(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112823210 B
(45)授权公告日 2025.04.18

(21)申请号 201980054169.6
(22)申请日 2019.06.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112823210 A
(43)申请公布日 2021.05.18
(30)优先权数据
62/686668 2018.06.18 US
62/740402 2018.10.02 US
62/752841 2018.10.30 US
62/823649 2019.03.25 US
62/860220 2019.06.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.02.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/037489 2019.06.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/245973 EN 2019.12.26

(73)专利权人 全国儿童医院研究所
地址 美国俄亥俄州
(72)发明人 L·罗迪诺-克拉帕奇
J·R·门德尔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 李志强

(51)Int.Cl.
C12N 15/86(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017180976 A1,2017.10.19
WO 2017181011 A1,2017.10.19
审查员 刘佳

权利要求书1页 说明书60页
序列表19页 附图29页

(54)发明名称

用于治疗肌营养不良的肌肉特异性微小肌营养不良蛋白的腺相关病毒载体递送

(57)摘要

本发明提供了表达微型化的人微小肌营养不良蛋白基因的基因治疗载体,诸如腺相关病毒(AAV)载体,以及使用这些载体在包括隔膜肌和心肌在内的骨骼肌中表达微小肌营养不良蛋白以及使肌纤维免受损伤、增加肌肉力量以及减少和/或预防患有肌营养不良的受试者的纤维化的方法。

CN 112823210 B

1.重组腺相关病毒(rAAV)用于制备用来治疗有需要的人受试者的杜兴肌营养不良的药物的用途,其中所述rAAV是血清型rh 74并且包含含有SEQ ID NO:9的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述药物被配制用于全身性施用途径,并且rAAV的剂量为1×10^{14}vg/kg至4×10^{14}vg/kg。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述药物被配制用于静脉内施用,并且所述rAAV的剂量为2×10^{14}vg/kg。

3.根据权利要求2所述的用途,其中所述rAAV的剂量通过利用超螺旋DNA标准品确定。

4.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述rAAV的剂量被配制用于以10mL/kg施用。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述药物被配制用于通过经一小时的输注来施用。

6.重组腺相关病毒(rAAV)用于制备用来治疗有需要的人受试者的杜兴肌营养不良的药物的用途,其中所述rAAV是血清型rh 74并且包含含有SEQ ID NO:9的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述药物被配制用于通过经一小时的静脉内输注来施用,并且rAAV的剂量为2×10^{14}vg/kg。

7.根据权利要求1或6所述的用途,其中与施用前的血清CK水平相比,在将rAAV施用于受试者后,受试者的血清CK水平降低。

8.根据权利要求6所述的用途,其中所述rAAV的剂量通过利用超螺旋DNA标准品确定。

用于治疗肌营养不良的肌肉特异性微小肌营养不良蛋白的腺相关病毒载体递送

[0001] 本申请要求2018年6月18日提交的美国临时专利申请号62/686,668号;2018年10月2日提交的美国临时专利申请号62/740,402;2018年10月30日提交的美国临时专利申请号62/752,841;2019年3月25日提交的美国临时专利申请号62/823,649和2018年6月11日提交的美国临时专利申请号62/860,220的优先权权益,这些临时专利申请中的每个以引用的方式整体并入本文。

[0002] 以引用的方式并入以电子方式提交的材料

[0003] 作为本公开的单独部分,本申请含有计算机可读形式的序列表,该序列表以引用的方式整体并入本文并且标识如下:文件名:53169_Seqlisting.txt;大小:60,056字节,创建日期:2019年6月17日。

技术领域

[0004] 本发明提供了表达微型化的人微小肌营养不良蛋白基因的基因治疗载体,诸如腺相关病毒(AAV)载体,以及使用这些载体在包括隔膜肌和心肌在内的骨骼肌中表达微小肌营养不良蛋白以及使肌纤维免受损伤、增加肌肉力量以及减少和/或预防患有肌营养不良的受试者的纤维化的方法。

背景技术

[0005] 肌肉质量和力量对于日常活动(诸如运动和呼吸)以及全身代谢的重要性是显而易见的。肌肉功能不足会引起肌营养不良(MD)(所述肌营养不良的特征在于肌无力和消瘦)并且会严重影响生活质量。最完善表征的MD是编码肌营养不良蛋白相关蛋白复合物(DAPC)的成员的基因突变的结果。这些MD是DAPC引起的肌膜细胞骨架栓系丧失相关的膜脆性的结果。杜兴肌营养不良(DMD)是最致命的肌肉疾病之一,在5000名新生男孩中就有1名受其影响。

[0006] DMD是由DMD基因中的突变导致的,所述突变导mRNA的减少和肌营养不良蛋白的缺失,肌营养不良蛋白是一种与肌营养不良蛋白相关蛋白复合物(DAPC)相关的427kD肌膜蛋白(Hoffman等人,Cell 51(6):919-28,1987)。DAPC由肌肉肌膜处的多种蛋白质组成,这些蛋白质经由肌营养不良蛋白(一种肌动蛋白结合蛋白)和α-肌营养不良蛋白聚糖(一种层粘连蛋白结合蛋白)在胞外基质(ECM)和细胞骨架之间形成结构连接。这些结构连接用于在收缩过程中稳定肌肉细胞膜以及防止收缩引起的损伤。随着肌营养不良蛋白的丧失,膜脆性导致肌膜撕裂和钙内流,从而触发钙活化的蛋白酶和分段性纤维坏死(Straub等人,Curr Opin.Neurol.10(2):168-75,1997)。肌肉退化和再生的这种不受控制的循环最终会耗尽肌肉干细胞群(Sacco等人,Cell,2010.143(7):第1059-71页;Wallace等人,Annu Rev Physiol,2009.71:第37-57页),从而引起进行性肌无力、肌内膜炎症和纤维化瘢痕。

[0007] 在不存在来自肌营养不良蛋白或微小肌营养不良蛋白的膜稳定的情况下,DMD将表现出组织损伤的不受控制的循环,并且通过结缔组织增殖来进行纤维化瘢痕组织替代丧

失的肌纤维的最终修复。纤维化的特征在于ECM基质蛋白(包括胶原蛋白和弹性蛋白)的过多沉积。ECM蛋白主要由细胞因子(诸如TGF)产生,所述细胞因子由活化的成纤维细胞响应于应激和炎症而释放。虽然DMD的主要病理特征是肌纤维退化和坏死,但是作为病理结果的纤维化具有相同的后果。纤维化组织的过度产生限制了肌肉再生,并且导致了DMD患者的进行性肌无力。在一项研究中,初始DMD肌肉活检中纤维化的存在与10年随访的不良运动结局高度相关联(Desguerre等人,JNeuropatholExp Neurol,2009.68(7):第762-7页)。这些结果表明纤维化是导致DMD肌肉功能障碍的主要因素,并且强调了在明显纤维化之前需要早期干预的必要性。

[0008] 对于患有DMD的患者,需要增加肌肉力量以及防止肌肉损的治疗。

发明内容

[0009] 本发明涉及将微小肌营养不良蛋白基因表达至骨骼肌(包括隔膜肌和心肌),以使肌纤维免受损伤、增加肌肉力量以及减少和/或预防纤维化的基因治疗载体,例如AAV。

[0010] 本发明提供了用于使用基因治疗载体来递送微小肌营养不良蛋白,以解决在DMD中观察到的基因缺陷,从而增加肌肉力量和/或增加肌肉质量的疗法和方法。实施例2描述了针对杜兴肌营养不良的全身性基因递送临床试验,在该研究中,受试者接受2×1014vg/kg AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。实施例3中描述的临床研究提供了一种新型关键性临床方案,所述方案包括随机双盲安慰剂对照设计。在研究开始时,受试者被随机分组并且接受2×10^{14}vg/kg AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白或乳酸林格氏液。

[0011] 本发明提供了包含SEQ ID NO:3、8或9的核苷酸序列的核酸分子。本发明还提供了包含SEQ ID NO:9的核酸序列或SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021的rAAV,以及包含SEQ ID NO:9的核酸序列或SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021的rAAV颗粒。

[0012] 本发明的另一个方面提供了包含核酸分子、rAAV和rAAV颗粒的组合物,所述核酸分子包含SEQ ID NO:3、8或9的核苷酸序列,所述rAAV包含SEQ ID NO:9的核酸序列或SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021,所述rAAV颗粒包含SEQ ID NO:9的核酸序列或SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021。本文公开的任何方法都可以使用这些组合物进行。

[0013] 本发明提供了治疗有需要的人受试者的肌营养不良的方法,所述方法包括施用重组腺病毒(rAAV)相关rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的步骤,其中所述rAAV以5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg的剂量通过全身性施用途径来施用。肌营养不良可以是杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良。

[0014] 例如,所施用的rAAV的剂量为约$5.0x10^{12}$ vg/kg至约$1.0x10^{14}$vg/kg、或约$5.0x10^{12}$ vg/kg至$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{12}$ vg/kg至约$2.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{12}$ vg/kg至约$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{12}$ vg/kg至约$5.0x10^{13}$ vg/kg、或约$5.0x10^{12}$ vg/kg至约$2.0x10^{13}$vg/kg、或约$5.0x10^{12}$ vg/kg至约$1.0x10^{13}$ vg/kg、或$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$1.0x10^{15}$ vg/kg、或$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.0x10^{13}$ vg/kg至$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$2.0x10^{14}$vg/kg、或约$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$5.0x10^{13}$ vg/kg、或约$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$3.0x10^{14}$ vg/kg、或约

$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$5.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$6.0x10^{14}$vg/kg、或$1.0x10^{13}$ vg/kg至约$1.0x10^{15}$ vg/kg、或$5.0x10^{13}$ vg/kg至约$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{13}$ vg/kg至$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{13}$vg/kg至约$2.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{13}$ vg/kg至约$1.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{13}$ vg/kg至约$3.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{13}$ vg/kg至约$5.0x10^{14}$ vg/kg、或约$5.0x10^{13}$ vg/kg至约$6.0x10^{14}$ vg/kg、或$5.0x10^{13}$vg/kg至约$1.0x10^{15}$ vg/kg、或$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$6.0x10^{14}$ vg/kg、或$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$5.0x10^{14}$ vg/kg、或$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$4.0x10^{14}$vg/kg、或$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$1.0x10^{15}$ vg/kg、或$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$3.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.0x10^{14}$ vg/kg至约$2.5x10^{14}$ vg/kg、或$1.0x10^{14}$vg/kg至约$2.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$3.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至$6.0x10^{14}$、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至$5.0x10^{14}$、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至$4.0x10^{14}$、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至$1.0x10^{15}$、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$3.5x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$3.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$2.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$2.5x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$2.0x10^{14}$ vg/kg、或$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$3.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.25x10^{14}$ vg/kg至约$3.5x10^{14}$ vg/kg、或$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$1.0x10^{15}$vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至$6.0x10^{14}$、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至$5.0x10^{14}$、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至$4.0x10^{14}$、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$3.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$3.5x10^{14}$ vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$3.25x10^{14}$ vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$3.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$2.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$2.5x10^{14}$ vg/kg、或约$1.5x10^{14}$ vg/kg至约$2.0x10^{14}$vg/kg、或$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$1.0x10^{15}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至$6.0x10^{14}$、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至$5.0x10^{14}$、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至$4.0x10^{14}$、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$3.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$3.5x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$3.25x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$3.0x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$2.75x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$2.5x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$2.25x10^{14}$ vg/kg、或约$1.75x10^{14}$ vg/kg至约$2.0x10^{14}$ vg/kg、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至$1.0x10^{15}$、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至$6.0x10^{14}$、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至$5.0x10^{14}$、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至约$4.0x10^{14}$ vg/kg、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至约$3.75x10^{14}$ vg/kg、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至约$3.5x10^{14}$ vg/kg、或约$2.0x10^{14}$ vg/kg至约$3.25x10^{14}$vg/kg。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的方法包括全身性施用rAAV,其中所述全身性施用途径是静脉内途径,并且所施用的rAAV的剂量为约2.0×10^{14}vg/kg。在另一个实施方案中,本发明的方法包括全身性施用rAAV,其中所述全身性施用途径是静脉内途径,并且所施用的rAAV的剂量为约5.0×10^{12}vg/kg、或约6.0×10^{12}vg/kg、或约7.0×10^{12}vg/kg、或约8.0×10^{12}vg/kg、或约9.0×10^{12}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg、或约1.25×10^{13}vg/kg、或约1.5×10^{13}vg/kg、或约1.75×10^{13}vg/kg、或约2.25×10^{13}vg/kg、或约2.5×10^{13}vg/kg、或约2.75×10^{13}vg/kg、或约3.0×10^{13}vg/kg、或约3.25×10^{13}vg/kg、或约3.5×10^{13}vg/kg、或约3.75×10^{13}vg/kg、或约4.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg、或约6.0×10^{13}vg/kg、或约7.0×10^{13}vg/kg、或约8.0×10^{13}vg/kg、或约9.0×10^{13}vg/kg、或约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg、或约2.25×10^{14}vg/kg、或约2.5×10^{14}vg/kg、或约2.75×10^{14}vg/kg、或约3.0×10^{14}vg/kg、或约3.25×10^{14}vg/kg、或约$3.5\times$

10^{14}vg/kg、或约3.75×10^{14}vg/kg、或约4.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{14}vg/kg、或约6.0×10^{14}vg/kg、或约1×10^{15}vg/kg。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白或AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,rAAV是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0016] 在本发明的方法中的任一者中,rAAV的剂量可以以约5mL/kg至约15mL/kg、或约8mL/kg至约12mL/kg、或8mL/kg至约10mL/kg、或5mL/kg至约10mL/kg、或约10mL/kg至12mL/k、或约10mL/kg至15mL/kg、或10mL/kg至约20mL/kg施用。在一个特定实施方案中,剂量或rAAV以约10mL/kg施用。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白或AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,rAAV是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0017] 在本发明的方法中的任一者中,rAAV的剂量可以通过注射、输注或移植来施用。例如,rAAV的剂量通过经大约一小时的输注来施用。此外,rAAV的剂量通过外周肢静脉(诸如,外周臂静脉或外周腿静脉)的静脉内途径来施用。或者,输注可以经大约30分钟、或大约1.5小时、或大约2小时、或大约2.5小时、或大约3小时施用。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0018] 通过本发明的方法中的任一者施用的rAAV可以包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子序列。此外,通过本发明的方法中的任一者施用的rAAV包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子序列。例如,rAAV可以包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。

[0019] 在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0020] 在本发明的方法中的任一者中,所施用的rAAV是血清型AAVrh7.4的。

[0021] 在一些实施方案中,本发明的方法治疗杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良。一个示例性实施方案是一种治疗有需要的人受试者的杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的方法,所述方法包括施用剂量重组腺病毒(rAAV)相关rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白

的步骤,其中施用途径是静脉内输注,并且所施用的rAAV的剂量为经大约一小时约2×10^{14}vg/kg,并且其中rAAV载体包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0022] 在一个实施方案中,本发明提供了rAAV,所述rAAV包含肌肉特异性控制元件核苷酸序列和编码微小肌营养不良蛋白的核苷酸序列。例如,核苷酸序列编码功能性微小肌营养不良蛋白,其中所述核苷酸与SEQ ID NO:1具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常地至少90%、91%、92%、93%或94%、甚至更通常地至少95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,其中所述蛋白质保持了微小肌营养不良蛋白活性。微小肌营养不良蛋白在肌肉收缩期间为肌肉膜提供稳定性,例如,微小肌营养不良蛋白在肌肉收缩期间作为减震器。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、或SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0023] 本发明还提供了rAAV,其中所述核苷酸序列包括在严格条件下与SEQ ID NO:1或其互补序列的核酸序列杂交,并且编码功能性微小肌营养不良蛋白的核苷酸序列。

[0024] 在一个实施方案中,rAAV是非复制性重组腺相关病毒(AAV),即SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。该载体基因组包含基因表达所需的最小元件,包括AAV2反向末端重复序列(ITR)、微小肌营养不良蛋白、SV40内含子(SD/SA)和合成多腺苷酸化(多聚A)信号,所有这些元件均在MHCK7启动子/增强子的控制下。载体基因组和表达盒的示意图如图1所示。在静脉内施用后,AAVrh74血清型可以用于在骨骼肌和心肌中实现有效的基因转移。

[0025] 术语“严格”用于指在本领域中通常理解为严格的条件。杂交严格性主要通过温度、离子强度和变性剂(诸如甲酰胺)的浓度来确定。用于杂交和洗涤的严格条件的实例是在65-68℃下的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠或者在42℃下的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺。参见Sambrook等人,MolecularCloning:A LaboratoryManual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,(Cold Spring Harbor,N.Y.1989)。还可以使用更严格的条件(诸如较高的温度、较低的离子强度、较高的甲酰胺或其他变性剂),然而,杂交的速率会受到影响。在涉及脱氧寡核苷酸杂交的情况下,另外的示例性严格杂交条件包括在37℃(对于14个碱基的寡核苷酸)、48℃(对于17个碱基的寡核苷酸)、55℃(对于20个碱基的

寡核苷酸)和60℃(对于23个碱基的寡核苷酸)下在6×SSC 0.05%焦磷酸钠中洗涤。

[0026] 为了减少非特异性和/或背景杂交,可以在杂交和洗涤缓冲液中包含其他试剂。实例是0.1%牛血清白蛋白、0.1%聚乙烯吡咯烷酮、0.1%焦磷酸钠、0.1%十二烷基硫酸钠、NaDodSO4、(SDS)、ficoll、登哈特(Denhardt)溶液、超声处理的鲑鱼精子DNA(或其他非互补性DNA)和硫酸葡聚糖,虽然还可以使用其他合适的试剂。可以改变这些添加剂的浓度和类型,而基本上不影响杂交条件的严格性。杂交实验通常在pH6.8-7.4下进行,然而,在典型的离子强度条件下,杂交的速率几乎与pH无关。参见Anderson等人,Nucleic Acid Hybridisation:A Practical Approach,第4章,IRL Press Limited(Oxford,England)。杂交条件可以由本领域的技术人员调整,以适应这些变量并且使不同序列相关性的DNA形成杂合体。

[0027] 术语“肌肉特异性控制元件”是指调节对于在肌肉组织中的表达具有特异性的编码序列的表达的核苷酸序列。这些控制元件包括增强子和启动子。本发明提供了包含肌肉特异性控制元件MCKH7启动子、MCK启动子和MCK增强子的构建体。

[0028] 术语“可操作地连接”是指调控元件核苷酸序列(例如启动子核苷酸序列)的定位,以通过所述调控元件赋予所述核苷酸序列的表达。

[0029] 在一个方面,本发明提供了rAAV,其中肌肉特异性控制元件是人骨骼肌肌动蛋白基因元件、心肌肌动蛋白基因元件、肌细胞特异性增强子结合因子(MEF)、肌肉肌酸激酶(MCK)、截短的MCK(tMCK)、肌球蛋白重链(MHC)、杂合体α-肌球蛋白重链增强子/MCK增强子-启动子(MHCK7)、C5-12、鼠科动物肌酸激酶增强子元件、骨骼肌快缩肌钙蛋白c基因元件、慢缩心肌肌钙蛋白c基因元件、慢缩肌钙蛋白i基因元件、缺氧诱导性核因子、类固醇诱导性元件或糖皮质激素应答元件(GRE)。

[0030] 例如,肌肉特异性控制元件是MHCK7启动子核苷酸序列SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7,或者肌肉特异性控制元件是MCK核苷酸序列SEQ ID NO:4。此外,在本发明的rAAV载体中的任一者中,肌肉特异性控制元件核苷酸序列(例如MHCK7或MCK核苷酸序列)可操作地连接至编码微小肌营养不良蛋白的核苷酸序列。例如,MHCK7启动子核苷酸序列(SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7)可操作地连接至人微小肌营养不良蛋白编码序列(SEQ ID NO:1),如图1或图2(SEQ ID NO:3)或图13(SEQ ID NO:9)中提供的构建体所示。在另一个实例中,MCK启动子(SEQ ID NO:4)可操作地连接至人微小肌营养不良蛋白编码序列(SEQ ID NO:1),如图5或图6(SEQ ID NO:5)提供的构建体所示。在另一个方面,本发明提供了rAAV载体,所述rAAV载体包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2或者SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:7的核苷酸序列。本发明还提供了rAAV载体,所述rAAV载体包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:4的核苷酸序列。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了包含在质粒中的rAAV构建体,所述质粒包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的核苷酸序列。例如,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体包含这样的核苷酸序列:所述核苷酸序列在SEQ ID NO:3的ITR内并且包括末端,如图2所示。rAAV载体包含5'ITR、MHCK7启动子、嵌合内含子序列、人微小肌营养不良蛋白基因的编码序列、多聚A和3'ITR。在一个实施方案中,载体包含SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021。SEQ ID NO:3所示的质粒还包含氨苄青霉素抗性和具有pBR322复制起点的pGEX质粒骨架。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列的rAAV。例如,

AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体构建体包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,如图13所示。该rAAV载体构建体包含MHCK7启动子、嵌合内含子序列、人微小肌营养不良蛋白基因的编码序列和多聚A。在一个实施方案中,rAAV载体构建体还包含启动子的5'的ITR和多聚A的3'的ITR。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74。

[0033] 在另一个方面,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体包含这样的核苷酸序列:所述核苷酸序列在SEQ ID NO:8的ITR内并且包括末端,如图15所示。rAAV载体包含5'ITR、MHCK7启动子、嵌合内含子序列、人微小肌营养不良蛋白基因的编码序列、多聚A和3'ITR。在一个实施方案中,载体包含SEQ ID NO:9的核苷酸1-4977。SEQ ID NO:3所示的质粒还包含卡那霉素抗性和具有pBR322复制起点的pGEX质粒骨架。

[0034] 在另一个方面,本发明提供了包含AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体构建体的质粒。在一个实施方案中,质粒包含5'ITR、MHCK7启动子、嵌合内含子序列、人微小肌营养不良蛋白基因的编码序列、多聚A和3'ITR。在一个实施方案中,质粒包含卡那霉素抗性并且任选地包含具有pBR322复制起点的pGEX质粒骨架。在一个特定的实施方案中,质粒如SEQ ID NO:8所示,并且在图14和15中显示。

[0035] 本发明提供了重组AAV载体,所述重组AAV载体包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列。该rAAV载体是AAV血清型AAVrh.74。

[0036] 本发明还提供了rAAV,所述rAAV包含在SEQ ID NO:3中的ITR内并且包括末端的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、在SEQ ID NO:8中的ITR内并且包括末端的核苷酸序列或如SEQ ID NO:9所示的核苷酸序列。该rAAV载体是AAV血清型AAVrh.74。

[0037] 本发明的rAAV载体可以是任何AAV血清型,诸如血清型AAVrh.74、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13。

[0038] 本发明还提供了包含本发明的rAAV载体中的任一者的药物组合物(或者有时在本文中简称为"组合物")。

[0039] 在另一个实施方案中,本发明提供了产生rAAV载体颗粒的方法,所述方法包括培养已经用本发明的任何rAAV载体转染的细胞,以及从所转染的细胞的上清液回收rAAV颗粒。本发明还提供了包含本发明的重组AAV载体中的任一者的病毒颗粒。

[0040] 在治疗肌营养不良的方法中的任一者中,在施用rAAV后,受试者的细胞中的微小肌营养不良蛋白基因表达的水平增加。在施用rAAV之前和之后,通过活检肌肉中的蛋白质印迹来测量微小肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白基因在细胞中的表达。具体而言,与施用rAAV前的微小肌营养不良蛋白的水平相比,在施用rAAV后,微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70%至至少约80%、或至少约70%至至少约90%、或至少约80%至至少约90%。例如,与施用rAAV前的微小肌营养不良蛋白的水平相比,在施用rAAV后,微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%。

[0041] 此外,通过在施用rAAV之前和之后肌肉活检中的免疫组织化学来测量微小肌营养

不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白基因在细胞中的表达。与施用rAAV前的微小肌营养不良蛋白的水平相比,在施用rAAV后,微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70%至至少约80%、或至少约70%至至少约90%、或至少约80%至至少约90%。例如,与施用rAAV前的微小肌营养不良蛋白的水平相比,在施用rAAV后,微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%。

[0042] 在治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后,受试者的血清CK水平降低。例如,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约65%至约90%、或约65%至约95%、或约75%至约90%、或约80%至约90%、或约85%至约95%、或约87%至约95%、或约87%至约90%。具体而言,在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约87%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约72%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约73%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约78%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约95%。在治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量相比,在施用rAAV后,受试者的肌肉组织中的微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量增加。例如,在施用rAAV之前和之后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量微小肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量。

[0043] 在治疗肌营养不良的方法中的任一者中,rAAV的施用使DAPC蛋白(诸如α-肌聚糖或β-肌聚糖)的表达上调。例如,与施用rAAV前的α-肌聚糖的水平相比,在施用rAAV后,受试者中的α-肌聚糖的水平增加。此外,与施用rAAV前的β-肌聚糖的水平相比,在施用rAAV后,受试者中的β-肌聚糖的水平增加。在施用rAAV之前和之后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量α-肌聚糖或β-肌聚糖蛋白水平,从而检测α-肌聚糖或β-肌聚糖的水平。

[0044] 在治疗肌营养不良的方法中的任一者中,在施用rAAV后,受试者的疾病进展延迟,如通过以下测试中的任一者来测量:六分钟步行测试、起立时间、上升4梯、上升和下降4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、10米计时测试、100米计时测试、手持式肌力测定(HHD)、计时起立-行走和/或大幅运动子测试量表(Bayley-III)分数。

[0045] 例如,在任何方法中,与施用rAAV前的NSAA得分相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的NSAA得分具有至少6分的改善。此外,在任何方法中,与施用rAAV前的起立时间相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的起立时间具有至少约0.8秒的改善。此外,在任何方法中,与施用rAAV前的上升4梯的时间测试相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的上升4梯的时间测试具有至少约1.2秒的改善。此外,在任何方法中,与施用rAAV前的100m计时测试相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的100m计时测试具有至少约7秒的改善。

[0046] 在另一个实施方案中,本发明提供了在患者细胞中表达微小肌营养不良蛋白基因的方法,所述方法包括将SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于所述患者。例如,在施用rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体之前和之后,通过肌肉活检中的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量微小肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白基因在患者细胞中的表达。此外,通过检测更多的每个细胞核的载体基因组的数量来测量患者中的微小肌营养不良蛋白基因的表达,其中每个细胞核1个载体基因组为约50%的微小肌营养不良蛋白表达,并且每个细胞核大于1个拷贝与微小肌营养不良蛋白表达水平一致。例如,细胞具有每个细胞核1.2个载体拷贝、或每个细胞核1.3个载体拷贝、或每个细胞核1.4个载体拷贝、或每个细胞核1.5个载体拷贝、或每个细胞核1.6个载体拷贝、或每个细胞核1.7个载体拷贝、或每个细胞核1.8个载体拷贝、或每个细胞核1.9个载体拷贝。

[0047] 在另一个实施方案中,本发明提供了减少有需要的患者的血清CK水平的方法,所述方法包括将SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于所述患者。例如,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,患者中的血清CK水平降低至少约65%至约90%、或约65%至约95%、或约75%至约90%、或约80%至约90%、或约85%至约95%、或约87%至约95%、或约87%至约90%。具体而言,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约87%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约72%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约73%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约78%,或者在本发明的治疗肌营养不良的方法中的任一者中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后60天,受试者的血清CK水平降低约95%。

[0048] 本发明还提供了增加患者肌肉组织中的微小肌营养不良蛋白阳性纤维的方法,所述方法包括将SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于所述患者。例如,在施用rAAV之前和之后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量。此外,通过检测更多的每个细胞核的载体基因组的数量来测量患者中的微小肌营养不良蛋白基因的表达,其中每个细胞核1个载体基因组为约50%的微小肌营养不良蛋白表达,并且每个细胞核大于1个拷贝与微小肌营养不良蛋白表达水平一致。例如,细胞具有每个细胞核1.2个载体拷贝、或每个细胞核1.3个载体拷贝、或每个细胞核1.4个载体拷贝、或每个细胞核1.5个载体拷贝、或每个细胞核1.6个载体拷贝、或每个细胞核1.7个载体拷贝、或每个细胞核1.8个载体拷贝、或每个细胞核1.9个载体拷贝。

[0049] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加有需要的患者中的α-肌聚糖的表达的方法,所述方法包括将SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序

列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于所述患者。例如,在施用rAAV之前和之后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量α-肌聚糖蛋白水平,从而检测α-肌聚糖的水平。

[0050] 此外,本发明提供了增加有需要的患者中的β-肌聚糖的表达的方法,所述方法包括将SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于所述患者。例如,在施用rAAV之前和之后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量β-肌聚糖蛋白水平,从而检测β-肌聚糖的水平。

[0051] 本发明还提供了治疗患有杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的患者的方法,所述方法包括将SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于所述患者,以使得所述患者的疾病进展延迟,如通过以下测试中的任一者来测量:六分钟步行测试、起立时间、上升4梯、上升和下降4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、10米计时测试、100米计时测试、手持式肌力测定(HHD)、计时起立-行走和/或大幅运动子测试量表(Bayley-III)分数。

[0052] 例如,在任何方法中,与施用rAAV前的NSAA得分相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的NSAA得分具有至少6分的改善。此外,在任何方法中,与施用rAAV前的起立时间相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的起立时间具有至少约0.8秒的改善。此外,在任何方法中,与施用rAAV前的上升4梯的时间测试相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的上升4梯的时间测试具有至少约1.2秒的改善。此外,在任何方法中,与施用rAAV前的100m计时测试相比,在施用rAAV后至少270天,受试者的100m计时测试具有至少约7秒的改善。

[0053] “纤维化”是指胞外基质(ECM)组分的过多或不受控制的沉积以及受伤后组织(包括骨骼肌、心肌、肝、肺、肾和胰腺)的异常修复过程。沉积的ECM组分包括纤连蛋白和胶原蛋白(例如胶原蛋白1、胶原蛋白2或胶原蛋白3)。

[0054] 本发明还提供了减少或预防患有肌营养不良的受试者的纤维化的方法,所述方法包括施用治疗有效量的rAAV或rAAV载体,所述rAAV包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列;所述rAAV载体包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在另一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在另一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5066的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在又一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0055] 在另一个实施方案中,本发明提供了预防有需要的受试者的纤维化的方法,所述方法包括施用治疗有效量的SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID

NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列;或rAAV载体,所述rAAV载体包含SEQ ID NO:9的AAV74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。例如,本发明的rAAV中的任一者可以被施用于患有肌营养不良的受试者,以预防纤维化,例如在受试者中观察到纤维化前,本发明的rAAV表达所施用的人微小肌营养不良蛋白。此外,表达人微小肌营养不良蛋白基因的本发明的rAAV可以被施用于具有患上纤维化的风险的受试者,诸如患有或被诊断为肌营养不良(例如DMD)的那些受试者。本发明的rAAV可以被施用于患有肌营养不良的受试者,以预防这些受试者的新的纤维化。

[0056] 本发明设想了在受试者中观察到纤维化前施用rAAV。此外,rAAV可以被施用于具有患上纤维化的风险的受试者,诸如患有或被诊断为肌营养不良(例如DMD)的那些受试者。rAAV可以被施用于已发展为纤维化的患有肌营养不良的受试者,以预防这些受试者的新的纤维化。

[0057] 本发明还提供了增加患有肌营养不良的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量的方法,所述方法包括施用治疗有效量的SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列;或rAAV,所述rAAV包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸的56-5022。

[0058] 本发明设想了在受试者中观察到纤维化前、或在肌肉力量减少前、或在肌肉质量减少前,将rAAV载体施用于被诊断为DMD的受试者。

[0059] 本发明还设想了将SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列;或rAAV,所述rAAV包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于已发展为纤维化的患有肌营养不良的受试者,以预防这些受试者的新的纤维化或减少这些受试者的纤维化。本发明还提供了将SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列;或rAAV载体,所述rAAV载体包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022施用于肌肉力量已减少或肌肉质量已减少的患有肌营养不良的受试者,以保护肌肉免受进一步损伤。

[0060] 在本发明的方法中的任一者中,受试者可以患有肌营养不良(诸如DMD)或任何其肌营养不良蛋白相关的肌营养不良。

[0061] 在本文所述的发明的方法中的任一者的其他实施方案中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在施用rAAV后,受试者的血清CK水平降低选自由以下各项组成的组的百分比水平:

[0062] a)在施用后90、180或270天至少78%;

[0063] b)在施用后270天至少46%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%或85%;

[0064] c)在施用后180天至少72%、73%、74%或95%;

[0065] d)在施用后90天至少87%、88%、93%或95%;

[0066] e)在施用后270天至少70%;

[0067] f)在施用后90、180或270天70%至95%;

[0068] g)在施用后90、180或270天至少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%或95%;以及

[0069] h)在施用后90、180或270天至少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%或95%。

[0070] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗有需要的人受试者的肌营养不良的组合物,其中所述组合物包含一定剂量的重组腺病毒(rAAV)相关rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白,其中所述组合物被配制用于全身性施用途径,并且rAAV的剂量为约1×10^{14}vg/kg至约4×10^{14}vg/kg。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0071] 例如,本发明的组合物包含约5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约5.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约2.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{13}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或1.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至1.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约5.0×10^{13}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约5.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约6.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或5.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约5.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约6.0×10^{14}vg/kg、或5.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约6.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约5.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约4.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约1.25×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约1.25×10^{14}vg/kg至4.0×10^{14}、或约1.25×10^{14}vg/kg至1.0×10^{15}、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约2.75×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或1.25×10^{14}vg/kg至约$3.75\times$

10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或1.5×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约1.5×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约1.5×10^{14}vg/kg至4.0×10^{14}、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.25×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约2.75×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或1.75×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约1.75×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约1.75×10^{14}vg/kg至4.0×10^{14}、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.25×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.75×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.25×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至1.0×10^{15}、或约2.0×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约2.0×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约2.0×10^{14}vg/kg至约4.0×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至约3.25×10^{14}vg/kg的剂量的rAAV。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的组合物被配制用于静脉内施用,并且包含约2.0×10^{14}vg/kg的剂量的rAAV。在另一个实施方案中,本发明的组合物被配制用于静脉内施用,并且包含约5.0×10^{12}vg/kg、或约6.0×10^{12}vg/kg、或约7.0×10^{12}vg/kg、或约8.0×10^{12}vg/kg、或约9.0×10^{12}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg、或约1.25×10^{13}vg/kg、或约1.5×10^{13}vg/kg、或约1.75×10^{13}vg/kg、或约2.25×10^{13}vg/kg、或约2.5×10^{13}vg/kg、或约2.75×10^{13}vg/kg、或约3.0×10^{13}vg/kg、或约3.25×10^{13}vg/kg、或约3.5×10^{13}vg/kg、或约3.75×10^{13}vg/kg、或约4.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg、或约6.0×10^{13}vg/kg、或约7.0×10^{13}vg/kg、或约8.0×10^{13}vg/kg、或约9.0×10^{13}vg/kg、或约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg、或约2.25×10^{14}vg/kg、或约2.5×10^{14}vg/kg、或约2.75×10^{14}vg/kg、或约3.0×10^{14}vg/kg、或约3.25×10^{14}vg/kg、或约3.5×10^{14}vg/kg、或约3.75×10^{14}vg/kg、或约4.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{14}vg/kg、或约6.0×10^{14}vg/kg、或约1×10^{15}的剂量的rAAV。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在另一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0073] 在本发明的组合物中的任一者中,rAAV的剂量以约5mL/kg至约15mL/kg、或约8mL/kg至约12mL/kg、或8mL/kg至约10mL/kg、或5mL/kg至约10mL/kg、或约10mL/kg至12mL/kg、或

约10mL/kg至15mL/kg、或10mL/kg至约20mL/kg递送。在一个特定实施方案中,组合物包含以约10mL/kg递送的rAAV的剂量。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在另一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0074] 本发明的组合物被配制用于通过注射、输注或移植来施用。例如,组合物被配制用于通过经大约一小时的输注来施用。此外,本发明的组合物被配制用于通过外周肢静脉(诸如,外周臂静脉或外周腿静脉)来静脉内施用。或者,输注可以经大约30分钟、或大约1.5小时、或大约2小时、或大约2.5小时、或大约3小时施用。

[0075] 本发明的组合物中的任一者包含rAAV或rAAV载体,所述rAAV包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子序列,所述rAAV载体包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。

[0076] 具体而言,本发明的组合物用于治疗杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良。例如,本发明提供了用于治疗有需要的人受试者的杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的组合物,其中所述组合物包含一定剂量的重组腺病毒(rAAV)相关rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白,其中所述组合物被配制用于通过经大约一小时的静脉内输注来施用,并且所施用rAAV的剂量为约2×10^{14}vg/kg,并且其中rAAV包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。

[0077] 在另一个实施方案中,本发明还提供了包含rAAV的组合物,所述组合物用于减少有需要的受试者的纤维化。此外,本发明提供了包含rAAV载体的组合物,所述组合物用于预防患有肌营养不良的受试者的纤维化。

[0078] 本发明还提供了包含rAAV的组合物,所述组合物用于增加患有肌营养不良的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量。在另一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的rAAV中的任一者的组合物,所述组合物用于治疗肌营养不良。

[0079] 在本发明的组合物中的任一者的其他实施方案中,与施用组合物前的血清CK水平相比,在所述组合物施用于需要治疗肌营养不良的人受试者后,受试者的血清CK水平降低选自由以下各项组成的组的百分比水平:

[0080] a)在施用后90、180或270天至少78%;

[0081] b)在施用后270天至少46%、55%、70%或85%;

[0082] c)在施用后180天至少72%、73%、74%或95%;

[0083] d)在施用后90天至少87%、99%、93%或95%;

[0084] e)在施用后270天至少70%;

[0085] f)在施用后90、180或270天70%至95%;

[0086] g)在施用后90、180或270天至少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％或95％;以及

[0087] h)在施用后90、180或270天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％或95％。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明提供了一定剂量的重组腺病毒(rAAV)相关rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白用于制备用来治疗有需要的人受试者的肌营养不良的药物的用途,其中所述药物被配制用于全身性施用途径,并且rAAV的剂量为约1×10^{14}vg/kg至约4×101^{4}vg/kg。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0089] 例如,药物包含约5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约5.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约2.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{12}vg/kg至约1.0×10^{13}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或1.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至1.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约5.0×10^{13}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约5.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg至约6.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或5.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约5.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg至约6.0×10^{14}vg/kg、或5.0×10^{13}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约6.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约5.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约4.0×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.0×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或1.0×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约1.25×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约1.25×10^{14}vg/kg至4.0×10^{14}、或约1.25×10^{14}vg/kg至1.0×10^{15}、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约2.75×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或1.25×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或1.5×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约1.5×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约1.5×10^{14}vg/kg至4.0×10^{14}、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.25×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约2.75×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约$2.5\times$

10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或1.75×10^{14}vg/kg至约1.0×10^{15}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约1.75×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约1.75×10^{14}vg/kg至4.0×10^{14}、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.25×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约3.0×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.75×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.25×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg至约2.0×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至1.0×10^{15}、或约2.0×10^{14}vg/kg至6.0×10^{14}、或约2.0×10^{14}vg/kg至5.0×10^{14}、或约2.0×10^{14}vg/kg至约4.0×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至约3.75×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至约3.5×10^{14}vg/kg、或约2.0×10^{14}vg/kg至约3.25×10^{14}vg/kg的剂量的rAAV。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0090] 在一个实施方案中,本发明的药物被配制用于一定剂量的rAAV的全身性施用,其中所述全身性施用途径是静脉内途径,并且所施用的rAAV的剂量为约2.0×10^{14}vg/kg。在另一个实施方案中,本发明的药物被配制用于一定剂量的rAAV的全身性施用,其中所述全身性施用途径是静脉内途径,并且rAAV的剂量为约5.0×10^{12}vg/kg、或约6.0×10^{12}vg/kg、或约7.0×10^{12}vg/kg、或约8.0×10^{12}vg/kg、或约9.0×10^{12}vg/kg、或约1.0×10^{13}vg/kg、或约1.25×10^{13}vg/kg、或约1.5×10^{13}vg/kg、或约1.75×10^{13}vg/kg、或约2.25×10^{13}vg/kg、或约2.5×10^{13}vg/kg、或约2.75×10^{13}vg/kg、或约3.0×10^{13}vg/kg、或约3.25×10^{13}vg/kg、或约3.5×10^{13}vg/kg、或约3.75×10^{13}vg/kg、或约4.0×10^{13}vg/kg、或约5.0×10^{13}vg/kg、或约6.0×10^{13}vg/kg、或约7.0×10^{13}vg/kg、或约8.0×10^{13}vg/kg、或约9.0×10^{13}vg/kg、或约1.0×10^{14}vg/kg、或约1.25×10^{14}vg/kg、或约1.5×10^{14}vg/kg、或约1.75×10^{14}vg/kg、或约2.25×10^{14}vg/kg、或约2.5×10^{14}vg/kg、或约2.75×10^{14}vg/kg、或约3.0×10^{14}vg/kg、或约3.25×10^{14}vg/kg、或约3.5×10^{14}vg/kg、或约3.75×10^{14}vg/kg、或约4.0×10^{14}vg/kg、或约5.0×10^{14}vg/kg、或约6.0×10^{14}vg/kg、或约1×10^{15}vg/kg。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0091] 在本发明的用途中的任一者中,药物包含约5mL/kg至约15mL/kg、或约8mL/kg至约12mL/kg、或8mL/kg至约10mL/kg、或5mL/kg至约10mL/kg、或约10mL/kg至12mL/k、或约10mL/kg至15mL/kg、或10mL/kg至约20mL/kg的剂量的rAAV。在一个特定实施方案中,剂量或rAAV为约10mL/kg。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID

NO:6的核苷酸56-5022。在一个实施方案中,rAAV是AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。在一个实施方案中,AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白是SEQ ID NO:5的核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白。

[0092] 在本发明的用途中的任一者中,药物被配制用于通过注射、注或移植来施用。例如,药物被配制用于通过经大约一小时的输注来施用。此外,药物被配制用于通过外周肢静脉(诸如,外周臂静脉或外周腿静脉)来静脉内施用。或者,输注可以经大约30分钟、或大约1.5小时、或大约2小时、或大约2.5小时、或大约3小时施用。

[0093] 在本发明的用途中的任一者中,药物包含rAAV,所述rAAV包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子序列、或SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。

[0094] 本发明的特定用途是制备用治疗杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的药物。例如,本发明提供了一定剂量的重组腺病毒(rAAV)相关rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白用于制备用来治疗有需要的人受试者的杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的药物的用途,其中所述药物被配制用于通过经大约一小时的静脉内输注来施用,并且所施用的rAAV的剂量为约2×10^{14}vg/kg,并且其中rAAV包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。

[0095] 在另一个实施方案中,本发明提供了rAAV用于制备用来减少有需要的受试者的纤维化的药物的用途。例如,有需要的受试者可以患有肌营养不良(诸如DMD)或任何其他肌营养不良蛋白相关的肌营养不良。

[0096] 在另一个实施方案中,本发明提供了rAAV用于制备用来预防患有肌营养不良的受试者的纤维化的药物的用途。

[0097] 此外,本发明提供了rAAV用于制备用来增加患有肌营养不良的受试者的肌肉力量和/或肌肉质量的药物的用途。

[0098] 本发明还提供了rAAV用于制备用来治疗肌营养不良的药物的用途。

[0099] 本发明提供了rAAV载体用于制备用来治疗肌营养不良的药物的用途:所述rAAV载体包含SEQ ID NO:1的人微小肌营养不良蛋白核苷酸序列和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的MHCK7启动子核苷酸序列,或者rAAV载体用于治疗肌营养不良的用途:所述rAAV载包含SEQ ID NO:9的AAVrf74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。

[0100] 在本发明的用途中的任一者的其他实施方案中,与施用rAAV前的血清CK水平相比,在rAAV施用于受试者后,受试者血清CK水平降低选自由以下各项组成的组的百分比水平:

[0101] a)在施用后90、180或270天至少78%;

[0102] b)在施用后270天至少46%、55%、70%或95%;

[0103] c)在施用后180天至少72%、73%、74%或95%;

[0104] d)在施用后90天至少87%、88%、93%或95%;

[0105] e)在施用后270天至少70%;

[0106] f)在施用后90、180或270天70％至95％；

[0107] g)在施用后90、180或270天至少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％或95％；以及

[0108] h)在施用后90、180或270天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％或95％。

[0109] 在用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者中，在所述组合物或药物的施用后，受试者的细胞中的微小肌营养不良蛋白基因表达的水平增加。在所述组合物或药物的施用前和施用后，通过活检肌肉中的蛋白质印迹来测量微小肌营养不良蛋白水平，从而检测微小肌营养不良蛋白基因在细胞中的表达。具体而言，与所述组合物或药物的施用前微小肌营养不良蛋白的水平相比，在所述组合物或药物的施用后，微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70％至至少约80％、或至少约70％至至少约90％、或至少约80％至至少约90％。例如，与所述组合物或药物的施用前微小肌营养不良蛋白的水平相比，在所述组合物的施用后，微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70％、或至少约71％、或至少约72％、或至少约73％、或至少约74％、或至少约75％、或至少约76％、或至少约77％、或至少约78％、或至少约79％、或至少约80％、或至少约81％、或至少约82％、或至少约83％、或至少约84％、或至少约85％。

[0110] 此外，通过在所述组合物或药物的施用前和施用后肌肉活检中的免疫组织化学来测量微小肌营养不良蛋白水平，从而检测微小肌营养不良蛋白基因在细胞中的表达。与所述组合物或药物的施用前微小肌营养不良蛋白的水平相比，在施用rAAV后，微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70％至至少约80％、或至少约70％至至少约90％、或至少约80％至至少约90％。例如，与所述组合物或药物的施用前微小肌营养不良蛋白的水平相比，在所述组合物或药物的施用后，微小肌营养不良蛋白的水平增加至少约70％、或至少约71％、或至少约72％、或至少约73％、或至少约74％、或至少约75％、或至少约76％、或至少约77％、或至少约78％、或至少约79％、或至少约80％、或至少约81％、或至少约82％、或至少约83％、或至少约84％、或至少约85％。

[0111] 在用于治疗肌营养不良的组合物中的任一者中，与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比，在施用rAAV后，受试者的血清CK水平降低。例如，与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比，在所述组合物或药物的施用后60天，受试者的血清CK水平降低约65％至约90％、或约65％至约95％、或约75％至约90％、或约80％至约90％、或约85％至约95％、或约87％至约95％、或约87％至约90％。具体而言，在用于治疗本发明的肌营养不良的组合物中的任一者中，与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比，在所述组合物或药物的施用后60天，受试者的血清CK水平降低约87％，或者在本发明的用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者中，与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比，在所述组合物或药物的施用后60天，受试者的血清CK水平降低约72％，或者在用于治疗本发明的肌营养不良的组合物中的任一者中，与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比，在所述组合物或药物的施用后60天，受试者的血清CK水平降低约73％，或者在本发明的用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用

途中的任一者中,与施用所述组合物前的血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天,受试者的血清CK水平降低约78%,或者在本发明的用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者中,与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天,受试者的血清CK水平降低约95%。在用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者中,与所述组合物或药物的施用前微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量相比,在所述组合物或药物的施用后,受试者的肌肉组织中的微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量增加。例如,在所述组合物或药物的施用前和施用后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量微小肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量。

[0112] 在用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者中,所述组合物或药物的施用使DAPC蛋白(诸如α-肌聚糖或β-肌聚糖)的表达上调。例如,与所述组合物或药物的施用前α-肌聚糖的水平相比,在所述组合物或药物的施用后,受试者中的α-肌聚糖的水平增加。此外,与所述组合物或药物的施用前β-肌聚糖的水平相比,在所述组合物或药物的施用后,受试者中的β-肌聚糖的水平增加。在所述组合物或药物的施用前和施用后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量α-肌聚糖或β-肌聚糖蛋白水平,从而检测α-肌聚糖或β-肌聚糖的水平。

[0113] 在用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者中,在所述组合物或药物的施用后,受试者的疾病进展延迟,如通过以下测试中的任一者来测量:六分钟步行测试、起立时间、上升4梯、上升和下降4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、10米计时测试、100米计时测试、手持式肌力测定(HHD)、计时起立-行走和/或大幅运动子测试量表(Bayley-III)分数。

[0114] 例如,在用于治疗肌营养不良的组合物或用于治疗肌营养不良的药物的用途中的任一者的施用后,与施用rAAV前的NSAA得分相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的NSAA得分具有至少6分的改善。此外,在任何方法中,与所述组合物或药物的施用前起立时间相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的起立时间具有至少约0.8秒的改善。此外,在本发明的方法或用途中的任一者中,与所述组合物或药物的施用前上升4梯的时间测试相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的上升4梯的时间的测试具有至少约1.2秒的改善。此外,在本发明的方法或用途中的任一者中,与所述组合物或药物的施用前100m计时测试相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的100m计时测试具有至少约7秒的改善。

[0115] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于在患者细胞中表达微小肌营养不良蛋白基因的组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。在另一个实施方案中,本发明提供了使用一定剂量的SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022来制备在患者细胞中表达微小肌营养不良蛋白基因的药物的用途。例如,在施用rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体之前和之后,通过肌肉活检中的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量微小肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白基因在患者细胞中的表达。此外,通过检测更多

的每个细胞核的载体基因组的数量来测量患者中的微小肌营养不良蛋白基因的表达,其中每个细胞核1个载体基因组为约50%的微小肌营养不良蛋白表达,并且每个细胞核大于1个拷贝与微小肌营养不良蛋白表达水平一致。例如,细胞具有每个细胞核1.2个载体拷贝、或每个细胞核1.3个载体拷贝、或每个细胞核1.4个载体拷贝、或每个细胞核1.5个载体拷贝、或每个细胞核1.6个载体拷贝、或每个细胞核1.7个载体拷贝、或每个细胞核1.8个载体拷贝、或每个细胞核1.9个载体拷贝。

[0116] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于减少有需要的患者的血清CK水平的组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。此外,本发明提供了使用一定剂量的SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022来制备降低有需要的患者中的血清CK水平的药物的用途。例如,与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天,患者中的血清CK水平降低至少约65%至约90%、或约65%至约95%、或约75%至约90%、或约80%至约90%、或约85%至约95%、或约87%至约95%、或约87%至约90%。具体而言,受试者的血清CK水平,与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天减少约87%,或者与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天减少约72%,或者与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天减少约73%,或者与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天减少约78%,或者与所述组合物或药物的施用前血清CK水平相比,在所述组合物或药物的施用后60天减少约95%。

[0117] 本发明还提供了用于增加患者肌肉组织中的微小肌营养不良蛋白阳性纤维的组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。此外,本发明提供了使用一定剂量的SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022来制备增加患者肌肉组织中的微小肌营养不良蛋白阳性纤维的药物的用途。例如,在所述组合物或药物的施用前和施用后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量肌营养不良蛋白水平,从而检测微小肌营养不良蛋白阳性纤维的数量。此外,通过检测更多的每个细胞核的载体基因组的数量来测量患者中的微小肌营养不良蛋白基因的表达,其中每个细胞核1个载体基因组为约50%的微小肌营养不良蛋白表达,并且每个细胞核大于1个拷贝与微小肌营养不良蛋白表达水平一致。例如,细胞具有每个细胞核1.2个载体拷贝、或每个细胞核1.3个载体拷贝、或每个细胞核1.4个载体拷贝、或每个细胞核1.5个载体拷贝、或每个细胞核1.6个载体拷贝、或每个细胞核1.7个载体拷贝、或每个细胞核1.8个载体拷贝、或每个细胞核1.9个载体拷贝。

[0118] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于增加有需要的患者中的α-肌聚糖的表达的组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。本发明还提供了使用一定剂量的SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营

养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022来制备增加有需要的患者中的α-肌聚糖的表达的药物的用途。例如,在所述组合物或药物的施用前和施用后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量α-肌聚糖蛋白水平,从而检测α-肌聚糖的水平。

[0119] 此外,本发明提供了用于增加有需要的患者中的β-肌聚糖的表达的组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022。本发明还提供了使用SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022来制备增加有需要的患者中的β-肌聚糖的表达的药物的用途。例如,在所述组合物或药物的施用前和施用后,通过针对肌肉活检的蛋白质印迹或免疫组织化学来测量β-肌聚糖蛋白水平,从而检测β-肌聚糖的水平。

[0120] 本发明还提供了一定剂量的SEQ ID NO:9的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体核苷酸序列、SEQ ID NO:3的核苷酸55-5021、SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977、或SEQ ID NO:6的核苷酸56-5022用于制备用来治疗患有杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的患者的药物,以使得所述药物的施用引起患者的疾病进展延迟的用途,如通过以下测试中的任一者来测量:六分钟步行测试、起立时间、上升4梯、上升和下降4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、10米计时测试、100米计时测试、手持式肌力测定(HHD)、计时起立-行走和/或大幅运动子测试量表(Bayley-III)分数。

[0121] 例如,与所述组合物或药物的施用前NSAA得分相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的NSAA得分具有至少6分的改善。此外,与所述组合物或药物的施用前起立时间相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的起立时间具有至少约0.8秒的改善。此外,与所述组合物或药物的施用前上升4梯的时间测试相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的上升4梯的时间的测试具有至少约1.2秒的改善。此外,与所述组合物或药物的施用前100m计时测试相比,在所述组合物或药物的施用后至少270天,受试者的100m计时测试具有至少约7秒的改善。

附图说明

[0122] 图1展示了rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体。在该构建体中,cDNA表达盒侧接有AAV2反向末端重复序列(ITR)。所述构建体的特征在于框内棒状结构域缺失(R4-R23),而铰链1、2和4(H_1、H_2和H_4)以及富含半胱氨酸的结构域则仍然可以产生138kDa蛋白质。微小肌营养不良蛋白(3579bp)的表达是由MHCK7启动子(795bp)指导的。内含子和5'UTR来源于质粒pCMVβ(Clontech)。微小肌营养不良蛋白盒在ATG起始位密码子前具有一个共有序列Kozak,并且具有一个用于mRNA终止的小型53bp合成多聚A信号。人微小肌营养不良蛋白盒含有(R4-R23/Δ71-78)结构域,如Harper等人(Nature Medicine 8,253-261(2002))此前所述。

[0123] 图2提供了AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的核酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0124] 图3提供了pNLREP2-Caprh74 AAV辅助质粒图。

[0125] 图4提供了Ad辅助质粒pHELP。

[0126] 图5展示了rAAV.MCK.微小肌营养不良蛋白质粒构建体。

[0127] 图6提供了rAAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白的核酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0128] 图7展示了通过免疫细胞化学测量的腓肠肌的肌纤维活检中的微小肌营养不良蛋白基因表达。

[0129] 图8A-8C提供了展示正确分子量的微小肌营养不良蛋白表达的蛋白质印迹。在图8C中,将受试者4的样品(*)1:4稀释(至线性范围),因为在初始分析中ULDQ(>80%)超标,并且相对于正常值,将平均值乘最终值的稀释校正因子。相对于正常值的平均微小肌营养不良蛋白表达在方法1中为182.7%,在方法2中为222.0%。

[0130] 图9A-9C展示了rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用使DAPC蛋白、α-肌聚糖和β-肌聚糖的表达上调。

[0131] 图10展示了在施用rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的情况下,肌酸激酶(CK)的持续显著减少。

[0132] 图11提供了从基线至第270天的平均CK变化。该数据表明,在施用rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白后,CK随时间推移显著减少。

[0133] 图12提供了从基线至第270天的平均NSAA变化和平均CK变化。该数据表明,在施用rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白后,NSAA随时间推移显著增加。

[0134] 图13提供了AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的核酸序列(SEQ ID NO:9)。

[0135] 图14展示了AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白质粒构建体。

[0136] 图15提供了包含卡那霉素抗性基因的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白质粒构建体的核酸序列(SEQ ID NO:8)。

具体实施方式

[0137] 本发明提供了过表达人微小肌营养不良蛋白的基因治疗载体(例如rAAV载体)以及减少和预防肌营养不良患者的纤维化的方法。在DMD诊断的早期采集的肌肉活检样品显示出显著的结缔组织增生。肌肉纤维化以多种方式产生有害影响。它通过结缔组织屏障来减少肌内膜营养物的正常运输,减少血流量,剥夺肌肉的血管源性营养成分,并且在功能上造成了由于肢体挛缩而产生的早期行走能力丧失。随时间推移,由于明显的肌肉纤维化,治疗的挑战也越来越多。这可以在比较连续时间点的结缔组织增生的肌肉活检中观察到。该过程继续加剧,导致行走能力丧失,并且加速失控,尤其是在轮椅依赖性患者中。

[0138] 如果不进行早期治疗(包括减少纤维化的平行方法),就不可能完全实现外显子跳跃、终止密码子通读或基因替代疗法的有益效果。如果不进行减少肌肉纤维化的方法,即使是小分子或蛋白质替代策略也可能会失败。此前对已经纤维化并且用AAV.微小肌营养不良蛋白治疗的老年mdx小鼠的研究表明,我们无法实现完全功能恢复(Liu,M.等人,Mol Ther 11,245-256(2005))。还已知,DMD心肌病的进展伴随着心室壁的瘢痕形成和纤维化。

[0139] 如本文所用,术语“AAV”是腺相关病毒的标准缩写。腺相关病毒是一种单链DNA细小病毒,仅在某些功能由共感染辅助病毒提供的细胞中生长。目前已鉴定出十三种AAV血清型。AAV的一般信息和综述可见于例如Carter,1989,Handbook ofParvoviruses,第1卷,第169-228页和Berns,1990,Virology,第1743-1764页,Raven Press,(New York)。然而,完全可以预期,这些相同的原理也将适用于其他AAV血清型,因为以下事实是熟知的:即使在遗

传水平上,各种血清型在结构和功能上都非常密切相关。(参见,例如Blacklowe,1988,Parvoviruses and Human Disease第165-174页,J.R.Pattison编;和Rose,Comprehensive Virology 3:1-61(1974))。例如,所有AAV血清型都明显表现出由同源rep基因介导的非常相似的复制性质;并且都携带三种相关的衣壳蛋白,诸如在AAV2中表达的那些。异源双链分析进一步表明了相关性程度,所述异源双链分析显示出沿着基因组长度的血清型之间的广泛交叉杂交;并且在对应于"反向末端重复序列"(ITR)的末端存在类似的自退火区段。相似的感染性模式还表明,每种血清型中的复制功能都处于相似的调控性控制下。

[0140] 如本文所用,"AAV载体"是指包含一个或多个侧接有AAV末端重复序列(ITR)的所关注的多核苷酸(或转基因)的载体。当此类AAV载体存在于已经转染有编码和表达rep和cap基因产物的载体的宿主细胞中时,它们可以被复制和包装成感染性病毒颗粒。

[0141] "AAV病毒粒子"或"AAV病毒颗粒"或"AAV载体颗粒"是指由至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳包裹的多核苷酸AAV载体组成的病毒颗粒。如果颗粒包含异源多核苷酸(即,除野生型AAV基因组之外的多核苷酸,诸如将要递送至哺乳动物细胞的转基因),则所述颗粒通常称为"AAV载体颗粒"或简称为"AAV载体"。因此,AAV载体颗粒的产生必然包括AAV载体的产生,因为这种载体包含在AAV载体颗粒内。

[0142] AAV

[0143] 腺相关病毒(AAV)是一种复制缺陷型细小病毒,它的单链DNA基因组的长度为约4.7kb,其中包括145个核苷酸的反向末端重复序列(ITR)。AAV有多种血清型。AAV血清型的基因组的核苷酸序列是已知的。例如,AAV血清型2(AAV2)基因组的核苷酸序列提供于Srivastava等人,J Virol,45:555-564(1983)中,由Ruffing等人,J Gen Virol,75:3385-3392(1994)进行了修改。作为其他实例,AAV-1的完整基因组提供于GenBank登录号NC_002077中;AAV-3的完整基因组提供于GenBank登录号NC_1829中;AAV-4的完整基因组提供于GenBank登录号NC_001829中;AAV-5基因组提供于GenBank登录号AF085716中;AAV-6的完整基因组提供于GenBank登录号NC_001862中;AAV-7和AAV-8基因组的至少一部分分别提供于GenBank登录号AX753246和AX753249中(另外参见涉及AAV-8的美国专利号7,282,199和7,790,449);AAV-9基因组提供于Gao等人,J.Virol.,78:6381-6388(2004)中;AAV-10基因组提供于Mol.Ther.,13(1):67-76(2006)中;并且AAV-11基因组提供于Virology,330(2):375-383(2004)中。AAVrh.74血清型的克隆在Rodino-Klapac等人,Journal oftranslational medicine 5,45(2007)中有所描述。指导病毒DNA复制(rep)的顺式作用序列,衣壳包裹/包装和宿主细胞染色体整合被包含在ITR内。三个AAV启动子(因它们的相对图谱位置而命名为p5、p19和p40)驱动编码rep和cap基因的两个AAV内部开放阅读框的表达。两个rep启动子(p5和p19),与单个AAV内含子的差异剪接(例如,在AAV2核苷酸2107和2227处)结合,从而从rep基因产生四个rep蛋白(rep 78、rep 68、rep 52和rep 40)。Rep蛋白具有多个酶学性质,这些酶学性质最终负责病毒基因组的复制。cap基因从p40启动子表达,它编码三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。可变剪接和非共有翻译起始位点负责三种相关衣壳蛋白的产生。单个共有多腺苷酸化位点定位于AAV基因组的图谱位置95。AAV的生命周期和遗传学在Muzyczka,Current Topics in Microbiology and Immunology,158:97-129(1992)中进行综述。

[0144] AAV具有独特的特征,这些特征使其成为具有吸引力的载体,所述载体用于例如在

基因疗法中将外源DNA递送至细胞。培养物中的细胞的AAV感染是非致细胞病变的,并且人和其他动物的自然感染是沉默和无症状的。此外,AAV感染很多哺乳动物细胞,从而可能在体内靶向很多不同的组织。此外,AAV转导缓慢分裂和不分裂的细胞,并且可以基本上作为转录活性核附加体(染色体外元件)在这些细胞的生命周期中持续存在。AAV前病毒基因组作为质粒中的克隆DNA具有感染性,这使重组基因组的构建成为可能。此外,由于指导AAV复制的信号,基因组衣壳包裹和整合被包含在AAV基因组的ITR内,因此内部大约4.3kb基因组的一部分或全部(编码复制和结构衣壳蛋白,rep-cap)可以被替换为外源DNA,诸如含有启动子的基因盒、所关注的DNA和多腺苷酸化信号。rep和cap蛋白可以以反式提供。AAV的另一个显著特征是它是一种极其稳定和强壮的病毒。它可以轻松承受用于灭活腺病毒的条件(56℃至65℃若干小时),从而使AAV的冷冻保存不再成为关键因素。AAV甚至可以是冻干的。最后,AAV感染的细胞对超感染无耐受性。

[0145] 多项研究表明,重组AAV介导的蛋白质可以在肌肉中长期表达(>1.5年)。参见Clark等人,Hum Gene Ther,8:659-669(1997);Kessler等人,Proc Nat.Acad Sc.USA,93:14082-14087(1996)和Xiao等人,J Virol,70:8098-8108(1996)。另外参见Chao等人,Mol Ther,2:619-623(2000)和Chao等人,Mol Ther,4:217-222(2001)。此外,由于肌肉是高度血管化的,因此在肌肉内注射后,重组AAV转导引起全身循环中出现转基因产物,如Herzog等人,ProcNatlAcadSci USA,94:5804-5809(1997)和Murphy等人,Proc Natl Acad Sci USA,94:13921-13926(1997)所述。此外,Lewis等人,J Virol,76:8769-8775(2002)展示了,骨骼肌纤维具有校正抗体糖基化、折叠和分泌所必需的细胞因子,这表明肌肉能够稳定表达分泌性蛋白质治疗剂。

[0146] 本发明的重组AAV基因组包含本发明的核酸分子和一个或多个侧接核酸分子的AAV ITR。rAAV基因组中的AAV DNA可以来自可以衍生出重组病毒的任何AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAVrh.74、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12和AAV-13。假型rAAV的产生在例如WO 01/83692中有所公开。还设想了其他类型的rAAV变体,例如具有衣壳突变的rAAV。参见例如Marsic等人,Molecular Therapy,22(11):1900-1909(2014)。如以上背景技术部分所述,各种AAV血清型的基因组的核苷酸序列是本领域已知的。为了促进骨骼肌特异性表达,可以使用AAV1、AAV6、AAV8或AAVrh.74。

[0147] 本发明的DNA质粒包含本发明的rAAV基因组。将DNA质粒转移至允许被AAV的辅助病毒(例如,腺病毒、E1缺失的腺病毒或疱疹病毒)感染的细胞,以将rAAV基因组组装成感染性病毒颗粒。产生rAAV颗粒的技术是本领域的标准技术,其中将要包装的AAV基因组、rep和cap基因以及辅助病毒功能元件被提供给细胞。rAAV的产生需要在单个细胞(在本文中称为包装细胞)内提供以下组分:rAAV基因组、与rAAV基因组分离(即不在rAAV基因组中)的AAV rep和cap基因、以及辅助病毒功能元件。AAV rep和cap基因可以来自可以衍生出重组病毒的任何AAV血清型,并且可以来自与rAAV基因组ITR不同的AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAVrh.74、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12和AAV-13。假型rAAV的产生在例如WO 01/83692中有所公开,该公开以引用的方式整体并入本文。

[0148] 产生包装细胞的方法是产生稳定表达用于AAV颗粒产生的所有必要组分的细胞

系。例如,将包含缺乏AAV rep和cap基因的rAAV基因组、与rAAV基因组分离的AAV rep和cap基因以及选择性标记(诸如新霉素抗性基因)的质粒(或多个质粒)整合进细胞的基因组。AAV基因组已经通过诸如GC加尾法(Samulski等人,1982,Proc.Natl.Acad.S6.USA,79:2077-2081),添加含有限制性核酸内切酶切割位点的合成接头(Laughlin等人,1983,Gene,23:65-73)的程序,或者通过直接平端连接(Senapathy&Carter,1984,J.Biol.Chem.,259:4661-4666)引入细菌质粒中。然后用辅助病毒(诸如腺病毒)感染包装细胞系。该方法的优点是,细胞是可选择的,并且适用于rAAV的大规模产生。合适方法的其他实例采用腺病毒或杆状病毒而不是质粒,以将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入包装细胞中。

[0149] rAAV产生的一般原理在例如Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,1533-539;和Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial.and Immunol.,158:97-129中有所综述。各种方法在Ratschin等人,Mol.Cell.Biol.4:2072(1984);Hermonat等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6466(1984);Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.5:3251(1985);McLaughlin等人,J.Virol.,62:1963(1988);和Lebkowski等人,Mol.Cell.Biol.,7:349(1988)。Samulski等人,J.Virol.,63:3822-3828(1989);美国专利No.5,173,414;WO 95/13365和对应的美国专利No.5,658.776;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441(PCT/US96/14423);WO 97/08298(PCT/US96/13872);WO 97/21825(PCT/US96/20777);WO 97/06243(PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin等人Vaccine 13:1244-1250(1995);Paul等人Human Gene Therapy 4:609-615(1993);Clark等人Gene Therapy 3:1124-1132(1996);美国专利号5,786,211;美国专利号5,871,982;和美国专利号6,258,595中有所描述。前述文档据此以引用的方式整体并入本文,特别需要强调的是文档中涉及rAAV产生的那些部分。

[0150] 因此,本发明提供了产生感染性rAAV的包装细胞。在一个实施方案中,包装细胞可以是稳定转化的癌细胞,诸如HeLa细胞、293细胞和PerC.6细胞(同源293细胞系)。在另一个实施方案中,包装细胞是未转化的癌细胞,诸如低传代293细胞(用腺病毒的E1转化的人胚胎肾细胞)、MRC-5细胞(人胚胎成纤维细胞)、WI-38细胞(人胚胎成纤维细胞)、Vero细胞(猴肾细胞)和FRhL-2细胞(恒河猴胚胎肺细胞)。

[0151] 本发明的重组AAV(即,感染性衣壳包裹的rAAV颗粒)包含rAAV基因组。在示例性实施方案中,两种rAAV的基因组均缺乏AAV rep和cap DNA,也就是说,在基因组的ITR之间不存在AAV rep或cap DNA。可以被构建为包含本发明的核酸分子的rAAV的实例在国际专利申请号PCT/US2012/047999(WO 2013/016352)中示出,该专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0152] 在一个示例性实施方案中,通过三重转染方法(Xiao等人,J Virol 72,2224-2232(1998))使用AAV载体质粒rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、pNLRep2-Caprh74和pHelp来产生本发明的重组AAV载体,rAAV含有侧接有AAV2反向末端重复序列(ITR)的微小肌营养不良蛋白基因表达盒。该序列被衣壳包裹成AAVrh74病毒粒子。所述质粒含有微小肌营养不良蛋白序列以及驱动基因表达的肌肉特异性启动子的MHCK7增强子和核心启动子元件。所述表达盒还含有SV40内含子(SD/SA)以促进高水平基因表达,并且牛生长激素多腺苷酸化信号用于有效转录终止。

[0153] pNLREP2-Caprh74是AAV辅助质粒,它编码来自血清型rh74的4种野生型AAV2 rep

蛋白和3种野生型AAV VP衣壳蛋白。pNLREP2-Caprh74质粒的示意性图谱如图3所示。

[0154] pHELP腺病毒辅助质粒为11,635bp,并且得自Applied Viromics。所述质粒含有对AAV复制重要的腺病毒基因组的区域,即E2A、E4ORF6和VA RNA(腺病毒E1功能元件由293细胞提供)。该质粒中存在的腺病毒序列仅代表腺病毒基因组的~40%,并且不含有复制关键性顺式元件,诸如腺病毒末端重复序列。所以,预期不会从这种产生系统中产生感染性腺病毒。pHELP质粒的示意性图谱如图4所示。

[0155] rAAV可以通过作为本领域标准的方法(诸如通过柱色谱法或氯化铯梯度法)来纯化。从辅助病毒中纯化rAAV载体的方法是本领域已知的,并且包括在例如Clark等人,Hum.Gene Ther.,10(6):1031-1039(1999);Schenpp and Clark,Methods Mol.Med.,69427-443(2002);美国专利号6,566,118和WO 98/09657中公开的方法。

[0156] 在另一个实施方案中,本发明设想了包含本发明的rAAV的组合物。本发明的组合物包含rAAV和药学上可接受的载剂。所述组合物还可以包含其他成分,诸如稀释剂和佐剂。可接受的载体、稀释剂和佐剂对接受者是无毒的,优选地在所采用的剂量和浓度下是惰性的,并且包括缓冲剂和表面活性剂(诸如普朗尼克(pluronics))。

[0157] 将要在本发明的方法中施用的rAAV的滴定度将根据例如特定的rAAV、施用方式、治疗目标、个体和所靶向的一种或多种细胞类型而变化,并且可以通过作为本领域标准的方法来确定。rAAV的滴定度的范围可以为每毫升约1×10^{6}、约1×10^{7}、约1×10^{8}、约1×10^{9}、约1×10^{10}、约1×10^{11}、约1×10^{12}、约1×10^{13}至约1×10^{14}或更多个DNA酶耐受性颗粒(DRP)。剂量也可以以病毒基因组(vg)为单位表示。确定衣壳包裹的载体基因组滴定度的一种示例性方法使用定量PCR,诸如(Pozsgai等人,Mol.Ther.25(4):855-869,2017)中描述的方法。

[0158] 本发明设想了在体内或体外用rAAV来转导靶细胞的方法。体内方法包括将一个有效剂量或多个有效剂量的包含本发明的rAAV的组合物施用于有需要的动物(包括人类)的步骤。如果在障碍/疾病发展前施用所述剂量,则所述施用是预防性的。如果在障碍/疾病发展后施用所述剂量,则所述施用是治疗性的。在本发明的实施方案中,有效剂量是减轻(消除或减少)与所治疗的障碍/疾病状态相关的至少一种症状、减慢或预防进展为障碍/疾病状态、减慢或预防障碍/疾病状态的进展、减少疾病的程度、引起疾病的缓解(部分或全部)、和/或延长存活期的剂量。所设想的用本发明的方法来预防或治疗的疾病的实例是DMD。

[0159] 本发明还设想了组合疗法。本文所用的组合包括同时治疗和顺序治疗二者。特别设想了本发明的方法与标准药物治疗(例如,皮质类固醇)的组合,正如与新疗法的组合那样。

[0160] 有效剂量的组合物的施用可以通过作为本领域标准的途径来进行,包括但不限于肌肉内、肠胃外、静脉内、口服、面颊、鼻、肺、颅内、骨内、眼内、直肠或阴道途径。考虑到所治疗的感染和/或疾病状态以及将要表达微小肌营养不良蛋白的靶细胞/一种或多种组织,本领域的技术人员可以选择和/或匹配本发明的rAAV的AAV组件(尤其是,AAV ITR和衣壳蛋白)的一个或多个施用途径和一种或多种血清型。

[0161] 本发明提供了有效剂量的rAAV和本发明的组合物的局部施用和全身性施用。例如,全身性施用是施用于循环系统,从而影响整体身体。全身性施用包括肠内施用(诸如通过胃肠道吸收)和肠胃外施用(通过注射、输注或移植进行)。

[0162] 具体而言,本发明的rAAV的实际施用可以通过使用将rAAV重组载体运输至动物的

靶组织的任何物理方法来完成。根据本发明的施用包括但不限于注射至肌肉内和注射至血流内。仅将rAAV重悬于磷酸盐缓冲盐水中即展示出足以提供可用于肌肉组织表达的媒介物,并且对于可以与rAAV共施用的载剂或其他组分没有已知限制(虽然在使用rAAV的常规方式中应避免降解DNA的组合物)。可以修饰rAAV的衣壳蛋白,从而使rAAV靶向所关注的特定靶组织,诸如肌肉。参见例如WO 02/053703,该公开的公开内容以引用的方式并入本文。药物组合物可以制备为通过透皮运输递送至肌肉的注射用制剂或局部制剂。此前开发了用于肌肉内注射和透皮运输的许多制剂,这些制剂可以用于本发明的实践。rAAV可以与任何药学上可接受的载剂一起使用,以便于施用和处理。

[0163] 在本发明的一个实施方案中,本文所述的AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白在含有20mM Tris(pH8.0)、1mM氯化镁($MgCl_2$)、200mM氯化钠(NaCl)和0.001%泊洛沙姆188的缓冲液中配制。

[0164] 将要在本文公开的方法中施用的rAAV的剂量将根据例如特定的rAAV、施用方式、治疗目标、个体和所靶向的一种或多种细胞类型而变化,并且可以通过作为本领域标准的方法来确定。所施用的每种rAAV的滴定度的范围可以为每毫升约1×10^6、约1×10^7、约1×10^8、约1×10^9、约1×10^{10}、约1×10^{11}、约1×10^{12}、约1×10^{13}、约1×10^{14}、约2×10^{14}或至约1×10^{15}或更多个DNA酶耐受性颗粒(DRP)。剂量也可以以病毒基因组(vg)为单位表示(即,分别地1×10^7vg、1×10^8vg、1×10^9vg、1×10^{10}vg、1×10^{11}vg、1×10^{12}vg、1×10^{13}vg、1×10^{14}vg、2×10^{14}vg、1×10^{15}vg)。剂量也可以以病毒基因组(vg)/千克(kg)体重为单位表示(即,分别地1×10^{10}vg/kg、1×10^{11}vg/kg、1×10^{12}vg/kg、1×10^{13}vg/kg、1×10^{14}vg/kg、1.25×10^{14}vg/kg、1.5×10^{14}vg/kg、1.75×10^{14}vg/kg、2.0×10^{14}vg/kg、2.25×10^{14}vg/kg、2.5×10^{14}vg/kg、2.75×10^{14}vg/kg、3.0×10^{14}vg/kg、3.25×10^{14}vg/kg、3.5×10^{14}vg/kg、3.75×10^{14}vg/kg、4.0×10^{14}vg/kg、1×10^{15}vg/kg)。用于滴定AAV的方法在Clark等人,Hum.Gene Ther.,10:1031-1039(1999)中有所描述。

[0165] 具体而言,本发明的rAAV的实际施用可以通过使用将rAAV重组载体运输至动物的靶组织的任何物理方法来完成。根据本发明的施用包括但不限于注射至肌肉内和注射至血流内。仅将rAAV重悬于磷酸盐缓冲盐水中即展示出足以提供可用于肌肉组织表达的媒介物,并且对于可以与rAAV共施用的载剂或其他组分没有已知限制(虽然在使用rAAV的常规方式中应避免降解DNA的组合物)。可以修饰rAAV的衣壳蛋白,从而使rAAV靶向所关注的特定靶组织,诸如肌肉。参见例如WO 02/053703,该公开的公开内容以引用的方式并入本文。药物组合物可以制备为通过透皮运输递送至肌肉的注射用制剂或局部制剂。此前开发了用于肌肉内注射和透皮运输的许多制剂,这些制剂可以用于本发明的实践。rAAV可以与任何药学上可接受的载剂一起使用,以便于施用和处理。

[0166] 为了进行肌肉内注射,可以采用溶于佐剂(诸如芝麻油或花生油)或溶于丙二醇水溶液的溶液,以及无菌水溶液。如果需要,此类水溶液可以是缓冲溶液,并且首先用盐水或葡萄糖对液体稀释剂进行等渗处理。可以通过在水中与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)适当混合来制备作为游离酸(DNA含有酸性磷酸基团)或药理学上可接受的盐的rAAV的溶液。还可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中以及在油中制备rAAV的分散体。在普通储存和使用条件下,这些制备物含有防腐剂,以防止微生物的生长。就此而言,所采用的无菌水性介质均可通过本领域的技术人员熟知的标准技术容易地获得。

[0167] 适用于注射用途的药物载剂、稀释剂或赋形剂包括无菌水溶液或分散体和用于无菌注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末剂。在所有情况下,所述形式均必须是无菌的,并且必须具有易于注射程度的流动性。它在制造和储存条件下必须是稳定的,并且必须能够防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等等)、它们的合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣(诸如卵磷脂),就分散体而言通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。微生物作用的防止可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等)来实现。在很多情况下包含等渗剂(例如糖或氯化钠)将是优选的。注射用组合物的延长吸收可以通过使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0168] 无菌注射用溶液通过将所需量的rAAV掺入具有上文列举的各种其他成分的适当溶剂中,然后根据需要进行过滤灭菌来制备。通常,通过将灭菌活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基本分散介质和上文列举的所需的其他组分。就用于制备无菌注射用溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这些方法从此前的无菌过滤溶液产生活性成分以及任何另外的所期望的成分的粉末。

[0169] 使用rAAV的转导也可以在体外进行。在一个实施方案中,所期望的靶肌肉细胞被从受试者中除去,用rAAV转导并且重新引入受试者中。或者,可以使用同种或异种肌肉细胞,这些细胞不会在受试者中产生不适当的免疫应答。

[0170] 用于将已转导的细胞转导和再转导至受试者中的合适的方法是本领域已知的。在一个实施方案中,可以通过将rAAV与肌肉细胞,例如在适当的培养基中组合,并且使用常规技术(诸如Southern印迹和/或PCR)或通过使用选择性标记来筛选具有所关注的DNA的那些细胞,从而对细胞进行体外转导。然后已转导的细胞可以配制成药物组合物,并且通过各种技术(诸如通过肌肉内、静脉内、皮下和腹膜内注射)或通过使用例如导管注射至平滑肌和心肌来将所述组合物引入受试者中。

[0171] 使用本发明的rAAV对细胞进行的转导的结果是微小肌营养不良蛋白的持续表达。因此,本发明提供了将表达微小肌营养不良蛋白的rAAV施用/递送至动物(优选地人类)的方法。这些方法包括使用本发明的一种或多种rAAV来转导组织(包括但不限于组织(诸如肌肉)、器官(诸如肝和大脑)和腺(诸如唾液腺))。转导可以使用包含组织特异性控制元件的基因盒来进行。例如,本发明的一个实施方案提供了肌肉特异性控制元件指导的肌肉细胞和肌肉组织转导方法,所述肌肉特异性控制元件包括但不限于来源于肌动蛋白和肌球蛋白基因家族,诸如来自myoD基因家族(参见Weintraub等人,Science,251:761-766(1991))、肌细胞特异性增强子结合因子MEF-2(Cserjesi and Olson,Mol Cell Biol 11:4854-4862(1991))的那些肌肉特异性控制元件,来源于人骨骼肌肌动蛋白基因(Muscat等人,Mol Cell Biol,7:4089-4099(1987))、心肌肌动蛋白基因、肌肉肌酸激酶序列元件(参见Johnson等人,Mol Cell Biol,9:3393-3399(1989))和鼠科动物肌酸激酶增强子(mCK)元件的控制元件,来源于骨骼肌快缩肌钙蛋白C基因、慢缩心肌肌钙蛋白C基因和慢缩肌钙蛋白I基因的控制元件:缺氧诱导性核因子(Semenza等人,Proc NatlAcadSci USA,88:5680-5684(1991))、类固醇诱导性元件和启动子(包括糖皮质激素应答元件(GRE))(参见Mader and White,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5603-5607(1993))以及其他控制元件。

[0172] 肌肉组织是用于体内DNA递送的有吸引力的靶标,因为它不是重要器官而且易于获取。本发明设想了来自已转导的肌纤维的微小肌营养不良蛋白的持续表达。

[0173] 所谓“肌肉细胞”或“肌肉组织”意指来源于任何类型的肌肉(例如,骨骼肌和平滑肌,例如来自消化道、膀胱、血管或心脏组织)的细胞或细胞群。此类肌肉细胞可以是分化的或未分化的,诸如成肌细胞、肌细胞、肌管、心肌细胞和成心肌细胞。

[0174] 术语“转导”用于指微小肌营养不良蛋白的编码区至接受者细胞的体内或体外施用/递送,经由本发明的复制缺陷型rAAV引起接受者细胞的微小肌营养不良蛋白表达。

[0175] 因此,本发明提供了将有效剂量(或基本上同时施用的剂量,或间隔一段时间给予的剂量)的编码微小肌营养不良蛋白的rAAV施用于有需要的受试者的方法。

[0176] 以下实施例以说明而非限制方式提供。所描述的数值范围包括每个范围内的每个整数值的端值在内,并且包括最小和最大所述整数的端值在内。

[0177] 实施例

[0178] 实施例1

[0179] A)AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体的产生

[0180] AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白质粒含有侧接有AAV2反向末端重复序列(ITR)的人微小肌营养不良蛋白cDNA表达盒(参见图1)。微小肌营养不良蛋白构建体的特征在于框内棒状结构域缺失(R4-R23),而铰链1、2和4和富含半胱氨酸的结构域仍然可以产生138kDa蛋白质。微小肌营养不良蛋白(3579bp)的表达是由MHCK7启动子(792bp)指导的。所述质粒通过从rAAV.MCK.微小肌营养不良蛋白质粒除去MCK启动子并且插入MHCK7启动子来构建。在核心启动子后,提供了用于有效转录起始的53bp内源性小鼠MCK外显子1(非翻译),然后是SV40晚期16S/19S剪接信号(150bp)和小型5’UTR(61bp)。内含子和5’UTR来源于质粒pCMVβ(Clontech)。微小肌营养不良蛋白盒在ATG起始位密码子前具有一个共有序列Kozak,并且具有一个用于mRNA终止的小型53bp合成多聚A信号。人微小肌营养不良蛋白盒含有(R4-R23/Δ71-78)结构域,如Harper等人.(Nature Medicine8,253-261(2002))此前所述。互补DNA是针对人类使用而进行密码子优化的并且由GenScript(Piscataway,NJ)合成(Mol Ther 18,109-117(2010))。该载体中包含的唯一病毒序列是AAV2的反向末端重复序列,这是病毒DNA复制和包装所必需的。微小肌营养不良蛋白盒具有一个用于mRNA终止的小型53bp合成多聚A信号。

[0181] 此前研究证实了使用MHCK7启动子的心脏表达(Salva等人Mol Ther 15,320-329(2007))并且AAVrh74实现了骨骼肌、隔膜肌和心肌表达(Sondergaard等人Annals ofclinical and Transl Neurology 2,256-270(2015)),图1的构建体的序列被衣壳包裹至AAVrh.74病毒粒子中。AAVrh.74血清型的分子克隆从恒河猴淋巴结克隆,并且在Rodino-Klapac等人JournalofTranslationalmedicine 5,45(2007)中有所讨论。

[0182] 表1显示了质粒AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的分子特征(SEQ ID NO:3)

[0183]

表 1. 质粒 rAAV.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的分子特征				
类型	起始	终止	名称	描述
区域	55	182	5' ITR	野生型 AAV2 反向末端重复序列
区域	244	1035	MHCK7	小鼠肌球蛋白重链复合物–E 盒肌肉肌酸激酶融合增强子/启动子
区域	1045	1194	嵌合内含子	来自人 β-珠蛋白基因的 5'供体位点以及来自 IgG 重链可变区的分支点和 3'剪接接受体位点
基因	1205	4783	huDys cDNA	人微小肌营养不良蛋白 cDNA
区域	4786	4838	多聚 A	合成多聚 A
区域	4894	5021	3' ITR	野生型 AAV2 反向末端重复序列
基因	6760	7619	AmpR	β-内酰胺酶基因
区域	7823	8442	Ori	质粒复制起点

[0184] B)AAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体的产生和编码卡那霉素(Kan)抗性的质粒

[0185] MHCK7.μDys.KAN的克隆通过以下步骤实现:从MHCK7.μDys.AMP质粒分离MHCK7.μDys片段和卡那霉素骨架,并且使用NEBuilder克隆工作流程使它们退火。MHCK7.μDys片段经由SnaBI限制性酶消化来分离。在37℃下,在1×CutSmart缓冲液(NEB)和1μL SnaBI中以50μL总反应物进行消化1小时。所得的片段使用1%琼脂糖凝胶经由电泳分离,电泳在105伏下运行1.5小时。切下对应于MHCK7.μDys插入物的条带,并且使用凝胶纯化试剂盒(Macherey-Nagel)进行纯化。所得的片段的DNA浓度为10ng/μL。在含有1×CutSmart缓冲液(NEB)和1μL XbaI的50μL反应物中,经由在37℃下XbaI限制性酶消化1小时来分离Kan骨架片段。所得的片段使用1%琼脂糖凝胶经由电泳分离,电泳在105伏下运行1.5小时。切下对应于Kan骨架的条带,并且经由凝胶纯化试剂盒(Macherey-Nagel)进行纯化。所得的片段的DNA浓度为8.1ng/μL。使用NEB Builder克隆工作流程对这两个片段进行退火,该工作流程能够将具有重叠序列的两个片段连接在一起。按照制造商的方案,在1×NEBuilder HiFi DNA组合预混物中,以20μL的总反应体积,使用1:1的MHCK7.μDys与卡那霉素骨架比率,在50℃下进行NEBuilder克隆反应15分钟。通过将2.5μL克隆产物添加至细胞中,然后在冰上放置30分钟,然后在42℃下放置30秒,再在冰上放置5分钟,从而将所得的克隆转化至NEB®稳定感受态大肠杆菌(E.coli)(C3040)中。在转化后,将950μL生长培养基添加至细胞中,并且在30℃下225rpm振荡生长1.5小时。在生长后,将450μL这些细胞涂铺于50μg/mL卡那霉素LB琼脂平板上,并且在干燥培养箱中在30℃下温育过夜。从该平板挑取菌落,并且在含有50μg/mL卡那霉素的LB中生长过夜。使用QIAprep®离心微量制备试剂盒(Qiagen)从3mL该培养物分离DNA。该DNA被用于确认克隆产物。经由用PmeI、MscI和SmaI进行限制性酶消化,然

后通过凝胶电泳来确认克隆产物。经由测序进一步确认克隆产物。所得的质粒如SEQ ID NO:8所示,并且在图14和15中显示。如上文所述,将图13的构建体的序列(对应于SEQ ID NO:9的序列)和SEQ ID NO:8的核苷酸1-4977衣壳包裹至AAVrh.74病毒粒子中。

[0186] 实施例2

[0187] 杜兴肌营养不良的全身基因递送临床试验

[0188] 这是针对DMD受试者的使用SEQ ID NO:3的rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白、核苷酸55-5021进行的单剂量对照试验。队列A将包括六名年龄为3个月至3岁的受试者,队列B将包括六名年龄为4岁至7岁的受试者。所有受试者将接受静脉内微小肌营养不良蛋白载体(2×10^{14}vg/kg,10mL/kg)注射。rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白在含有20mM Tris(pH8.0)、1mM氯化镁($MgCl_2$)、200mM氯化钠(NaCl)和0.001%泊洛沙姆188的缓冲液中配制。

[0189] 在该研究中,rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白经由外周臂静脉输注,从而可以达到身体中的所有肌肉。六名年龄为3个月至3岁的DMD受试者被纳入队列A中,六名年龄为4岁至7岁的DMD受试者被纳入队列B中。所有受试者均接受静脉内微小肌营养不良蛋白载体(2×10^{14}vg/kg,10mL/kg)注射。通过定量PCR,使用Prism 7500Taqman检测器系统(PE Applied Biosystems),利用针对MHCK7启动子的引物来确定与超螺旋DNA质粒标准品相比,针对施用剂量的衣壳包裹的载体基因组滴定度(Pozsgai等人.Mol.Ther.25(4):855-869,2017)。

[0190] 受试者在全国儿童医院的儿童重症监护室(PICU)接受超过1小时的输注。在基因疗法前,在筛选访视时进行肌肉活检。受试者将进行第二次肌肉活检,以确定在分娩后90天该基因是否允许对缺失的肌营养不良蛋白进行替换。在基因转移后,应仔细监测患者的任何治疗副作用。该监测包括血液和尿液测试,以及在筛选访视期间以及在第0、1、7、14、30、60、90和180天以及在第9、12、18、24、30和36个月的身体检查,以确保基因注射无副作用。

[0191] 队列A的受试者(n=6)的年龄在3个月至3岁之间,并且接受静脉内rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体(2×10^{14}vg/kg,10mL/kg)注射。在基因转移前一天,队列A中的受试者开始注射1mg/kg泼尼松或地夫可特并且维持30天,同时监测免疫应答。如果在第30天为阴性,则在1周内停用类固醇。如果T细胞对AAV或微小肌营养不良蛋白的反应>125SFC/106PBMC,则维持类固醇直到水平降至该阈值以下。

[0192] 队列B的受试者(n=6)的年龄在4岁至7岁之间,并且接受静脉内rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体(2×10^{14}vg/kg,10mL/kg)注射。这些受试者在整个试验期间均维持稳定剂量的皮质类固醇,但是如果T细胞对AAV或微小肌营养不良蛋白的反应>125SFC/106PBMC,则所述剂量可以在短时间内增加。

[0193] 合格标准

[0194] 该研究的纳入标准如下:

[0195] • 纳入年龄:队列A:年龄为3个月至7岁,队列B:年龄为4岁-7岁(含)。

[0196] • 具有移码(缺失或重复)或外显子18至58之间的过早终止密码子突变的DMD基因的分子表征。

[0197] • CK升高>1000U/L

[0198] • 队列A受试者:在针对大幅运动的Bayley-III运动评估中小于平均值被定义为

量表分数≤9

[0199] • 队列B:在100米计时测试中小于平均值被定义为<预测的80%

[0200] • 任何种族的男性。

[0201] • 能够与运动评估测试协作。

[0202] • 队列A受试者:此前未使用皮质类固醇治疗。

[0203] • 队列B受试者:在筛选前至少12周口服皮质类固醇的稳定剂量当量,并且在整个研究中,预期剂量保持恒定(除适应体重变化的调整之外)。

[0204] 该研究的排除标准如下:

[0205] • 基于临床观察的活性病毒感染。

[0206] • 心肌病的体征,包括射血分数小于40%的超声心动图。

[0207] • HIV感染、或者乙肝或丙肝感染的血清学证据。

[0208] • 自身免疫疾病的诊断(或正在进行的治疗)。

[0209] • 异常实验室值被认为具有临床显著性。

[0210] • PI认为,伴随疾病或对慢性药物治疗的需要会给基因转移带来不必要的风险。

[0211] • 通过ELISA免疫测定法确定的AAVrh74或AAV8抗体滴定度>1:400的受试者。

[0212] • 研究者认为,医学病症或缓解情况可以损害受试者遵守方案所要求的测试或程序的能力,或者损害受试者的健康、安全性或临床可解释性。

[0213] • 在基因转移访视前4周内发生严重感染(例如,肺炎、肾盂肾炎或脑脊髓膜炎)(纳入可能推迟)。

[0214] • 在针对该研究的筛选前的最近6个月内,接受任何研究药物(除皮质类固醇之外)或外显子跳跃药物(包括ExonDys51®)或者实验药物。

[0215] • 已经进行任何类型的基因疗法、基于细胞的疗法(例如干细胞移植)或CRISPR/Cas9疗法。

[0216] • 家庭不希望向初级保健医生和其他医疗提供者公开患者的研究参与情况。

[0217] 结局指标

[0218] 主要结局指标是基于发生不良事件的参与者的数量的安全性(时间范围:3年)。监测不良反应,并且对研究项目的严重性和相关性进行评分。

[0219] 次要结局指标如下:

[0220] 大幅运动子测试量表(Bayley-III)分数(时间范围:筛选,第30天-3年):大幅运动量表分数测量运动发展。从第30天至3年,每次随访都对队列A进行Bayley-III大幅运动子测试评分。在筛选时,与年龄为42个月的儿童的标准数据相比,年龄为43-47个月(含)的任何受试者均具有计算量表分数。Bayley-III提供了年龄为1-42个月的儿童的标准数据。

[0221] 物理疗法评估100米计时测试(100m)(时间范围:筛选,第30天-3年):100m是队列B的主要运动结局。100米计时测试是在儿童3岁时针对队列A的起始探索性结局。

[0222] 物理疗法评估北极星移动评估量表(NSAA)(时间范围:筛选,第30天-3年):北极星移动评估量表(NSAA)是在儿童四岁时针对队列A和针对队列B的起始探索性结局。NSAA测量患有杜兴肌营养不良的年轻男孩的行走质量。

[0223] 物理疗法评估针对儿童而修改的计时起立-行走(TUG)(时间范围:筛选,第30天-3年):队列B的探索性结局包括针对儿童而修改的计时起立-行走(TUG)。

[0224] 物理疗法评估上升和下降4梯(时间范围:筛选,第30天-3年):队列B的探索性结局将包括上升和下降4梯。

[0225] 物理疗法评估手持式肌力测定(HHD)(时间范围:筛选,第30天-3年):队列B的探索性结局包括膝伸肌和膝屈肌以及肘屈肌和肘伸肌的手持式肌力测定(HHD)。

[0226] 通过免疫荧光进行的微小肌营养不良蛋白基因表达定量(时间范围:筛选,第90天):微小肌营养不良蛋白基因表达水平通过免疫荧光来定量,并且在肌肉活检前后进行比较。

[0227] 通过蛋白质印迹进行的微小肌营养不良蛋白基因表达定量(时间范围:筛选,第90天):微小肌营养不良蛋白基因表达水平通过蛋白质印迹分析来定量,并且在肌肉活检前后进行比较。

[0228] 在基因疗法后CK的减少(时间范围:3年):在循环血液中CK水平的减少。

[0229] 心脏磁共振成像(1年)。

[0230] 微小肌营养不良蛋白基因表达

[0231] 经由免疫荧光(IF)纤维强度对微小肌营养不良蛋白表达相对于基线的变化进行分析和定量。如图7所示,在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后,受试者1(5岁)展示出在腓肠肌活检的肌纤维中微小肌营养不良蛋白的表达为78%,在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后,受试者2(4岁)展示出在腓肠肌活检的肌纤维中微小肌营养不良蛋白的表达为73.5%,在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后,受试者3(6岁)展示出在腓肠肌活检的肌纤维中微小肌营养不良蛋白的表达为77.0%。在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后,受试者4(4岁)展示出在腓肠肌活检的肌纤维中微小肌营养不良蛋白的表达为96.2%。所有患者均显示出已转导的微小肌营养不良蛋白的强表达,所述微小肌营养不良蛋白适当地定位于肌肉肌膜中,如通过免疫组织化学所测量。与正常对照相比,如通过微小肌营养不良蛋白阳性纤维的百分数所测量,平均基因表达为76.2%,平均纤维强度为74.5%。

[0232] 表2

[0233]

受试者	平均强度	肌营养不良蛋白阳性纤维的百分比
1	82.0%	78.0%
2	59.0%	73.5%
3	83.0%	77.0%
4	160.0%	96.2%
平均值	96.0%	81.2%

[0234] 还通过定量微小肌营养不良蛋白表达来评估从基线至第60天的微小肌营养不良蛋白基因表达的变化,如通过活检肌肉组织的蛋白质印迹所测量。如图8A和8B所示,蛋白质印迹分析检测到受试者1(5岁)、受试者2(4岁)和受试者3(6岁)中的微小肌营养不良蛋白表达。图8C提供了检测受试者4(4岁)中的微小肌营养不良蛋白表达的蛋白质印迹分析。如通过蛋白质印迹所测量,所有治疗后活检样品均显示出微小肌营养不良蛋白的高水平,受试者1-4的平均值,与采用方法1的正常值相比为74.3%,与根据方法2(针对脂肪和纤维化组织进行调整)的正常值相比为95.8%。

[0235] 对于每名受试者,测量每个肌纤维的细胞核的载体基因组拷贝。如表3所示,在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后,对于每名受试者,每个核酸酶的载体基因组拷贝均大于1。一个拷贝的载体表示大约50%的微小肌营养不良蛋白基因表达。在受试者1-3中测量的每个细胞核的载体拷贝平均值为1.6,这与所观察的高微小肌营养不良蛋白表达水平一致。当纳入受试者4的值时,平均载体拷贝/μg DNA>10^5,每个细胞核的载体拷贝平均值为3.3。

[0236] 表3

[0237]

受试者	载体拷贝/μgDNA	每个细胞核的拷贝
1	>10^5	1.7
2	>10^5	1.3
3	>10^5	1.9

[0238] 在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用前和施用后,通过免疫组织化学来测量肌肉活检组织中的α-肌聚糖和β-肌聚糖的蛋白质水平。rAAVrh74.MHCK7的施用还引起受试者中的DAPC蛋白的上调。如图9所示,在受试者1(图9A)、受试者2(图9B)和受试者3(图9C)中,在rAAVrh74.MHCK7的施用前,肌肉活检组织中的α-肌聚糖和β-肌聚糖的表达,与肌肉活检样品中的这些蛋白质的水平相比有所增加。

[0239] 循环血清CK水平

[0240] 在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体(2×10^{14}vg/kg,10mL/kg)的静脉内输注施用后,每30天获取一次血样。在每次访视时测量CK水平,并且将该CK水平与在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用前(第0天访视)获得的基线水平进行比较。下表4中提供了基线血清CK水平(单位/升)。如图10所示,在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后2个月,循环血清CK的水平降低约87%。所有受试者均显示出血清肌酸激酶(CK)水平显著减少,在治疗后2个月CK减少平均值大于87%(n=3)。CK是一种与肌肉损伤相关的酶,患有DMD的患者始终表现出高水平的CK。实际上,显著升高的CK通常被用作DMD的初步诊断工具,然后再进行证实性遗传检验。

[0241] 表5和图10提供了每名受试者的CK水平。图11提供了随时间推移的平均CK水平,并且展示出在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后,平均CK水平随时间推移显著减少。27,064U/L的平均基线CK水平(表4的平均值)减少约63%,达到9,982U/L的平均值(平均值,第270天,表5)。

[0242] 表4

[0243]

受试者	年龄(岁)	基线CK水平单位/升(U/L)
1	5	20691
2	4	23414
3	6	34942
4	4	29210

[0244] 表5:从基线至第270天的CK水平变化

[0245]

受试者	基线	第 30 天	第 60 天	第 90 天	第 180 天	第 270 天	第 360 天
1		-	2984	2444	18476	6317	-
2	23414	10427	4283	41920	6209	10494	-
3	34942	10430	2966	2546	9650	18855	6410
4	29210	7215	908	1382	2580	4262	-

[0246] 功效评估

[0247] 除微小肌营养不良蛋白和CK水平之外,还通过以下功能测试来测量功效:从地面起立时间、上升4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、起立时间测试、上升4梯测试、10米计时测试(10m)和100米计时测试(100m)。数据提供于下表6和7中,并且该数据展示出在rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的施用后9个月的持续、持久改善。图12还提供了随时间推移的NSAA改善。

[0248] 表6:从基线至第270天的NSAA变化

[0249]

受试者	基线	第 30 天	第 60 天	第 90 天	第 180 天	第 270 天	从基线的变化
1	18	22	24	23	25	26	8
2	19	21	23	25	27	27	8
3	26	28	28	30	30	28	2
4	19	20	20	25	25	27	8
平均改善	20.5	22.75	23.75	25.75	26.75	27	6.5

[0250] 表7:从基线至第270天的变化

[0251]

受试者	评估	NSAA	起立时间	上升 4 梯	100m (秒)	10m
1	基线	18	3.7	3.4	49.3	5.1
	第 270 天	26	3.0	2.3	43.2	4.3
2	基线	19	3.0	3.8	49.9	4.3
	第 180 天	27	3.7	2.6	48.6	3.9
	第 270 天	27	3.3	2.7	50.3	

[0252]

3	基线	26	3.9	1.9	59.3	4.7
	第 180 天	30	3.4	1.8	48.4	4.1
	第 270 天	28	2.8	1.9	50.7	
4	基线	19	4.1	4.8	67.2	5.4
	第 90 天	25	2.3	2.2	50.7	4.4
	第 270 天	27	2.4	2.2	49.7	
平均值	从基线的变化	6.5 分的改善	.8 秒的改善	1.2 秒的改善	7.95 秒的改善	14%的改善

[0253] 安全性评估

[0254] 在研究中未观察到严重不良事件(SAE)。三名受试者的γ-谷氨酰转移酶(GGT)升高,这可通过在一周内的类固醇增加而缓解,并且恢复基线水平。未观察到其他临床显著性实验室发现。患者通常在治疗的第一周出现短暂恶心,同时类固醇剂量增加。这与肝酶升高或任何其他异常无关。

[0255] 实施例3

[0256] 随机双盲安慰剂对照的全身基因递送I/IIa期临床试验

[0257] 这是针对DMD受试者的使用rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白进行的随机双盲单剂量试验。该研究包括二十四名年龄为4岁至7岁的受试者。在纳入时将受试者随机分组至治疗组或安慰剂组。十二名受试者接受静脉内rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白载体(2×10^{14}vg/kg,大约10mL/kg)施用,而另十二名受试者将接受10mL/kg安慰剂(乳酸林格氏液)。安慰剂受试者将在最后一名治疗的受试者给药后一年,按照与12名此前治疗的受试者相同的方式继续进行治疗。受试者经大约1小时接受携带微小肌营养不良蛋白的rAAV或乳酸林格氏液的输注。在治疗前和治疗后(90天)对腓肠肌进行针刺肌肉活检。

[0258] 该研究的主要目的是评估针对DMD受试者经由外周肢静脉的rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白的静脉内施用的安全性。通过血液学、血清化学、尿液分析、对rAAVrh74和微小肌营养不良蛋白的免疫应答、以及报告病史和症状观察的变化来评估安全性终点。肌营养不良蛋白基因表达与安全性一起作为主要结局指标。使用经验证的免疫荧光和免疫印迹测定法来进行定量。基因疗法后的CK减少作为次要结局。功效通过以下功能测试来测量:起立时间、上升4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、10米计时测试(10m)、100米计时测试(100m)。探索性指标包括膝伸肌和膝屈肌以及肘屈肌和肘伸肌的手持式肌力测定(HHD)。

[0259] 该研究的纳入标准如下:

[0260] • 纳入年龄:年龄在4岁-7岁(含)之间。

[0261] • 具有移码(缺失或重复)或外显子18至58之间的过早终止密码子突变的DMD基因的分子表征。

[0262] • 症状性肌营养不良的适应症:CK升高>1000U/L并且在100米步行测试中小于预测时间的平均值百分比

[0263] • 任何种族的男性均符合纳入资格。

[0264] • 能够与运动评估测试协作。

[0265] • 在筛选前至少12周口服皮质类固醇的稳定剂量当量,并且在整个研究中,预期剂量保持恒定(除适应体重变化的潜在调整之外)。

[0266] 该研究的排除标准如下:

[0267] • 基于临床观察的活性病毒感染。

[0268] • 心肌病的体征,包括射血分数小于40%的超声心动图。

[0269] • HIV感染、或者乙肝或丙肝感染的血清学证据。

[0270] • 自身免疫疾病的诊断(或正在进行的治疗)。

[0271] • 异常实验室值被认为具有临床显著性(GGT>3XULN、胆红素≥3.0mg/dL、肌酐≥1.8mg/dL、Hgb<8或>18g/Dl;WBC>18,500/cmm),血小板≤50,000。

[0272] • PI认为,伴随疾病或对慢性药物治疗的需要会给基因转移带来不必要的风险。

[0273] • 通过ELISA免疫测定法确定的AAVrh74或AAV8抗体滴定度>1:400的受试者。如果在筛选时终点滴定度为正,则可以在排除前重复测试。

[0274] • 研究者认为,具有医学病症或缓解情况,这些医学病症或缓解情况可以损害受试者遵守方案所要求的测试或程序的能力,或者损害受试者的健康、安全性或临床可解释性。

[0275] • 在基因转移访视前4周内发生严重感染(例如,肺炎、肾盂肾炎或脑脊髓膜炎)(纳入可能推迟)。

[0276] • 在针对该研究的筛选前的最近6个月内,已经接受任何研究药物(除皮质类固醇之外)或外显子跳跃药物(包括ExonDys51®)或者实验药物。

[0277] • 已经进行任何类型的基因疗法、基于细胞的疗法(例如干细胞移植)或CRISPR/Cas9疗法。

[0278] • 家庭不希望向初级保健医生和其他医疗提供者公开患者的研究参与情况。

[0279] 功效评估

[0280] 肌营养不良蛋白基因表达与安全性一起作为主要结局指标。使用经验证的免疫荧光和免疫印迹测定法来进行定量。基因疗法后的CK减少作为次要结局。此外,功效通过以下功能测试来测量:从地面起立时间、上升4梯、北极星移动评估量表(NSAA)、10米计时测试(10m)、100米计时测试(100m)。探索性指标包括膝伸肌和膝屈肌以及肘屈肌和肘伸肌的手持式肌力测定(HHD)。

[0281] 超声引导下的肌肉活检被用于进行比较基线与第90天的转基因表达定量。对与原始活检相同、但是在另一条腿上的肌肉进行活检。在一年后对所有受试者进行给药,安慰剂交叉受试者将在访视1时重新开始研究时间表。安慰剂受试者在第二次基线筛选时将不会进行以下操作:心脏MRI和肌肉活检。安慰剂受试者在第90天接受肌肉活检(总共3次肌肉活检)。使用间接免疫荧光(IF)对冷冻切片进行肌营养不良蛋白染色。使用经验证的图像扫描和MuscleMapTM分析算法进行全玻片扫描,并且对微小肌营养不良蛋白强度和阳性纤维百分比进行定量。通过盲法进行肌肉形态测量,包括纤维尺寸直方图。使用经验证的蛋白质印迹方法,将盲法冷冻肌肉活检刮拭物用于进行针对微小肌营养不良蛋白的定量蛋白质分析。

[0282] 腓肠肌的肌肉针刺活检(除非PI认为在特定受试者中是禁忌的,在这种情况下PI将选择替代性肌肉进行活检)被用于定量微小肌营养不良蛋白表达。

[0283] 功效分析

[0284] 主要功效终点是微小肌营养不良蛋白表达的数量从基线至第90天的变化,如通过活检肌肉组织的蛋白质印迹所测量。主要功效终点的治疗组差异通过协方差分析(ANCOVA)模型来评估,其中治疗是固定因子,基线值是协变量。威尔科克森(Wilcoxon)秩和检验作为支持性分析进行。类似地,经由免疫荧光(IF)纤维强度对微小肌营养不良蛋白表达相对于基线的变化进行分析。

[0285] 支持性功效终点包括从地面起立时间、上升4梯、NSAA、10米计时测试(10m)、100米计时测试(100m)和CK变化的从基线至每次预定评估的变化。探索性指标包括膝伸肌和膝屈肌以及肘屈肌和肘伸肌的HHD。治疗组差异通过ANCOVA模型来评估,其中治疗是固定因子,基线值是协变量。威尔科克森秩和检验作为支持性分析进行。

[0286] 实施例4

[0287] 上文实施例2和实施例3中所述的试验和研究可以替代性地采用SEQ ID NO:9所示的rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白构建体;SEQ ID NO:8所示的核苷酸1-4977;或SEQ ID NO:6所示的核苷酸56-5022来进行。

[0288] 实施例5

[0289] pAAV.MCK.微小肌营养不良蛋白构建体的产生

[0290] 通过将驱动密码子优化的人微小肌营养不良蛋白cDNA序列的MCK表达盒插入AAV克隆载体psub201中来构建pAAV.MCK.微小肌营养不良蛋白质粒(Samulski等人,J.Virol.61(10):3096-3101)。肌肉特异性调控元件被包括在构建体中以驱动肌肉特异性基因表达。该调控元件包含融合至351bp MCK核心启动子(近端)的小鼠MCK核心增强子(206bp)。在核心启动子后,所述构建体包含用于有效转录起始的53bp内源性小鼠MCK外显子1(非翻译),然后是SV40晚期16S/19S剪接信号(97bp)和小型5'UTR(61bp)。内含子和5'UTR来源于质粒pCMVβ(Clontech)。微小肌营养不良蛋白盒在ATG起始位密码子前具有一个共有序列Kozak,并且具有一个用于mRNA终止的小型53bp合成多聚A信号。人微小肌营养不良蛋白盒含有(R4-R23/Δ71-78)结构域,如Harper等人Nat.Med.8(3):253-61,2002此前所述。

[0291] pAAV.MCK.微小肌营养不良蛋白质粒含有侧接有AAV2反向末端重复序列(ITR)的人微小肌营养不良蛋白cDNA表达盒(参见图5)。该序列被衣壳包裹成AAVrh.74病毒粒子。AAVrh.74血清型的分子克隆从恒河猴淋巴结克隆,并且在Rodino-Klapac等人.Journal ofTran.Med.45(2007)中有所描述。

[0292] 参考文献

[0293] 1.Hoffman,E.P.,Brown,R.H.,Jr.&Kunkel,L.M.Dystrophin:the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus.Cell 51,919-928(1987).

[0294] 2.Straub,V.&Campbell,K.P.Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex.Curr Opin Neurol 10,168-175(1997).

[0295] 3.Sacco,A.,et al.Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice.Cell 143,1059-1071(2010).

[0296] 4.Wallace,G.Q.&McNally,E.M.Mechanisms of muscle degeneration, regeneration,and repair in the muscular dystrophies.Annu Rev Physiol 71,37-57

(2009).

[0297] 5.Zhou,L.&Lu,H.Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy.JNeuropatholExp Neurol 69,771-776(2010).

[0298] 6.Desguerre,I.,et al.Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy:a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation.J Neuropathol Exp Neurol 68,762-773(2009).

[0299] 7.DiPrimio,N.,McPhee,S.W.&Samulski,R.J.Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases:toward clinical trials.Curr Opin Mol Ther 12,553-560(2010).

[0300] 8.Mendell,J.R.,et al.Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy,type 2D.Ann Neurol 68,629-638(2010).

[0301] 9.Mendell,J.R.,et al.Limb-girdle muscular dystrophy type2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins.Ann Neurol 66,290-297(2009).

[0302] 10.Mendell,J.R.,et al.A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy.Molecular therapy:the journal of theAmerican Society ofGene Therapy 23,192-201(2015).

[0303] 11.Carnwath,J.W.&Shotton,D.M.Muscular dystrophy in the mdx mouse:histopathology ofthe soleus and extensor digitorum longus muscles.JNeurol Sci 80,39-54(1987).

[0304] 12.Coulton,G.R.,Morgan,J.E.,Partridge,T.A.&Sloper,J.C.The mdx mouse skeletal muscle myopathy:I.A histological,morphometric and biochemical investigation.Neuropathol Appl Neurobiol 14,53-70(1988).

[0305] 13.Cullen,M.J.&Jaros,E.Ultrastructure ofthe skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic(mdx)mouse.Comparison with Duchenne muscular dystrophy.Acta Neuropathol 77,69-81(1988).

[0306] 14.Dupont-Versteegden,E.E.&McCarter,R.J.Differential expression ofmuscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles ofmdx mice.Muscle Nerve 15,1105-1110(1992).

[0307] 15.Stedman,H.H.,et al.The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy.Nature 352,536-539(1991).

[0308] 16.Deconinck,A.E.,et al.Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy.Cell 90,717-727(1997).

[0309] 17.Grady,R.M.,et al.Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin:a model for Duchenne muscular dystrophy.Cell 90,729-738(1997).

[0310] 18.Love,D.R.,et al.An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin.Nature 339,55-58(1989).

[0311] 19.Tinsley,J.M.,et al.Primary structure of dystrophin-related protein.Nature 360,591-593(1992).

[0312] 20.Tinsley,J.,et al.Expression offull-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice.NatMed4,1441-1444(1998).

[0313] 21.Squire,S.,et al.Prevention of pathology in mdx mice by expression ofutrophin:analysis using an inducible transgenic expression system.Hum Mol Genet 11,3333-3344(2002).

[0314] 22.Rafael,J.A.,Tinsley,J.M.,Potter,A.C.,Deconinck,A.E.&Davies,K.E.Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice.Nat Genet 19,79-82(1998).

[0315] 23.Zhou,L.,et al.Haploinsufficiency ofutrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice.JNeurol Sci 264,106-111(2008).

[0316] 24.Gutpell,K.M.,Hrinivich,W.T.&Hoffman,L.M.Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/-Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model ofDuchenne Muscular Dystrophy.PloS one 10,e0117306(2015).

[0317] 25.Rodino-Klapac,L.R.,et al.Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model.Human moleculargenetics 22,4929-4937(2013).

[0318] 26.Nevo,Y.,et al.The Ras antagonist,farnesylthiosalicylic acid(FTS),decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model ofmuscular dystrophy.PloSone 6,e18049(2011).

[0319] 27.Rodino-Klapac,L.R.,et al.A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy.J Transl Med 5,45(2007).

[0320] 28.Mulieri,L.A.,Hasenfuss,G.,Ittleman,F.,Blanchard,E.M.&Alpert,N.R.Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime.Circ Res 65,1441-1449(1989).

[0321] 29.Rodino-Klapac,L.R.,et al.Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery.Molecular therapy:the journal ofthe American Society ofGene Therapy 18,109-117(2010).

[0322] 30.Grose,W.E.,et al.Homologous recombination mediates functional recovery ofdysferlin deficiency following AAV5 gene transfer.PloS one 7,e39233(2012).

[0323] 31.Liu,M.,et al.Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury.Mol Ther 11,245-256(2005).

[0324] 32.Harper,S.Q.,et al.Modular flexibility of dystrophin:implications

for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy.Nature medicine 8,253-261 (2002).

[0325] 33.Rodino-Klapac,L.R.,et al.Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery.Mol Ther 18,109-117(2010).

[0326] 34.Salva,M.Z.,et al.Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle.Mol Ther 15,320-329(2007).

[0327] 35.Sondergaard,P.C.,et al.AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models.Annals ofclinical and translational neurology 2,256-270(2015).

[0328] 36.De,B.P.,et al.High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses.Mol Ther 13,67-76(2006).

[0329] 37.Rodino-Klapac,L.R.,et al.A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment ofDuchenne muscular dystrophy.Journal of translational medicine 5,45(2007).

[0330] 38.Bulfield et al.,X chromosome-linked muscular dystrophy(mdx)in the mouse.Proc NatlAcadSci USA.1984;81(4):1189-1192.

[0331] 39.Sicinski et al.,The molecular basis ofmuscular dystrophy in the mdx mouse:a point mutation.Science.198930;244(4912):1578-80。

序列表

<110> 全国儿童医院研究所

<120> 用于治疗肌营养不良的肌肉特异性
微小肌营养不良蛋白的腺相关病毒载体递送

<130> 28335/53169

<150> US 62/686,668

<151> 2018-06-18

<150> US 62/740,402

<151> 2018-10-02

<150> US 62/752,841

<151> 2018-10-30

<150> US 62/823,649

<151> 2019-03-25

<150> US 62/860,220

<151> 2019-06-11

<160> 9

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 3579

<212> DNA

[0332]

<213> 智人（Homo sapiens）

<400> 1

atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca gaagaagact 60

tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat cgagaatctg 120

ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact gactggccag 180

aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt gaacaaagct 240

ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac tgatatcgtg 300

gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca ctggcaggtg 360

aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga gaagatcctg 420

ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat taacttcact 480

acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag gcctgatctg 540

ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga acatgccttc 600

aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga tgtggacact 660

acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca ggtgctgcca 720

cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc ccccaaagtg 780

actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca gattaccgtg 840

agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa gtcctacgct 900

tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt tccatcccag 960

cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag cgaggtgaat 1020

ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag tgctgaagac 1080

acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga tcagttccac 1140

acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg caatatcctg 1200

[0333]

```
cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga aacagaagtg    1260
caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc tagtatggag    1320
aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact gaaagagctg    1380
aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga gccactggga    1440
cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca ggaggatctg    1500
gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt ggacgaatct    1560
agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg ggaccggtgg    1620
gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat cctgctgaaa    1680
tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga gaaagaggac    1740
gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct gtctagcctg    1800
cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat gggcaaactg    1860
tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac ccagaagaca    1920
gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa actggagaaa    1980
agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac ccagacaacc    2040
gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa acatgcccag    2100
gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct gcaggagctg    2160
caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat taaggggtct    2220
tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga aaaggtgaag    2280
gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa cgatctggct    2340
agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac actggaggac    2400
ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg gcagctgcat    2460
gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc cgtgcagggg    2520
ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca cgagacccag    2580
accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc cgatctgaac    2640
aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca gaaggccctg    2700
tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca taatctgaag    2760
cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac tatctacgac    2820
aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga tatgtgcctg    2880
aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt gctgagtttt    2940
aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag gtacctgttc    3000
aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact gctgctgcat    3060
gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg atctaacatc    3120
gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat cgaggctgct    3180
ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc tgtgctgcac    3240
agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg caaggaatgt    3300
cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat ttgccagagc    3360
tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat ggtggaatat    3420
tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct gaagaataag    3480
tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc agtgcagaca    3540
gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtga                           3579
<210> 2
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
```

<220>

<223> 合成启动子

<400> 2

gtttaaacaa gcttgcatgt ctaagctaga cccttcagat taaaaataac tgaggtaagg 60

gcctgggtag gggaggtggt gtgagacgct cctgtctctc ctctatctgc ccatcggccc 120

tttggggagg aggaatgtgc ccaaggacta aaaaaaggcc atggagccag aggggcgagg 180

gcaacagacc tttcatgggc aaaccttggg gccctgctgt ctagcatgcc ccactacggg 240

tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct ggttataatt 300

aacccagaca tgtggctgcc ccccccccccc caacacctgc tgcctctaaa aataaccctg 360

tccctggtgg atcccctgca tgcgaagatc ttcgaacaag gctgtggggg actgagggca 420

ggctgtaaca ggcttggggg ccagggctta tacgtgcctg ggactcccaa agtattactg 480

ttccatgttc ccggcgaagg gccagctgtc ccccgccagc tagactcagc acttagttta 540

ggaaccagtg agcaagtcag cccttggggc agcccataca aggccatggg gctgggcaag 600

ctgcacgcct gggtccgggg tgggcacggt gcccgggcaa cgagctgaaa gctcatctgc 660

tctcaggggc ccctccctgg ggacagcccc tcctggctag tcacaccctg taggctcctc 720

tatataaccc aggggcacag gggctgccct cattctacca ccacctccac agcacagaca 780

gacactcagg agccagccag cggcgcgccc 810

<210> 3

<211> 8562

<212> DNA

<213> 腺相关病毒

<400> 3

[0334]

gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgcgcgc 60

tcgctcgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc 120

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 180

cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctacg tagccatgct ctagagttta 240

aacaagcttg catgtctaag ctagacccct cagattaaaa ataactgagg taagggcctg 300

ggtaggggag gtggtgtgag acgctcctgt ctctcctcta tctgcccatc ggccctttgg 360

ggaggaggaa tgtgcccaag gactaaaaaa aggccatgga gccagagggg cgagggcaac 420

agacctttca tgggcaaacc ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480

gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540

agacatgtgg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgcct ctaaaaataa ccctgtccct 600

ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660

taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720

tgttcccggc gaagggccag ctgtcccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780

cagtgagcaa gtcagcccct ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840

cgcctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca 900

ggggcccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat 960

aacccagggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020

tcaggagcag ccagcggcgc gcccaggtaa gtttagtctt tttgtctttt atttcaggtc 1080

ccggatccgg tggtggtgca aatcaaagaa ctgctcctca gtggatgttg cctttacttc 1140

taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc ggaattgtac ccgcggccgc 1200

caccatgctg tggtgggagg aggtggagga ttgttatgaa agggaggacg tgcagaagaa 1260

gacttttacc aagtgggtga acgctcagtt cagcaaattt gggaagcagc acatcgagaa 1320

[0335]

```
tctgttttcc gacctgcagg atgggagacg gctgctggat ctgctggaag gactgactgg    1380
ccagaagctg cccaaagaga aggggagcac tagggtgcac gccctgaaca acgtgaacaa    1440
agctctgaga gtgctgcaga acaacaacgt ggatctggtg aatattggca gtactgatat    1500
cgtggacggg aaccacaaac tgacactggg cctgatctgg aacattattc tgcactggca    1560
ggtgaaaaat gtgatgaaga acatcatggc cgggctgcag cagaccaatt ccgagaagat    1620
cctgctgtct tgggtgcggc agagcacccg caactatccc caggtgaacg tgattaactt    1680
cactacatcc tggagcgacg ggctggccct gaatgctctg attcacagcc acaggcctga    1740
tctgttcgac tggaatagcg tggtgtgcca gcagtctgcc acacagcgcc tggaacatgc    1800
cttcaatatc gctcggtacc agctggggat cgaaaaactg ctggacccag aggatgtgga    1860
cactacatac ccagataaaa agtctattct gatgtacatt actagcctgt tccaggtgct    1920
gccacagcag gtgtctattg aagccattca ggaggtggaa atgctgcccc gccccccaa     1980
agtgactaaa gaggagcatt ttcagctgca tcatcagatg cattacagcc agcagattac    2040
cgtgagcctg gctcagggat atgagcgcac cagtagtcca aaaccacggt tcaagtccta    2100
cgcttatacc caggctgcct acgtgacaac tagcgaccct actagatccc cctttccatc    2160
ccagcacctg gaggccccag aggacaagag ctttgggtcc agcctgatgg aaagcgaggt    2220
gaatctggat cggtaccaga cagccctgga ggaggtgctg agctggctgc tgagtgctga    2280
agacacactg caggcccagg gcgaaatttc caatgacgtg gaagtggtga aggatcagtt    2340
ccacacacac gagggctata tgatggacct gacagctcac caggggcgcg tgggcaatat    2400
cctgcagctg ggctctaaac tgatcggcac cgggaaactg agtgaggacg aggaaacaga    2460
agtgcaggag cagatgaacc tgctgaacag ccgctgggag tgtctgagag tggctagtat    2520
ggagaagcag tccaacctgc accgggtgct gatggacctg cagaaccaga aactgaaaga    2580
gctgaacgac tggctgacaa agactgagga acgcacaagg aagatggagg aggagccact    2640
gggacccgac ctggaggatc tgaagagaca ggtgcagcag cataaggtgc tgcaggagga    2700
tctggaacag gagcaggtgc gggtgaactc cctgacacat atggtggtgg tggtggacga    2760
atctagtgga gatcacgcca ccgccgccct ggaggaacag ctgaaggtgc tgggggaccg    2820
gtgggccaac atttgccggt ggaccgagga caggtgggtg ctgctgcagg acatcctgct    2880
gaaatggcag aggctgaccg aggagcagtg tctgtttagt gcttggctga gcgagaaaga    2940
ggacgccgtg aacaagatcc acacaaccgg ctttaaggat cagaacgaaa tgctgtctag    3000
cctgcagaaa ctggctgtgc tgaaggccga tctggagaaa aagaagcaga gcatgggcaa    3060
actgtatagc ctgaaacagg acctgctgag caccctgaag aacaagagcg tgacccagaa    3120
gacagaagcc tggctggata actttgcccg ctgctgggac aacctggtgc agaaactgga    3180
gaaaagtaca gctcagatct ctcaggctgt gaccacaacc cagcctagcc tgacccagac    3240
aaccgtgatg gaaaccgtga ccaccgtgac aacccgcgaa cagatcctgg tgaaacatgc    3300
ccaggaagag ctgccacctc cacctcccca gaagaagaga accctggagc ggctgcagga    3360
gctgcaggaa gccactgacg aactggacct gaagctgagg caggccgaag tgattaaggg    3420
gtcttggcag cctgtgggcg atctgctgat tgattccctg caggaccacc tggaaaaggt    3480
gaaggctctg agaggcgaaa ttgctccact gaaggagaac gtgagtcatg tgaacgatct    3540
ggctagacag ctgacaacac tgggcatcca gctgagccca tacaatctga gcacactgga    3600
ggacctgaat accaggtgga agctgctgca ggtggctgtg gaagaccggg tgcggcagct    3660
gcatgaggcc catcgcgact tcggaccagc cagccagcac tttctgagca catccgtgca    3720
ggggccctgg gagagggcca tttctcccaa caaggtgccc tactatatta atcacgagac    3780
ccagaccact tgttgggacc atcccaagat gacagaactg taccagtccc tggccgatct    3840
gaacaacgtg aggtttagcg cttacagaac cgctatgaag ctgagacggc tgcagaaggc    3900
cctgtgcctg gatctgctgt ccctgtccgc cgcctgcgat gccctggatc agcataatct    3960
```

[0336]

gaagcagaac gatcagccaa tggatatcct gcagatcatc aactgcctga ccactatcta 4020
cgacaggctg gagcaggagc acaacaacct ggtgaacgtg cctctgtgcg tggatatgtg 4080
cctgaactgg ctgctgaacg tgtatgacac tgggcgcacc ggccggatca gagtgctgag 4140
ttttaaaact gggattatct ccctgtgtaa ggcccacctg gaggacaagt acaggtacct 4200
gttcaagcag gtggctagta gcactggatt ttgtgaccag cgccgcctgg gactgctgct 4260
gcatgatagt atccagattc ctagacagct gggagaggtg gctagtttcg gaggatctaa 4320
catcgaaccc agcgtgcgca gctgtttcca gtttgccaat aacaaacctg aaatcgaggc 4380
tgctctgttc ctggattgga tgcgcctgga accacagagc atggtgtggc tgcctgtgct 4440
gcacagagtg gctgccgccg aaactgccaa gcaccaggct aaatgcaaca tctgcaagga 4500
atgtcccatt atcggctttc gctacaggag tctgaaacat tttaactacg atatttgcca 4560
gagctgcttc ttttccggaa gagtggccaa aggacacaag atgcactacc ctatggtgga 4620
atattgcacc ccaactacat ctggcgaaga tgtgcgcgat tttgccaagg tgctgaagaa 4680
taagtttcgg actaagaggt acttcgccaa gcacccccgc atggggtatc tgccagtgca 4740
gacagtgctg gaaggagaca atatggagac cgatacaatg tgagcggccg caataaaaga 4800
tctttatttt cattagatct gtgtgttggt tttttgtgtg tctagagcat ggctacgtag 4860
ataagtagca tggcgggtta atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca 4920
ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc 4980
cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagctggcgt aatagcgaag 5040
aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgattcc 5100
gttgcaatgg ctggcggtaa tattgttctg gatattacca gcaaggccga tagtttgagt 5160
tcttctactc aggcaagtga tgttattact aatcaaagaa gtattgcgac aacggttaat 5220
ttgcgtgatg gacagactct tttactcggt ggcctcactg attataaaaa cacttctcag 5280
gattctggcg taccgttcct gtctaaaatc cctttaatcg gcctcctgtt tagctcccgc 5340
tctgattcta acgaggaaag cacgttatac gtgctcgtca aagcaaccat agtacgcgcc 5400
ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 5460
tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc 5520
cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 5580
acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc 5640
ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt 5700
gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat 5760
tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 5820
ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta aatatttgct tatacaatct tcctgttttt 5880
ggggctttc tgattatcaa ccggggtaca tatgattgac atgctagttt tacgattacc 5940
gttcatcgat tctcttgttt gctccagact ctcaggcaat gacctgatag cctttgtaga 6000
gacctctcaa aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac ggttgaatat 6060
catattgatg gtgatttgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc tttacctaca 6120
cattactcag gcattgcatt taaaatatat gagggttcta aaaattttta tccttgcgtt 6180
gaaataaagg cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg tacaaccgat 6240
ttagctttat gctctgaggc tttattgctt aattttgcta attctttgcc ttgcctgtat 6300
gatttattgg atgttggaat cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta 6360
tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc 6420
agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat 6480
ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 6540
catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatttta taggttaatg 6600

[0337]

tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 6660
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 6720
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 6780
tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc 6840
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 6900
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 6960
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 7020
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag 7080
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga 7140
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 7200
ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga 7260
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 7320
tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 7380
ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 7440
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 7500
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 7560
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 7620
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 7680
aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 7740
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 7800
tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 7860
gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 7920
agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 7980
tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 8040
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt 8100
cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 8160
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 8220
acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg 8280
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 8340
ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 8400
tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg 8460
attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 8520
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gc 8562

<210> 4
<211> 564
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 合成启动子
<400> 4

cagccactat gggtctaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg 60
cctggttata attaacccag acatgtggct gctccccccc cccaacacct gctgcctgag 120
cctcaccccc accccggtgc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc 180
tctaaaaata accctgtccc tggtgggctg tgggggactg agggcaggct gtaacaggct 240

tgggggccag ggcttatacg tgcctgggac tcccaaagta ttactgttcc atgttcccgg 300
cgaagggcca gctgtccccc gccagctaga ctcagcactt agtttaggaa ccagtgagca 360
agtcagccct tggggcagcc catacaaggc catggggctg ggcaagctgc acgcctgggt 420
ccggggtggg cacggtgccc gggcaacgag ctgaaagctc atctgctctc aggggccccc 480
ccctggggac agcccctcct ggctagtcac accctgtagg ctcctctata taacccaggg 540
gcacaggggc tgcccccggg tcac 564

<210> 5
<211> 8409
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 5

gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60
ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 120
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180
ccttgtagtt aatgattaac ccgccatgct aattatctac gtagccatgt ctagacagcc 240
actatgggtc taggctgccc atgtaaggag gcaaggcctg gggacacccg agatgcctgg 300
ttataattaa cccagacatg tggctgctcc ccccccccaa cacctgctgc ctgagcctca 360
cccccacccc ggtgcctggg tcttaggctc tgtacaccat ggaggagaag ctcgctctaa 420
aaataaccct gtccctggtg ggctgtgggg gactgagggc aggctgtaac aggcttgggg 480
gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact gttccatgtt cccggcgaag 540
ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagtca 600
gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg 660
gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctccctg 720
gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct ctatataacc caggggcaca 780
ggggctgccc ccgggtcacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca 840
gccaggtaag tttagtcttt ttgtctttta tttcaggtcc cggatccggt ggtggtgcaa 900
atcaaagaac tgctcctcag tggatgttgc ctttacttct aggcctgtac ggaagtgtta 960
cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc cgcggccgcc accatgctgt ggtgggagga 1020
ggtggaggat tgttatgaaa gggaggacgt gcagaagaag acttttacca agtgggtgaa 1080
cgctcagttc agcaaatttg ggaagcagca catcgagaat ctgttttccg acctgcagga 1140
tgggagacgg ctgctggatc tgctggaagg actgactggc cagaagctgc ccaaagagaa 1200
ggggagcact agggtgcacg ccctgaacaa cgtgaacaaa gctctgagag tgctgcagaa 1260
caacaacgtg gatctggtga atattggcag tactgatatc gtggacggga accacaaact 1320
gacactgggc ctgatctgga acattattct gcactggcag gtgaaaaatg tgatgaagaa 1380
catcatggcc gggctgcagc agaccaattc cgagaagatc ctgctgtctt gggtgcggca 1440
gagcacccgc aactatcccc aggtgaacgt gattaacttc actacatcct ggagcgacgg 1500
gctggccctg aatgctctga ttcacagcca caggcctgat ctgttcgact ggaatagcgt 1560
ggtgtgccag cagtctgcca cacagcgcct ggaacatgcc ttcaatatcg ctcggtacca 1620
gctggggatc gaaaaactgc tggacccaga ggatgtggac actacatacc cagataaaaa 1680
gtctattctg atgtacatta ctagcctgtt ccaggtgctg ccacagcagg tgtctattga 1740
agccattcag gaggtggaaa tgctgccccg ccccccccaaa gtgactaaag aggagcattt 1800
tcagctgcat catcagatgc attacagcca gcagattacc gtgagcctgg ctcagggata 1860
tgagcgcacc agtagtccaa aaccacggtt caagtcctac gcttataccc aggctgccta 1920
cgtgacaact agcgacccta ctagatcccc ctttccatcc cagcacctgg aggccccaga 1980

[0338]

[0339]

```
ggacaagagc tttgggtcca gcctgatgga aagcgaggtg aatctggatc ggtaccagac 2040
agccctggag gaggtgctga gctggctgct gagtgctgaa gacacactgc aggcccaggg 2100
cgaaatttcc aatgacgtgg aagtggtgaa ggatcagttc cacacacacg agggctatat 2160
gatggacctg acagctcacc aggggcgcgt gggcaatatc ctgcagctgg gctctaaact 2220
gatcggcacc gggaaactga gtgaggacga ggaaacagaa gtgcaggagc agatgaacct 2280
gctgaacagc cgctgggagt gtctgagagt ggctagtatg gagaagcagt ccaacctgca 2340
ccgggtgctg atggacctgc agaaccagaa actgaaagag ctgaacgact ggctgacaaa 2400
gactgaggaa cgcacaagga agatggagga ggagccactg ggacccgacc tggaggatct 2460
gaagagacag gtgcagcagc ataaggtgct gcaggaggat ctggaacagg agcaggtgcg 2520
ggtgaactcc ctgacacata tggtggtggt ggtggacgaa tctagtggag atcacgccac 2580
cgccgccctg gaggaacagc tgaaggtgct gggggaccgg tgggccaaca tttgccggtg 2640
gaccgaggac aggtgggtgc tgctgcagga catcctgctg aaatggcaga ggctgaccga 2700
ggagcagtgt ctgtttagtg cttggctgag cgagaaagag gacgccgtga acaagatcca 2760
cacaaccggc tttaaggatc agaacgaaat gctgtctagc ctgcagaaac tggctgtgct 2820
gaaggccgat ctggagaaaa agaagcagag catgggcaaa ctgtatagcc tgaaacagga 2880
cctgctgagc accctgaaga acaagagcgt gacccagaag acagaagcct ggctggataa 2940
ctttgcccgc tgctgggaca acctggtgca gaaactggag aaaagtacag ctcagatctc 3000
tcaggctgtg accacaaccc agcctagcct gacccagaca accgtgatgg aaaccgtgac 3060
caccgtgaca acccgcgaac agatcctggt gaaacatgcc caggaagagc tgccacctcc 3120
acctccccag aagaagagaa ccctggagcg gctgcaggag ctgcaggaag ccactgacga 3180
actggacctg aagctgaggc aggccgaagt gattaagggg tcttggcagc ctgtgggcga 3240
tctgctgatt gattccctgc aggaccacct ggaaaaggtg aaggctctga gaggcgaaat 3300
tgctccactg aaggagaacg tgagtcatgt gaacgatctg gctagacagc tgacaacact 3360
gggcatccag ctgagcccat acaatctgag cacactggag gacctgaata ccaggtggaa 3420
gctgctgcag gtggctgtgg aagaccgggt gcggcagctg catgaggccc atcgcgactt 3480
cggaccagcc agccagcact ttctgagcac atccgtgcag gggccctggg agagggccat 3540
ttctcccaac aaggtgccct actatattaa tcacgagacc cagaccactt gttgggacca 3600
tcccaagatg acagaactgt accagtccct ggccgatctg aacaacgtga ggtttagcgc 3660
ttacagaacc gctatgaagc tgagacggct gcagaaggcc ctgtgcctgg atctgctgtc 3720
cctgtccgcc gcctgcgatg ccctggatca gcataatctg aagcagaacg atcagccaat 3780
ggatatcctg cagatcatca actgcctgac cactatctac gacaggctgg agcaggagca 3840
caacaacctg gtgaacgtgc ctctgtgcgt ggatatgtgc ctgaactggc tgctgaacgt 3900
gtatgacact gggcgcaccg gccggatcag agtgctgagt tttaaaactg ggattatctc 3960
cctgtgtaag gcccacctgg aggacaagta caggtacctg ttcaagcagg tggctagtag 4020
cactggattt tgtgaccagc gccgcctggg actgctgctg catgatagta tccagattcc 4080
tagacagctg ggagaggtgg ctagtttcgg aggatctaac atcgaaccca gcgtgcgcag 4140
ctgtttccag tttgccaata acaaacctga aatcgaggct gctctgttcc tggattggat 4200
gcgcctggaa ccacagagca tggtgtggct gcctgtgctg cacagagtgg ctgccgccga 4260
aactgccaag caccaggcta aatgcaacat ctgcaaggaa tgtcccatta tcggctttcg 4320
ctacaggagt ctgaaacatt ttaactacga tatttgccag agctgcttct tttccggaag 4380
agtggccaaa ggacacaaga tgcactaccc tatggtggaa tattgcaccc caactacatc 4440
tggcgaagat gtgcgcgatt ttgccaaggt gctgaagaat aagtttcgga ctaagaggta 4500
cttcgccaag caccccccgca tggggtatct gccagtgcag acagtgctgg aaggagacaa 4560
tatggagacc gatacaatgt gagcggccgc aataaaagat ctttattttc attagatctg 4620
```

[0340]

```
tgtgttggtt ttttgtgtgt ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa  4680
tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct  4740
cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct  4800
cagtgagcga gcgagcgcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct  4860
tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaagttcc agacgattga gcgtcaaaat  4920
gtaggtattt ccatgagcgt ttttcctgtt gcaatggctg gcggtaatat tgttctggat  4980
attaccagca aggccgatag tttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat  5040
caaagaagta ttgcgacaac ggttaatttg cgtgatggac agactctttt actcggtggc  5100
ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttcctgtc taaaatccct  5160
ttaatcggcc tcctgtttag ctcccgctct gattctaacg aggaaagcac gttatacgtg  5220
ctcgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt  5280
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt  5340
cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct  5400
ccctttaggg ttccgattta gtgatttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg  5460
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga  5520
gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc  5580
ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga  5640
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaaat  5700
atttgcttat acaatcttcc tgtttttggg gcttttctga ttatcaaccg gggtacatat  5760
gattgacatg ctagttttac gattaccgtt catcgattct cttgtttgct ccagactctc  5820
aggcaatgac ctgatagcct ttgtagagac ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg  5880
aatttatcag ctagaacggt tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt  5940
tctcacccgt ttgaatcttt acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag  6000
ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa ataaaggctt ctcccgcaaa agtattacag  6060
ggtcataatg tttttggtac aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat  6120
tttgctaatt ctttgccttg cctgtatgat ttattggatg ttggaagttc ctgatgcggt  6180
attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa  6240
tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc  6300
cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga  6360
gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg  6420
tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg  6480
gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa  6540
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga  6600
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc  6660
ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg  6720
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc  6780
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat  6840
tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg  6900
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag  6960
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa  7020
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc  7080
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca  7140
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc  7200
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc  7260
```

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 7320
ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 7380
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 7440
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 7500
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 7560
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 7620
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 7680
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttte 7740
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 7800
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcgtac atacctcgct ctgctaatcc 7860
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 7920
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 7980
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 8040
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 8100
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 8160
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 8220
ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 8280
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gggtttgagt 8340
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaccaag 8400
cggaagagc 8409

[0341]

<210> 6
<211> 8611
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 6

gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60
ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 120
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180
ccttgtagtt aatgattaac ccgccatgct aattatctac gtagccatgt ctagagttta 240
aacaagcttg catgtctaag ctagaccctt cagattaaaa ataactgagg taagggcctg 300
ggtaggggag gtggtgtgag acgctcctgt ctctcctcta tctgcccatc ggccctttgg 360
ggaggaggaa tgtgcccaag gactaaaaaa aggccatgga gccagagggg cgagggcaac 420
agacctttca tgggcaaacc ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480
gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540
agacatgtgg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgcct ctaaaaataa ccctgtccct 600
ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660
taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720
tgttcccggc gaagggccag ctgtcccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780
cagtgagcaa gtcagccctt ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840
cgcctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca 900
ggggcccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat 960
aacccagggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020
tcaggagcca gccagcggcg cgcccaggta agtttagtct ttttgtcttt tatttcaggt 1080
cccggatccg gtggtggtgc aaatcaaaga actgctcctc agtggatgtt gcctttactt 1140

[0342]

ctaggcctgt acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattgta cccgcggccg 1200
ccaccatgct gtggtgggag gaggtggagg attgttatga aagggaggac gtgcagaaga 1260
agacttttac caagtgggtg aacgctcagt tcagcaaatt tgggaagcag cacatcgaga 1320
atctgttttc cgacctgcag gatgggagac ggctgctgga tctgctggaa ggactgactg 1380
gccagaagct gcccaaagag aaggggagca ctagggtgca cgccctgaac aacgtgaaca 1440
aagctctgag agtgctgcag aacaacaacg tggatctggt gaatattggc agtactgata 1500
tcgtggacgg gaaccacaaa ctgacactgg gcctgatctg gaacattatt ctgcactggc 1560
aggtgaaaaa tgtgatgaag aacatcatgg ccgggctgca gcagaccaat tccgagaaga 1620
tcctgctgtc ttgggtgcgg cagagcaccc gcaactatcc ccaggtgaac gtgattaact 1680
tcactacatc ctggagcgac gggctggccc tgaatgctct gattcacagc cacaggcctg 1740
atctgttcga ctggaatagc gtggtgtgcc agcagtctgc cacacagcgc ctggaacatg 1800
ccttcaatat cgctcggtac cagctgggga tcgaaaaact gctggaccca gaggatgtgg 1860
acactacata cccagataaa aagtctattc tgatgtacat tactagcctg ttccaggtgc 1920
tgccacagca ggtgtctatt gaagccattc aggaggtgga aatgctgccc cgccccccca 1980
aagtgactaa agaggagcat tttcagctgc atcatcagat gcattacagc cagcagatta 2040
ccgtgagcct ggctcaggga tatgagcgca ccagtagtcc aaaaccacgg ttcaagtcct 2100
acgcttatac ccaggctgcc tacgtgacaa ctagcgaccc tactagatcc ccctttccat 2160
cccagcacct ggaggcccca gaggacaaga gctttgggtc cagcctgatg gaaagcgagg 2220
tgaatctgga tcggtaccag acagccctgg aggaggtgct gagctggctg ctgagtgctg 2280
aagacacact gcaggcccag ggcgaaattt ccaatgacgt ggaagtggtg aaggatcagt 2340
tccacacaca cgagggctat atgatggacc tgacagctca ccaggggcgc gtgggcaata 2400
tcctgcagct gggctctaaa ctgatcggca ccgggaaact gagtgaggac gaggaaacag 2460
aagtgcagga gcagatgaac ctgctgaaca gccgctggga gtgtctgaga gtggctagta 2520
tggagaagca gtccaacctg caccgggtgc tgatggacct gcagaaccag aaactgaaag 2580
agctgaacga ctggctgaca aagactgagg aacgcacaag gaagatggag gaggagccac 2640
tgggacccga cctggaggat ctgaagagac aggtgcagca gcataaggtg ctgcaggagg 2700
atctggaaca ggagcaggtg cgggtgaact ccctgacaca tatggtggtg gtggtggacg 2760
aatctagtgg agatcacgcc accgccgccc tggaggaaca gctgaaggtg ctgggggacc 2820
ggtgggccaa catttgccgg tggaccgagg acaggtgggt gctgctgcag gacatcctgc 2880
tgaaatggca gaggctgacc gaggagcagt gtctgtttag tgcttggctg agcgagaaag 2940
aggacgccgt gaacaagatc cacacaaccg gctttaagga tcagaacgaa atgctgtcta 3000
gcctgcagaa actggctgtg ctgaaggccg atctggagaa aaagaagcag agcatgggca 3060

aactgtatag cctgaaacag gacctgctga gcaccctgaa gaacaagagc gtgacccaga 3120
agacagaagc ctggctggat aactttgccc gctgctggga caacctggtg cagaaactgg 3180
agaaaagtac agctcagatc tctcaggctg tgaccacaac ccagcctagc ctgacccaga 3240
caaccgtgat ggaaaccgtg accaccgtga caacccgcga acagatcctg gtgaaacatg 3300
cccaggaaga gctgccacct ccacctcccc agaagaagag aaccctggag cggctgcagg 3360
agctgcagga agccactgac gaactggacc tgaagctgag gcaggccgaa gtgattaagg 3420
ggtcttggca gcctgtgggc gatctgctga ttgattccct gcaggaccac ctggaaaagg 3480
tgaaggctct gagaggcgaa attgctccac tgaaggagaa cgtgagtcat gtgaacgatc 3540
tggctagaca gctgacaaca ctgggcatcc agctgagccc atacaatctg agcacactgg 3600
aggacctgaa taccaggtgg aagctgctgc aggtggctgt ggaagaccgg gtgcggcagc 3660
tgcatgaggc ccatcgcgac ttcggaccag ccagccagca ctttctgagc acatccgtgc 3720

aggggccctg ggagagggcc atttctccca acaaggtgcc ctactatatt aatcacgaga 3780
cccagaccac ttgttgggac catcccaaga tgacagaact gtaccagtcc ctggccgatc 3840
tgaacaacgt gaggtttagc gcttacagaa ccgctatgaa gctgagacgg ctgcagaagg 3900
ccctgtgcct ggatctgctg tccctgtccg ccgcctgcga tgccctggat cagcataatc 3960
tgaagcagaa cgatcagcca atggatatcc tgcagatcat caactgcctg accactatct 4020
acgacaggct ggagcaggag cacaacaacc tggtgaacgt gcctctgtgc gtggatatgt 4080
gcctgaactg gctgctgaac gtgtatgaca ctgggcgcac cggccggatc agagtgctga 4140
gttttaaaac tgggattatc tccctgtgta aggcccacct ggaggacaag tacaggtacc 4200
tgttcaagca ggtggctagt agcactggat tttgtgacca gcgccgcctg ggactgctgc 4260
tgcatgatag tatccagatt cctagacagc tgggagaggt ggctagtttc ggaggatcta 4320
acatcgaacc cagcgtgcgc agctgtttcc agtttgccaa taacaaacct gaaatcgagg 4380
ctgctctgtt cctggattgg atgcgcctgg aaccacagag catggtgtgg ctgcctgtgc 4440
tgcacagagt ggctgccgcc gaaactgcca agcaccaggc taaatgcaac atctgcaagg 4500
aatgtcccat tatcggcttt cgctacagga gtctgaaaca ttttaactac gatatttgcc 4560
agagctgctt cttttccgga agagtggcca aaggacacaa gatgcactac cctatggtgg 4620
aatattgcac cccaactaca tctggcgaag atgtgcgcga ttttgccaag gtgctgaaga 4680
ataagtttcg gactaagagg tacttcgcca agcacccccg catggggtat ctgccagtgc 4740
agacagtgct ggaaggagac aatatggaga ccgatacaat gtgagcggcc gcaataaaag 4800
atctttattt tcattagatc tgtgtgttgg ttttttgtgt gtctagagca tggctacgta 4860
gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4920
actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc 4980
ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gccagctggc gtaatagcga 5040
agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggaagtt 5100
ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc gtttttcctg ttgcaatggc 5160
tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat agtttgagtt cttctactca 5220
ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca acggttaatt tgcgtgatgg 5280
acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac acttctcagg attctggcgt 5340
accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt agctcccgct ctgattctaa 5400
cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata gtacgcgccc tgtagcggcg 5460
cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc 5520
tagcgcccgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc 5580
gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgattta cggcacctcg 5640
accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 5700
tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg 5760
gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt 5820
cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa 5880
tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt cctgtttttg gggcttttct 5940
gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt acgattaccg ttcatcgatt 6000
ctcttgtttg ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc ctttgtagag acctctcaaa 6060
aatagctacc ctctccggca tgaatttatc agctagaacg gttgaatatc atattgatgg 6120
tgatttgact gtctccggcc tttctcaccc gtttgaatct ttacctacac attactcagg 6180
cattgcattt aaaatatatg agggttctaa aaatttttat ccttgcgttg aaataaaggc 6240
ttctcccgca aaagtattac agggtcataa tgtttttggt acaaccgatt tagctttatg 6300
ctctgaggct ttattgctta attttgctaa ttctttgcct tgcctgtatg atttattgga 6360

[0343]

[0344]

```
tgttggaagt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc     6420
atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac     6480
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga     6540
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa     6600
cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata     6660
atggtttctt agacgtcagg tggcacttttcggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt     6720
ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg     6780
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt     6840
ccctttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta     6900
aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc     6960
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa     7020
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc     7080
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt     7140
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact     7200
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac     7260
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata     7320
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta     7380
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg     7440
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat     7500
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt     7560
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga     7620
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa     7680
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag     7740
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac     7800
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc     7860
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat     7920
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat     7980
actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcgt     8040
acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt     8100
cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg     8160
gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta     8220
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg     8280
gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg     8340
tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc     8400
tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg     8460
gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat     8520
aaccgtatta ccgggtttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc     8580
agcgagtcag tgagcgacca agcggaagag c                                    8611
<210> 7
<211> 792
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 合成启动子
```

<400> 7

aagcttgcat gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60
aggggaggtg gtgtgagacg ctcctgtctc tcctctatct gcccatcggc cctttgggga 120
ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcga gggcaacaga 180
cctttcatgg gcaaaccttg gggccctgct gtctagcatg ccccactacg ggtctaggct 240
gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaacccaga 300
catgtggctg ccccccccc cccaacacct gctgcctcta aaaataaccc tgtccctggt 360
ggatcccctg catgcgaaga tcttcgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420
caggcttggg ggccagggct tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt 480
tcccggcgaa gggccagctg tcccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag 540
tgagcaagtc agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600
ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg 660
gcccctccct ggggacagcc cctcctggct agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac 720
ccaggggcac aggggctgcc ctcattctac caccacctcc acagcacaga cagacactca 780
ggagcagcca gc 792

<210> 8
<211> 8629
<212> DNA
<213> 腺相关病毒

<400> 8

[0345]

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60
tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120
gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag 180
agtttaaaca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 240
ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc 300
ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag 360
ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 420
gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480
taacccagac atgtggctgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct 540

gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 600
aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact 660
gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 720
aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa 780
gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct 900
ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 960
agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 1020
caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt 1080
tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc 1140
ggccgccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200
gaagaagact tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat 1260
cgagaatctg ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320
gactggccag aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt 1380

[0346]

```
gaacaaagct ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac 1440
tgatatcgtg gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca 1500
ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560
gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat 1620
taacttcact acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680
gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga 1740
acatgccttc aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800
tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860
ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920
ccccaaagtg actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca 1980
gattaccgtg agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040
gtcctacgct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt 2100
tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag 2160
cgaggtgaat ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220
tgctgaagac acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga 2280
tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340
caatatcctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga 2400
aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc 2460
tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520
gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580
gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640
ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt 2700
ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg 2760
ggaccggtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820
cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga 2880
gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct 2940
gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000
gggcaaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060
ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa 3120
actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac 3180
ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa 3240
acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct 3300
gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360
taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420
aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa 3480
cgatctggct agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac 3540
actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600
gcagctgcat gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660
cgtgcagggg ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca 3720
cgagacccag accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780
cgatctgaac aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840
gaaggccctg tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900
taatctgaag cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac 3960
tatctacgac aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020
```

[0347]

```
tatgtgcctg aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt    4080
gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag    4140
gtacctgttc aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact    4200
gctgctgcat gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg    4260
atctaacatc gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat    4320
cgaggctgct ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc    4380
tgtgctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg    4440
caaggaatgt cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat    4500
ttgccagagc tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat    4560
ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct    4620
gaagaataag tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc    4680
agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat    4740
aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcta gagtcgacca    4800
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta    4860
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca    4920
aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc    4980
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg    5040
cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc    5100
actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt    5160
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc    5220
ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa    5280
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc    5340
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg    5400
cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc    5460
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc    5520
gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca    5580
ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact    5640
acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg    5700
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt    5760
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct    5820
tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga    5880
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa    5940
tctaaagtat atatgagtaa aaatattccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag    6000
gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc    6060
aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat    6120
ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca    6180
caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg    6240
gttcttttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg    6300
cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact    6360
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatcc    6420
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg    6480
cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt    6540
actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc    6660
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc    6660
```

[0348]

```
gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga    6720
ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc    6780
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt    6840
atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga    6900
accggtaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg    6960
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac    7020
ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga    7080
ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc    7140
cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg    7200
cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg    7260
tactgagagt gcaccatatg cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc    7320
gcatcaggcg attccaacat ccaataaatc atacaggcaa ggcaaagaat tagcaaaatt    7380
aagcaataaa gcctcagagc ataaagctaa atcggttgta ccaaaaacat tatgaccctg    7440
taatactttt gcgggagaag cctttatttc aacgcaagga taaaaatttt tagaaccctc    7500
atatatttta aatgcaatgc ctgagtaatg tgtaggtaaa gattcaaacg ggtgagaaag    7560
gccggagaca gtcaaatcac catcaatatg atattcaacc gttctagctg ataaattcat    7620
gccggagagg gtagctattt ttgagaggtc tctacaaagg ctatcaggtc attgcctgag    7680
agtctggagc aaacaagaga atcgatgaac ggtaatcgta aaactagcat gtcaatcata    7740
tgtaccccgg ttgataatca gaaaagcccc aaaaacagga agattgtata agcaaatatt    7800
taaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca    7860
ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag    7920
atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc    7980
aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc    8040
taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc    8100
ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa    8160
gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc    8220

acacccgccg cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtact atggttgctt tgacgagcac    8280
gtataacgtg ctttcctcgt tagaatcaga gcgggagcta aacaggaggc cgattaaagg    8340
gattttagac aggaacggta cgccagaatc ctgagaagtg tttttataat cagtgaggcc    8400
accgagtaaa agagtctgtc catcacgcaa attaaccgtt gtcgcaatac ttctttgatt    8460
agtaataaca tcacttgcct gagtagaaga actcaaacta tcggccttgc tggtaatatc    8520
cagaacaata ttaccgccag ccattgcaac ggaatcgcca ttcgccattc aggctgcgca    8580
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagct                8629
```

<210> 9
<211> 4977
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 9

```
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg      60
tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag     120
gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag     180
agtttaaaca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag     240
ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc     300
```

[0349]

```
ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag      360
ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg      420
gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat      480
taacccagac atgtggctgc ccccccccca ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct      540
gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc      600
aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact      660
gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt      720
aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa      780
gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg      840
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct      900
ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac      960
agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt     1020
caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt     1080
tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc     1140
ggccgccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca     1200
gaagaagact tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat     1260
cgagaatctg ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact     1320
gactggccag aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt     1380
gaacaaagct ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac     1440
tgatatcgtg gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca     1500
ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga     1560
gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat     1620
taacttcact acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag     1680
gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga     1740
acatgccttc aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga     1800
tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca     1860
ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc     1920
ccccaaagtg actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca     1980
gattaccgtg agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa     2040
gtcctacgct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt     2100
tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag     2160
cgaggtgaat ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag     2220
tgctgaagac acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga     2280
tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg     2340
caatatcctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga     2400
aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc     2460
tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact     2520
gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga     2580
gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca     2640
ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt     2700
ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg     2760
ggaccggtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat     2820
cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga     2880
gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct     2940
```

[0350]

gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000
gggcaaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060
ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa 3120
actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac 3180
ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa 3240
acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct 3300
gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360
taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420
aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa 3480
cgatctggct agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac 3540
actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600
gcagctgcat gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660
cgtgcagggg ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca 3720
cgagacccag accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780
cgatctgaac aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840
gaaggccctg tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900
taatctgaag cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac 3960
tatctacgac aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020
tatgtgcctg aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt 4080
gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140
gtacctgttc aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact 4200
gctgctgcat gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg 4260
atctaacatc gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat 4320
cgaggctgct ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc 4380
tgtgctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg 4440
caaggaatgt cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat 4500
ttgccagagc tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat 4560
ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct 4620
gaagaataag tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680
agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat 4740
aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcta gagtcgacca 4800
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta 4860
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca 4920
aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 4977

序列表

<110> 全国儿童医院研究所

<120> 用于治疗肌营养不良的肌肉特异性
微小肌营养不良蛋白的腺相关病毒载体递送

<130> 28335/53169

<150> US 62/686,668

<151> 2018-06-18

<150> US 62/740,402

<151> 2018-10-02

<150> US 62/752,841

<151> 2018-10-30

<150> US 62/823,649

<151> 2019-03-25

<150> US 62/860,220

<151> 2019-06-11

<160> 9

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 3579

<212> DNA

[0001]

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca gaagaagact 60
tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat cgagaatctg 120
ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact gactggccag 180
aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt gaacaaagct 240
ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac tgatatcgtg 300
gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca ctggcaggtg 360
aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga gaagatcctg 420
ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat taacttcact 480
acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag gcctgatctg 540
ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga acatgccttc 600
aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga tgtggacact 660
acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca ggtgctgcca 720
cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc ccccaaagtg 780
actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca gattaccgtg 840
agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa gtcctacgct 900
tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt tccatcccag 960
cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag cgaggtgaat 1020
ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag tgctgaagac 1080
acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga tcagttccac 1140
acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg caatatcctg 1200

[0002]

cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga aacagaagtg 1260
caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc tagtatggag 1320
aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact gaaagagctg 1380
aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga gccactggga 1440
cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca ggaggatctg 1500
gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt ggacgaatct 1560
agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg ggaccggtgg 1620
gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat cctgctgaaa 1680
tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga gaaagaggac 1740
gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct gtctagcctg 1800
cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat gggcaaactg 1860
tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac ccagaagaca 1920
gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa actggagaaa 1980
agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac ccagacaacc 2040
gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa acatgcccag 2100
gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct gcaggagctg 2160
caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat taaggggtct 2220
tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga aaaggtgaag 2280
gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa cgatctggct 2340
agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac actggaggac 2400
ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg gcagctgcat 2460
gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc cgtgcagggg 2520
ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca cgagacccag 2580
accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc cgatctgaac 2640
aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca gaaggccctg 2700
tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca taatctgaag 2760
cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac tatctacgac 2820
aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga tatgtgcctg 2880
aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt gctgagtttt 2940
aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag gtacctgttc 3000
aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact gctgctgcat 3060
gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg atctaacatc 3120
gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat cgaggctgct 3180
ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc tgtgctgcac 3240
agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg caaggaatgt 3300
cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat ttgccagagc 3360
tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat ggtggaatat 3420
tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct gaagaataag 3480
tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc agtgcagaca 3540
gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtga 3579

<210> 2
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成启动子
<400> 2
gtttaaacaa gcttgcatgt ctaagctaga cccttcagat taaaaataac tgaggtaagg 60
gcctgggtag gggaggtggt gtgagacgct cctgtctctc ctctatctgc ccatcggccc 120
tttggggagg aggaatgtgc ccaaggacta aaaaaaggcc atggagccag aggggcgagg 180
gcaacagacc tttcatgggc aaaccttggg gccctgctgt ctagcatgcc ccactacggg 240
tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct ggttataatt 300
aacccagaca tgtggctgcc ccccccccccc caacacctgc tgcctctaaa aataaccctg 360
tccctggtgg atcccctgca tgcgaagatc ttcgaacaag gctgtggggg actgagggca 420
ggctgtaaca ggcttggggg ccagggctta tacgtgcctg ggactcccaa agtattactg 480
ttccatgttc ccggcgaagg gccagctgtc ccccgccagc tagactcagc acttagttta 540
ggaaccagtg agcaagtcag cccttggggc agcccataca aggccatggg gctgggcaag 600
ctgcacgcct gggtccgggg tgggcacggt gcccgggcaa cgagctgaaa gctcatctgc 660
tctcaggggc ccctccctgg ggacagcccc tcctggctag tcacaccctg taggctcctc 720
tatataaccc aggggcacag gggctgccct cattctacca ccacctccac agcacagaca 780
gacactcagg agccagccag cggcgcgccc 810
<210> 3
<211> 8562
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 3
[0003]
gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgcgcgc 60
tcgctcgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc 120
ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 180
cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctacg tagccatgct ctagagttta 240
aacaagcttg catgtctaag ctagaccctt cagattaaaa ataactgagg taagggcctg 300
ggtaggggag gtggtgtgag acgctcctgt ctctcctcta tctgcccatc ggccctttgg 360
ggaggaggaa tgtgcccaag gactaaaaaa aggccatgga gccagagggg cgagggcaac 420
agacctttca tgggcaaacc ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480
gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540
agacatgtgg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgcct ctaaaaataa ccctgtccct 600
ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660
taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720
tgttcccggc gaagggccag ctgtcccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780
cagtgagcaa gtcagcccct ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840
cgcctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca 900
ggggcccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat 960
aacccagggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020
tcaggagcag ccagcggcgc gcccaggtaa gtttagtctt tttgtctttt atttcaggtc 1080
ccggatccgg tggtggtgca aatcaaagaa ctgctcctca gtggatgttg cctttacttc 1140
taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc ggaattgtac ccgcggccgc 1200
caccatgctg tggtgggagg aggtggagga ttgttatgaa agggaggacg tgcagaagaa 1260
gacttttacc aagtgggtga acgctcagtt cagcaaattt gggaagcagc acatcgagaa 1320

[0004]

tctgttttcc gacctgcagg atgggagacg gctgctggat ctgctggaag gactgactgg 1380
ccagaagctg cccaaagaga aggggagcac tagggtgcac gccctgaaca acgtgaacaa 1440
agctctgaga gtgctgcaga acaacaacgt ggatctggtg aatattggca gtactgatat 1500
cgtggacggg aaccacaaac tgacactggg cctgatctgg aacattattc tgcactggca 1560
ggtgaaaaat gtgatgaaga acatcatggc cgggctgcag cagaccaatt ccgagaagat 1620
cctgctgtct tgggtgcggc agagcacccg caactatccc caggtgaacg tgattaactt 1680
cactacatcc tggagcgacg ggctggccct gaatgctctg attcacagcc acaggcctga 1740
tctgttcgac tggaatagcg tggtgtgcca gcagtctgcc acacagcgcc tggaacatgc 1800
cttcaatatc gctcggtacc agctggggat cgaaaaactg ctggacccag aggatgtgga 1860
cactacatac ccagataaaa agtctattct gatgtacatt actagcctgt tccaggtgct 1920
gccacagcag gtgtctattg aagccattca ggaggtggaa atgctgcccc gccccccaa 1980
agtgactaaa gaggagcatt ttcagctgca tcatcagatg cattacagcc agcagattac 2040
cgtgagcctg gctcagggat atgagcgcac cagtagtcca aaaccacggt tcaagtccta 2100
cgcttatacc caggctgcct acgtgacaac tagcgaccct actagatccc cctttccatc 2160
ccagcacctg gaggccccag aggacaagag ctttgggtcc agcctgatgg aaagcgaggt 2220
gaatctggat cggtaccaga cagccctgga ggaggtgctg agctggctgc tgagtgctga 2280
agacacactg caggcccagg gcgaaatttc caatgacgtg gaagtggtga aggatcagtt 2340
ccacacacac gagggctata tgatggacct gacagctcac caggggcgcg tgggcaatat 2400
cctgcagctg ggctctaaac tgatcggcac cgggaaactg agtgaggacg aggaaacaga 2460
agtgcaggag cagatgaacc tgctgaacag ccgctgggag tgtctgagag tggctagtat 2520
ggagaagcag tccaacctgc accgggtgct gatggacctg cagaaccaga aactgaaaga 2580
gctgaacgac tggctgacaa agactgagga acgcacaagg aagatggagg aggagccact 2640
gggacccgac ctggaggatc tgaagagaca ggtgcagcag cataaggtgc tgcaggagga 2700
tctggaacag gagcaggtgc gggtgaactc cctgacacat atggtggtgg tggtggacga 2760
atctagtgga gatcacgcca ccgccgccct ggaggaacag ctgaaggtgc tgggggaccg 2820
gtgggccaac atttgccggt ggaccgagga caggtgggtg ctgctgcagg acatcctgct 2880
gaaatggcag aggctgaccg aggagcagtg tctgtttagt gcttggctga gcgagaaaga 2940
ggacgccgtg aacaagatcc acacaaccgg ctttaaggat cagaacgaaa tgctgtctag 3000
cctgcagaaa ctggctgtgc tgaaggccga tctggagaaa aagaagcaga gcatgggcaa 3060
actgtatagc ctgaaacagg acctgctgag caccctgaag aacaagagcg tgacccagaa 3120
gacagaagcc tggctggata actttgcccg ctgctgggac aacctggtgc agaaactgga 3180
gaaaagtaca gctcagatct ctcaggctgt gaccacaacc cagcctagcc tgacccagac 3240
aaccgtgatg gaaaccgtga ccaccgtgac aacccgcgaa cagatcctgg tgaaacatgc 3300
ccaggaagag ctgccacctc cacctcccca gaagaagaga accctggagc ggctgcagga 3360
gctgcaggaa gccactgacg aactggacct gaagctgagg caggccgaag tgattaaggg 3420
gtcttggcag cctgtgggcg atctgctgat tgattccctg caggaccacc tggaaaaggt 3480
gaaggctctg agaggcgaaa ttgctccact gaaggagaac gtgagtcatg tgaacgatct 3540
ggctagacag ctgacaacac tgggcatcca gctgagccca tacaatctga gcacactgga 3600
ggacctgaat accaggtgga agctgctgca ggtggctgtg gaagaccggg tgcggcagct 3660
gcatgaggcc catcgcgact tcggaccagc cagccagcac tttctgagca catccgtgca 3720
ggggccctgg gagagggcca tttctcccaa caaggtgccc tactatatta atcacgagac 3780
ccagaccact tgttgggacc atcccaagat gacagaactg taccagtccc tggccgatct 3840
gaacaacgtg aggtttagcg cttacagaac cgctatgaag ctgagacggc tgcagaaggc 3900
cctgtgcctg gatctgctgt ccctgtccgc cgcctgcgat gccctggatc agcataatct 3960

[0005]

gaagcagaac gatcagccaa tggatatcct gcagatcatc aactgcctga ccactatcta 4020
cgacaggctg gagcaggagc acaacaacct ggtgaacgtg cctctgtgcg tggatatgtg 4080
cctgaactgg ctgctgaacg tgtatgacac tgggcgcacc ggccggatca gagtgctgag 4140
ttttaaaact gggattatct ccctgtgtaa ggcccacctg gaggacaagt acaggtacct 4200
gttcaagcag gtggctagta gcactggatt ttgtgaccag cgccgcctgg gactgctgct 4260
gcatgatagt atccagattc ctagacagct gggagaggtg gctagtttcg gaggatctaa 4320
catcgaaccc agcgtgcgca gctgtttcca gtttgccaat aacaaacctg aaatcgaggc 4380
tgctctgttc ctggattgga tgcgcctgga accacagagc atggtgtggc tgcctgtgct 4440
gcacagagtg gctgccgccg aaactgccaa gcaccaggct aaatgcaaca tctgcaagga 4500
atgtcccatt atcggctttc gctacaggag tctgaaacat tttaactacg atatttgcca 4560
gagctgcttc ttttccggaa gagtggccaa aggacacaag atgcactacc ctatggtgga 4620
atattgcacc ccaactacat ctggcgaaga tgtgcgcgat tttgccaagg tgctgaagaa 4680
taagtttcgg actaagaggt acttcgccaa gcacccccgc atggggtatc tgccagtgca 4740
gacagtgctg gaaggagaca atatggagac cgatacaatg tgagcggccg caataaaaga 4800
tctttatttt cattagatct gtgtgttggt tttttgtgtg tctagagcat ggctacgtag 4860
ataagtagca tggcgggtta atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca 4920
ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc 4980
cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagctggcgt aatagcgaag 5040
aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgattcc 5100
gttgcaatgg ctggcggtaa tattgttctg gatattacca gcaaggccga tagtttgagt 5160
tcttctactc aggcaagtga tgttattact aatcaaagaa gtattgcgac aacggttaat 5220
ttgcgtgatg gacagactct tttactcggt ggcctcactg attataaaaa cacttctcag 5280
gattctggcg taccgttcct gtctaaaatc cctttaatcg gcctcctgtt tagctcccgc 5340
tctgattcta acgaggaaag cacgttatac gtgctcgtca aagcaaccat agtacgcgcc 5400
ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 5460
tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc 5520
cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 5580
acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc 5640
ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt 5700
gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat 5760
tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 5820
ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta aatatttgct tatacaatct tcctgttttt 5880
ggggctttc tgattatcaa ccggggtaca tatgattgac atgctagttt tacgattacc 5940
gttcatcgat tctcttgttt gctccagact ctcaggcaat gacctgatag cctttgtaga 6000
gacctctcaa aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac ggttgaatat 6060
catattgatg gtgatttgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc tttacctaca 6120
cattactcag gcattgcatt taaaatatat gagggttcta aaaatttta tccttgcgtt 6180
gaaataaagg cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg tacaaccgat 6240
ttagctttat gctctgaggc tttattgctt aattttgcta attctttgcc ttgcctgtat 6300
gatttattgg atgttggaat cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta 6360
tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc 6420
agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat 6480
ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 6540
catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatttta taggttaatg 6600

[0006]

tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 6660
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 6720
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 6780
tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc 6840
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 6900
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 6960
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 7020
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag 7080
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga 7140
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 7200
ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga 7260
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 7320
tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 7380
ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 7440
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 7500
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 7560
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 7620
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 7680
aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 7740
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 7800
tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 7860
gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 7920
agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 7980
tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 8040
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt 8100
cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 8160
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 8220
acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg 8280
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 8340
ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 8400
tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg 8460
attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 8520
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gc 8562

<210> 4
<211> 564
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 合成启动子
<400> 4

cagccactat gggtctaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg 60
cctggttata attaacccag acatgtggct gctccccccc cccaacacct gctgcctgag 120
cctcaccccc accccggtgc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc 180
tctaaaaata accctgtccc tggtgggctg tgggggactg agggcaggct gtaacaggct 240

tgggggccag ggcttatacg tgcctgggac tcccaaagta ttactgttcc atgttcccgg 300
cgaagggcca gctgtccccc gccagctaga ctcagcactt agtttaggaa ccagtgagca 360
agtcagccct tggggcagcc catacaaggc catggggctg ggcaagctgc acgcctgggt 420
ccggggtggg cacggtgccc gggcaacgag ctgaaagctc atctgctctc aggggcccct 480
ccctggggac agcccctcct ggctagtcac accctgtagg ctcctctata taacccaggg 540
gcacaggggc tgcccccggg tcac 564

<210> 5
<211> 8409
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 5

gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60
ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 120
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180
ccttgtagtt aatgattaac ccgccatgct aattatctac gtagccatgt ctagacagcc 240
actatgggtc taggctgccc atgtaaggag gcaaggcctg gggacacccg agatgcctgg 300
ttataattaa cccagacatg tggctgctcc ccccccccaa cacctgctgc ctgagcctca 360
cccccacccc ggtgcctggg tcttaggctc tgtacaccat ggaggagaag ctcgctctaa 420
aaataaccct gtccctggtg ggctgtgggg gactgagggc aggctgtaac aggcttgggg 480
gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact gttccatgtt cccggcgaag 540
ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagtca 600
gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg 660
gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctccctg 720
gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct ctatataacc caggggcaca 780
ggggctgccc ccgggtcacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca 840
gccaggtaag tttagtcttt ttgtctttta tttcaggtcc cggatccggt ggtggtgcaa 900
atcaaagaac tgctcctcag tggatgttgc ctttacttct aggcctgtac ggaagtgtta 960
cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc cgcggccgcc accatgctgt ggtgggagga 1020
ggtggaggat tgttatgaaa gggaggacgt gcagaagaag acttttacca agtgggtgaa 1080
cgctcagttc agcaaatttg ggaagcagca catcgagaat ctgttttccg acctgcagga 1140
tgggagacgg ctgctggatc tgctggaagg actgactggc cagaagctgc ccaaagagaa 1200
ggggagcact agggtgcacg ccctgaacaa cgtgaacaaa gctctgagag tgctgcagaa 1260
caacaacgtg gatctggtga atattggcag tactgatatc gtggacggga accacaaact 1320
gacactgggc ctgatctgga acattattct gcactggcag gtgaaaaatg tgatgaagaa 1380
catcatggcc gggctgcagc agaccaattc cgagaagatc ctgctgtctt gggtgcggca 1440
gagcacccgc aactatcccc aggtgaacgt gattaacttc actacatcct ggagcgacgg 1500
gctggccctg aatgctctga ttcacagcca caggcctgat ctgttcgact ggaatagcgt 1560
ggtgtgccag cagtctgcca cacagcgcct ggaacatgcc ttcaatatcg ctcggtacca 1620
gctggggatc gaaaaactgc tggacccaga ggatgtggac actacatacc cagataaaaa 1680
gtctattctg atgtacatta ctagcctgtt ccaggtgctg ccacagcagg tgtctattga 1740
agccattcag gaggtggaaa tgctgccccg ccccccccaaa gtgactaaag aggagcattt 1800
tcagctgcat catcagatgc attacagcca gcagattacc gtgagcctgg ctcagggata 1860
tgagcgcacc agtagtccaa aaccacggtt caagtcctac gcttataccc aggctgccta 1920
cgtgacaact agcgacccta ctagatcccc ctttccatcc cagcacctgg aggccccaga 1980

[0007]

[0008]

ggacaagagc tttgggtcca gcctgatgga aagcgaggtg aatctggatc ggtaccagac 2040
agccctggag gaggtgctga gctggctgct gagtgctgaa gacacactgc aggcccaggg 2100
cgaaatttcc aatgacgtgg aagtggtgaa ggatcagttc cacacacacg agggctatat 2160
gatggacctg acagctcacc aggggcgcgt gggcaatatc ctgcagctgg gctctaaact 2220
gatcggcacc gggaaactga gtgaggacga ggaaacagaa gtgcaggagc agatgaacct 2280
gctgaacagc cgctgggagt gtctgagagt ggctagtatg gagaagcagt ccaacctgca 2340
ccgggtgctg atggacctgc agaaccagaa actgaaagag ctgaacgact ggctgacaaa 2400
gactgaggaa cgcacaagga agatggagga ggagccactg ggacccgacc tggaggatct 2460
gaagagacag gtgcagcagc ataaggtgct gcaggaggat ctggaacagg agcaggtgcg 2520
ggtgaactcc ctgacacata tggtggtggt ggtggacgaa tctagtggag atcacgccac 2580
cgccgccctg gaggaacagc tgaaggtgct gggggaccgg tgggccaaca tttgccggtg 2640
gaccgaggac aggtgggtgc tgctgcagga catcctgctg aaatggcaga ggctgaccga 2700
ggagcagtgt ctgtttagtg cttggctgag cgagaaagag gacgccgtga acaagatcca 2760
cacaaccggc tttaaggatc agaacgaaat gctgtctagc ctgcagaaac tggctgtgct 2820
gaaggccgat ctggagaaaa agaagcagag catgggcaaa ctgtatagcc tgaaacagga 2880
cctgctgagc accctgaaga acaagagcgt gacccagaag acagaagcct ggctggataa 2940
ctttgcccgc tgctgggaca acctggtgca gaaactggag aaaagtacag ctcagatctc 3000
tcaggctgtg accacaaccc agcctagcct gacccagaca accgtgatgg aaaccgtgac 3060
caccgtgaca acccgcgaac agatcctggt gaaacatgcc caggaagagc tgccacctcc 3120
acctccccag aagaagagaa ccctggagcg gctgcaggag ctgcaggaag ccactgacga 3180
actggacctg aagctgaggc aggccgaagt gattaagggg tcttggcagc ctgtgggcga 3240
tctgctgatt gattccctgc aggaccacct ggaaaaggtg aaggctctga gaggcgaaat 3300
tgctccactg aaggagaacg tgagtcatgt gaacgatctg gctagacagc tgacaacact 3360
gggcatccag ctgagcccat acaatctgag cacactggag gacctgaata ccaggtggaa 3420
gctgctgcag gtggctgtgg aagaccgggt gcggcagctg catgaggccc atcgcgactt 3480
cggaccagcc agccagcact ttctgagcac atccgtgcag gggccctggg agagggccat 3540
ttctcccaac aaggtgccct actatattaa tcacgagacc cagaccactt gttgggacca 3600
tcccaagatg acagaactgt accagtccct ggccgatctg aacaacgtga ggtttagcgc 3660
ttacagaacc gctatgaagc tgagacggct gcagaaggcc ctgtgcctgg atctgctgtc 3720
cctgtccgcc gcctgcgatg ccctggatca gcataatctg aagcagaacg atcagccaat 3780
ggatatcctg cagatcatca actgcctgac cactatctac gacaggctgg agcaggagca 3840
caacaacctg gtgaacgtgc ctctgtgcgt ggatatgtgc ctgaactggc tgctgaacgt 3900
gtatgacact gggcgcaccg gccggatcag agtgctgagt tttaaaactg ggattatctc 3960
cctgtgtaag gcccacctgg aggacaagta caggtacctg ttcaagcagg tggctagtag 4020
cactggattt tgtgaccagc gccgcctggg actgctgctg catgatagta tccagattcc 4080
tagacagctg ggagaggtgg ctagtttcgg aggatctaac atcgaaccca gcgtgcgcag 4140
ctgtttccag tttgccaata acaaacctga aatcgaggct gctctgttcc tggattggat 4200
gcgcctggaa ccacagagca tggtgtggct gcctgtgctg cacagagtgg ctgccgccga 4260
aactgccaag caccaggcta aatgcaacat ctgcaaggaa tgtcccatta tcggctttcg 4320
ctacaggagt ctgaaacatt ttaactacga tatttgccag agctgcttct tttccggaag 4380
agtggccaaa ggacacaaga tgcactaccc tatggtggaa tattgcaccc caactacatc 4440
tggcgaagat gtgcgcgatt ttgccaaggt gctgaagaat aagtttcgga ctaagaggta 4500
cttcgccaag caccccccgca tggggtatct gccagtgcag acagtgctgg aaggagacaa 4560
tatggagacc gatacaatgt gagcggccgc aataaaagat ctttattttc attagatctg 4620

[0009]

tgtgttggtt ttttgtgtgt ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa 4680
tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 4740
cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 4800
cagtgagcga gcgagcgcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct 4860
tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaagttcc agacgattga gcgtcaaaat 4920
gtaggtattt ccatgagcgt ttttcctgtt gcaatggctg gcggtaatat tgttctggat 4980
attaccagca aggccgatag tttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat 5040
caaagaagta ttgcgacaac ggttaatttg cgtgatggac agactctttt actcggtggc 5100
ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttcctgtc taaaatccct 5160
ttaatcggcc tcctgtttag ctcccgctct gattctaacg aggaaagcac gttatacgtg 5220
ctcgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 5280
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt 5340
cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 5400
ccctttaggg ttccgattta gtgatttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg 5460
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga 5520
gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc 5580
ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 5640
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaaat 5700
atttgcttat acaatcttcc tgtttttggg gcttttctga ttatcaaccg gggtacatat 5760
gattgacatg ctagttttac gattaccgtt catcgattct cttgtttgct ccagactctc 5820
aggcaatgac ctgatagcct ttgtagagac ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg 5880
aatttatcag ctagaacggt tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt 5940
tctcacccgt ttgaatcttt acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag 6000
ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa ataaaggctt ctcccgcaaa agtattacag 6060
ggtcataatg tttttggtac aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat 6120
tttgctaatt ctttgccttg cctgtatgat ttattggatg ttggaagttc ctgatgcggt 6180
attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa 6240
tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc 6300
cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga 6360
gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg 6420
tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg 6480
gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa 6540
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 6600
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc 6660
ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 6720
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 6780
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 6840
tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 6900
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 6960
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 7020
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 7080
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 7140
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 7200
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 7260

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 7320
ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 7380
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 7440
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 7500
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 7560
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 7620
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 7680
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttte 7740
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 7800
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcgtac atacctcgct ctgctaatcc 7860
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 7920
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 7980
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 8040
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 8100
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 8160
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 8220
ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 8280
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gggtttgagt 8340
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaccaag 8400
cggaagagc 8409

[0010]

<210> 6
<211> 8611
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 6

gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60
ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 120
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180
ccttgtagtt aatgattaac ccgccatgct aattatctac gtagccatgt ctagagttta 240
aacaagcttg catgtctaag ctagaccctt cagattaaaa ataactgagg taagggcctg 300
ggtaggggag gtggtgtgag acgctcctgt ctctcctcta tctgcccatc ggccctttgg 360
ggaggaggaa tgtgcccaag gactaaaaaa aggccatgga gccagagggg cgagggcaac 420
agacctttca tgggcaaacc ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480
gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540
agacatgtgg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgcct ctaaaaataa ccctgtccct 600
ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660
taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720
tgttcccggc gaagggccag ctgtcccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780
cagtgagcaa gtcagccctt ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840
cgcctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca 900
ggggcccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat 960
aacccagggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020
tcaggagcca gccagcggcg cgcccaggta agtttagtct ttttgtcttt tatttcaggt 1080
cccggatccg gtggtggtgc aaatcaaaga actgctcctc agtggatgtt gcctttactt 1140

[0011]

ctaggcctgt acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattgta cccgcggccg 1200
ccaccatgct gtggtgggag gaggtggagg attgttatga aagggaggac gtgcagaaga 1260
agacttttac caagtgggtg aacgctcagt tcagcaaatt tgggaagcag cacatcgaga 1320
atctgttttc cgacctgcag gatgggagac ggctgctgga tctgctggaa ggactgactg 1380
gccagaagct gcccaaagag aaggggagca ctagggtgca cgccctgaac aacgtgaaca 1440
aagctctgag agtgctgcag aacaacaacg tggatctggt gaatattggc agtactgata 1500
tcgtggacgg gaaccacaaa ctgacactgg gcctgatctg gaacattatt ctgcactggc 1560
aggtgaaaaa tgtgatgaag aacatcatgg ccgggctgca gcagaccaat tccgagaaga 1620
tcctgctgtc ttgggtgcgg cagagcaccc gcaactatcc ccaggtgaac gtgattaact 1680
tcactacatc ctggagcgac gggctggccc tgaatgctct gattcacagc cacaggcctg 1740
atctgttcga ctggaatagc gtggtgtgcc agcagtctgc cacacagcgc ctggaacatg 1800
ccttcaatat cgctcggtac cagctgggga tcgaaaaact gctggaccca gaggatgtgg 1860
acactacata cccagataaa aagtctattc tgatgtacat tactagcctg ttccaggtgc 1920
tgccacagca ggtgtctatt gaagccattc aggaggtgga aatgctgccc cgccccccca 1980
aagtgactaa agaggagcat tttcagctgc atcatcagat gcattacagc cagcagatta 2040
ccgtgagcct ggctcaggga tatgagcgca ccagtagtcc aaaaccacgg ttcaagtcct 2100
acgcttatac ccaggctgcc tacgtgacaa ctagcgaccc tactagatcc ccctttccat 2160
cccagcacct ggaggcccca gaggacaaga gctttgggtc cagcctgatg gaaagcgagg 2220
tgaatctgga tcggtaccag acagccctgg aggaggtgct gagctggctg ctgagtgctg 2280
aagacacact gcaggcccag ggcgaaattt ccaatgacgt ggaagtggtg aaggatcagt 2340
tccacacaca cgagggctat atgatggacc tgacagctca ccaggggcgc gtgggcaata 2400
tcctgcagct gggctctaaa ctgatcggca ccgggaaact gagtgaggac gaggaaacag 2460
aagtgcagga gcagatgaac ctgctgaaca gccgctggga gtgtctgaga gtggctagta 2520
tggagaagca gtccaacctg caccgggtgc tgatggacct gcagaaccag aaactgaaag 2580
agctgaacga ctggctgaca aagactgagg aacgcacaag gaagatggag gaggagccac 2640
tgggacccga cctggaggat ctgaagagac aggtgcagca gcataaggtg ctgcaggagg 2700
atctggaaca ggagcaggtg cgggtgaact ccctgacaca tatggtggtg gtggtggacg 2760
aatctagtgg agatcacgcc accgccgccc tggaggaaca gctgaaggtg ctgggggacc 2820
ggtgggccaa catttgccgg tggaccgagg acaggtgggt gctgctgcag gacatcctgc 2880
tgaaatggca gaggctgacc gaggagcagt gtctgtttag tgcttggctg agcgagaaag 2940
aggacgccgt gaacaagatc cacacaaccg gctttaagga tcagaacgaa atgctgtcta 3000
gcctgcagaa actggctgtg ctgaaggccg atctggagaa aaagaagcag agcatgggca 3060

aactgtatag cctgaaacag gacctgctga gcaccctgaa gaacaagagc gtgacccaga 3120
agacagaagc ctggctggat aactttgccc gctgctggga caacctggtg cagaaactgg 3180
agaaaagtac agctcagatc tctcaggctg tgaccacaac ccagcctagc ctgacccaga 3240
caaccgtgat ggaaaccgtg accaccgtga caacccgcga acagatcctg gtgaaacatg 3300
cccaggaaga gctgccacct ccacctcccc agaagaagag aaccctggag cggctgcagg 3360
agctgcagga agccactgac gaactggacc tgaagctgag gcaggccgaa gtgattaagg 3420
ggtcttggca gcctgtgggc gatctgctga ttgattccct gcaggaccac ctggaaaagg 3480
tgaaggctct gagaggcgaa attgctccac tgaaggagaa cgtgagtcat gtgaacgatc 3540
tggctagaca gctgacaaca ctgggcatcc agctgagccc atacaatctg agcacactgg 3600
aggacctgaa taccaggtgg aagctgctgc aggtggctgt ggaagaccgg gtgcggcagc 3660
tgcatgaggc ccatcgcgac ttcggaccag ccagccagca ctttctgagc acatccgtgc 3720

[0012]

aggggccctg ggagagggcc atttctccca acaaggtgcc ctactatatt aatcacgaga 3780
cccagaccac ttgttgggac catcccaaga tgacagaact gtaccagtcc ctggccgatc 3840
tgaacaacgt gaggtttagc gcttacagaa ccgctatgaa gctgagacgg ctgcagaagg 3900
ccctgtgcct ggatctgctg tccctgtccg ccgcctgcga tgccctggat cagcataatc 3960
tgaagcagaa cgatcagcca atggatatcc tgcagatcat caactgcctg accactatct 4020
acgacaggct ggagcaggag cacaacaacc tggtgaacgt gcctctgtgc gtggatatgt 4080
gcctgaactg gctgctgaac gtgtatgaca ctgggcgcac cggccggatc agagtgctga 4140
gttttaaaac tgggattatc tccctgtgta aggcccacct ggaggacaag tacaggtacc 4200
tgttcaagca ggtggctagt agcactggat tttgtgacca gcgccgcctg ggactgctgc 4260
tgcatgatag tatccagatt cctagacagc tgggagaggt ggctagtttc ggaggatcta 4320
acatcgaacc cagcgtgcgc agctgtttcc agtttgccaa taacaaacct gaaatcgagg 4380
ctgctctgtt cctggattgg atgcgcctgg aaccacagag catggtgtgg ctgcctgtgc 4440
tgcacagagt ggctgccgcc gaaactgcca agcaccaggc taaatgcaac atctgcaagg 4500
aatgtcccat tatcggcttt cgctacagga gtctgaaaca ttttaactac gatatttgcc 4560
agagctgctt cttttccgga agagtggcca aaggacacaa gatgcactac cctatggtgg 4620
aatattgcac cccaactaca tctggcgaag atgtgcgcga ttttgccaag gtgctgaaga 4680
ataagtttcg gactaagagg tacttcgcca agcacccccg catggggtat ctgccagtgc 4740
agacagtgct ggaaggagac aatatggaga ccgatacaat gtgagcggcc gcaataaaag 4800
atctttattt tcattagatc tgtgtgttgg ttttttgtgt gtctagagca tggctacgta 4860
gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4920
actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc 4980
ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gccagctggc gtaatagcga 5040
agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggaagtt 5100
ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc gtttttcctg ttgcaatggc 5160
tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat agtttgagtt cttctactca 5220
ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca acggttaatt tgcgtgatgg 5280
acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac acttctcagg attctggcgt 5340
accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt agctcccgct ctgattctaa 5400
cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata gtacgcgccc tgtagcggcg 5460
cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc 5520
tagcgcccgc tcctttcgct ttcttcccttcctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc 5580
gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgattta cggcacctcg 5640
accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 5700
tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg 5760
gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt 5820
cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa 5880
tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt cctgtttttg gggcttttct 5940
gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt acgattaccg ttcatcgatt 6000
ctcttgtttg ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc ctttgtagag acctctcaaa 6060
aatagctacc ctctccggca tgaatttatc agctagaacg gttgaatatc atattgatgg 6120
tgatttgact gtctccggcc tttctcaccc gtttgaatct ttacctacac attactcagg 6180
cattgcattt aaaatatatg agggttctaa aaatttttat ccttgcgttg aaataaaggc 6240
ttctcccgca aaagtattac agggtcataa tgtttttggt acaaccgatt tagctttatg 6300
ctctgaggct ttattgctta attttgctaa ttctttgcct tgcctgtatg atttattgga 6360

[0013]

tgttggaagt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc 6420
atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac 6480
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 6540
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 6600
cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 6660
atggtttctt agacgtcagg tggcacttttcggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 6720
ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 6780
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 6840
ccctttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 6900
aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 6960
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa 7020
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 7080
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 7140
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 7200
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac 7260
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 7320
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 7380
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 7440
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 7500
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 7560
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 7620
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 7680
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag 7740
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 7800
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 7860
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat 7920
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 7980
actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcgt 8040
acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 8100
cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 8160
gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 8220
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 8280
gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 8340
tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 8400
tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 8460
gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat 8520
aaccgtatta ccgggtttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 8580
agcgagtcag tgagcgacca agcggaagag c 8611

<210> 7
<211> 792
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 合成启动子

<400> 7

aagcttgcat gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60
aggggaggtg gtgtgagacg ctcctgtctc tcctctatct gcccatcggc cctttgggga 120
ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcga gggcaacaga 180
cctttcatgg gcaaaccttg gggccctgct gtctagcatg ccccactacg ggtctaggct 240
gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaacccaga 300
catgtggctg ccccccccc cccaacacct gctgcctcta aaaataaccc tgtccctggt 360
ggatcccctg catgcgaaga tcttcgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420
caggcttggg ggccagggct tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt 480
tcccggcgaa gggccagctg tcccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag 540
tgagcaagtc agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600
ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg 660
gcccctccct ggggacagcc cctcctggct agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac 720
ccaggggcac aggggctgcc ctcattctac caccacctcc acagcacaga cagacactca 780
ggagcagcca gc 792

<210> 8
<211> 8629
<212> DNA
<213> 腺相关病毒

<400> 8

[0014]

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60
tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120
gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag 180
agtttaaaca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 240
ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc 300
ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag 360
ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 420
gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480
taacccagac atgtggctgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct 540

gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 600
aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact 660
gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 720
aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa 780
gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct 900
ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 960
agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 1020
caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt 1080
tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc 1140
ggccgccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200
gaagaagact tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat 1260
cgagaatctg ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320
gactggccag aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt 1380

[0015]

gaacaaagct ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac 1440
tgatatcgtg gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca 1500
ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560
gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat 1620
taacttcact acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680
gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga 1740
acatgccttc aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800
tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860
ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920
ccccaaagtg actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca 1980
gattaccgtg agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040
gtcctacgct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt 2100
tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag 2160
cgaggtgaat ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220
tgctgaagac acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga 2280
tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340
caatatcctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga 2400
aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc 2460
tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520
gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580
gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640
ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt 2700
ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg 2760
ggaccggtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820
cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga 2880
gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct 2940
gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000
gggcaaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060
ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa 3120
actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac 3180
ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa 3240
acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct 3300
gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360
taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420
aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa 3480
cgatctggct agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac 3540
actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600
gcagctgcat gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660
cgtgcagggg ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca 3720
cgagacccag accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780
cgatctgaac aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840
gaaggccctg tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900
taatctgaag cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac 3960
tatctacgac aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020

[0016]

tatgtgcctg aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt 4080
gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140
gtacctgttc aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact 4200
gctgctgcat gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg 4260
atctaacatc gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat 4320
cgaggctgct ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc 4380
tgtgctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg 4440
caaggaatgt cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat 4500
ttgccagagc tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat 4560
ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct 4620
gaagaataag tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680
agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat 4740
aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcta gagtcgacca 4800
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta 4860
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca 4920
aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 4980
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg 5040
cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 5100
actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 5160
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 5220
ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 5280
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 5340
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 5400
cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc 5460
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 5520
gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 5580
ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 5640
acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 5700
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 5760
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 5820
tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 5880
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 5940
tctaaagtat atatgagtaa aaatattccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag 6000
gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 6060
aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 6120
ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 6180
caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg 6240
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 6300
cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact 6360
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatcc 6420
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 6480
cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 6540
actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 6600
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc 6660

[0017]

gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 6720
ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 6780
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 6840
atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 6900
accggtaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 6960
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 7020
ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 7080
ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 7140
cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 7200
cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 7260
tactgagagt gcaccatatg cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 7320
gcatcaggcg attccaacat ccaataaatc atacaggcaa ggcaaagaat tagcaaaatt 7380
aagcaataaa gcctcagagc ataaagctaa atcggttgta ccaaaaacat tatgaccctg 7440
taatactttt gcgggagaag cctttatttc aacgcaagga taaaaatttt tagaaccctc 7500
atatatttta aatgcaatgc ctgagtaatg tgtaggtaaa gattcaaacg ggtgagaaag 7560
gccggagaca gtcaaatcac catcaatatg atattcaacc gttctagctg ataaattcat 7620
gccggagagg gtagctattt ttgagaggtc tctacaaagg ctatcaggtc attgcctgag 7680
agtctggagc aaacaagaga atcgatgaac ggtaatcgta aaactagcat gtcaatcata 7740
tgtaccccgg ttgataatca gaaaagcccc aaaaacagga agattgtata agcaaatatt 7800
taaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca 7860
ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 7920
atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 7980
aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc 8040
taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc 8100
ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 8160
gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 8220

acacccgccg cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtact atggttgctt tgacgagcac 8280
gtataacgtg ctttcctcgt tagaatcaga gcgggagcta aacaggaggc cgattaaagg 8340
gattttagac aggaacggta cgccagaatc ctgagaagtg tttttataat cagtgaggcc 8400
accgagtaaa agagtctgtc catcacgcaa attaaccgtt gtcgcaatac ttctttgatt 8460
agtaataaca tcacttgcct gagtagaaga actcaaacta tcggccttgc tggtaatatc 8520
cagaacaata ttaccgccag ccattgcaac ggaatcgcca ttcgccattc aggctgcgca 8580
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagct 8629

<210> 9
<211> 4977
<212> DNA
<213> 腺相关病毒
<400> 9

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60
tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120
gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag 180
agtttaaaca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 240
ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc 300

[0018]

ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag 360
ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 420
gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480
taacccagac atgtggctgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct 540
gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 600
aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact 660
gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 720
aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa 780
gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct 900
ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 960
agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 1020
caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt 1080
tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc 1140
ggccgccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200
gaagaagact tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat 1260
cgagaatctg ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320
gactggccag aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt 1380
gaacaaagct ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac 1440
tgatatcgtg gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca 1500
ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560
gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat 1620
taacttcact acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680
gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga 1740
acatgccttc aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800
tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860
ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920
ccccaaagtg actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca 1980
gattaccgtg agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040
gtcctacgct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt 2100
tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag 2160
cgaggtgaat ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220
tgctgaagac acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga 2280
tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340
caatatcctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga 2400
aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc 2460
tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520
gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580
gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640
ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt 2700
ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg 2760
ggaccggtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820
cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga 2880
gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct 2940

[0019]

gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000
gggcaaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060
ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa 3120
actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac 3180
ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa 3240
acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct 3300
gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360
taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420
aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa 3480
cgatctggct agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac 3540
actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600
gcagctgcat gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660
cgtgcagggg ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca 3720
cgagacccag accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780
cgatctgaac aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840
gaaggccctg tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900
taatctgaag cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac 3960
tatctacgac aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020
tatgtgcctg aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt 4080
gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140
gtacctgttc aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact 4200
gctgctgcat gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg 4260
atctaacatc gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat 4320
cgaggctgct ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc 4380
tgtgctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg 4440
caaggaatgt cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat 4500
ttgccagagc tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat 4560
ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct 4620
gaagaataag tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680
agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat 4740
aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcta gagtcgacca 4800
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta 4860
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca 4920
aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 4977

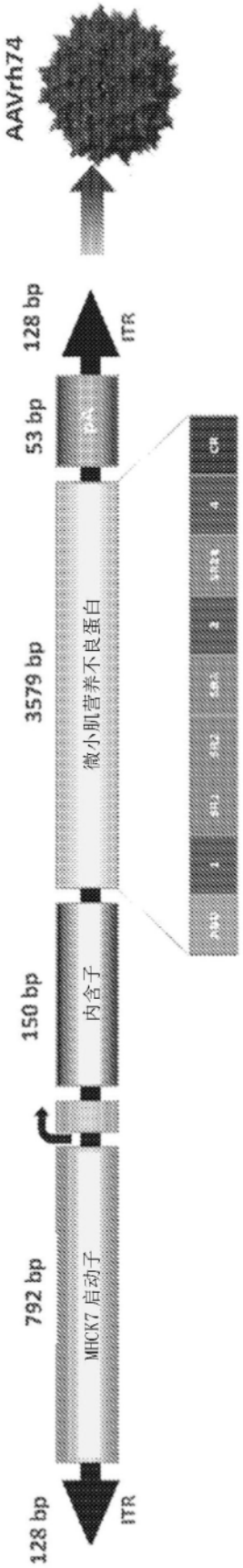

AAVrh74
128 bp
ITR
53 bp
3579 bp
微小肌营养不良蛋白
150 bp
内含子
792 bp
MHCK7 启动子
128 bp
ITR

图1

SEQ ID NO: 3

rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白

主要特征：

ITR
MHCK7 启动子
嵌合内含子序列
人微小肌营养不良蛋白序列
多聚 A 尾
氨苄青霉素抗性

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCT**GCG**
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA
ACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCT
ACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaagcttgcatgtctaagctagaccttcagattaaaaataactgaggtaagggcct
gggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgcccatcggccctttggggaggaggaatgtgcccaaggactaaaaaa
aggccatggagccagaggggcgagggcaacagacctttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacgggtcta
ggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataattaacccagacatgtggctgcccccccccccccaac
acctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcgaagatcttcgaacaaggctgtgggggactgagggcaggctg
taacaggcttgggggccagggcttatacgtgcctgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaagggccagctgtccccgc
cagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaagctgcac
gcctgggtccggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcccctcctg
gctagtcacaccctgtaggctcctctatataacccaggggcacaggggctgccctcattctaccaccacctccacagcacagacagacact
caggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGAT
CCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAG
GCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGC
CACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGA
AGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCAC
ATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAA
GGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCT
GAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGA
ATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCT
GGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGG
CTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCG
CAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGC
CCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGT
GTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCA
GCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATA
AAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGT

CTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGACTAAA
GAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGC
CTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCCTACGC
TTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTTCCATC
CCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCG
AGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTG
AGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGT
GAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGG
GGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAAACTG
AGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCT
GGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTG
ATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGA
GGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTG
AAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGG
TGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGAT
CACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAA
CATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAAT
GGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAG
GACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTC
TAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCA
TGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACAAGAGC
GTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCT
GGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCC
AGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAACCCGC
GAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAA
GAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGAC
CTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCT
GCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAA
TTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACA
ACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATAC
CAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGG
CCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCAGGGGC
CCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCC
AGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATC
TGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAG
AAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGATGCCCTGGATCAG
CATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTG
ACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCT
GTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGG
CCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGGCCCACCT
GGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTG
ACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGG
GAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCC
AGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCTGGATTGGATGCGCC
TGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAA
ACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTT

CGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCG
GAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATATTGCACCCCA
ACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGG
ACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGT
GCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGtgaGCGGCCGCAATAAAAGATCT
TTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAGCATGGCTACGTAGA
TAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG**
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT
CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGATTCCGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATA
TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA
ATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCG
GTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTA
AAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCA
CGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG
CCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT
TTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTT
TGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATT
ACCGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTT
GTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG
TTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATC
TTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTT
TATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTT
TTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT
CTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAATCGCCTGATGCGGTATTTTCTC
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCT
CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGC
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGG
TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA

GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG
CCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC
GCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT
ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT
AGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC
CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC
TTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCT
ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCT
GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
AGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT
CCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
CAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC
CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC
CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA
GAGC

图2

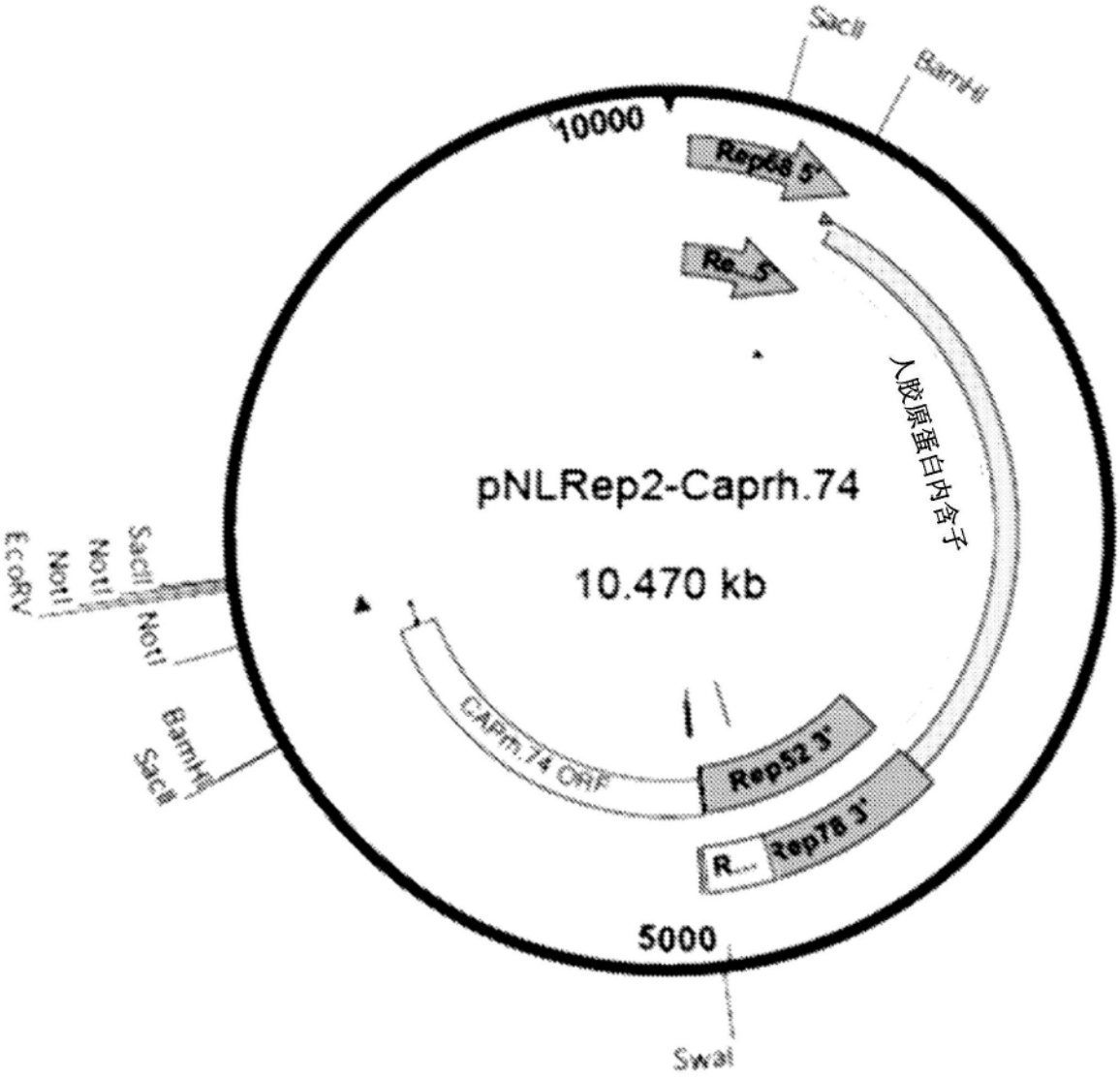

SacII
BamHI
10000
Rep68 5'
Rep40 5'
人胶原蛋白内含子
pNLRep2-Caprh.74
10.470 kb
SacII
NotI
NotI
EcoRV
NotI
BamHI
SacII
CAPrh.74 ORF
Rep52 3'
R...
Rep78 3'
5000
SwaI

图3

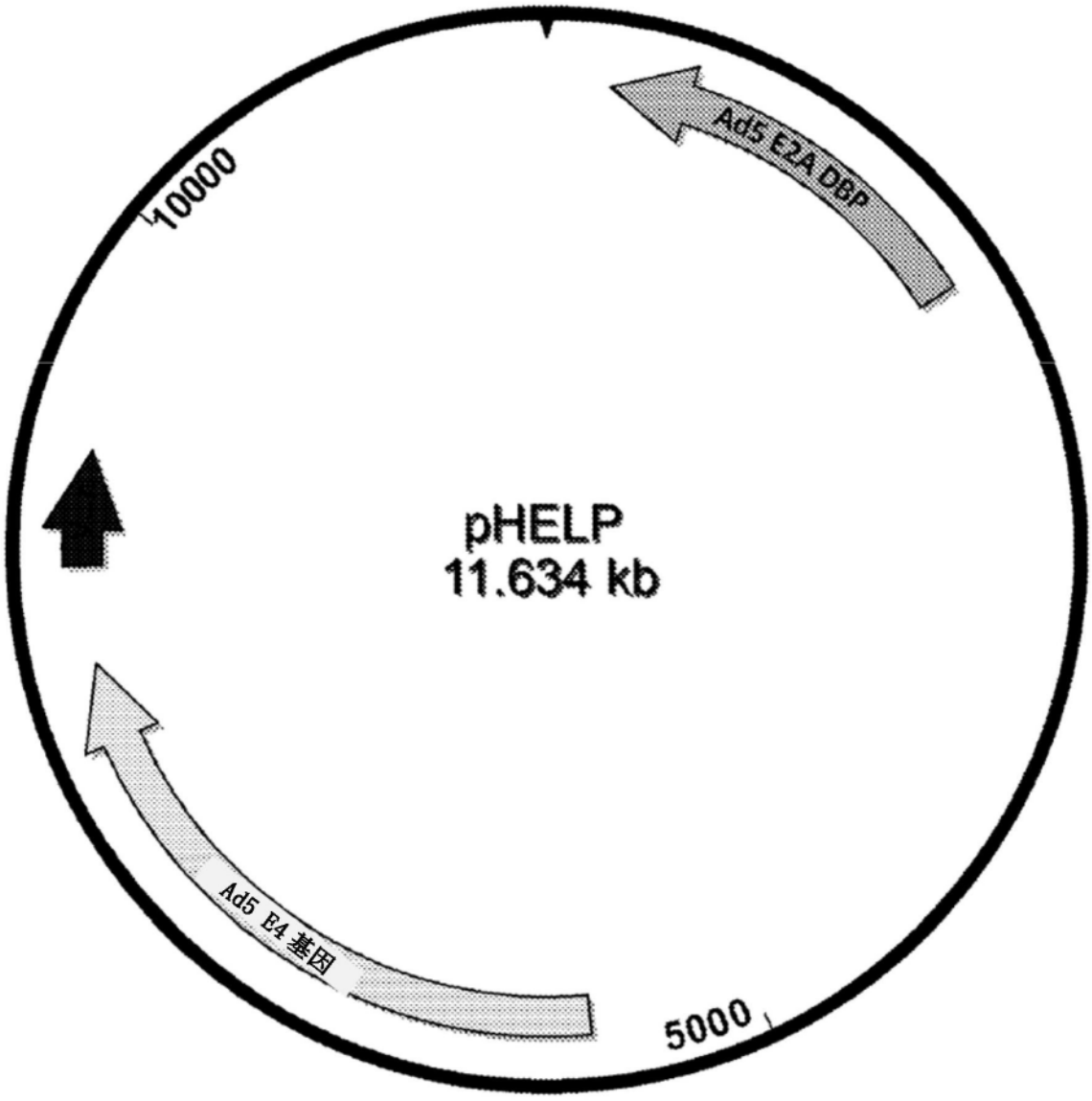


图4

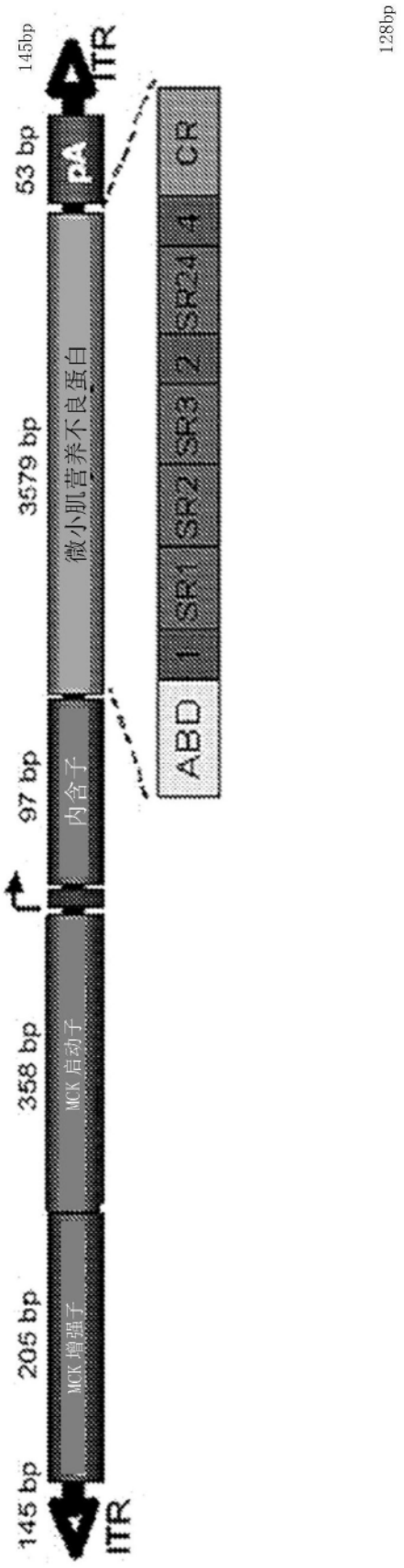

145bp
ITR
53 bp
PA
3579 bp
微小肌营养不良蛋白
97 bp
内含子
358 bp
MCK 启动子
205 bp
MCK 增强子
145 bp
ITR
128bp
ABD
1
SR1
SR2
SR3
2
SR2J
4
CR

图5

SEQ ID NO: 5

rAAVrh74.MCK.微小肌营养不良蛋白

主要特征：
ITR
MCK 启动子
嵌合内含子序列
人密码子优化的微小肌营养不良蛋白序列-
多聚 A 尾
氨苄青霉素抗性
具有 pBR322 复制起点或复制序列的 pGEX 质粒骨架

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTG**GCGCGCTCGCTCGCTCACTGA**
GGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGC
CATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTG
GTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCC
TGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGG
ACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCA
TGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAG
CCCTTGGGGCAGCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCC
GGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCT
GTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCCCGGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACA
CTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAA
TCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTG
CGGAATTGTACCCGCGGCCGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTT
CCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAG
GGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCT
GGTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCTGGAACATTATTCT
GCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGC

TGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACG

GGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGT

CTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAG

AGGATGTGGACACTACATACCCAGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACA

GCAGGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGACTAAAGAGGAGCATTT

TCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAG

TCCAAAACCACGGTTCAAGTCCTACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCT

TTCCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAGGTGAATCTG

GATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGG

CGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGC

TCACCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAAACTGAGTGAGGACG

AGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGA

GAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGA

CAAAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGAAGAGACA

GGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGG

TGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGAC

CGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAG

GCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAA

CCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAA

AGAAGCAGAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACAAGAGCGTGACC

CAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTAC

AGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACC

GTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAAGAAGAGA

ACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGAT

TAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCT

GAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGG

GCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTG

TGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACAT

CCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCA

CTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTA

CAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGA

TGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACT

ATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGG

CTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGT

GTAAGGCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGC

GCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGAT

CTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCT

GGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTG

CCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTT

TAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTG

GAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTA

AGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAG

ACCGATACAATGTGAGC**GGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG**CTA

GAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC**

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCG

GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA

CAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTT

TTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCA

GGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTC

GGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCT

CCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCC

CTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC

GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT

CCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT

GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA

AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT

AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTT

ATACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTAC

CGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAG

CTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTT

TCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTTAT

CCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTT

ATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTG

ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT

GCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCAT
CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGC
GAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC
CTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAA
GATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
AAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTT
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGAT
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAAC
AACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG
GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC
GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA
AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACC
AGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA
CCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGC
TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAG
TTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT
ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTAT
AGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA
AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTAT
CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGC
GCAGCGAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

图6

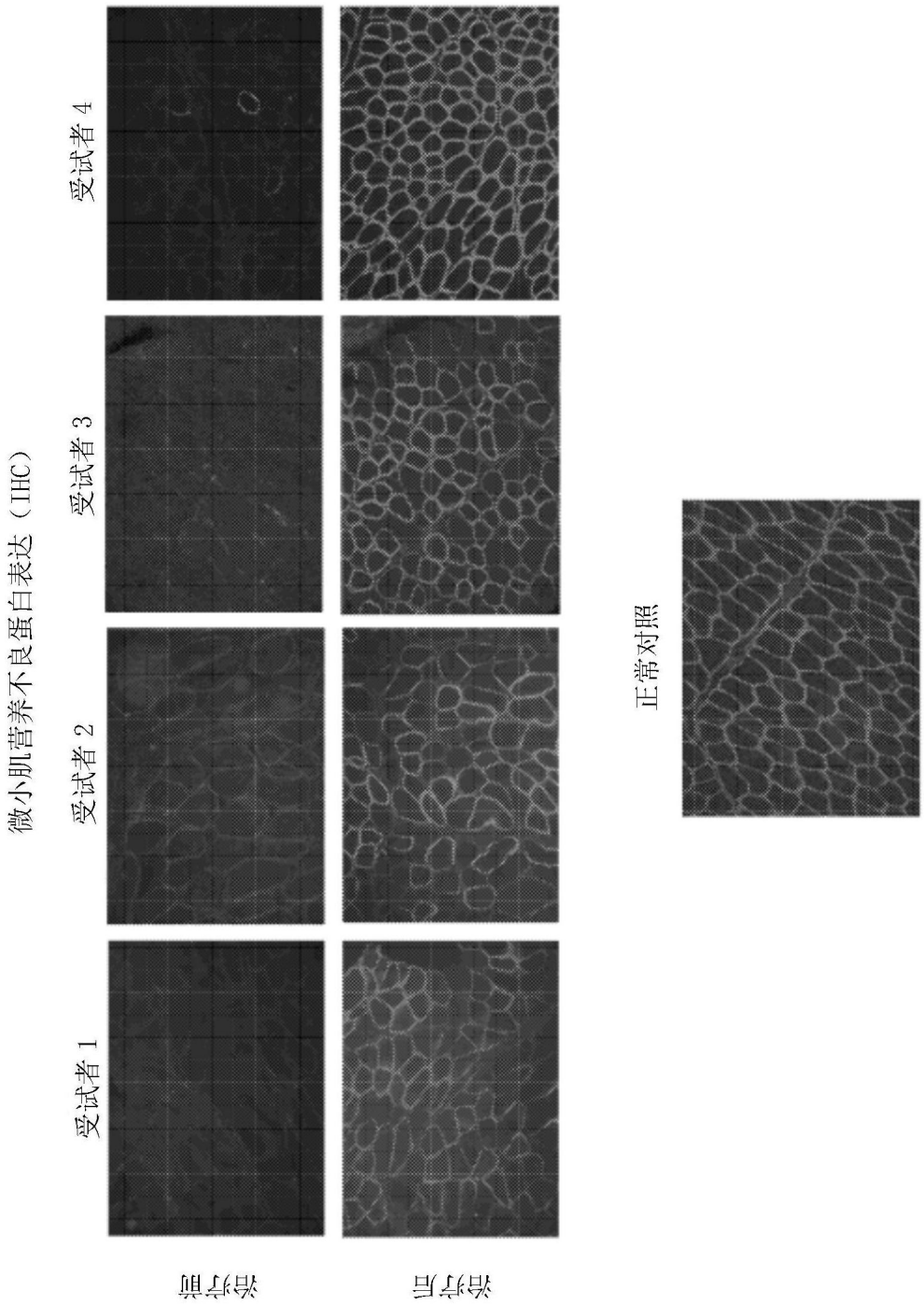


图7

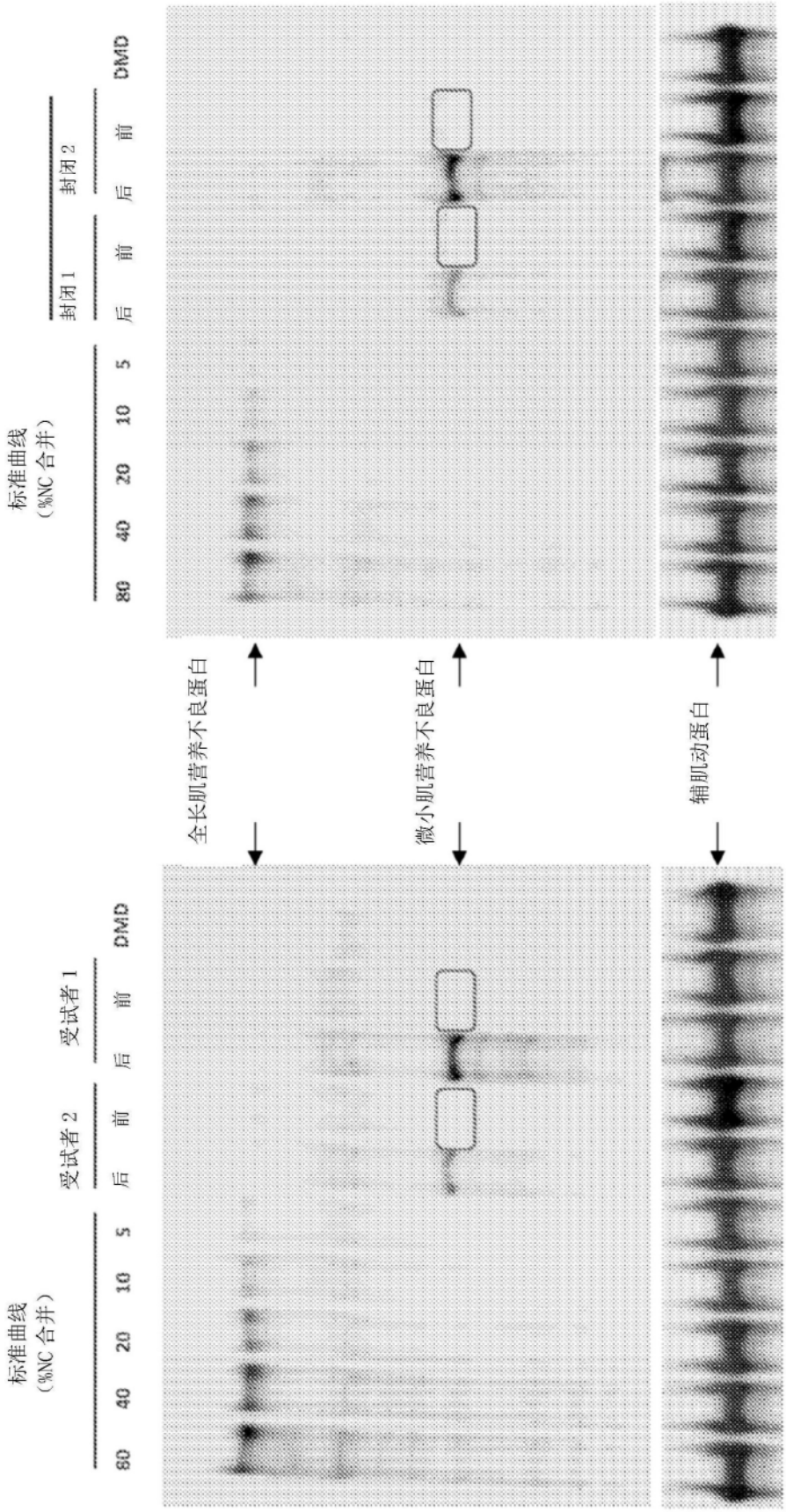

标准曲线
(%NC 合并)
80
40
20
10
5
后
前
受试者 2
受试者 1
DMD
全长肌营养不良蛋白
微小肌营养不良蛋白
辅肌动蛋白
封闭 1
封闭 2

图8A

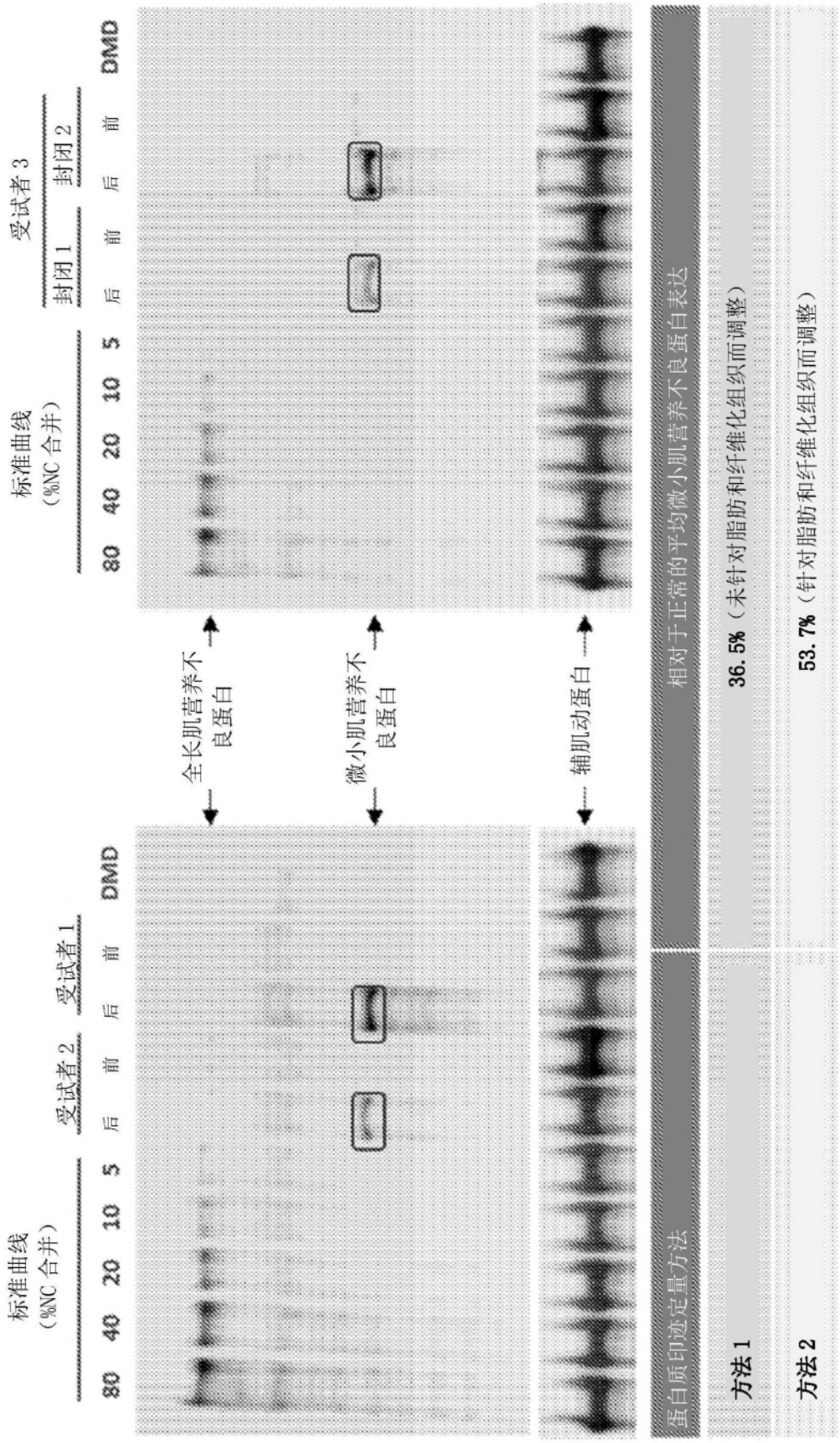

标准曲线
(%NC 合并)
80 40 20 10 5
受试者 2
后 前
受试者 1
后 前
DMD
全长肌营养不良蛋白
微小肌营养不良蛋白
辅肌动蛋白
标准曲线
(%NC 合并)
80 40 20 10 5
受试者 3
封闭 1
后 前
封闭 2
后 前
DMD
蛋白质印迹定量方法
相对于正常的平均微小肌营养不良蛋白表达
方法 1
36.5%（未针对脂肪和纤维化组织而调整）
方法 2
53.7%（针对脂肪和纤维化组织而调整）

图8B

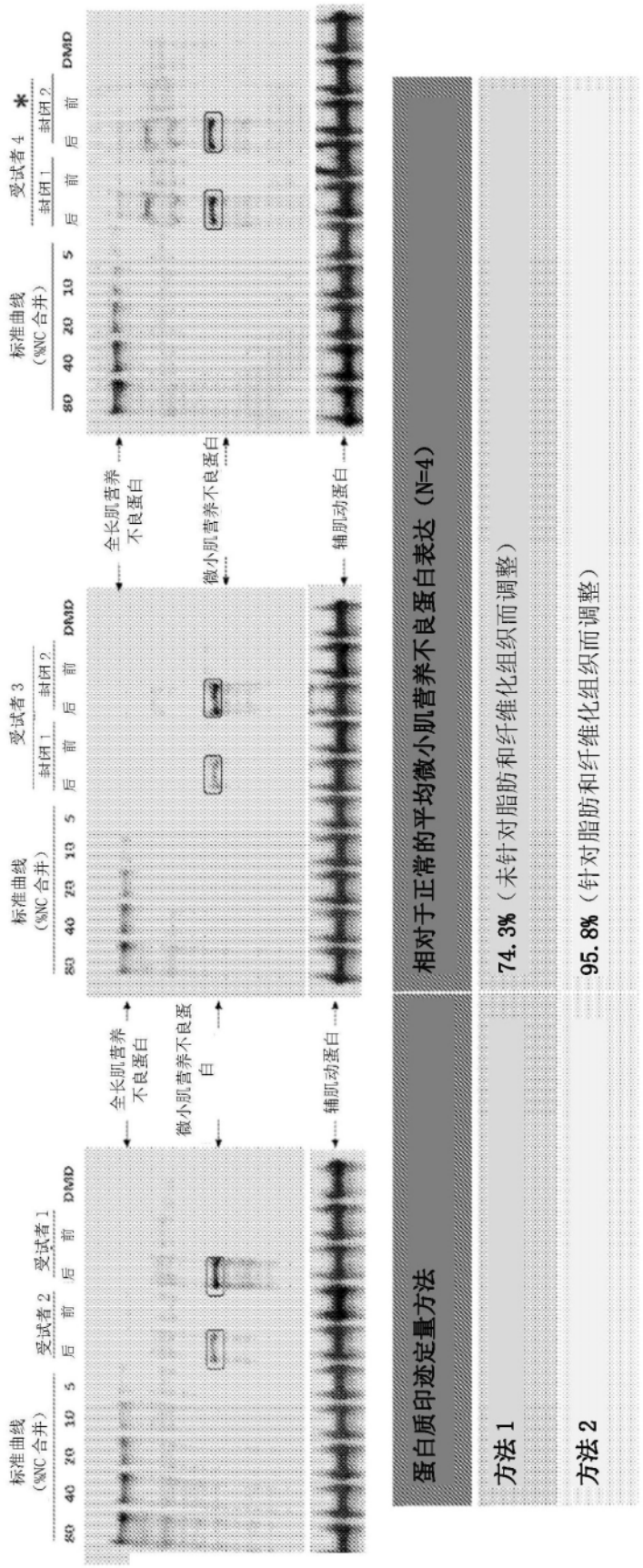

标准曲线
(%NC 合并)
80 40 20 10 5
受试者 2
后 前
受试者 1
后 前
DMD
全长肌营养不良蛋白
微小肌营养不良蛋白
辅肌动蛋白
受试者 3
封闭 1
后 前
封闭 2
后 前
DMD
全长肌营养不良蛋白
微小肌营养不良蛋白
辅肌动蛋白
受试者 4 *
封闭 1
后 前
封闭 2
后 前
DMD
蛋白质印迹定量方法
相对于正常的平均微小肌营养不良蛋白表达（N=4）
方法 1
74.3%（未针对脂肪和纤维化组织而调整）
方法 2
95.8%（针对脂肪和纤维化组织而调整）

图8C

图9A

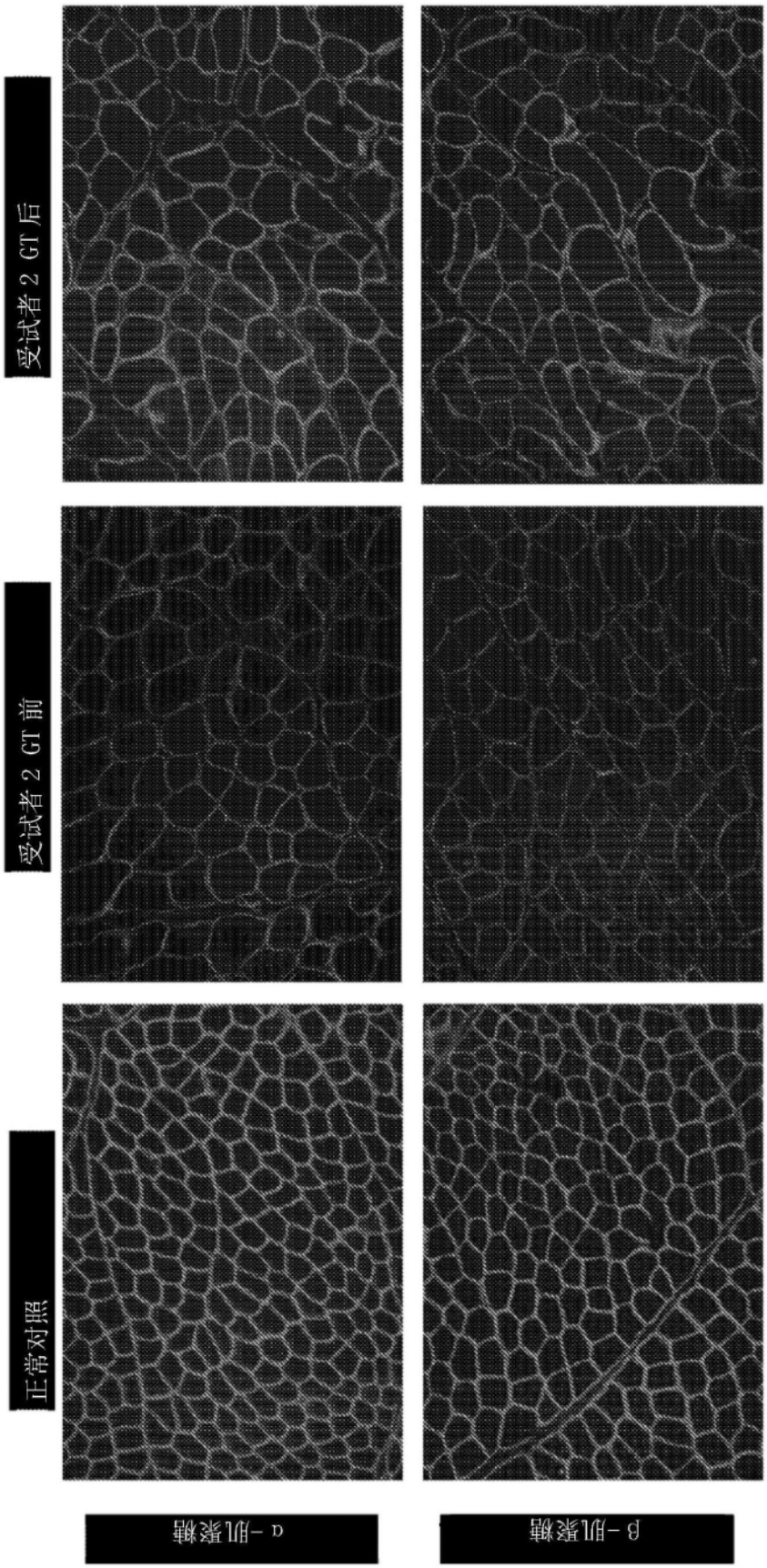


图9B

图9C

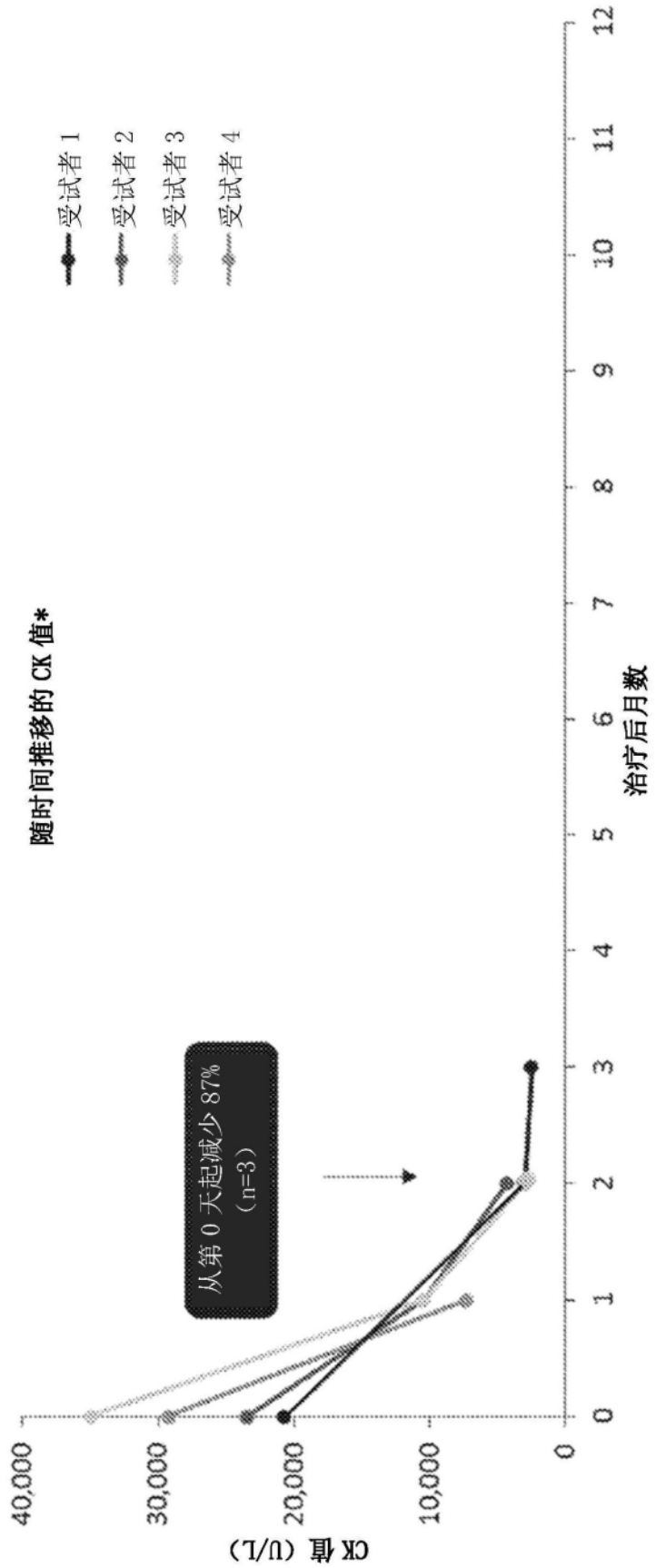

随时间推移的 CK 值*
受试者 1
受试者 2
受试者 3
受试者 4
从第 0 天起减少 87%
（n=3）
CK 值（U/L）
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
治疗后月数

图10

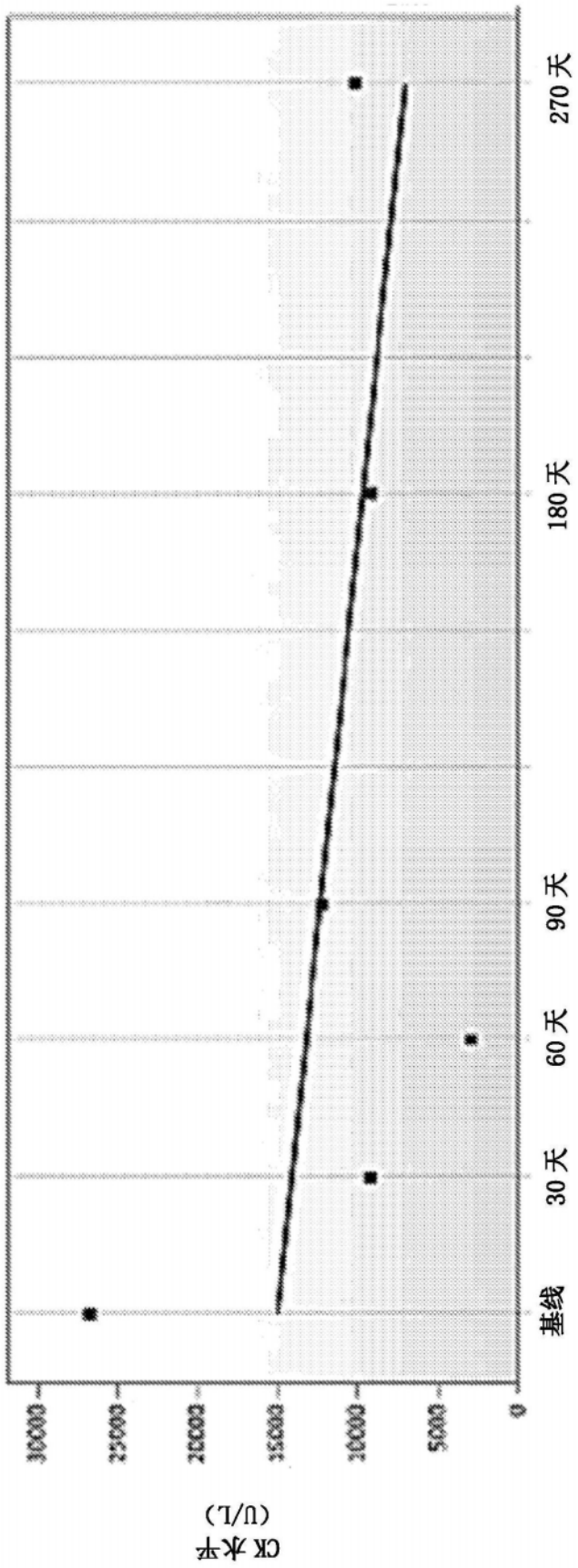


图11:平均CK水平随时间推移显著降低

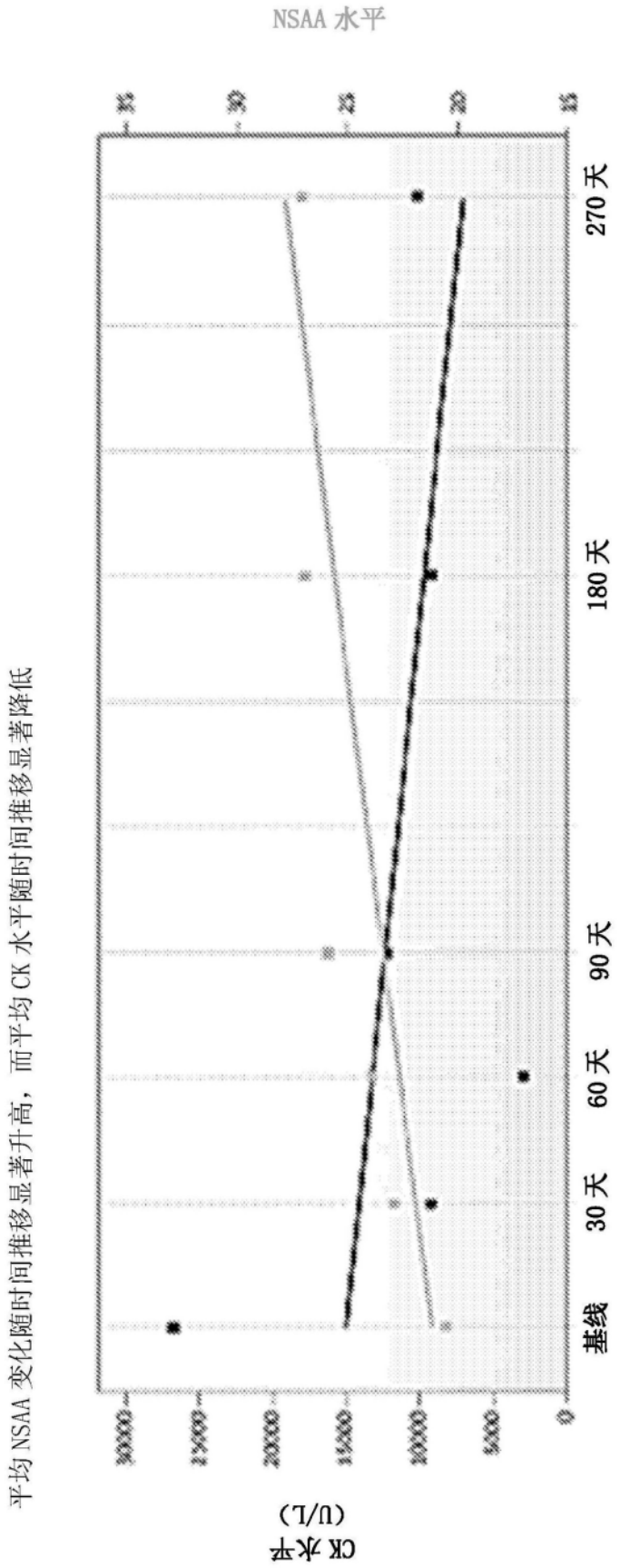

NSAA 水平
CK 水平
(U/L)
基线
30 天
60 天
90 天
180 天
270 天
平均 NSAA 变化随时间推移显著升高，而平均 CK 水平随时间推移显著降低

图12

SEQ ID NO: 9
rAAVrh74.MHCK7.微小肌营养不良蛋白

主要特征：
ITR
MHCK7 启动子
嵌合内含子序列
人微小肌营养不良蛋白序列
多聚 A 尾

GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG
CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTT
ATCTACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaagcttgcatgtctaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaa
gggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgcccatcggccctttggggaggaggaatgtgcccaaggact
aaaaaaaggccatggagccagaggggcgagggcaacagaccttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacg
ggtctaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataattaacccagacatgtggctgccccccccccc
cccaacacctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcgaagatcttcgaacaaggctgtgggggactgagggc
aggctgtaacaggcttgggggccagggcttatacgtgcctgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaagggccagctgtcc
cccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaag
ctgcacgcctgggtccggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcc
cctcctggctagtcacaccctgtaggctcctctatataacccaggggcacaggggctgccctcattctaccaccacctccacagcacagaca
gacactcaggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCG
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTC
TAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC
CGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAG
CACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTG
GAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACG
CCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTG
GTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCT
GATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGG
CCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGC
ACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGG
CTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGC
GTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGG
TACCAGCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCC
AGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCA
GGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGA
CTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCG
TGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCC
TACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTT
CCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGA

AAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGC
TGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAA
GTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCA
CCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGA
AACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAG
CCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGG
TGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAG
ACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGG
ATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA
GCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTG
GAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGG
GCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCT
GAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGA
AAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG
CTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCA
GAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACA
AGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGAC
AACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCAC
AACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAA
CCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCC
CAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAAC
TGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGC
GATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGG
CGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAA
CGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGA
GCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGAC
CGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTT
TCTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGC
CCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAG
AACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCG
CTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCG
CCGCCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGAT
ATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCA
CAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAA
CGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGA
TTATCTCCCTGTGTAAGGCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGG
TGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATA
GTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCG
AACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTG
CTCTGTTCCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGC
TGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGC
AAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGAT
ATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTAC
CCTATGGTGGAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCC
AAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCAT
GGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAA

TGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTG
TGTGtctagagtcgaccagagcatggctacgtagataagtagcatggcgg**gttaatcattaactacaAGGAACCCCTAG**
TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG
AGCGAGCGCGC

图13

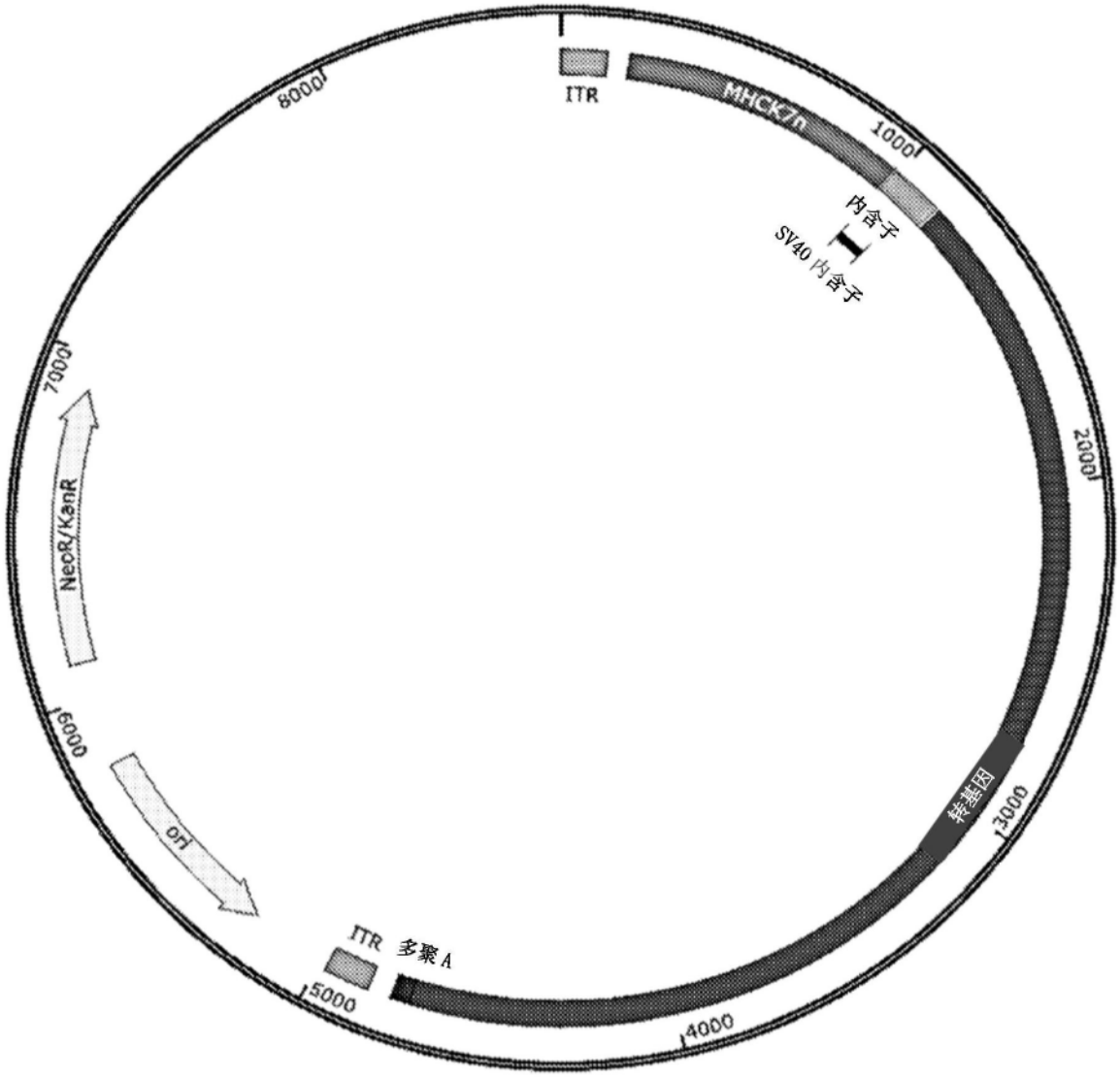


图14

SEQ ID NO: 8

主要特征：

ITR

MHCK7 启动子

嵌合内含子序列

人微小肌营养不良蛋白序列

多聚 A 尾

卡那霉素抗性

GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG
CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTT
ATCTACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaagcttgcatgtctaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaa
gggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgcccatcggccctttggggaggaggaatgtgcccaaggact
aaaaaaaggccatggagccagaggggcgagggcaacagaccctttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacg
ggtctaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataattaacccagacatgtggctgccccccccccc
cccaacacctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcgaagatcttcgaacaaggctgtgggggactgagggc
aggctgtaacaggcttgggggccagggcttatacgtgcctgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaagggccagctgtcc
cccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaag
ctgcacgcctgggtccggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcc
cctcctggctagtcacaccctgtaggctcctctatataacccaggggcacaggggctgccctcattctaccaccacctccacagcacagaca
gacactcaggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCG
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTC
TAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC
CGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAG
CACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTG
GAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACG
CCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTG
GTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCT
GATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGG
CCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGC
ACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGG
CTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGC
GTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGG
TACCAGCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCC
AGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCA
GGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGA
CTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCG

TGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCC
TACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTT
CCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGA
AAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGC
TGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAA
GTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCA
CCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGA
AACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAG
CCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGG
TGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAG
ACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGG
ATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA
GCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTG
GAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGG
GCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCT
GAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGA
AAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG
CTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCA
GAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACA
AGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGAC
AACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCAC
AACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAA
CCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCC
CAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAAC
TGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGC
GATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGG
CGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGC
TGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTG
AATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCA
TGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCA
GGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGA
GACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGG
CCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGG
CTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGATGCCCTG
GATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAA
CTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAACG
TGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGC
GCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGG
CCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGA
TTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGA

CAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAG
CTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCTGGATTG
GATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTG
CCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATT
ATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGC
TTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATAT
TGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAAT
AAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTG
CAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGCGGCCGCAAT
AAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGtctagagtcgaccagagcat
ggctacgtagataagtagcatggcgg**gttaatcattaactaca**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC
CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCagctgcat
taatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcg
gctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaaCATGTGA
GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC
TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC
AGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG
TGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
TAAAAATATTCCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTG
CAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAA
GATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTG
CACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAA
CAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCG
GTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCA
GCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCT
CCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCG
GCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCG
CATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG

ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGC
ATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC
ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG
GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGC
GAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGC
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAACCGGTAATATTATTGAAGCAT
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTctaagaaaccattat
tatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcag
ctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtc
ggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaa
aataccgcatcaggCGAttccaacatccaataaatcatacaggcaaggcaaagaattagcaaaattaagcaataaagcctcagagcataa
agctaaatcggttgtaccaaaaacattatgaccctgtaatacttttgcgggagaagcctttatttcaacgcaaggataaaaatttttagaaccctc
atatattttaaatgcaatgcctgagtaatgtgtaggtaaagattcaaacgggtgagaaaggccggagacagtcaaatcaccatcaatatgatat
tcaaccgttctagctgataaattcatgccggagagggtagctatttttgagaggtctctacaaaggctatcaggtcattgcctgagagtctgga
gcaaacaagagaatcgatgaacggtaatcgtaaaactagcatgtcaatcatatgtaccccggttgataatcagaaaagccccaaaaacagg
aagattgtataagcaaatatttaaattgtaaGcgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttttaaccaataggccg
aaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacg
tggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagtttttttggggtcgag
gtgccgtaaaGcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaagga
agggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaa
tgcgccgctacagggcgcgtactatggttgctttgacgagcacgtataacgtgctttcctcgttagaatcagagcgggagctaaacaggagg
ccgattaaagggattttagacaggaacggtacgccagaatcctgagaagtgtttttataatcagtgaggccaccgagtaaaagagtctgtcca
tcacgcaaattaaccgttgtcgcaatacttctttgattagtaataacatcacttgcctgagtagaagaactcaaactatcggccttgctggtaatat
ccagaacaatattaccgccagccattgcaacggaatcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcc
tcttcgctattacgccagct

图15