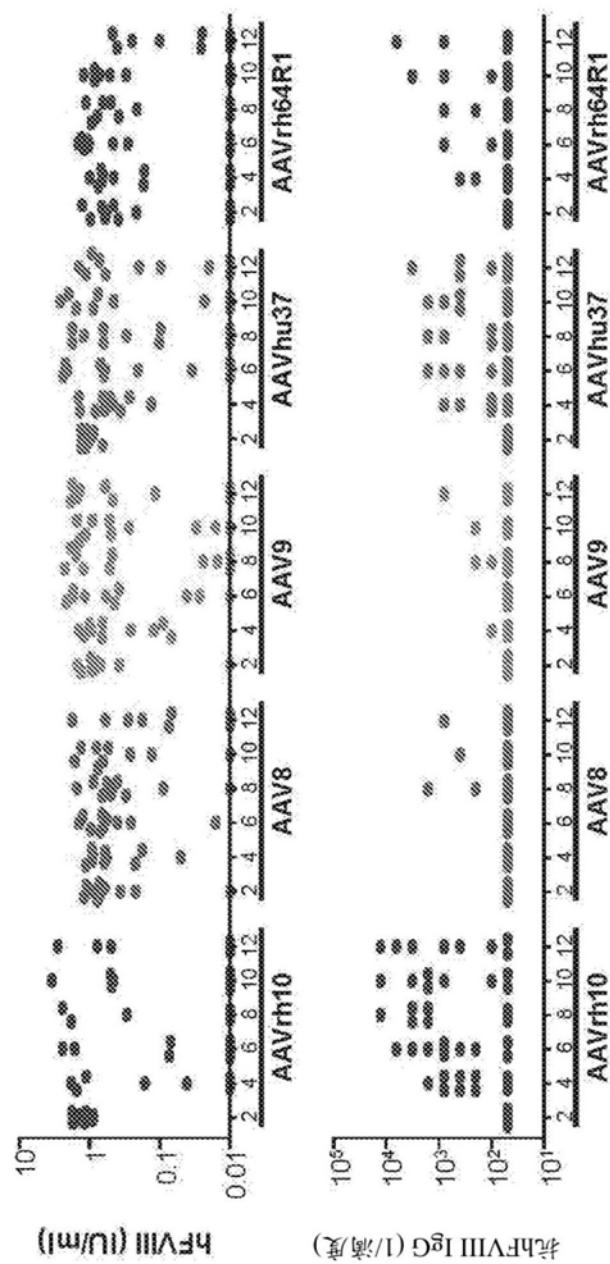


图9

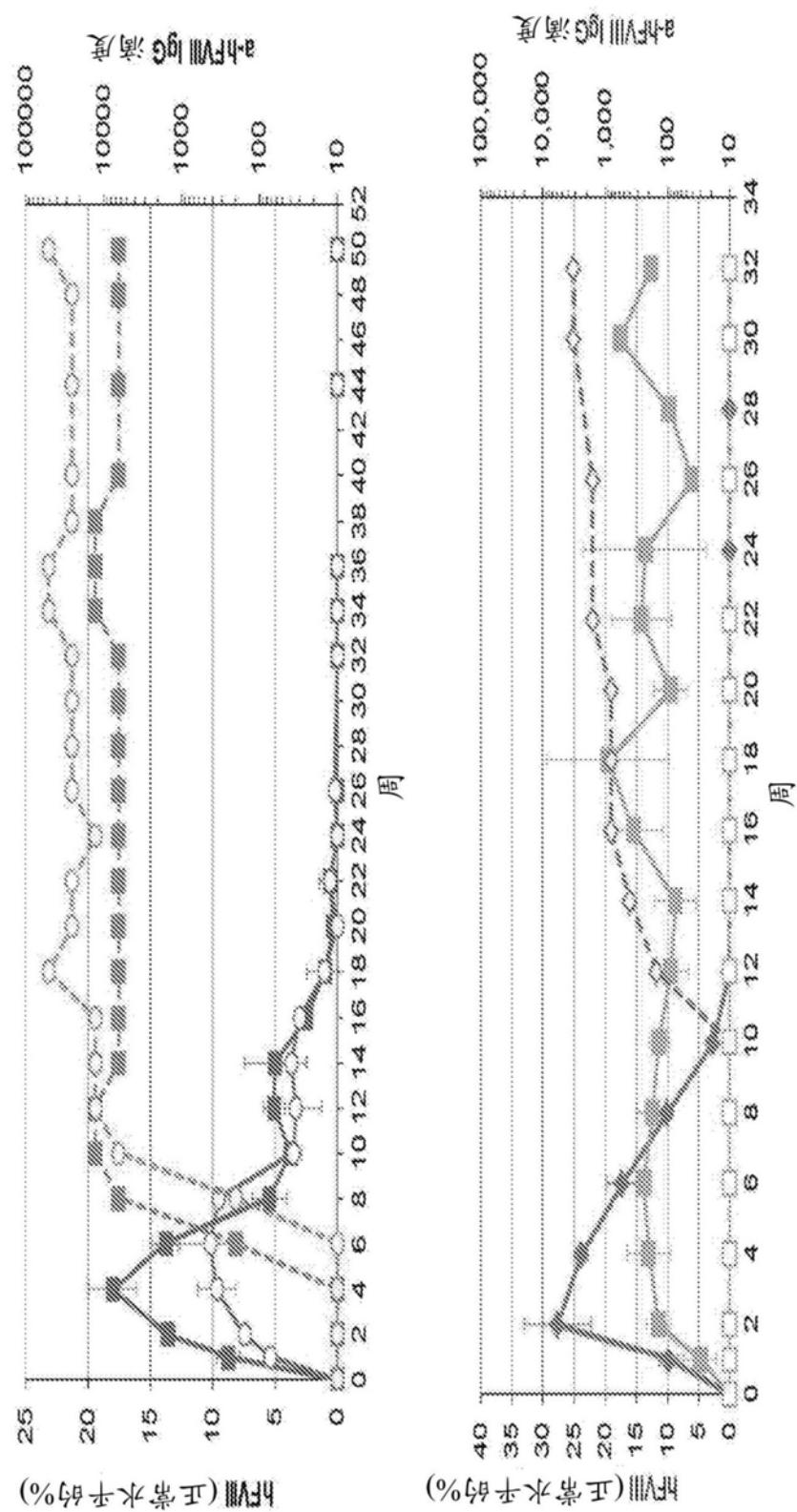


图10

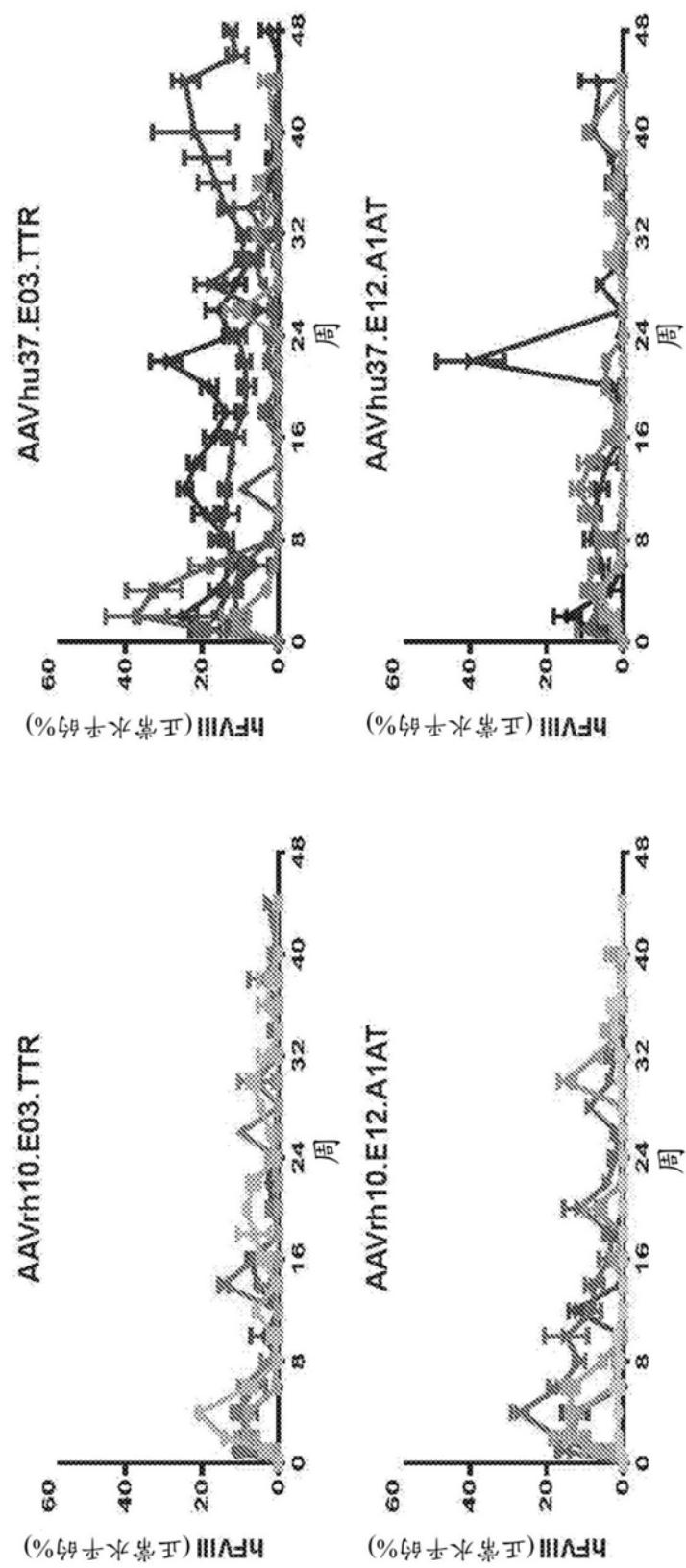


图11

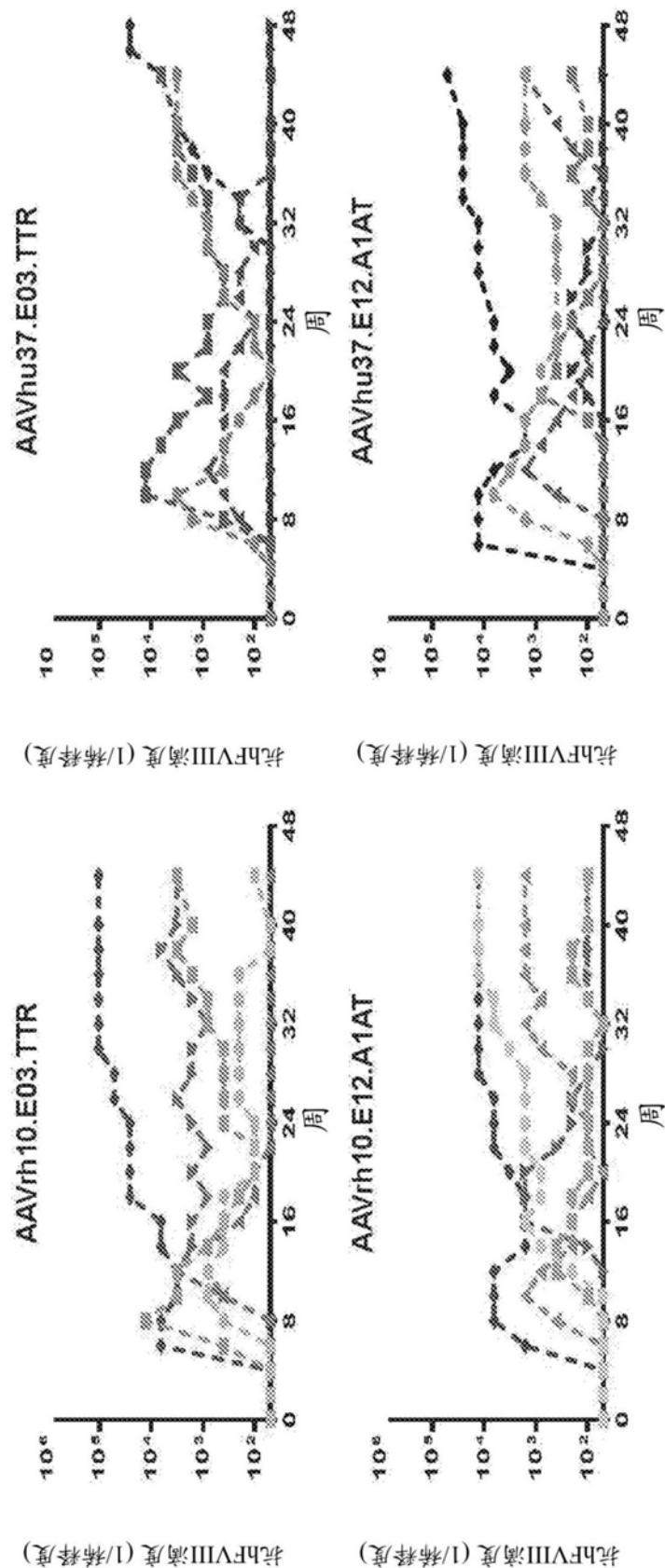


图12

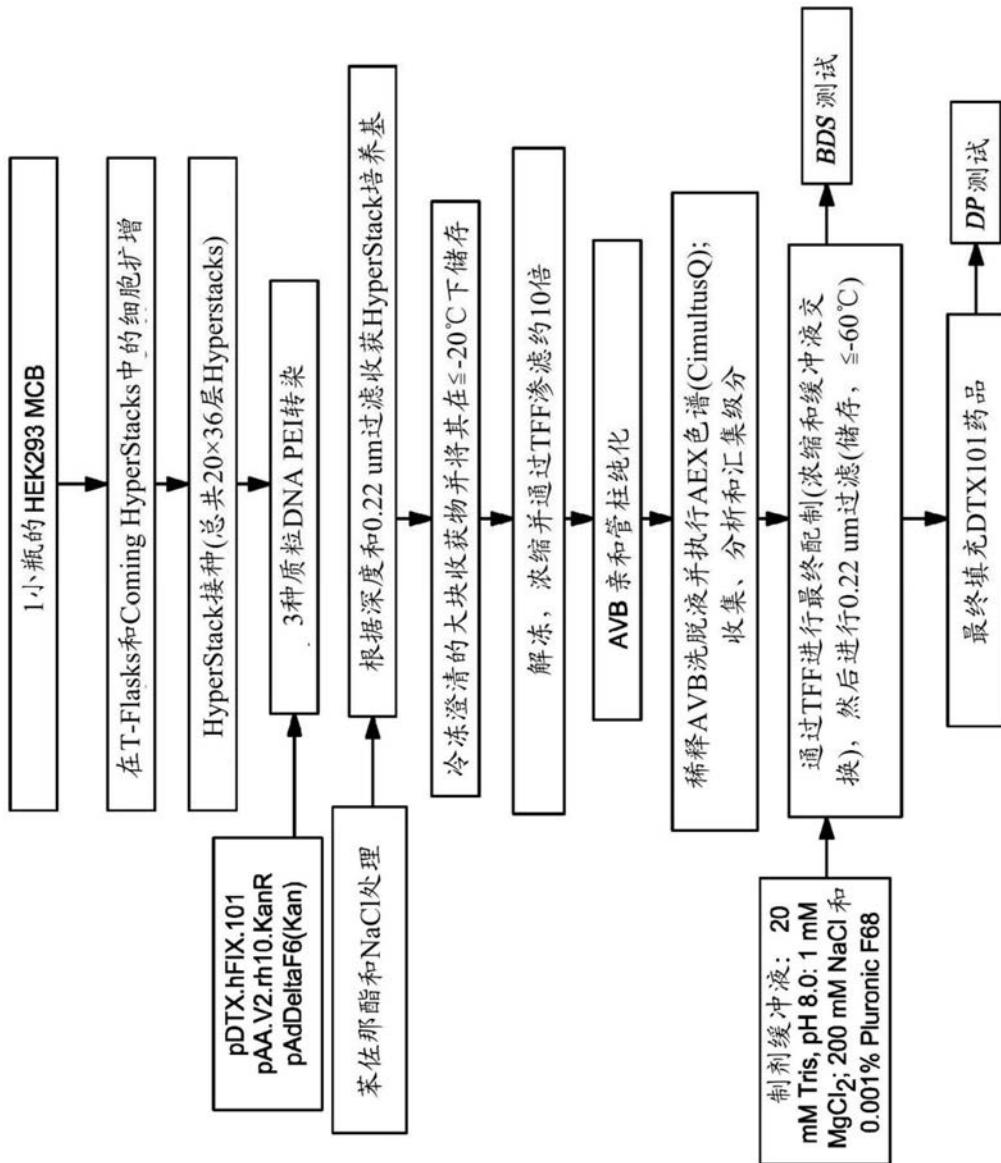


图 13

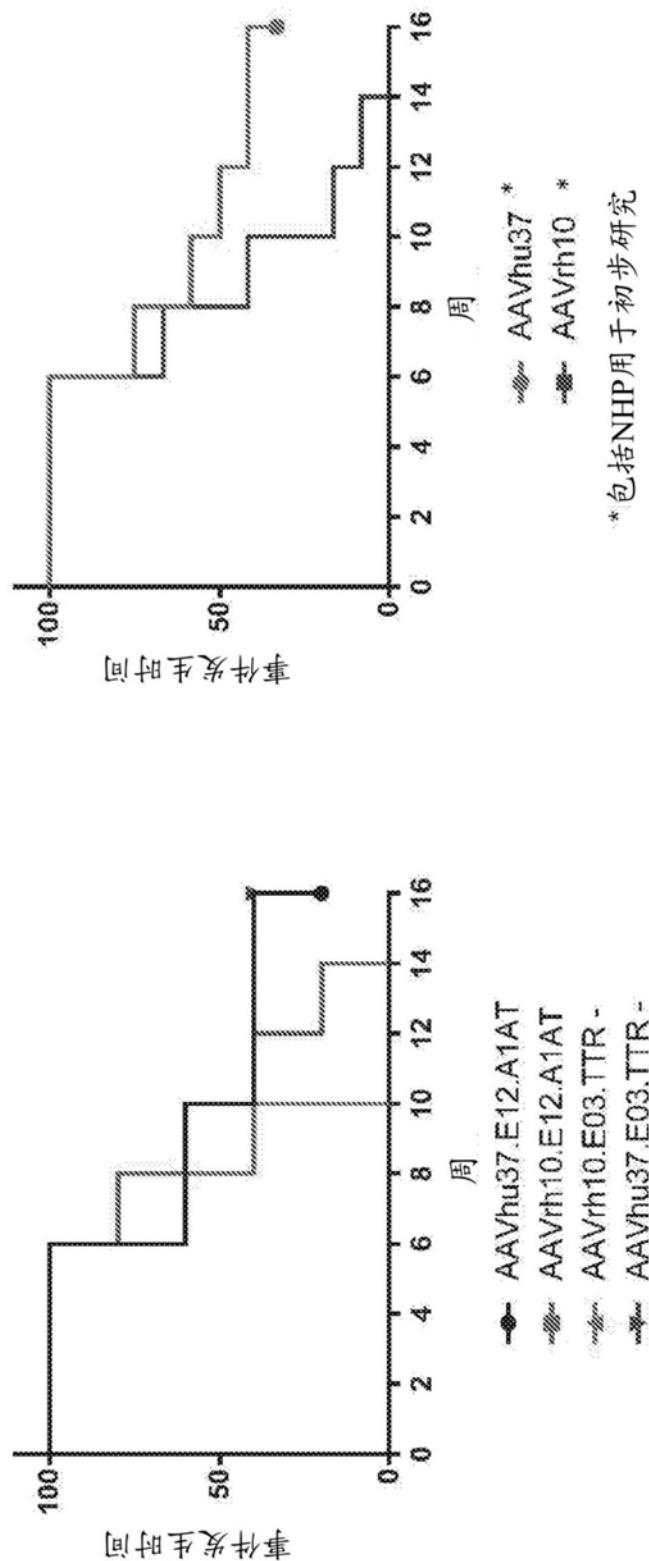


图14

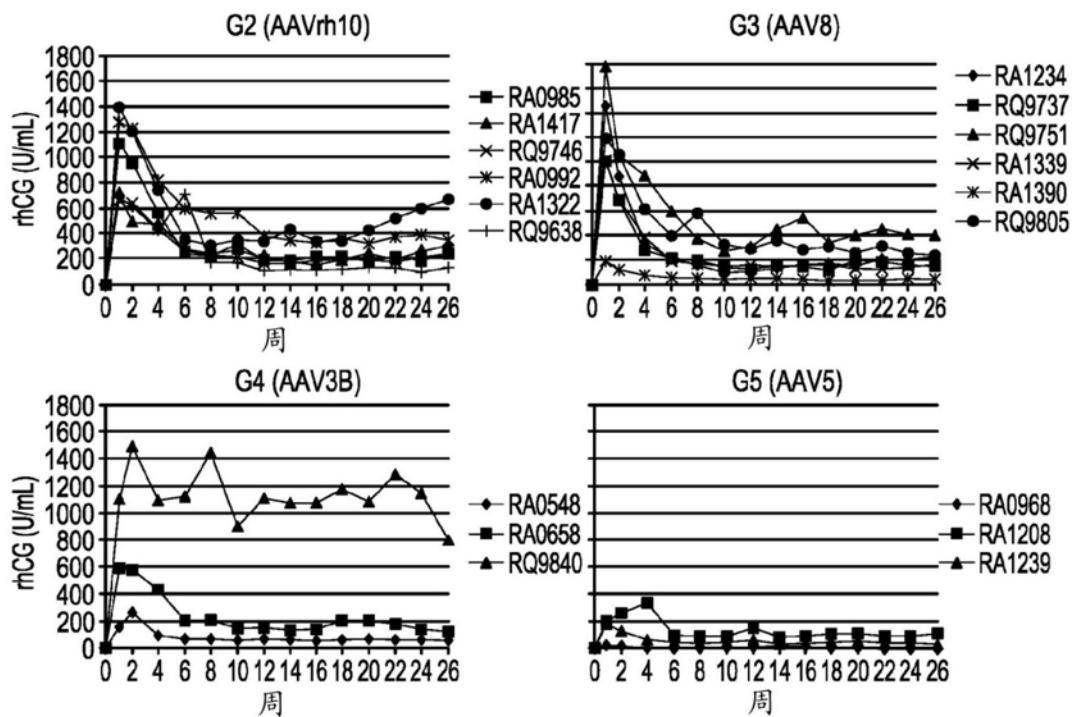


图15

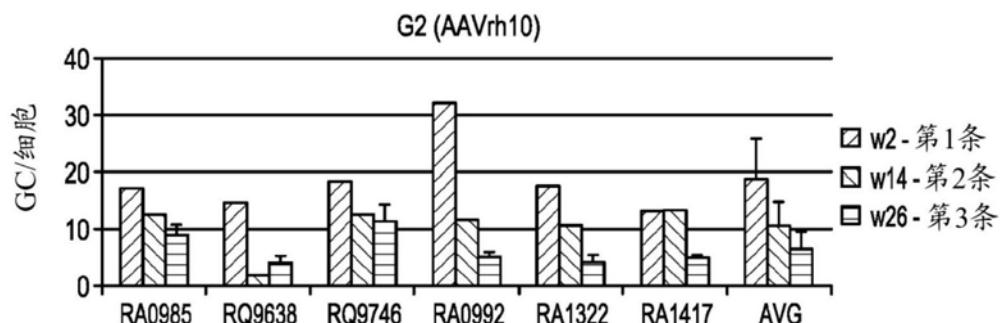


图16A

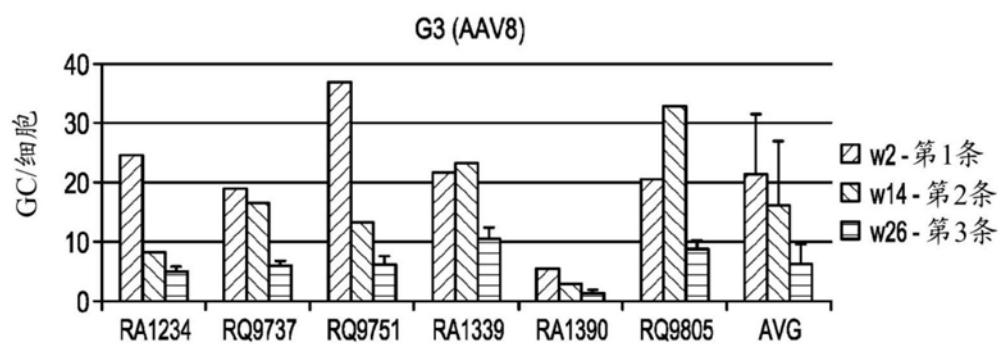


图16B

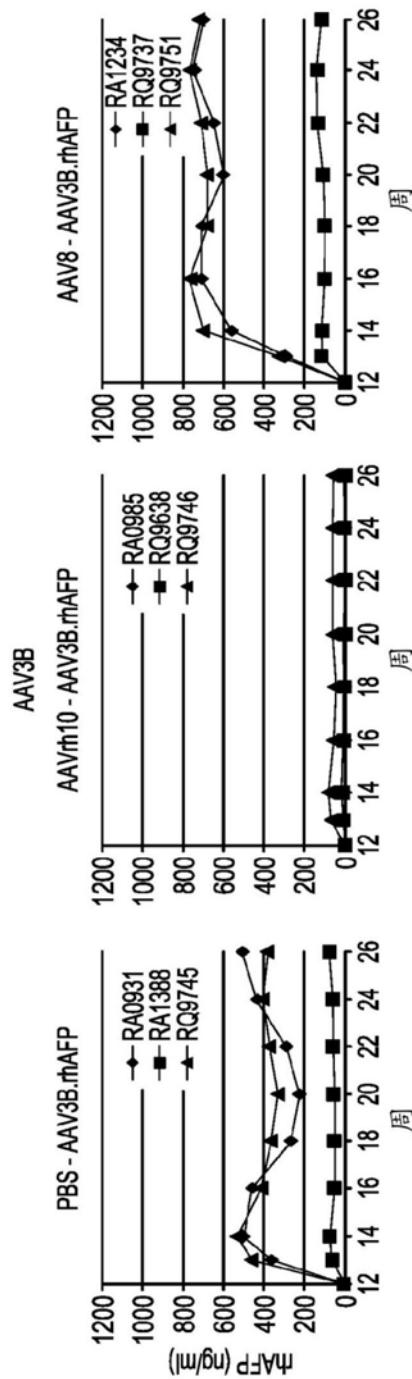


图17A

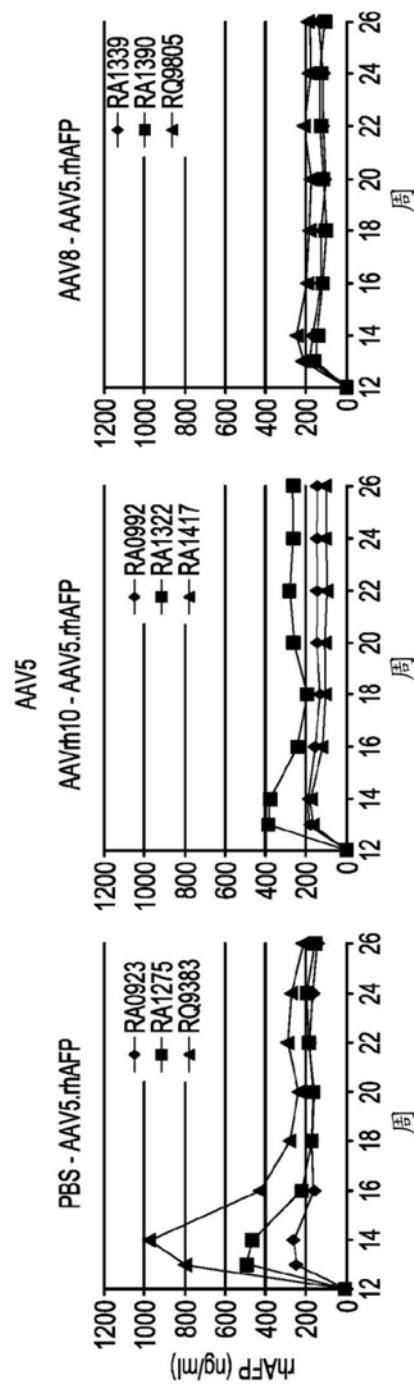


图17B

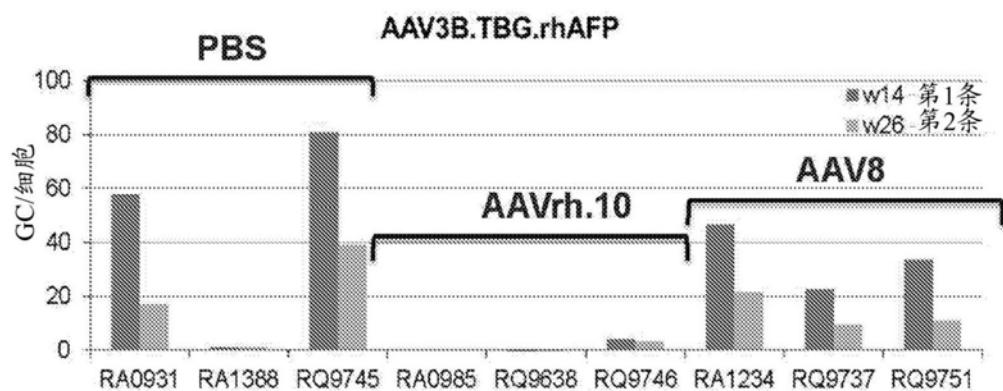


图18A

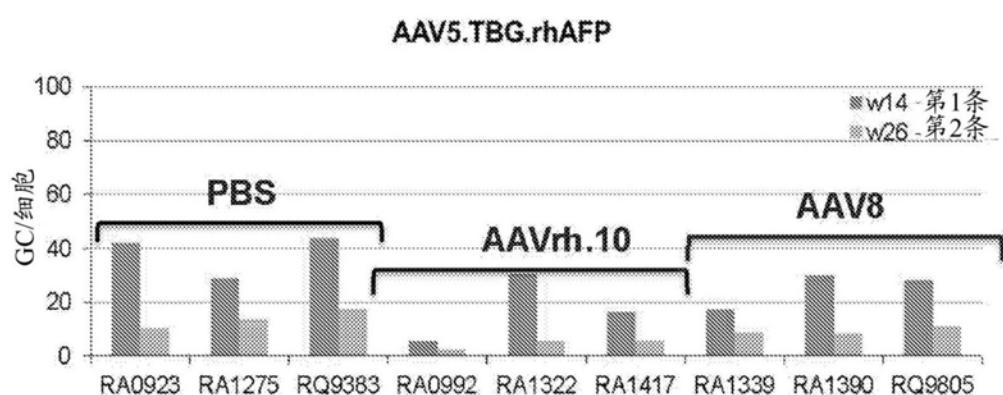


图18B

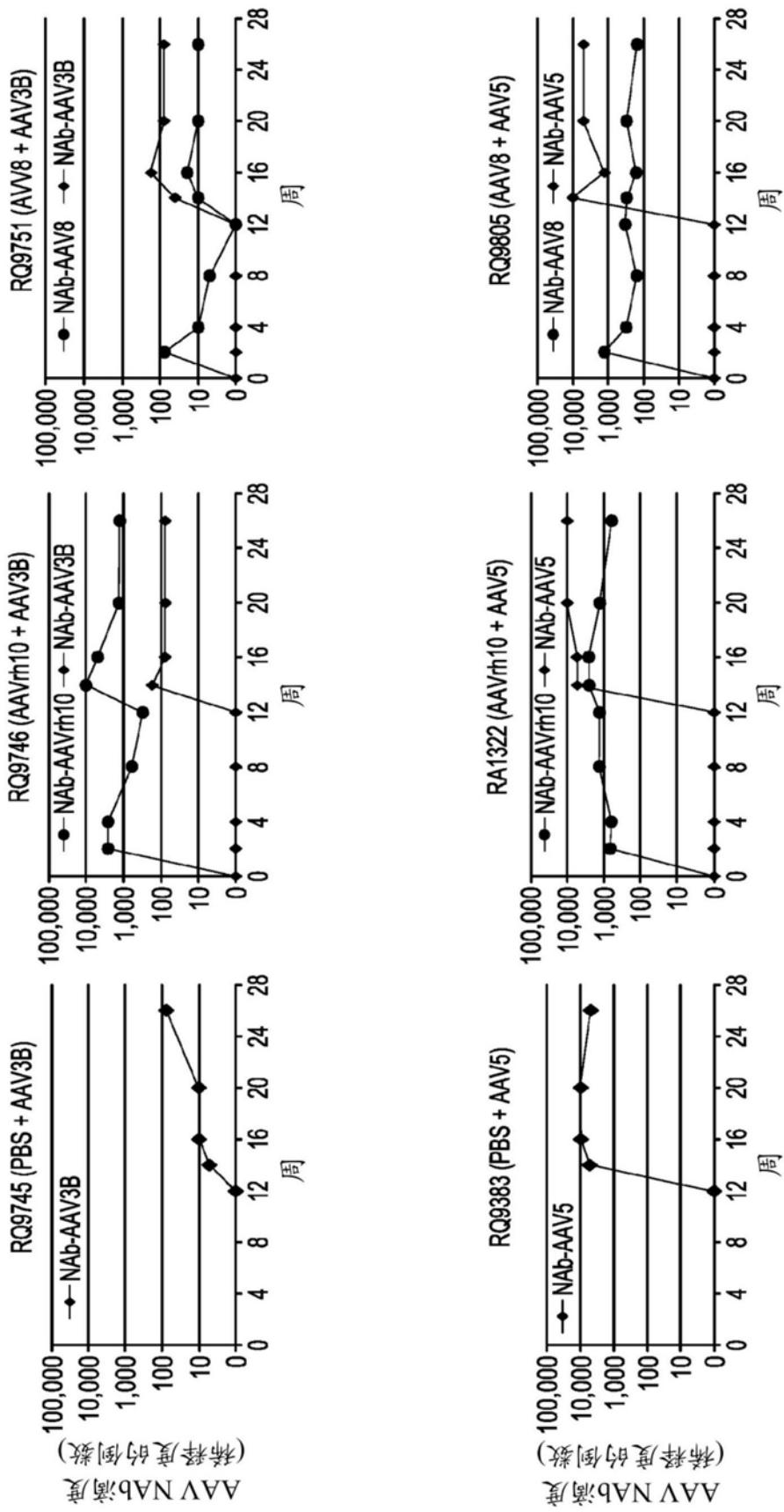


图19

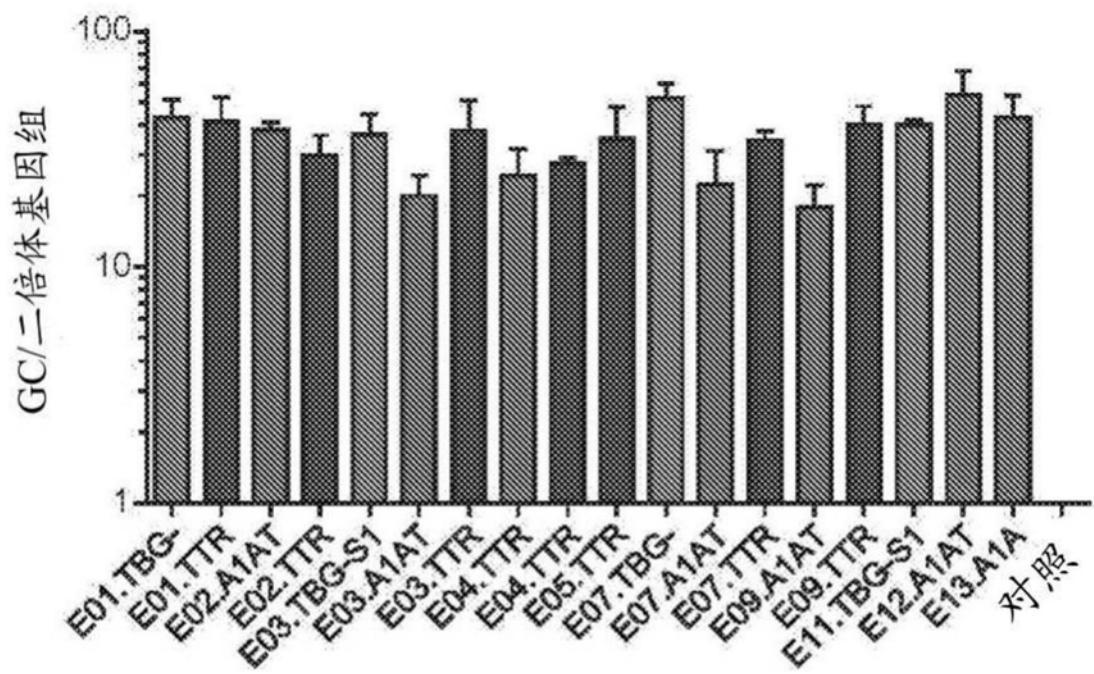


图20A

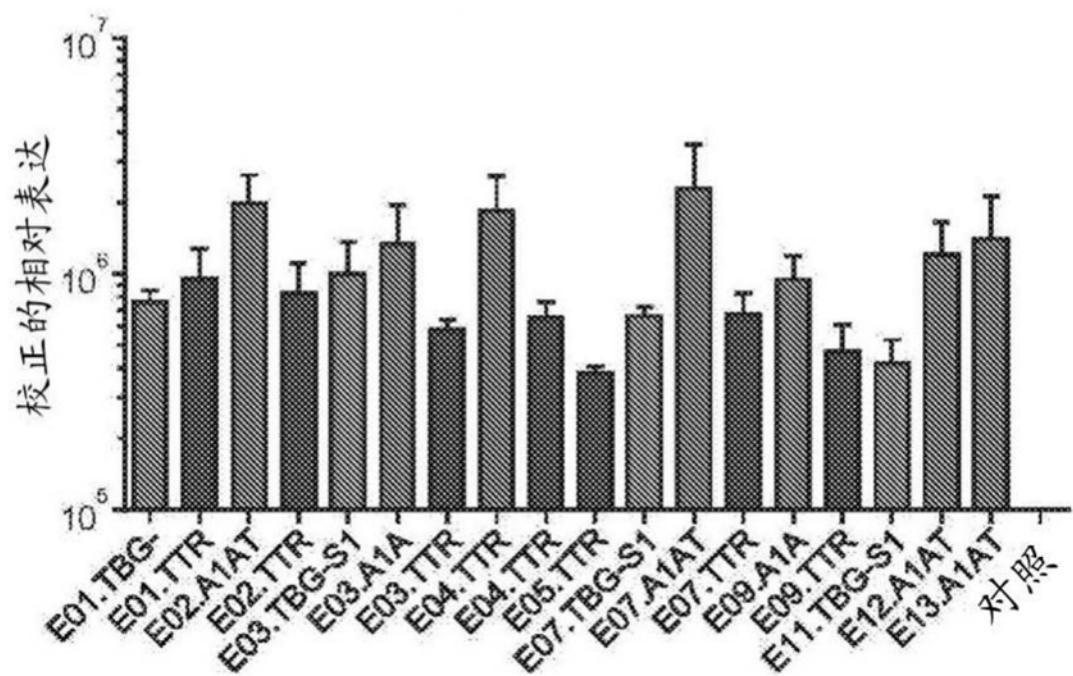


图20B

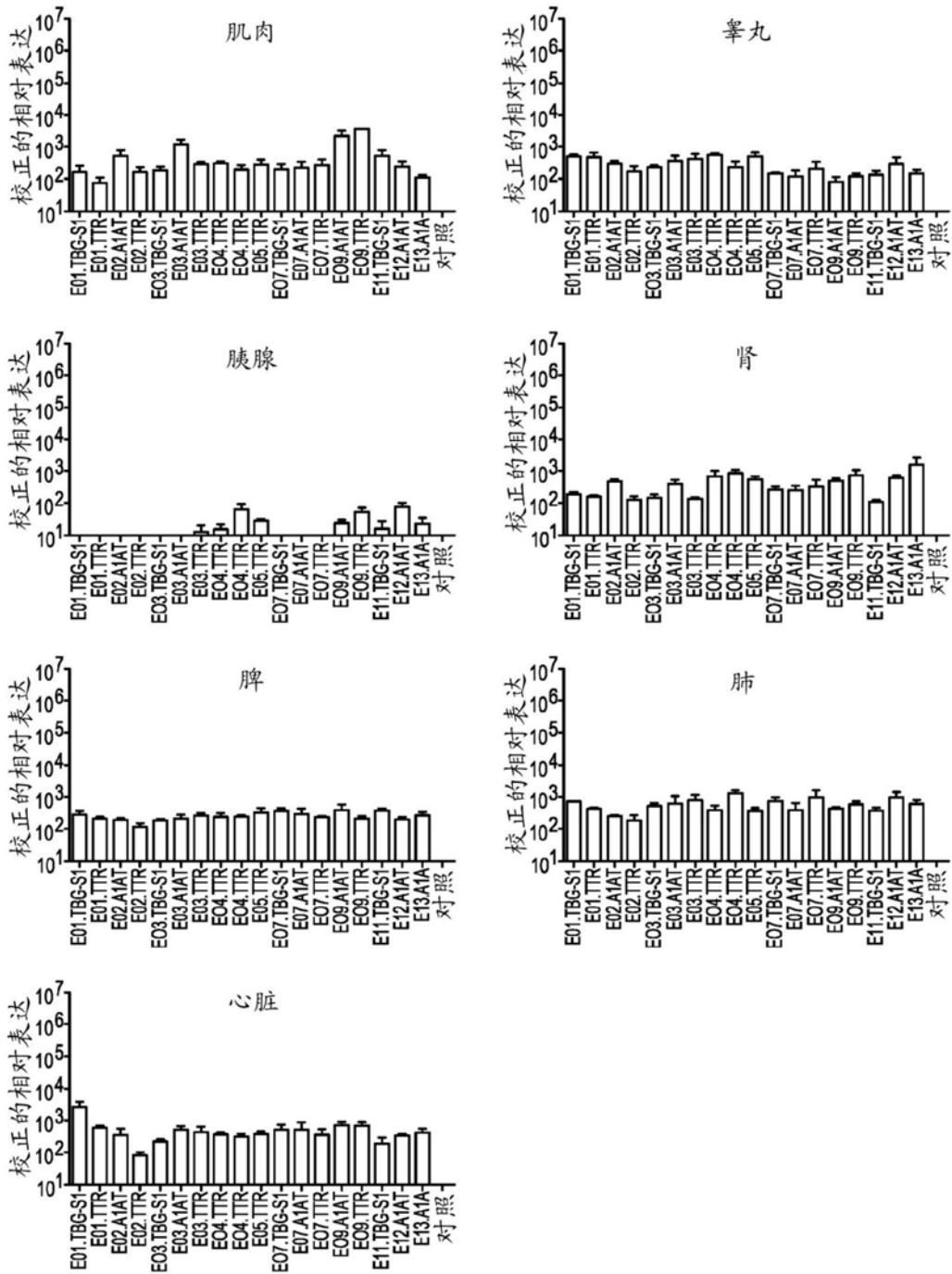


图21

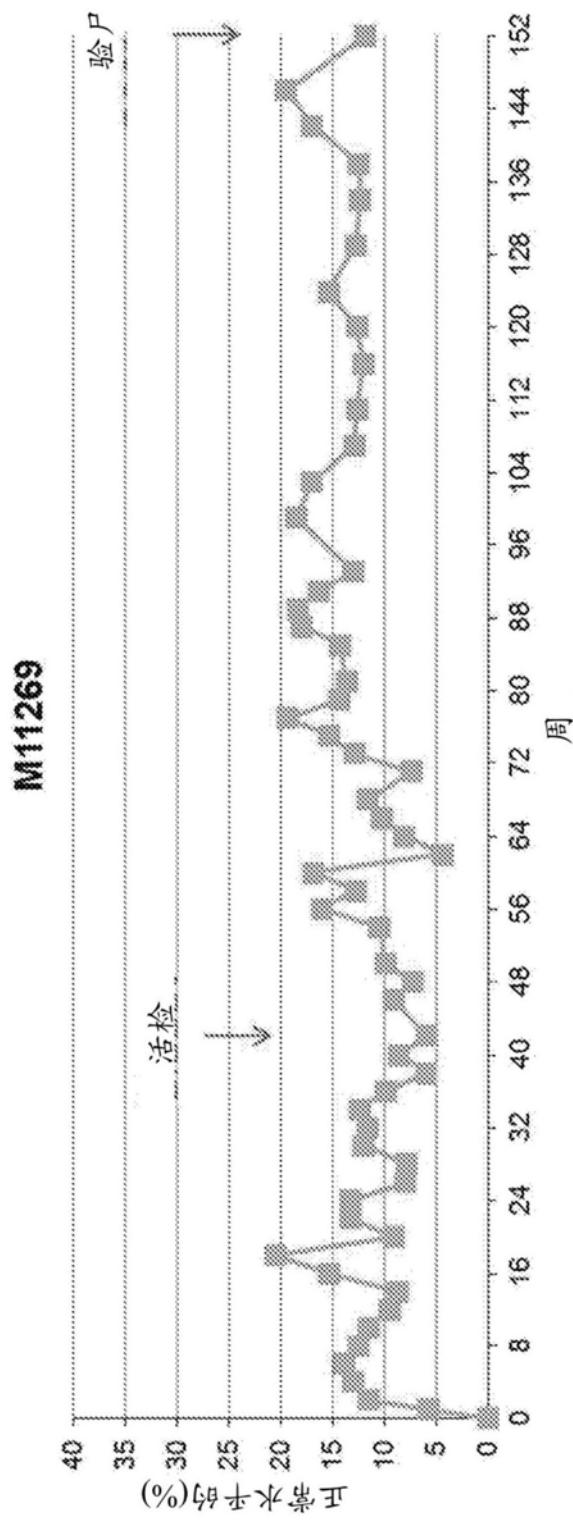
AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3x10¹² GC/kg)

图22

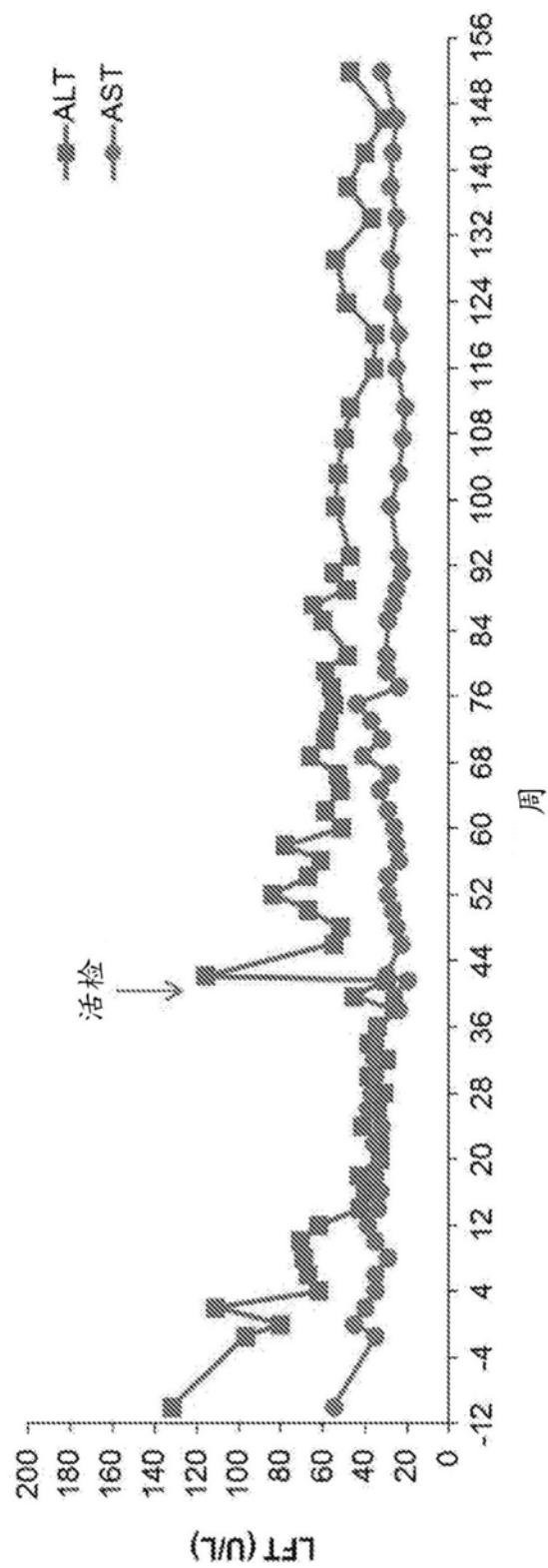
AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3×10¹² GC/kg)

图23

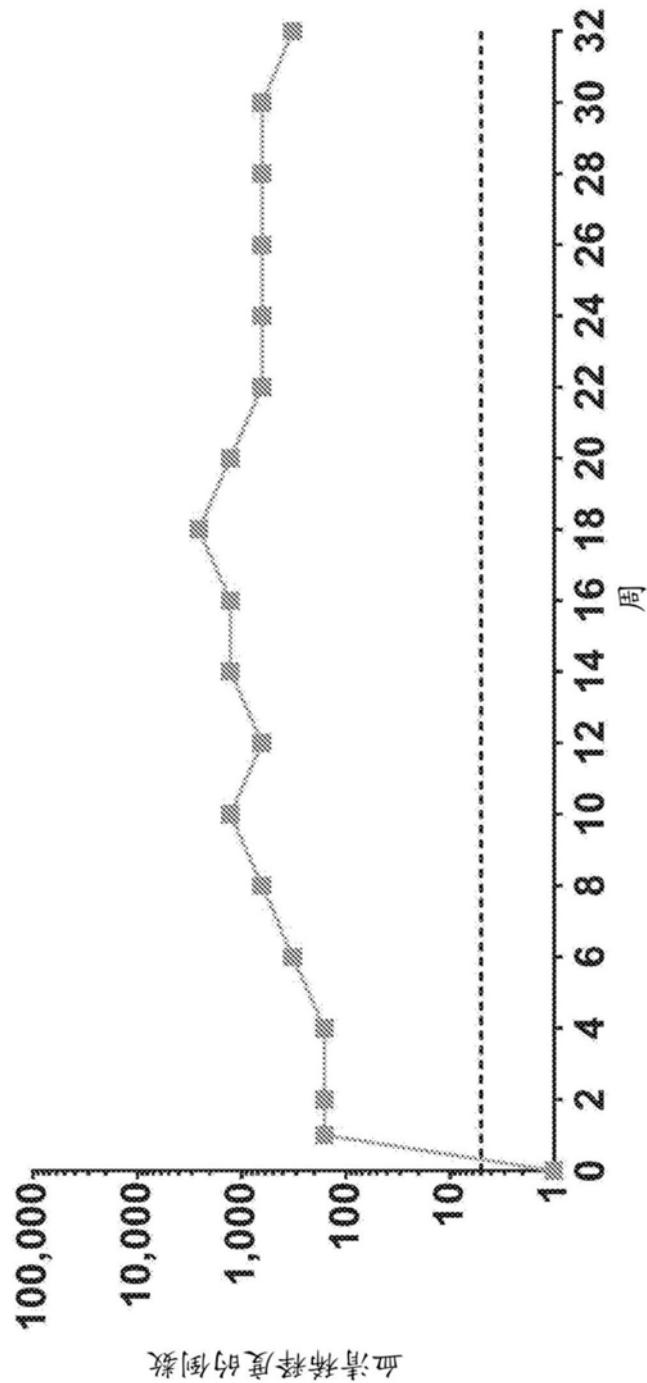


图24

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	atgcagatcgagctgagcacctgtttccctgtgcctgtgcgggtctgtttccgc	60	
hfVIII	atgcaaatagagactctccacgtttccctgtgcctttgcgattctgttttagtgc	60	
*****	*****	*****	*****
hfVIIIco	accggcggtactacccggagccgtggagctgagctgggattacatgcagagcgatctg	120	
hfVIII	accagaagatactacccgggtgcagtggaaactgtcatggactatatgcaaaatgtatctc	120	
***	***	*****	*****
hfVIIIco	ggagagctgcagttggatgcccgttccaccacgggtgccaagagacttccattcaac	180	
hfVIII	ggtagactgcctgtggacgcaagatttcccttagatgtgcggaaaatctttccattcaac	180	
**	*****	*****	*****
hfVIIIco	accagcgtgggttacaagaagaccctgttcgtggagttcacgttcaacatc	240	
hfVIII	acactcgtgggttacaaaaagactctgttttagatcacggatcacccatcaacatc	240	
***	***	*****	*****
hfVIIIco	gccaaggccacggccaccctggatggactgtggaccacaatccaggccgagggtgtac	300	
hfVIII	gctaaggccacggccaccctggatggatggatgtcttaggtcttaccatccaggctgagggttat	300	
**	*****	*****	*****
hfVIIIco	gataccgtgggttacccctgttacaagaacatggctctcatcctgtgtccctgcacggcgtg	360	
hfVIII	gatacgtgggttacccctgttacaagaacatggcttccatcctgtcagtcttcatgtgtt	360	
*****	*****	*****	*****
hfVIIIco	ggagttagactctggaaaggccagcgaggagccgagtagatgtatcagaccaggccagg	420	
hfVIII	ggtagtacccactggaaaggcttctggaggtgtatgtatcagaccaggccagg	420	
***	***	*****	*****
hfVIIIco	gagaaggaggatgataagggtttccaggaggaagccacactacgtgtggcagggtctg	480	
hfVIII	gagaaagaagatgataaaagtcttccctgttggaaagccatacatatgtctggcaggctgt	480	
*****	*****	*****	*****
hfVIIIco	aaggagaacggaccaatggccagcgatccactgtgcctgacctacagctacgtggccac	540	
hfVIII	aaagagaatggccaatggccctgtgccttacactcatatgtttctcat	540	
*****	*****	*****	*****
hfVIIIco	gtggatctggtaaggatctgttacacagcgactgtcgagccctgtgggtgtccggag	600	
hfVIII	gtggactctggtaaaagacttgcattcgccctactgtatgttagagaa	600	
*****	*****	*****	*****
hfVIIIco	ggaaggccctggccaaggagaagacccagaccctgcacaagttcatcctgtgttccgcgt	660	
hfVIII	ggtagtctggccaaggaaaagacacatgttgcacaaattatactactttgtgt	660	
**	*****	*****	*****
hfVIIIco	ttcgatggggaaagacttgcacagcgagaccaagaacacgcctgtatgcaggatcggt	720	
hfVIII	tttgcataaggaaaatgttgcactcggaaacaaagaactcctgtatgcaggataggat	720	
**	*****	*****	*****
hfVIIIco	gcccggcagccggccggcgtggccaaagatgcacaccgtgaacggatacgtgaacggagc	780	
hfVIII	gctgcatactgtcggccgtggctaaatgcacacagtcataatgttgcacaggct	780	
***	***	*****	*****

图25

图25(续)

图25(续)

hfVIIIco	caggagttcaccgatggaagcttacccagccactgtaccggggagagctgaacgagcac	2640
hfVIII	caggaatttactgtatgccttactcagccctataaccgtggagaactaaatgaacat	2640
*****	*****	*****
hfVIIIco	ctgggactgtgggaccatacatccggccgagggtggaggataacatcatgggaccc	2700
hfVIII	ttgggactctggggccatataagagcagaaggtaagataatcatggtaactttc	2700
*****	*****	*****
hfVIIIco	cggAACCCAGGCCAGCCGCTACAGCTCACAGCAGCCTGATCAGCTACAGGAGGAT	2760
hfVIII	AGAAATCAGGCCCTCTCGTCCCTATTCCTCTATTCTGCTATTCTTATGAGGAAGAT	2760
*****	*****	*****
hfVIIIco	cagcggcaggggccggccacggaaacttcgtgaagccaaacgagaccaagacctac	2820
hfVIII	cagaggcaaggaggcagaacccatgggggggggggggggggggggggggggggggg	2820
*****	*****	*****
hfVIIIco	ttctggaaagggtgcagcaccacatgggggggggggggggggggggggggggggg	2880
hfVIII	ttttggaaaggtaacatcatatgggggggggggggggggggggggggggggggggg	2880
*****	*****	*****
hfVIIIco	gcctacttcagcgatgtggatctggagaaggatgtgcacagcggactgtcgacc	2940
hfVIII	gcttatttctctgtatgttgcacccactgggggggggggggggggggggggggg	2940
*****	*****	*****
hfVIIIco	ctgggtgtccacaccaacaccctgaacccagccacggacggcagggtgggggggg	3000
hfVIII	ctgggtgtccacactaacactgaacccctgtcatgggggggggggggggggggg	3000
*****	*****	*****
hfVIIIco	ttcgccctgttccatccatcttcgtatgggggggggggggggggggggggggggg	3060
hfVIII	tttgctctgttttccatcttcgtatgggggggggggggggggggggggggggggg	3060
*****	*****	*****
hfVIIIco	gagcgggaactgcggggcccttgcacatccagatgggggggggggggggggggg	3120
hfVIII	gaaagaaaactgcagggtcccttgcacatccagatgggggggggggggggggggg	3120
*****	*****	*****
hfVIIIco	taccgggttccacggccatcaacggatacatcatggataccctgggggggggggg	3180
hfVIII	tatcgcttcatgcacatggctacataatggatacactacgggggggggggggg	3180
*****	*****	*****
hfVIIIco	caggatcagcgatccgggtgttacctgtgttgcggatgggggggggggggggg	3240
hfVIII	caggatcaaaggattcgatgttatctgtgttgcggatgggggggggggggggg	3240
*****	*****	*****
hfVIIIco	atccacttcagcgacacgtgttccatccgtgggggggggggggggggggggggg	3300
hfVIII	attcatttcagtgacatgtgttgcgttgcggatgggggggggggggggggggg	3300
*****	*****	*****
hfVIIIco	tacaacctgtacccaggagggtttcgaggggggggggggggggggggggggg	3360
hfVIII	tacaatcttatccagggttttttttttttttttttttttttttttttttttttt	3360
*****	*****	*****
hfVIIIco	tggcgggtggagggtgcctgtatcgggaggggggggggggggggggggggggg	3420
hfVIII	tggcgggtggagggtgccttattggcgagcatctacatgtgtgggggggggggg	3420
*****	*****	*****
hfVIIIco	gtgtacagcaacaagggtgcgggggggggggggggggggggggggggggggggg	3480
hfVIII	gtgtacagcaataagggtcgactccctgggggggggggggggggggggggggg	3480
*****	*****	*****

图25 (续)

hfVIIIco	cagatcaccgcccagcggacagtacggacagtggccccc aaagctggcccgctgactac	3540
hfVIII	cagattacagttcaggacaatatacgacagtggccccc aaagctggcccgacttcattat	3540
*****	*****	*****
hfVIIIco	agcggaaagcatcaacgcctggagcaccacggacattcagctggatcaagttggatctg	3600
hfVIII	tccggatcaatcatgcctggagcaccacggaccccttcttggatcaagggtggatctg	3600
*****	*****	*****
hfVIIIco	ctggcccaatgatcatccacggaatcaagaccaggagccggcagaagttcagcgc	3660
hfVIII	ttggcaccaatgattattacacggcatcaagaccagggtgcggcagaagttctccagc	3660
*****	*****	*****
hfVIIIco	ctgtacatcagccagttcatcatcatgtacagccgtggatggaaagaagtggcagac	3720
hfVIII	ctctacatctctcgatgtttatcatcatgtatagtcttgcggaaagaagtggcagactt	3720
*****	*****	*****
hfVIIIco	cggggaaacagcaccggaaacctgtatgggttcttcggaaacgtggatagcagcggaa	3780
hfVIII	cgagggaaattccactggaaaccttaatggtctttggcaatgtggattcatctgggata	3780
*****	*****	*****
hfVIIIco	aagcacaaatcttcaacccaccaatcatcgccgatacatccggctgcacccaacccac	3840
hfVIII	aaacacaatatttttaaccctccaattattgtcgatcatccgttgcaccaactcat	3840
*****	*****	*****
hfVIIIco	tacagcatcagaaggccctcgccatggagctgtatggatgtatctgaacagctgctcc	3900
hfVIII	tatagcattcgccgactctcgccgtggatgtatggatgtatttaaatagttgcagc	3900
*****	*****	*****
hfVIIIco	atgccacttggaaatggagagcaaggccatcagcgatgccatcaccggcagcgtac	3960
hfVIII	atgccatggaaatggagagtaaagcaatcatcgatgcacagattactqcttcatcc	3960
*****	*****	*****
hfVIIIco	ttcaccaacatgttgcacccctggagcccaagcaaggccggctgcacctgcagg	4020
hfVIII	tttaccaatatgttgcacccctggatctcccttcaaaagctcgacttcacccaaagg	4020
*****	*****	*****
hfVIIIco	agcaacgcctggccggccacaggtaataacccaaaggatggctgcagggtggatccag	4080
hfVIII	agtaatgcctggagacttcaggtgaataatccaaaggatggctgcagggtggacttccag	4080
*****	*****	*****
hfVIIIco	aagaccatgaaggtgaccggagtgaccacccagggtggatgtggactgcactagcat	4140
hfVIII	aagacaatgaaaagtccacaggtaactactcagggtggataaaatctctgttaccagcat	4140
*****	*****	*****
hfVIIIco	tatgtgaaggagtccctgtatcagcagccaggatggacaccaggatggaccctgtt	4200
hfVIII	tatgtgaaggagtccctcatccacgcgtcaagatggccatcagtggactcttttt	4200
*****	*****	*****
hfVIIIco	cagaacggaaaggtaagggtttccaggaaaccaggatagcttcacccaggatggtaac	4260
hfVIII	cagaatggcaaaaggtaagggtttccaggaaatcaagactcttcacacccaggatggtaac	4260
*****	*****	*****
hfVIIIco	agcctggatccaccactgtgacccgatacctcgccgatccacccacagagctgggtgac	4320
hfVIII	tctctagaccacccgttactactcgatccatccatcaccaggatgggtgac	4320
*****	*****	*****
hfVIIIco	cagatcgccctgagaatggaggtgtggatgcgaggcccaggatctgtactga	4374
hfVIII	cagattgcctgaggatggaggtctggatgcgaggcacaaggacactctac---	4371
*****	*****	*****

图25 (续)